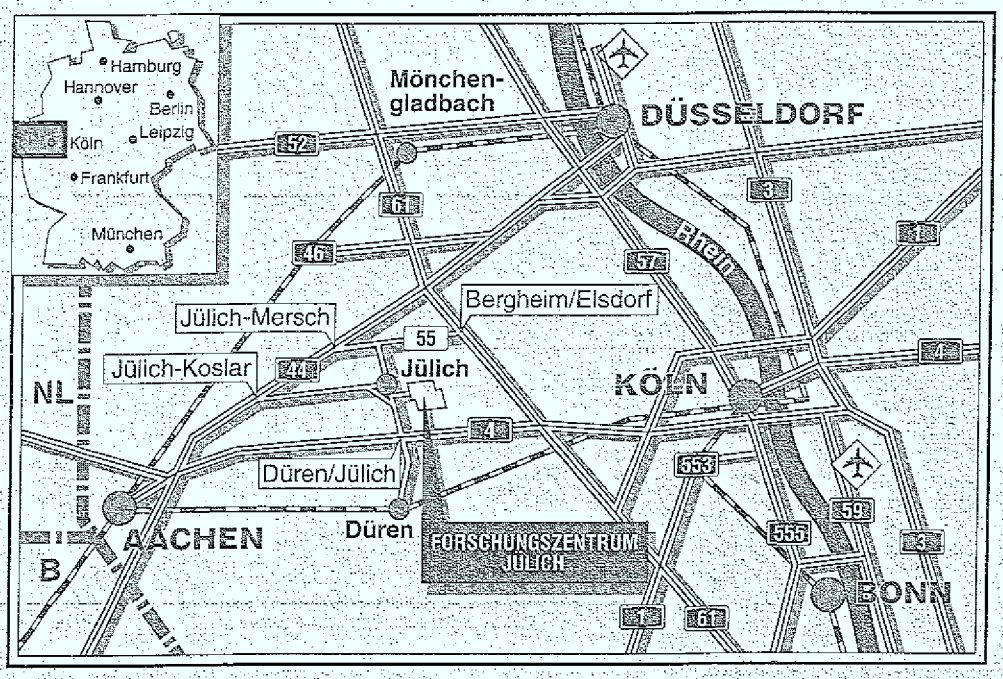
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH KFA

Institut für Biologische Informationsverarbeitung

Transmembranale Topologie der α-Untereinheiten zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle aus Rindersehstäbchen und *Drosophila melanogaster*

Doris Katharina Henn



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3026
ISSN 0944-2952
Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3026
D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Transmembranale Topologie der α-Untereinheiten zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle aus Rinderseh-stäbchen und *Drosophila melanogaster*

Doris Katharina Henn

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
boCNGC	zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal aus olfaktorischem Epithel des Rinds
bp	Basenpaare
brCNGC	zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal aus Rindersehstäbchen
°C	Temperatur in Grad Celsius
cAMP	3′,5′-zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	3′,5′-zyklisches Guanosinmonophosphat
CNG	zyklisch-Nukleotid-gesteuert
CNGC	zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
C-Terminus	Carboxylterminus einer Polypeptidkette
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DmCNGC	zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal aus *Drosophila melanogaster*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreit
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	[Ethylen-bis(oxyethylen-nitrilo)]-tetraessigsäure
ES	extrazelluläres Segment
EtOH	Ethanol
g	Gramm
g	Normal-Fallbeschleunigung (9,81 $m \cdot s^{-2}$)
βGal	β-Galaktosidase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H_2O	Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
IS	intrazelluläres Segment
KAc	Kalium-Acetat

l	Liter
lacZ	kodierende Sequenz des β-Galaktosidasegens
M	molar
$m^7G(5')ppp(5')G$	P^1-5′-(7-Methyl)-guanosin-P^3-5′-guanosin-triphosphat
min	Minute(n)
NaAc	Natrium-Acetat
N-Terminus	Aminoterminus einer Polypeptidkette
OD	Extinktion bei der im Index in nm angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
phoA	kodierende Sequenz des Gens für die alkalische Phosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
S4	Spannungsfühler-Motiv
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethylammonium
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
u	Enzymeinheit (′unit′)
UTP	Uridintriphosphat
z. B.	zum Beispiel

Die einzelnen Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz werden durch den Anfangsbuchstaben der Base bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, U: Uracil). Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code wiedergegeben (A: Alanin, C: Cystein, D: Asparaginsäure, E: Glutaminsäure, F: Phenylalanin, G: Glycin, H: Histidin, I: Isoleucin, K: Lysin, L: Leucin, M: Methionin, N: Asparagin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arginin, S: Serin, T: Threonin, V: Valin, W: Tryptophan, Y: Tyrosin).

1. Einleitung

1.1 Membranproteine

Pro- und eukaryontische Zellen sowie Zellkompartimente sind von einer doppelten Lipidschicht umgeben, die die Grenzschicht zum extrazellulären Raum bzw. zu anderen Kompartimenten innerhalb der Zelle bildet. Diese Lipidmembran ist undurchlässig für die meisten Moleküle und verhindert so die ungeordnete Vermischung von Stoffen beiderseits der Membran. Dadurch ist es möglich, daß z. B. im Zytosol und im extrazellulären Raum unterschiedliche Ionenkonzentrationen aufrecht erhalten werden können. Dennoch muß ein regulierter Austausch von Stoffen über die Membran gewährleistet sein, mit dem die Zelle auf endogene und exogene Signale reagiert und mit dessen Hilfe sie ihre spezifischen Aufgaben erfüllt. Sowohl die Signalübertragung als auch der regulierte Austausch von Stoffen wird mit Hilfe von Membranproteinen bewerkstelligt. Sie bilden die Vermittler zwischen Zelle und Umwelt oder zwischen Zellen in einem Zellverband (Unwin & Henderson, 1984).
Membranproteine lassen sich nach funktionellen Kriterien in mehrere Klassen einteilen. Einige übertragen Signale aus der Umgebung in die Zelle, indem sie mit G-Proteinen wechselwirken und so eine intrazelluläre Signaltransduktionskette in Gang setzen wie beispielsweise der β-adrenerge Rezeptor (O'Dowd et al., 1989) oder Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (Claesson-Welsh et al., 1989). Andere können durch aktive, energieverbrauchende Prozesse große Moleküle oder Ionen entgegen ihrer Konzentrationsgradienten durch die Membran schleusen, wie Glucosetransporter oder Ionenpumpen (Stein, 1990). Wieder andere bilden auf bestimmte Reize hin wässrige Poren in der Membran, so daß Ionen in und aus der Zelle herausfließen können. Man unterscheidet Ionenkanäle nach dem Aktivierungsmechanismus - z. B. spannungsaktivierte oder Liganden-gesteuerte Ionenkanäle - oder nach ihrer Spezifität - z. B. die hoch-selektiven K^+-, Na^+-, Cl^-- und Ca^{2+}-Kanäle (Hille, 1992), bzw. die weniger selektiven Kationenkanäle wie z. B. die zyklisch-Nukleotid-gesteuerten Kanäle (Eismann et al., 1993).
Strukturell lassen sich zwei Klassen von Membranproteinen unterscheiden (Alberts et al., 1989). Die *peripheren* Membranproteine sind an die Membran oder andere Membranproteine angelagert. Die *integralen* Membranproteine durchspannen die Membran komplett. Die Struktur der integralen Membranproteine wird im folgenden detaillierter beschrieben.

1.2 Die Struktur von integralen Membranproteinen

Integrale Membranproteine besitzen hydrophobe Domänen, die sich in die Lipidschicht einlagern, sowie hydrophile Domänen, die auf der intra- und extrazellulären Seite der Membran in die wässrige Umgebung ragen. Die hydrophoben Regionen, mit denen ein Protein in der Membran verankert ist, bezeichnet man als transmembranale Segmente. Die Anzahl dieser Segmente und in welcher Richtung sie die Membran durchspannen bestimmt die "transmembranale Topologie" des Proteins (von Heijne, 1994).
Mit Hilfe einer Hydrophobizitäts-Analyse der Aminosäuresequenz können α-helicale, transmembranale Segmente mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden. Bei dieser Analyse wird die Aminosäuresequenz eines Proteins daraufhin untersucht, ob Bereiche mit einer Häufung von hydrophoben Aminosäuren zu erkennen sind. Nach Kyte und Doolittle (1982) existiert ein transmembranales Segment dann, wenn es ca. 20 Aminosäuren lang ist und wenn auf der von den Autoren definierten Hydrophobizitätsskala der Schwellenwert 1,6 überschritten ist (Abb. 1). Vereinzelt können in solchen transmembranalen Segmenten jedoch auch polare oder geladene Reste vorkommen.
Manche Membranproteine haben nur ein transmembranales Segment, wie die Guanylatzyklasen (Garbers, 1992). Andere, wie G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Donnelly et al., 1994) oder Ionenkanäle (Jessell & Kandel, 1993), besitzen mehrere transmembranale Segmente.
Direkte Verfahren zur genauen Aufklärung der drei-dimensionalen Struktur von integralen Membranproteinen durch Röntgenstrukturanalyse oder elektronenmikroskopische Techniken, waren bisher nur in ganz wenigen Fällen erfolgreich. Ein klassisches Beispiel für die Strukturaufklärung mit Hilfe elektronenmikroskopischer Techniken ist das Bakteriorhodopsin (Henderson & Unwin, 1975; Henderson et al., 1990). Mittlerweile wurde auch die Struktur von Rhodopsin (Schertler et al., 1993) und des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (Unwin, 1993) so weit aufgeklärt, daß einzelne transmembranale Segmente erkennbar waren. Mit Hilfe der Röntgenstrukturdiffraktion wurde die Struktur des bakteriellen Photosynthese-Reaktionszentrums auf atomarer Ebene aufgeklärt (Deisenhofer et al., 1985; Allen et al., 1987; Yeates et al., 1987). Die Kristallisation von Membranproteinen ist jedoch wegen der stark hydrophoben Regionen besonders schwierig. Außerdem lassen sich häufig nicht die für die Röntgenstrukturanalyse erforderlichen Proteinmengen gewinnen, weder durch direkte Reinigung noch durch heterologe Expression des betreffenden Membranproteins.

1.3 Integration von Membranproteinen in die Membran

Der Mechanismus des Einbaus der Membranproteine in die Lipiddoppelschicht ist zwar noch nicht vollständig geklärt, man nimmt aber an, daß er sehr ähnlich wie die Translokation

sekretorischer Proteine durch die Membran abläuft (Singer, 1990). Sekretorische Proteine haben an ihrem N-Terminus eine sogenannte Signalsequenz. Diese besteht aus einer positiv geladenen N-terminalen Region, einer charakteristischen hydrophoben Kernregion von etwa 7 bis 20 Aminosäuren und einer typischerweise 5 bis 6 Aminosäuren langen, polaren Region (von Heijne, 1985). Während sich eine Polypeptidkette an einem Ribosom bildet, wird die Signalsequenz von einem Signalerkennungsteilchen (signal recognition particle, SRP) gebunden. Dieser Komplex von Ribosom, wachsender Polypeptidkette und SRP wird zum SRP-Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Reticulums transportiert und dort gebunden. Das SRP hat hierbei zwei Aufgaben: zum einen führt es das Ribosom und die wachsende Polypeptidkette zur Membran und zum anderen verhindert es eine vorzeitige, falsche Faltung der Polypeptidkette. Nach der Ablösung des SRP von diesem Komplex wird das Ribosom durch einen Ribosomen-Rezeptor an die Membran gebunden. Dort wird die Polypeptidkette von einem komplexen Translokationsapparat durch die Membran transferiert (Rapoport, 1992). Mehrere Proteine bilden einen Protein-leitenden Kanal, so daß auch hydrophile Teile eines sekretorischen Proteins durch die Membran geschleust werden können (Simon & Blobel, 1991; Rapoport, 1991; Görlich & Rapoport, 1993). Die Signalsequenz der sekretorischen Proteine wird nach der Translokation durch spezifische Signalpeptidasen abgespalten und das gereifte Protein wird freigesetzt (Dalbey & von Heijne, 1992). Der hier geschilderte Ablauf gilt sowohl für pro- als auch für eukaryontische Organismen (Jungnickel et al., 1994; Tokuda, 1994)

Integrale Membranproteine müssen ebenfalls partiell durch die Membran geschleust und geordnet eingebaut werden. Sie besitzen häufig keine klassische Signalsequenz, weisen jedoch eine Anzahl von hydrophoben Regionen auf, die insofern Signalsequenzen sehr ähneln, als daß sie häufig eine charakteristische Anhäufung von positiv geladenen Aminosäuren an einem Ende besitzen (von Heijne & Gavel, 1988). Es wird angenommen, daß diese Regionen alternierend als Signalsequenz und als "Stop-Transfersequenz" fungieren. Wenn das erste hydrophobe Segment in die Membran eingebaut worden ist, wird das darauffolgende mehr hydrophile Segment nach außen geschleust, bis das nächste hydrophobe Segment wieder in die Membran eingebaut wird (Stop-Transfersequenz). Der darauffolgende hydrophile Bereich verbleibt im Zytoplasma bis das dritte hydrophobe Segment wiederum in die Membran eingebaut wird. Dieser Mechanismus ist sequentiell, d.h. in Richtung vom N- zum C-Terminus wird ein transmembranales Segment nach dem anderen in die Membran eingebaut (Wessels & Spiess, 1988; Singer, 1990).

1.4 Zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle

In dieser Arbeit sollte die transmembranale Topologie der α-Untereinheiten zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle untersucht werden. Zyklisch-Nukleotid-gesteuerte (CNG) Ionenkanäle werden direkt und kooperativ durch 3′,5′-zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und 3′,5′-zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) geöffnet und gehören zu einer neuen Familie von Ionenkanälen, die durch intrazelluläre Botenstoffe geöffnet werden (Kaupp, 1991; Eismann et al., 1993).

In den Sehstäbchen und -zapfen der Vertebratenretina sind CNG-Kanäle das letzte Glied in der Enzymkaskade der Phototransduktion (Yau & Baylor, 1989; Kaupp & Koch, 1992; Yau, 1994). Im olfaktorischen Epithel spielen sie eine Rolle bei der Duftstoffrezeption (Nakamura & Gold, 1987; Lancet & Pace, 1987; Dhallan et al., 1990; Ludwig et al., 1990; Zufall et al., 1994). Die α-Untereinheiten bilden bei den Kanälen aus Sehstäbchen nach Expression funktionelle Kanäle, denen jedoch einige Eigenschaften der nativen Kanäle fehlen. Sie erhalten diese Eigenschaften, wenn zusätzlich eine β-Untereinheit koexprimiert wird, die etwa 30 % Homologie zu den α-Untereinheiten aufweist (Chen et al, 1993). Mittlerweile wurde eine ganze Reihe von CNG-Kanälen auch in anderen, nicht-sensorischen Zellen, wie Spermienzellen (Weyand et al., 1994), retinalen Ganglienzellen (Ahmad et al., 1994), Nieren- (Ahmad et al., 1992) und Herzzellen (Biel et al., 1993) gefunden. Die Primärstruktur dieser Kanäle ist jedoch jeweils identisch mit einem der drei vorher genannten Kanäle aus sensorischen Zellen. Dies bedeutet, daß die Expression dieser Kanäle nicht nur spezifisch in sensorischen, sondern auch in anderen Geweben erfolgt (Eismann et al., 1993). Die Funktion der CNG Kanäle in nicht-sensorischen Zellen ist noch nicht bekannt. Aus *Drosophila melanogaster* wurde ein CNG-Kanal kloniert, der wahrscheinlich bei der Duftstofferkennung und bei der Phototransduktion funktionell beteiligt ist (Baumann et al., 1994).

CNG-Kanäle besitzen überraschenderweise Sequenzähnlichkeiten zu den spannungsabhängigen Ionenkanälen, insbesondere zu den K^+-Kanälen der *Shaker*-Familie. Diese Ähnlichkeiten beschränken sich jedoch auf zwei Sequenzmotive, das Spannungsfühler-Motiv (S4) (Jan & Jan, 1990) und eine Poren-bildende Region (Heginbotham et al., 1992). Die Hydrophobizitäts-Analysen von K^+-Kanälen sagen eindeutig sechs transmembranale Segmente, S1 bis S6, voraus (Abb. 1). Bisher gibt es jedoch kaum experimentelle Untersuchungen, die dies beweisen. Einzig für S1 (Shen et al., 1993; Babila et al., 1994) und S4 (Stühmer, 1991), den Spannungs-Fühler, ist gezeigt worden, daß sie die Membran durchspannen. Mit Hilfe von Mutationsexperimenten wurde gezeigt, daß eine Region von ca. 20 Aminosäuren zwischen S5 und S6 die wässrige Pore des Ionenkanals bildet (Yool et al., 1991; Hartmann et al., 1991; Miller, 1992). *Shaker* K^+-Kanäle sind durch Tetraethylammonium (TEA) blockierbar. Hierbei kann man zwischen einer Blockierung von der extrazellulären Seite und von der intrazellulären Seite unterscheiden. Mutationen am N- und C-Terminus der Poren-bildenden Region beeinflussen die Blockierung

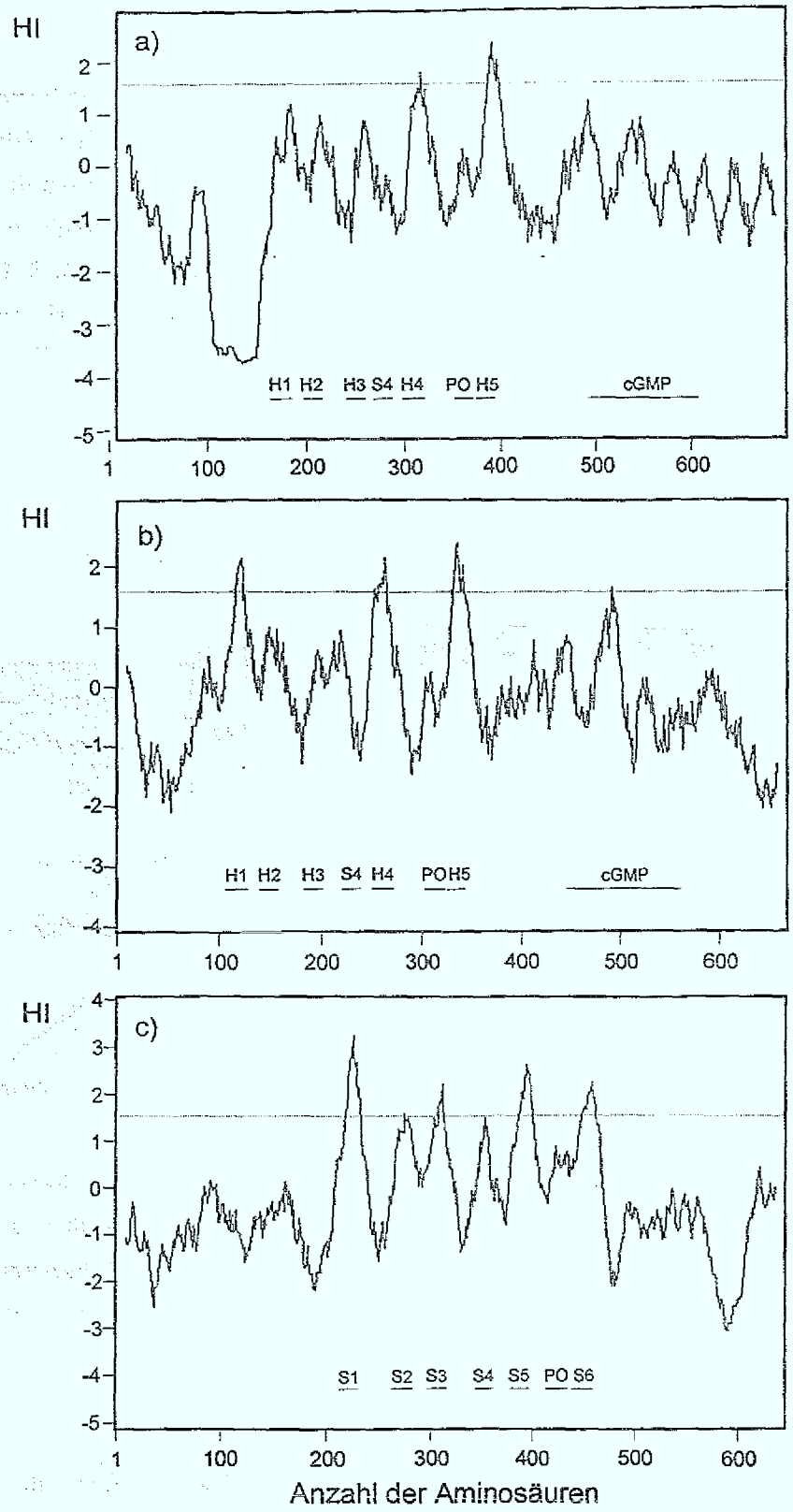


Abb 1: Hydrophobizitäts-Profile der Aminosäuresequenzen der CNG-Kanäle aus Rindersehstäbchen (a) und *Drosophila melanogaster* (b) im Vergleich mit dem *ShakerB* K^+-Kanal (c; Pongs et al., 1988). Der Hydrophobizitäts-Index (HI; Kyte & Doolittle, 1982) ist gegen die Anzahl der Aminosäuren aufgetragen; auf der Höhe des Wertes 1,6 (Kriterium für ein transmembranales Segment) ist eine gestrichelte Linie gezeichnet. Die Fenstergröße beträgt 19 Aminosäuren. Hydrophobe Segmente (H1-H5 und S4 bzw. S1-S6), die Porenbildende Region (PO) und die cGMP-Bindungsstelle sind gekennzeichnet.

durch TEA von außen, Mutationen in der Mitte der Poren-bildenden Region beeinflussen die Blockierbarkeit von innen (Yellen et al., 1991). Hieraus konnte man schließen, daß die Enden dieser Region extrazellulär und der mittlere Teil intrazellulär liegen. Deshalb wurde ein Modell entwickelt, in dem die 20 Aminosäuren der Poren-bildenden Region die Membran zweimal in einer Haarnadel-ähnlichen Struktur durchspannen (Guy & Conti, 1990; Durell & Guy, 1992). In den CNG-Kanälen liegt eine ähnliche Sequenz zwischen den Segmenten H4 und H5 vor. Diese Region ist auch bei den CNG-Kanälen für die Bildung der wässrigen Pore durch die Membran verantwortlich, wie in Mutagenese-Studien bewiesen werden konnte (Root & MacKinnon, 1993; Goulding et al., 1993; Eismann et al., 1994).

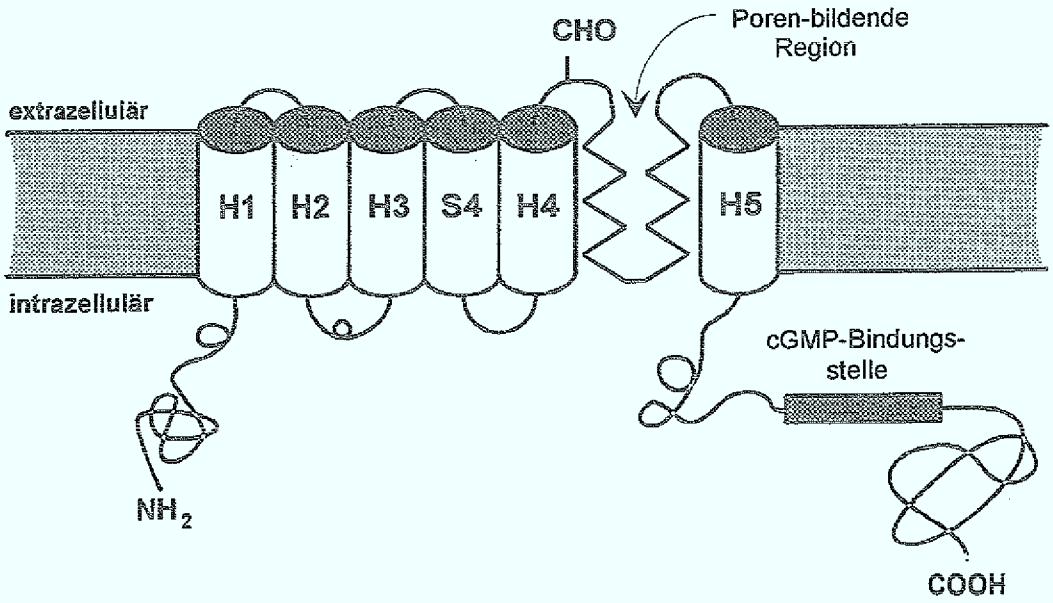


Abb. 2: Modell der transmembranalen Topologie zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle. Das Modell entstand in Anlehnung an das Topologie-Modell der K^+-Kanäle (s. Text). Dargestellt sind die einzelnen putativen transmembranalen Segmente H1 bis H5, sowie das S4-Motiv, die cGMP-Bindungsstelle und die Poren-bildende Region. CHO bezeichnet eine N-Glykosylierungsstelle, die C-terminal von H4 gefunden wurde (Wohlfart et al., 1992)

Auf Grund der Hydrophobizitäts-Analysen der CNG-Kanäle und der entfernten Verwandtschaft von CNG- und K^+-Kanälen wurde das für K^+-Kanäle entwickelte Topologie-Modell auf CNG-Kanäle übertragen (Abb. 2, Wohlfart et al., 1992; Goulding et al., 1992; Bönigk et al., 1993). Wenn man jedoch nur die Hydrophobizitäts-Analyse des CNG-Kanals aus Rindersehstäbchen (Abb. 1a) betrachtet, ist dieses Modell mit sechs transmembranalen Segmenten nicht zwingend. Der Vergleich der Hydrophobizitäts-Analysen des *ShakerB* K^+-

CNG-Kanal aus Rindersehstäbchen (Abb. 1a) zeigt deutlich, daß die Hydrophobizität bei allen Segmenten des K^+-Kanals viel stärker ausgeprägt ist. Nur H4 und H5 bei dem CNG-Kanal aus Rindersehstäbchen können nach dem Kyte & Doolittle-Kriterium (Hydrophobizitäts-Index ≥ 1,6) als transmembranale Segmente angesehen werden. Bei dem CNG Kanal aus *Drosophila* erfüllt zusätzlich noch das Segment H1 dieses Kriterium. Die anderen Segmente H2, H3 und S4 erfüllen dieses Kriterium nicht. Zusätzlich muß das S4-Motiv, das in den K^+-Kanälen als Spannungsfühler dient, bei CNG-Kanälen nicht unbedingt in der Membran liegen, da diese spannungsunabhängig sind (Kaupp et al., 1989; Zimmerman & Baylor, 1992; Baumann et al., 1994). In den Hydrophobizitäts-Analysen der CNG-Kanäle sind zudem noch zwei Gipfel zu erkennen, die weiter C-terminal von H5 liegen und ähnliche Werte aufweisen wie H2 und H3. Diese Bereiche können jedoch nicht transmembranal sein, da sie zu der cGMP-Bindungsstelle dieser Kanäle gehören (Kaupp et al. 1989; Altenhofen et al., 1991).
Da allein durch die Hydrophobizitäts-Analyse keine endgültige Aussage darüber getroffen werden konnte, wieviele transmembranale Segmente vorliegen, war es wichtig, das für CNG-Kanäle aufgestellte Modell (Abb. 2) experimentell zu überprüfen. Die Topologie ist ein wichtiges Kriterium für die Verwandtschaft zwischen den einzelnen Kanalfamilien und ist somit auch sehr wichtig für Überlegungen über den evolutionären Ursprung dieser Kanäle.

