

Aktivierung und Desensibilisierung des olfaktorischen  
cAMP-gesteuerten-Kanal –  
Identifizierung von funktionellen Modulen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom Biologe Clemens Prinz zu Waldeck  
Juni 2009

Aktivierung und Desensibilisierung des olfaktorischen  
cAMP-gesteuerten-Kanal –  
Identifizierung von funktionellen Modulen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom Biologe Clemens Prinz zu Waldeck  
aus Frankfurt

Tag der mündlichen Prüfung: 6.08.2009

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zoologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg in der Zeit von Oktober 2003 bis November 2008 unter Anleitung von Prof. Dr. Stephan Frings angefertigt

Gutachter:

Prof. Dr. Stephan Frings

Prof. Dr. Gabriele Petersen

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Heidelberg,

Clemens Prinz zu Waldeck

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Molekulare Physiologie am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg durchgeführt. Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Physiologie für die gute Zusammenarbeit im Laufe der letzten Jahre und die hervorragende Arbeitsatmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank:

- Prof. Dr. Stephan Frings für die Überlassung des bearbeiteten Themas und für sein Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit. Seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und seine große Begeisterung für die Wissenschaft hat sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen,
- Prof. Dr. Gabriele Petersen für die Begutachtung meiner Arbeit.
- Diplom Biologin Kerstin Vocke für die Herstellung der Plasmide
- Dr. Daniel Klimmeck und Diplom Biologin Maren Stavermann für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Entwicklung der vitalen Gewebeschnitte aus dem olfaktorischen Epithel.
- Dr. Frank Möhrle und Dr. Hiroshi Kaneko für ihre stete Diskussionsbereitschaft.
- meinem ehemaligen Mitbewohner und Mitarbeiter Dr. Daniel Gilbert für seine Diskussionsbereitschaft und seine Hilfestellungen bei handwerklichen Herausforderungen
- Gabriele Günther und Tanja Kellner für die Unterstützung in der Zellkultur und bei der Molekularbiologie
- meinen Freunden, die mich während der Zeit motiviert und begleitet haben.
- meinen lieben Eltern, die mich stets in allen Belangen unterstützt haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>i</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Anatomie des Riechepithels .....	1
1.2 Olfaktorische Signaltransduktionskaskade .....	3
1.3 Struktur von CNG-Kanälen.....	5
1.4 Kinetische Modelle der Aktivierung .....	7
1.5 Zielsetzung .....	9
<b>2 Material &amp; Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1 Materialien .....	10
2.2 Lösungen und Medien.....	10
2.2.1 Lösungen .....	10
2.2.1.1 Lösungen für die Zell-Kultur und die Transfektion.....	11
2.2.1.2 Lösungen für das Ca <sup>2+</sup> -Imaging in vitalen Gewebeschnitte.....	12
2.2.1.3 Lösungen für die <i>patch-clamp</i> -Experimente.....	12
2.3 Plasmid-Vektoren.....	13
2.4 Tiere und die Herstellung vitaler Gewebeschnitte .....	14
2.4.1 Präparation der vitalen Gewebeschnitte.....	14
2.5 Zelllinien und heterologe Genexpression.....	15
2.5.1 Kulturbedingungen für die Zelllinien.....	15
2.5.1.1 Transiente Transfektion von HEK293 Zellen .....	16
2.5.2 Identifizierung transfizierter HEK 293 Zellen .....	17
2.6 Ca <sup>2+</sup> -Imaging der vitalen Gewebeschnitte .....	18
2.6.1 Kalzium-abhängige Farbstoffe.....	18
2.6.2 Vorbereitung der vitalen Gewebeschnitte .....	20
2.6.3 Aufbau des Ca <sup>2+</sup> -Imaging Meßstands.....	20
2.6.4 Auswertung der Fluoreszenzbilder.....	20
2.7 Patch-Clamp-Technik.....	21
2.7.1 Aufbau des Meßstands .....	21
2.7.2 Durchführung der Messung.....	22
2.7.3 Auswertung der Messdaten .....	24

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1	Kalzium Signale stimulierter ORN's in vitalen Gewebeschnitten.....	27
3.2	Untersuchungen zur heterologen Expression des A2-A2-A4-B1b Kanals .....	31
3.3	Untersuchungen der Rolle von CNGA4 und CNGB1b bei der Aktivierung des A2-A2-A4-B1b Kanals durch cAMP .....	36
3.4	Untersuchungen der Rolle von CNGA4 und CNGB1b bei der Desensibilisierung des A2-A4-B1b-Kanals durch Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin .....	40
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>48</b>
4.1	Zusammensetzung der Quartärstruktur von heteromeren CNG-Kanälen .....	48
4.2	Aktivierung des heteromeren A2-A2-A4-B1b-Kanals.....	50
4.3	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Desensibilisierung des heteromeren A2-A2-A4-B1b-Kanals .....	52
4.4	Physiologische Bedeutung der schnellen Desensibilisierung .....	56
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>70</b>

## Zusammenfassung

Der olfaktorische zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Kanal (CNG-Kanal) wandelt in den Riechneuronen das chemische Duftstoffsignal in ein elektrisches Signal um und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Generierung, aber auch bei der Terminierung des Rezeptorstroms. Der CNG-Kanal ist ein heterotetrameres Protein und setzt sich aus den drei Untereinheiten CNGA2, CNGA4 und CNGB1b wie folgt zusammen: A2-A2-A4-B1b. Der CNG-Kanal ist ein unspezifischer Kationenkanal, der hauptsächlich Kalzium in die Riechneuronen leitet. cAMP öffnet den CNG-Kanal kooperativ, und die Sensivität des CNG-Kanals für cAMP wird durch Calmodulin Kalzium-abhängig moduliert.

In dieser Arbeit wurde die Beteiligung der einzelnen Untereinheiten bei der Aktivierung und der Desensibilisierung des CNG Kanals in einem heterologen Expressionssystem (HEK 293-Zellen) untersucht. Bei den *patch-clamp* Untersuchungen wurde festgestellt, dass HEK 293 Zellen, die mit den drei Untereinheiten transfiziert wurden, nicht eine einheitliche Kanalpopulation exprimierten, sondern Mischungen von allen möglichen Kanalzusammensetzungen ( $A2_4$ ,  $A2_3-A4_1$ ,  $A2_3-B1b_1$ , und  $A2_2-A4_1-B1b_1$ ). Allerdings wurden zwei Ausschlusskriterien zur Identifizierung von *inside-out Patches*, die fast ausschließlich A2-A2-A4-B1b Kanäle hatten, bestimmt. Erstens können die verschiedenen CNG Kanäle anhand ihrer Sensivität für cAMP unterschieden werden. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante ( $K_{1/2}$ ) für cAMP ist das zweite Kriterium.

Für den CNG-Kanal wurde vor kurzem das erste adäquate kinetische Modell (C4L-Modell) für die Aktivierung beschrieben. Das C4L-Modell beschreibt eine sequentielle Bindung von cAMP an den homomeren CNGA2-Kanal. In der vorliegenden Arbeit konnte das C4L-Modell für den heteromeren A2-A2-A4-B1b-Kanal erweitert werden. Mit Mutagenese wurden die Bindestellen für cAMP auf den einzelnen Untereinheiten funktionell ausgeschaltet. Somit wurden A2-A2-A4-B1b Kanäle mit zwei bis vier intakten Bindestellen erzeugt. Die Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Kanalaktivierung ergab die Reihenfolge, in der die vier Kanaluntereinheiten cAMP binden. Die beiden CNGA2-Untereinheiten vermitteln die ersten beiden cAMP-Bindungen und öffnen den Kanal. Die Bindung des dritten und vierten cAMPs kann von CNGA4 oder CNGB1b gleich gut vermittelt werden, und stabilisieren den Kanal im offenen Zustand. Für die schnelle Desensibilisierung des A2-A2-A4-B1b Kanals wurde überprüft, ob eine der beiden LQ-Typ Calmodulin-Bindestellen von CNGA4 und CNGB1b ausreicht, um den Kanal zu desensibilisieren. Dafür wurden die beiden LQ-Typ Calmodulin-Bindestellen durch Mutagenese funktionell ausgeschaltet. Der Effekt der

Mutationen auf den Kanal wurde mit der *patch-clamp* Technik untersucht. Dabei wurden Dosis-Wirkungs-Beziehungen für cAMP unter desensibilisierenden Bedingungen, dass heißt in der Gegenwart von Kalzium, erstellt. Die Analyse der Daten ergab, dass CNGB1b notwendig und ausreichend ist, den A2-A2-A4-B1b Kanal zu desensibilisieren.



## Abstract

The cyclic nucleotide-gated channel in olfactory sensory neurons transforms a chemical odorant stimulus into an electrical signal. The channel plays a key role for the generation as well as for the termination of the receptor current. The heterotetrameric channel is composed of CNGA2, CNGA4 and CNGB1b subunits with the following stoichiometry: A2-A2-A4-B1b. The channel is an unspecific cation channel, which mainly conducts calcium ions into the neuron. cAMP activates and opens the channel cooperatively, and its sensitivity to cAMP is modulated by calmodulin in a calcium-dependent way. In the present thesis, the contribution of individual subunits for channel activation and desensitization was investigated in a heterologous expression system (HEK 293 cells). Patch clamp measurements of HEK 293 cells cotransfected with CNGA2, CNGA4 and CNGB1b showed, that HEK 293 cells do not express one specific channel population, but instead a mixture of all possible subunit combinations (A2<sub>4</sub>, A2<sub>3</sub>-A4<sub>1</sub>, A2<sub>3</sub>-B1b<sub>1</sub>, und A2<sub>2</sub>-A4<sub>1</sub>-B1b<sub>1</sub>). However, it was possible to determine two criteria to identify inside-out patches with predominant A2-A2-A4-B1b expression. Each CNG-channel has a distinct cAMP-sensitivity and shows a specific current rectification.

The first adequate kinetic model (C4L-model) for CNG-channel activation has been described recently. This model depicts a sequential binding of four cAMP molecules to homomeric A2-channels. In the present thesis the C4L-model was extended for the heteromeric A2-A2-A4-B1b channel. Using site-directed mutagenesis of the cAMP-binding-site, each subunit was selectively rendered inoperable. Thus A2-A2-A4-B1b channels with either two, three or four intact cAMP-binding-sites were generated. The analysis of the dose-dependent channel activation revealed the cAMP-binding-sequence of the four channel-subunits. The two CNGA2-subunits initially bind two cAMP-molecules and open the channel. Binding of the third and fourth cAMP-molecule was equally well mediated by CNGA4 und CNGB1b, and stabilized the channel in the open state. Furthermore, for rapid desensitization of A2-A2-A4-B1b channels, it was examined whether one of the two LQ-type calmodulin-binding-sites is sufficient to desensitize the channel. Thus, the two LQ-type calmodulin-binding-sites were functionally silenced by mutagenesis. The effect of the mutations on the channel were analysed with the patch-clamp-technique. Dose-response relations were generated in the presence of calcium to simulate the condition of desensitization. The analysis revealed, that CNGB1b is sufficient and necessary to desensitize the A2-A2-A4-B1b channel.

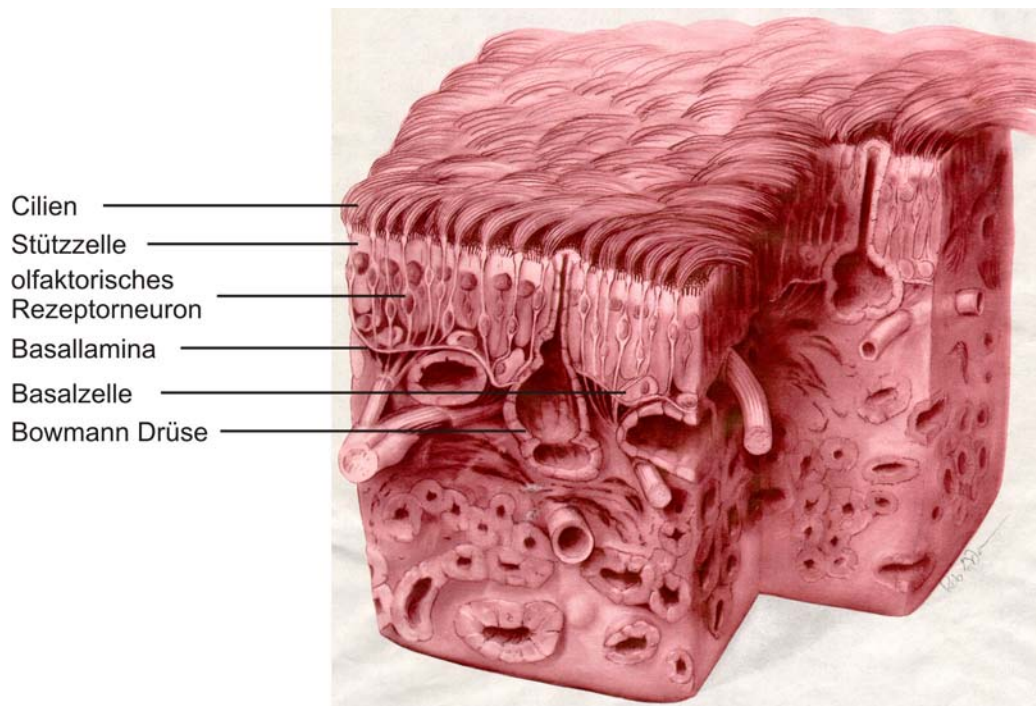
# 1 Einleitung

Der Geruchssinn gilt als „niederer“ Sinn im Vergleich mit den „höheren“ Sinnen des Menschen, dem Sehen und Hören. Dabei beeinflusst der Geruchssinn unsere Gefühlswelt und das Sozialverhalten mehr als gemeinhin angenommen wird. Zusätzlich zeigt sich die Geruchswelt äußerst komplex in ihren molekularen Grundlagen und der neuronalen Verarbeitung.

Riechsinneszellen detektieren Substanzen, die entweder als Pheromone Teil der artspezifischen Kommunikation sind oder flüchtige, niedermolekulare Duftstoffe, die oft lebenswichtige Informationen vermitteln und zumindest beim Menschen erheblich zur emotionalen Lebensqualität beitragen. Die olfaktorische Chemodetektion erfolgt in der Nase der Säuger hauptsächlich in zwei anatomisch und physiologisch getrennten Sinnesorganen, dem Vomeronasalen Organ (VNO), das in dem vorderen Bereich der Nasenhöhle lokalisiert ist, und dem Riechepithel, das sich über den hinteren Bereich der Nasenhöhle erstreckt. Die Sinneszellen des VNO detektieren Pheromone, chemische Signale, die angeborene Verhaltensweisen induzieren. Die Sinneszellen des Riechepithels (olfaktorische Rezeptorneurone, ORN) hingegen detektieren hauptsächlich flüchtige Substanzen in der Atemluft, die als Gerüche wahrgenommen werden. Dieser Prozess der Wahrnehmung ist bei Nagern extrem schnell. Neuere Untersuchungen ergaben, dass vom Einatmen des Duftstoffes bis zur Wahrnehmung nur wenige hundert Millisekunden vergehen. Dadurch können Nager mehrere aufeinander folgende Geruchsstimuli innerhalb einer Sekunde erfassen. Dafür müssen die Proteine der Signaltransduktion schnell aktiviert und inhibiert werden können, insbesondere der zyklisch-Nukleotid gesteuerte Kanal (CNG-Kanal). Es ist ein Schlüsselprotein, das das chemische (Duftstoff-)signal in ein elektrisches umwandelt. Welche Untereinheiten des CNG-Kanals für die Aktivierung und Inhibierung verantwortlich sind, möchte ich in der vorliegenden Arbeit beantworten.

## 1.1 Anatomie des Riechepithels

Das Riechepithel erscheint durch die Anordnung seiner Zellen als geschichtetes Gewebe. Die Abgrenzung zur Nasenhöhle wird durch eine einzellige Schicht von Stützzellen gewährleistet,



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels** (verändert nach Anholt, 1993)

die zum einem untereinander, und zum anderen mit den Membranen der dendritischen Knöpfe von ORNs durch tight junctions (*Zonula occludens*) verbunden sind. Somit fungieren die Stützzellen als eine Diffusionsbarriere zwischen dem Mukus und der interstitiellen Flüssigkeit. Unterhalb der Stützzellen liegen die Somata der ORNs. ORNs sind primäre, bipolare chemosensorische Neurone mit einem Axon, das in den Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) projiziert, und mit einem Dendriten, der in einem „Knopf“ mit 10-20 Zilien (50-200  $\mu\text{m}$  lang) endet. Knopf und Zilien ragen in das Lumen der Nasenhöhle und haben eine große chemosensorische Oberfläche (Menco, 1980; Menco, 1997). Die Proteine für Chemodetektion und Signaltransduktion befinden sich ausschließlich in den Knöpfen und Zilien (Buck und Axel, 1991). Die unterste Schicht zur Basallamina hin bilden die globulären Basalzellen. Die Basalzellen sind neuronale Stammzellen, die zur Proliferation und Zellteilung fähig sind. Sie ersetzen abgestorbene ORNs, da diese nur eine Lebenserwartung von 4-6 Wochen haben (Farbman, 1990; Farbman und Buchholz, 1992). Die reifenden und differenzierenden Zellen wandern in die über ihnen liegende Schicht der ORNs (Caggiano et al., 1994; Harding et al., 1977). Somit herrscht im adulten olfaktorischen Epithel ein Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellproliferation. Eine Population aus ORNs stellt daher immer eine Mischung aus Zellen unterschiedlicher Reifegrade dar (Weiler und Farbman, 1997). Die Oberfläche des Riechepithels wird durch eine 5-30  $\mu\text{m}$  dicke Mukusschicht bedeckt (Menco und Farbman, 1992). Die Bowman'schen Drüsen sezernieren ein viskoses

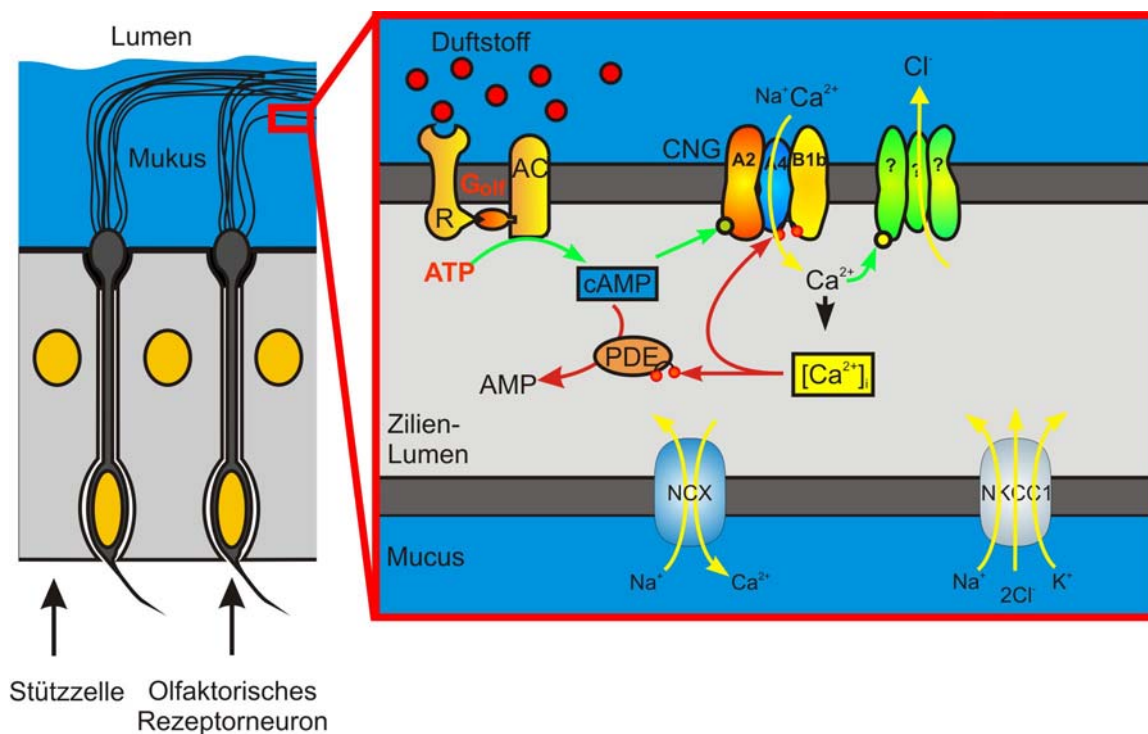
Sekret, das mehrere Funktionen übernimmt. Zum einem bewahrt der Mukus das Riechepithel vor der Austrocknung, zum anderem enthält der Mukus zum Schutz vor Infektionen sekretorische Formen der Immunglobuline Typ A & M, bakteriostatische und bakterizide Proteine. Außerdem enthält der Mukus Duftstoffbindepoteine, welche die Diffusion der Duftstoffmoleküle zu den im Mukus eingebetteten Zilien ermöglicht (Pelosi und Maida, 1995; Bal und Anholt, 1993). Eine definierte Zusammensetzung von Natrium-, Kalium-, Kalzium- und Chlorid-Ionen ermöglicht die Erzeugung des Rezeptorstroms (Reuter et al., 1998).

## 1.2 Olfaktorische Signaltransduktionskaskade

Ein chemisches Signal (Duftstoff) wird durch die olfaktorische Signaltransduktionskaskade in ein elektrisches Signal (Aktionspotential) umgewandelt (Anholt, 1991; Frings, 2001; Kleene, 2008). Der eingeatmete Duftstoff löst sich im Mukus und bindet an die Riechrezeptoren in den Zilien der ORN. Der aktivierte Riechrezeptor ist mit einem G-Protein (GTP-Binde-Protein) gekoppelt (Jones und Reed, 1989; Firestein et al., 1991a; Menco et al., 1992). Das G-Protein besteht aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Durch die Aktivierung des Riechrezeptors bindet die spezifische  $\alpha$  Untereinheit  $G_{\alpha\text{Olf}}$  GTP und spaltet sich von den  $\beta\gamma$ -Untereinheiten ab. Das so aktivierte G-Protein stimuliert eine spezifische, membranständige Adenylylzyclase, die ACIII (Pace et al., 1985; Pfeuffer et al., 1989; Bakalyar und Reed, 1990). Die ACIII erhöht nun die intrazelluläre Konzentration des sekundären Botenstoffes cAMP durch Synthese aus ATP. Transgene Mäuse, denen entweder  $G_{\alpha\text{Olf}}$ , ACIII oder CNGA2 (eine Untereinheit des olfaktorischen CNG-Kanals) fehlt, sind anosmisch (Belluscio et al., 1998; Wong et al., 2000; Brunet et al., 1996), das heißt, sie können nicht riechen.

Wenn cAMP an den zyklisch-Nukleotid-gesteuerten-Kanal (CNG-Kanal) bindet, öffnet der Ionenkanal (Nakamura und Gold, 1987; Firestein et al., 1991b; Frings et al., 1992). Mit der Aktivierung des CNG-Kanals wird der Duftstoffstimulus in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das führt dazu, dass die positiv geladene Ionen (Kationen) Natrium und Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus dem Mucus in die Zelle, beziehungsweise in das Zilienlumen fließen und das Membranpotential ein wenig depolarisieren (Zufall und Firestein, 1993; Frings et al., 1995; Dzeja et al., 1999). Der physiologisch bedeutsame Effekt des CNG-Kanals ist aber nicht die Depolarisierung, sondern die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.  $\text{Ca}^{2+}$

fungiert neben cAMP als sekundärer Botenstoff (Leinders-Zufall et al., 1997), und öffnet einen weiteren Ionenkanal, den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten-Chlorid-Kanal (CaCC; (Hartzell et al., 2008; Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008b; Yang et al., 2008a; Caputo et al., 2008; Kleene, 1993)). Die Aktivierung des CaCl wird vermutlich durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin vermittelt (Kaneko et al., 2006). Durch die hohe intrazelluläre Chloridkonzentration der ORNs ( $\sim 54 \text{ mM}$ ), die ähnlich der extrazellulären Chloridkonzentration im Mukus ist ( $\sim 55 \text{ mM}$ ), liegt das Umkehrpotential für Chlorid bei  $\sim 0 \text{ mV}$ . Werden die Chloridkanäle aktiviert, kommt es



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade in den Zilien der olfaktorischen Rezeptorneuronen.** Weitere Erklärung siehe Text. Aktivierende Prozesse sind durch grüne Pfeile dargestellt, inhibierende Prozesse durch rote Pfeile. Verwendete Abkürzungen: AC: Adenylylzyklase III; CNG: zyklisch-nukleotid gesteuerter Kanal;  $G_{\text{olf}}$ : G-Protein; NCX: Natrium-Kalzium-Austauscher; NKCC1: Chlorid-Kationen-Kotransporter; PDE: Phosphodiesterase; R: Duftstoffrezeptor; ?: molekular nicht identifizierter Kalzium-aktivierter Chlorid-Kanal.