1.5 Genfusionen mit alkalischer Phosphatase und ß-Galaktosidase als Reporterenzyme

Zur Aufklärung der transmembranalen Topologie der CNG-Kanäle wurde in einem bakteriellen Expressionssystem eine Genfusions-Methode angewendet. Dabei wurde die kodierende Sequenz des CNG-Kanals aus Rindersehstäbchen bzw. aus *Drosophila melanogaster* an zwei verschiedene bakterielle Reporterenzyme, die alkalische Phosphatase oder die β-Galaktosidase fusioniert und diese Fusionen in *E. coli* exprimiert (Manoil & Beckwith, 1986; Manoil et al., 1990). Alkalische Phosphatase ist nur aktiv, wenn sie ins Periplasma der Bakterienzelle transportiert wird, da sie für ihre Aktivität Disulfidbrücken benötigt, die nur im Periplasma gebildet werden können. Im Zytoplasma bleibt sie inaktiv (Derman & Beckwith, 1991; Derman et al., 1993). Die β-Galaktosidase verhält sich umgekehrt: Sie ist nur aktiv, wenn sie im Zytoplasma verbleibt, nach Transport ins Periplasma ist sie inaktiv (Manoil, 1990).
Die Genfusions-Methode beruht auf der Annahme, daß transmembranale Segmente die gleichen Eigenschaften besitzen wie Signalpeptide. Wird die alkalische Phosphatase hinter ein transmembranales Segment fusioniert, wird sie durch dieses ins Periplasma transportiert und ist aktiv (Abb. 3a). Wird die alkalische Phosphatase jedoch hinter einen Bereich fusioniert, der nicht als Signalsequenz fungiert, sei es weil dieser kein transmembranales Segment ist oder sei es weil dieses transmembranale Segment ein Stop-Transfer Segment ist, wird sie nicht durch die Membran transportiert und bleibt inaktiv (Abb. 3b). Fusionen mit β-Galaktosidase an den

gleichen Stellen sollten das entgegengesetzte Ergebnis zeigen und dienen daher zur Überprüfung der Ergebnisse mit der alkalischen Phosphatase (Abb. 3).

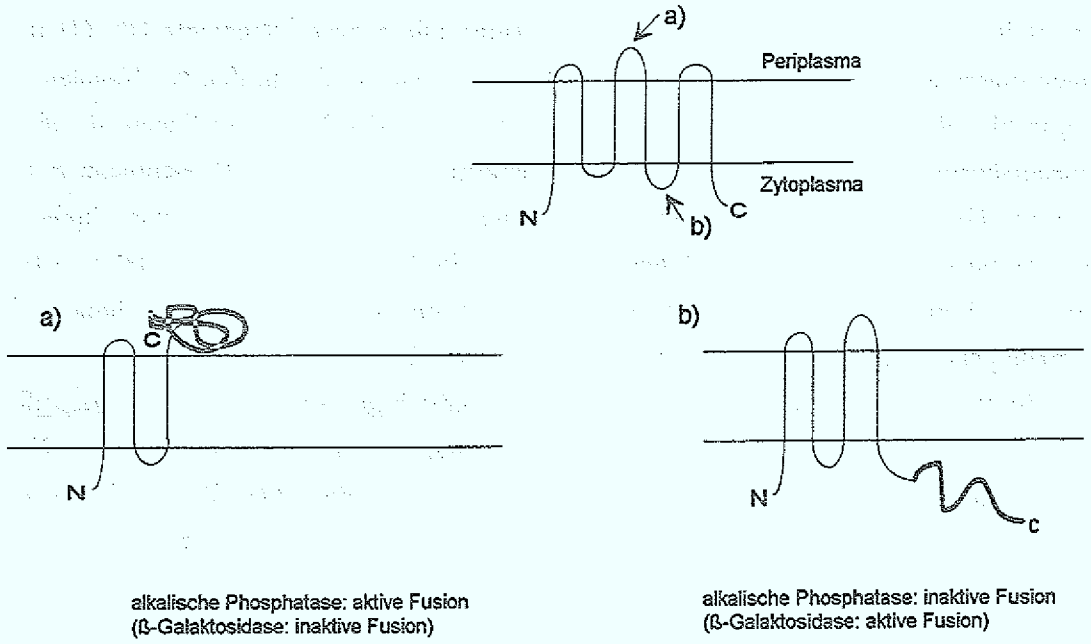


Abb. 3: Schema möglicher Fusionsarten zwischen einem Membranprotein und alkalischer Phosphatase bzw. β-Galaktosidase. Oben in der Abbildung ist das Membranprotein mit zwei verschiedenen Fusionsstellen dargestellt. Wenn die alkalische Phosphatase mit einer extrazellulären Schleife fusioniert wird, wird sie ins Periplasma transportiert und ist aktiv (a). Wenn sie mit einer zytoplasmatischen Schleife fusioniert wird, bleibt sie im Zytoplasma und ist inaktiv (b). β-Galaktosidase zeigt genau die umgekehrten Eigenschaften. Der Anteil der alkalischen Phosphatase in (a) und (b) ist durch die dickere Linie gekennzeichnet. Durch die Fusion mit dem Reporterenzym wird der C-terminal liegende Teil des Membranproteins deletiert.

Solche Fusionen können entweder durch zufällige Insertion der Reportergene mit Hilfe der "Transposon-Mutagenese" oder durch gezielte Mutagenese mit Hilfe rekombinanter DNA-Techniken hergestellt werden.

Für die Transposon-Mutagenese zur Herstellung von Genfusionen mit alkalischer Phosphatase oder β-Galaktosidase wurden zwei Transposons konstruiert, Tn*phoA* (Manoil & Beckwith, 1985) und Tn*lacZ* (Manoil, 1990). Sie tragen an ihren 5´-Enden die kodierenden Sequenzen für die alkalische Phosphatase bzw. β-Galaktosidase und besitzen Insertionssequenzen, um in fremde DNA zu integrieren. Dies ist ein zufälliger Prozess, so daß die Insertion in kodierende Sequenzen statistisch in einem von sechs Fällen im Leserahmen erfolgt. Wenn die Reporterenzyme im Leserahmen in DNA inserieren, die für ein Kanal-Protein kodiert, entsteht die kodierende Sequenz für ein Fusionsprotein aus Kanal am N-Terminus und alkalischer Phosphatase oder β-Galaktosidase am C-Terminus. Liegt die Fusionsstelle C-terminal eines

transmembranalen Segmentes, das als Signalpeptid fungiert, wird im Falle von Tn*phoA* eine aktive alkalische Phosphatase und im Fall von Tn*lacZ* eine inaktive β-Galaktosidase entstehen. Mit der gezielten Mutagenese werden die kodierenden Sequenzen für die Reporterenzyme an genau vorherbestimmte Stellen eingefügt. Dabei kann man z.B. berücksichtigen, daß die intra- oder extrazellulären Schleifen, die direkt auf ein transmembranales Segment folgen, ebenfalls topogene Determinanten enthalten, die für den Einbau des transmembranalen Segmentes wichtig sind (von Heijne, 1986a; Traxler et al., 1993, Boyd, 1994).
Die C-terminal liegenden Bereiche des zu untersuchenden Proteins werden bei beiden Fusionsarten, durch Transposon-Mutagenese oder durch gezielte Fusionen, jedoch deletiert (Abb. 3). Eine wichtige Voraussetzung für diese Methode ist daher, daß ein Membranprotein wirklich sequentiell eingebaut wird, daß also weiter C-terminal liegende Segmente keinen Einfluß auf den Einbau N-terminaler Bereiche haben.
In dieser Arbeit sollte mit Hilfe beider Methoden, über die Transposon-Mutagenese und über gerichtete Mutagenese, versucht werden, die Topologie der α-Untereinheiten der CNG-Kanäle aus Rindersehstäbchen und *Drosophila melanogaster* aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Düsseldorf), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen, Chemikalien zur Synthese von Oligonukleotiden von der Firma MWG (Ebersberg). Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Boehringer (Mannheim), GIBCO BRL (Eggenstein), ITC (Heidelberg), NEB (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg) und USB (Bad Homburg) geliefert. Proteine wurden auf Immobilon P-Membran der Firma Millipore (Eschborn) transferiert. Ein monoklonaler Antikörper, der gegen alkalische Phosphatase aus *E. coli* gerichtet ist, wurde von Medac (Hamburg) bezogen. Sekundäre Antikörper und Reagenzien für die immunologischen Nachweise stammten von Amersham (Braunschweig). [α-^{35}S]-dATP mit einer Aktivität von >1000 Ci/mmol wurde ebenfalls von Amersham bezogen.

Alle in dieser Arbeit benutzten Methoden, soweit nicht anders vermerkt, wurden aus Sambrook et al. (1989) übernommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.2 Bakterienstämme und Vektoren

Folgende *E. coli* K12 Bakterienstämme wurden eingesetzt:

XL1-Blue: *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, thi-1, *hsdR*17, *supE*44, *rel* A1, *lac*, [F′*proAB*, *lacI*^{q}ZΔ M15, Tn10(*tet*^{r})]; (Bullock et al., 1987); wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA benutzt.

GM4: F$^-$, *thr*-1, *leu*-6, *pro*A2, *his*-4, *met*B1, *lac*Y1, *gal*K2, *ara*-14, *xyl*-5, *mtl*-1, *str*-31, *tsx*-33, *thi*-1, *thy*A21, *tlr*-14, *sup*-37, *dam*-3; (Marinus und Morris, 1973); wurde zur Anreicherung unmethylierter Plasmid-DNA eingesetzt.

CC118: *araD*139, Δ(*ara*, *leu*) 7697, Δ*lac*X74, *phoA*Δ20, *galE*, *galK*, *thi*, *rpsE*, *rpoB*, *argE*$_{am}$, *recA*1; (Manoil & Beckwith, 1985); dieser Stamm besitzt weder eine endogene alkalische Phosphatase- noch eine β-Galaktosidase-Aktivität und wurde für die Expression der Fusionsproteine benutzt.

CC170: CC118 mit einer chromosomalen Insertion von Tn*lacZ;* (Manoil, 1990); wurde zur Transposon-Mutagenese mit Tn*lacZ* eingesetzt.

CC202: F42, *lac*I3, zzf-2::Tn*phoA*/ CC118; wurde zur Transposon-Mutagenese mit Tn*phoA* eingesetzt.

Für die Subklonierungen wurden die Plasmide pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985) und pBluescript I SK - (Stratagene, Short et al., 1988) benutzt. Die cDNA des CNG-Kanals aus Rindersehstäbchen wurde durch Restriktion aus dem Plasmid pRCG1 (Kaupp et al., 1989) isoliert. Die cDNA des CNG-Kanals aus *Drosophila melanogaster* stammt aus dem Plasmid pDmCNGC (Baumann et al., 1994), die kodierende Sequenz der alkalischen Phosphatase aus pSWF II (Ehrmann et al., 1990; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Ehrmann, Konstanz).

2.3 Größenstandards

DNA-Größenstandard:
λ(cl857*ind*1*Sam*7)-DNA, Hind III geschnitten: 500 ng/7,5 µl
Fragmentgrößen: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125 bp
λ(cl857*ind*1*Sam*7)-DNA, Hind III/Eco RI geschnitten: 500 ng/7,5 µl
Fragmentgrößen: 21.226, 5.148, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564, 125 bp

Protein-Größenstandard:
LMW-Größenstandard (Proteine mit niedriger Molmasse; Pharmacia): 1,2 µg/µl in 1x SDS-Probenpuffer.
Bandengrößen: 94 kDa (Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel), 67 kDa (Albumin aus Rinderserum), 43 kDa (Ovalbumin aus Hühnereiweiß), 30 kDa (Carboanhydrase aus Rinder-Erythrozyten), 20 kDa (Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne), 14 kDa (α-Lactalbumin aus Kuhmilch)

2.4 Anzucht von Bakterienkulturen

Bakterienkulturen wurden in LB-Flüssigmedium (10 g/l Baktotrypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt) in einem Rotationsinkubator (New Brunswick, Nürtingen) oder in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel, Melsungen) angezogen. Wenn möglich, wurden Antibiotika zur Selektion der Plasmide eingesetzt (Endkonzentrationen: Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 30 bzw. 300 µg/ml). Bakterienkulturen, die Plasmide mit *lacZ*-Promotoren enthielten, wurde zur Catabolit-Repression 1 % Glucose hinzugefügt. Für Plasmid-DNA Präparationen wurden Kulturen benutzt, die mindestens 8 h bei 37 °C inkubiert wurden.

2.5 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mit einem DNA-Synthesizer 391 (Applied Biosystems) synthetisiert. Für die Reinigung der Oligonukleotide wurde das Säulenmaterial in Ammoniak überführt und 15 h bei 55 °C inkubiert. Nach Lyophilisierung wurden die Oligonukleotide in H_2O resuspendiert und mit 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 4,8, sowie dem dreifachen Volumen EtOH gefällt. Die im Rahmen dieser Arbeit für die Mutagenese benutzten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde entweder photometrisch oder gelelektrophoretisch mit Hilfe der Ethidiumbromid-Fluoreszenz durchgeführt.
Für die photometrische Bestimmung wurde die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 und 280 nm (Schichtdicke: 1 cm) bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Eine reine Nukleinsäurelösung hat einen Quotienten von 2,0.
Bei der Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Ethidiumbromid-Fluoreszenz wurde die DNA und ein DNA-Standard bekannter Konzentration in einem Agarosegel aufgetrennt. Durch einen Vergleich der Intensitäten der Banden wurde die Konzentration abgeschätzt. Lösungen von *in vitro* transkribierter cRNA wurden mit Ethidiumbromid-Lösung (14 µg/ml) 1:1 vermischt und in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten gefüllt. Unter UV-Licht wurde die Konzentration im Vergleich mit tRNA-Standardlösungen (0,25, 0,5, 1 und 2 µg/µl) bestimmt.

2.7 Präparation von Plasmid-DNA

2.7.1 Mini-Präparation

Plasmid-Präparationen wurden durch alkalische Lyse nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Die pelletierten Bakterienzellen aus 1,5 ml Kulturvolumen wurden in 100 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und mit 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % SDS) lysiert. SDS, Proteine und bakterielle DNA wurden nach Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M KAc pH 4,8) gefällt. Nach Zentrifugation (20.000 x g) wurde die wäßrige Phase mit Phenol/Chloroform (im Verhältnis 1:1) extrahiert und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1 ml Ethanol gefällt. Die Nukleinsäuren wurden in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug 3-5 µg.

2.7.2 Midi-Präparation

Plasmid-Präparationen aus 50-200 ml Kulturvolumen wurden mit Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ausbeute betrug etwa 1 µg Plasmid-DNA/ml Kulturvolumen.

2.8 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.8.1 Glätten überhängender Enden mit Klenow-Fragment

Zum Auffüllen überhängender 5′-Enden wurden etwa 500 ng Vektorfragment mit 1-5 u Klenow-Fragment [EC 2.7.7.7] und 0,1 mM aller vier Desoxynukleotide in Restriktionspuffer A (Boehringer) 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I besitzt außerdem 3′→5′ Exonuklease-Aktivität, so daß überhängende 3′-Enden abgeschnitten werden.

2.8.2 Phosphorylierung der 5′-Enden von DNA

PCR-Fragmente besitzen keine endständigen 5′-Phosphatreste und mußten phosphoryliert werden, bevor sie zur Ligation eingesetzt werden konnten. Die Fragmente wurden mit 5-10 u T4-Polynukleotidkinase [EC 2.7.1.78], 0,1 mM ATP und dem mitgelieferten Puffer (Boehringer) 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Kinase wurde 10 min bei 65 °C inaktiviert. Wenn vor der Phosphorylierungsreaktion eine Klenow-Reaktion durchgeführt worden war, wurden die Desoxynukleotide entweder durch EtOH-Fällung oder durch Agarosegelelektrophorese (2.9.3) entfernt, da sie die Polynukleotidkinase inhibieren.

2.8.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Für die Dephosphorylierung wurde die DNA mit 0.04 u alkalischer Phosphatase [EC 3.1.3.1] in dem mitgelieferten Phosphatase-Puffer (Boehringer) 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Phosphatase wurde durch Zugabe von 0,2 x Volumen 100 mM EGTA und 15 minütiger Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Nach zweimaliger Phenol/Chloroform- und Chloroformextraktion wurde die DNA entweder ethanolgefällt oder in einem Agarosegel aufgetrennt (2.9.3) und anschließend isoliert (2.9.4).

2.9 Analyse von DNA

2.9.1 Restriktion

1 µg Plasmid-DNA wurde mit einem 2-3 fachen Überschuß an Enzymeinheiten 1 h in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und der vorgegebenen Temperatur inkubiert. Die Proben wurden zur weiteren Analyse in einem Agarosegel (2.9.3) aufgetrennt oder mit Phenol/Chloroform extrahiert und ethanolgefällt.

2.9.2 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung wurde nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Didesoxy-Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Für die Reaktionen wurde das Sequenase Kit, Version 2.0 (USB), nach Angaben des Herstellers benutzt. Die doppelsträngige DNA wurde vor der Reaktion alkalisch denaturiert. Zur radioaktiven Markierung wurde 2,5 µCi [α^{35}S]-dATP eingesetzt.

2.9.3 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele (GNA 100, Pharmacia) benutzt. Die Agarose-Konzentration wurde dem jeweiligen Trennproblem angepaßt: sie variierte zwischen 0,5 % (Auftrennung von Fragmenten >5000 bp) und 2 % (Auftrennung von Fragmenten <500 bp). Der Gellösung wurde Ethidiumbromid (1 µg/ml) zugefügt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,1x Volumen Probenpuffer (50 % Glyzerin, 10x Elektrophoresepuffer, 0,02 % Bromphenolblau, 0,02 % Xylencyanol) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 80 bis 140 V bis zum Erreichen der erforderlichen Trennung der Fragmente durchgeführt. Als Puffersystem diente 1x TAE (40 mM Tris/Acetat pH 7,5, 1 mM EDTA).
Die Auftrennung der Sequenzierreaktionsproben (2.9.2) erfolgte in 0,4 mm dicken, denaturierenden PAA-Gelen (6 % Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 8 M Harnstoff, 1x Elektrophoresepuffer) in einer S2 Sequenzierungskammer von Gibco BRL. Als Puffersystem diente 1x TBE (50 mM Tris/Borat pH 7,8, 1 mM EDTA). Die Elektrophorese wurde bei 65 W etwa 2,5 bis 3 h durchgeführt. Für die Analyse von DNA-Bereichen, die sich in weiterem Abstand zum Sequenzierprimer befanden, wurde die Elektrophorese bei 20 W 15-18 h durchgeführt. Das Gel wurde 15 min fixiert (5 % Ethanol, 5 % Essigsäure), auf ein Filterpapier überführt und 45 min im Vakuum bei 80 °C getrocknet. Der Nachweis der markierten Fragmente erfolgte durch Autoradiographie über Nacht.

2.9.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die nach einer Agarosegelelektrophorese (2.9.3) für Ligationen (2.10.1) oder Modifizierungsreaktionen (2.8) benutzt werden sollten, wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit folgenden Methoden eluiert:
Für die Gewinnung von Fragmenten, die in TE oder H_2O gelöst sein sollten, wurde die Isolierung von DNA-Fragmenten mit einem Qiaex-Kit der Firma Qiagen nach Anleitung durchgeführt.
Alternativ wurde die Zentrifugationsmethode (Heery et al., 1990) benutzt. Hierzu wurde die Spitze eines Eppendorfreaktionsgefäßes mit einer Kanüle durchstochen und der untere Teil mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde auf die Glaswatte gelegt. Dieses Reaktionsgefäß wurde in ein zweites gesetzt und beide zusammen bei 6000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge 10 min zentrifugiert. Die gewonnene DNA befand sich nach der Elution in Elektrophorese-Laufpuffer.

2.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.10.1 Ligation

Für die Ligation wurden die Fragmente im molaren Verhältnis von 3:1 bis 10:1 (Insert:Vektorfragment) eingesetzt. Die DNA wurde mit T4-DNA-Ligase (1 u) [EC 6.5.1.1] und dem vom Hersteller (Boehringer) mitgelieferten Inkubationspuffer, der bereits 0,1 mM ATP enthielt, in einem Volumen von etwa 20 µl bei 16-22 °C 1 h bis üN inkubiert. Für Religationsansätze wurde ein Volumen von 50 µl gewählt.

2.10.2 Transformation

Die für die Transformation benötigten kompetenten Zellen wurden wie folgt hergestellt: Eine Bakterienkultur (50 ml) wurde bis zu einer OD_{600} von etwa 0,4 bei 37 °C und dann 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (10 min, 3000 x g, 2 °C), in 25 ml 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml 100 mM $CaCl_2$/20 % Glyzerin resuspendiert und 2 bis 4 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.
Der Ligationsansatz wurde mit 10 µl 10x CM (100 mM $CaCl_2$, 400 mM $MgCl_2$) versetzt, auf 100 µl mit H_2O aufgefüllt und mit 100 µl kompetenter Zellen vermischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis, 1 min bei 42 °C und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Zur Regenerierung der Zellen wurde 600 - 800 µl LB-Medium (2.4) zugegeben und der Ansatz 30 min unter

Schütteln bei 37 °C inkubiert. Er wurde auf LB-Agarplatten (LB-Medium mit 15 g/l Agar), die nach Bedarf Antibiotika und Glucose enthielten, ausplattiert.
Für Retransformationen von Plasmiden wurde die DNA mit 10 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) und 20 µl kompetenter Zellen vermischt und nach 10 min Inkubation bei 4 °C auf Agarplatten ausplattiert.

2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde in Geräten der Firmen Perkin Elmer oder Biometra durchgeführt. Die für die PCR-Reaktionen eingesetzten Oligonukleotide werden als Primer bezeichnet. Für einen 100 µl Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt:

Plasmid-DNA: 20 ng

Primer: 10 ng/Base (d.h. für einen Primer mit 17 b 170 ng)
1x PCR-Puffer (Boehringer)
0,2 mM dNTP
2,5 u Taq-Polymerase (Boehringer) [EC 2.7.7.7]

Zykluszahl: 25

Für Fragmente bis zu einer Länge von 2000 bp wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt: Die erste Denaturierung erfolgte 3 min bei 94 °C, in jedem weiteren Zyklus betrug die Denaturierungsdauer 50 s. Die Temperatur für die Hybridisierungsreaktion wurde nach folgender Formel bestimmt:

T_m = (G/C) x 4 °C + (A/T) x 2 °C - Fehlbasenpaarung x 4 °C - 4 °C.

Es wurde stets die niedrigere Schmelztemperatur der beiden Primer für die Hybridisierungsreaktion gewählt und 50 s beibehalten. Die Polymerisation erfolgte 50 s bei 72 °C.
PCR-Ansätze, in denen ganze Plasmide amplifiziert wurden, wurden 1 min 30 s bei 72 °C inkubiert. Die Polymerisationszeit wurde bei jeder Wiederholung um 3 s verlängert. Zusätzlich wurde bei diesen Reaktionen nach 15 Zyklen 2,5 u Taq-Polymerase zupipettiert und weitere 15 Zyklen inkubiert.
Nach der PCR-Reaktion wurden alle Ansätze phenol/chloroform- und chloroformextrahiert und mit Ethanol gefällt. Für die Amplifizierung von mutierten DNA-Fragmenten wurden Primer benutzt, deren Sequenz so verändert war, daß sie die gewünschte Mutation erzeugten. Teilweise wurden Mutationen mit PCR nach der Methode von Herlitze und Koenen (1990) durchgeführt. Die in dieser Arbeit benutzten Primer sind im Anhang aufgeführt.

2.12 *In vitro* Transkription

Die Transkription wurde mit linearisierten Plasmiden und SP6-RNA-Polymerase [EC 2.7.7.6] durchgeführt (Melton et al., 1984). Zur Erhöhung der Transkriptstabilität wurde das Dinukleotid $m^7G(5')ppp(5')G$ zugegeben (Konarska et al.,1984). Etwa 5 µg linearisierte DNA wurde mit 30-50 u SP6-RNA-Polymerase (Promega), dem mitgelieferten Puffer, 10 mM DTT, je 0,625 mM ATP, CTP, UTP, 0,625 mM $m^7G(5')ppp(5')G$, 0,1 mM GTP und 100 u RNase-Inhibitor 2 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde durch 30 min Inkubation mit 5 u DNase I (RNase frei, Boehringer) abgebaut. Die RNA wurde durch je zwei Phenol/Chloroform- und Chloroformextraktionen gereinigt, mit Ethanol gefällt und in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Die Konzentration wurde durch Ethidiumbromid-Fluoreszenz bestimmt (2.6) und auf 0,5 µg/µl eingestellt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.13 Herstellung von Fusionsproteinen durch Transposon-Mutagenese

Für die Transposonmutagenese mit Tn*phoA*, das die kodierende Sequenz der alkalischen Phosphatase enthält, und Tn*lacZ*, das die kodierende Sequenz der β-Galaktosidase enthält, wurden die Bakterienstämme CC202 bzw. CC170 (2.2) benutzt. CC202 besitzt ein Episom, auf dem Tn*phoA* kodiert, Tn*lacZ* ist in das Genom des Bakterienstammes CC170 integriert. Das Plasmid, das die kodierende Sequenz für den CNG-Kanal aus Rindersehstäbchen enthielt, mit dem die Fusionen hergestellt werden sollten, wurde in die entsprechenden Bakterienstämme transformiert. Die Bakterien wurden auf LB-Agar Platten ausgestrichen, die 30 µg/ml Kanamycin zur Selektion auf das Transposon und 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion auf das Plasmid enthielten. Einzelne Kolonien dieser Transformation wurden in LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar Platten ausgestrichen, die 300 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampicillin enthielten. Die hohe Kanamycinkonzentration selektionierte auf Plasmide, die ein Transposon integriert hatten, da diese in höherer Kopienzahl repliziert wurden und so auch die Resistenz stärker ausgeprägt sein mußte. Zusätzlich enthielten die Agar-Platten 40 µg/ml des Substrats 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat bei Mutagenese mit Tn*phoA* bzw. 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid bei Mutagenese mit Tn*lacZ*. Hierdurch kann die funktionelle Expression der Enzyme nachgewiesen werden. Diese Substrate werden von alkalischer Phosphatase bzw. β-Galaktosidase gespalten und vom Luftsauerstoff zu dem Farbstoff Indigo oxidiert, der die Kolonien blau färbt. Blaue und auch weiße Kolonien wurden erneut auf LB-Agar Platten mit Kanamycin (30 µg/ml), Ampicillin (100 µg/ml) und dem jeweiligen Substrat ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Diese wurden in LB-Medium angezogen, um Plasmid Mini-Präparationen (2.7.1) durchzuführen. Die jeweilige Insertionsstelle der Transposons wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestimmt.

2.14 Expression von Fusionsproteinen

Für die Expression der Fusionsproteine des cGMP-abhängigen Kanals aus Rindersehstäbchen (brCNGC) mit alkalischer Phosphatase (AP) wurden 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und 1 % Glucose mit frisch transformierten CC118-Zellen beimpft und 4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Induktion wurde das Medium gegen LB-Medium mit Ampicillin ausgetauscht und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Expression der Fusionen des cGMP-abhängigen Kanals aus *Drosophila melanogaster* (DmCNGC) mit AP erfolgte 6 h in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und 1 % Glucose. Die Expression der Fusionen der beiden Kanalgene mit β-Galaktosidase (βGal) erfolgte über Nacht. Nach der Expression wurden entweder die Enzymaktivitäten von AP bzw. βGal bestimmt (2.15) oder die Zellen für die weitere Analyse durch Immunoblotting vorbereitet (2.16).

2.15 Aktivitätsbestimmung der Reporterenzyme

Die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase [EC 3.1.3.1] erfolgte photometrisch mit dem Substrat p-Nitrophenyl-Phosphat (Sigma) nach der Methode von Brickman & Beckwith (1975). Die Aktivitätsbestimmung der β-Galaktosidase [EC 3.2.1.23] wurde mit o-Nitrophenyl β-D-Galaktose nach der Methode von Miller (1972) durchgeführt. Für beide Bestimmungen wurden nach Expression der Fusionsproteine (2.14) 100 µl Zellen pellettiert und in 2 ml 1 M Tris/HCl pH 8,0 für die Aktivitätsbestimmung der AP bzw. in 2 ml Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 50 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,0) für die Aktivitätsbestimmung der βGal resuspendiert. Mit einer Hälfte des Ansatzes wurde photometrisch die OD der Zellen bei 600 nm bestimmt. Zu der anderen Hälfte wurden je 50 µl 0,1 % SDS und Chloroform gegeben, um die Zellen zu permeabilisieren (van Beilen et al., 1992). Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 0,4 % p-Nitrophenyl-Phosphat in 1 M Tris/HCl pH 8,0 (für AP) bzw. 100 µl 0,4 % o-Nitrophenyl β-D-Galaktose in Z-Puffer (für βGal) gestartet. Die Ansätze wurden bei 37 °C (AP) bzw. 28 °C (βGal) inkubiert, bis eine leichte Gelbfärbung zu erkennen war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 1 M K_2HPO_4 (AP) bzw. 100 µl 5 M Na_2CO_3 (βGal) gestoppt. Nach kurzer Zentrifugation (Eppendorfzentrifuge) wurden die Extinktionen der Proben photometrisch bei 420 und 550 nm gemessen. Die Extinktion bei 550 nm ergab einen Korrekturfaktor für die Trübung, die durch Zellreste hervorgerufen wurde. Die Enzymaktivitäten (u) wurden nach folgender Formel bestimmt:

$$1000 \times \frac{OD420 - 1{,}75 \times OD550}{\text{Inkubationszeit} \times OD600} \times \text{Verdünnungsfaktor} = u$$

2.16 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)

2.16.1 Gesamtzellextrakt und Fraktionierung von *E. coli* Zellen

Für den Gesamtzellextrakt wurden gemäß einer OD_{600}-Bestimmung ca. 5 x 10^8 Zellen in 25 µl 1x SDS-Probenpuffer (0,8 % SDS, 0,5 % β-Mercaptoethanol, 25 mM Tris/HCl pH 7,6, 6,25 % Glyzerin, 0,005 % Bromphenolblau) resuspendiert.
Die Fraktionierung von Zellen wurde, wie von Manoil & Beckwith (1986) beschrieben, durchgeführt.
Vor der Auftrennung der Proteine in PAA/SDS-Gelen wurden die Proben 10 min bei 95 °C denaturiert.

2.16.2 Gelelektrophorese und Transfer von Proteinen

Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde nach Laemmli (1970) in 10 %igen PAA/SDS-Gelen (Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1), die eine Dicke von 1 mm hatten, durchgeführt. Hierfür wurde eine Minigel Twin Kammer (Biometra, Göttingen) benutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA, bis die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.
Der Transfer der Proteine wurde mit einer Biometra Fast Blot B33 Kammer nach Angaben des Herstellers 30 min bei 5 mA/cm^2 Gelfläche durchgeführt. Als Blotfolie diente Immobilon P (Millipore).

2.16.3 Immunologischer Nachweis

Nach dem Blotten wurde der Bereich des Längenstandards (2.3) abgeschnitten und Amido-Schwarz (0,1 % Amidoschwarz, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 45 % H_2O) gefärbt. Der Rest des Blots wurde 1 h bis über Nacht in TBS/2 % Milchpulver inkubiert, kurz in TBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris/HCl pH 8,0) gewaschen und für mehrere Stunden mit einem monoklonalen Antikörper gegen alkalische Phosphatase aus *E. coli* (Medac), der 1:500 in TBS verdünnt wurde, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Wasch-TBS (TBS/0,1 % Milchpulver) für je 10 min wurde der Blot mit einem sekundären Antikörper (Amersham), der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt war, inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde in Wasch-TBS 1:1000 bis 1:5000 verdünnt. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasch-TBS für je 10 min, wurde der Nachweis der Proteine mit dem ECL-Kit (Amersham) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.17 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen in *Xenopus*-Oozyten

In vitro transkribierte cRNA wurde in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert (~ 50 nl/Oozyte) und die Oozyten zwei bis drei Tage in antibiotikahaltigem Barths-Medium (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM $NaHCO_3$, 0,82 mM $MgSO_4$, 0,3 mM $Ca(NO_3)2$, 0,41 mM $CaCl_2$, 15 mM HEPES pH 7,4, 10^3 u/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,004 mg/ml Zinazef, 0,1 mg/ml Gentamycinsulfat) bei 19 °C inkubiert. Die Oozyten wurden für 2 bis 4 h in 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 fixiert und anschließend zweimal 5 min in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 (PB) gewaschen. Nach einer Inkubation von mindestens 2 h in 10 % Sucrose in PB wurden sie in 30 % Sucrose in PB überführt. Die Oozyten wurden in Einbettmedium (Tissue Tek, Miles Inc., USA) so eingefroren, daß die Äquatorialebene senkrecht zur Schnittebene lag und mit einem Kryostat (2800 Frigocut E, Reichert-Jung) geschnitten. Die Schnittdicke betrug 20 µm. Die Schnitte wurden auf Objektträgern 5 min mit 4 % Paraformaldehyd in PB fixiert und in PB gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation mit Präinkubationslösung (10 % Ziegen-Serum (Sigma), 0,5 % Triton-X100 in PB) wurden die Schnitte kurz in PB gewaschen und über Nacht mit verschiedenen, gegen brCNGC gerichteten, primären Antikörpern, die in 5 % Ziegen-Serum, 0,5 % Triton-X100 in PB verdünnt wurden, inkubiert. Die Objektträger wurden zweimal 15 min in PB gewaschen und 1,5 h mit den sekundären Antikörpern, die mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelt waren, inkubiert. Die Schnitte wurden erneut zweimal 15 min in PB gewaschen und nach Eindecken in Mowiol 488 Eindeckmedium (10 % Mowiol (Hoechst), 40 % Glyzerin, 100 mM Tris/HCl pH 8,5) unter dem Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss) bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm analysiert.

3. Ergebnisse

Zur Untersuchung der transmembranalen Topologie der α-Untereinheiten von CNG-Kanälen wurden Genfusionen mit zwei Reporterenzymen - alkalischer Phosphatase und ß-Galaktosidase - konstruiert. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden benutzt: Transposon-Mutagenese und zielgerichtete Mutagenese. Nachdem die Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert worden waren, wurde die Aktivität des jeweiligen Reporterenzyms bestimmt. Aus dem Ergebnis konnte auf Membranständigkeit und Orientierung der einzelnen putativen transmembranalen Segmente geschlossen werden.
Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen der Kanalproteine sind im Anhang wiedergegeben. Die Numerierung der Aminosäuren und der Nukleotide beginnt jeweils mit dem Start-Methionin bzw. dem 1. Nukleotid des Start-Codons.

3.1 Konstruktion der Expressionsplasmide für brCNGC und DmCNGC

Die kodierenden Sequenzen der cGMP-gesteuerten Ionenkanäle aus Rindersehstäbchen (brCNGC) und *Drosophila melanogaster* (DmCNGC) wurden in Plasmide subkloniert, die 5'-wärts ihrer multiplen Klonierungsregion *lac*-Promotoren enthalten. In Gegenwart des *lac*-Repressors wird die Transkription von diesen Promotoren gehemmt. Die Repression wird durch die Anwesenheit von Glucose im Medium unterstützt ("Catabolit-Repression"). In Abwesenheit von Glucose kann die Transkription durch IPTG, ein Induktor, der an den *lac*-Repressor bindet, induziert werden. Dadurch ist eine gezielte Expression möglich.
Die kodierende Sequenz von brCNGC wurde mit den Restriktionsendonukleasen Afl II (bp -28) und Hpa II (bp 2140) aus pRCG1 (Kaupp et al., 1989) ausgeschnitten. Die Enden des Fragmentes wurden durch Behandlung mit Klenow-Fragment geglättet (2.8.1) und in einen mit Sma I geschnittenen pUC18 Vektor subkloniert. Dieses Plasmid (pbrCNGC1) wurde für die Transposon-Mutagenese mit Tn*phoA* und Tn*lacZ* benutzt (3.2). Für die Herstellung der verschiedenen Fusionskonstrukte durch gerichtete Mutagenese (3.3) wurden die 28 bp des 5' nicht-kodierenden Bereiches des Kanalgens deletiert, so daß das Start-Codon der cDNA von brCNGC im Leserahmen mit den ersten elf Codons für das α-Peptid des *lacZ*-Gens (Yanisch-Perron et al., 1985) fusioniert wurde. Die Deletion erfolgte durch eine inverse PCR (Hemsley et al., 1989). Die Primer waren so ausgerichtet, daß durch die PCR-Reaktion das ganze Plasmid bis auf die 28 bp der nicht-kodierenden Region amplifiziert wurde (Abb.4). Bei dieser PCR-Reaktion wurde die Dauer der Polymerase-Reaktion bei jedem Zyklus um 3 s verlängert (2.11). Die Enden des PCR-Produktes wurden mit Klenow-Fragment behandelt (2.8.1) und phosphoryliert (2.8.2). Das Fragment wurde elektrophoretisch getrennt (2.9.3), aus dem Agarosegel eluiert (2.9.4), religiert (2.10.1) und in XL1-Blue transformiert (2.10.2). Für die

weitere Klonierung wurde das Fragment, das von der Sac I Erkennungsstelle in der multiplen Klonierungsregion des Plasmides bis zu der Hpa I Erkennungsstelle (bp 267 in brCNGC) reicht, nach Sequenzanalyse gegen das Sac I/Hpa I Fragment von pbrCNGC1 ausgetauscht. Das so entstandene Plasmid pbrCNGC2 unterscheidet sich von pbrCNGC1 nur durch die 28 bp lange nicht-kodierende 5′-Region von brCNGC1.

```
                 Sma I*
Eco RI Sac I Kpn I                                  Start
GAATTCGAGCTCGGTACCCTTAAGCAACCAAAGATATTAAACTAACCATGAAGAAAGTGATTAT
<———————————————                                  ———————————————>
        #480                                                #479
```

Abb. 4: 5′-Klonierungsstelle von pbrCNGC1: Die Sequenz ist ab der Eco RI Erkennungsequenz in der multiplen Klonierungsregion von pUC18 bis einschließlich der ersten 17 bp von brCNGC dargestellt. Das Start-Codon von brCNGC ist unterstrichen. Die beiden gegenläufigen Primer, # 479 und # 480, die für die Deletion von 28 bp in der nicht-kodierenden 5′-Region benutzt wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Ein Sternchen bezeichnet die zerstörte Sma I Erkennungssequenz. Die Sac I Schnittstelle wurde für die Klonierung des Sac I/Hpa I-Fragmentes benutzt; die Kpn I Schnittstelle diente zur Klonierung von boH1-AP und boH1-β Gal (3.5.1).

Für die Konstruktion der gezielten Fusionen mit DmCNGC (3.3) wurde das Plasmid pDmCNGC (Baumann et al., 1994) benutzt. Die cDNA von DmCNGC ist in die Bam HI und Eco RI Klonierungsstellen von pBluescript SK- inseriert. Dieses Plasmid enthält eine Xba I Erkennungssequenz in der multiplen Klonierungsregion direkt 5′-wärts der Bam HI Klonierungsstelle. Da alle gerichteten Fusionen mit alkalischer Phosphatase und β-Galaktosidase mit Hilfe von singulären Xba I Restriktionsschnittstellen konstruiert werden sollten, mußte die Erkennungssequenz zerstört werden. Hierzu wurde das Plasmid mit Xba I und Bam HI geschnitten (2.9.1), die Enden mit Klenow-Fragment geglättet (2.8.1) und religiert (2.10.1). Hierdurch wurde die Xba I Erkennungssequenz zerstört, die Bam HI Erkennungssequenz blieb jedoch erhalten. Gleichzeitig entstand eine Fusion des Kanal-Gens im Leserahmen mit den ersten 27 Codons des α-Peptids des *lacZ*-Gens. Dieses Plasmid wurde als pDmCNGCX bezeichnet.

3.2 Herstellung von Fusionsproteinen mit brCNGC durch Transposon-Mutagenese

3.2.1 Fusionen der alkalischen Phosphatase mit brCNGC mittels Tn*phoA*

Das Transposon Tn*phoA* (Manoil & Beckwith, 1985) trägt das Kanamycin-Resistenzgen, die Insertionssequenzen $IS50_L$ und $IS50_R$, die die Integration in fremde DNA ermöglichen, sowie am 5'-Ende von $IS50_L$ die kodierende Sequenz der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (Abb.5). Entscheidend für diese Fusionsmethode ist das Fehlen der Signalsequenz der alkalischen Phosphatase. Inseriert das Transposon in kodierende Sequenzen anderer Proteine, können Fusionsproteine entstehen. Kodieren die Sequenzen, die dann 5'-wärts der alkalischen Phosphatase liegen, für Signalpeptide oder transmembranale Segmente mit Signalsequenz-charakter, entsteht aktive alkalische Phosphatase, da diese Sequenzen die Aufgabe des fehlenden Signalpeptides übernehmen und die alkalische Phosphatase ins Periplasma transportieren. Fusionen mit Stop-Transfersequenzen oder Bereichen, die keine Transportfähigkeit besitzen, führen zu inaktiver alkalischer Phosphatase.

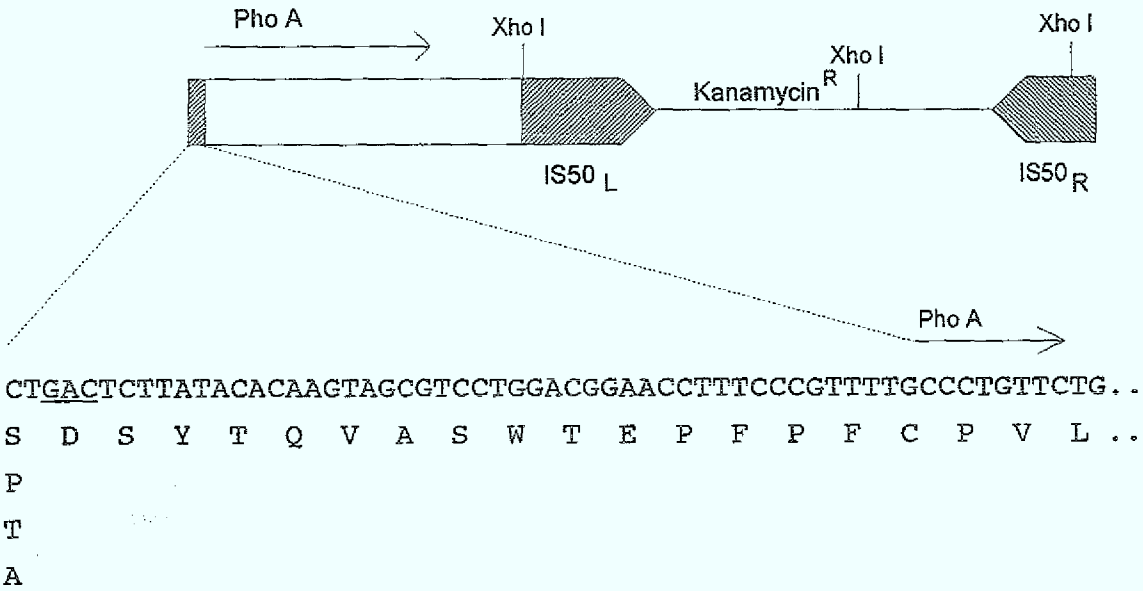


Abb. 5: Struktur von Tn*phoA*: Das Transposon Tn*phoA* trägt am 5'-Ende von $IS50_L$ die kodierende Sequenz für die alkalische Phosphatase aus *E. coli* (*phoA*). Die Insertionssequenzen $IS50_L$ und $IS50_R$ sind schraffiert dargestellt, das Kanamycinresistenzgen als Linie. Tn*phoA* besitzt eine Größe von etwa 7,5 kbp. Am unteren Rand ist die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des 5'-Endes des Transposons gezeigt. Nach einem Insertionsvorgang bildet dieser Bereich den Übergang zwischen dem zu untersuchenden Gen und der kodierenden Sequenz der alkalischen Phosphatase. Der Leserahmen liegt so, daß das erste vollständige Codon bp 3-5 (unterstrichen dargestellt) umfaßt. Daher bestimmt das 3'-wärts letzte Nukleotid des zu untersuchenden Gens die erste Aminosäure dieser Verbindung. Die vier möglichen Aminosäuren sind

angegeben. Die eingezeichneten Xho I Schnittstellen wurden für die Verkürzung der Fusion brH4-AP benutzt (3.3.1).

Die Fusionen zwischen brCNGC1 und Tn*phoA* wurden, wie unter 2.13 beschrieben, isoliert. Es wurden jeweils mehrere blaue und weiße Kolonien in LB-Kulturen angeimpft und Plasmid-Mini-Präparationen (2.7.1) durchgeführt. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit Hind III und Eco RI geschnitten. Tn*phoA* besitzt zwei Eco RI Erkennungssequenzen im kodierenden Bereich der AP und jeweils eine Hind III Erkennungssequenz in $IS50_L$ und $IS50_R$. pbrCNGC1 besitzt eine Eco RI Schnittstelle 5´-wärts der Sma I Klonierungsstelle der cDNA und eine Hind III Schnittstelle 3´-wärts der Klonierungsstelle. Anhand des Restriktionsmusters konnte bestimmt werden, ob Tn*phoA* in die kodierende Sequenz des Kanals inseriert war. Um die genaue Insertionsstelle festzustellen, wurden die Plasmide sequenziert (2.9.2).

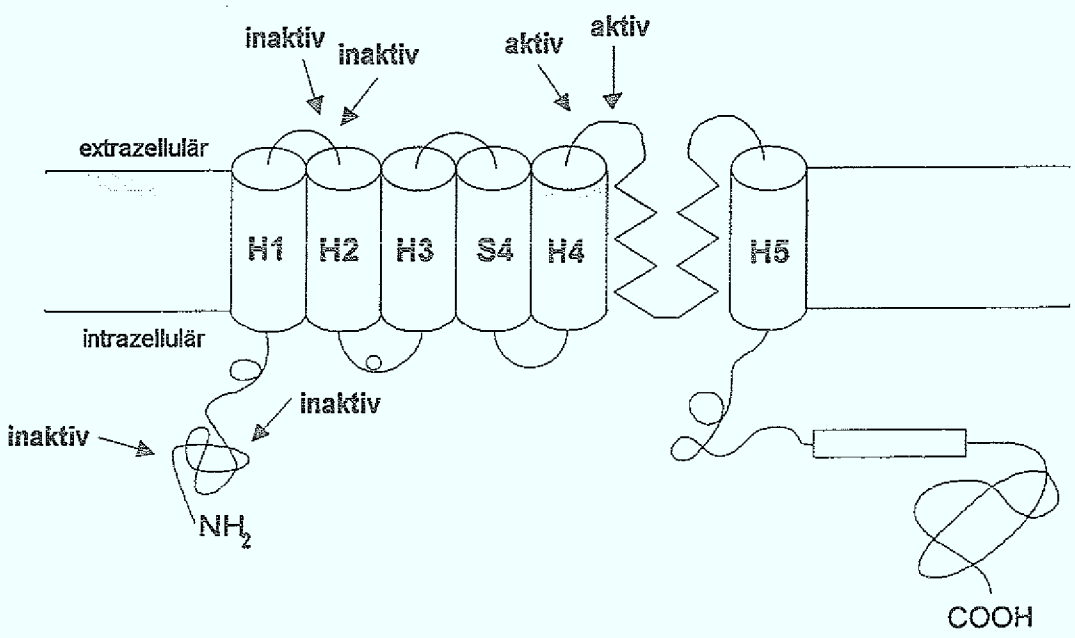


Abb. 6: Insertionsstellen von Tn*phoA* in brCNGC. Die bei den verschiedenen Klonen gefundenen Insertionsstellen in brCNGC sind in dem Topologie-Modell (s. auch Abb. 2) durch Pfeile dargestellt. Es ist jeweils angegeben, ob aktive oder inaktive alkalische Phosphatase entstanden ist.

Es wurden sieben Klone mit Insertionen im Kanalgen gefunden, die eine blaue Koloniefärbung verursachten, also eine aktive Phosphatase besaßen (2.13). Bei einem Klon lag die Fusionsstelle bei Tyrosin 352, zwischen der putativen Transmembranregion H4 und der Pore. Sechs weitere Klone zeigten eine Insertionsstelle bei Tyrosin 332, ebenfalls zwischen H4 und der Pore (Abb.6).
Bei den Fusionen mit weißer Koloniefarbe, also inaktiver AP, lagen die Insertionsstellen im N-terminalen Bereich bei Histidin 58 und bei Asparagin 88 und im Bereich zwischen H1 und H2 bei Leucin 190 und Tyrosin 197. Zusätzlich gab es noch mehrere Klone, bei denen die alkalische Phosphatase nicht im Leserahmen fusioniert war und deshalb nicht exprimiert werden konnte.
Die Ergebnisse dieser Fusionen zeigen, daß die transmembranale Region H4 von brCNGC als Signalsequenz fungieren kann, H1 jedoch nicht.

3.2.2 Fusionen der β-Galaktosidase mit brCNGC mittels Tn*lacZ*

Tn*lacZ* (Manoil, 1990) entspricht im Aufbau Tn*phoA*. Hier liegt im 5′-Bereich von $IS50_L$ jedoch die kodierende Sequenz für die β-Galaktosidase (Abb. 7). Fusionen C-terminal von transmembranalen Bereichen, die Signalsequenzcharakter haben, führen zu inaktiver β-Galaktosidase, Fusionen in anderen Bereichen zu aktiver β-Galaktosidase, da das Enzym nur im Zytoplasma von *E. coli* aktiv ist. Da die Eigenschaften der Fusionen mit β-Galaktosidase bzw. alkalischer Phosphatase zueinander komplementär sind, können sie als gegenseitige Kontrolle genutzt werden.
Das Plasmid brCNGC1 (3.1) wurde in den *E. coli* Stamm CC170 transformiert und die Transposon-Mutagenese mit Tn*lacZ* wie unter 2.13 angegeben durchgeführt. Mehrere blaue und weiße Kolonien wurden in LB-Kulturen angeimpft und Plasmid Mini-Präparationen hergestellt. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit Hind III geschnitten, um anhand einer Restriktionskarte die Plasmide zu ermitteln, die das Transposon im Kanalgen enthielten. Tn*lacZ* enthält zwei Hind III Schnittstellen, pbrCNGC1 enthält eine Hind III Schnittstelle in der 3′-wärts vom Insert liegenden multiplen Klonierungsregion. Die Restriktion mit einem Plasmid, in das Tn*lacZ* inseriert ist, ergab ein charakteristisches 3,3 kbp Fragment, das den mittleren Teil des Transposons beinhaltete. Aus der Länge der zusätzlich entstandenen Fragmente, konnte geschlossen werden, ob die Insertion im Kanalgen erfolgt war. Die exakten Fusionsstellen von brCNGC mit Tn*lacZ* wurden durch Sequenzierung bestimmt.

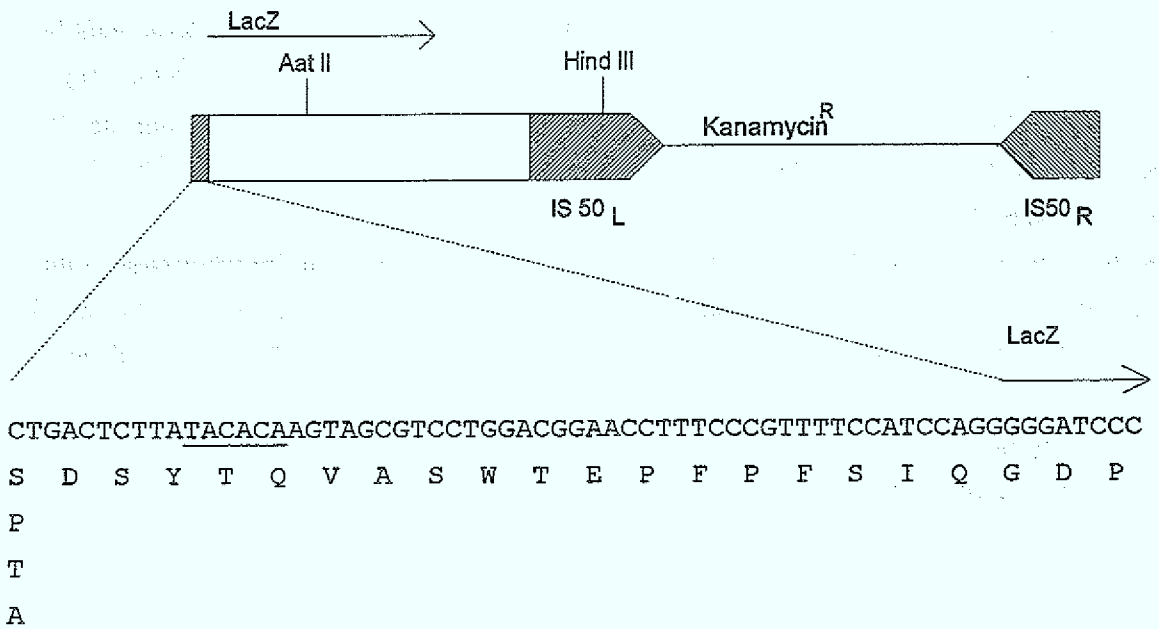


Abb. 7: Struktur von Tn*lacZ*: Das Transposon Tn*lacZ* trägt am 5'-Ende von $IS50_L$ die kodierende Sequenz für die β-Galaktosidase aus *E. coli* (*lacZ*). Es besitzt eine Größe von ca. 8,3 kbp. Die Insertionssequenzen $IS50_L$ und $IS50_R$ sind schraffiert dargestellt, das Kanamycinresistenzgen als Linie. Am unteren Rand ist die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des 5'-Endes des Transposons gezeigt. Nach einem Insertionsvorgang bildet dieser Bereich wie bei Tn*phoA* den Übergang zwischen dem Fremd-Gen und der kodierenden Sequenz der β-Galaktosidase. Das letzte Nukleotid des Fremd-Genes bestimmt die erste Aminosäure des Verbindungsstückes. Die eingezeichneten Aat II und Hind III Schnittstellen wurden für die Subklonierung der kodierenden Sequenz der β-Galaktosidase benutzt. Der unterstrichene Teil der angegebenen Nukleinsäuresequenz zeigt den Bereich, der für die Subklonierung zu einer Xba I Erkennungssequenz mutiert wurde (3.3.2).

Es wurden fünf verschiedene aktive Fusionen gefunden. Zwei Fusionsstellen liegen im N-Terminus bei Glutamin 72 und Glutamin 78, eine Fusionsstelle im C-Terminus bei Aspartat 633, eine bei Glutamat 462, kurz vor der cGMP-Bindungsstelle und eine bei Asparagin 300, am Anfang von H4 (Abb. 8). Bei allen inaktiven Fusionen war die Insertion nicht im Leserahmen erfolgt.

Die aktiven β-Galaktosidase-Fusionen zeigen, daß sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus sowie die cGMP-Bindungsstelle im Zytoplasma liegen. Fusionen mit anderen Bereichen, insbesondere der mittleren Region des Kanalproteins, die die transmembranalen Segmente enthält, wurden nicht gefunden.

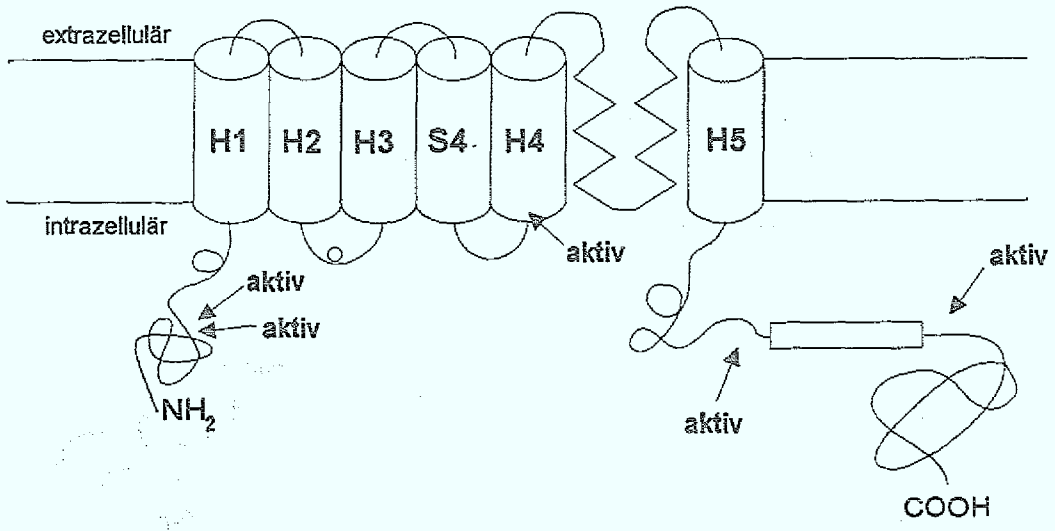


Abb.8: Insertionsstellen von Tn*lacZ* in brCNGC. Die bei den verschiedenen Klonen gefundenen Insertionsstellen in brCNGC sind in dem Topologie-Modell (s. auch Abb. 2) durch Pfeile dargestellt; alle Fusionen enthielten aktive β-Galaktosidase.