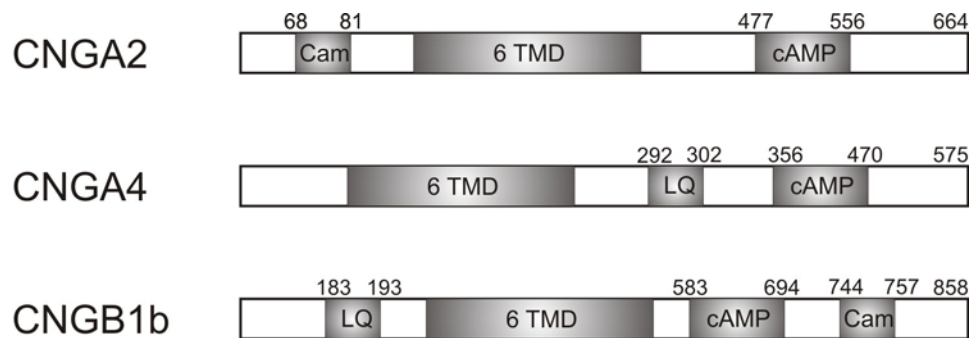
wegen des negativen Membranpotentials von  $-90$  bis  $-50 \text{ mV}$  der ORNs (Lynch und Barry, 1991; Schild und Restrepo, 1998) zu einem Chloridausstrom und zu einer zusätzlichen Depolarisation der Zelle.

Somit hat der Rezeptorstrom eine anionische und ein kationische Komponente, wobei  $\sim 90\%$  des Rezeptorstromes von  $\text{CaCl}$  geleitet wird (Kleene und Gesteland, 1991; Kleene, 1993; Kurahashi und Yau, 1993). Die hohe intrazelluläre Chloridkonzentration wird durch den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Symporter (NKCC1) vermittelt (Kaneko et al., 2004; Reisert et al., 2005). Neben

den aktivierenden Prozessen gibt es auch inhibierende Prozesse, die den Rezeptorstrom terminieren. Diese Prozesse werden durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, beziehungsweise durch deren Bindung an das Protein Calmodulin, vermittelt. Die Phosphodiesterase PDE1C2 (PDE) wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin aktiviert und spaltet cAMP in AMP (Yan et al., 1995; Borisy et al., 1992). Desweiteren wird die ACIII durch Phosphorylierung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin abhängigen Protein-Kinase II inhibiert (Wei et al., 1998; Wayman et al., 1995). Ebenso verringert  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin die Sensitivität des CNG-Kanals für cAMP (Chen und Yau, 1994; Liu et al., 1994; Balasubramanian et al., 1996). Schließlich werden die Kalzium-Ionen über  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus dem Cilienlumen und den dendritischen Knöpfen exportiert und die Chloridkanäle schließen (Jung et al., 1994; Tareilus et al., 1995; Menini, 1999; Reisert und Matthews, 1998).

### 1.3 Struktur von CNG-Kanälen

CNG-Kanäle sind liganden-gesteuerte Ionenkanäle und gehören zur Superfamilie der spannungsgesteuerten Ionenkanäle (Bonigk et al., 1993; Goulding et al., 1992; Jan und Jan, 1990). Die CNG-Familie wird von sechs Genen kodiert und teilt sich in zwei Subtypen CNGA und CNGB auf (Bradley et al., 2001a). CNG-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, die sowohl monovalente als auch divalente Ionen leiten (Frings et al., 1992; Haynes, 1995). Unter physiologischen Bedingungen leiten sie hauptsächlich  $\text{Ca}^{2+}$  (Dzeja et al., 1999; Frings et al., 1995; Seifert et al., 1999; Sesti et al., 1994). Wichtige funktionelle Eigenschaften der CNG-Kanäle, wie Ligandensensitivität und Selektivität, Ionenpermeabilität und Schaltverhalten werden durch die Zusammensetzung der Untereinheiten der jeweiligen Kanalkomplexe bestimmt (Kaupp und Seifert, 2002; Matulef und Zagotta, 2003). Die CNG-Kanäle haben eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion von Seh- und Riechsinneszellen. Die Untereinheit -CNGA1- wurde zuerst aus den Sechstäbchen von Rindern kloniert (Kaupp et al., 1989) und bildet mit der CNGB1 Untereinheit (Chen et al., 1993; Korschen et al., 1995) ein Kanal mit der Zusammensetzung A1-A1-A1-B1 (Weitz et al., 2002; Zheng et al., 2002). CNGA3 (Bonigk et al., 1993; Weyand et al., 1994) bildet zusammen mit CNGB3 (Gerstner et al., 2000a) den Kanal aus Sehzapfen mit der Zusammensetzung A3-A3-B3-B3 (Peng et al., 2004). Der olfaktorische CNG-Kanal setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen: CNGA2 (Dhallan et al., 1990; Ludwig et al., 1990),



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der CNGA2-, CNGA4-, und CNGB1b-Untereinheiten.** Weitere Erklärung siehe Text. Verwendete Abkürzungen: Cam: klassische Calmodulin-Bindestelle; cAMP: Bindestelle für zyklische Nukleotide; LQ: IQ-Typ Calmodulin-Bindestelle; 6 TMD: sechs Transmembranregionen (S1-S6) mit einer Porenregion zwischen S5 und S6.

CNGA4 (Bradley et al., 1994; Liman und Buck, 1994) und CNGB1b (Sautter et al., 1998; Bonigk et al., 1999) eine alternative Spleißvariante von CNGB1. Die native Zusammensetzung ist A2-A2-A4-B1b (Zheng und Zagotta, 2004). Nur die CNGA-Untereinheiten formen funktionelle homomere Kanäle, mit der Ausnahme von CNGA4.

Alle CNG-Kanal Untereinheiten weisen die gleichen strukturellen Eigenschaften auf. Vier Untereinheiten lagern sich um eine zentrale Pore zusammen (Gordon und Zagotta, 1995; Liu et al., 1996). Jede Untereinheit besteht aus sechs Transmembranregionen (S1-S6), intrazellulären N- und C-Termini, einer Porenregion zwischen S5 und S6 und einer zyklischen-Nukleotid Bindedomäne (cNBD) im C-Terminus, die mittels des „C-Linkers“ mit der S6 Region verbunden ist (Kaupp et al., 1989; Liu et al., 1996; Henn et al., 1995; Molday et al., 1991). Die Bindung der zyklischen Nukleotide induziert vermutlich eine Konformationsänderung innerhalb der Bindestelle, die auf andere Bereiche übertragen wird und zum Öffnen des Kanals führt (Gordon und Zagotta, 1995; Goulding et al., 1994). Der genaue Mechanismus der Aktivierung ist jedoch nicht bekannt. Während alle CNG-Kanäle eine hohe Empfindlichkeit für cGMP besitzen, hat der olfaktorischen CNG-Kanal auch eine hohe Empfindlichkeit für cAMP ( $K_{1/2} \sim 4 \mu\text{M}$  cAMP; (Altenhofen et al., 1991; Varnum et al., 1995; Bonigk et al., 1999).

Die Porenregion der drei Untereinheiten beeinflussen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit des olfaktorischen CNG-Kanals unterschiedlich. CNGA2 und CNGA4 haben eine negativ geladene Aminosäure, die  $\text{Ca}^{2+}$  bindet und die Verweildauer in der Pore im Vergleich zu CNGB1b verlängert (Bradley et al., 1994). CNGB1b hat an dieser Stelle der Pore ein ungeladenes Glycin, das die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung in der Pore schwächt, und somit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit des Kanals erhöht (Bonigk et al., 1999; Dzeja et al., 1999).

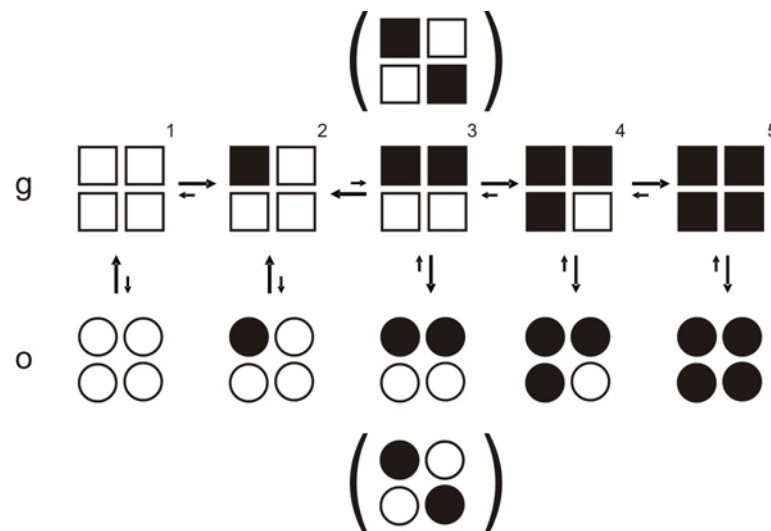
Ein weiteres strukturelles Merkmal der olfaktorischen CNG-Untereinheiten sind ihre Calmodulin-Bindestellen. CNGA2 hat im N-Terminus eine klassische Calmodulin-Bindestelle (CaMBD) (Liu et al., 1994). Diese CaMBD hat an den Positionen 1, 8 und 14 hydrophobe Aminosäuren und bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin (Rhoads und Friedberg, 1997). Bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin an diese CaMBD eines homomeren A2-Kanals, verringert sich die cAMP-Sensibilität und die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals (Chen und Yau, 1994; Lynch und Lindemann, 1994; Varnum und Zagotta, 1997; Zheng et al., 2003). Dabei wird die Interaktion zwischen dem N-Terminus (CaMBD) und dem C-Terminus einer benachbarten CNGA2-Untereinheit verhindert. Eine ähnliche reduzierte cAMP-Empfindlichkeit beobachtet man auch, wenn die CaMBD von CNGA2 (auch auto-excitatorische Domäne genannt) deletiert wurde (Zheng et al., 2003; Trudeau und Zagotta, 2003; Varnum und Zagotta, 1997). Eine weitere „klassische“ CaMBD befindet sich im C-Terminus von CNGB1b, der bisher aber noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (Grunwald et al., 1998; Weitz et al., 1998). Neben den „klassischen“ CaMBD hat CNGB1b im N-Terminus und CNGA4 im C-Terminus eine Calmodulin-Bindestelle vom IQ-Typ (Rhoads und Friedberg, 1997; Bahler und Rhoads, 2002; Bradley et al., 2004). Die IQ-Typ Calmodulin-Bindestelle kann im Gegensatz zu der CaMBD Calmodulin auch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig binden (Bahler und Rhoads, 2002). Bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin an die IQ-Typ Calmodulin-Bindestelle von CNGA4 und CNGB1b desensibilisiert der A2-A2-A4-B1b-Kanal, das heißt der Kanal öffnet nur bei höheren cAMP-Konzentrationen (Bradley et al., 2004).

#### 1.4 Kinetische Modelle der Aktivierung

CNG-Kanäle sind Liganden-gesteuerte Kanäle. Durch kooperative Bindung von zyklischen Nucleotiden (z.B.: cAMP oder cGMP) an die intrazelluläre Bindestelle kommt es zu einer Konformationsänderung des Kanals, und der Kanal öffnet. Für den Schaltmechanismus der CNG-Kanäle sind verschiedene Modelle beschrieben worden (Übersichtsartikel: (Kaupp und Seifert, 2002; Craven und Zagotta, 2006). Das einfachste Modell beschreibt eine sequentielle Bindung von vier zyklischen Nucleotiden an den CNG-Kanal und der anschließenden Öffnung des vollständig ligandierten Kanals. In diesem linearen (sequentiellen)-Modell kann der CNG-Kanal nicht in den geöffneten Zustand übergehen, wenn der Kanal gar nicht oder nur partiell ligandiert ist. Solche Öffnungsereignisse sind allerdings nachgewiesen worden



(Kleene, 2000; Tibbs et al., 1997). Diese Transitionen sind in einer allgemeineren Form des Sequentiellen Modell, dem cyclischen-allosterischen-Modell (MWC-Modell), enthalten (Monod et al., 1965). Eine weitere Vorhersage des MWC-Modells ist, dass jeder ligandierter



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des C4L-Modells für den homomeren A2-Kanal.** Quadrate repräsentieren den geschlossenen Zustand (g), Kreise den geöffneten Zustand (o). Ausgefüllte Symbole sind cAMP-ligandierter Untereinheiten. Die Pfeilgröße veranschaulicht die Wahrscheinlichkeitsverteilung für den bevorzugten Zustand. Das Modell zeigt, dass der Kanal öffnet, wenn er zwei cAMP-Moleküle gebunden hat (3). Dieses Öffnungsereignis konkurriert mit dem Verlust eines cAMP, dessen Dissoziation durch die negative Kooperativität begünstigt ist. Die Bindung des dritten und vierten cAMPs an CNGA2 (4,5) stabilisiert den Kanal im geöffneten Zustand. (nach Biskup et al., 2007)

Zustand einen diskreten geöffneten Zustand hat. In Einzelkanalmessungen, in denen ein Analog des cGMP an die cNBD kovalent gebunden wurde, wurden die Öffnungswahrscheinlichkeiten von einem ein- bis vierfach ligandierten Kanal gemessen (Ruiz und Karpen, 1997; Ruiz und Karpen, 1999). Die Relation der Öffnungswahrscheinlichkeiten der unterschiedlich ligandierten Kanäle, ließen sich nicht mit der Vorhersage des MWC-Modells in Deckung bringen. Eine andere Studie, bei der die Bindestellen durch Mutationen funktionell ausgeschaltet wurden, stimmten ebenfalls die gemessenen Öffnungswahrscheinlichkeiten nicht mit den vorhergesagten des MWC-Modells überein (Tibbs et al., 1998). Sie führte zu dem „Coupled-Dimer-Modell“ (CD-Modell). In dem CD-Modell agieren je zwei Untereinheiten als funktionelle Einheit, binden ihre Liganden unabhängig und führen die allosterische Konformationsänderung konzertiert durch, um die Pore zu öffnen.

Das erste adäquate Modell (C4L-Modell) zum Schaltmechanismus konnte durch die Arbeit von Biskup und Kollegen aufgestellt werden. Durch die gleichzeitige Messung von

Ligandenbindung mit Hilfe eines fluoreszierenden cGMP-Analogs und Messung der Aktivierung des CNGA2-Homomers durch die Patch-Clamp-Registrierung, konnte ein kooperatives Schaltmodell erstellt werden (Biskup et al., 2007). Im Gegensatz zu den anderen Modellen, sind bei dem C4L-Modell nicht alle Ligandenbindungen an den Kanal identisch. Die cAMP-Bindungen sind asymmetrisch, und die einzelnen Ligandierungsstufen gehen nur im geschlossenen Zustand ineinander über. Die Bindung des ersten Liganden erzeugt sogar eine negative Kooperativität für die Bindung des zweiten Liganden. Demzufolge ist der Zustand mit zwei gebundenen Liganden sehr instabil. Durch die Bindung des zweiten Liganden erhöht sich die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals fast auf eins. Allerdings stabilisiert erst die Bindung des dritten und vierten Liganden den Kanal im geöffneten Zustand.

Der Schaltmechanismus ist der Gleiche, wenn der A2-A2-A4-B1b-Kanal mit cGMP oder mit cAMP geöffnet wird. Erstaunlicherweise kann das C4L-Modell auf den heteromeren A2-A2-A4-B1b-Kanal übertragen werden, da der A2-A2-A2-A2-Kanal und der heteromere A2-A2-A4-B1b-Kanal nach dem gleichen Schaltprinzip aktiviert werden. (Nache et al., 2005). Es ist allerdings nicht bekannt in welcher Reihenfolge die drei Untereinheiten cAMP binden, und ob der A2-A2-A4-B1b-Kanal mit zwei oder drei cAMP-Bindestellen noch funktionell ist, so wie es das C4L-Modell vorhersagt.

### 1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

- Dauern Duftstoff-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale lange genug an, um die CNG-Kanäle zu desensibilisieren?
- Welche der Kanaluntereinheiten im A2-A2-A4-B1b-Kanal vermitteln die vier Bindungsschritte des C4L-Modells?
- Durch welche Calmodulin-Bindestellen im A2-A2-A4-B1b-Kanal wird die Desensibilisierung vermittelt?

Aus diesen Fragestellungen soll sich ein Ansatz für eine mechanistische Beschreibung der Aktivität von CNG-Kanälen ergeben.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen:

AppliChem (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Fluka Chemie GmbH (Steinheim), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma Aldrich Chemikalien GmbH (Steinheim), USB Europe GmbH (Staufen) Invitrogen GmbH (Karlsruhe) und Henkel KGaA (Düsseldorf) Die Mutagenese wurde mit dem *Quick Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Kalifornien) durchgeführt.

Die Lösungen und Puffer wurden mit Wasser aus einer MilliQ UF Plus-Anlage der Firma Millipore (APS Water Services Inc., Van Nuys, CA, USA) angesetzt, falls nicht anders angezeigt.

### 2.2 Lösungen und Medien

#### 2.2.1 Lösungen

Soweit erforderlich, wurden die Lösungen durch Autoklavieren (20 - 30 min, 121 °C) sterilisiert. Lösungen für die Zellkultur wurden sterilfiltriert.

## 2.2.1.1 Lösungen für die Zell-Kultur und die Transfektion

Flüssigmedium

10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS)

1 % (v/v) Glut-Penicillin\_S treptomycin

1 % (v/v) nicht essentielle Aminosäuren,  
ohne L-Glutamin (100 X)\*in M10: Minimal essential Medium (MEM), NaHCO<sub>3</sub> (1 x Flüssigmedium) für HEK 293-Zellen.2 x HBS

280 mM NaCl

10 mM KCl

1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

12 mM Dextrose

50 mM Hapes

pH 7,05

PBS

137,0 mM NaCl

10,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,6 mM KCl

1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,2

Poly-L-Lysin0,1 mg Poly-L-Lysin/ml H<sub>2</sub>OPBS/EDTA

2 g EDTA/l PBS

Trypsin/EDTA

0,05 % (v/v) Trypsin

0,02 % (v/v) EDTA

CaCl<sub>2</sub>2 M CaCl<sub>2</sub>in H<sub>2</sub>O

Na-Butyrat

0,5 M NaButyrat

in PBS

### 2.2.1.2 Lösungen für das Ca<sup>2+</sup>-Imaging in vitalen Gewebeschnitte

#### Ringerlösung

120 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
2 mM CaCl  
1 mM MgSO<sub>4</sub>  
10 mM D-Glucose  
10 mM Hepes  
pH 7,4 (NaOH)

#### Fluo-4-AM-Lösung

5 µM Fluo-4-AM  
0,1 % Pluronic F-127  
0,1 % DMSO  
in Ringerlösung  
pH 7,4 (NaOH)

#### K<sup>+</sup>-Lösung

90 mM NaCl  
30 mM KCl  
2 mM CaCl  
1 mM MgSO<sub>4</sub>  
10 mM D-Glucose  
10 mM Hepes  
pH 7,4

#### Agaroselösung

5 % (w/v) low melting Agarose TYP VII  
in Ringerlösung

#### Forskolin-Lösung

20 µM Forskolin  
0,2 % DMSO  
in Ringerlösung

#### Duftstoff-Lösung

0,2 % (v/v) Henkel 100  
in Ringerlösung

### 2.2.1.3 Lösungen für die *patch-clamp*-Experimente

#### Extrazelluläre Lösung (EL)

140 mM NaCl  
3 mM KCl  
2,5 mM CaCl<sub>2</sub>  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
15 mM Hepes  
pH 7,4 (NaOH)

#### Pipettenlösung

140 mM NaCl  
3 mM KCl  
10 mM EGTA  
10 mM Hepes  
pH 7,4 (NaOH)

Messlösung 1 (ML<sub>EGTA</sub>)

140 mM NaCl  
 3 mM KCl  
 10 mM EGTA  
 10 mM Hepes  
 pH 7,4 (NaOH)

Messlösung 2 (ML<sub>Ca<sup>2+</sup></sub>)

140 mM NaCl  
 3 mM KCl  
 8,5 mM CaCl<sub>2</sub>  $\triangleq$  20  $\mu$ M „freien“ Ca<sup>2+</sup>  
 10 mM HEDTA  
 10 mM Hepes  
 pH 7,4 (NaOH)

Herstellung der cAMP-Meßlösungen

Die cAMP-Stammlösung (200mM) wurde durch Einwiegen des Natriumsalzes von cAMP in Wasser hergestellt. Die cAMP-Konzentrationen der cAMP-Meßlösungen wurden durch Verdünnungen der cAMP-Stammlösung mit ML<sub>EGTA</sub> oder ML<sub>Ca<sup>2+</sup></sub> eingestellt. Die Kontrolle der cAMP-Konzentration erfolgte photometrisch bei 258 nm. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz  $E = \epsilon * c * d$  erfolgte die Berechnung der Konzentration mit dem Extinktionskoeffizienten für pH 7,0  $\epsilon = 14650 * \text{cm}^{-1} * \text{M}^{-1}$  (siehe Merck Index).

Bestimmung der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der Messlösung 2

Die benötigte Menge CaCl<sub>2</sub>, um die gewünschte freie Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu erhalten, wurde mit dem Programm WINMAXC v2.50 (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) berechnet. Die freie Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde mit einer Ca<sup>2+</sup>-selektiven Elektrode (Kwik-Tip, WPI) und Eichlösung mit definierter Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Calbuf-1, WPI) gemessen.

## 2.3 Plasmid-Vektoren

In dieser Arbeit wurden die Plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen), pEYFP-N1 (Clontech) und der Dual-Expressionsvektor pBudCE4.1 (Invitrogen) benutzt, um die cDNA-Klone der CNG-Untereinheiten und deren Mutanten heterolog zu exprimieren. In Tabelle 2.1 sind alle verwendeten Konstrukte aufgeführt. Die Konstrukte wurden mir von Dipl. Biologin Kerstin Vocke (Universität Heidelberg) zu Verfügung gestellt.

Plasmid-Vektor	pcDNA3.1	pEYFP-N1	pBudCE4.1
Genprodukt	CNGA2	CNGA2-YFP	
	CNGA4	CNGA2 <sup>R538E</sup> -YFP	CNGA4-RFP + CNGB1b-CFP
	CNGA4 <sup>R430E</sup>		CNGA4 <sup>L292E</sup> -RFP + CNGB1b-CFP
	CNGB1b <sup>R657E</sup>		CNGA4-RFP + CNGB1b <sup>L183E</sup> -CFP

**Tabelle 2.1 Expressionsplasmide der CNG-Untereinheiten und deren Mutanten.** Die Aminosäurenaustausche und deren Positionen sind hochgestellt.

## 2.4 Tiere und die Herstellung vitaler Gewebeschnitte

Für die Herstellung vitaler Gewebeschnitte des olfaktorischen Epithels der Maus, wurde der Stamm Balb-C verwendet. Die Gewebeschnitte entstammen aus postnatalen Tieren in dem Alter von 0-5 Tagen. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus in vollklimatisierten Räumen gehalten und aufgezogen.

### 2.4.1 Präparation der vitalen Gewebeschnitte

Vor der Präparation wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet und dekapitiert. Anschließend wurde dem Kopf das Fell und der Unterkiefer entfernt. Der posteriore Teil des Schädels wurde durch einen Schnitt koronal abgetrennt. Ebenso wurde etwa 300 µm der Nasenspitze entfernt. Der Mäuseschädel wurde dann mit der Nasenspitze nach oben in ein

Einbettgefäß gegeben und mit 37°C warmer 5 % *low melting* Agarose übergossen. Der ausgehärtete Agaroseblock wurde aus dem Einbettgefäß gelöst und mit Acrylcyanatkleber auf den Probenteller des Vibratom VT1000S (Leica GmbH, Nussloch) befestigt. Der Probenteller wurde dann in die Probenkammer mit der dorsalen Seite zur Klinge hin positioniert. Die mit Eis gekühlte Probenkammer war mit Ringerlösung befüllt. Alle Lösungen, in denen das Präparat aufbewahrt wurde, waren durch Carbogen-Begasung (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) mit O<sub>2</sub> gesättigt. Mit den folgenden Schnittparametern: Vorschubgeschwindigkeit: 0,20 mm/s; Frequenz: 50-60 Hz und Amplitude: 1 mm konnten mit dem Vibratom 100 – 150 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt werden.