3.3 Gezielte Fusionen von brCNGC und DmCNGC mit alkalischer Phosphatase bzw. β-Galaktosidase

Bei den Fusionsexperimenten mit Tn*phoA* und Tn*lacZ* waren nur wenige Fusionen außerhalb der N- und C-Termini von brCNGC gefunden worden. Um durch gezielte Fusionen jedes der vorhergesagten transmembranalen Segmente zu untersuchen, wurde die Methode der gerichteten Mutagenese eingesetzt. Zusätzlich zu brCNGC wurde auch der zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Ionenkanal aus *Drosophila melanogaster* untersucht. Als Fusionsstelle wurde jeweils das Ende einer putativen extrazellulären bzw. intrazellulären Schleife des Kanalproteins gewählt, da nicht nur transmembranale Segmente, sondern auch die Bereiche C-terminal dieser Segmente, topogene Determinanten tragen können (von Heijne, 1986a; Traxler et al., 1993; Boyd, 1994; Abb. 9).

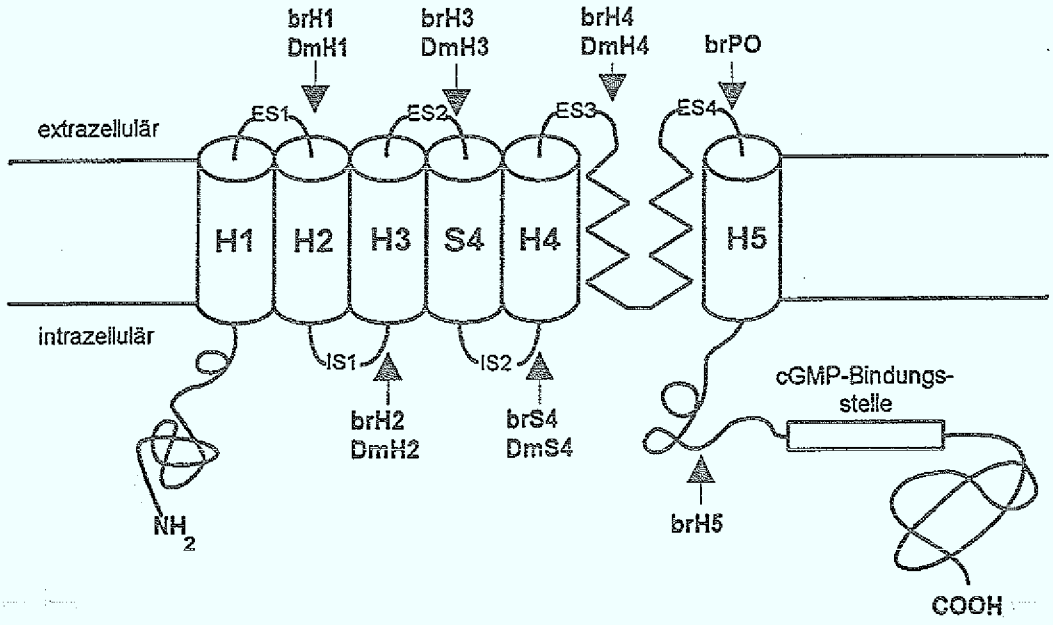
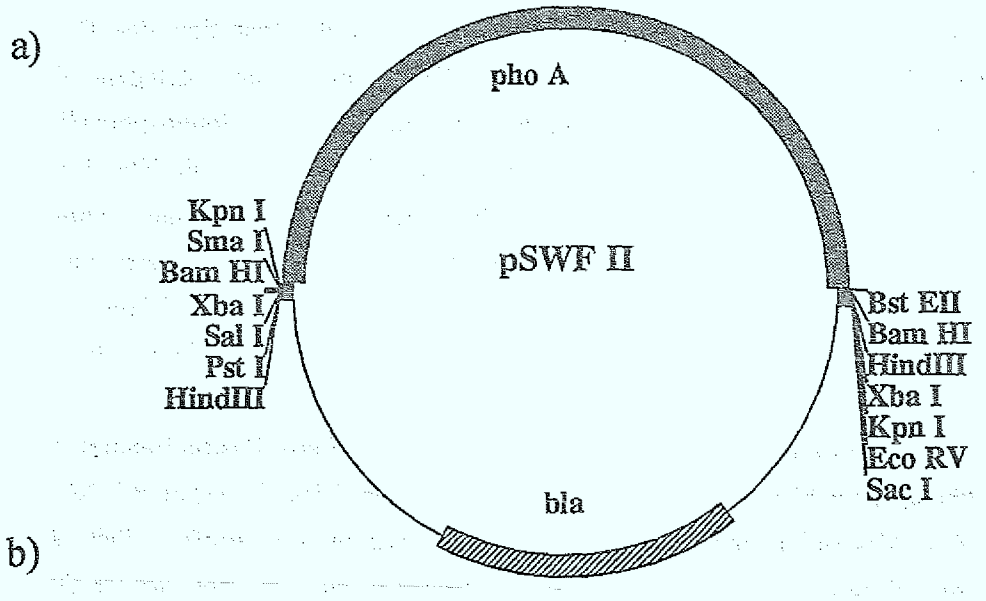


Abb.9: Fusionsstellen der verschiedenen Fusionsproteine von brCNGC und DmCNGC mit alkalischer Phosphatase und β-Galaktosidase. Die Pfeile weisen in dem Topologie-Modell auf die verschiedenen Stellen an den Enden der intra- und extrazellulären Schleifen, wo die Fusionsgrenze zwischen Kanalprotein und Reporterenzym liegt. Die Namen der Fusionen sind angegeben. Die einzelnen Segmente sind durchnumeriert: transmembranale Segmente H1-H5, extrazelluläre Schleifen (ES) 1-4 und intrazelluläre Schleifen (IS) 1 und 2.

3.3.1 Konstruktion der Fusionen von brCNGC und DmCNGC mit *phoA*

Als Spender für die kodierende Sequenz der alkalischen Phosphatase wurde das Plasmid pSWF II (Ehrmann et al., 1990) benutzt (Abb. 10a), auf dem sich die Sequenz für die gereifte Phosphatase ohne Signalsequenz befindet. Das Plasmid enthält singuläre Schnittstellen, mit denen die kodierende Sequenz isoliert und direkt für Fusionen eingesetzt werden kann. Da die kodierenden Sequenzen beider Kanal-Proteine keine Erkennungssequenzen für Xba I besitzen, wurde diese Schnittstelle für die Konstruktion der Fusionen benutzt. Die Klonierung wurde für alle Fusionen nach dem gleichen Schema durchgeführt. Die Fusionen brH1-AP und DmH1-AP, d.h. Fusionen mit alkalischer Phosphatase in der extrazellulären Schleife hinter H1 (ES 1, Abb. 9), werden exemplarisch beschrieben. Bei den Bezeichnungen der Fusionskonstrukte ist jeweils angegeben, ob sie als Kanalprotein-Anteil brCNGC (br) oder DmCNGC (Dm) enthalten. Dahinter ist die transmembranale Region angegeben, deren Signalsequenzcharakter überprüft werden sollte. Nach dem Bindestrich folgt jeweils der Fusionspartner AP bzw. βGal. Ein p vor der Bezeichnung gibt an, daß das Plasmid gemeint ist.



5´-Bereich von pho A:

```
Hind III          Pst I   Sal I   Xba I   Bam HI   Sma I Kpn I
A AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCT GAC TCT
   S   L   H   G   C   R   S   T   L   E   D   P   R   V   P   D   S
```

3´-Bereich von pho A:

```
        Bst EII  Bam HI  Hind III     Xba I   Kpn I          Eco RV
CTG AAA GGT TAC CGG ATC CCA AGC TTC TTC TAG AGG TAC CGC ATG CGA TAT CGA GCT
        G   Y   R   I   P   S   F   F  STOP
```

Abb. 10: a) Karte von pSWF II. Die Schnittstellen der multiplen Klonierungsregion, der Bereich der kodierenden Sequenz der alkalischen Phosphatase ohne Signalsequenz und das Gen für die β-Laktamase sind dargestellt. b) Die multiplen Klonierungsregionen der kodierenden Sequenz der alkalischen Phosphatase am 5´- und 3´- Ende mit den davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind dargestellt. Die unterstrichenen Schnittstellen wurden in dieser Arbeit zur Klonierung eingesetzt (3.3.1, 3.4.1 und 3.6.1).

Für die Konstruktion von brH1 wurde eine PCR-Reaktion mit pbrCNGC2 (3.1) als Matrize durchgeführt, bei der mit Hilfe des 3´-Primers # 521 eine Xba I Erkennungssequenz 3´-wärts des Codons für Y194 eingeführt wurde, so daß die kodierende Sequenz für die alkalische Phosphatase im Leserahmen kloniert werden konnte. Als 5´-Primer wurde #37, der von bp 164 bis bp 181 in brCNGC hybridisiert, benutzt. Er diente auch bei allen anderen brCNGC-Fusionen als 5´-Gegenprimer. Das amplifizierte Fragment wurde mit Hpa I (bp 267 in brCNGC) und Xba I geschnitten. Zur Herstellung des Vektorfragments wurde pbrCNGC2 mit den gleichen Enzymen geschnitten. Die hier benutzte Xba I Erkennungssequenz liegt in der

multiplen Klonierungsregion 3′-wärts vom brCNGC-Insert. Durch die Insertion des PCR-Fragmentes wurde der 3′-wärts von der eingefügten Xba I -Erkennungssequenz gelegene Teil von brCNGC deletiert. pbrH1 wurde mit Xba I geschnitten und die Enden dephosphoryliert (2.8.3). Die kodierende Sequenz der alkalischen Phosphatase, die ebenfalls mit Xba I aus pSWF II ausgeschnitten worden war, wurde in den geschnittenen Vektor subkloniert. Dieses Plasmid wurde als pbrH1-AP bezeichnet. Zur Bestimmung der Orientierung des Inserts wurde im Bereich der *phoA*-Klonierungsstelle sequenziert. Zusätzlich wurden bei allen Klonen die durch PCR entstandenen Fragmente sequenziert. Die Strategie dieser Klonierung ist in Abb. 11 veranschaulicht.

Für die Fusion brH4-AP wurde die nach Transposon-Mutagenese isolierte Fusion benutzt, bei der die alkalische Phosphatase hinter Y352 inseriert war (3.2.1). Das Plasmid wurde mit Xho I geschnitten und das Vektorfragment religiert. Hierdurch wurde ein großer Teil des Transposons entfernt, ohne daß die Sequenz für das Fusionsprotein beeinflußt wurde (van Beilen et al., 1992; Abb. 5). Das Plasmid pbrPO wurde für die Subklonierung von *phoA* bzw. *lacZ* in dem Bakterienstamm GM4 (2.2) angereichert, um unmethylierte DNA zu erhalten.

Die Klonierung von DmH1-AP wurde entsprechend der Klonierung von brH1-AP durchgeführt. Mit dem 3′-Primer wurde hier wiederum eine Xba I Erkennungssequenz 3′-wärts des Codons für A138 eingeführt, so daß die alkalische Phosphatase im Leserahmen kloniert werden konnte. Als 5′-Primer diente hier der "reverse" Primer, der am 5′-Ende der multiplen Klonierungsregion von pBluescript SK- hybridisiert. Die Matrize war pDmCNGCX (3.1). Das so erhaltene Fragment wurde mit Sac I, dessen Erkennungssequenz am 5′-Ende der multiplen Klonierungsregion liegt, und Xba I geschnitten und in einen ebenso geschnittenen pBluescript SK- Vektor subkloniert. Die Subklonierung von *phoA* erfolgte wie oben beschrieben.

Die genauen Klonierungsstellen der anderen Fusionen mit alkalischer Phosphatase und β-Galaktosidase sind in Tabelle 1 (3.3.3) angegeben. Zusätzlich sind die jeweiligen Fusionsstellen in Abb. 9 und im Anhang dargestellt.

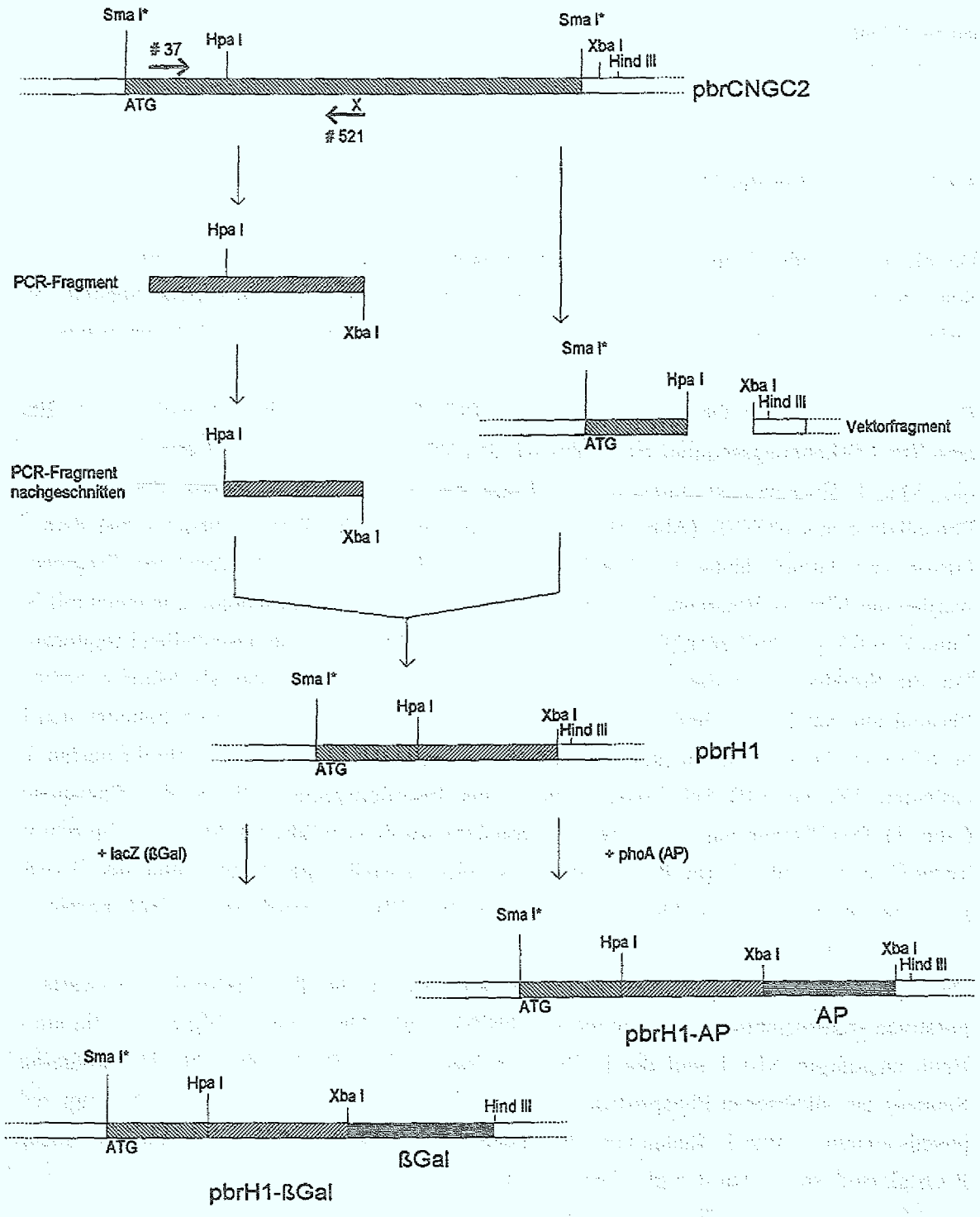


Abb. 11: Schematische Darstellung der Klonierung von brH1-AP und brH1-βGal. Die Klonierung erfolgte wie im Text beschrieben. Es sind nur die benutzten Restriktionsschnittstellen eingezeichnet. Sma I* kennzeichnet die durch die Klonierung von pbrCNGC2 zerstörte Sma I Schnittstelle. Mit ATG ist das Start-Codon von brCNGC bezeichnet, das X über Primer # 521 deutet die eingeführte Xba I Erkennungssequenz an. Die Klonierung von DmH1-AP und DmH1-βGal wurde entsprechend durchgeführt. Hier wurde jedoch keine

interne Schnittstelle (Hpa I) sondern eine Schnittstelle im 5′-Bereich der multiplen Klonierungsregion von pDmCNGCX (Sac I) benutzt.

3.3.2 Konstruktion der Fusionen von brCNGC und DmCNGC mit *lacZ*

Da die kodierende Sequenz der β-Galaktosidase nicht auf einem Plasmid mit geeigneten Schnittstellen für die Subklonierung zur Verfügung stand, wurde die βGal-Sequenz von Tn*lacZ* in pBluescript SK- subkloniert und am 5′-Ende mit einer Xba I Erkennungssequenz versehen.
Die ersten 709 bp von Tn*lacZ* wurden in einer PCR-Reaktion amplifiziert, wobei am 5′-Ende eine Xba I Erkennungssequenz eingeführt wurde (Abb. 7), die im gleichen Leserahmen lag, wie die Xba I Erkennungssequenz am 5′-Ende der kodierenden Sequenz der alkalischen Phosphatase aus pSWFII (Abb. 10b). Als Matrize wurde das Plasmid benutzt, bei dem die Fusion von Tn*lacZ* hinter E462 erfolgt war. Die Enden des so gewonnenen Fragmentes wurden mit Klenow-Fragment behandelt, das Fragment mit Xba I geschnitten, in einen mit Xba I und Eco RV geschnittenen pBluescript SK- Vektor subkloniert und anschließend sequenziert. Für die Subklonierung des zweiten Teiles des *lacZ* Gens wurde das als Matrize benutzte Plasmid mit Aat II und Hind III geschnitten. Die Aat II Erkennungssequenz befindet sich bei bp 676 von Tn*lacZ* und war somit auch schon in dem ersten, durch PCR amplifizierten Teil enthalten. Die Hind III Schnittstelle liegt in der Insertionssequenz $IL50_L$ des Transposons (Abb. 7). Das Plasmid mit dem ersten Teil von *lacZ* wurde ebenfalls mit Aat II (bei bp 676 von Tn*lacZ*) und Hind III (in der multiplen Klonierungsstelle) geschnitten und der 3′-wärts gelegene Teil von *lacZ* subkloniert. Das entstandene Plasmid wurde mit pB*lacZ* bezeichnet. Die Klonierung ist in Abb. 12 veranschaulicht.
Die eigentliche Subklonierung der kodierenden Sequenz der β-Galaktosidase 3′-wärts der putativen transmembranalen Regionen von brCNGC und DmCNGC erfolgte über die am 5′-Ende eingefügte Xba I und die in $IS50_L$ gelegene Hind III Schnittstelle. Die kodierende Sequenz der alkalischen Phosphatase wurde mit Xba I und Hind III, deren Erkennungsstellen jeweils an den 5′- und 3′-Enden von *phoA* liegen, ausgeschnitten. Die kodierende Sequenz der β-Galaktosidase, die mit den gleichen Enzymen aus pB*lacZ* ausgeschnitten worden war, wurde anschließend in das jeweilige Vektorfragment ligiert.

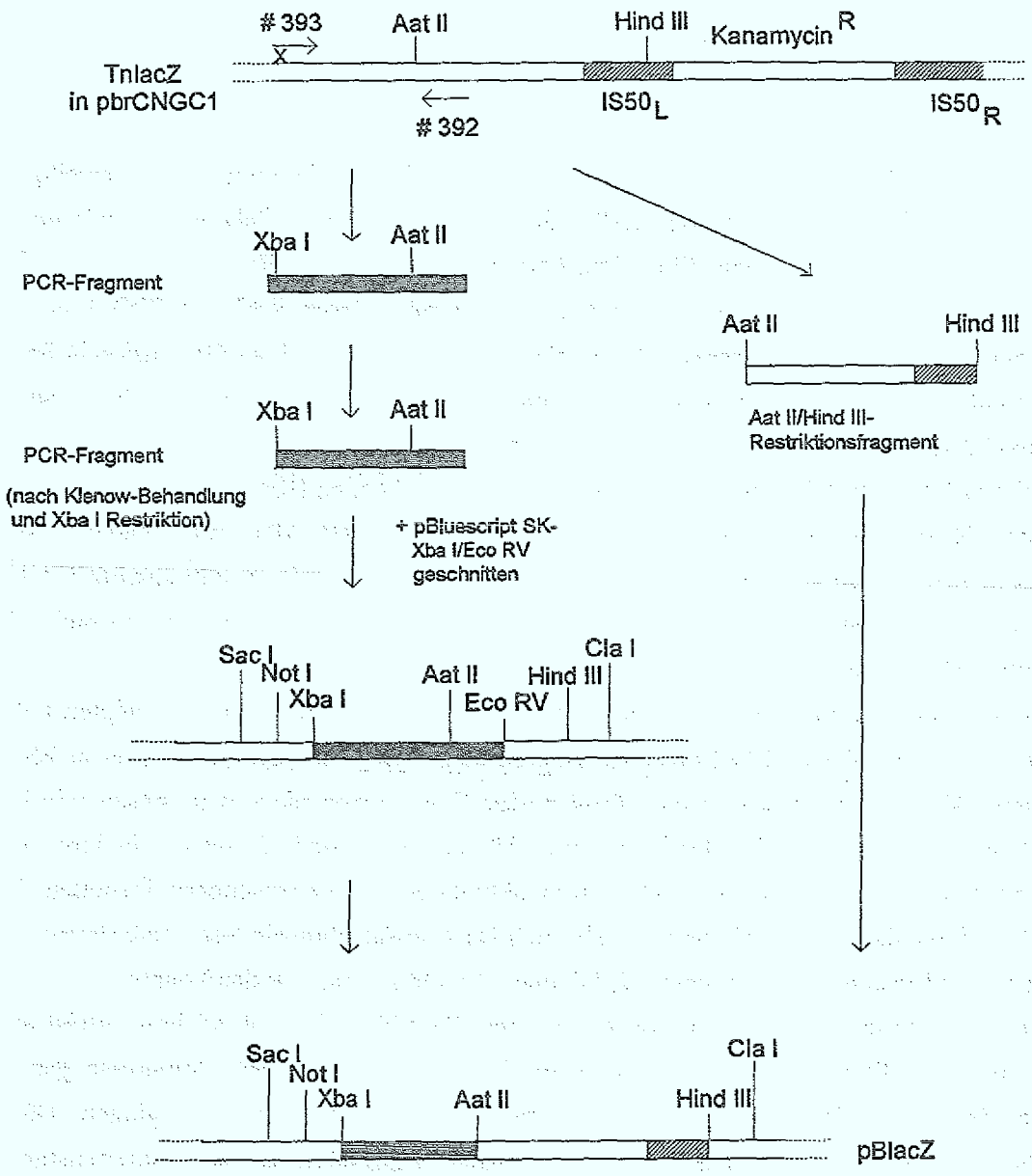


Abb. 12: Schematische Darstellung der Subklonierung der kodierenden Region der β-Galaktosidase aus Tn*lacZ* (Abb. 7) in pBluescript SK-. Die Primer für die PCR sind durch Pfeile gekennzeichnet, die Nummern entsprechen den im Anhang benutzten Bezeichnungen. Zusätzlich zu den benutzten Schnittstellen sind noch 5'- und 3'- wärts der Einklonierungsstelle Schnittstellen zur Orientierung in der multiplen Konierungsregion von pBluescript SK- angegeben.

3.3.3 Enzymaktivitäten der Fusionsproteine von brCNGC und DmCNGC mit alkalischer Phosphatase (AP) bzw. β-Galaktosidase (βGal)

Die Expression der Fusionsproteine und die Aktivitätsbestimmung des jeweiligen Reporterenzyms, alkalische Phosphatase (AP) oder β-Galaktosidase (βGal), wurde, wie unter 2.14 und 2.15 beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Fusionen von brCNGC mit AP in den putativen extrazellulären Schleifen (ES) 3 und 4 (Abb. 9) zeigten hohe Phosphataseaktivität, wohingegen die dazugehörige βGal-Fusion in ES 4 kaum Aktivität zeigte. Die AP-Fusionen in ES 1 und 2 wiesen keine Aktivität auf. Hier zeigten die dazugehörigen βGal-Fusionen hohe Aktivität. Alle AP-Fusionen in den putativen intrazellulären Schleifen (IS) waren inaktiv und die entsprechenden βGal-Fusionen aktiv. Die AP-Fusion N-terminal von der cGMP-Bindungsstelle (brH5-AP) war inaktiv, die entsprechende ßGal-Fusion aktiv. Die Ergebnisse dieser Fusionen zeigen, daß sowohl H4 als auch H5 transmembranale Segmente darstellen. H1, H2, H3 und S4 konnten jedoch nicht als transmembranale Segmente identifiziert werden.
Die Fusionen von DmCNGC mit AP in den extrazellulären Schleifen 1, 3 und 4 zeigten hohe Aktivität, die dazugehörigen βGal-Fusionen zeigten keine Aktivität. Die AP-Fusion in ES 2 zeigte keine Aktivität, wohingegen die dazugehörige βGal-Fusion aktiv war, genau wie bei brH3-AP und brH3-βGal. Die Fusionen mit AP in IS 1 und 2 waren inaktiv, die entsprechenden βGal-Fusionen aktiv. Die Enzymaktivitäten der verschiedenen Fusionen mit DmCNGC zeigen, daß sowohl H4 und H5, als auch H1 transmembranale Segmente darstellen, wohingegen die Existenz der Segmente H2, H3 und S4 nicht gezeigt werden konnte.
Die Bakterienzellen des Stammes CC118, die mit den Plasmiden pDmH4-AP bzw. -βGal und pDmPO-AP bzw. -βGal transformiert waren, wuchsen nur sehr langsam. Außerdem gab es Hinweise, daß diese Plasmide während der Anzucht der Kulturen verloren gingen. Diese Fusionsproteine wurden daher zusätzlich in XL1-Blue exprimiert. Dieser Bakterienstamm bildet durch eine Mutation im *lacI*-Promotor etwa 10 mal mehr *lac*-Repressor. Dies bewirkt, daß der *lacZ*-Promoter des Expressionsplasmides stärker reprimiert wird, so daß die Transkription im nicht induzierten Zustand noch drastischer gehemmt ist. Erst nach der Induktion, wenn die Bakterienkulturen schon eine größere Dichte haben, setzt die Expression der Fusionsproteine ein. So war sichergestellt, daß mögliche toxische Wirkungen der Fusionsproteine unterdrückt wurden. Deshalb sollte das Plasmid keiner negativen Selektion unterworfen sein. Zusätzlich wurde als Kontrolle auch DmS4-AP in XL1-Blue exprimiert. Dieses Fusionsprotein bewirkte keine Wachstumshemmung in CC118, so daß die Expression in XL1-Blue keine Änderung der Enzymaktivitäten bewirken sollte. Dies war hier auch der Fall: die Aktivitäten waren sehr ähnlich, wohingegen die Aktivitäten von DmH4-AP bzw. DmPO-AP, aber auch DmPO-βGal, in XL1-Blue deutlich größer waren. Die Aktivitätswerte nach Expression in XL1-Blue sind in Tabelle 1 bei den entsprechenden Fusionen in eckigen

Klammern aufgeführt. Die endogene AP-Aktivität des Bakterienstammes XL1-Blue (ca. 20 Einheiten) wurde jeweils von den Aktivitäten abgezogen.