## 2.5 Zelllinien und heterologe Genexpression

### 2.5.1 Kulturbedingungen für die Zelllinien

Es wurde die folgende Zelllinien HEK293 (Graham et al.; 1977) verwendet:

Die Zellen wurden in ihrem Nährmedium (siehe 2.2.1.1) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und ~ 95 % Luftfeuchtigkeit auf Petrischalen (Ø 9 cm) kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die Zellen teilen sich etwa alle 24 h. Bei ~90 %iger Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt (*Splitting*). Dazu wurden die Zellen zunächst mit 3 – 5 ml PBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C in ca. 5 min abgelöst. Die Zellen wurden in 8 – 10 ml Medium resuspendiert und die Zelldichte der Suspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Zellerhaltung wurde ein Teil der Zellen (die Menge entspricht 10 – 20 % Konfluenz) auf Ø 9 cm-Schalen mit frischem Medium ausgesät. Die verbleibenden Zellen wurden für die Transfektion (siehe 2.5.2) in unterschiedlichen Dichten ausgesät. Nach 30 *Splitting*-Runden wurden die Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Aussaat verwendet.



## 2.5.1.1 Transiente Transfektion von HEK293 Zellen

Für die Transfektion wurden  $0,5 \times$ ,  $1 \times$  oder  $2 \times 10^5$  Zellen auf  $\varnothing 5$  cm-Schalen ausgesät, je nachdem, ob die Transfektion am 3., 2. oder 1. Tag nach der Aussaat erfolgen sollte.

Die Zellen wurden nach der Kalziumphosphat-Methode (Chen & Okayama, 1987) transfiziert. Der Transfektionsansatz für eine  $\varnothing 5$  cm-Schale ist in Tabelle 2.2 aufgeführt. Bei der Kalziumphosphat-Methode wird der Transfektionsansatz für 20 min bei Raumtemperatur

<b>Plasmid-DNA</b> (je nach Konzentration)	x $\mu$ l (y $\mu$ g <i>Plasmid DNA</i> )
<b>H<sub>2</sub>O</b>	124 – x $\mu$ l
<b>CaCl<sub>2</sub> (2 M)</b>	21 $\mu$ l
<b>2 x HBS</b>	165 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	300 $\mu$ l

**Tabelle 2.2:** Transfektionsansatz für eine  $\varnothing 5$  cm-Schale

gelagert und dann auf die Zellen gegeben. Die DNA präzipitiert, während man die Zellen für 20-22 h inkubiert (bei 35°C, 3 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit). Das Präzipitat wurde von den Zellen mit je einmal 3 ml PBS und 2 ml PBS/EDTA gewaschen. Dann wurde 300  $\mu$ l Trypsin/EDTA zu den Zellen pipettiert, anschließend wurden sie bei 37 °C inkubiert, bis sie vom Schalenboden abgelöst waren. Der Trypsinverdau wurde gestoppt, indem die abgelösten Zellen in 4,7 ml Medium resuspendiert wurden. Für die elektrophysiologische Untersuchungen wurden 300  $\mu$ l Zellsuspension auf beschichtete Glasplättchen in Multiwell-Platten pipettiert. Das Beschichten der Plättchen erfolgte in den Multiwell-Platten mit Poly-L-Lysin (Sigma). Die Zellen werden für weitere 20 - 22 h inkubiert (bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) und dann gemessen. Dem Medium wurde 3 mM Natriumbutyrat 2 -3 h nach dem Umsetzen hinzugefügt, um das Expressionsniveau zu steigern.

### 2.5.2 Identifizierung transfizierter HEK 293 Zellen

Für die Identifizierung transfizierter Zellen, wurde CNGA2 für die Experimente in 3.2 und 3.3 am C-Terminus mit dem *yellow fluorescent protein* (YFP) fusioniert. Zellen die CNGA2-YFP exprimieren zeigen Fluoreszenz.

Für die Experimente in 3.4 wurden CNGA4 und CNGB1b in dem Dualexpressionsvektor pBudCE4.1 kloniert. Zusätzlich wurden CNGA4 mit RFP, und CNGB1b mit CFP am C-Terminus fusioniert. Es wurden dann nur Ableitungen von Zellen vorgenommen, die eine rote und eine grüne Fluoreszenz zeigte. Die Verwendung des Dualexpressionsvektor erhöhte die Wahrscheinlichkeit von ~ 10 % (3.2 und 3.3) auf ~ 25 % (3.4) Ableitungen von fast ausschließlich A2-A2-A4-B1b-Kanälen zu bekommen (siehe 3.2).

In der Tabelle 2.3 sind die Mischungsverhältnisse der Expressionsplasmide unterschiedlicher CNG-Untereinheiten bei der heterologen Koexpression aufgeführt. Dieselben Mischungsverhältnisse galten auch bei der Koexpression mutierter CNG-Untereinheiten.

Kanal		Mischungen der Expressionsplasmide bei Kotransfektion für	
		Benutzt in 3.2 und 3.3	Benutzt in 3.4
A2-A2-A2-A4	(A2 : A4)	4 : 1	
A2-A2-A2-B1b	(A2 : B1b)	7 : 3	
A2-A2-A4-B1b	(A2 : A4 : B1b)	2 : 1 : 2	
	(A2 : A4 + B1b)		1 : 1
Gesamtmenge DNA (µg)		15	20

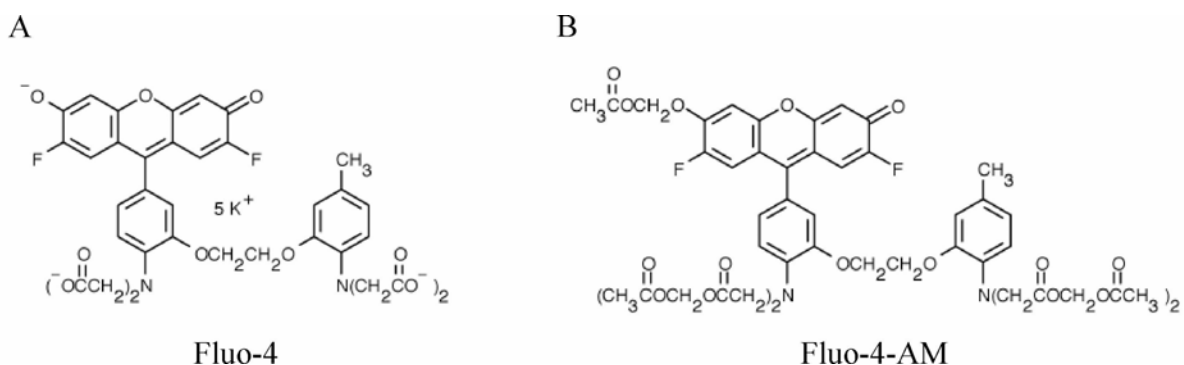
**Tabelle 2.3: Mischungsverhältnisse der Expressionsplasmide bei Kotransfektion**

## 2.6 $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging der vitalen Gewebeschnitte

Beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging wird die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, sowie ihre zeitliche und räumliche Veränderung bestimmt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird dabei indirekt mit Hilfe von Farbstoffen bestimmt, deren spektroskopische Eigenschaften sich mit der Bindung von Kalzium ändern. Zum Nachweis der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in ORNs der vitalen Gewebeschnitte wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 verwendet. Die gezeigten Daten wurden unter meiner Anleitung durch Diplom Biologin Maren Stavermann erstellt.

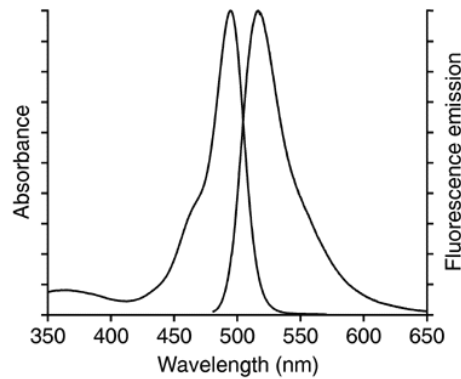
### 2.6.1 Kalzium-abhängige Farbstoffe

Fluo-4 (Molecular Probes) ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Fluoreszenz-Farbstoff ( $\text{Ca}^{2+}$ -Farbstoff). Es wurde der Acetoxymethylester (Fluo-4 AM) verwendet. Durch den AM-Ester wird Fluo-4 ungeladen und hydrophob, das heißt er wird membranpermeabel. Die Esterverbindung Fluo-4-AM wird durch intrazellulären unspezifische Esterasen gespalten (Williams et al., 1987) und anionisches Fluo-4 reichert sich in der Zelle an. Der  $K_{1/2}$ -Wert für  $\text{Ca}^{2+}$  beträgt 345 nM (in 100 mM KCl; 10 mM MOPS; pH 7,2).

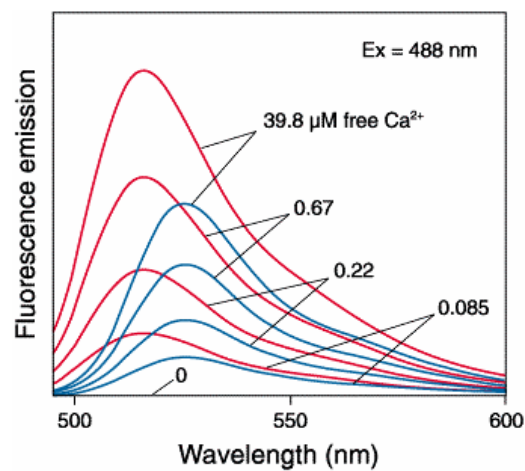


**Abbildung 2.1:** Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Farbstoffes (A) Fluo-4 und seines Acetoxymethylesters (B) Fluo-4-AM

Fluo-4 besitzt ein Absorptionsmaximum bei 494 nm (Abbildung 2.2). Das Emissionsmaximum liegt bei 516 nm (Abbildung 2.2). Unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen beeinflussen die Fluoreszenzintensität von Fluo-4 (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.2:** Spektrum des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Farbstoffes Fluo-4. Das Absorptionsspektrum (linke Kurve) und Emissionsspektrum (rechte Kurve) sind gleichzeitig dargestellt (aus: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))



**Abbildung 2.3:** Fluoreszenzemissionsspektrum bei gleichen Konzentrationen von Fluo-3 (blau) und Fluo-4 (rot) in Lösungen mit 0 – 39,8  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . (aus: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

### 2.6.2 Vorbereitung der vitalen Gewebeschnitte

Die vitalen Gewebeschnitte wurden mit dem membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM für 75 min bei 37 °C beladen. Die 5 µM Fluo-4 AM-Lösung enthielt neben Pluronic auch noch Probenicid. Pluronic ist ein Dispergenz und erhöht die Löslichkeit von Fluo-4 AM. Pluronic hemmt die Aktivität von Anionentransportern, die für den Export von Fluo-4 verantwortlich ist (Di Virgilio et al., 1988).

### 2.6.3 Aufbau des Ca<sup>2+</sup>-Imaging Meßstands

Das Ca<sup>2+</sup>-Imaging wurde an einem *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) durchgeführt. Das inverse Mikroskop Nikon TE2000 (Nikon GmbH, Düsseldorf) war mit dem *scanhead spinning-disc confocal* ERS-FRET (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, USA) ausgestattet und wurde vom Nikon Imaging Center (Universität Heidelberg) bereitgestellt. Es wurde ein Wasser-Immersionsobjektiv (Nikon Plan Apo VC, 60x, NA = 1,2) benutzt. Mit einem Argon-Ionen Laser (43 series Ion Lasers; Melles Griot, Bensheim) wurde der Fluoreszenzfarbstoff bei 488 nm angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit einer CCD-Digitalkamera (Hamamatsu Electron Multiplier CCD Camera, 1k x 1k; Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching) registriert und die Daten von der UltraVIEW ERS Software (ImagingSuite™; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, USA) erfasst und gespeichert.

### 2.6.4 Auswertung der Fluoreszenzbilder

Der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten eines ORNs wurde über die Zeit bestimmt. Zur Bestimmung der Fluoreszenzwerte, wurde ein ROI (*region of interest*) gebildet und die mittlere Pixelintensität (MPI) registriert. Die MPI der Hintergrundwerte (ein Bereich ohne Gewebe) wurde von den Fluoreszenzwerten abgezogen. Normiert wurde die

Fluorezenzänderung der ORNs auf die basale Fluoreszenz der ORNs vor der Stimulierung (Baseline Normierung).

$$\frac{F - F_B}{F_B} * 100 = \frac{\Delta F}{F}$$

## 2.7 Patch-Clamp-Technik

Die Grundidee der Patch-Clamp-Technik (HAMILL et al., 1981) besteht darin einen isolierten Bereich der Zellmembran (*patch*, die Fläche beträgt einige  $\mu\text{m}^2$ ) so in die Spitze einer feinen Glaskapillare (Patchelektrode) zu schmiegen, dass ein hochohmiger Kontakt (*gigaseal*;  $\geq 1\text{G}\Omega$ ) zwischen Membran und Glas entsteht. Dadurch lassen sich Leckströme und thermisches Rauschen so stark reduzieren, dass Ströme von wenigen pA über die Membran messbar sind. Über eine Kompensationsschaltung kann die angelegte Membranspannung unabhängig von dem über den Patch fließenden Strom konstant gehalten werden (*voltage clamp*).

### 2.7.1 Aufbau des Meßstands

Mit dem Messstand (Abb. 2.10) können Strom- und Fluoreszenzsignale registriert werden. Mit einer Quecksilberdampf-Lampe (Hg; 103 W/2, Nikon, Düsseldorf) wird das Fluoreszenzlicht einer Probe angeregt. Die Belichtungsintensität kann mit einer Irisblende reguliert werden. Ein Anregungsfilter befindet sich zwischen Hg-Lampe und der Probe. Dort wird das Licht an einem dichroischen Spiegel (DC-Spiegel) reflektiert. Ein Wasser-Immersionsobjektiv (Nikon Fluor, 40 x, NA = 0,8) fokussiert das Licht auf die Probe. Das von der Probe in der Meßkammer emittierte Fluoreszenzlicht fällt durch einen Bandpaßfilter auf eine Digitalkamera (DN 100 und Kamerakontrolle DN100 Digital Net Camera, Camera Control; Nikon AG, Düsseldorf).

Ein elektrischer Mikromanipulator (SM-5; Luigs & Neumann, Ratingen), mit dem die Patchpipette im Mikrometerbereich bewegt werden kann, ist an dem Mikroskop befestigt. Die Messkammer auf dem Kreuztisch des Mikroskopes besteht aus einem rechteckigen Plexiglasbecken und Perfusionskanälen. Um den *patch* mit verschiedenen Messlösungen zu umspülen, wurde die Glaspipette vor verschiedene Perfusionskanäle positioniert. Für den schnellen Wechsel von Messlösungen wurde ein Multikanal-Perfusionssystem benutzt (SF-77B Perfusion Fast-Step; Warner Instr. Corp., Hamden, CT, USA). Die Flussgeschwindigkeit, mit der die Messlösungen den *patch* umspülten, betrug zwischen 0,5 und 1 ml/min. Die Ag/AgCl-Referenzelektrode wurde in die Badlösung in der Messkammer eingetaucht. In die Patchpipette wurde ein chlorierter Silberdraht eingeführt, der mit dem Vorverstärker verbunden ist. Über die Pipettenhalterung am Vorverstärker kann ein Über- oder Unterdruck im Inneren der Glaspipette angelegt werden. Der Vorverstärker ist mit dem Hauptverstärker (EPC-8; HEKA Elektronik, Lambrecht/Pf.) verbunden. Ausgehend vom Hauptverstärker gelangt das Signal der Messelektrode über einen A/D-Wandler (NI PCI 6014, National Instruments) in einen Computer. Mittels der Software WinWCP ([http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software\\_ses.htm](http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software_ses.htm)) wurde das Stromsignal aufgenommen.

### 2.7.2 Durchführung der Messung

#### Beschaffenheit und Herstellung der Pipetten

Filamentierte Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser: 1,5 mm, Innendurchmesser: 0,87 mm, Hilgenberg, Malsfeld) wurden mit einem Flaming Brown Puller (MODEL P-97; Sutter Instr. Co., Novato, CA) auseinandergezogen und anschließend feuerpoliert (Mikroforge L/M-CPZ 101, List, Darmstadt).

#### Testpuls

Befinden sich die Pipette und Referenzelektrode in der Badlösung, kann die Stromantwort der Pipette auf einen rechteckförmigen Kommandospannungspuls (10 mV) mit dem Computer betrachtet werden. Der Widerstand der Patchpipette kann aus dieser Stromantwort ermittelt werden. Er lag bei allen Messungen zwischen 5 und 10 M $\Omega$ .

### Stromantwort in der *cell-attached*-Konfiguration

In der *cell-attached*-Konfiguration befindet sich die Pipette auf der Zelloberfläche (Abbildung 2.11). Dabei bildet sich ein hochohmiger Kontakt (*gigaseal*;  $\geq 1\text{G}\Omega$ ) zwischen Pipettenwand und Membran. Währenddessen verändert sich die Stromantwort der Pipette auf den Testpuls. Der Haltestrom während des Spannungssprunges wird wegen des hohen Widerstandes (*gigaseal*) minimal. Spannungsdifferenzen zwischen Mess- und Referenzelektrode wurden vor dem Zellkontakt in der Messkammer unter symmetrischen Ionenbedingungen abgeglichen (*offset*-Korrektur).

### Übergang in die *inside-out*-Konfiguration

Nach dem Erreichen des Gigaseals wird die Glaspipette schnell zurückgezogen. Dabei wird ein Stück Membran (*patch*) herausgerissen. In der *inside-out*-Konfiguration ist die zytoplasmatische Seite des *patch* der Badlösung zugewandt. Bei allen Experimenten wurden Strommessungen unter Spannungsklemme durchgeführt.

### Messung der Strom-Spannungs-Kennlinie

Die Strom-Spannungs-Kennlinien ( $I/V_m$ -Kurven) wurden bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen ( $I_{makro}$ ) am *inside-out* Patch bestimmt. Die Leckströme ( $I_{Leck}$ ) über *patches* in der *inside-out*-Konfiguration wurden in ligandenfreier Messlösung gemessen. *Patches* mit einem Leckstromanteil von über 10% wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Dabei wurde fünfmal eine Spannungsrampe von -80 mV bis +80 mV angelegt, die jeweils 1 s lang waren. Zwischen jeder Spannungsrampe betrug für 1 s lang die Haltespannung 0 mV. Die gemessenen Ströme der fünf Spannungsrampen wurden gemittelt. Die Messungen wurden mit einer Frequenz von 1 kHz aufgenommen und mit 500 Hz gefiltert.

### Kinetische Messung der Desensibilisierung

Die kinetischen Messungen der Desensibilisierung der CNG-Kanäle wurde bei einer Haltespannung von -40 mV durchgeführt. Die Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wirkung wurde mit 500 Hz aufgenommen, und die längeren Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Wirkung wurde mit 50 Hz aufgenommen. Der schnelle Lösungswechsel erfolgte mit dem 77B Perfusion Fast-Step Perfusionssystem innerhalb von wenigen ms.



### 2.7.3 Auswertung der Messdaten

Die Auswertung der gespeicherten Daten erfolgte mit der Software Origin.

#### Bestimmung der Dosis-Wirkungskurven

Für die Bestimmung der Dosis-Wirkungskurven wurde von den I/V-Kurven der gemessene Leckstrom abgezogen. Anschließend wurden die gemessenen Ströme bei – 50 mV und bei + 50 mV der verschiedenen cAMP-Konzentrationen auf den Maximalwert normiert und gegen die Liganden-Konzentration aufgetragen. Die Messpunkte liegen auf einer Kurve, die sich durch die Hill-Gleichung beschreiben lässt:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{[\text{cAMP}]^n}{[\text{cAMP}]^n + K_{\frac{1}{2}}^n}$$

Dabei entspricht der  $K_{\frac{1}{2}}$  der cAMP-Konzentration ( $[\text{cAMP}]$ ), die die halbmaximale Stromantwort auslöst, und  $n$  ist der Hill-Koeffizient.

Um *patches* mit fast ausschließlich A2-A2-A4-B1b Kanälen zu identifizieren (siehe 3.2), wurde ein Testparameter durch die folgende theoretische Betrachtung abgeleitet. Sind in einem patch Kanäle mit unterschiedlicher Untereinheiten-Zusammensetzung, dann setzt sich der relative Strom ( $I/I_{\max}$ ) aus der gewichteten Summe der vier Hill-Gleichungen zusammen. Jede der vier Hill-Gleichungen beschreibt die cAMP-Abhängigkeit einer möglichen Untereinheiten-Zusammensetzung.

$$I/I_{\max} = x_1 H_1(\text{A2-A2-A4-B1b}) + x_2 H_2(\text{A2-A2-A2-A4}) + x_3 H_3(\text{A2-A2-A2-B1b}) + x_4 H_4(\text{A2})$$

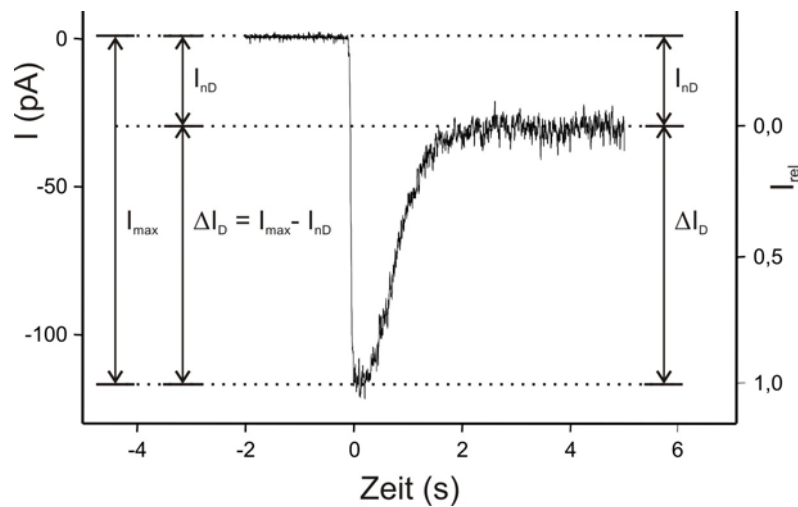
$H_i$  entspricht der Hill-Gleichung einer spezifischen Untereinheiten-Zusammensetzung und  $x_i$  ist der dazugehörige Skalierungsfaktor. Die Aktivierungskonstante  $K_{\frac{1}{2}}$  und der Hillkoeffizient  $n$  entsamen aus Bönigk et al. (1999) (siehe Tabelle 3.1). Der Testparameter war der fraktionale Strom  $I/I_{\max}$  bei den Testlösungen mit 3,4  $\mu\text{M}$  und 8,8  $\mu\text{M}$  cAMP. Für diese cAMP-Konzentrationen sagt die Analyse ein fraktionales Strom von  $I/I_{\max}$  0,31 und 0,63 dann voraus, wenn fast ausschließlich A2-A2-A4-B1b Kanäle ( $x_1/[x_2+x_3+x_4] > 10$ ) in dem *patch* enthalten sind. Es wurden nur die Messungen zur Auswertung verwendet, deren fraktionaler Strom bei den oben genannten cAMP-Konzentrationen die Werte übersteigt.

### Bestimmung der Desensibilisierungs-Kinetik

Für die Bestimmung der Kinetik der Desensibilisierung wurden die Stromwerte mit Exponentialfunktionen gefittet. Dafür wurden die Stromwerte zu Beginn der Desensibilisierung als Zeitpunkt null definiert. Anschließend wurden die Stromwerte ( $I_{nD}$ ), die nach dem Erreichen des Gleichgewichtszustands nicht durch die Desensibilisierung unterdrückt wurden, von der maximalen Stromamplitude ( $I_{max}$ ) abgezogen (1). Schließlich wurden die Desensibilisierung-sensitiven Stromwerte auf den Effekt der Desensibilisierung ( $\Delta I_D$ ) normiert (2).

$$(1) \quad \Delta I_D = I_{max} - I_{nD}$$

$$(2) \quad I_{norm} = \frac{I(t) - I_{nD}}{\Delta I_D}$$



**Abbildung 2.5: Aufbereitung der Messdaten für die Analyse der Desensibilisierungs-Kinetik.** Erläuterung siehe Text.

Die Kinetik des Desensibilisierung-Effekts, der durch exogenes  $Ca^{2+}$ -Calmodulin ausgelöst wurde, ließ sich am besten mit einer bi-exponentiellen Funktion beschreiben.

$$I_{norm}(t) = a_f e^{-\frac{t}{\tau_s}} + (1 - a_f) e^{-\frac{t}{\tau_l}}$$

Die Kinetik des Desensibilisierung-Effekts, der durch  $Ca^{2+}$  und endogenes Calmodulin ausgelöst wurde, ließ sich am besten mit einer einfach-exponentiellen Funktion beschreiben.

$$I_{\text{norm}}(t) = e^{-\frac{t}{\tau}}$$

$\tau_s$  und  $\tau_l$  sind die schnellen und langsamen Zeitkonstanten der Exponentialfunktionen,  $a_f$  und  $(1-a_f)$  sind die normalisierten Amplituden der Exponentialterme.

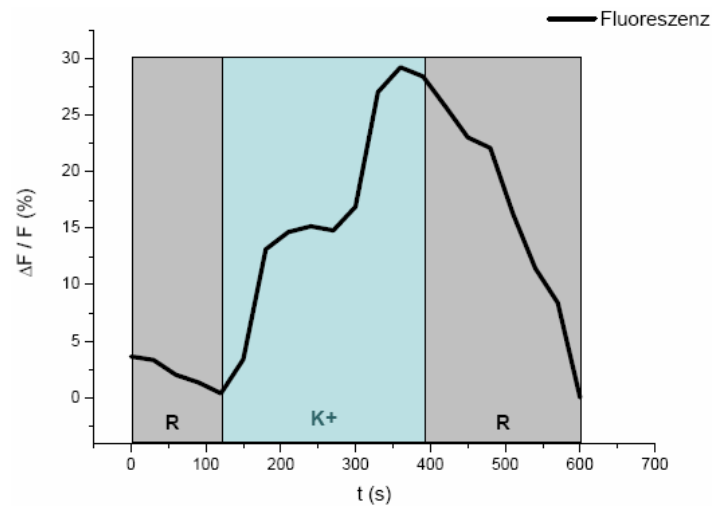
## 3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte. In dem ersten Kapitel (3.1) wird der Zeitverlauf von Kalzium Signalen stimulierter olfaktorischer Rezeptorneuronen (ORN) in vitalen Gewebeschnitten mit dem Kalzium sensitiven Farbstoff Fluo-4 gezeigt. Im zweiten Teil (3.2) wird die Zusammensetzung des heterolog exprimierten olfaktorischen CNG-Kanals untersucht. Thema der letzten beiden Abschnitte ist die Rolle der modulatorischen Untereinheiten CNGA4 und CNGB1b bei der Aktivierung des olfaktorischen CNG-Kanals durch cAMP (3.3) und der Desensibilisierung des olfaktorischen CNG-Kanals durch Kalzium-Calmodulin (3.4).

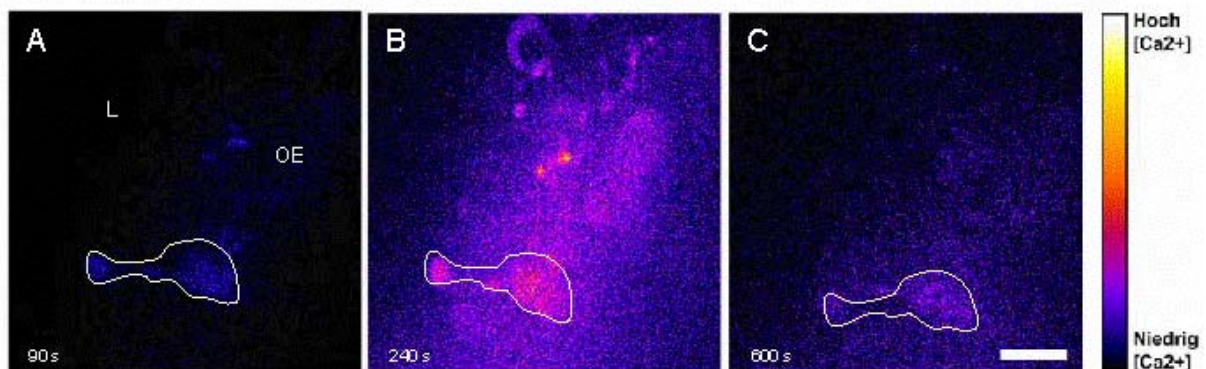
### 3.1 Kalzium Signale stimulierter ORN`s in vitalen Gewebeschnitten

Um  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in vitalen Gewebeschnitten darzustellen, wurden die Zellen mit dem Kalzium-sensitiven Farbstoff Fluo-4 beladen. Der zeitliche Verlauf dieser Kalzium Signale in aktivierten ORNs soll zeigen, ob die Kalzium Signale lang genug sind, um den CNG-Kanal durch Kalzium-Calmodulin zu desensibilisieren. Die elektrische Erregbarkeit, und somit die Vitalität der ORN`s, wurde mit einer erhöhten Kalium-Lösung überprüft, und anschließend wurde die Signaltransduktionskaskade mit Forskolin oder einem Duftstoffgemisch (Henkel 100) stimuliert. Die resultierende Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurde durch den Fluoreszenzverlauf von Fluo-4 an einem konfokalen LSM dargestellt.

Die Perfusion mit einer 30 mM  $\text{K}^+$ -Lösung führt zu einer Verschiebung des elektrochemischen Gleichgewichts der ORNs für  $\text{K}^+$ , und sie depolarisieren. Daraufhin öffnen spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen strömen ins Cytosol. Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann fluoreszenzoptisch detektiert werden. Die Fluoreszenzänderung von Fluo-4 während der Messung ist in Abbildung 3.2 am Beispiel einer Zelle in Falschfarben dargestellt. Der detaillierte Fluoreszenzverlauf eines ORNs (Abb. 3.1) zeigte, dass der Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität nach 240 s mit 29% ihr Maximum erreicht hatte. Der Ausgangswert der



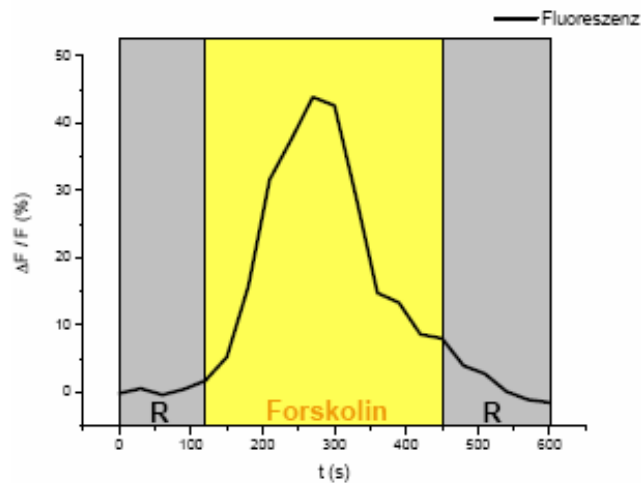
**Abbildung 3.1: Zunahme der Fluoreszenzintensität eines ORN's durch eine erhöhte extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration.** Die Abbildung zeigt den relativen Fluoreszenzverlauf ( $\Delta F/F$ ) eines ORN's bei der Perfusion mit einer 30 mM  $K^+$ -Lösung. Die Fluoreszenzintensität erreicht nach 240 s ihr Maximum bei 29%. R: Ringerperfusion,;  $K^+$ : 30 mM  $K^+$ -Lösung, blau unterlegt.



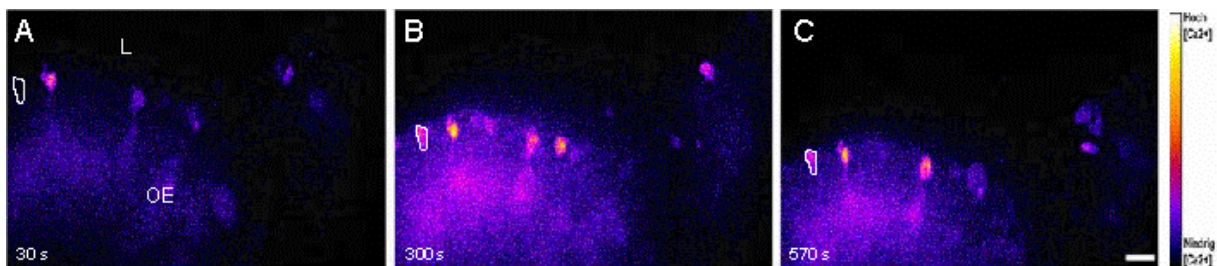
**Abbildung 3.2: Riechzellstimulation mit der extrazellulären 30 mM  $K^+$ -Lösung:** Falschfarbendarstellung eines stimulierten ORN's (ROI, weiß umrandet), dessen Fluoreszenzverlauf in Abbildung 3.1 zu sehen ist. (A) Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist vor der Stimulation niedrig. (B) Während der Stimulation mit 30 mM  $K^+$  steigt die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration und sinkt wieder nach der Stimulation (C). Zeitangaben geben den Moment der Aufnahme an. L: Lumen, OE: olfaktorisches Epithel. Balken: 10  $\mu$ M

Fluoreszenz hat sich nach der Perfusion mit Ringerlösung wieder eingestellt. Die relative Fluoreszenzintensitätsänderung der reagierenden ORNs betrug durchschnittlich 14% ( $n=43$ ). Hiermit konnte die Vitalität der ORNs innerhalb eines Experiments gezeigt werden. Für die weiteren Untersuchungen, wurden nur diejenigen ORNs ausgewertet, die auch auf die Perfusion mit 30 mM  $K^+$ -Lösung mit einem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration reagierten.

Im nächsten Schritt wurde dann die Signaltransduktion der ORNs zum einem mit Forskolin und zum anderem mit einem Duffstoffgemisch stimuliert. Forskolin aktiviert die ACIII und erhöht somit die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Dadurch öffnen sich die CNG-Kanäle



**Abbildung 3.3: Zunahme der Fluoreszenzintensität eines ORNs durch Forskolin.** Die Abbildung zeigt den relativen Fluoreszenzverlauf ( $\Delta F/F$ ) eines ORN's bei der Perfusion mit einer 20  $\mu\text{M}$  Forskolin-Lösung. Die Fluoreszenzintensität erreicht nach 140 s ihr Maximum bei 44%. R: Ringerperfusion, grau unterlegt.

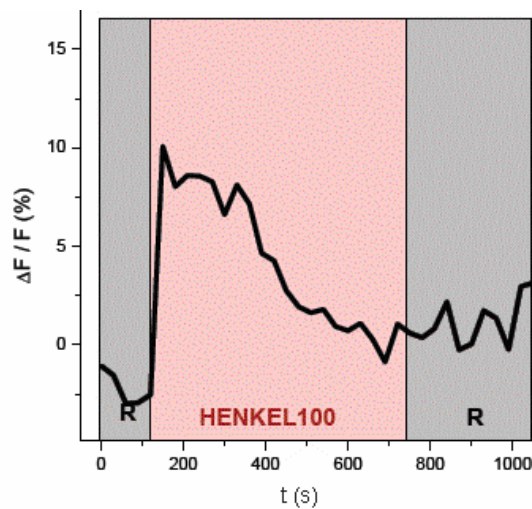


**Abbildung 3.4: Riechzellstimulation mit 20  $\mu\text{M}$  Forskolin:** Falschfarbendarstellung des stimulierten ORNs (ROI, weiß umrandet), dessen Fluoreszenzverlauf in Abbildung 3.3 zu sehen ist. (A) Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist vor der Stimulation niedrig. (B) Während der Stimulation mit 20  $\mu\text{M}$  Forskolin steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und verringert sich nach der Stimulation (C). Zeitangaben geben den Moment der Aufnahme an. L: Lumen, OE: olfaktorisches Epithel. Balken: 10  $\mu\text{M}$

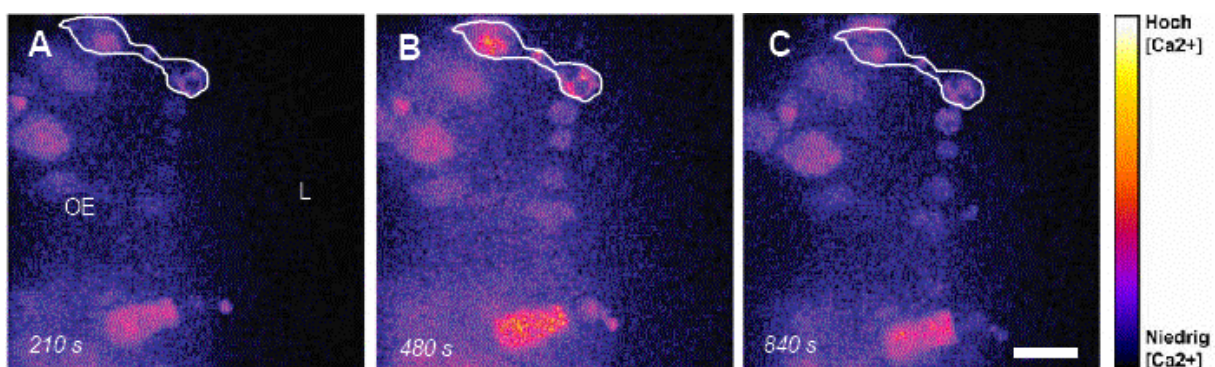
und leiten einen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom. Diese Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird über Fluo-4 fluoreszenzoptisch detektiert. Die Abbildung (3.3) zeigt beispielhaft den Fluoreszenzverlauf eines ORNs, das mit 20  $\mu\text{M}$  Forskolin perfundiert wurde. Abbildung (3.4) zeigt dieselben Zellen innerhalb des Experiments in Falschfarben. Durchschnittlich betrug die Änderung der Fluoreszenzintensität 21% ( $n=80$ ). Der Ausgangswert der Fluoreszenz stellte sich nach der Perfusion mit Ringerlösung wieder ein. Die durchschnittliche Länge des Fluoreszenzsignals betrug 562 Sekunden.

Nach der Aktivierung der ORNs mit einem Duftstoffgemisch (Henkel 100, 1:500 verdünnt) steigt die Fluoreszenzintensität auf 10% an, und kehrt auf den Ausgangswert zurück, nachdem mit Ringerlösung perfundiert wurde (Abbildung. 3.5). Durchschnittlich betrug die Änderung der Fluoreszenzintensität 12%.

In diesem Kapitel wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in ORNs durch die Überprüfung der elektrischen Erregbarkeit und der Aktivierung der Signaltransduktion der ORNs beschrieben. Bei der Überprüfung der elektrischen Erregbarkeit der ORNs (Abb 3.1, 3.2) zeigten 46% der Zellen ( $n=93$ ) eine Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Stimulierung der Signaltransduktion durch Forskolin oder Henkel 100 führte bei 52% der Zellen ( $n=153$ ), bzw. 67% der Zellen ( $n=51$ ) zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Dauer des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signales betrug bei der Stimulation mit Forskolin oder Henkel 100 mindestens 180 Sekunden. Die Dauer des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signales reicht aus um den CNG zu desensibilisieren, da der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin vermittelte Effekt innerhalb weniger Sekunden ( $\leq 5$  s, (Bradley et al., 2001b; Bradley et al., 2004) auftritt. Im folgendem sollte nun die Beteiligung der Untereinheiten (CNGA4,



**Abbildung 3.5: Zunahme der Fluoreszenzintensität eines ORN's durch Henkel 100.** Die Abbildung zeigt den relativen Fluoreszenzverlauf ( $\Delta F/F$ ) eines ORN's bei der Perfusion mit Henkel 100 (1:500). Die Fluoreszenzintensität erreicht nach 30 s ihr Maximum bei 10%. R: Ringerperfusion, grau unterlegt.



**Abbildung 3.6: Riechzellstimulation mit dem Duffstoffgemisch Henkel 100:** Falschfarbendarstellung eines stimulierten ORN's (ROI, weiß umrandet), deren Fluoreszenzverlauf in Abbildung 3.5 zu sehen ist. (A) Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist vor der Stimulation niedrig. (B) Während der Stimulation mit Henkel 100 (1:500) steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und verringert sich nach der Stimulation (C). Zeitangaben geben den Moment der Aufnahme an. L: Lumen, OE: olfaktorisches Epithel. Balken: 10  $\mu\text{M}$

CNGB1b) bei der Aktivierung des CNG-Kanals sowie der Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$  durch die modulatorischen Untereinheiten auf den CNG-Kanal elektrophysiologisch untersucht werden. Die ORNs ließen sich in vitalen Gewebeschnitten nur sehr schlecht mit der Patch-Clamp Technik untersuchen, da die Erfolgsquote ein Giga-Seal zu bekommen gering war. Ein Giga-Seal braucht man, um in einen Modus zu kommen (*Whole-Cell* oder *excised Patch* s. 2.7), in dem Messungen durchgeführt werden können. Deswegen wurden für die weiteren Experimente die drei Untereinheiten CNGA2, CNGA4 und CNGB1b heterolog in HEK293-Zellen exprimiert.

### 3.2 Untersuchungen zur heterologen Expression des A2-A2-A4-B1b Kanals

In diesem Kapitel wird die heterologe Expression des A2-A2-A4-B1b Kanals elektrophysiologisch analysiert. Hierbei ist es nicht sicher, ob eine Zelle, die mit den drei Untereinheiten CNGA2, CNGA4 und CNGB1b transfiziert wurde, diese auch in einer einzigen Quartärstruktur zusammensetzt. Neben der gewollten Zusammensetzung A2-A2-A4-B1b führen auch A2-A2-A2-A4, A2-A2-A2-B1b und A2-A2-A2-A2 zu funktionellen Kanälen. Es soll nun im folgendem geklärt werden, ob die heterolog

	Native	A2-A2-A4-B1b	A2-A2-A2-B1b	A2-A2-A2-A2
$K_{1/2}$ [ $\mu\text{M}$ ]	3,4	4,0	28	40
Hill Koeffizient	2,3	2,0	1,9	2,5

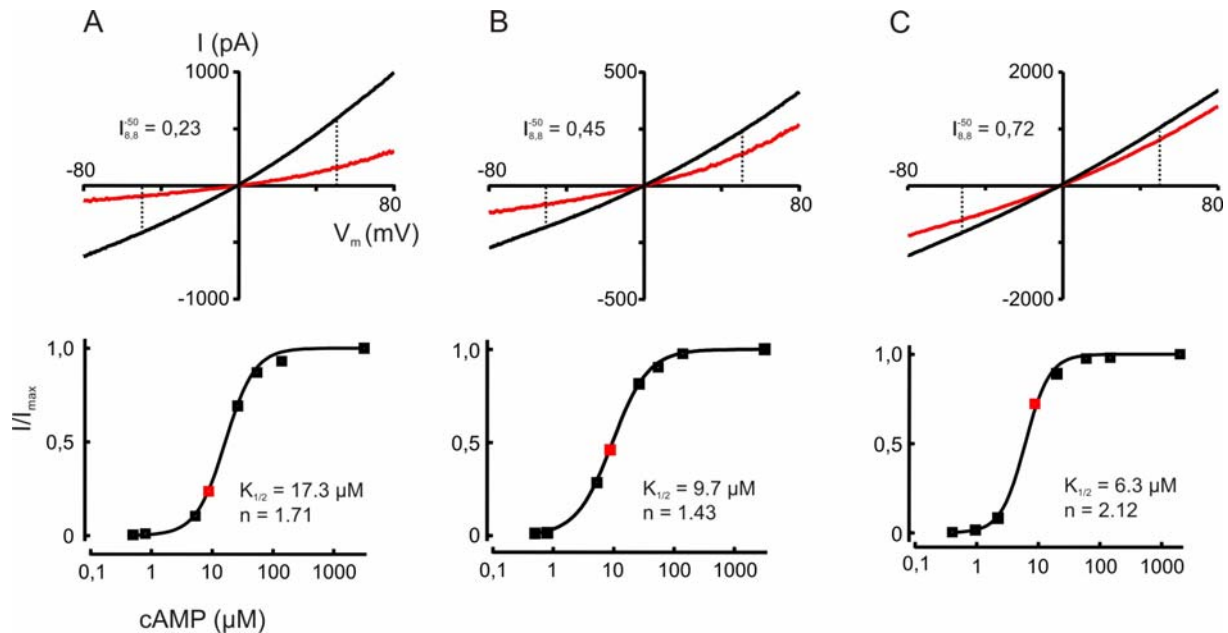
**Tabelle 3.1: Einzelkanalparameter von olfaktorischen CNG-Kanälen.** Die Tabelle zeigt die  $K_{1/2}$ -Werte bei einer Spannung von +50 mV. Geändert nach Bönigk et al. (1999).

koexprimierten Kanäle nur zu einer spezifischen Population von A2-A2-A4-B1b-Kanälen führen. Dafür wurden HEK 293-Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche die drei Untereinheiten (CNGA2, CNGA4 und CNGB1b) des A2-A2-A4-B1b Kanals kodieren. In *inside-Out Patches* von transfizierten Zellen habe ich die Ligandensensitivität der exprimierten Kanäle für cAMP bestimmt, da diese spezifisch für verschiedenen Untereinheitenzusammensetzungen ist (Tab. 3.1; (Bonigk et al., 1999)). Die Dosis-



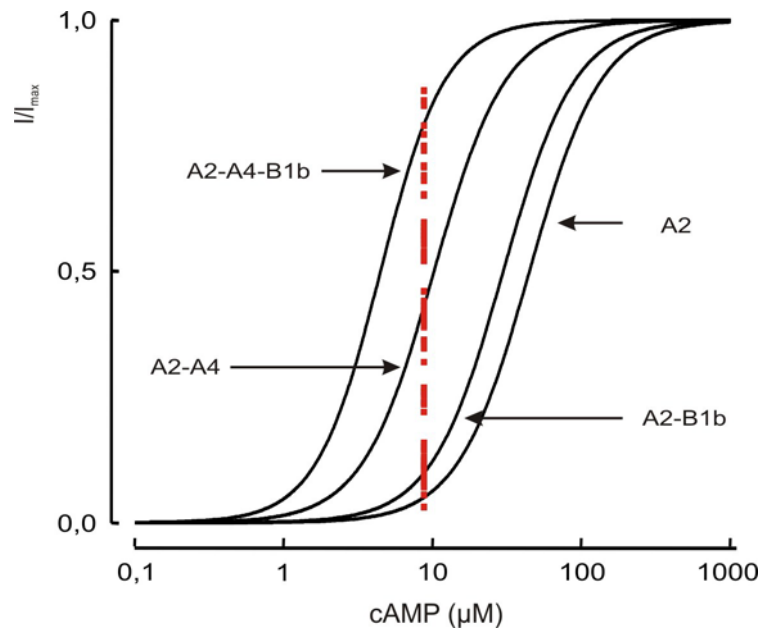
Wirkungsbeziehung der Aktivierung durch cAMP wurde mit der Hill-Gleichung  $I/I_{\max} = c^n / [c^n + K_{1/2}^n]$  berechnet (Hill, 1913; Weiss, 1997). Dabei ist  $K_{1/2}$  die Aktivierungskonstante,  $c$  die Ligandenkonzentration und  $n$  der Hill-Koeffizient.

Die Strom-Spannungs-Kennlinien (I/V-Kurven) von drei transfizierten Zellen für 8,8  $\mu\text{M}$



**Abbildung 3.7: Heterolog exprimierte heteromere olfaktorische CNG-Kanäle ergeben keine spezifische Kanalpopulation.** (A-C) Gezeigt sind die I/V-Kurven nach Aktivierung mit 8,8  $\mu\text{M}$  (rot) und saturierenden 2mM cAMP (schwarz) exzidiierter *Inside-Out Patches*, und die zu den *Patches* die gehörenden Dosis-Wirkungsbeziehungen (untere Zeile). (A)  $I_{8,8}^{-50} = 0,23$  mit den  $K_{1/2}$ -Werten und Hill Koeffizienten bei  $-50\text{mV}$  sind  $17,3\mu\text{M}$  und  $1,71$  (B)  $I_{8,8}^{-50} = 0,45$  mit den  $K_{1/2}$ -Werten und Hill Koeffizienten bei  $-50\text{mV}$  sind  $9,7\mu\text{M}$  und  $1,43$  (C)  $I_{8,8}^{-50} = 0,72$  mit den  $K_{1/2}$ -Werten und Hill Koeffizienten bei  $-50\text{mV}$  sind  $6,3\mu\text{M}$  und  $2,12$ .