	Fusion	Fusionsstelle	Reporter-Enzym	aktiv	Enzymaktivität u ± (s.a.m.)
	brH1	Y194	AP ßGal	nein ja	8.5 ± 0.8 (7) 3670 ± 103 (6)
	brH2	R232	AP ßGal	nein ja	5.9 ± 0.5 (7) 2536 ± 73.0 (6)
	brH3	F261	AP ßGal	nein ja	5.0 ± 0.8 (7) 1724 ± 55.3 (6)
	brS4	I295	AP ßGal	nein ja	5.7 ± 1.2 (7) 1733 ± 58.6 (6)
	brH4	Y352	AP ßGal	ja	2461 ± 390 (7) n.k.
	brPO	D370	AP ßGal	ja nein	297 ± 19.1 (7) 295 ± 18.5 (6)
	brH5	T471	AP ßGal	nein ja	2.3 ± 0.6 (5) 4791 ± 685 (6)
	DmH1	A138	AP ßGal	ja nein	2766 ± 290 (6) 31.3 ± 10.4 (6)
	DmH2	Y182	AP ßGal	nein ja	4.1 ± 2.5 (4) 6791 ± 657 (5)
	DmH3	C217	AP ßGal	nein ja	7.3 ± 2.7 (4) 6966 ± 1101 (6)
	DmS4	F249	AP ßGal	nein ja	6,7 ± 2.1 (6) [9,8 ± 0,7 (2)][1)] 3863 ± 830 (6)
	DmH4	L287	AP ßGal	ja nein	247 ± 129 (2) [906 ± 63,5 (2)][1)] 18.9 ± 6.7 (6)
	DmPO	N321	AP βGal	ja nein	246 ± 76,3 (4) [514 ± 101 (4)][1)] 27,7 ± 10,2 (5) [62,9 ± 7,9 (2)][1)]

Tabelle 1: Enzymaktivitäten der Fusionen von brCNGC und DmCNGC mit AP und βGal. In der ersten Spalte ist das jeweilige Fusionsprotein als Piktogramm dargestellt. H1 bis H5 bzw. S4 im Namen der jeweiligen Fusion gibt an, hinter welchem putativen transmembranalen Segment fusioniert wurde, PO bedeutet Porenbildendes Segment. In der 3. Spalte ist die genaue Fusionsstelle, d.h. der letzte Aminosäurerest im Kanalprotein-Anteil des Fusionsproteins, angegeben. Ob die Fusion mit AP oder βGal konstruiert wurde, ist in der 4. Spalte angegeben. Die Aktivitäten der jeweiligen Fusionen sind in Enzymeinheiten (2.15) ± Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der Experimente wider. Fusionen mit AP gelten als aktiv, wenn mehr als 10 Einheiten bestimmt wurden. Bei βGal Fusionen werden Aktivitäten oberhalb von 300 Einheiten als aktiv angesehen (s. 5. Spalte). Die nicht konstruierte βGal-Fusion ist mit n.k. gekennzeichnet. [1)] In den eckigen Klammern sind die Aktivitäten angegeben, die bei Expression der Fusionsproteine in XL1-Blue gemessen wurden (s. Text).

3.4 Verhindern Aspartat-Reste in Segment H3 den Transport der Reporterenzyme durch die Membran?

Mutationen, die in der hydrophoben Kernregion von Signalpeptiden zu polaren oder geladenen Aminosäureresten führen, können den Transport von Proteinen durch die Membran beeinträchtigen (Michaelis et al., 1983; von Heijne, 1986b; Allard & Bertrand, 1992). Segment H3 funktionierte nicht als Signalpeptid. Die Fusionen H3-AP und DmH3-AP waren inaktiv, die entsprechenden βGal-Fusionen aktiv (Tab. 1). Alle bis jetzt klonierten zyklisch-Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle besitzen in Segment H3 zwei negativ geladene Aspartatreste (Eismann et al., 1993). Wenn H3 zwar eine transmembranale Region ist, jedoch aufgrund der geladenen Reste nicht als Signalpeptid wirken kann, sollte die Neutralisierung einer oder beider Aspartatreste zu einer Steigerung der Exportleistung und somit auch der Enzymaktivität führen.

3.4.1 Konstruktion der Aspartat/Valin-Austausche in H3

Die Mutagenese der Aspartat-Reste in H3 erfolgte nach der Methode von Herlitze & Koenen (1990). Bei dieser Methode muß nicht direkt bei der zu mutierenden Stelle eine Restriktionsschnittstelle für die Klonierung zur Verfügung stehen oder eingebaut werden, wie es bei Mutagenese mit PCR sonst nötig ist. Es werden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. In der ersten Reaktion dient ein Plasmid als Matrize und in der zweiten Reaktion ein Gemisch aus dem 1. PCR-Fragment und einem passenden Restriktionsfragment. Als Beispiel soll hier die gleichzeitige Neutralisierung von D191 und D199 in H3 von DmCNGC beschrieben werden.

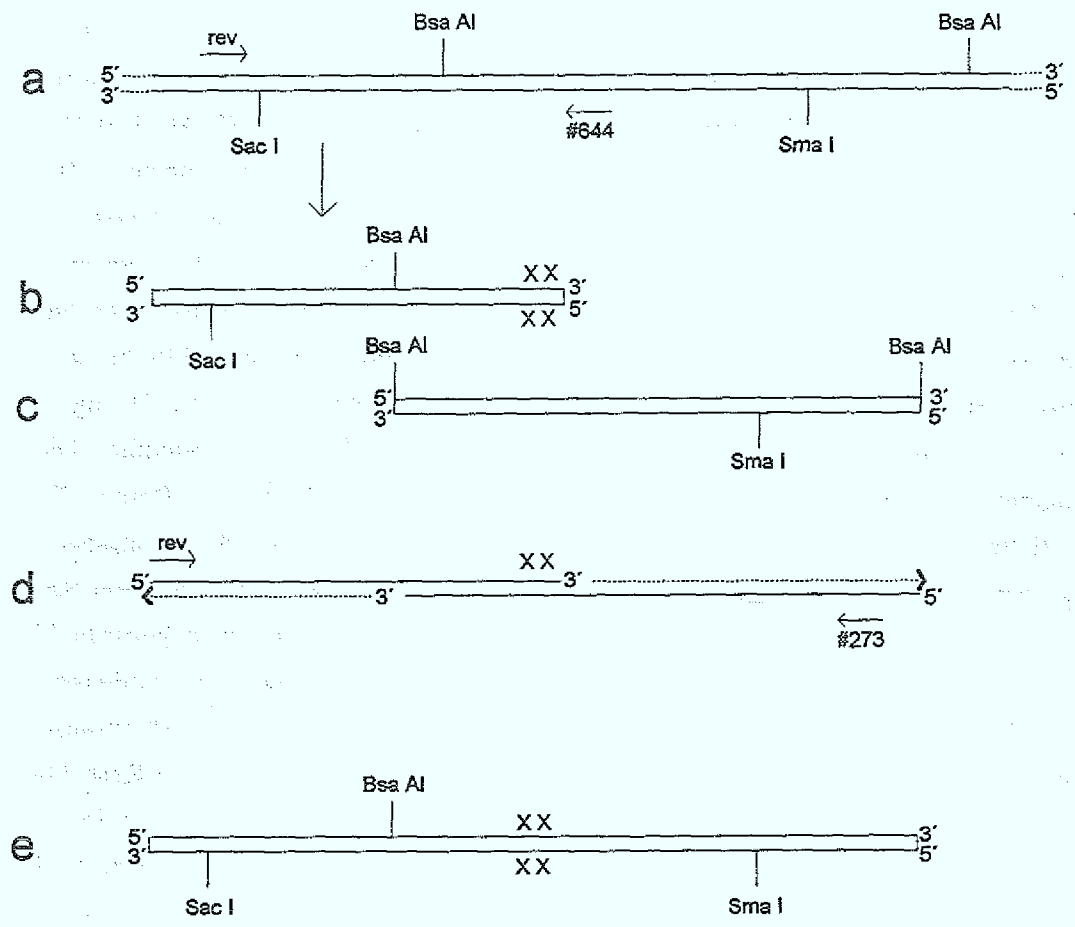


Abb. 13: Schematische Darstellung der Klonierung von DmH3D191/199V. a: Das Ausgangsplasmid für die 1. PCR-Reaktion war pDmH3-AP. Eingezeichnet sind die beiden Primer, rev und der Mutageneseprimer # 644, die für die 1. PCR-Reaktion benutzt wurden, die Bsa AI-Schnittstellen, die zur Herstellung des Restriktionsfragmentes benutzt wurden und die Sac I und Sma I Schnittstellen, mit denen die Subklonierung durchgeführt wurde. b: Das 1. PCR-Fragment enthielt die durch Primer # 644 eingefügten Mutationen (hier durch X gekennzeichnet). c: Das Bsa AI-Restriktionsfragment überlappt mit dem 1. PCR-Fragment (ca. 340 bp). d: In der 2. PCR-Reaktion wurde die neue Matrize von den beiden miteinander hybridisierenden Fragmenten gebildet. Nachdem die überstehenden Enden aufgefüllt waren (durch gestrichelte Linien dargestellt), konnten die Primer für die 2. PCR-Reaktion, rev und # 273 hybridisieren. e: Das neu entstandene PCR-Fragment wurde mit Sac I und Sma I geschnitten und gegen das Sac I/Sma I-Fragment von pDmH3-AP ausgetauscht. Hier wurde nur die Fragmentart mit den gewünschten Mutationen (durch X markiert) gezeichnet. Da das in der 2. PCR-Reaktion eingesetzte Restriktionsfragment die Mutationen nicht enthält, ist bei dieser Methode mit einem Anteil bis zu 50 % nicht mutierter Fragmente zu rechnen.

Bei der ersten PCR wurde mit Hilfe des "reverse" Primers, der 5′-wärts der multiplen Klonierungsregion von pBluesript SK- hybridisiert, und dem Mutageneseprimer # 644, der von

bp 564 bis bp 601 in DmCNGC hybridisiert, ein 695 bp großes Fragment amplifiziert. Durch eine veränderte Sequenz in Primer # 644 wurde die kodierende Sequenz für die Aspartatreste D191 und D199 in Codons für Valinreste mutiert. Als Matrize diente pDmH3-AP. Das PCR-Fragment wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und eluiert. Das Restriktionsfragment, das in der 2. PCR-Reaktion eingesetzt wurde, wurde mit Bsa AI aus pDmH3-AP ausgeschnitten. Bsa AI schneidet im 5´-Bereich der kodierenden Sequenz von DmCNGC bei bp 265 und im 5´-Bereich der kodierenden Sequenz von AP bei bp 250 (ab der Xba I-Klonierungsstelle gezählt). Die geschnittene DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und das 636 bp große Restriktionsfragment aus dem Gel eluiert. Die 2. PCR-Reaktion wurde mit 10 ng des Restriktionsfragmentes und 125 ng des 1. PCR-Fragmentes als Matrize durchgeführt. Diese beiden Fragmente hybridisierten miteinander, so daß mit dem reverse Primer und Primer #273, der am 5´-Ende der kodierenden Sequenz der AP noch vor der Bsa AI Erkennungssequenz hybridisiert, ein 840 bp großes Fragment amplifiziert wurde. Dieses Fragment wurde mit Sac I, dessen Erkennungssequenz am 5´-Ende der multiplen Klonierungsregion von pBluesript SK- liegt, und mit Sma I, dessen Erkennungssequenz in der 5´-Klonierungsregion der kodierenden Sequenz der AP liegt, geschnitten und gegen das gleiche Fragment aus pDmH3-AP getauscht. Die Klone, die nach Ligation und Transformation erhalten wurden, wurden durch Restriktion und Sequenzierung analysiert. Da bei dieser Methode bei der 2. PCR-Reaktion ein Restriktionsfragment eingesetzt wurde, das die unmutierte Sequenz für H3 enthielt, war nur bei etwa 50 % der Klone mit einer Mutation zu rechnen. Der genaue Verlauf der Klonierung ist in Abb. 13 dargestellt.

Bei der Konstruktion von DmH3D191V-AP bzw. DmH3D199V-AP wurde genauso vorgegangen, wie bei DmH3D191/199V-AP. Nur in der ersten PCR-Reaktion wurde jeweils ein anderer Mutagenese-Primer für den Austausch jeweils eines Aspartatrestes in einen Valinrest eingesetzt.

Die Konstruktion von brH3D255V-AP verlief ebenso, wie die der DmCNGC-Klone. Als 5´-Primer der 1. PCR-Reaktion wurde ebenfalls der reverse Primer benutzt. Als 3´-Primer diente # 671, der die Mutation des Codons für Aspartat in Valin enthielt. Das Restriktionsfragment für die 2. PCR-Reaktion war ebenfalls ein Bsa AI-Fragment, da Bsa AI auch im 5´-Bereich der kodierenden Sequenz für brCNGC, bei bp 485, schneidet. Dieses Fragment war 548 bp groß. Für die Subklonierung konnten ebenfalls die gleichen Schnittstellen benutzt werden. Sac I schneidet in der 5´-Seite der multiplen Klonierungsregion von pUC18 und Sma I schneidet in der 5´-Klonierungsregion der kodierenden Sequenz der AP. Als Vektorfragment wurde brH3-AP benutzt.

Die Neutralisierung geladener Reste in der Region H3 könnte möglicherweise erst zum Einbau einer ursprünglich nicht membranständigen Region in die Membran führen, also ein neues transmembranales Segment schaffen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die gleichen Neutralisierungen in H3 auch in den Fusionen DmH4 und brPO durchgeführt. Diese

Fusionsproteine weisen hohe AP-Aktivitäten auf. Sollte erst durch die Neutralisierungen in H3 dieses Segment in die Membran gelangen, müßten sich die Orientierungen der C-terminal liegenden transmembranalen Segmente umkehren und somit die aktiven Fusionen DmH4-AP und brPO-AP inaktiv werden. Gleichbleibende Aktivitäten würden darauf hinweisen, daß keine neue transmembranale Region geschaffen worden war.
Für diese Neutralisierung wurde die Mutagenese genauso durchgeführt, wie im ersten Beispiel beschrieben. Es konnten dieselben Fragmente der 1. PCR von DmH3D191/199V-AP, DmH3D199V-AP und brH3D255V-AP für die jeweiligen 2. PCR-Reaktionen benutzt werden. Ausgangs-DNA für die Bsa AI-Restriktionsfragmente waren die Fusionen DmH4-AP und brPO-AP. Die Fragmentgrößen betrugen 843 bp bei DmH4-AP und 875 bp bei brPO-AP. Die in der 2. PCR-Reaktion amplifizierten Fragmente wurden ebenfalls mit Sac I und Sma I geschnitten und gegen das entsprechende Fragment in DmH4-AP bzw. brPO-AP ausgetauscht. Ausgehend von DmH3D199V-AP, DmH4D199V-AP, brH3D255V-AP und brPOD255V-AP wurden die entsprechenden βGal-Fusionen kloniert (3.3.2).

3.4.2 Enzymaktivitäten der in H3 neutralisierten Fusionen

Die Expression und die Aktivitätsbestimmungen wurden wie unter 2.14 und 2.15 beschrieben durchgeführt; die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Der Austausch D255V bei brH3-AP bewirkte eine etwa 35fache Aktivitätssteigerung (von 5 auf 173 Einheiten). Der Austausch von D191V bzw. von D199V in DmH3-AP führte zu einer etwa 100fachen Steigerung der Aktivität (von 7,3 auf 967 bzw. 619 Einheiten). Die Neutralisierung beider Glutamatreste in H3 führte sogar zu einer 200fachen Steigerung der Enzymaktivität. Die βGal-Aktivitäten der Fusionen brH3D255V-βGal und DmH3D199V-βGal wurden zwar deutlich verringert, lagen jedoch weiterhin über dem angenommenen Grenzwert von 300 Einheiten. Die Neutralisierungen in H3 bei den Kontrollfusionen brPOD255V, DmH4D199V und DmH4D191/199V hatten kaum Einfluß auf die Aktivität der Reporterenzyme.
Diese Ergebnisse identifizieren auch H2, H3 und S4 in DmCNGC als transmembranale Segmente. Dadurch, daß H1, H3 und H4 die gleiche Orientierung in der Membran aufweisen, bei allen ist der C-terminale Teil extrazellulär, müssen auch H2 und S4 transmembranale Segmente sein. Bei brCNGC wurden durch diese Ergebnisse auch H3 und aus den gleichen Gründen wie bei DmCNGC auch S4 als transmembranale Segmente identifiziert.

	Fusion	Fusionsstelle	Reporter-Enzym	aktiv	Enzymaktivität u ± (s.a.m.)
	brH3	F261	AP ßGal	nein ja	5.0 ± 0.8 (7) 1724 ± 55.3 (6)
	brH3D255V	F261	AP ßGal	ja ja	173 ± 24.8 (5) 1262 ± 63.0 (6)
	brPO	D370	AP ßGal	ja nein	297 ± 19.1 (7) 295 ± 18.5 (6)
	brPOD255V	D370	AP ßGal	ja nein	264 ± 11.9 (5) 4.2 ± 4.2 (6)
	DmH3	C217	AP ßGal	nein ja	7.3 ± 2.7 (4) 6966 ± 1101 (6)
	DmH3D191V	C217	AP ßGal	ja	967 ± 196 (5) n.k.
	DmH3D199V	C217	AP ßGal	ja ja	619 ± 102 (5) 1007 ± 395 (6)
	DmH3D191/199V	C217	AP ßGal	ja	1475 ± 451 (6) n.k.
	DmH4	L287	AP ßGal	ja nein	247 ± 129 (2) 18.9 ± 6.7 (6)
	DmH4D199V	L287	AP ßGal	ja nein	214 ± 11.5 (2) 8.9 ± 9.6 (4)
	DmH4D191/199V	L287	AP ßGal	ja	181 ± 7.0 (2) n.k.

Tabelle 2: Wirkung der Neutralisierungen von Aspartatresten in H3 auf die Enzymaktivitäten der Fusionen von brCNGC und DmCNGC mit AP und βGal. Die jeweils neutralisierten Aminosäurereste in H3 sind hinter den Fusionsnamen angegeben. Die anderen Bezeichnungen in der Tabelle entsprechen denen aus Tabelle 1. Zum besseren Vergleich sind die Aktivitäten der nicht mutierten Fusionen brH3, brPO, DmH3 und DmH4 aus Tabelle 1 noch einmal aufgeführt.

3.5 H1 als Signalsequenz: drei AP-Fusionen im Vergleich

Die bisher dargestellten Ergebnisse erlauben bei beiden untersuchten Ionenkanälen ähnliche Schlußfolgerungen über die Anzahl und Orientierung der transmembranalen Segmente. Nur im Fall der putativen transmembranalen Region H1 stimmen die Ergebnisse nicht überein. Bei DmCNGC funktionierte H1 sehr gut als Signalsequenz, AP-Fusionen hinter H1 ergaben hohe Phosphataseaktivitäten. Bei brCNGC jedoch besitzt H1 offenbar keinen Signalsequenzcharakter. Die beiden Kanalproteine unterscheiden sich in dem Hydrophobizitäts-Index (Kyte & Doolittle, 1982) für H1 sehr deutlich: bei DmCNGC beträgt der Spitzenwert 2,3, bei brCNGC nur 1,4 (Abb. 14). Der kritische Wert für eine transmembranale Region liegt bei 1,6 (Kyte & Doolittle, 1982). Ein dritter cGMP-abhängiger Ionenkanal, der CNG-Kanal aus dem Riechepithel des Rindes (boCNGC, Ludwig et al., 1990), zeigt einen Hydrophobizitätswert für H1 von 1,9. Dieser Wert liegt über dem von Kyte & Doolittle ermittelten Grenzwert. Um H1 genauer zu untersuchen, wurde auch mit diesem CNG-Kanal eine Fusion mit AP bzw. βGal in ES 1, also C-terminal von H1, durchgeführt.

		H 1		Hydrophobizitäts-Index
brCNGC	163	YYNWLFCITLPVMYNWTMIIA	183	1,4
boCNGC	140	YYRWLFLIALPVLYNWCLLVA	160	1,9
DmCNGC	107	HYRWLAIVSLAVLYNIIFVVG	127	2,3
		* ** ..*.*.** ...		

Abb. 14: Vergleich der Aminosäuresequenz der ersten putativen transmembranalen Region in brCNGC, boCNGC und DmCNGC. Sterne unterhalb der Sequenz zeigen identische, Punkte konservativ ausgetauschte Aminosäurereste an. Die Zahlen vor und hinter der Sequenz geben die Nummer des ersten bzw. letzten Aminosäurerestes der Region an. Die Zahlen am Ende der Reihe geben den Spitzenwert an, der bei einer Hydrophobizitäts-Analyse mit einem Fenster von 19 Aminosäuren (Kyte & Doolittle, 1982) über dieser Region erreicht wurde.

3.5.1 Konstruktion von boH1-AP und boH1-βGal

Um eine gute Vergleichsmöglichkeit der Enzymaktivitäten zu erhalten, wurde die kodierende Sequenz von boCNGC bis Aminosäurerest Y171 genau so in pUC18 subkloniert wie brH1-AP. Hierfür wurde die kodierende Sequenz vom Start-Codon bis zu dem Codon für Tyrosin 171 mit einer PCR-Reaktion amplifiziert. Am 5'-Ende wurde die Sequenz der multiplen Klonierungsstelle von pUC18 von der Erkennungssequenz für Sac I bis zu der zerstörten Sma I Erkennungssequenz (Abb. 4) angehängt und am 3'-Ende die Erkennungssequenz für Xba I im

Leserahmen für eine Fusion mit der AP. Dieses Fragment wurde Kpn I und Xba I geschnitten und gegen das entsprechende Fragment von pbrH1 ausgetauscht. Danach wurden, wie unter 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, die kodierenden Sequenzen für die alkalische Phosphatase bzw. die β-Galaktosidase eingefügt.

3.5.2 Enzymaktivitäten der boH1-Fusionsproteine im Vergleich mit brH1- und DmH1-Fusionsproteinen

Die Expression der Fusionsproteine boH1-AP und boH1-βGal wurde so durchgeführt, wie bei den br-Fusionsproteinen. Die AP-Aktivität war deutlich höher als bei brH1, aber niedriger als bei DmH1. Die βGal-Aktivität verhielt sich reziprok (Tab. 3). Die Ergebnisse zeigten zwar nicht so eindeutig wie die DmH1-Fusionen, daß H1 als Signalpeptid funktioniert, sie hatten sich jedoch in der erwarteten Tendenz verändert.

	Fusion	Hydrophob. -Index	Fusionsstelle	Reporter-Enzym	aktiv	Enzymaktivität u ± (s.f.m.)
	brH1	1,4	Y194	AP	nein	8.5 ± 0.8 (7)
				ßGal	ja	3670 ± 103 (6)
	boH1	1,9	Y171	AP	ja	44,7 ± 2,5 (8)
				ßGal	nein	203 ± 39,6 (5)
	DmH1	2,3	A138	AP	ja	2766 ± 290 (6)
				ßGal	nein	31.3 ± 10.4 (6)

Tabelle 3: Vergleich der Aktivitäten der Fusionen mit AP und βGal von brH1, boH1 und DmH1. Die Darstellung in der Tabelle entspricht der in Tabelle 1.

3.6 Sandwichfusionen

3.6.1 Konstruktion von brH2sand und brPOsand

Die Ergebnisse der Gen-Fusionsmethode sind nur dann gültig, wenn die C-terminal verkürzten Fusionsproteine und die vollständigen Proteine die Membran auf genau die gleiche Art durchspannen. Um dies zu testen, wurden zwei "Sandwich"-Fusionen konstruiert. Hierbei wurde der in der einfachen Fusion fehlende C-terminale Teil des Kanal-Proteins im Leserahmen hinter die alkalische Phosphatase fusioniert, so daß diese wie bei einem Sandwich von dem Kanalprotein eingerahmt wird.
Die kodierende Sequenz der AP besitzt kurz vor dem Stop-Codon eine Erkennungssequenz für Hind III. Durch eine PCR-Reaktion mit pRCG1 als Matrize wurde jeweils ein Fragment amplifiziert, das den fehlenden C-terminalen Teil von brCNGC (bei brH2sand ab D236 und bei brPOsand ab S371) enthielt. Mit Hilfe eines Mutagenese-Primers wurde am 5′-Ende eine Hind III Erkennungssequenz eingebaut, so daß das Fragment im Leserahmen an den C-Terminus der kodierenden Sequenz der AP fusioniert werden konnte. Als 3′-Primer diente der reverse Primer, der auf der 3′-Seite der multiplen Klonierungsregion von pSP65 hybridisiert. In dieser multiplen Klonierungsregion befindet sich eine Hind III Erkennungssequenz. Die Fragmente wurden mit Hind III geschnitten und in die jeweilige Fusion, brH2-AP und brPO-AP, die ebenfalls mit Hind III geschnitten wurden, ligiert. Die gewünschte Orientierung des Hind III-Fragmentes wurde durch Sequenzierung festgestellt. Die neuen Fusionen wurden mit brH2sand und brPOsand bezeichnet.

3.6.2 Enzymaktivitäten von brH2sand und brPOsand im Vergleich mit brH2-AP und brPO-AP

Die Expression und Aktivitätsbestimmung der Sandwichfusionen ergab im Fall der Fusion mit AP hinter H2 sehr niedrige Enzymaktivitäten und im Fall der Fusion mit AP hinter der Pore recht hohe Enzymaktivitäten. Sie entspricht den Aktivitäten, die schon bei den dazugehörigen C-terminal deletierten AP-Fusionen gemessen worden waren (Tab. 4).

	Fusion	Fusionsstelle	Reporter Enzym	aktiv	Enzymaktivität u ± (s.a.m.)
	brH2	R232	AP	nein	5.9 ± 0.5 (7)
	brH2sand	R232	AP	nein	6.9 ± 10.0 (5)
	brPO	D370	AP	ja	297 ± 19.1 (7)
	brPOsand	D370	AP	ja	112 ± 8.0 (7)

Tabelle 4: Sandwichfusionen brH2sand und brPOsand im Vergleich mit brH2-AP und brPO-AP. Die Darstellung in der Tabelle entspricht der in Tabelle 1. Die Endung 'sand' bezieht sich auf Sandwich-Fusion.

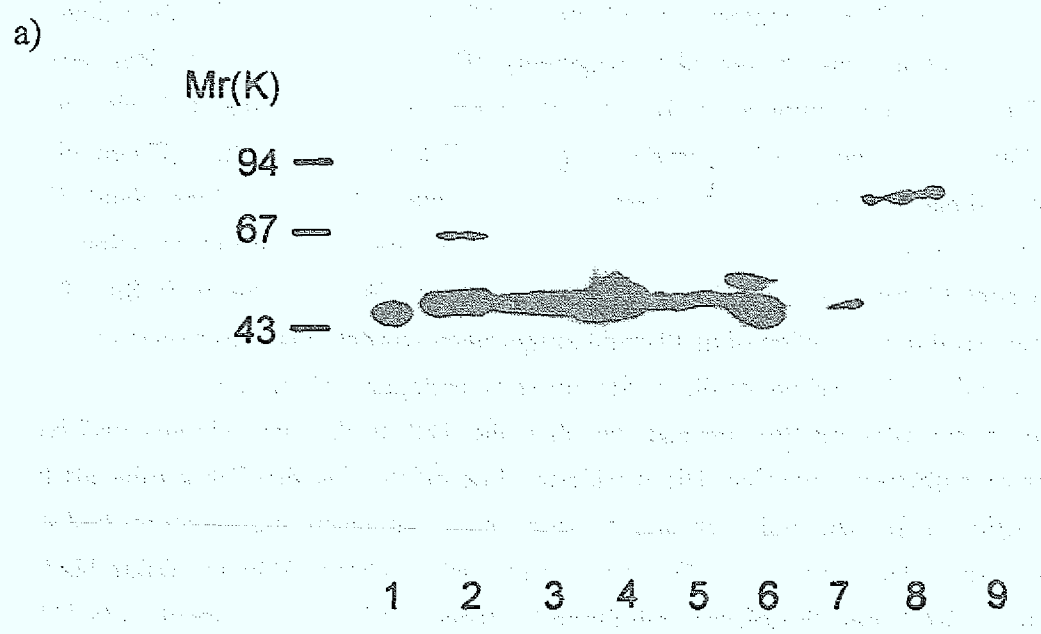
3.7 Nachweis der Expression der AP-Fusionsproteine durch Western-Blot Analyse

Erhält man bei der Fusionsmethode ein inaktives Reporterenzym, muß sichergestellt sein, daß tatsächlich Fusionsprotein exprimiert wird. Erst dann kann man davon ausgehen, daß das Enzym wegen seiner unphysiologischen Lokalisierung inaktiv ist. Deshalb wurden die verschiedenen Fusionsproteine zusätzlich mit einem Antikörper gegen die alkalische Phosphatase in einem Western-Blot nachgewiesen.

3.7.1 Ganzzellextrakte

Für die Analyse der Expression wurden jeweils etwa 5 x 10^8 *E. coli* Zellen (nach Bestimmung der OD_{600}) in SDS-Probenpuffer resuspendiert und 10 min denaturiert (2.16.1). Nach der Auftrennung der Proben in einem 10 %igen SDS-Gel wurden die Proteine auf Immobilon P Membran geblottet (2.16.2). Als Positivkontrolle diente alkalische Phosphatase aus *E. coli* (Sigma). Als Negativkontrolle wurden *E. coli* CC118-Zellen ohne Expressionsvektor aufgetragen. Der Nachweis mit dem monoklonalen Antikörper gegen die alkalische Phosphatase wurde wie unter 2.16.3 beschrieben durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Chemiluminiszenz.