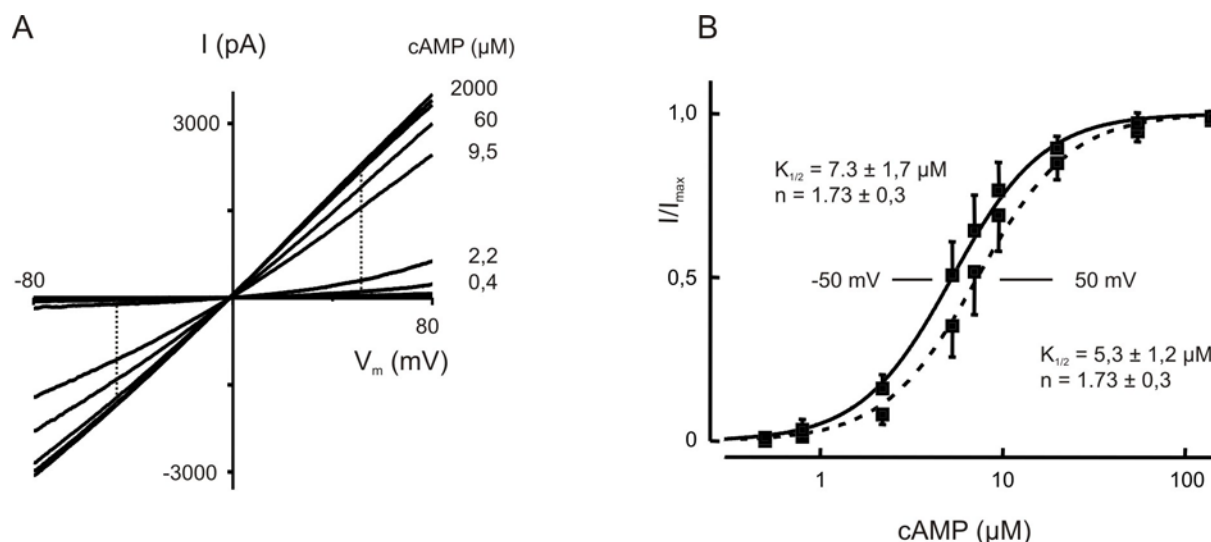
cAMP und 2 mM cAMP (saturierend) sind in der Abbildung 3.7 (A-C) zu sehen. Auffällig hierbei ist, dass die anteiligen Ströme,  $I_{(8,8\mu\text{M})}/I_{(2\text{mM})} = I/I_{\max}$  bei einer Spannung von  $-50\text{mV}$  sich mit  $I_{8,8}^{-50} = 0,23, 0,45$  und  $0,72$  deutlich voneinander unterscheiden. Ebenso unterschiedlich sind die dazugehörigen Dosis-Wirkungsbeziehungen für cAMP mit den  $K_{1/2}$ -Werten und den Hill-Koeffizienten von  $17,3\mu\text{M}$  und  $1,71$  (Abbildung 3.7 A unten),  $9,7\mu\text{M}$  und  $1,43$  (Abb. 3.7 B unten) sowie  $6,3\mu\text{M}$  und  $2,12$  (Abbildung 3.7 C unten). Diese  $K_{1/2}$ -Werte weichen von den spezifischen  $K_{1/2}$ -Werten aus Einzelkanalmessungen ab, und deuten auf eine uneinheitliche Kanalpopulation innerhalb des *Patches* hin. Die Abbildung 3.8 zeigt die anteiligen Ströme ( $I_{8,8}^{-50}$ ) von 66 transfizierten Zellen. Die gemessenen Werte für  $I/I_{\max}$  verteilen sich über die komplette Spanne der Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen dem homomeren A2-Kanal und dem heteromeren A2-A2-A4-B1b Kanal. Theoretische Berechnungen (s. 2.7.3) zu möglichen Kanalzusammensetzungen ergaben, dass *Patches*, die



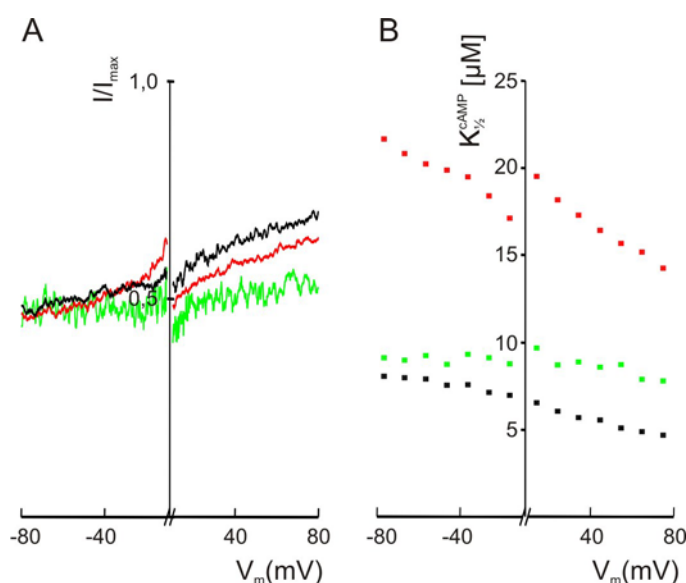
**Abbildung 3.8: Heterolog exprimierte heteromere A2-A2-A4-B1b Kanäle ergeben gemischte Kanalpopulationen.** Normalisierte Stromantworten von 66 verschiedenen *Inside-Out Patches* ( $\square$ ) verteilen über die komplette Spanne der A2; A2-A4; A2-B1b und A2-A4-B1b Dosis-Wirkungsbeziehungen. Diese Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden mit den Daten von Einzelkanalmessungen berechnet (Bonigk et al., 1999). Die HEK293-Zellen wurden entweder mit  $Ca^{2+}$ -Phosphat, TransFektin oder Amaxa transfiziert. Die Stromantworten wurden mit 8,8  $\mu M$  cAMP ausgelöst, auf 2 mM cAMP normiert und bei -50 mV aufgenommen.

einen anteiligen Strom von  $I_{8,8}^{-50} \geq 0,63$  hatten, 10-30mal mehr A2-A2-A4-B1b Kanäle besaßen als die anderen Kanalzusammensetzungen. Die Dosis-Wirkungsbeziehung von *Patches* mit  $I_{8,8}^{-50} \geq 0,63$  hatten mittlere  $K_{1/2}$ -Werte bei -50 mV von  $K_{1/2}^{-50} = 7.3 \pm 1.7 \mu M$  cAMP sowie  $K_{1/2}^{+50} = 5.3 \pm 1.2 \mu M$  cAMP bei 50 mV (7 *Patches*, Abb. 3.9 B). Dieser Untersuchung zeigt, dass der Wert von  $I_{8,8}^{-50}$  als ein Ausschlußkriterium zur Identifizierung von A2-A2-A4-B1b-Kanälen herangezogen werden kann.

Eine weitere Beobachtung der *I/V*-Kurven von *Patches*, die A2-A2-A4-B1b Kanäle besaßen, war, dass sie auswärts rektifizierten (Abb. 3.10 A). Die Kanäle ließen sich bei positiven Spannungen effizienter mit cAMP aktivieren. Daraus folgt, dass es eine Spannungsabhängigkeit der  $K_{1/2}$ -Werte gibt (Abb. 3.10 B). Auch in Experimenten mit Zellen, die mit CNGA2 und CNGB1b transfiziert wurden, konnte eine leichte Spannungsabhängigkeit der  $K_{1/2}$ -Werte gezeigt werden. Dagegen trat diese bei Zellen, die mit CNGA2 und CNGA4 transfiziert wurden, nicht auf. Das Verhältnis von  $K_{1/2}^{-50}/K_{1/2}^{+50}$  der A2-A2-A4-B1b Kanäle war  $1,38 \pm 0,1$  (Abb. 3.11;  $n=7$ ). Die Verhältnisse  $K_{1/2}^{-50}/K_{1/2}^{+50}$  von A2-A2-A2-B1b mit  $1,18 \pm 0,1$  ( $n=4$ ) und A2-A2-A2-A4 mit  $1,01 \pm 0,1$  ( $n=4$ ) waren



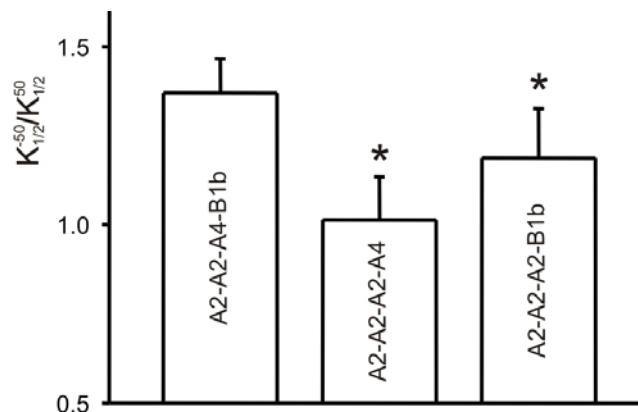
**Abbildung 3.9: Strom-Spannungs-Kennlinien und Dosis-Wirkungs-Kurven von A2-A2-A4-B1b-Kanälen.** (A) Eine beispielhafte I/V-Kurve bei den angegebenen cAMP-Konzentrationen. (B) Dosis-Wirkungs-Kurven von A2-A2-A4-B1b-Kanälen ( $n=7$ ) mit den  $K_{1/2}$ -Werten für cAMP und Hill Koeffizienten bei -50mV von  $7.3 \pm 1.7 \mu\text{M}$  und  $1.71 \pm 0.3$  (durchgezogene Linie); und bei 50 mV von  $5.3 \pm 1.2 \mu\text{M}$  und  $1.73 \pm 0.3$  (gestrichelte Linie).



**Abbildung 3.10: Rektifizierung und Spannungsabhängigkeit der  $K_{1/2}$ -Werte von CNG-Kanälen.** (A) Dargestellt sind normierte I/V-Kurven. Ausgelöst wurden die Ströme der verschiedenen CNG-Kanäle mit einer halb maximal aktivierten cAMP-Konzentration: A2-A2-A4-B1b in schwarz bei  $7 \mu\text{M}$ , A2-A2-A2-A4 in grün bei  $9.1 \mu\text{M}$ , A2-A2-A2-B1b in rot bei  $19.1 \mu\text{M}$  cAMP. (B) Gezeigt sind die  $K_{1/2}$ -Werte von A2-A2-A4-B1b (schwarz), A2-A2-A2-A4 (grün) und A2-A2-A2-B1b (rot) bei verschiedenen Spannungen.

signifikant verschieden zu den A2-A2-A4-B1b Kanälen ( $p < 0.05$  für A2-B1b;  $p < 0.001$  für A2-A2-A2-A4; Abb. 3.11). Somit ist die Spannungsabhängigkeit der  $K_{1/2}$ -Werte ein zweites Ausschlußkriterium zur Identifizierung von A2-A2-A4-B1b Kanälen.

Um eine bessere Transfektionsmethode zu finden, habe ich drei verschiedene Transfektionsmethoden getestet. Die HEK293-Zellen wurden mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Phosphat, TransFektin



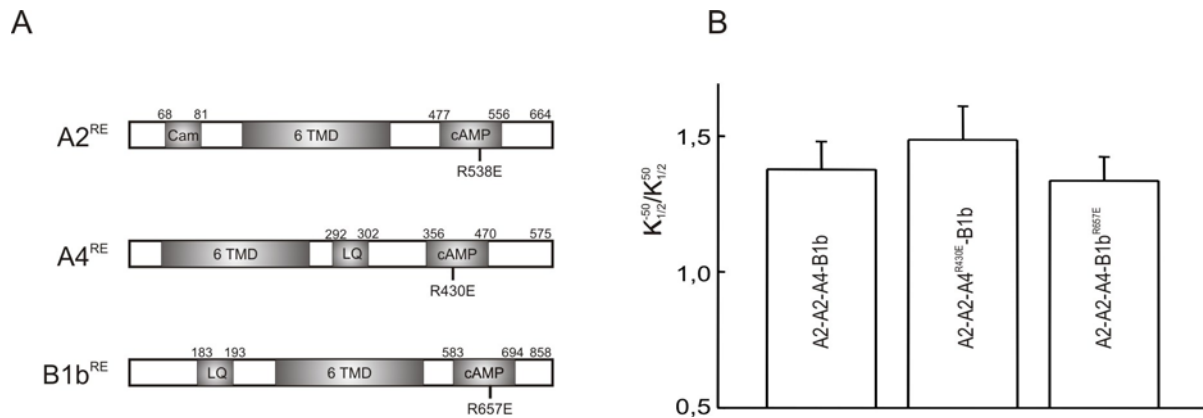
**Abbildung 3.11: Spannungsabhängigkeit der  $K_{1/2}$ -Werte von CNG-Kanälen.** (B) Dargestellt sind die Verhältnisse  $K_{1/2}^{-50} / K_{1/2}^{+50}$  von A2-A2-A4-B1b mit  $1,38 \pm 0,1$ , A2-A2-A2-A4 mit  $1,01 \pm 0,1$  und A2-A2-A2-B1b mit  $1,18 \pm 0,1$ . Die Verhältnisse von A2-A2-A2-A4 und A2-A2-A2-B1b waren signifikant verschieden zu dem Verhältnis von A2-A2-A4-B1b.

oder Amaxa transfiziert. Die Abbildung 3.8 zeigt die Messungen der unterschiedlich transfizierten Zellen. Keine der Transfektionsmethoden führte zu einer einheitlichen Kanalpopulation. Damit ist ein Einfluß der Transfektionsmethode auf die Expression der CNG-Kanäle ausgeschlossen.

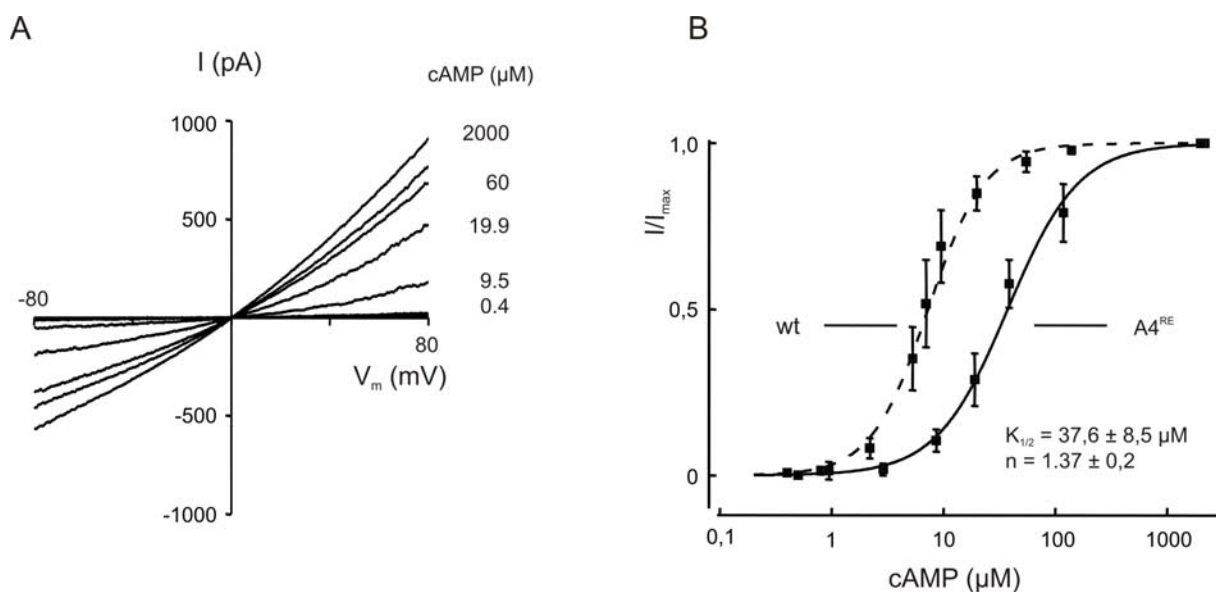
In diesem Kapitel wurde beschrieben, dass HEK293-Zellen, die mit den drei Untereinheiten des olfaktorischen CNG-Kanals transfiziert wurden, nicht zu einer spezifischen Population von Kanälen geführt haben. Es entstanden Mischungen verschiedener Kanalpopulationen. Da ich allerdings zwei Kriterien zur Identifizierung des A2-A2-A4-B1b Kanals gefunden habe, konnte ich weiterführende Untersuchungen zur Aktivierung und Desensibilisierung durchführen. Zum einem konnten die A2-A2-A4-B1b Kanäle an Hand seiner Sensivität zu cAMP identifiziert werden. Dieses Kriterium wurde zur Identifizierung des A2-A2-A4-B1b Kanals bei den Mutagenesestudien zur Desensibilisierung benutzt (s. 3.4). Zum anderem konnte die A2-A2-A4-B1b Kanäle mit Hilfe der Spannungsabhängigkeit der  $K_{1/2}$ -Werte identifiziert werden. Das Kriterium kam bei dem Experiment zur Aktivierung zum Einsatz, bei der die cAMP-Sensivität des A2-A2-A4-B1b Kanals durch Mutation verändert wurde (s. 3.3).

### 3.3 Untersuchungen der Rolle von CNGA4 und CNGB1b bei der Aktivierung des A2-A2-A4-B1b Kanals durch cAMP

Die Rolle von CNGA4 und CNGB1b in dem heteromeren A2-A2-A4-B1b-Kanal bei der Aktivierung durch cAMP ist bis jetzt nur teilweise verstanden. Biskup und Kollegen (2007) konnte, durch den Vergleich von der Bindung des Liganden und der Aktivierung des homomeren A2-Kanals, ein Modell (C4L) aufstellen, dass der A2-Kanal durch eine sequentielle Bindung von vier cAMP Molekülen geöffnet wird. Die Bindungs- und Öffnungsereignisse in diesem C4L-Modell sind asymmetrisch. Die Bindung des ersten cAMP führt zu einer schwachen Aktivierung des Kanals. Die Bindung des zweiten cAMP ist kritisch für die Aktivierung, da zum einen die Gleichgewichtsassoziationskonstante drei Größenordnungen kleiner ist als die der anderen Bindungsereignisse; das heißt diese Bindung ist nicht stabil. Und zum anderen wird die Öffnungswahrscheinlichkeit fast eins. Somit ist der zweite Bindungsschritt wie ein Schalter: der Kanal ist fast immer geöffnet, wobei der Zustand nicht stabil ist. Erst die dritte und vierte Bindung von cAMP stabilisiert den Kanal in dem geöffneten Zustand. Das C4L-Modell kann auf den heteromeren A2-A2-A4-B1b Kanal übertragen werden, da es so aussieht, als ob der homomere A2 Kanal und der heteromere A2-A2-A4-B1b Kanal in derselben Art und Weise gesteuert wird (Nache et al., 2005). Um die Rolle der Untereinheiten an der Aktivierung der A2-A2-A4-B1b Kanäle durch cAMP zu untersuchen, wurden die cAMP-Bindestellen der Untereinheiten durch eine Punktmutation funktionell ausgeschaltet. Die cytoplasmatischen cAMP-Bindestellen der drei Untereinheiten sind strukturell ähnlich. Sie besitzen alle ein konserviertes Arginin, das mit dem cyclischen Phosphat von cAMP eine elektrostatische Bindung eingeht. Tibbs et al. (1998) mutierten das dementsprechende Arginin in dem A1-Kanal zu einem Glutamat, und die Ligandensensitivität des A1<sup>R559E</sup>-Kanals sank um den Faktor 1000. Diesen Aminosäureaustausch habe ich benutzt, um selektiv die cAMP-Bindung an jeder Untereinheit zu unterbinden. Als Marker für die Expressionseffizienz setzte ich das Fusionsprotein A2-YFP ein, und es wurden nur *Patches* von Zellen ähnlicher Fluoreszenzintensität gemessen, um sicherzustellen, dass die untersuchten Zellen ungefähr die gleichen Proteinmengen hergestellt hatten. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden, die für die Wildtyp- und Mutanten-Untereinheiten kodieren, transfiziert. Die Kanalzusammensetzung wurde durch die Spannungsabhängigkeit der cAMP-Sensitivität ( $K_{1/2}^{-50}/K_{1/2}^{+50}$ ) überprüft. Die Verhältnisse  $K_{1/2}^{-50}/K_{1/2}^{+50}$  der verwendeten Messungen waren  $1,50 \pm 0,2$  (n = 5) für A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b und  $1,33 \pm 0,1$  (n = 5) für

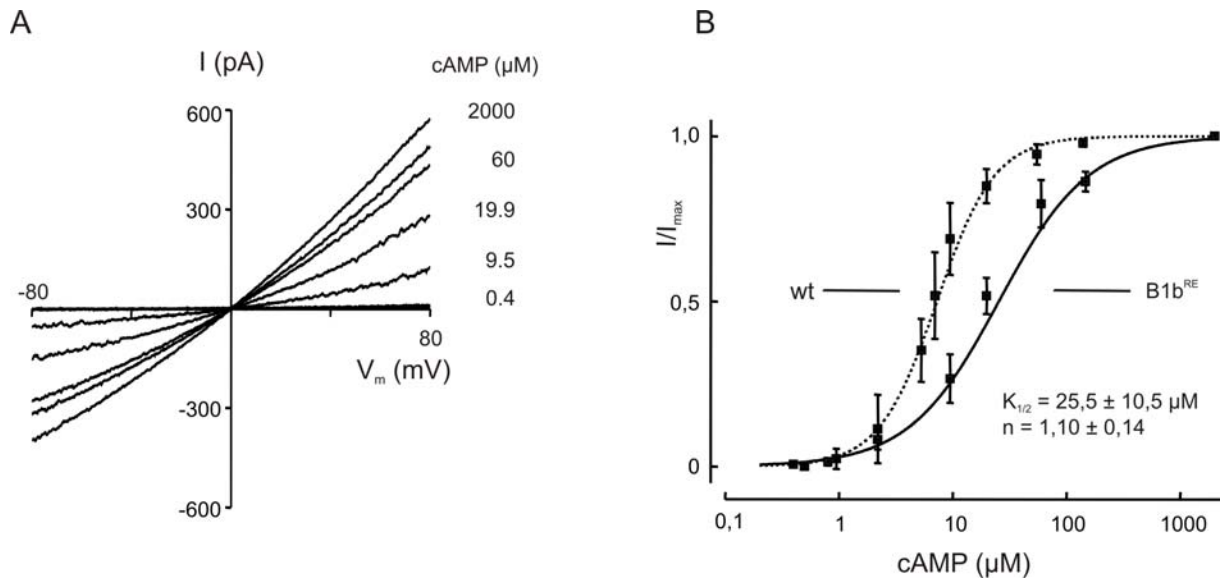


**Abbildung 3.12: Spannungsabhängigkeit der  $K_{1/2}$ -Werte von CNG-Kanal-Mutanten.** (A) Schematische Darstellung der Punktmutationen der cAMP Bindestellen bei den CNG-Untereinheiten. Grau unterlegt sind Transmembrandomänen (6 TMD), die cAMP-Bindestelle (cAMP) und die Calmodulinbindestellen (CaM, LQ). (B) Dargestellt sind die Verhältnisse  $K_{1/2}^{-50} / K_{1/2}^{+50}$  von A2-A2-A4-B1b mit  $1,38 \pm 0,1$ , A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b mit  $1,50 \pm 0,2$  und A2-A2-A4-B1b<sup>R657E</sup> mit  $1,33 \pm 0,1$ .

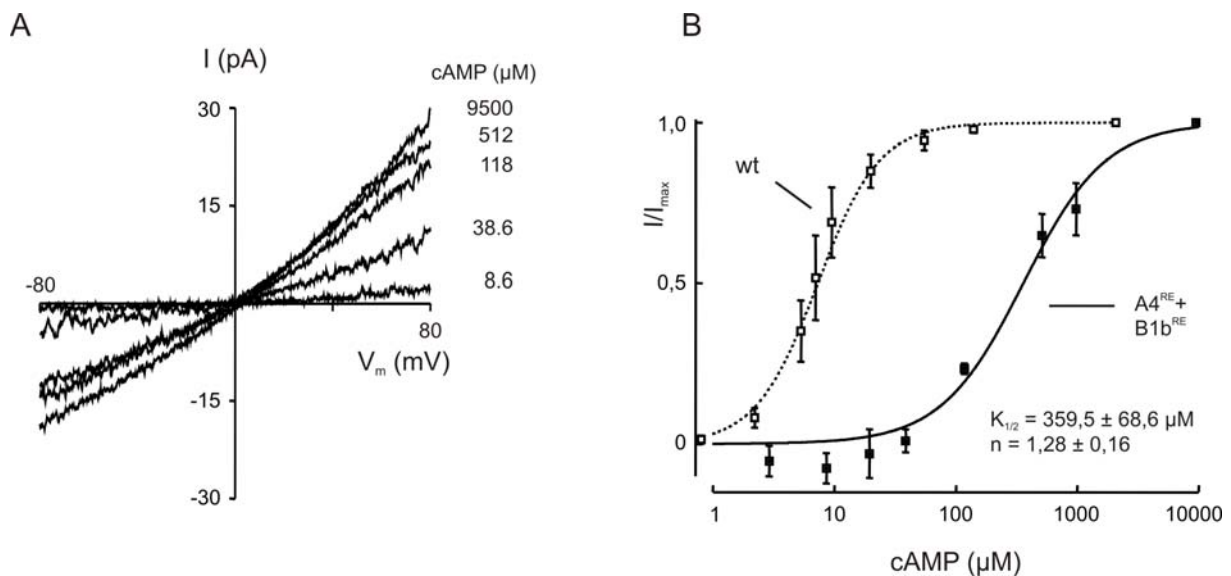


**Abbildung 3.13: Strom-Spannungs-Kennlinien und Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b-Kanälen.** (A) Eine beispielhafte I/V-Analyse bei den angegebenen cAMP-Konzentrationen. (B) Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b-Kanälen ( $n=5$ ) mit den  $K_{1/2}$ -Werten für cAMP und Hill Koeffizienten bei  $-50\text{mV}$  von  $37,6 \pm 8,5 \mu\text{M}$  und  $1,37 \pm 0,2$ , sowie bei  $50 \text{mV}$  von  $25,6 \pm 7,3 \mu\text{M}$  und  $1,51 \pm 0,1$ . Zum Vergleich ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4-B1b-Kanälen (gestrichelte Linie) gezeigt.

A2-A2-A4-B1b<sup>R657E</sup> (Abb. 3.12). Die Verhältnisse der CNG-Kanäle waren nicht signifikant verschieden. Den Effekt der Mutation der A4 Untereinheit (CNGA4<sup>R430E</sup>) zeigt die Abbildung 3.13. Der  $K_{1/2}$ -Wert für cAMP von A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b steigt von  $7,3 \pm 1,7 \mu\text{M}$  bei  $-50 \text{mV}$  auf  $37,6 \pm 8,5 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ). Der Hill-Koeffizient, der ein Maß



**Abbildung 3.14: Strom-Spannungs-Kennlinien und Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4-B1b<sup>R657E</sup>-Kanälen.** (A) Eine beispielhafte I/V-Analyse bei den angegebenen cAMP-Konzentrationen. (B) Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4-B1b<sup>R657E</sup>-Kanälen (n=5) mit den K<sub>1/2</sub>-Werten für cAMP und Hill Koeffizienten bei -50mV von 25,5 ± 10,5 µM und 1,10 ± 0,14, sowie bei 50 mV von 19,1 ± 7,8 µM und 1,15 ± 0,08. Zum Vergleich ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4-B1b-Kanälen (gestrichelte Linie) gezeigt.

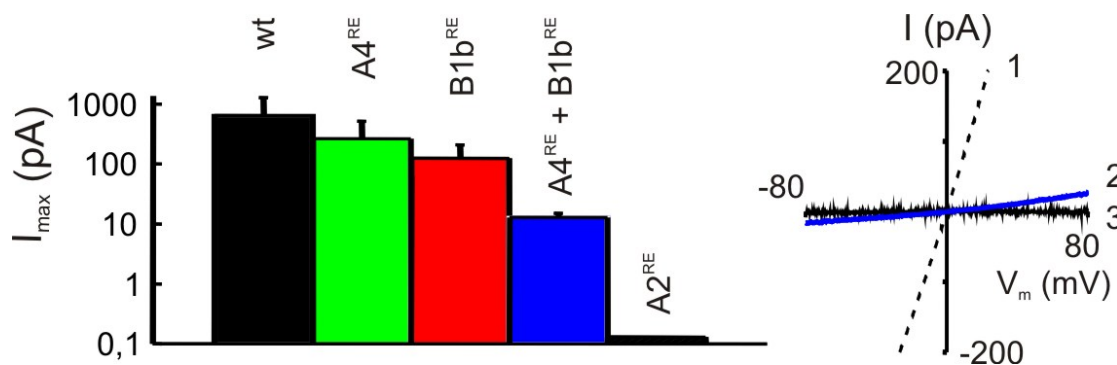


**Abbildung 3.15: Strom-Spannungs-Kennlinien und Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup>-Kanälen.** (A) Eine beispielhafte I/V-Analyse bei den angegebenen cAMP-Konzentrationen. (B) Dosis-Wirkungs-Kurven von A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup>-Kanälen (n=3 von 12) mit den K<sub>1/2</sub>-Werten für cAMP und Hill Koeffizienten bei -50mV von 359,5 ± 68,5 µM und 1,28 ± 0,16, sowie bei 50 mV von 327 ± 172,5 µM und 1,14 ± 0,07. Zum Vergleich ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4-B1b-Kanälen (gestrichelte Linie) gezeigt.

für die Kooperativität des zugrunde liegenden Aktivierungs-Mechanismus ist, fiel von  $1,71 \pm 0,3$  bei -50 mV auf  $1,37 \pm 0,2$ . Der durchschnittliche maximale Strom der gemessenen Patches betrug  $263,9 \pm 251,9$  pA. Ein ähnlicher Effekt war für die mutierte B1b Untereinheit



(CNGB1b<sup>R657E</sup>) zu beobachten (Abb. 3.14). Der  $K_{1/2}$ -Wert für cAMP von A2-A2-A4-B1b<sup>R657E</sup> stieg von  $7,3 \pm 1,7 \mu\text{M}$  bei  $-50 \text{ mV}$  auf  $25,5 \pm 10,5 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ , Abb. 3.15). Der Hill-Koeffizient fiel von  $1,71 \pm 0,3$  bei  $-50 \text{ mV}$  auf  $1,10 \pm 0,14$ . Der durchschnittliche maximale Strom der gemessenen Patches betrug  $124,8 \pm 83,4 \text{ pA}$ . Wurden CNGA4 und CNGB1b mutiert, verringerte sich die Ligandensensitivität für cAMP von A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup> weit mehr als mit nur einer mutierten Untereinheit. Der mittlere  $K_{1/2}$ -Wert bei  $-50 \text{ mV}$  betrug  $359,5 \pm 68,5 \mu\text{M}$  und der mittlere Hill-Koeffizient war  $1,28 \pm 0,2$ . Allerdings ließ sich in nur 3 von 12 transfizierten Zellen ein Strom messen. Ebenso war der durchschnittliche maximale Strom mit  $12,8 \pm 2,2 \text{ pA}$  um etwa den Faktor 50 kleiner als bei den anderen Kanälen (Abb. 3.16). Waren die beiden cAMP-Bindestellen der A2-Untereinheiten mutiert (A2<sup>R539E</sup>-A2<sup>R539E</sup>-A4-B1b), konnten bei cAMP-Konzentrationen bis  $10 \text{ mM}$  keine cAMP induzierten Ströme von transfizierten Zellen gemessen werden ( $n = 13$ ). Die reduzierten Stromamplituden von A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup> und A2<sup>R539E</sup>-A2<sup>R539E</sup>-A4-B1b waren nicht mit einem verringerten Expressionsniveau zu erklären, da alle gemessenen Zellen eine ähnlich



**Abbildung 3.16: Mittlere maximale Stromamplitude in Patches mit Kanalmutanten.** Dargestellt sind die mittleren maximalen Stromamplituden von A2-A2-A4-B1b (schwarz):  $643,2 \pm 642,1 \text{ pA}$ ; A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b (rot):  $263,9 \pm 251,9 \text{ pA}$ ; A2-A2-A4-B1b<sup>R657E</sup> (grün):  $124,8 \pm 83,4 \text{ pA}$ ; A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup> (blau):  $12,8 \pm 2,2 \text{ pA}$  und keine Stromamplitude für A2<sup>R539E</sup>-A2<sup>R539E</sup>-A4-B1b. Gemessen wurde bei  $-50 \text{ mV}$ . Die I/V Kurven verdeutlichen die Reduzierung des Stroms der A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup> Kanäle (2, blau) und die Abwesenheit eines messbaren Stroms von A2<sup>R539E</sup>-A2<sup>R539E</sup>-A4-B1b Kanälen (3, schwarz) verglichen mit den Wildtyp Kanälen (1, gestrichelte Linie)

starke Fluoreszenz des Fusionsprotein CNGA2-YFP zeigten.

In diesem Kapitel wurde beschrieben, dass die Mutation einer cAMP-Bindestelle von CNGA4 und CNGB1b die maximale Stromamplitude kaum reduzierte, wohingegen die Mutation beider cAMP-Bindestellen die maximale Stromamplitude um den Faktor 50 verringerte. Dies bedeutet, dass der A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup>-Kanal zwar noch funktionell ist, aber eine sehr geringe Öffnungswahrscheinlichkeit hat. Wurde allerdings die cAMP-Bindestelle von



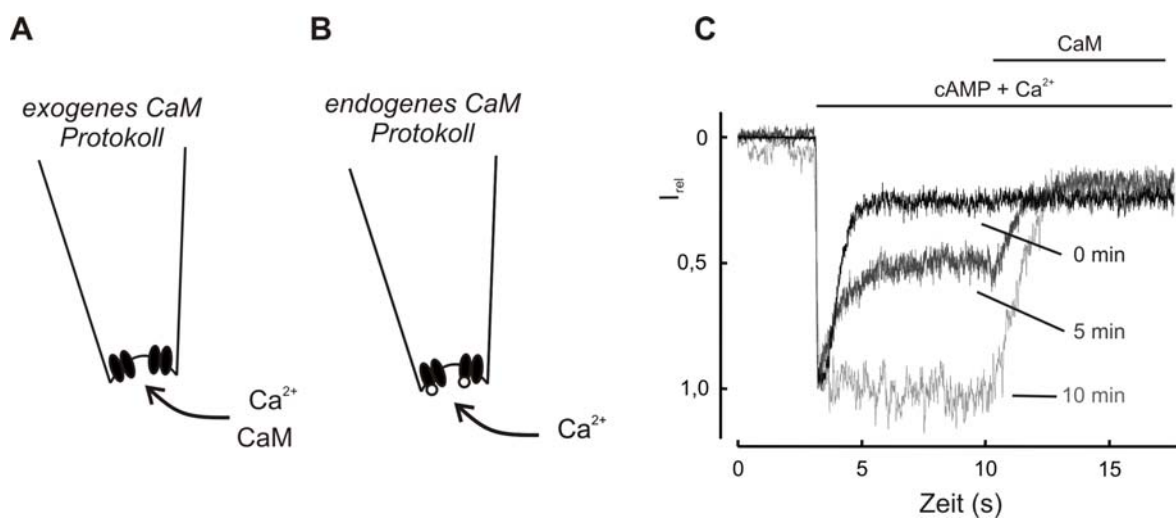
CNGA2 mutiert, A2<sup>R539E</sup>-A2<sup>R539E</sup>-A4-B1b, entstanden keine funktionellen Kanäle. Daraus folgt, dass der A2-A2-A4-B1b Kanal mindestens beide A2- cAMP-Bindestellen braucht um überhaupt aktiviert werden zu können. Die Bindung eines dritten cAMP an CNGA4 oder CNGB1b erhöht wesentlich die Aktivierungseffizienz des Kanals. Und die Bindung des vierten cAMPs bringt die cAMP-Sensivität des Kanals auf ein physiologisches Niveau.

### 3.4 Untersuchungen der Rolle von CNGA4 und CNGB1b bei der Desensibilisierung des A2-A4-B1b-Kanals durch Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin

Neben der Erzeugung eines Ca<sup>2+</sup>-Signals durch aktivierte CNG-Kanäle ist die negative Rückkopplungshemmung durch dasselbe Ca<sup>2+</sup>-Signal eine wichtige Funktion der CNG-Kanäle. Diese Hemmung wird durch Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin vermittelt und führt zu einer Verminderung der cAMP-Sensivität der CNG-Kanäle (Desensibilisierung). Das heißt, dass bei gleich bleibender cAMP-Konzentration weniger CNG-Kanäle öffnen und somit insgesamt einen geringeren Strom leiten. In der Regulation des A2-A2-A4-B1b-Kanals durch Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin gibt es bei den veröffentlichten Daten noch Widersprüche. CNGA4 und CNGB1b haben je eine IQ-Typ Calmodulin-Bindestelle (Weitz et al., 1998; Bradley et al., 2004). Munger und Kollegen (2001) stellten die Hypothese auf, dass der A2-A2-A4-B1b-Kanal im Gleichgewichtszustand nach der Assoziation von exogenem Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin an den Kanal die CNGA4-Untereinheit nicht braucht, um zu desensibilisieren. Dagegen zeigten Bradley und Kollegen (2004), dass zum einem beide IQ-Typ Calmodulin-Bindestellen von CNGA4 und CNGB1b für die schnelle Desensibilisierung des A2-A2-A4-B1b-Kanals durch exogenes Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin benötigt wurden, und zum anderem, dass Calmodulin an den A2-A2-A4-B1b-Kanal präassoziiert ist.

In diesem Kapitel untersuche ich die Frage, ob die Beteiligung der einzelnen IQ-Typ Calmodulin-Bindestelle von CNGB1b ausreicht den CNG-Kanal zu desensibilisieren. Bradley und Munger untersuchten die Regulation der CNG-Kanäle durch Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin mittels der Perfusion von exogenem Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin zu exzidierten Inside-Out Patches, nachdem der endogene Ca<sup>2+</sup>-Sensor (wahrscheinlich Calmodulin) mit Hilfe von EGTA entfernt wurde (*exogenes Calmodulin Protokoll*). Bei dem *endogenen Calmodulin-Protokoll* dagegen wird die Desensibilisierung der CNG-Kanäle durch das zelleigene endogene Calmodulin vermittelt, und in Experimenten durch Perfusion mit Ca<sup>2+</sup> ausgelöst. Ich habe untersucht, ob

es einen Unterschied zwischen diesen beiden Protokollen gab. Dafür habe ich den zeitlichen Verlauf der Desensibilisierung der CNG-Kanäle (A2-A2-A4-B1b, A2-A2-A2-A4 und A2-A2-A2-B1b) durch das *exogene Calmodulin-Protokoll* mit dem zeitlichen Verlauf der Desensibilisierung bei der Verwendung des *endogenem Calmodulin-Protokolls* verglichen. Anschließend habe ich die Beteiligung jeder der beiden LQ-Typ Calmodulin-Bindestellen an der Desensibilisierung des A2-A2-A4-B1b-Kanals untersucht. Dafür wurde jeweils eine der IQ-Typ Calmodulin-Bindestellen der Untereinheiten (CNGB1b) durch einen



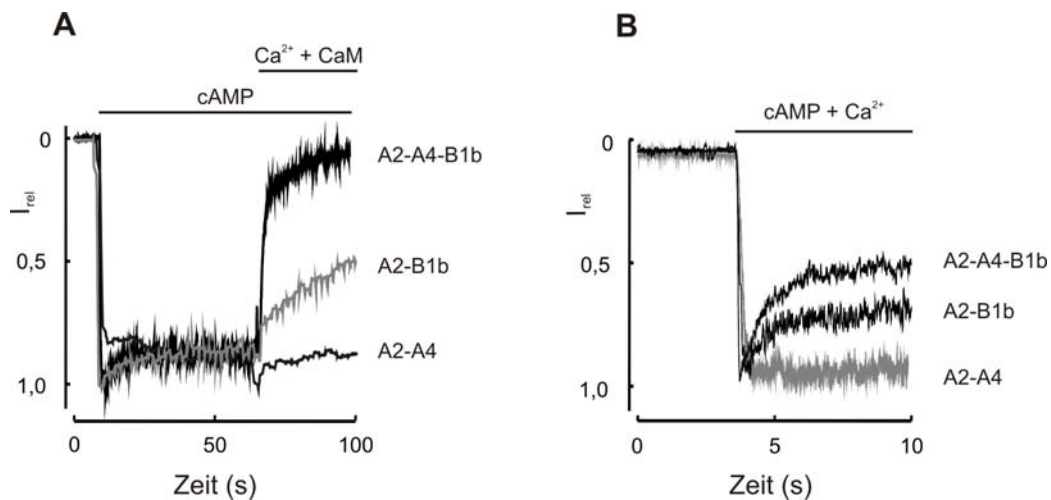
**Abbildung 3.17: Unterschiedliche Ausgangsbedingungen des exogenen Calmodulin Protokolls und des endogenen Calmodulin Protokolls.** (A) *Exogenes Calmodulin Protokoll*: Hier gezeigt ist eine schematische Darstellung eines excidierten *Inside-out Patches* mit CNG Kanälen, der für 10 min mit 10 mM EGTA gewaschen wurde. Aktivierte CNG-Kanäle wurden durch die Perfusion mit  $Ca^{2+}$  und Calmodulin desensibilisiert. Bei dem *endogenen Calmodulin Protokoll* (B) wurde der *Patch* mit CNG-Kanälen nicht gewaschen und die Kanäle behielten ihr endogenes Calmodulin. Für die Desensibilisierung aktivierter CNG-Kanäle reichte die Perfusion mit  $Ca^{2+}$  aus. In (C) ist eine Stromregistrierung von A2-A2-A4-B1b Kanälen gezeigt, die durch das Waschen mit 10 mM EGTA allmählich ihr endogenes Calmodulin verlieren. Sofort nach dem Excidieren des *Patches* desensibilisieren die aktivierten (15  $\mu$ M cAMP) A2-A2-A4-B1b-Kanäle durch 20  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  (schwarz). Nach 5 min waschen (dunkelgrau) desensibilisieren sie nur noch teilweise, und nach 10 min gar nicht mehr. Durch die zusätzliche Perfusion mit 200 nM Calmodulin (CaM) zeigen die gewaschenen A2-A2-A4-B1b-Kanäle denselben Grad der Desensibilisierung wie mit 20  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  vor dem Waschen. Die Haltespannung betrug -40 mV.

Aminosäureaustausch Leucin zu Glutamat (CNGB1b<sup>L183E</sup>, CNGB1b<sup>L292E</sup>) funktionell ausgeschaltet. Die Auswirkung der Mutationen auf die Desensibilisierung der CNG-Kanäle mit endogenem Calmodulin (A2-A2-A4<sup>L292E</sup>-B1b, A2-A2-A4-B1b<sup>L183E</sup>) habe ich durch die cAMP-Empfindlichkeit in der Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  überprüft. Die Abbildung 3.17 a) und b) illustriert die unterschiedlichen Ausgangsbedingungen der beiden Protokolle. Bei dem *exogenen Calmodulin Protokoll* (Abb. 3.17 a) wird das endogene Calmodulin von dem CNG-Kanal durch 10-minütiges Waschen mit 10 mM EGTA entfernt, und anschließend werden durch die Perfusion mit exogenem  $Ca^{2+}$ -Calmodulin die CNG-Kanäle desensibilisiert.

Wegen die CNG-Kanälen bei dem *endogenen Calmodulin Protokoll* nicht mit 10 mM EGTA gewaschen werden und somit eine Perfusion mit  $\text{Ca}^{2+}$  ausreicht, um sie zu desensibilisieren. Der zeitliche Verlauf der Desensibilisierung von A2-A2-A4-B1b Kanälen zeigt die Abbildung 3.17 c). Dieselben A2-A2-A4-B1b-Kanäle wurden kurz vor sowie 5 und 10 Minuten nach dem Waschen mit 10 mM EGTA gemessen. Dabei wurden die Kanäle zuerst mit 15  $\mu\text{M}$  cAMP und 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und im Anschluss daran mit 15  $\mu\text{M}$  cAMP, 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und 250 nM Calmodulin perfundiert. Zum Zeitpunkt null wurden die A2-A2-A4-B1b-Kanäle durch cAMP aktiviert. Das endogene Calmodulin band  $\text{Ca}^{2+}$ , desensibilisierte die Kanäle und reduzierte die Stromamplitude. Die nachfolgende Perfusion mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin führte (innerhalb von wenigen Sekunden) zu keiner weiteren Reduzierung der Stromamplitude. Nach 5-minütigem Waschen mit 10 mM EGTA kam es, im Vergleich zu der Messung zum Zeitpunkt null, zu einer relativ geringeren Stromamplitudenreduzierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ . Es konnten weniger A2-A2-A4-B1b-Kanäle desensibilisiert werden, da ein Teil des endogenen Calmodulins bereits von den Kanälen entfernt war. Nachdem das gesamte endogene Calmodulin durch 10 minütiges Waschen mit 10 mM EGTA entfernt war, kam es zu keiner Desensibilisierung der A2-A2-A4-B1b-Kanäle allein durch das  $\text{Ca}^{2+}$ . Bei beiden Messungen (nach 5 und 10 Minuten) kam es aber wieder zu einer vollständigen Desensibilisierung durch die Perfusion mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin. Die Messung zum Zeitpunkt null während der Perfusion mit cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  entspricht dem neuen *endogenen Calmodulin-Protokoll*, und die Messung nach 10 Minuten und der Perfusion mit cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin entspricht dem alten *exogenem Calmodulin-Protokoll*. Beide Protokolle zeigten denselben desensibilisierenden Effekt bei A2-A4-B1b Kanälen. Allerdings deuten sich hier schon erste Unterschiede zwischen den beiden Protokollen an: Das endogene Calmodulin scheint fester an den Kanal gebunden zu sein als das exogene Calmodulin, da das endogene erst nach 10-minütigem Waschen mit 10 mM EGTA entfernt werden konnte, wohingegen das exogene Calmodulin schon nach 1 Minute in 10 mM EGTA von den CNG-Kanälen dissoziiert war.

Im folgendem vergleiche ich den zeitlichen Verlauf der Desensibilisierung der CNG-Kanäle (A2-A2-A4-B1b, A2-A2-A2-A4 und A2-A2-A2-B1b) im *exogenen Calmodulin-Protokoll* mit dem zeitlichen Verlauf der Desensibilisierung bei der Verwendung des *endogene Calmodulin-Protokolls*. Mit dem *exogenen Calmodulin-Protokoll* zeigte der A2-A2-A4-B1b Kanal eine schnelle Abnahme der Stromamplitude. CNG-Kanäle mit CNGA4 oder CNGB1b (A2-A2-A2-A4 und A2-A2-A2-B1b) waren bis zu 100-mal langsamer als A2-A2-A4-B1b-Kanäle (Abb. 3.18 a). Für die Bindung von Calmodulin *in vitro* und die schnelle und vollständige Desensibilisierung braucht der CNG-Kanal beide modulatorische

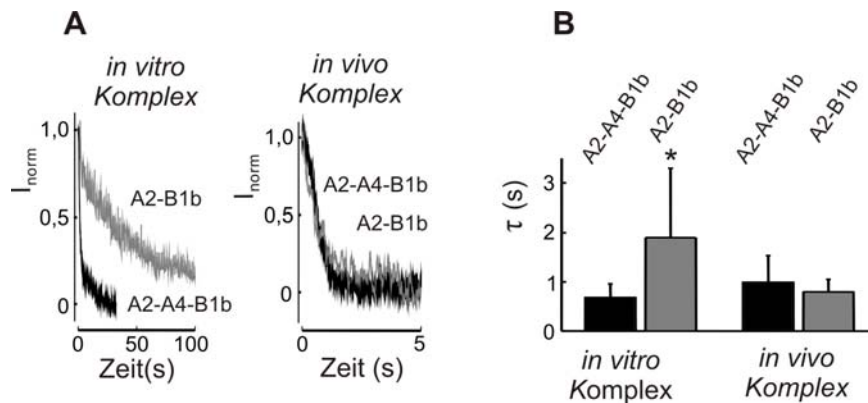
Untereinheiten. A2-A2-A4-B1b-Kanäle zeigten mit dem *endogenen Calmodulin-Protokoll*, nach der Aktivierung mit cAMP eine schnelle Desensibilisierung durch der Perfusion mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Abb. 3.18 b). Wie erwartet zeigte der A2-A2-A2-A4 Kanal keine Reaktion auf  $\text{Ca}^{2+}$ , dagegen zeigte der A2-A2-A2-B1b Kanal eine ähnlich schnelle Desensibilisierung wie der A2-A2-A4-B1b-Kanal. Allerdings war die Stromreduzierung nicht so ausgeprägt. Diese



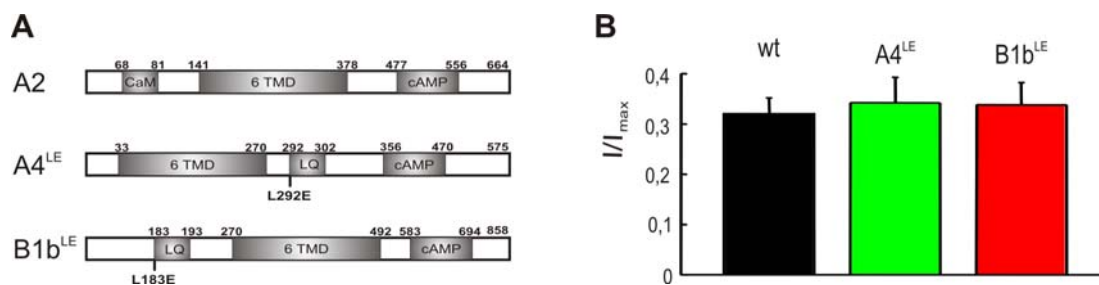
**Abbildung 3.18: Unterschiede bei der Desensibilisierung von A2-A2-A4-B1b, A2-A2-A2-B1b und A2-A2-A2-A4 Kanälen mit dem exogenen Calmodulin Protokoll und dem endogenen Calmodulin Protokoll.** Die Reaktion aktivierter CNG-Kanäle auf das *exogene Calmodulin Protokoll* ist in (A) dargestellt. Während die A2-A2-A4-B1b Kanäle (15  $\mu\text{M}$  cAMP) eine schnelle Stromreduzierung auf Grund der Desensibilisierung durch 0,5  $\mu\text{M}$  Calmodulin und 150  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zeigten, reagierten die A2-A2-A2-B1b Kanäle (40  $\mu\text{M}$  cAMP) ca. 50-100 mal langsamer und die A2-A2-A2-A4 Kanäle (40  $\mu\text{M}$  cAMP) nur schwach. (B) Dagegen mit dem *endogenen Calmodulin Protokoll* die aktivierten A2-A2-A4-B1b Kanäle (15  $\mu\text{M}$  cAMP) und die A2-A2-A2-B1b Kanäle (40  $\mu\text{M}$  cAMP) eine schnelle Desensibilisierung durch 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Dagegen wurde bei den A2-A2-A2-A4 Kanälen (30  $\mu\text{M}$  cAMP) keine Desensibilisierung beobachtet. Man beachte die unterschiedlichen Zeitskalen bei (A) und (B). Die Haltespannung betrug -40 mV.