In Abb. 15a) ist ein Western-Blot mit verschiedenen aktiven Fusionsproteinen gezeigt. In Spur 1 ist gereinigte AP aus *E. coli* aufgetragen. Eine Bande von ca. 47 kDa wird erwartungsgemäß angefärbt. Die Extrakte mit den Fusionsproteinen zeigen alle eine Bande bei 49 kDa. Dies entspricht der Größe der AP zusammen mit dem N-terminalen Verbindungspeptid und



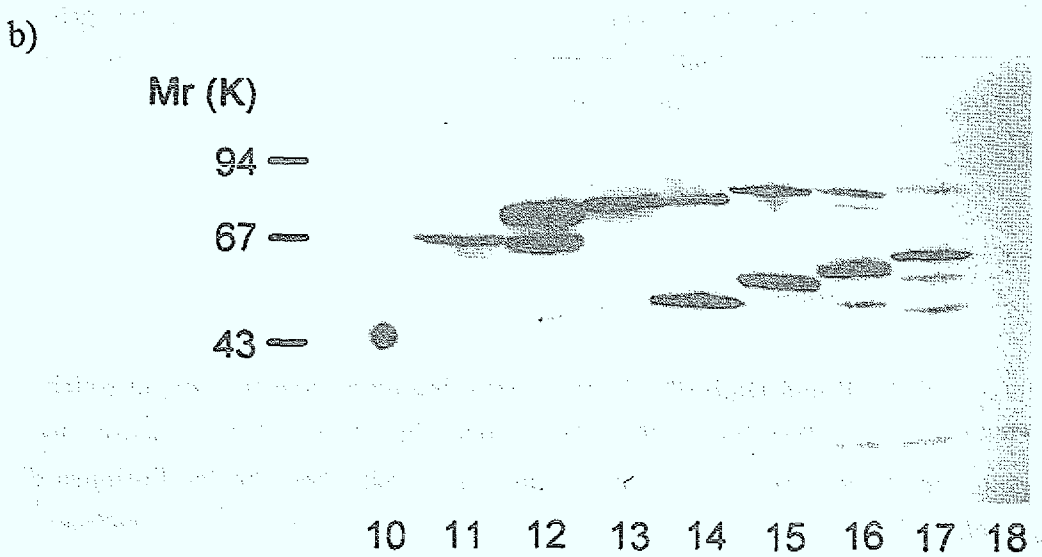


Abb. 15: Western-Blot Analyse der Expression der AP-Fusionen von DmCNGC bzw. brCNGC. Es wurden jeweils ca. 5 x 10^8 Bakterienzellen aufgetragen. a) Aktive Fusionen. Spur 1 zeigt AP aus *E. coli*, Spuren 2-8, Ganzzellextrakte von CC118-Zellen, die transformiert worden waren mit: Spur 2, DmH1-AP; Spur 3, DmH3D191/199V-AP; Spur 4, DmH3D191V-AP; Spur 5, DmH4-AP; Spur 6, brH4-AP; Spur 7, brPO-AP; Spur 8, brPOsand; Spur 9, nicht-transformierte CC118-Zellen.

b) Inaktive AP-Fusionen. Spur 10 zeigt AP aus *E. coli*, Spuren 11-17, Ganzzellextrakte von CC118-Zellen, die transformiert worden waren mit: Spur 11, DmH2-AP; Spur 12, DmH3-AP; Spur 13, DmS4-AP; Spur 14, brH1-AP; Spur 15, brH2-AP, Spur 16, brH3-AP; Spur 17, brS4-AP; Spur 18, nicht-transfomierte CC118-Zellen.

bedeutet, daß der Kanalanteil aller Fusionsproteine degradiert wurde. Nur bei DmH1-AP und brH4-AP sind noch größere Fragmente zu erkennen. Alle anderen, hier nicht abgebildeten, aktiven Fusionsproteine zeigten dieselbe Fragmentgröße im Western Blot. Bei etwas veränderten Expressionsbedingungen (z. B. kürzere Expressionsdauer) waren teilweise auch bei anderen Fusionsproteinen noch zusätzliche, größere Fragmente zu sehen (Daten nicht gezeigt). Der Abbau ist auch bei brPOsand zu erkennen (Spur 8). Das Sandwich-Fusionsprotein ist deutlich größer als das dazugehörige Fusionsprotein brPO-AP (Spur 7), jedoch immer noch kleiner (ca. 90 kDa), als erwartet (129 kDa). Wie erwartet ist in Spur 9, in der CC118-Zellextrakte von Zellen ohne Plasmid aufgetragen wurden, keine Reaktion mit dem Antikörper gegen die AP zu sehen, da dieser Stamm keine endogene AP besitzt.
In Abb. 15b) ist ein Western-Blot gezeigt, bei dem die Zellextrakte von einigen inaktiven Fusionsproteinen aufgetrennt wurden. Die markierten Fragmente sind deutlich größer als bei den aktiven Fusionen. Jedoch sind auch hier Abbauprodukte zu sehen, besonders im Fall der brCNGC-Fusionsproteine (Spuren 14-17). Hier sind teilweise mehrere Abbauprodukte bis hin zu der erwarteten Größe der Phosphatase mit ihrem N-terminalen Verbindungspeptid (49 kDa) zu sehen (Spur17). Die Größe der längsten Fragmente nimmt von Spur 11 bis zu Spur 17 immer mehr zu, da auch der Anteil des Kanalproteins in den jeweiligen Klonen immer größer wurde. In Spur 11 bis 13 ist DmH2, DmH3 und DmS4 aufgetragen, die eine errechnete Größe von etwa 70, 74 bzw. 78 kDa haben sollten. Die Fusionsproteine in den Spuren 14 bis 17, brH1 bis brS4, sollten etwa 72, 76, 80 und 84 kDa haben.

3.7.2 Fraktionierte Zellextrakte

Am Beispiel von DmH3-AP und DmH3D191/199V-AP sollte untersucht werden, in welchem Bereich der Bakterienzelle (Periplasma, Zytoplasma oder innere Membran) inaktive bzw. aktive Fusionsproteine lokalisiert sind. Darüberhinaus konnte mit diesen beiden Fusionen die Wirkung der Neutralisierung der Aspartate in H3 in Bezug auf die Lokalisierung veranschaulicht werden.
Beide Fusionsproteine wurden, wie unter 2.14 beschrieben, exprimiert und jeweils 1,5 ml Zellsuspension in die Bestandteile Periplasma, Zytoplasma und innere Membran fraktioniert (2.16.1). Die einzelnen Fraktionen wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Immobilon P Membran geblottet (2.16.2). Der AP-Nachweis erfolgte wiederum mit dem monoklonalen Antikörper gegen AP.
Das inaktive Fusionsprotein DmH3-AP befand sich ausschließlich in der Membranfraktion (Abb. 16, Spur 4). Wie schon in Abb. 15b) zu sehen, waren auch hier Abbauprodukte des Fusionsproteins vorhanden. Sowohl in der Periplasma-, als auch in der Zytoplasmafraktion war keine Immunreaktion durch den eingesetzten Antikörper zu erkennen. Die Neutralisierung der

beiden Aspartate in H3 bei DmH3D191/199V-AP veränderte die Verteilung des Fusionsproteins. Der größte Anteil befand sich im Periplasma (Spur 5), jedoch bis auf die Größe der AP plus Verbindungspeptid abgebaut. In der Membranfraktion befand sich auch ein Anteil des abgebauten Fusionsproteins, zusätzlich aber auch größere Fragmente (Spur 7). In der Zytoplasmafraktion (Spur 6) war keine Immunreaktivität nachzuweisen.

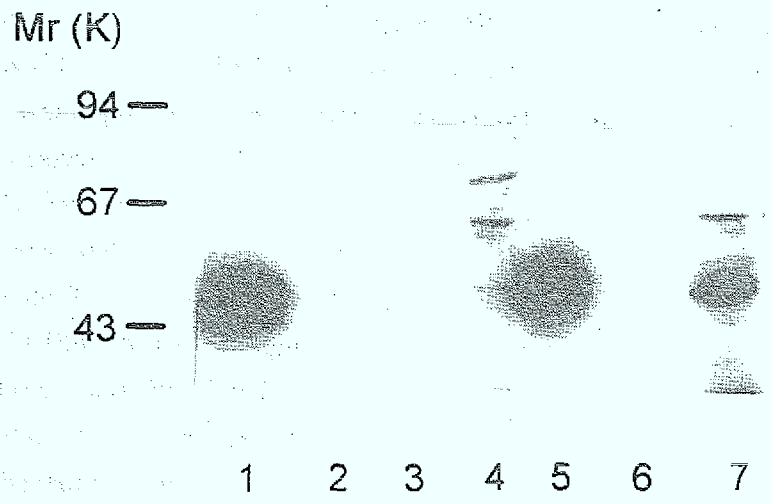


Abb. 16: Fraktionierung von *E. coli*-Zellen, die mit DmH3-AP und DmH3D191/199V-AP transformiert worden waren. Spur 1, AP aus *E. coli*; Spur 2-4, DmH3-AP; Spur 5-7, DmH3D191/199V-AP; Spur 2 und 5, Periplasmafraktion; Spur 3 und 6, Zytoplasmafraktion; Spur 4 und 7, Membranfraktion.

3.8 Expression einer C-terminal deletierten Mutante von brCNGC in *Xenopus*-Oozyten und ihr immunzytochemischer Nachweis

Mit der beschriebenen Fusionsmethode konnte nicht nachgewiesen werden, daß die Segmente H1 und H2 von brCNGC membrangängig sind. H3 und S4 wurden erst nach Neutralisierung von D255 in H3 als transmembranale Segmente identifiziert. Um den N-terminalen Bereich von brCNGC zu untersuchen, wurde ein weiteres eukaryontisches Expressionssystem, *Xenopus*-Oozyten, benutzt. Dieses System erlaubt es, Proteine immunzytochemisch in bzw. an der Membran nachzuweisen. Der Einbau in die Membran erfolgt sehr wahrscheinlich sequentiell vom N-Terminus zum C-Terminus des Proteins (Wessels & Spiess, 1988, Singer, 1990). Wenn im N-terminalen Teil von brCNGC bis S4 transmembranale Segmente vorhanden sind, sollte also eine C-terminale Deletionsmutante von brCNGC, die direkt hinter S4 bis zum C-Terminus deletiert ist, noch in die Membran eingebaut werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine solche Deletion von brCNGC konstruiert und in *Xenopus*-Oozyten exprimiert.
Als Ausgangsplasmid wurde pRCG1 (Kaupp et al., 1989), das die kodierende Sequenz von brCNGC enthält, benutzt. Der Bereich von bp 164 bis bp 886 in brCNGC wurde mit Hilfe der Primer # 37 und # 425 in einer PCR-Reaktion amplifiziert, wobei am 3´-Ende ein Stop-Codon und darauffolgend eine Erkennungssequenz für Apa I eingebaut wurde. pRCG1 und das PCR-Fragment wurden mit Hpa I (schneidet bei bp 267 in brCNGC) und Apa I geschnitten. pRCG1 besitzt bei bp 2050 eine Apa I Schnittstelle. Das Vektorfragment und das geschnittene PCR-Fragment wurden ligiert. Hierdurch entstand ein Plasmid, das die kodierende Sequenz von brCNGC vom Start-Methionin bis zu Threonin 290 enthielt. Der Aminosäurerest T290 befindet sich 7 Aminosäurereste N-terminal von H4.
Die DNA der Mutante sowie die von pRCG1 als Kontrolle wurde *in vitro* transkribiert (2.12) und die RNA in Oozyten injiziert. Die Fixierung und Färbung der Oozyten erfolgte wie unter 2.17 beschrieben. Es wurden zwei verschiedene primäre Antikörper zur Detektion benutzt: ein polyklonaler Antikörper, der gegen den N-Terminus von brCNGC gerichtet ist und ein monoklonaler Antikörper, PMc1D1, der gegen den C-Terminus von brCNGC gerichtet ist (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R.S. Molday). Beide Antikörper markierten die Membran von Oozyten, in die RNA von pRCG1 injiziert worden war (Abb. 17a). Aber nur mit dem N-terminalen Antikörper konnte eine spezifische Immun-Fluoreszenz bei den Oozyten beobachtet werden, in die RNA der Deletionsmutante injiziert worden war. Die Oozyten, in die keine RNA injiziert worden war, zeigten keine Fluoreszenz (Abb. 17b).
Diese immunzytochemische Untersuchung gibt einen weiteren Hinweis darauf, daß im Bereich H1 bis S4 transmembranale Segmente vorliegen, da die Deletionsmutante in die Membran eingebaut wurde.

a)

b)

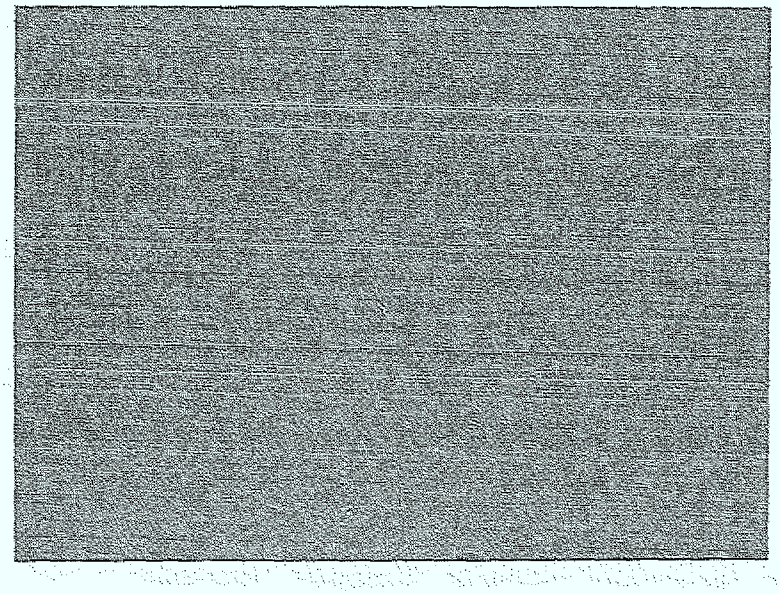


Abb. 17: Nachweis von brCNGC in der Membran von Oozyten. In a) ist ein Ausschnitt einer Xenopus-Oozyte gezeigt, in die RNA von RCG1 injiziert wurde. Die Membran fluoresziert dort, wo der primäre Antikörper PMc1D1 und der sekundäre Antikörper gebunden haben (2.17). Im Vergleich dazu ist in b) ein Ausschnitt einer Oozyte gezeigt, in die keine RNA injiziert wurde. Der eingezeichnete Längenstandard entspricht 50 µm.

4. Diskussion

Shaker-ähnliche K^+-Kanäle und zyklisch-Nukleotid-gesteuerte (CNG) Ionenkanäle enthalten zwei Sequenzmotive, das S4-Segment und die Poren-bildende Region, die in den beiden Proteinfamilien sehr ähnlich sind. Deshalb wurde angenommen, daß diese Kanäle auch die gleiche transmembranale Topologie besitzen (Abb. 2). Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell mit Hilfe einer Genfusionsmethode am Beispiel der CNG-Kanäle aus Rindersehstäbchen und *Drosophila melanogaster* überprüft. Die Methode beruht darauf, daß einzelne Segmente als Signal- oder Stop-Transfersequenz fungieren und Reporterenzyme - alkalische Phosphatase (AP) und β-Galaktosidase (βGal) - durch die Membran transportieren können.
Bei der Untersuchung von bakteriellen Membranproteinen mit dieser Methode waren einige experimentelle Ergebnisse nicht eindeutig zu interpretieren (Traxler et al., 1993). Zudem fehlen Erfahrungen mit der Expression von eukaryontischen Membranproteinen in *E. coli*. Deshalb wurde die Genfusionsmethode systematisch, mit vielen internen Kontrollen durchgeführt:

- Es wurden zwei verschiedene, aber homologe Kanalproteine untersucht, da angenommen wird, daß alle Mitglieder der engeren Familie der CNG-Kanäle die gleiche Topologie besitzen.
- Die Reporterenzyme wurden mit allen putativen intra- und extrazellulären Schleifen fusioniert.
- Die Ergebnisse der AP-Fusionen wurden mit βGal-Fusionen überprüft.
- Schließlich wurde mit Sandwich-Fusionen überprüft, ob die Proteine sequentiell in die Membran eingebaut werden.

Wenn man von dem ersten transmembranalen Segment H1 absieht, stimmen die Ergebnisse, die mit Fusionen von beiden Kanaltypen erzielt wurden, miteinander überein.

4.1 Voraussetzungen für die Anwendung der Genfusions-Methode

Die Genfusions-Methode wurde bisher - mit einer Ausnahme - ausschließlich verwendet, um Proteine der inneren bakteriellen Membran zu untersuchen (Manoil & Beckwith, 1986; Boyd et al., 1987; Allard & Bertrand, 1992; van Beilen et al., 1992; Boyd et al., 1993; Timm et al., 1994). Wenn man mit dieser Methode die Topologie eukaryontischer Membranproteine untersuchen möchte, muß vorausgesetzt werden, daß sich die native Topologie in der inneren bakteriellen Membran nicht ändert. Wahrscheinlich trifft dies zu, da prokaryontische und eukaryontische Organismen ähnliche Mechanismen verwenden, um Proteine über die Membran

zu translozieren oder einzubauen. Mehrere Komponenten des Translokations-Apparates sind von den Bakterien bis zum Menschen evolutionär konserviert (High & Stirling, 1993; Jungnickel et al., 1994) und Signalsequenzen von prokaryontischen, sekretorischen Proteinen werden auch von eukaryontischen Zellen richtig erkannt. Außerdem können eukaryontische Membranproteine funktionell in *E. coli* exprimiert werden. Der Glucosetransporter aus menschlichen Erythrozyten kann nach Expression in *E. coli* nach wie vor Glucose transportieren (Sarkar et al., 1988). Der β_2-adrenerge Rezeptor des Menschen bindet auch in der inneren Membran von *E. coli* Liganden und behält seine pharmakologischen Eigenschaften bei (Marullo et al., 1988). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß diese Proteine mit der richtigen Orientierung in die Membran eingebaut werden.

Bisher wurde die transmembranale Topologie von zwei eukaryontischen Proteinen in *E. coli* untersucht. Für die β-Untereinheit der Na,K-ATPase aus Schafsniere, deren Topologie schon bekannt war (Kawakami & Nagano, 1988), wurde mit β-Laktamase als Reporterenzym gezeigt, daß die native Orientierung in der Membran von *E. coli* erhalten bleibt (Broome-Smith et al., 1990; Zhang & Broome-Smith, 1990). Diese Untereinheit besitzt eine sehr einfache Struktur mit nur einem transmembranalen Segment. Die Fusionsmethoden mit β-Laktamase und AP funktionieren ähnlich, da beide Reporterenzyme nur im Periplasma aktiv sind. Weiterhin wurde der β_2-adrenerge Rezeptor des Menschen in *E. coli* durch verschiedene Fusionen mit AP untersucht (Traxler et al., 1993). Die Ergebnisse stimmen weitgehend mit dem vorgeschlagenen Modell, das sieben transmembranale Segmente enthält, überein.

Durch das Einfügen der Reporterenzyme werden die C-terminalen Bereiche der CNG-Kanäle deletiert (Abb. 3). Die Genfusionsmethode setzt deshalb voraus, daß Regionen, die C-terminal von der Fusionsstelle liegen, keine topogenen Signale enthalten, die den Einbau von N-terminal gelegenen Regionen beeinflussen. Bei Membranproteinen mit einem extrazellulär lokalisierten N-Terminus werden für dessen Export wahrscheinlich Sequenz-Abschnitte benötigt, die weiter C-terminal liegen. Dadurch können Fusionen am N-Terminus dieser Proteine falsche Ergebnisse liefern (Traxler et al., 1993). Bei Membranproteinen, deren N-Terminus im Zytoplasma lokalisiert ist, wie es auch bei CNG-Kanälen der Fall ist (Molday et al., 1991), sollte der Einbau in die Membran sequentiell ohne Einfluß weiter C-terminal liegender Sequenz-Abschnitte erfolgen (Wessels & Spiess, 1988; Singer, 1990). Um nachzuweisen, daß diese Annahme auch für CNG-Kanäle gilt, wurden zwei "Sandwich"-Fusionen konstruiert (Ehrmann et al., 1990), bei denen die AP in der intrazelluären Schleife IS 1 bzw. in der extrazellulären Schleife ES 4 eingefügt wurde. Die Sandwich-Fusion brH2sand war, wie das entsprechende Konstrukt brH2-AP, inaktiv. Die Aktivität der Sandwichfusion mit aktiver AP (brPOsand) war aber um ca. 60 % niedriger als die Aktivität des C-terminal deletierten Proteins (brPO-AP). Ein geringeres Aktivitätsniveau ist auch bei Sandwichfusionen des MalF-Proteins beobachtet worden (Ehrmann et al., 1990). Vermutlich ist die AP, die erst als Dimer aktiv wird (McCracken & Meighen, 1980), durch die beiderseitige Verknüpfung mit anderen

Proteinanteilen sterisch gehindert. Diese Ergebnisse zeigen jedoch, daß Deletionen nicht die Topologie verändern.

4.2 Fusionen von brCNGC und DmCNGC mit alkalischer Phosphatase bzw. β-Galaktosidase

Die Fusionen mit brCNGC identifizieren H4 und H5 als transmembranale Segmente. H4 übernimmt die Funktion einer Signalsequenz, da die Fusion C-terminal von H4 (brH4-AP) aktiv ist. H5 hingegen stellt eine Stop-Transfersequenz dar, da die AP Fusion C-terminal von H5 inaktiv ist. Die anderen putativen transmembranalen Segmente H1 bis H3 und S4 verhielten sich jedoch nicht - wie eigentlich erwartet - als Signalsequenz.
Bei DmCNGC wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei brCNGC, jedoch konnte zusätzlich H1 als transmembranales Segment identifiziert werden. Da sowohl H1 als auch H4 in den Fusionen als Signalpeptide funktionieren, muß mindestens ein weiteres transmembranales Segment zwischen H1 und H4 existieren. Durch Mutagenese der potentiellen Signalsequenzen konnten auch noch weitere Segmente identifiziert werden (s.u.).
Die Aktivitäten der AP- und der βGal-Fusionen unterscheiden sich deutlich voneinander. Dies ist besonders an dem Fusionspaar brPO zu beobachten. Die AP-Fusion, die als aktiv angesehen wurde, hatte eine Aktivität von ca. 297 Einheiten. Die entsprechende βGal-Fusion, die als inaktiv angesehen wurde, hatte eine Aktivität von 295 Einheiten. βGal ist ein sehr großes, zytoplasmatisches Protein. Es gibt Hinweise, daß βGal, wenn sie mit einem Signalpeptid fusioniert ist, nicht immer ins Periplasma transportiert wird (Freudl, 1988). Man vermutet, daß bei einem Bruchteil der Fusionen die βGal ihre native Tertiärstruktur ausbildet, bevor sie transportiert wird. Proteine müssen während des Transports durch eine Membran jedoch in einer entfalteten Form vorliegen. Dies führt dazu, daß diese Fusionsproteine überhaupt nicht oder nur teilweise in die Membran transferiert werden (Traxler et al., 1993). Dadurch entstehen höhere Grundaktivitäten. Es wurden deshalb nur solche βGal-Fusionen als aktiv bewertet, die ≥300 Einheiten Enzymaktivität aufwiesen (die niedrigste Aktivität der aktiven β Gal-Fusionen betrug ca. 1000 Einheiten). Bei AP-Fusionen ist der Unterschied zwischen aktiven und inaktiven Fusionen deutlicher; inaktive Fusionen wiesen immer Aktivitäten auf, die ≤10 Einheiten waren.
CC118-Bakterienzellen, die mit den Plasmiden pDmH4-AP, -βGal, pDmPO-AP und -βGal transformiert worden waren, wuchsen nur sehr langsam. CC118 besitzt keinen endogenen *lac*-Repressor, so daß die Repression des Promotors nur über Glucose möglich ist. Diese sogenannte "Catabolit-Repression" ist jedoch nicht sehr effektiv, da auch bei Anwesenheit von Glucose im Medium Fusionsprotein gebildet wird. Vermutlich sind manche Fusionsproteine, die Teile (DmH4) oder die ganze Poren-bildende Region (DmPO) enthalten, toxisch für die

Zelle. Die Proteine könnten einen "negativen Selektionsdruck" auf die Zellen ausüben, die diese Plasmide enthalten. Zellen ohne Plasmide oder mit inaktivierten Promotoren haben deshalb einen Wachstumsvorteil. Da die Aktivität der Reporterenzyme auf die OD_{600} der Zellen normiert wird (2.15), erhält man niedrige Werte, weil wahrscheinlich viele Zellen vorhanden sind, die kein Fusionsprotein exprimieren.
Die Bakterien mit den entsprechenden brCNGC-Fusionen wuchsen normal, da ein anderer Vektor, pUC18, verwendet wurde. Bei diesem Vektor mußte zur maximalen Expression die Glucose aus dem Medium entfernt werden (2.14). Die DmCNGC-Konstrukte wurden jedoch auch in Anwesenheit von Glucose stark exprimiert. Bei Transformation der Plasmide in XL1-Blue, einem Bakterienstamm, der durch eine Mutation im Promoter des *lacI*-Gens sehr viel Repressor bildet, wurde keine Wachstumsverzögerung bemerkt. Dieser Bakterienstamm enthält jedoch eine endogene AP. Da die vier oben genannten Plasmide die einzigen waren, die das Wachstum der CC118-Bakterien verlangsamten, wurden jedoch alle Aktivitätsmessungen in dem Bakterienstamm CC118 durchgeführt.

4.3 Die Auswirkung von Aspartat-Resten in H3 auf den Transport der Reporterenzyme durch die Membran

Nach dem Topologie-Modell in Abb. 2 sollte H3 ein transmembranales Segment darstellen. Die AP-Fusionen C-terminal von H3 waren jedoch inaktiv, während die entsprechenden βGal-Fusionen aktiv waren. Zunächst deutete dieses Ergebnis darauf hin, daß H3 nicht membranständig ist. Alle bekannten CNG-Kanäle besitzen jedoch in H3 zwei konservierte Aspartat-Reste (Eismann et al., 1993). Mutationen, die zu polaren oder geladenen Resten in der hydrophoben Region von Signalpeptiden führen, beeinträchtigen den Transport durch die Membran (Michaelis et al., 1983; von Heijne, 1986b). Geladene Reste in transmembranalen Segmenten könnten genauso wie bei Signalpeptiden den Export behindern. Dies ist auch schon für das Tetrazyklinresistenz-Protein gezeigt worden (Allard & Bertrand, 1992). Ein transmembranales Segment konnte erst dann als Signalpeptid dienen, als geladene durch neutrale Aminosäurereste ausgetauscht worden waren.
Die gentechnische Neutralisierung geladener Reste in H3 bewirkt, daß das veränderte H3-Segment sowohl in den brCNGC- als auch den DmCNGC-Konstrukten als Signalpeptid fungiert. Die mutierten AP-Fusionen besaßen eine Aktivität, die um das 35fache (brH3D255V-AP) bzw. das 200fache (DmH3D191/199V) angestiegen war. Die Aktivitäten der entsprechenden βGal-Fusionen waren zwar niedriger als die der unmutierten Fusionen, waren jedoch absolut betrachtet noch sehr hoch. Wahrscheinlich stellen diese Segmente trotz des Austausches der geladenen Aminosäuren lediglich schwache Signalpeptide dar, die die große ß-Galaktosidase nur mühsam über die Membran schleusen können.