Beobachtung bestätigte sich mit der kinetischen Analyse der gemessenen Daten. Der Zeitverlauf der Desensibilisierung aktivierter CNG-Kanäle kann bei dem *endogenen Calmodulin-Protokoll* durch eine einfache Exponentialfunktion und bei dem *exogenen Calmodulin-Protokoll* durch die Summe von zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden. Dafür wurden die Stromamplituden auf die Amplitude des Desensibilisierung-Effekts normiert ( $I_{\text{norm}}(t) = I_{\text{CaM}(t)}/\Delta I_{\text{CaM}}$ ). Anschließend wurden die Zeitkonstante  $\tau$  der einzigen bzw. der schnellen Komponente der Funktionen miteinander verglichen. Die Zeitkonstanten waren für die A2-A2-A4-B1b-Kanäle bei dem *exogenen Calmodulin-Protokoll* ( $\tau = 0,7 \pm 0,3$  s;  $n = 7$ ) und dem *endogenen Calmodulin-Protokoll* ( $\tau = 0,9 \pm 0,5$  s;  $n = 5$ ) gleich schnell (Abbildung 3.19). Für den A2-A2-A2-B1b-Kanal war die Zeitkonstante mit dem *exogenen Calmodulin-Protokoll* ( $\tau = 1,9 \pm 1,4$  s;  $n = 10$ ) signifikant langsamer als mit dem *endogenen Calmodulin-Protokoll* ( $\tau = 0,8 \pm 0,3$  s;  $n = 4$ ). Letztere ist jedoch vergleichbar mit der

Zeitkonstante der A2-A2-A4-B1b-Kanäle. Dieses Ergebnis zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen der Kanaldesensibilisierung durch endogenes Calmodulin (*in vivo* Komplex) im Vergleich zu exogenem Calmodulin (*in vitro* Komplex).



**Abbildung 3.19: Kinetische Analyse der Unterschiede bei der Desensibilisierung von A2-A2-A4-B1b und A2-A2-A2-B1b Kanälen mit dem exogenen Calmodulin Protokoll und dem endogenen Calmodulin Protokoll.** Der zeitliche Verlauf der Desensibilisierung wurde auf den Calmodulin Effekt normiert (A). Deutlich zeigt sich, dass die Stromabnahme von A2-A2-A4-B1b und A2-A2-A2-B1b Kanälen in dem *in vivo* Komplex dem gleichen Zeitverlauf folgen und in dem *in vitro* Komplex nicht. (B) Zusammenfassung der Kinetiken bei der Desensibilisierung. Die Zeitkonstanten waren für die A2-A2-A4-B1b Kanäle mit dem *in vitro* Komplex ( $\tau = 0,7 \pm 0,3$  s;  $n = 7$ ) und in dem *in vivo* Komplex ( $\tau = 0,9 \pm 0,5$  s;  $n = 5$ ) gleich schnell. Nur für den A2-A2-A2-B1b Kanal war die Zeitkonstante mit dem *in vitro* Komplex ( $\tau = 1,9 \pm 1,4$  s;  $n = 10$ ) signifikant langsamer als mit dem *in vivo* Komplex ( $\tau = 0,8 \pm 0,3$  s;  $n = 4$ ).

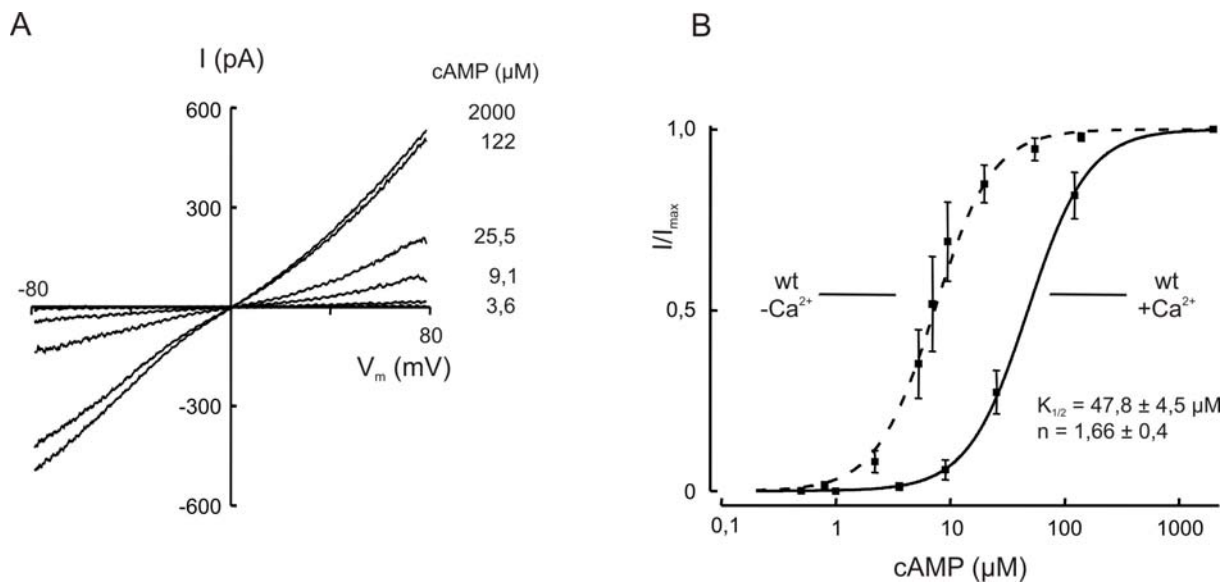


**Abbildung 3.20: Kontrolle der A2-A2-A4-B1b-Kanal Expression.** (A) Schematische Darstellung der Punktmutationen der LQ-Type-Calmodulin Bindestellen bei den CNG-Untereinheiten. Grau unterlegt sind Transmembrandomänen (6 TMD), die cAMP-Bindestelle (cAMP) und die Calmodulinbindestellen (CaM, LQ). (B) Kontrollmessungen der A2-A2-A4-B1b Kanal Expression in den Patches, die für die folgenden Dosis-Wirkungs-Beziehungen verwendet wurde. Gemessen wurde der anteilige Strom  $3,4 \mu\text{M}$  cAMP bei bezogen auf  $2\text{mM}$  cAMP. Es waren mehr als 90% der Kanäle A2-A2-A4-B1b, wenn  $I/I_{\text{max}} > 0,31$ .  $I/I_{\text{max}}$  war  $0,32 \pm 0,03$  ( $n = 7$ ) für A2-A2-A4-B1b,  $0,34 \pm 0,05$  ( $n = 5$ ) für A2-A2-A4<sup>L292E</sup>-B1b, und  $0,33 \pm 0,04$  ( $n = 5$ ) für A2-A2-A4-B1b<sup>L183E</sup>.

Im ersten Fall wird die CNGA4-Untereinheit nicht gebraucht, wohingegen Sie bei dem *exogenen Calmodulin-Protokoll* benötigt wurde. Im folgendem möchte ich mit endogenem Calmodulin überprüfen, ob auch die Beteiligung der einzelnen IQ-Typ Calmodulin-Bindestelle von CNGB1b ausreicht, den A2-A2-A4-B1b Kanal zu desensibilisieren. Die

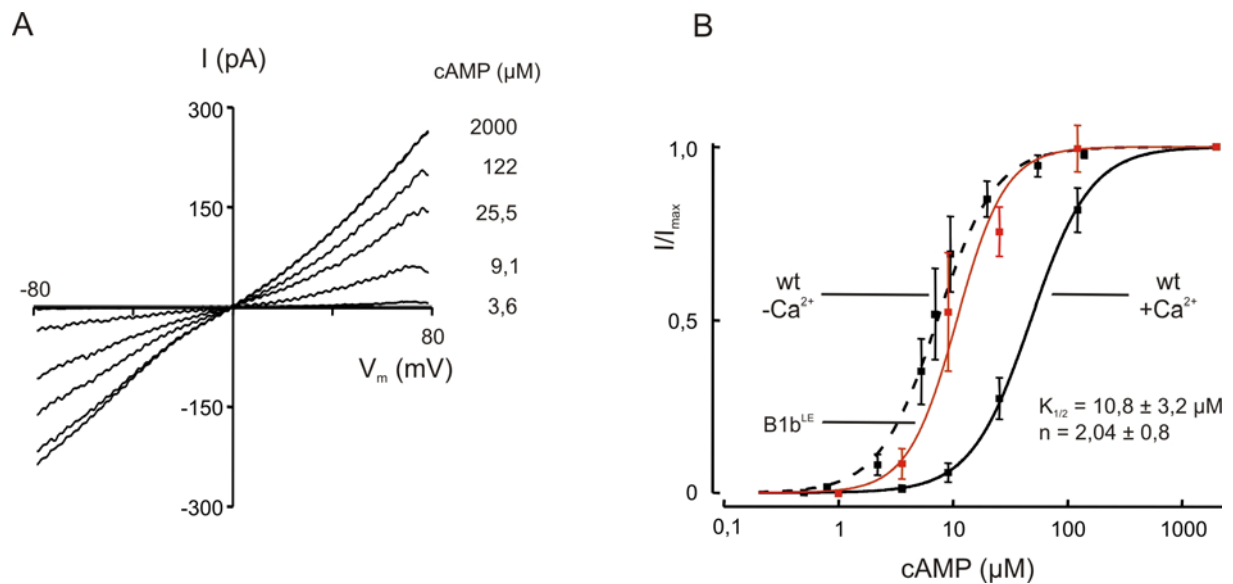
IQ-Typ Calmodulin-Bindestellen im C-Terminus von CNGA4 und im N-Terminus von CNGB1b wurden selektiv mit einer Punktmutation ausgeschaltet (Abbildung 3.20 a). Jede dieser Mutationen hatte ausgereicht, die Desensibilisierung des CNG-Kanals mit dem *exogenen Calmodulin-Protokoll* zu verhindern (Bradley et al., 2004). Die Einführung dieser Mutationen hatte nicht die Sensitivität für cAMP in der Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  verändert (Bradley et al., 2004). Deswegen konnte ich die Zusammensetzung der CNG-Kanäle anhand ihrer Sensitivität für cAMP in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Lösung überprüfen (s. 3.2). Die anteiligen Ströme

$I_{(3,4 \mu\text{M})}/I_{(2 \text{ mM})} = I/I_{\text{max}}$  bei einer Spannung von -50 mV betragen für A2-A2-A4-B1b, A2-A2-A4<sup>L292E</sup>-B1b und A2-A2-A4-B1b<sup>L183E</sup>  $I_{3,4}^{-50}$  : 0,32; 0,34 und 0,33 (Abbildung 3.20b).

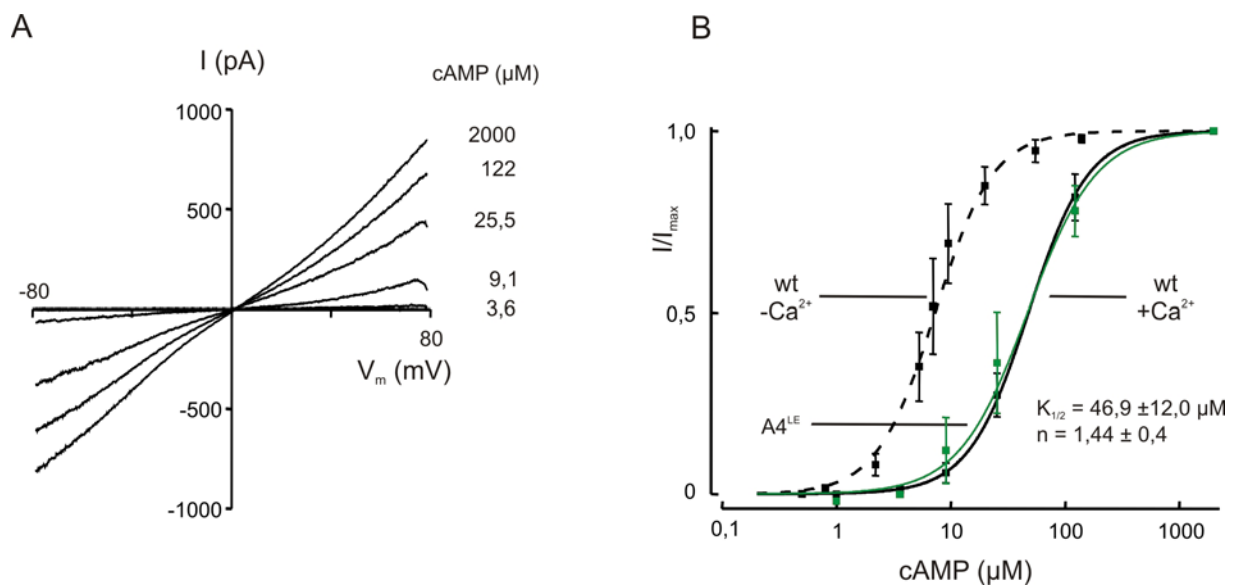


**Abbildung 3.21: Strom-Spannungs-Kennlinien und Dosis-Wirkungs-Kurve von Wildtyp A2-A2-A4-B1b-Kanälen mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ .** (A) Eine beispielhafte I/V-Analyse bei den angegebenen cAMP-Konzentrationen. (B) Dosis-Wirkungs-Kurve von Wildtyp A2-A2-A4-B1b -Kanälen ( $n=7$ ) mit den  $K_{1/2}$ -Werten für cAMP und Hill Koeffizienten bei -50mV von  $47,8 \pm 4,4 \mu\text{M}$  und  $n = 1,7 \pm 0,3$ , sowie bei 50 mV von  $29,7 \pm 2,3 \mu\text{M}$  und  $1,9 \pm 0,4$ . Zum Vergleich ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4-B1b-Kanälen (gestrichelte Linie) gezeigt, die ohne  $\text{Ca}^{2+}$  gemessen wurde.

Alle *Patches*, die für die weiteren Dosis-Wirkungs Beziehungen benutzt wurden, enthielten mehr als 90% A2-A2-A4-B1b Kanäle, da  $I_{3,4}/I_{\text{max}} > 0,31$  war. Wildtyp A2-A2-A4-B1b Kanäle zeigten mit dem *endogenen Calmodulin-Protokoll* in der Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  eine reduzierte Sensitivität für cAMP (Abbildung 3.21). Der  $K_{1/2}$  erhöhte sich auf  $47,8 \pm 4,4 \mu\text{M}$  ( $n = 7$ , -50 mV). Dieselbe cAMP Empfindlichkeit war auch bei A2-A2-A4<sup>L292E</sup>-B1b Kanälen in der Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zu beobachten (Abbildung 3.22), mit einem  $K_{1/2}$  von  $46,9 \pm 12 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ , -50 mV). Im Gegensatz dazu, wurde die cAMP-Sensitivität von A2-A2-A4-B1b<sup>L183E</sup> so gut wie gar nicht durch  $20 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  verändert (Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.22: Strom-Spannungs-Kennlinien und Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4-B1b<sup>LE</sup>-Kanälen mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ .** (A) Eine beispielhafte I/V-Analyse bei den angegebenen cAMP-Konzentrationen. (B) Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4-B1b<sup>LE</sup>-Kanälen ( $n=5$ , grün) mit den  $K_{1/2}$ -Werten für cAMP und Hill Koeffizienten bei  $-50\text{mV}$  von  $10,8 \pm 3,2 \mu\text{M}$  und  $n = 2,0 \pm 0,8$ , sowie bei  $50 \text{mV}$  von  $8,0 \pm 2,6 \mu\text{M}$  und  $2,1 \pm 1,0$ . Zum Vergleich sind die Dosis-Wirkungs-Kurve zum einem von Wildtyp A2-A2-A4-B1b-Kanälen (gestrichelte Linie) gezeigt, die ohne  $\text{Ca}^{2+}$  gemessen wurde, und zum anderen Wildtyp A2-A2-A4-B1b-Kanälen (durchgezogene Linie) mit  $20 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ .



**Abbildung 3.23: Strom-Spannungs-Kennlinien und Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4<sup>LE</sup>-B1b-Kanälen mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ .** (A) Eine beispielhafte I/V-Analyse bei den angegebenen cAMP-Konzentrationen. (B) Dosis-Wirkungs-Kurve von A2-A2-A4<sup>LE</sup>-B1b-Kanälen ( $n=5$ , grün) mit den  $K_{1/2}$ -Werten für cAMP und Hill Koeffizienten bei  $-50\text{mV}$  von  $46,9 \pm 12,0 \mu\text{M}$  und  $n = 1,4 \pm 0,4$ , sowie bei  $50 \text{mV}$  von  $31,9 \pm 6,2 \mu\text{M}$  und  $1,2 \pm 0,2$ . Zum Vergleich sind die Dosis-Wirkungs-Kurve zum einem von Wildtyp A2-A2-A4-B1b-Kanälen (gestrichelte Linie) gezeigt, die ohne  $\text{Ca}^{2+}$  gemessen wurde, und zum anderen von Wildtyp A2-A2-A4-B1b-Kanälen (durchgezogene Linie) mit  $20 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ .

Der  $K_{1/2}$  betrug  $10,8 \pm 3,2 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ,  $-50 \text{mV}$ ) und unterschied sich damit kaum von den A2-A2-A4-B1b Kontrollmessungen ohne  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{1/2} = 7,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ). Diese Ergebnisse zeigen, dass die CNGA4 Untereinheit bei der Desensibilisierung des A2-A2-A4-B1b Kanals durch

das endogene Calmodulin nicht beteiligt ist. Die CNGB1b Untereinheit dagegen wird benötigt und reicht aus, den A2-A2-A4-B1b Kanal zu desensibilisieren.



## 4 Diskussion

In olfaktorischen Rezeptorneuronen wird die Signaltransduktionskaskade durch ein Duftstoffgemisch aktiviert. Dabei öffnen die CNG-Kanäle, und es kommt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal das lange genug anhält um den Kanal zu desensibilisieren (negative Rückkopplungshemmung). Die Desensibilisierung wird  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig durch Calmodulin vermittelt und verringert die Sensitivität der CNG-Kanäle für cAMP. In der vorliegenden Arbeit habe ich die Beteiligung der modulatorischen Untereinheiten CNGA4 und CNGB1b bei der Aktivierung und Desensibilisierung untersucht. Für die Aktivierung habe ich den Effekt von Punktmutationen in der cAMP-Bindestelle der Kanaluntereinheiten auf die Dosis-Wirkungsbeziehungen analysiert. Ebenso habe ich den Effekt von Punktmutationen in den Calmodulin-Bindestellen von CNGA4 und CNGB1b auf die Desensibilisierung durch die cAMP-Empfindlichkeit in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  untersucht.

### 4.1 Zusammensetzung der Quartärstruktur von heteromeren CNG-Kanälen

Der olfaktorische CNG-Kanal ist ein Heterotetramer und besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten. Der Kanal setzt sich aus zwei CNGA2, und je einer Untereinheit CNGA4 und CNGB1b zusammen: A2-A2-A4-B1b (Zheng und Zagotta, 2004). Nur die Hauptuntereinheit CNGA2 kann alleine funktionelle Kanäle bilden, CNGA4 und CNGB1b nur in Verbindung mit CNGA2. Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich die drei Untereinheiten im HEK 293-Zellen heterolog exprimiert. Dabei kam es nicht zu einer einheitlichen Population mit der nativen Zusammensetzung A2-A2-A4-B1b, sondern zu einer Mischung sämtlicher möglichen funktionellen Kanäle (A2-A2-A2-A2, A2-A2-A2-A4, A2-A2-A2-B1b und A2-A2-A4-B1b).

Bei der Proteinbiosynthese und dem Transport von Proteinen gibt es verschiedene Ebenen der Qualitätskontrolle. Es werden endoplasmatische Retikulum (ER) Rückhaltesignale exponiert, wenn ein Protein falsch gefaltet wird oder wenn sich Proteinuntereinheiten unvollständig zusammen lagern (Teasdale und Jackson, 1996; Zerangue et al., 1999; Ellgaard und Helenius, 2003; Ma und Jan, 2002). Diese Signale werden von Hilfsproteinen erkannt, und das neu

synthetisierte Protein wird in das ER zurücktransportiert oder dort zurückgehalten, bis es richtig gefaltet oder mit den dazu gehörigen Untereinheiten zusammen gelagert wurde. Ein Problem der Faltung lag vermutlich im Falle des olfaktorischen CNG-Kanals nicht vor, da alle drei CNG-Untereinheiten funktionell nachgewiesen wurden. Somit scheint das Problem der verschiedenen Mischungen in der Zusammenlagerung und dem Transport zu bestehen. Für einige Proteine hat man spezifische Transportsequenzen gefunden, die dafür sorgen dass die Proteine nur zu ihrem Zielort, z.B.: Dendriten oder Axone, transportiert werden (Heusser und Schwappach, 2005; Jespersen et al., 2004; Rivera et al., 2003; Horton und Ehlers, 2003; Gu et al., 2003). Eine Qualitätskontrolle innerhalb der Zellen gewährleistet dann den zielgerichteten Transport an Hand der Transportsequenz.

In den HEK 293-Zellen scheint es für die CNG-Kanäle keine Qualitätskontrolle für die richtige Zusammenlagerung und einen gezielten Transport zu geben. Eine Form der Qualitätskontrolle gibt es vermutlich in MDCK-Zellen. Um A2-A2-A4-B1b-Kanäle in das einzelne Zilium der MDCK-Zellen zu transportieren, wurde die CNGA4 Untereinheit nicht benötigt, die CNGB1b Untereinheit jedoch schon (Jenkins et al., 2006). In dieser Studie wurde eine Ziliäre-Lokalisations-Sequenz R<sup>821</sup>VSP in dem C-Terminus von CNGB1b gefunden, die in CNGA2 und CNGA4 nicht vorhanden ist. Das zuverlässigste Expressionssystem für CNG-Kanäle scheinen *Xenopus* Oocyten zu sein. Nach der Injektion der entsprechenden RNA-Zusammensetzung, exprimieren *Xenopus* oocyten eine einheitliche Kanalpopulation (Zheng und Zagotta, 2004; Nache et al., 2005). Ich habe für den olfaktorischen CNG-Kanal die Spannungsabhängigkeit des  $K_{1/2}$  und die Sensivität für cAMP als Merkmal für die native Zusammensetzung charakterisiert. Dadurch war ich in der Lage, diejenigen Membran-Patches auszuwählen, die > 90% Korrekt zusammen gelagerte Kanäle enthielten. Diese Auswahl ist für Expressionsstudien in HEK 293-Zellen unerlässlich. Die native Zusammensetzung der CNG-Kanäle aus Sehsinneszellen (A1-A1-A1-B1 & A3-A3-B3-B3) wird in Expressionsstudien durch den Block mit *L-cis*-Diltiazem überprüft (Quandt et al., 1991; Haynes, 1992; Biel et al., 1994; Stern et al., 1986; Cook et al., 1987; Kaupp et al., 1989). Werden die CNGA-Untereinheiten mit ihren jeweiligen CNGB-Untereinheiten koexprimiert, weisen die CNG-Kanäle die *L-cis*-Diltiazem-Empfindlichkeit der nativen Kanäle auf (Chen et al., 1993; Gerstner et al., 2000b; Korschen et al., 1995).