Möglicherweise hat erst der Austausch der Aspartatreste in H3 zum Einbau dieses Segmentes in die Membran geführt. Als Folge davon sollten membranständige Segmente, die C-terminal von H3 liegen, ihre Orientierung umkehren. Deshalb wurden die Aspartate in H3 auch in den Fusionen brPO und DmH4 mutiert. Ein zusätzliches transmembranales Segment N-terminal von H4 sollte zu Fusionen mit inaktiver AP und aktiver βGal führen. Die Aktivitäten änderten sich jedoch nicht im Vergleich zu den unmutierten Fusionen. Das Ergebnis zeigt, daß durch die Mutationen kein zusätzliches membranständiges Segment geschaffen wird. H3 ist als ein transmembranales Segment anzusehen, das aber wegen seiner geladenen Reste nicht als Signalpeptid funktioniert.
Ein Vergleich der Sequenzen von H2 und H3 ist interessant. H2 muß als Stop-Transfersequenz angesehen werden, da es zwischen H1 und H3 liegt, die in DmCNGC als Signalpeptide funktionieren. H2 besitzt jedoch drei Aspartatreste. Trotzdem ist dieses Segment in der Lage, in der Fusion DmH2-AP die AP ins Zytoplasma zu transportieren. Möglicherweise besitzen Stop-Transfersequenzen andere funktionelle Eigenschaften, die durch geladene Reste nicht beeinträchtigt werden.
Durch die Expressionsversuche mit Mutanten konnte H3 eindeutig als transmembranales Segment identifiziert werden. Da sowohl H3 als auch H4 als Signalpeptid funktionieren, muß S4 eine Stop-Transfersequenz darstellen und membranständig sein. In den K^+-Kanälen hat das S4-Segment die Aufgabe eines Spannungsfühlers und muß deshalb die Membran durchspannen (Stühmer, 1991). Die CNG-Kanäle sind jedoch spannungsunabhängig (Kaupp et al., 1989; Zimmerman & Baylor, 1992; Baumann et al., 1994). Insofern ist dieses Ergebnis sehr interessant und es wird notwendig sein, die genaue Aufgabe des S4-Segmentes in weiteren Experimenten aufzuklären.

4.4 H1 als Signalsequenz: drei AP-Fusionen im Vergleich

Die Ergebnisse, die mit brCNGC- und DmCNGC-Fusionen erzielt wurden, sind gleich; nur die Fusionen C-terminal von H1 zeigen unterschiedliche Ergebnisse. brH1-AP war inaktiv, während DmH1-AP aktiv war. Da die Primärstruktur und die funktionellen Eigenschaften beider Kanalproteine sehr ähnlich sind (Baumann et al., 1994), ist es nicht wahrscheinlich, daß sich die Kanäle in einer so wichtigen Eigenschaft wie der Topologie unterscheiden.
H1 aus DmCNGC ist deutlich hydrophober als H1 aus brCNGC (Abb. 1 und 14). Eine charakteristische Eigenschaft eines funktionellen Signalpeptids ist die stark hydrophobe Region in der Mitte des Motivs. Es ist möglich, daß H1 aus DmCNGC aufgrund seiner größeren Hydrophobizität besser als Signalpeptid funktioniert als H1 aus brCNGC.
Um den Einfluß der Hydrophobizität des H1-Segments zu analysieren, wurde der CNG-Kanal aus dem Riechepithel des Rindes untersucht. Der Hydrophobizitäts-Index von H1 liegt mit 1,9

zwischen den Werten für die beiden anderen Kanalproteine (Abb. 14). Die AP-Fusion C-terminal zu H1 des olfaktorischen CNG-Kanals war aktiv, jedoch war die Aktivität nicht so hoch wie bei DmH1-AP; die βGal-Fusion war deutlich inaktiver als bei brH1-βGal. Man kann daraus schließen, daß die Fähigkeit, die AP zu exportieren, eindeutig mit der Hydrophobizität der H1-Segmente korreliert (Tab. 4).

Anscheinend werden durch das Kriterium von Kyte & Doolittle (Hydrophobizitäts-Index ≥ 1,6) nicht alle transmembranalen Segmente erfaßt, da H1-H3 und S4 in brCNGC und H2, H3 und S4 in DmCNGC dieses Kriterium nicht erfüllen. Es müssen noch andere Eigenschaften als nur die Hydrophobizität für die Bestimmung einer Region als transmembranales Segment wichtig sein. Umgekehrt müssen Segmente, die einen Hydrophobizitäts-Wert ≥ 1,6 besitzen, nicht notwendigerweise membranständig sein. DmCNGC liefert dafür ein gutes Beispiel: Die cGMP-Bindungsstelle weist zum Teil höhere Hydrophobizitäts-Werte auf als H2, H3 und S4, befindet sich aber im Zytosol.

In der Mitte der H1-Segmente von brCNGC und boCNGC befindet sich ein Prolinrest. Diese Aminosäure kommt recht häufig in transmembranalen Segmenten von Membranproteinen vor (von Heijne, 1991). Es wird angenommen, daß sie einen Knick in der Achse des α-helicalen Segmentes bewirkt. In Signalpeptiden oder Membranproteinen mit nur einem transmembranalen Segment sind jedoch bisher keine Prolinreste gefunden worden. Wahrscheinlich stören die Prolinreste die Fähigkeit von H1 als Signalpeptid zu dienen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß H1 in den CNG-Kanälen ein transmembranales Segment darstellt. Wahrscheinlich müssen jedoch in brCNGC auch andere Segmente mitwirken, um H1 in die Membran einzubauen.

4.5 Nachweis der Expression der AP-Fusionen

Wenn AP-Fusionen inaktiv sind, muß überprüft werden, ob auch tatsächlich die alkalische Phosphatase gebildet wurde. Deshalb wurden aktive und inaktive AP-Fusionsproteine mit einem Antikörper, der gegen die alkalische Phosphatase gerichtet ist, im Western-Blot nachgewiesen (Abb. 15). Die meisten AP-Fusionen waren zu kleineren Fragmenten abgebaut. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da bekannt ist, daß eukaryontische Proteine, die in *E. coli* exprimiert werden, sehr häufig einem proteolytischen Abbau unterliegen (Marston, 1986). Man nimmt an, daß die exogenen Proteine von der Zelle als fremd erkannt und deshalb zerstört werden. Insbesondere die aktiven AP-Fusionsproteine wurden bis zu der Größe der alkalischen Phosphatase plus ihrem Verbindungspeptid abgebaut. Da die aktiven AP-Fusionen den AP-Anteil ins Periplasma transportieren, war das Enzym vor weiterem Proteaseabbau geschützt. Deshalb wird die AP dort angereichert. Bei inaktiven AP-Fusionsproteinen wurden Banden mit verschiedenen Molekulargewichten beobachtet. Die AP-Bande war nicht oder nur schwach zu

sehen. Da die Phosphatase nicht ins Periplasma transportiert wird, ist es wahrscheinlich, daß sie fast vollständig abgebaut wird. Wenn die Fusionen mit aktiver alkalischer Phosphatase für kürzere Zeit exprimiert werden, beobachtet man, wie bei den inaktiven AP-Fusionen, mehrere verschieden große Proteinbanden. Das liegt wahrscheinlich daran, daß die Fusionsproteine noch nicht vollständig abgebaut worden sind. Man kann nicht ausschließen, daß eine periplasmatische Protease die aktiven AP-Fusionsproteine im Verbindungsstück spaltet. Dies würde ebenfalls dazu führen, daß die N-terminalen Kanalanteile im Western-Blot nicht mehr detektiert werden.
Der Abbau von Fusionsproteinen ist auch schon bei anderen Proteinen, z. B. dem Methyl-akzeptierenden Chemotaxis-Protein (DcrA) von *Desulfovibrio vulgaris* beobachtet worden (Deckers & Voordouw, 1994). Das Fusionsprotein mit aktiver AP wurde größtenteils bis auf etwa 49 kDa abgebaut, was der Größe von AP mit dem Verbindungspeptid entspricht. Das Fusionsprotein mit inaktiver AP war nach der Expression nicht nachweisbar.
Um sicher zu sein, daß bei aktiven AP-Fusionsproteinen die AP tatsächlich im Periplasma vorliegt, wurden Western-Blots mit fraktionierten Zellextrakten durchgeführt. Periplasma, Zytoplasma und Membran wurden getrennt analysiert. Das Ergebnis war wie erwartet: Bei der Fusion mit aktiver AP (DmH3D191/199V-AP) war im Periplasma sehr viel und in der Membranfraktion wenig AP-Immunreaktivität nachzuweisen. Bei der Fusion mit inaktiver AP befand sich die Immunreaktivität in der Membranfraktion, d. h. es wurde keine AP durch die Membran transportiert. In den Zytoplasmafraktionen war keine Immunreaktivität zu erkennen. Dies ist auch nicht zu erwarten, da die Fusionsstelle C-terminal von H3 liegt und somit drei transmembranale Segmente vorhanden sind, die das Fusionsprotein in der Membran verankern.
Die Fraktionierungsexperimente bestätigen die durch die Aktivitätsmessungen erhaltenen Ergebnisse: nur bei aktiven AP-Fusionsproteinen wird das Enzym ins Periplasma transportiert.

4.6 Analyse von brCNGC und DmCNGC mit der "positive-inside"-Regel

von Heijne analysierte die Ladungsverteilung in zytoplasmatischen und periplasmatischen bzw. extrazellulären Schleifen mehrerer membranständiger Proteine aus Pro- und Eukaryonten. Er stellte fest, daß die zytoplasmatischen Schleifen mehr positiv geladene Aminosäuren (Lysine und Arginine) enthielten als die extrazellulär gelegenen Schleifen (von Heijne, 1986a; von Heijne & Gavel, 1988; von Heijne, 1989; von Heijne, 1992; Sipos & von Heijne, 1993). Diese sogenannte "positive-inside"-Regel gilt jedoch nur für kürzere Schleifen bis zu einer Gesamtlänge von etwa 60 Aminosäureresten (von Heijne, 1994).
Warum positiv geladene Aminosäurereste die zytoplasmatische Lokalisierung von Segmenten bestimmen, ist nicht bekannt. Man vermutet, daß basische Aminosäurereste mit den sauren Kopfgruppen der Phospholipide an der zytoplasmatischen Seite der Membran wechselwirken

(Boyd & Beckwith, 1990), oder daß positiv geladene Aminosäuren, wie sie auch N-terminal von Signalsequenzen vorkommen, mit negativ geladenen Aminosäureresten im Translokationsapparat wechselwirken (Akita et al., 1990). Vermutlich verhindert auch das Membranpotential von *E. coli*, daß positiv geladene Aminosäurereste durch die Membran transportiert werden (Andersson & von Heijne, 1994). Bei Eukaryonten kann dieser Mechanismus jedoch keine Rolle spielen, da das endoplasmatische Reticulum kein vergleichbares Membranpotential aufbaut (Boyd & Beckwith, 1990). Bei Eukaryonten wird vermutet, daß nur die Ladungsdifferenz zwischen den N- und C-terminalen Schleifen des ersten transmembranalen Segments für die Orientierung wichtig ist, und daß die folgenden Segmente sequentiell eingefügt werden (Hartmann et al., 1989). Diese Hypothese erklärt allerdings nicht, warum auch bei Eukaryonten diese unsymmetrische Ladungsverteilung entlang der ganzen Proteinkette zu beobachten ist.

Die intrazellulären Schleifen IS 1 und IS 2 von brCNGC und DmCNGC (Abb. 9) besitzen mehr positiv geladene Aminosäuren als die extrazellulären Schleifen ES 1 und ES 2 (Tab. 5). Dies ergibt eine positive Nettoladung der IS im Vergleich zu einer negativen Nettoladung oder Neutralität der extrazellulären Schleifen. Bei ES 3 ist die Nettoladung ebenfalls 0, ES 4 besitzt eine negative Nettoladung. Die Analyse der Ladungsverteilung stimmt mit der Topologie in Abb. 2 überein. Das zeigt, daß die "positive-inside"-Regel auch auf CNG-Kanäle anwendbar ist.

	brCNGC			DmCNGC		
	Anzahl + AS	Anzahl - AS	Nettoladung	Anzahl + AS	Anzahl - AS	Nettoladung
ES 1	1	3	-2	1	1	0
IS 1	7	4	+3	4	3	+1
ES 2	1	1	0	0	1	-1
IS 2	2	0	+2	1	0	+1
ES 3	4	4	0	2	2	0
ES 4	1	2	-1	0	3	-3

Tab. 5: Anzahl positiv (+ AS) und negativ (- AS) geladener Aminosäuren in den extrazellulären (ES) und intrazellulären (IS) Schleifen von brCNGC und DmCNGC und die daraus berechnete Nettoladung.

4.7 Strukturelle und funktionelle Zuordnung der CNG-Kanäle zu anderen Ionenkanal-Familien

CNG-Kanäle sind genetisch mit der Familie der spannungsabhängigen Ionenkanäle verwandt. Sie besitzen nicht nur gemeinsame Sequenzmotive wie das S4-Segment und die Poren-bildende Region, sondern sind, wie diese Arbeit zeigt, auch strukturell ähnlich. Es wird deshalb vermutet, daß sich CNG- und spannungsabhängige K^+-Kanäle aus einem gemeinsamen Vorfahren, vermutlich einem K^+-Kanal, entwickelt haben (Sather et al., 1994). Aus den CNG-Kanälen haben sich dann durch Genverdopplung und Veränderungen in der Porenregion die Ca^{2+}- und Na^+-Kanäle entwickelt.
Funktionell allerdings gehören die CNG-Kanäle zur Klasse der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle, da sie direkt und kooperativ von cGMP bzw. cAMP geöffnet werden. Sie weisen jedoch keinerlei strukturelle oder sequenzspezifische Ähnlichkeit zu klassischen Liganden-gesteuerten Ionenkanälen, wie dem nikotinischen Azetylcholinrezeptor, auf. Es wird angenommen, daß die Liganden-gesteuerten Ionenkanäle vier transmembranale Segmente besitzen (Numa, 1989; Barnard, 1992). Ionotrope Glutamatrezeptoren gehören ebenfalls zur Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle, weil sie durch den Neurotransmitter Glutamat geöffnet werden. Sie sollten deshalb ebenfalls vier transmembranale Segmente besitzen. Wie neuere Mutationsexperimente (Kuryatov et al., 1994), aber auch Untersuchungen zur Phosphorylierung (Tingley et al., 1993) oder zur N-Glycosylierung (Roche et al, 1994; Wo & Oswald, 1994) zeigen, besitzen diese Rezeptoren entweder drei oder fünf transmembranale Segmente.
Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede sind CNG-Kanäle daher nicht mit diesen Kanälen verwandt und es ist deshalb vorgeschlagen worden, daß Kanäle, die von intrazellulären Botenstoffen gesteuert werden, eine eigenständige Familie bilden. Zu dieser Familie von Kanälen, die wie CNG-Kanäle, intrazellulär von einem "second messenger" aktiviert werden, gehören auch der Inositol-1,4,5-trisphosphate-(InsP3)-Rezeptor (Furuichi et al., 1989) und der Ryanodine-Rezeptor (Takeshima et al., 1989). Für den InsP3-Rezeptor wurde ein Modell mit sechs transmembranalen Segmenten vorgeschlagen (Michikawa et al., 1994). Diese Rezeptoren zeigen jedoch keine Sequenzähnlichkeiten zu CNG- oder *Shaker*-ähnlichen K^+-Kanälen.
Auch in der Superfamilie der spannungsabhängigen Ionenkanäle sind inzwischen Proteine bekannt, die zwar funktionell ähnlich, aber strukturell vom Rest der Familie sehr verschieden sind. Ein gutes Beispiel sind die einwärts-rektifizierenden K^+-Kanäle, die wahrscheinlich nur zwei transmembranale Segmente besitzen (Ho et al., 1993; Kubo et al., 1993; Taglialatela et al., 1994).
Diese Beispiele zeigen, daß die Einteilung von Membranrezeptoren nach strukturellen Kriterien (Tertiär- und Quartärstruktur) nicht unbedingt mit der Einteilung nach funktionellen Kriterien (Aktivierungsmechanismus) übereinstimmt (Abb. 18). Die klassische Einteilung in die Familien

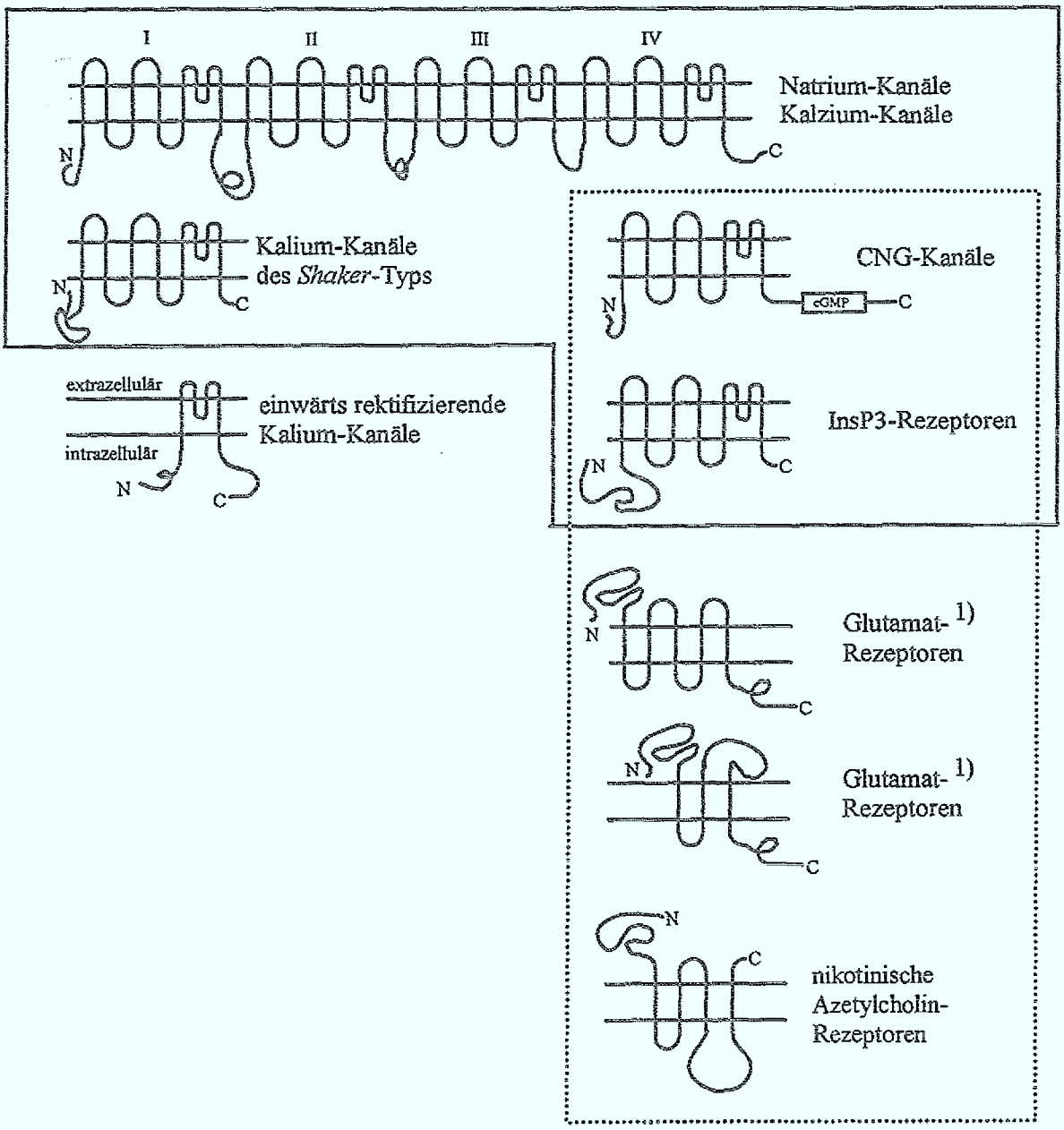


Abb. 18: Strukturelle und funktionelle Zuordnung der CNG-Kanäle zu anderen Kanal-Familien. Die größten strukturellen Ähnlichkeiten haben die CNG-Kanäle zu den K^+-Kanälen des *Shaker*-Typs und damit zu der Super-Familie der spannungsabhängigen Ionenkanäle, zu der auch Na^+- und Ca^{2+}-Kanäle gehören. Na^+- und Ca^{2+}-Kanäle besitzen die gleiche Topologie wie K^+-Kanäle, sie bestehen jedoch aus einem langen Polypeptid mit je vier Wiederholungen einer Untereinheit des K^+-Kanaltyps. Die strukturelle Beziehung der CNG-Kanäle zu spannungsabhängigen Ionenkanälen ist durch einen Kasten mit durchgezogener Linie gekennzeichnet. Funktioneli betrachtet gehören die CNG-Kanäle jedoch auch zur Klasse der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle (Kasten mit gestrichelter Linie). Die Orientierung der Proteine in der Membran ist bei dem Modell für den einwärts rektifizierenden K^+-Kanal angegeben. 1) Für die Familie der Glutamat-Rezeptoren existieren Topologie-Modelle mit drei bzw. fünf transmembranalen Segmenten (s. Text).

der spannungsabhängigen und Liganden-gesteuerten Ionenkanäle ist daher nicht mehr ausreichend. Für eine zukünftige Klassifizierung sollten deshalb Kriterien benutzt werden, die die unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften gleichermaßen berücksichtigen.

5. Zusammenfassung

Zyklisch-Nukleotid-gesteuerte (CNG) Ionenkanäle werden direkt durch die Bindung von cGMP oder cAMP geöffnet und bilden eine neue Famile von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen. Sie besitzen strukturelle Motive, die dem S4-Segment und der Poren-bildenden Region in spannungsabhängigen K^+-Kanälen sehr ähnlich sind. Aufgrund von Hydrophobizitäts-Analysen und diesen beiden Sequenzmotiven wurde die transmembranale Topologie der K^+-Kanäle, die aus sechs transmembranalen Segmenten und einer Haarnadel-ähnlichen Poren-Region besteht, auf die CNG-Kanäle übertragen. Dieses Modell wurde experimentell an den CNG-Kanälen aus Rindersehstäbchen (brCNGC) und *Drosophila melanogaster* (DmCNGC) mit Hilfe einer Genfusions-Methode überprüft, bei der verschiedene Reporterenzyme, alkalische Phosphatase bzw. β-Galaktosidase, C-terminal der putativen transmembranalen Segmente der Kanalproteine fusioniert wurden. Diese Enzyme sind entweder nur im Periplasma oder im Zytoplasma aktiv. Die Aktivität der Enzyme wurde nach Expression in *E. coli* bestimmt. Aus den Ergebnissen konnte die Orientierung der einzelnen Segmente abgeleitet werden.

Bei DmCNGC konnten alle sechs transmembranalen Segmente des Modells identifiziert werden, während bei brCNGC nur die letzten vier transmembranalen Segmente identifiziert werden konnten. Das dritte transmembranale Segment beider Kanäle konnte erst nachgewiesen werden, nachdem Aspartatreste, die die Signalsequenzfunktion dieses Segmentes stören, gegen Valinreste ausgetauscht worden waren. Die Membranständigkeit der ersten beiden transmembranalen Segmente konnte durch zusätzliche Untersuchungen des CNG-Kanals aus dem olfaktorischen Epithel des Rindes bestätigt werden. Die transmembranale Topologie ist zudem im Einklang mit der bisher aus immunologischen Untersuchungen beschriebenen Struktur und bestätigt die evolutionäre Verwandtschaft zwischen spannungsabhängigen- und CNG-Kanälen.

6. Literaturverzeichnis

Ahmad, I. Korbmacher, C., Segal, A.S., Cheung, P., Boulpaep, E.L., Barnstable, C.J. (1992): Mouse cortical collecting duct cells show nonselective cation channel activity and express a gene related to the cGMP-gated rod photoreceptor channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10262-10266.

Ahmad, I., Leinders-Zufall, T., Kocsis, J.D., Shepherd, G.M., Zufall, F., Barnstable, C.J. (1994): Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron* **12**, 155-165.

Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S., Mizushima, S (1990): SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 8164-8169.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1989): Molecular biology of the cell. 2. Auflage, Garland Publishing Inc., New York.

Allard, J.D., Bertrand, K.P. (1992): Membrane topology of the pBR322 tetracycline resistance protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 17809-17819.

Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H., Rees, D.C. (1987): Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the protein subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6162-6166.

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.

Andersson, H., von Heijne, G. (1994): Membrane protein topology: effects of $\Delta\mu_{H+}$ on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *EMBO J.* **13**, 2267-2272.

Babila, T., Moscucci, A., Wang, H., Weaver, F.E., Koren, G. (1994): Assembly of mammalian voltage-gated potassium channels: Evidence for an important role of the first transmembrane segment. *Neuron*, **12**, 615-626.

Barnard, E.A. (1992): Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 368-374.

Baumann, A., Frings, S., Godde, M., Seifert, R., Kaupp, U.B. (1994): Primary structure and functional expression of a *Drosophila* cyclic nucleotide-gated channel present in eyes and antennae. *EMBO J.*, im Druck.

Biel, M., Altenhofen, W., Hullin, R., Ludwig, J., Freichel, M., Flockerzi, V., Dascal, N., Kaupp, U.B., Hofmann, F. (1993): Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from rabbit aorta. *FEBS Lett.* **329**, 134-138.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Bönigk, W., Altenhofen, W., Müller, F., Dose, 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.

Boyd, D. (1994): The use of gene fusions to determine membrane protein topology. In: Membrane Protein Structure: Experimental Approaches (Ed. S. White), Oxford University Press, New York.

Boyd, D., Beckwith, J. (1990): The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. *Cell* **62**, 1031-1033.

Boyd, D., Manoil, C., Beckwith, J. (1987): Determinants of membrane protein topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8525-8529.

Boyd, D., Traxler, B., Beckwith, J. (1993): Analysis of the topology of a membrane protein by using a minimum number of alkaline phosphatase fusions. *J. Bact.* **175**, 553-556.

Brickman, E., Beckwith, J. (1975): Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and *ϕ80* transducing phages. *J. Mol. Biol.* **96**, 307-316.

Broome-Smith, J.K., Tadayyon, M., Zhang, Y. (1990): β-lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. *Molecular Microbiology* **4**, 1637-1644.

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.

Chen, T.-Y., Peng, Y.-W., Dhallan, R.S., Ahamed, B., Reed, R.R., Yau, K.-W. (1993): A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* **362**: 764-767.

Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Westermark, B., Heldin, C.-H. (1989): cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4917-4921.

Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with herarchial clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**, 10881-10890.

Dalbey, R.E., von Heijne, G. (1992): Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes - a new protease family. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 474-478.

Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Orcutt, B.C. (1978) in: Atlas of protein sequence and structure, Vol. 5, Suppl. 3. Hrsg.: Dayhoff, M.O. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, MD, Seiten 345-352.

Deckers, H.M., Voordouw, G. (1994): Membrane topology of the methyl-accepting chemotaxis protein DcrA from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**, 7-12.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., Michel, H. (1985): Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature* 318, 618-624.

Derman, A.I., Beckwith, J. (1991): *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bact.* 173, 7719-7722.

Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D., Beckwith, J. (1993): Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262, 1744-1747.

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.

Donnelly, D., Findlay, J.B.C., Blundell, T.L. (1994): The evolution and structure of aminergic G protein-coupled receptors. *Receptors and Channels* 2, 61-78.

Durell, S.R., Guy, H.R. (1992): Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys. J.* 62, 238-250.

Ehrmann, M., Boyd, D., Beckwith, J. (1990): Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7574-7578.

Eismann, E., Bönigk, W., Kaupp, U.B. (1993): Structural features of cyclic nucleotide-gated channels. *Cell. Physiol. Biochem.* 3, 332-351.

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.

Freudl, R. (1988): Transport von Proteinen durch die Cytoplasmamembran von Escherichia coli. *Forum Mikrobiologie* 5/88, 188-194.

Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., Mikoshiba, K. (1989): Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P_{400}. *Nature* 342, 32-38.

Garbers, D.L. (1992): Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71, 1-4.

Görlich, D., Rapoport, T.A. (1993): Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75, 615-630.

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.

Guy H.R., Conti, F. (1990): Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *Trends Neurosci.* **13**, 201-206.

Hartmann, E., Rapoport, T.A., Lodish, H.F. (1989): Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5786-5790.

Hartmann, H.A., Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Taglialatela, M., Joho, R.H., Brown, A.M. (1991): Exchange of conduction pathways between two related K^+ channels. *Science* **251**, 942-944.

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.

Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M.D., Cortopassi, G., Galas, D.J. (1989): A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* **17**, 6545-6551.

Henderson, R., Unwin, P.N.T. (1975): Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**, 28-32.

Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., Downing, K.H. (1990): Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929.

Herlitze, S., Koenen, M. (1990): A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. *Gene* **91**, 143-147.

High, S., Stirling, C.J. (1993): Protein translocation across membranes: common themes in divergent organisms. *Trends Cell Biol.* **3**, 335-339.

Hille, B. (1992): Ionic channels of excitable membranes. 2. Auflage. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V., Hebert, S.C. (1993): Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**, 31-37.

Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1990): A superfamily of ion channels. *Nature* **345**, 672.

Jessell, T.M., Kandel, E.R. (1993): Synaptic transmission: A bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell 72/Neuron* **10** (Suppl.), 1-30.

Jungnickel, B., Rapoport, T.A., Hartmann, E. (1994): Protein translocation: common themes from bacteria to man. *FEBS Lett.* **346**, 73-77.

Kaupp, U.B. (1991): The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *Trends Neurosci.* **14**, 150-157.

Kaupp, U.B., Koch, K.-W. (1992): Role of cGMP and Ca^{2+} 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.

Kawakami, K., Nagano, K. (1988): The transmembrane segment of the human Na,K-ATPase ß-subunit acts as the membrane incorporation signal. *J. Biochem.* **103**, 54-60.

Konarska, M.M., Padgett, R.A., Sharp, P.A. (1984): Recognition of cap structure in splicing *in vitro* of mRNA precursors. *Cell* **38**, 731-736.

Kubo, Y., Baldwin, T.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1993): Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127-133.

Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H., Kuhse, J. (1994): Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: Structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* **12**, 1291-1300.

Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lancet, D., Pace, U. (1987): The molecular basis of odor recognition. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 63-66.

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.

Manoil, C. (1990): Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J. Bact.* **172**, 1035-1042.

Manoil, C., Beckwith, J. (1985): Tn*phoA*: A transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8129-8133.

Manoil, C., Beckwith, J. (1986): A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* **233**, 1403-1408.

Manoil, C., Mekalanos, J.J., Beckwith, J. (1990): Alkaline phosphatase fusions: Sensors of subcellular location. *J. Bact.* **172**, 515-518.

Marinus, M.G., Morris, N.R. (1973): Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bact.* **114**, 1143-1150.

Marston, F.A.O. (1986): The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**, 1-12.

Marullo, S., Delavier-Klutchko, C., Eshdat, Y., Strosberg, A.D. (1988): Human β_2-adrenergic receptors expressed in *Escherichia coli* membranes retain their pharmacological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7551-7555.

McCracken, S., Meighen, E. (1980): Functional and structural properties of immobilized subunits of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **255**, 2396-2404.

Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., Green, M.R. (1984): Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and DNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* **13**, 7035-7056.

Michaelis, S., Inouye, H., Oliver, D., Beckwith, J. (1983): Mutations that alter the signal sequence of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **154**, 366-374.

Michikawa, T., Hamanaka, H., Otsu, H., Yamamoto, A., Miyawaki, A., Furuichi, T., Tashiro, Y., Mikoshiba, K. (1994): Transmembrane topology and sites of N-gycosylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 9184-9189.

Miller, J.H. (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Miller, C. (1992): Hunting for the pore of voltage-gated channels. *Curr. Biol.* **2**, 573-575.

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.

Nakamura, T., Gold, G.H. (1987): A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**, 442-444.

Numa, S. (1989): A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. In: The Harvey Lectures, Serie **83**, 121-165.

O'Dowd, B.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1989): Structure of the adrenergic and related receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 67-83.

Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H.H., Canal, I., Llamazares, S., Ferrus, A. (1988): *Shaker* encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* **7**, 1087-1096.

Rapoport, T.A. (1991): Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane: facts, models, mysteries. *FASEB J.* **5**, 2792-2798.

Rapoport, T.A. (1992): Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* **258**, 931-936.

Roche, K.W., Raymond, L.A., Blackstone, C., Huganir, R.L (1994): Transmembrane topology of the glutamate receptor subunit GluR6. *J. Biol. Chem.* **269**, 11679-11682.

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., Frisch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A laboratory manual. 2. Auflage. 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.

Sarkar, H.K., Thorens, B., Lodish, H.F., Kaback, H.R. (1988): Expression of the human erythrocyte glucose transporter in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5463-5467.

Sather, W.A., Yang, J., Tsien, R.W. (1994): Structural basis of ion channel permeation and selectivity. *Current Opinion in Neurobiology* **4**, 313-323.

Schertler, G.F.X., Villa, C., Henderson, R. (1993): Projection structure of rhodopsin. *Nature* **362**, 770-772.

Shen, N.V., Chen, X., Boyer, M.M., Pfaffinger, P.J. (1993): Deletion analysis of K^+ channel assembly. *Neuron* **11**, 67-76.

Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988): λZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nuc. Acids Res.* **16**, 7583-7600.

Simon, S.M., Blobel, G. (1991): A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**, 371-380.

Singer, S.J. (1990): The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 247-296.

Sipos, L., von Heijne, G. (1993): Predicting the topology of eukaryotic membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1333-1340.

Stein, W.D. (1990): Channels, carriers, and pumps: An introduction to membrane transport. Academic Press, San Diego.

Stühmer, W. (1991): Structure-function studies of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 65-78.

Taglialatela, M., Wible, B.A., Caporaso, R., Brown, A.M. (1994): Specification of pore properties by the carboxyl terminus of inwardly rectifying K^+ channels. *Science* **264**, 844-847.

Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H, Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., Numa, S. (1989): Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* **339**, 439-445.

Timm, J., Perilli, M.G., Duez, C., Trias, J., Orefici, G., Fattorini, L., Amicosante, G., Oratore, A., Joris, B., Frère, J.M., Pugsley, A.P., Gicquel, B. (1994): Transcription and expression analysis, using *lacZ* and *phoA* gene fusions, of *Mycobacterium fortuitum* β-lactamase genes cloned from a natural isolate and a high-level β-lactamase producer. *Molecular Microbiology* **12**, 491-504.

Tingley, W.G., Roche, K.W., Thompson, A.K., Huganir, R.L. (1993): Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* **364**, 70-73.

Tokuda, H. (1994): Biochemical characterization of the presecretory protein translocation machinery of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **346**, 65-68.

Traxler, B., Boyd, D., Beckwith, J. (1993): The topological analysis of integral cytoplasmic membrane proteins. *J. Membrane Biol.* **132**, 1-11.

Unwin, N. (1993): Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **229**, 1101-1124.

Unwin, N., Henderson, R. (1984): Die Struktur von Membranproteinen. *Spektrum der Wissenschaft* April, 60-72.

van Beilen, J.B., Penninga, D., Witholt, B. (1992): Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biol. Chem.* **267**, 9194-9201.

von Heijne, G. (1985): Signal sequences: The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**, 99-105.

von Heijne, G. (1986a): The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J.* **5**, 3021-3027.

von Heijne, G. (1986b): Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J. Mol. Biol.* **192**, 287-290.

von Heijne, G. (1989): Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**, 456-458.

von Heijne, G. (1991): Proline kinks in transmembrane α-helices. *J. Mol. Biol.* **218**, 499-503.

von Heijne, G. (1992): Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225**, 487-494.

von Heijne, G. (1994): Membrane proteins: From sequence to structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 167-192.

von Heijne, G., Gavel, Y. (1988): Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 174, 671-678.

Wessels, H.P., Spiess, M. (1988): Insertion of a multispanning membrane protein occurs sequentially and requires only one signal sequence. *Cell* 55, 61-70.

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.

Wo, Z.G., Oswald, R.E. (1994): Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by N-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7154-7158.

Wohlfart, P., Haase, W., Molday, R.S., Cook, N.J. (1992): Antibodies against synthetic peptides used to determine the topology and site of glycosylation of the cGMP-gated channel from bovine rod photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 267, 644-648.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Yau, K.-W. (1994): Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35, 9-32.

Yau, K.W., Baylor, D.A. (1989): Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 12, 289-327.

Yeates, T.O., Komiya, H., Rees, D.C., Allen, J.P., Feher, G. (1987): Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: Membrane-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6438-6442.

Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T., MacKinnon, R. (1991): Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K^+ channel. *Science* 251, 939-942.

Yool, A.J., Schwarz, T.L. (1991): Alteration of ionic selectivity of a K^+ channel by mutation of the H5 region. *Nature* 349, 700-704.

Zhang, Y., Broome-Smith, J.K. (1990): Correct insertion of a simple eukaryotic plasma-membrane protein into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Gene* 96, 51-57.

Zimmerman, A.L., Baylor, D.A. (1992): Cation interactions within the cyclic GMP-activated channel of retinal rods from the tiger salamander. *J. Physiol.* 449, 759-783.

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

```
brCNGC   MKKVIINTWHSFVNIPNVVGPDVEKEITRMENGACSSFSGDDDDSASMFE   50
DmCNGC   MRHFKVKAMVQSLDISAITGQQTDAEPSKRSKPSALRRTLQALRQRLTKR   50

brCNGC   ESETENPHARDSFRSNTHGSGQPSQREQYLPGAIALFNVNNSSNKEQEPK   100
DmCNGC   NRPKPPDWFLEKFSNTTNTDKIRKGCPAMEDAALSSEIRGSSVLCNR---   97

brCNGC   EKKKKKKEKKSKPDDKNENKKDPEKKKKKEKDKDKKKKEEKGKDKKEEEK   150
DmCNGC   ----------------------------------------------------   97
                          H1                          ↓
brCNGC   KEVVVIDPSGNTYYNWLFCITLPVMYNWTMIIARACFDELQSDYLEYWLA   200
DmCNGC   ---LSVDPTLQSHYRWLAIVSLAVLYNIIFVVGRAVFWEINKSAPAFWYT   144
         H2                                          ↑ H3
brCNGC   FDYLSDVVYLLDMFVRTRTGYLEQGLLVKEERKLIDKYKSTFQFKLDVLS   250
DmCNGC   LDYLCDFIYLLDTLVHMHEGFLDQGLLVRDAFRLRRHYFHTKGWYLDVLS   194
                  ↓                       S4 ↑
brCNGC   VIPTDLLYIKF-----GWNY---PEI-RLNRLLRISRMFEFFQRTETRTN   291
DmCNGC   MLPTDLAYIWWPPETCSSLYLPCPVIVRLNRLLRINRLWEWFDRTETATG   244
            ↓            H4   ↑
brCNGC   YPNIFRISNLVMYIIIIIHWNACVYFSISKAIGFGNDTWVYPDVNDPDFG   341
DmCNGC   YPNAFRICKVVLAILVLIHWNACMYFAISYEIGFSSDSWVY-NLNGTRNN   293
            ↑     ↓  Pore          ↓          H5  ↑
brCNGC   RLARKYVYSLYWSTLTLTTIGETPPPVRDSEYFFVVADFLIGVLIFATIV   391
DmCNGC   TLQRQYIYSFYWSTLTLTTIGETPTPENDVEYLFVVADFLAGVLIFATIV   343
                                     ↑
brCNGC   GNIGSMISNMNAARAEFQARIDAIKQYMHFRNVSKDMEKRVIKWFDYLWT   441
DmCNGC   GNIGSMISNMNVARVEFQNRMDGVKQYMAFRRVGHELEARVIRWFAYTWS   393
                                        ↓
brCNGC   NKKTVDEREVLKYLPDKLRAEIAINVHLDTLKKVRIFADCEAGLLVELVL   491
DmCNGC   QSGALDEERVLAALPDKLKAEIAIQVHMDTLKQVRIFHDTEPGLLEALVL   443

brCNGC   KLQPQVYSPGDYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGITQFVVLSDGSY   541
DmCNGC   KLKLQVFSPGDYICRKGDVGKEMYIVKRGKLSVVGDDGITVLATLGAGSV   493
                cGMP/cAMP-Bindungsstelle
brCNGC   FGEISILNIKGSKAGNRRTANIKSIGYSDLFCLSKDDLMEALTEYPDAKG   591
DmCNGC   FGEVSVLEIAGNRTGNRRTANVRSLGYSDLFCLAKRDLWETLSDYPEARS   543

brCNGC   MLEEKGKQILMKDGLLDINI-ANAGSDPKDLEEKVTRMESSVDLLQTRFA   640
DmCNGC   TLTQRGCQLLRKDGLLDEQIFADSQRVHDSIEGGIEKLELSVENLNMRLA   593

brCNGC   RILAEYESMQQKLKQRLTKVEKFLKPLIDTEFSAIEGSGTESGPTDSTQD   690
DmCNGC   RLLAEYTASQAKIKQRLAKLEMNGGPGTWRLECEPQSRARSGRLYSLQPK   643

DmCNGC   RRPRSRPDATAKSSDAAKQNTL                              665
```

Abb. A1: Aminosäurevergleich zwischen brCNGC und DmCNGC. Der Sequenzvergleich wurde zunächst mit dem Programm MULTALIN (Corpet, 1988) durchgeführt und anschließend "von Hand" optimiert. In N- und C-Termini beider Sequenzen wurden keine optimierenden Lücken eingefügt. Optimierende Lücken innerhalb der Sequenzen sind durch Bindestriche markiert. Doppelpunkte markieren identische, Punkte konservativ substituierte Aminosäuren. Als konservative Substitutionen sind Aminosäuren definiert, die zu einer der folgenden Gruppen gehören: A,G,P,S,T/I,L,M,V/D,E,N,Q/H,K,R/F,W,Y (Dayhoff et al., 1978).
Die transmembranalen Segmente H1-H5 und S4, die Poren-bildende Region (Pore) und die cGMP/cAMP-Bindungsstelle sind durch Striche gekennzeichnet. Die Pfeile oberhalb und unterhalb der Sequenz bezeichnen die letzte Aminosäure in den jeweiligen Fusionsproteinen von brCNGC und DmCNGC (Tab. 1).

```
   1                                        ATGAAGAAAGTGATTATCAATACATGGCACTCTTTTGTAAATATTC

  47  CCAATGTGGTTGGACCAGATGTTGAAAAGGAAATAACAAGGATGGAAAATGGAGCATGCAGCTCCTTTTCTGGTGATGAT

                                           5'-AGAACCCCCACGCAAGGG-3' (# 037)
 127  GACGACAGTGCCTCTATGTTTGAAGAATCAGAGACTGAGAACCCCCACGCAAGGGATTCCTTTAGAAGTAATACACACGG

 207  AAGCGGACAACCATCACAGAGGGAGCAATACCTGCCTGGAGCCATTGCACTTTTTAATGTTAACAACAGCAGCAATAAGG

 287  AGCAAGAACCAAAGGAAAAGAAGAAAAAGAAAAAAGAAAAGAAGAGCAAGCCAGATGATAAAAATGAAAATAAAAAGGAC

 367  CCAGAAAAGAAAAAGAAGAAAGAAAAGGACAAAGACAAGAAAAAGAAAGAGGAGAAAGGCAAAGATAAGAAAGAGGAAGA

 447  GAAGAAGGAAGTCGTGGTTATTGATCCCTCAGGAAATACGTATTACAACTGGCTGTTCTGCATCACCTTACCTGTTATGT

 527  ATAACTGGACCATGATTATTGCAAGAGCATGTTTTGATGAACTTCAGTCTGATTACCTAGAATACTGGCTTGCTTTTGAT
                                                   3'-TCAGACTAATAGATCTTATGA-5' (# 521; brH1)

 607  TACTTATCAGATGTAGTCTATCTTCTTGATATGTTTGTACGAACAAGGACAGGTTACCTAGAACAAGGACTACTGGTGAA
                                                                                 3'-CACTT

         5'-GCGTAAAAGCTTAGACAAGTATAA-3' (# 498; brH2sand)
 687  GGAAGAGCGTAAACTCATAGACAAGTATAAATCAACCTTTCAATTTAAACTTGATGTTCTATCAGTGATCCCAACTGATC
      CCTTCTCAGATCTGAGTATC-5' (# 303; brH2)                          3'-CACTAGGGTTGACAAG

 767  TGCTGTATATTAAGTTTGGCTGGAATTATCCAGAAATTAGATTAAACAGATTGTTAAGGATCTCTCGAATGTTTGAGTTC
                 3'-AAACCGACCTTAAGATCTCTTTAAT-5' (# 304; brH3)
      AC-5' (# 671; brH3D255V)

 847  TTCCAGAGAACAGAAACACGGACAAACTACCCAAACATCTTCAGGATCTCTAACCTTGTCATGTACATCATCATCATCAT
                              3'-GATGGGTTTGTAAGATCTCTAGAGA-5' (# 286; brS4)
          3'-CTTGTCTTTGTGCCTGTATTCCCGGGTTGTAGA-5' (# 425; C-term. Deletion, 3.8)

 927  CCACTGGAATGCGTGTGTGTACTTCTCTATTTCCAAAGCTATTGGGTTTGGAAATGACACATGGGTCTATCCTGATGTTA

1007  ATGATCCTGATTTTGGCCGTTTGGCTAGAAAATATGTGTACAGTCTTTACTGGTCTACACTGACTTTGACCACTATTGGC

             5'-TCCTGTAAGCTTTTCTGAGTATTTC-3' (# 497; brPOsand)
1087  GAAACACCACCTCCTGTGAGGGATTCTGAGTATTTCTTTGTGGTGGCTGATTTCCTCATTGGAGTGTTAATTTTTGCCAC
              3'-GGACACTCCCTAGATCTCATAAAG-5' (# 287; brPO)

1167  CATTGTCGGTAACATAGGTTCTATGATTTCCAACATGAATGCGGCCAGGGCAGAATTTCAAGCAAGAATTGATGCAATCA

1247  AGCAATACATGCATTTTCGAAATGTAAGCAAAGATATGGAGAAGCGAGTCATTAAATGGTTTGACTATCTGTGGACCAAC

1327  AAAAAAACAGTGGATGAGAGAGAAGTCTTGAAGTATCTACCTGATAAACTAAGAGCAGAGATCGCCATCAATGTTCATTT
                                                                                 3'-GTAAA

1407  AGACACATTAAAAAAGGTGCGCATTTTTGCAGACTGTGAAGCTGGTCTGTTGGTGGAGTTGGTCTTGAAATTACAACCCC
      TCTGTGAGATCTTTTCCAC-5' (# 288; brH5)

1487  AAGTCTACAGTCCTGGAGATTACATTTGCAAGAAAGGGGACATTGGCCGAGAGATGTACATCATCAAGGAAGGCAAACTC

1567  GCCGTGGTGGCTGATGACGGGATCACTCAGTTTGTAGTATTGAGTGATGGCAGCTACTTTGGTGAAATCAGTATCCTTAA

1647  TATTAAAGGTAGCAAAGCTGGCAATCGAAGAACAGCCAATATTAAAAGCATTGGCTACTCAGATCTATTCTGTCTCTCAA

1727  AAGATGACCTCATGGAAGCTCTAACTGAGTACCCAGATGCCAAAGGTATGCTAGAAGAGAAAGGGAAGCAAATTTTGATG

1807  AAAGATGGTCTATTGGACATAAACATTGCAAATGCTGGAAGTGATCCTAAAGATCTTGAAGAGAAGGTCACCCGAATGGA

1887  GAGCTCAGTAGACCTCCTGCAAACAAGGTTTGCTCGGATCCTGGCTGAGTATGAGTCAATGCAGCAGAAACTGAAGCAGA

1967  GGCTAACCAAGGTTGAGAAATTCCTGAAACCACTTATTGACACAGAATTTTCAGCTATTGAAGGATCTGGAACTGAAAGT

2047  GGGCCCACAGACTCTACACAGGACTGA
```

Abb. A2: Für die Mutagenese von brCNGC verwendete PCR-Primer. Es ist nur die kodierende Sequenz von brCNGC mit dem Stop-Codon angegeben. Primer, deren Sequenzen dem kodierenden Strang entsprechen, stehen über der cDNA-Sequenz. Unter der cDNA-Sequenz sind die Primer aufgeführt, die komplementär zum kodierenden Strang sind. Die Bezeichnung der Primer und ihr Verwendungszweck sind in Klammern angegeben. Nukleotide innerhalb der Primersequenzen, die von der cDNA-Sequenz abweichen, sind unterstrichen.

```
   1                                                ATGCGACATTTCAAAGTCAAAGCCATGGTGCAGTCGC

  38  TGGATATATCCGCCATAACGGGACAGCAAACAGATGCGGAGCCAAGCAAACGGAGCAAACCCTCCGCTTTAAGACGCACT

 118  CTGCAGGCACTGCGCCAGCGTCTGACTAAAAGGAATCGCCCCAAACCGCCGGACTGGTTCCTCGAGAAGTTCTCCAACAC

 198  CACCAACACGGACAAGATTCGCAAGGGTTGTCCGGCGATGGAGGATGCGGCGCTATCCAGCGAAATACGTGGCTCCAGTG

 278  TCCTGTGCAACCGTCTGTCCGTCGATCCCACCCTGCAGTCGCATTACAGATGGCTGGCCATCGTTTCACTGGCAGTGCTT

 358  TACAATATCATCTTCGTGGTGGGACGTGCGGTCTTCTGGGAGATCAATAAGAGTGCTCCCGCCTTTTGGTACACGCTGGA
                                                 3'-GTTATTCTCACGAGATCTGAAAACC-5' (# 600; DmH1)

 438  CTACCTGTGCGACTTTATCTATCTGCTGGATACGCTCGTCCACATGCACGAGGGATTTTTGGACCAAGGTCTCCTCGTGC

 518  GGGATGCCTTTCGGCTGCGCCGGCACTATTTCCACACCAAGGGCTGGTACCTCGACGTCCTGTCCATGCTGCCCACGGAC
                  3'-GCGGCCGTGATAGATCTGTGGTT-5' (# 629; DmH2)        3'-GACGGGTGCCAG
                                                 3'-CATGGAGCAGCAGGACAGGTACGACGGGTGCCAG
                                                 3'-GACCATGGAGCAGCAGGAC-5' (# 653; DmH3D191V)

 598  TTGGCCTACATCTGGTGGCCGCCGGAGACCTGCTCCAGTCTGTATCTGCCGTGTCCCGTGATAGTGCGTCTGAATCGTCT
      AACC-5' (# 644; DmH3D191/199V)         3'-ATAGACGGCACAGATCTCTATCA-5' (# 628; DmH3)
      AACCGG-5' (# 652; DmH3D199V)

 678  GCTCAGGATCAATCGACTGTGGGAGTGGTTCGATCGAACGGAGACAGCGACGGGATATCCGAATGCCTTCCGCATCTGCA
                                                                 3'-ATAGGCTTACGGAAAGATCTGACGT

 758  AGGTGGTGCTGGCCATTTTGGTGCTGATCCACTGGAATGCCTGCATGTACTTTGCCATCAGCTACGAAATCGGCTTCAGT
      TC-5' (# 655; DmS4)

 838  TCGGATTCGTGGGTGTATAATCTGAATGGAACGAGAAACAATACGTTGCAGCGGCAGTACATCTATAGTTTCTACTGGTC
             3'-CCCACATATTAGATCTACCTTGC-5' (# 654; DmH4)

 918  GACGCTAACGCTGACCACCATTGGCGAGACTCCAACGCCGGAGAACGATGTGGAGTATCTGTTCGTGGTGGCCGATTTCC
                                        3'-GTTGCGGCCTCTTAGATCTCCTCATA-5' (# 831; DmPO)

 998  TGGCTGGCGTCCTAATCTTCGCCACCATTGTGGGTAACATTGGCTCCATGATCTCCAACATGAATGTGGCCCGCGTGGAA

1078  TTCCAGAATCGCATGGACGGTGTCAAGCAGTACATGGCCTTCCGGCGAGTGGGTCACGAGCTGGAGGCCCGGGTGATCCG

1158  CTGGTTTGCCTACACGTGGTCGCAAAGTGGTGCGCTGGACGAGGAGCGTGTGCTGGCCGCCCTGCCGGACAAGCTGAAGG

1238  CGGAGATCGCTATCCAGGTGCACATGGATACGCTGAAGCAGGTGCGCATCTTCCACGACACGGAACCGGGTCTCCTCGAG

1318  GCCCTGGTGCTGAAGCTCAAGCTGCAGGTCTTCAGTCCGGGCGACTATATCTGTCGCAAGGGTGACGTGGGCAAGGAGAT

1398  GTATATCGTGAAGCGGGGCAAGTTGTCCGTCGTCGGCGATGATGGCATCACCGTGCTGGCCACCTTGGGCGCCGGTTCGG

1478  TGTTCGGCGAGGTTTCCGTACTCGAGATTGCGGGCAATCGGACGGGCAATCGGCGCACGGCCAATGTGAGATCCCTGGGC

1558  TACTCGGATCTCTTCTGTCTGGCGAAACGGGATTTGTGGGAGACCCTGTCCGACTATCCGGAGGCCAGATCCACGCTCAC

1638  TCAGCGAGGATGCCAGCTGCTGCGCAAGGATGGCTTACTGGACGAGCAAATATTCGCTGATTCACAAAGGGTACACGACA

1718  GCATTGAGGGCGGCATCGAAAAGCTGGAGCTCTCGGTGGAGAACCTCAACATGCGGCTGGCCCGCCTCCTCGCTGAGTAC

1798  ACGGCCAGCCAGGCAAAGATCAAGCAGCGCCTCGCAAAGCTGGAGATGAATGGCGGCCCTGGCACGTGGCGATTGGAGTG

1878  TGAGCCCCAAAGTCGGGCTCGCAGCGGACGCCTCTATTCGCTGCAGCCCAAGCGGCGCCCACGTTCGCGACCCGACGCGA

1958  CTGCCAAGAGCAGCGATGCTCGCAAACAGAACACACTGTAA
```

Abb. A3: Für die Mutagenese von DmCNGC verwendete PCR-Primer. Es ist nur die kodierende Sequenz von DmCNGC mit dem Stop-Codon angegeben. Primer, deren Sequenzen dem kodierenden Strang entsprechen, stehen über der cDNA-Sequenz. Unter der cDNA-Sequenz sind die Primer aufgeführt, die komplementär zum kodierenden Strang sind. Die Bezeichnung der Primer und ihr Verwendungszweck sind in Klammern angegeben. Nukleotide innerhalb der Primersequenzen, die von der cDNA-Sequenz abweichen, sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5´→3´)	Verwendung
rev	CAGGAAACAGCTATGAC	M13-REVERSE PRIMER
# 273	CGCCCTGAGCAGCCCGG	Mutation der Aspartatreste in H3; hybridisiert an die Nukleotide 110-94 von *phoA* (ab der XbaI-Klonierungsstelle von pSWF II gezählt(3.4.1)
# 392	CTGATTTGTGTAGTCGG	Subklonierung von *lacZ*; hybridisiert an die Nukleotide 709-693 von Tn*lacZ* (3.3.2)
# 393	GACTCTTATCTAGAAGTAGCGTCCTGG	Subklonierung von *lacZ*; hybridisiert an die Nukleotide 3-29 von Tn*lacZ* (3.3.2)
# 479	ATGAAGAAAGTGATTAT	Klonierung von pbrCNGC2; 5´-Primer für die PCR-Reaktion (Abb. 4)
# 480	GGGTACCGAGCTCGAAT	Klonierung von pbrCNGC2; 3´-Primer für die PCR-Reaktion (Abb. 4)
# 839	CCACACTTCTAGATAGCCTTTCTGCAG GTC	Klonierung von boH1; hybridisiert an die Nukleotide 525-496 von boCNGC (3.5.1)
# 840	GAGCTCGGTACCCATGACAGAAAAAGC CAAT	Klonierung von boH1; hybridisiert ab Nukleotid 14 des Primers an die Nukleotide 1-18 von boCNGC; die ersten 13 Nukleotide entsprechen dem 5´-Bereich der multiplen Klonierungsregion von pbrCNGC2 zwischen der SacI- und der zerstörten SmaI-Erkennungssequenz (Abb. 4; 3.5.1)

Tab. A1: Weitere für PCR-Reaktionen verwendete Primer. Bei den Primern # 393 und # 839 sind die Nukleotide unterstrichen, die von der DNA-Sequenz von Tn*lacZ* bzw. boCNGC abweichen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI) der KFA Jülich angefertigt. Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank

- Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft,
- Dr. A. Baumann für die vielen hilfreichen Diskussionen und Vorschläge und für die Überlassung der cDNA des CNG-Kanals aus *Drosophila melanogaster*
- Dr. W. Bönigk für seine Unterstützung in allen Fragen der Molekularbiologie und seiner Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen,
- Dr. E. Eismann für die hilfreichen Diskussionen bei der Niederschrift der Arbeit,
- Dr. F. Müller für seine Hilfe bei den immunzytochemischen Versuchen,
- Frau S. Balfanz für ihren Einsatz bei der Anfertigung der Abbildungen.

Dr. R. Freudl danke ich für die Überlassung der Bakterienstämme CC118, CC170 und CC202 und für die Konstruktion von pbrCNGC1.

Prof. Dr. F. Kreuzaler möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der RWTH Aachen danken.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-3026
Februar 1995
ISSN 0944-2952