Das Problem der richtigen Zusammenlagerung betrifft die CNG-Kanäle auch in nativen Zellen. Die sensorischen Neuronen, in denen die CNG-Kanäle vorkommen (Sehstäbchen, Sehzapfen und ORN), sind polarisiert. Hier müssen die CNG-Kanäle gezielt in ein

spezialisiertes Organell (Außensegment bei den Sehsinneszellen; Zilien bei den ORNs) transportiert werden. Dieser zielgerichtete Transport funktioniert nur, wenn die CNG-Kanäle die vollständige native Zusammensetzung haben. Andernfalls werden die CNG-Kanäle in andere Bereiche der Plasmamembran transportiert (Koch et al., 1987; Torre et al., 1992; Ruiz et al., 1999; Munger et al., 2001; Michalakis et al., 2006). Im Gegensatz zu den Expressionssystemen, muss es eine Qualitätskontrolle in Sinnesneuronen geben. Die Signaltransduktion wäre gestört, besäße jedes Sinnesneuron eine unterschiedliche Mischung von CNG-Kanälen.

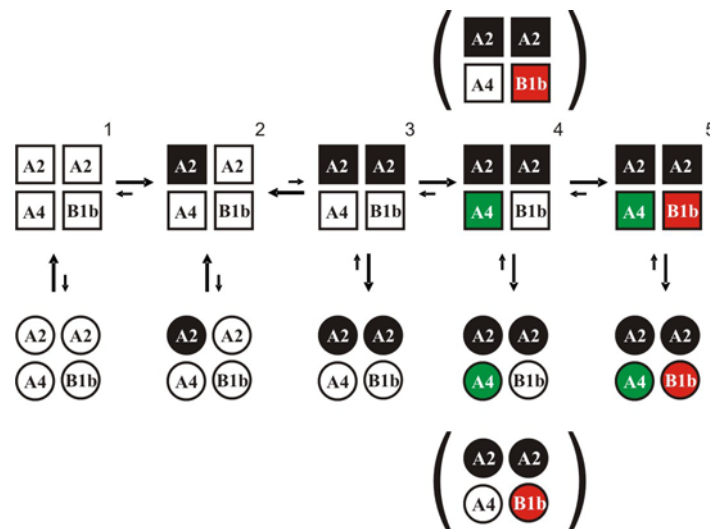
## 4.2 Aktivierung des heteromeren A2-A2-A4-B1b-Kanals

CNG-Kanäle sind liganden-gesteuerte Kanäle. Durch die sequentielle, kooperative Bindung von zyklischen Nucleotiden (z.B.: cAMP oder cGMP) an die intrazelluläre Bindestelle kommt es zu einer Konformationsänderung des Kanals, und der Kanal öffnet. Das C4L-Modell (Biskup et al., 2007) beschreibt diesen Schaltvorgang zum ersten Mal für einen liganden-gesteuerten Kanal zufriedenstellend. Der konzeptionelle Fortschritt zu älteren Schaltmodellen ist, dass die vier Bindungen von cAMP an den Kanal nicht identisch sind. Gerade die Bindung des zweiten cAMPs an den Kanal ist aus zwei Gründen ein entscheidender Schritt in dem Schaltmechanismus. Erstens erzeugt die Bindung des ersten cAMPs eine negative Kooperativität für die Bindung des zweiten cAMPs. Das heißt, dass die Assoziationskonstante des zweiten cAMPs an den Kanal um drei Größenordnungen kleiner ist als die der drei anderen cAMPs. Damit ist ein zweifach ligandierter Kanal so instabil, dass das zweite cAMP entweder vom Kanal dissoziiert oder ein drittes cAMP gebunden wird. Gleichzeitig aber wird durch die Bindung des zweiten cAMPs die Öffnungswahrscheinlichkeit fast eins. Somit fungiert das zweite Bindungsereignis als Schalter für den Übergang vom geschlossenen in den offenen Zustand.

In meiner Studie mit mutierten cAMP-Bindestellen der Untereinheiten CNGA2, CNGA4 und CNGB1b zeigte sich, dass zwingend CNGA2 notwendig für das Funktionieren des Kanals ist. Heteromere Kanäle mit der nicht funktionellen Bindestellenmutante CNGA2<sup>R539E</sup> ließen sich nicht aktivieren. Im Gegensatz dazu konnte der A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup> Kanal durch die zwei intakten Bindestellen von CNGA2 geöffnet werden, wenn auch mit einer geringen Effizienz. Der Effekt der negativen Kooperativität, der zwischen der Bindung des ersten und

zweiten cAMPs entsteht, zeigte sich hier in dem hohen  $K_{1/2}$ -Wert des A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup> Kanals. Ebenso ist die 50fach geringere Stromamplitude im Einklang mit dem C4L-Modell, das den instabilen Zustand des zweifach ligandierten Kanals vorhersagt. Da der Kanal nicht den dreifach ligandierten Zustand erreichen kann, können nicht einmal sehr hohen cAMP-Konzentrationen den A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b<sup>R657E</sup> Kanal in einen robusten Offenzustand versetzen. Diese Beobachtungen lassen im Zusammenhang mit dem C4L-Modell den Schluß zu, dass CNGA2 die Hauptuntereinheit ist. CNGA2 vermittelt den grundlegenden Schaltvorgang durch die Bindung die ersten zwei initialen cAMP-Moleküle.

Damit der A2-A2-A4-B1b-Kanal einen robusten Offenzustand erreichen kann, muss der Kanal dreifach ligandiert sein. Die Kanäle mit drei intakten Bindestellen A2-A2-A4<sup>R430E</sup>-B1b und A2-A2-A4-B1b<sup>R657E</sup> zeigten beide eine ähnlich verringerte Sensitivität für cAMP. Damit



**Abbildung 4.1: Aktivierungsmodell:** Schematische Darstellung des erweiterten 4CL-Steuerungsmodells von Biskup (2007). Quadrate repräsentieren den geschlossenen Zustand, Kreise den geöffneten Zustand. Ausgefüllte Symbole sind cAMP-ligandierten Untereinheiten. Die Pfeilgröße veranschaulicht die Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen. Das Modell zeigt, dass die cAMP-Ligandierung der zwei CNGA2 Untereinheiten (3) den Kanal öffnet. Dieses Öffnungsereignis konkurriert mit dem Verlust eines cAMP, dessen Dissoziation durch die negative Kooperativität begünstigt ist. Die Bindung von cAMP an CNGA4 und CNGB1b (4,5) stabilisiert den Kanal im geöffneten Zustand.

können CNGA4 und CNGB1b beide gleich gut die Bindung der dritten cAMPs koordinieren. Die verringerte Sensitivität für cAMP wird durch die fehlende vierte Bindung des cAMPs erklärt. Somit wird die vierte Bindestelle benötigt um die Empfindlichkeit des Kanals in den physiologischen Konzentrationsbereich (5-7  $\mu$ M cAMP) zu bringen. Studien haben gezeigt, dass bei der Duftstoffwahrnehmung durch die ORNs nur sehr wenig cAMP ( $\sim$  1-10  $\mu$ M cAMP pro Sekunde) hergestellt wird (Bhandawat et al., 2005; Kleene, 2008;

Tomaru und Kurahashi, 2005). Mit der vorliegenden Studie konnte das C4L-Modell, das an dem homomeren CNGA2-Kanal erstellt wurde, erweitert werden. Die unterschiedlichen Kanaluntereinheiten konnten jetzt diskreten Bindungsschritten zugeordnet werden.

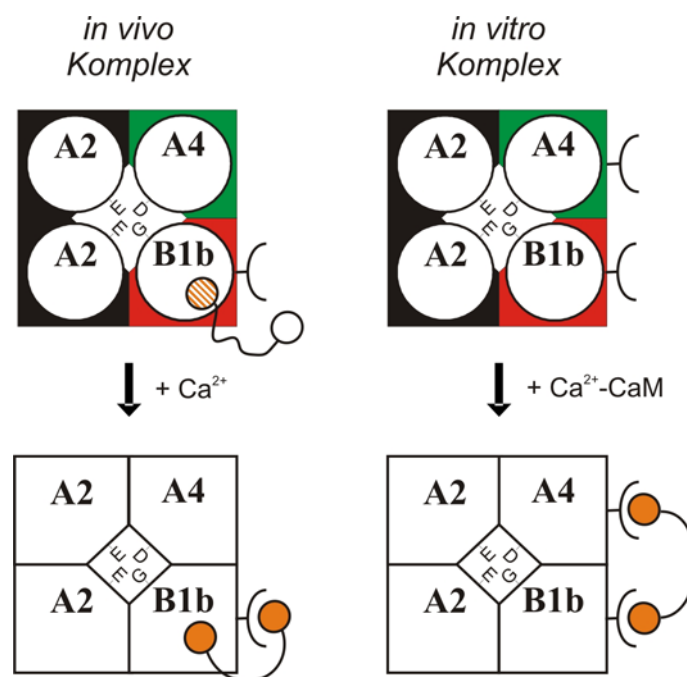
### 4.3 $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Desensibilisierung des heteromeren A2-A2-A4-B1b-Kanals

Der aktivierte A2-A2-A4-B1b-Kanal leitet unter physiologischen Bedingungen monovalente Kationen und hauptsächlich  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zilien (Dzeja et al., 1999).  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden bei der Permeation des Kanals durch negativ geladene Aminosäurereste innerhalb der Pore koordiniert (Bradley et al., 1994). Im Gegensatz zu CNGA2 ( $\text{E}^{342}$ ) und CNGA4 ( $\text{D}^{234}$ ) hat CNGB1b ein ungeladenes Glycin an der homologen Position ( $\text{G}^{463}$ ), das die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung schwächt, die Verweildauer der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verkürzt und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeationrate erhöht (Bonigk et al., 1999). Eine funktionelle Eigenschaft von CNGB1b ist daher die Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms.

Das einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  kontrolliert die Aktivität des Kanals durch eine Rückkopplungshemmung, die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin ausgelöst wird. Präassoziiertes Calmodulin ist so fest an den A2-A2-A4-B1b-Kanal verankert, dass man es als eine fünfte Untereinheit des Kanals betrachten kann. Das einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht die lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $\text{Ca}^{2+}$ -Microdomäne) an der Poreninnenseite des Kanals, und das Calmodulin im *in vivo* Komplex kann sofort darauf reagieren. Somit ist der Zeitverlauf der Desensibilisierung nicht abhängig von der Diffusion, sondern alleine von dem allosterischen Übergang, der durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an das verankerte Calmodulin ausgelöst wird.  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin desensibilisiert den Kanal, so dass er bei submaximaler Aktivierung schnell geschlossen wird. Als Arbeitshypothese wird angenommen, dass der endogene  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor Calmodulin ist. Dies muss allerdings erst noch gezeigt werden, z.B. mit einer Immunpräzipitation.

Endogenes Calmodulin kann durch 10-minütiges Waschen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung (10 mM EGTA) irreversibel von dem Kanalkomplex entfernt werden (Lynch und Lindemann, 1994; Balasubramanian et al., 1996; Bradley et al., 2001b; Bradley et al., 2004). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der EGTA-gewaschenen Kanäle, konnte mit exogenem Calmodulin wieder hergestellt werden. Allerdings gibt es zwei Beobachtungen, die darauf hinweisen, dass der

molekulare Mechanismus der schnellen Desensibilisierung mit endogenem Calmodulin sich von der schnellen Desensibilisierung mit exogenem Calmodulin unterscheidet. Erstens braucht es nur ca. 20 s bis das exogene Calmodulin von dem Kanalkomplex mit EGTA gewaschen wurde, im Vergleich zu den zehn Minuten bei dem endogenen Calmodulin (Bradley et al., 2001b). Zweitens zeigte der A2-A2-A4-B1b-Kanal im *in vitro* Komplex nur dann eine schnelle Desensibilisierung, wenn beide IQ-Typ Calmodulin-Bindestellen von CNGA4 und CNGB1b intakt waren (Bradley et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigte der A2-A2-A4-B1b-Kanal im *in vivo* Komplex eine schnelle Desensibilisierung, wenn nur die IQ-Typ Bindestelle von CNGB1b intakt war. Zudem desensibilisieren A2-A2-A2-B1b-Kanäle, ohne CNGA4, gleich schnell wie A2-A2-A4-B1b-Kanäle. Daraus



**Abbildung 4.2: Desensibilisierungsmodell:** Schematische Darstellung der Desensibilisierungsreaktion eines aktivierten Kanals bei einer subsaturierenden cAMP-Konzentration und steigender lokaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (*in vivo* Komplex). Nach dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch den Kanal wird das verankerte Calmodulin (hantelförmiges Symbol) aktiviert und bindet an die IQ-Typ Calmodulin-Bindestelle mit einer seiner zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomänen. Das destabilisiert den offenen Zustand und schließt den Kanal. Wird das endogene Calmodulin von dem Kanal entfernt (*in vitro* Komplex), kann der Kanal immer noch durch die Perfusion mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin desensibilisiert werden. Dieser Effekt benötigt für die Verankerung von exogenem Calmodulin die IQ-Typ Calmodulin-Bindestelle von CNGA4. In beiden Fällen muss für den Desensibilisierungseffekt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin, Calmodulin an den Kanal präassoziiert sein. Die obere Reihe repräsentiert den offenen Zustand, die untere Reihe den geschlossenen Zustand. Ausgefüllte Symbole sind cAMP ligandierte Untereinheiten. Das hantelförmige Symbol stellt Calmodulin dar, mit ausgefüllte Kreise  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin.

schließe ich, dass CNGA4 *in vivo* nicht an dem desensibilisierenden Effekt beteiligt ist. Das steht im Widerspruch zu einer Studie der CNGA4<sup>-/-</sup> Maus, die eine verringerte Adaptation im Elektroolfaktogramm (EOG) auf zwei 3 s auseinander liegenden Duftstoffpulsen zeigte

(Munger et al., 2001). Dieser Widerspruch kann mit folgender Beobachtung erklärt werden. ORNs besitzen eine Qualitätskontrolle (s 3.2), die dafür sorgt, dass nur CNG-Kanäle mit der richtigen Zusammensetzung (A2-A2-A4-B1b) zielgerichtet in die Zilien transportiert werden (Jenkins et al., 2006). Durch das Fehlen der CNGA4-Untereinheit versagt diese Kontrolle, und das EOG der CNGA4<sup>-/-</sup> Maus entsteht durch Aktivierung einer Mischung aus insgesamt wenigen homomeren A2 und heteromeren A2-A2-A2-B1b-Kanälen. Die fehlende Adaptation der CNGA4<sup>-/-</sup> Maus ist daher eher ein Problem der Kanalzusammenlagerung und des zielgerichteten Transports, als ein Hinweis für die Beteiligung von CNGA4 bei der Adaptation.

Die konstitutive Verankerung von Calmodulin an einen Ionenkanal scheint ein generelles Prinzip zu sein (Tadross et al., 2008; Maylie et al., 2004; Fakler und Adelman, 2008; Mori et al., 2008; Saimi und Kung, 2002), da dies fast ausschließlich bei Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zu beobachten ist. Diese Kanäle können auf diese Weise schnell durch eine Änderung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration reguliert werden. Die molekularen Mechanismen der Verankerung und des Effekts auf die Kanäle sind sehr unterschiedlich. Hier sind ein paar ausgewählte Beispiele dargestellt, um das zu verdeutlichen. Bei Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Kaliumkanälen (SK-Kanäle) hat jede der vier A-Untereinheiten ein Calmodulin präassoziiert (Keen et al., 1999; Xia et al., 1998; Allen et al., 2007). Calmodulin bindet dabei an eine Domäne, die weder dem klassischen 1,8,14-Motif, noch dem IQ-Typ-Motif entspricht. Der SK-Kanal öffnet, wenn alle 4 Calmoduline mit ihren EF-Händen 1 & 2 Ca<sup>2+</sup> binden (Allen et al., 2007; Xia et al., 1998; Keen et al., 1999). Spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Ca<sub>v</sub>-Kanäle) binden im Gegensatz zu den SK-Kanälen nur ein präassoziiertes Calmodulin pro Kanal (Tadross et al., 2008). Calmodulin bindet an eine unkonventionelle Calmodulinbindestelle (CB), die unmittelbar vor einer IQ-Typ-Bindestelle liegt (Pate et al., 2000). Erstaunlicherweise kann Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin zwei unterschiedliche Effekte auf einen Ca<sub>v</sub>-Kanal haben. Hat der C-Terminus von Calmodulin Ca<sup>2+</sup> gebunden kommt es zu einer Verstärkung des Stroms, hat der N-Terminus Ca<sup>2+</sup> gebunden kommt es zu einer Inaktivierung von Ca<sub>v</sub>2.1-Kanälen. Während bei Ca<sub>v</sub>2.2 und 2.3 nur die Inaktivierung ausgeprägt ist und auch durch den N-Terminus von Calmodulin vermittelt wird, ist die Auswirkung des N und C-Terminus von Calmodulin auf Ca<sub>v</sub>1.2 genau umgekehrt (Dunlap, 2007; Dick et al., 2008; DeMaria et al., 2001). Die Effekte von Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin werden durch die Interaktion von dem N oder C-Terminus mit der IQ-Typ-Bindestelle bei der Ca<sub>v</sub>2-Kanalamilie vermittelt (Liang et al., 2003; Kim et al., 2008). Eine zusätzliche Effektor-domäne zur IQ-Typ-Bindestelle für Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin gibt es bei der Ca<sub>v</sub>1-Kanalfamilie (Dick et al., 2008). Diese Effektor-domäne

(NSCaTE) ermöglicht es den Kanälen, auf zwei unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, einem lokalen und einem globalen Signal, unterschiedlich zu reagieren.

Diese Vielfältigkeit der Calmodulin-Kanal-Interaktionen verhindert ein einheitliches Modell für die Interaktion aufzustellen. Für den molekularen Mechanismus der Desensibilisierung des olfaktorischen CNG-Kanals kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Zum einen könnte die Verankerung an der LQ-Type Bindestelle von CNGB1b stattfinden, und der desensibilisierende Effekt wird durch die Interaktion mit den klassischen Calmodulin-Bindestellen des Typs 1,8,14 von CNGA2<sup>68-81</sup> oder CNGB1b<sup>744-757</sup> (Liu et al., 1994; Weitz et al., 1998; Grunwald et al., 1998) hervorgerufen. Die 1,8,14 Calmodulin-Bindestelle von CNGA2 ist wahrscheinlich nicht die Effektordomäne. Studien an homomeren CNGA2-Kanälen haben gezeigt, dass die Calmodulin-Bindestelle einer CNGA2-Untereinheit mit der cAMP-Bindestelle einer benachbarten CNGA2-Untereinheit interagiert (Varnum und Zagotta, 1997; Zheng et al., 2003). Das führt zu einem so genannten „autoexcitatorischen Effekt“, der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin inhibiert werden kann und dabei die Öffnungswahrscheinlichkeit bei saturierenden cAMP-Konzentrationen stark reduziert (Liu et al., 1994; Chen und Yau, 1994). Bei der schnellen Desensibilisierung kommt es nicht zu einer solchen Reduzierung der Öffnungswahrscheinlichkeit, und somit kann man die Calmodulin-Bindestelle von CNGA2 als Effektordomäne ausschließen. Die zweite Calmodulin-Bindestelle von CNGB1b<sup>744-757</sup> wurde in einer Studie deletiert (Bradley et al., 2004). Die Mutation hatte aber keinen Einfluß auf die schnelle Desensibilisierung, wobei allerdings das Experiment mit dem exogenen Calmodulin (*in vitro Komplex*) durchgeführt wurde. Es könnte sein, dass die zweite Calmodulin-Bindestelle von CNGB1b<sup>744-757</sup> in dem *in vivo Komplex* die Effektordomäne ist, und diese Funktion von Calmodulin-Bindestelle von CNGA4 übernommen werden kann. Ebenso denkbar ist, dass die IQ-Typ Calmodulin Bindestelle von CNGB1b<sup>183-193</sup> Bindestelle und Effektordomäne ist.



#### 4.4 Physiologische Bedeutung der schnellen Desensibilisierung

Die Untersuchungen von Riechfunktionen an einer transgenen Maus, in deren CNGB1b-Untereinheit die CaM-Bindestelle des IQ-Typs deletiert wurde, hat der Desensibilisierung eine andere Funktion als Adaptation zugeordnet (Song et al., 2008). Die A2-A2-A4-B1b<sup>ΔCaM</sup>-Kanäle werden in den ORNs zielgerichtet in die Zilienmembran transportiert und haben in Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung eine unveränderte cAMP-Sensitivität verglichen mit dem Wildtyp. Die ORNs der B1b<sup>ΔCaM</sup>-Maus zeigten subtile Unterschiede in der Reaktionskinetik auf einen Duftstoffpuls. Die B1b<sup>ΔCaM</sup>-Maus reagiert auf einen kurzen Duftstoffpuls mit einem verlängerten Rezeptorpotential. Das führt zu einer verstärkten Adaptation bei zwei kurz aufeinander folgenden Duftstoffpulsen ( $\leq 1$  s), da das verlängerte Rezeptorpotential die Refraktärzeit der ORNs beeinflusst und so weniger Aktionspotentiale bei dem zweiten Duftstoffpuls ausgelöst werden. Ein weiterer Hinweis auf die verzögerte Termination des Rezeptorpotentials findet man auch bei Ableitungen aus dem olfaktorischen Bulbus. Song und Kollegen schlagen vor, dass CNGB1b die Termination des Rezeptorpotentials der ORNs beschleunigt. Die Untereinheit ermöglicht somit den ORNs auf kurz aufeinander folgende Duftstoffpulse zu reagieren. Eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Desensibilisierung verhindert also die schnelle Adaptation und erhöht somit die zeitliche Auflösung der olfaktorischen Informationsverarbeitung.

Die zeitliche Auflösung der Duftstoffperzeption wurde in aktuellen Studien untersucht, und sie zeigen dass die Duftstoffdetektion und Diskriminierung sehr schnelle Prozesse sind. Von dem ersten Einatmen eines Duftstoffes bis zum Auslösen eines Verhaltens dauert es nur 200-500 ms (Abraham et al., 2004; Abraham et al., 2004; Rinberg et al., 2006; Carey et al., 2009; Wesson et al., 2009; Wesson et al., 2008b; Wesson et al., 2008a). Innerhalb dieser erstaunlich kurzen Zeitspanne muss der A2-A2-A4-B1b-Kanal aktiviert und wieder desensibilisiert werden. Experimente mit Salamandern haben ergeben, dass innerhalb dieser kurzen Zeitspanne die ziliäre cAMP-Konzentration ungefähr 5 - 10  $\mu$ M cAMP in Abhängigkeit von der Intensität des Stimulus erreicht (Takeuchi und Kurahashi, 2005). Eine kinetische Analyse der Aktivierung von A2-A2-A4-B1b-Kanälen zeigte, dass die halbmaximale Aktivierung bei 5 – 10  $\mu$ M cAMP sich innerhalb von 50 ms entwickelt (Nache et al., 2005). Ebenso schnell erhöht sich die darauf folgende intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. So kann in der kurzen Zeitspanne die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Desensibilisierung ausgelöst werden. Die halbmaximale Desensibilisierung des Kanals erfolgt innerhalb von

300-500 ms. Der A2-A2-A4-B1b-Kanal ist während einer Duftstoffpulses nur eine kurze Zeit offen und schließt umgehend wieder, weil die Öffnungswahrscheinlichkeit des desensibilisierten Kanals bei 5 – 10  $\mu\text{M}$  cAMP fast null ist. Die transiente Aktivierung verursacht eine kurze  $\text{Ca}^{2+}$ -Injektion in das ziliäre Lumen und erzeugt einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Chlorid Ausstrom (Reisert et al., 2005). Natrium-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher beseitigen das ziliäre  $\text{Ca}^{2+}$  (Reisert und Matthews, 1998; Kwon et al., 2009), schließen so die Chlorid-Kanäle und beenden die Duftstoffantwort.

Damit erlauben die kinetischen Eigenschaften des CNG-Kanals, in jeder Sekunde eine mehrmalige Probennahme der Duftstoffe in der Umgebung.

#### Der modulare Aufbau des olfaktorischen CNG-Kanals

Die Studien von Biskup (Biskup et al., 2007), Dzeja (Dzeja et al., 1999), Bradley (Bradley et al., 1994) und die vorliegende Arbeit lassen den Schluss zu, dass der olfaktorische CNG-Kanal *in vivo* in drei funktionelle Module eingeteilt werden kann. **1. Modul:** Die zwei CNGA2-Untereinheiten bilden das Hauptschaltmodul, das den Kanal öffnet. **2. Modul:** CNGA4 und CNGB1b sind das Stabilisierungsmodul, das den Kanal bei geringen cAMP-Konzentrationen im geöffneten Zustand stabilisiert. **3. Modul:** CNGB1b erfüllt zusätzlich die Funktion des Kalziummoduls, das die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeation erhöht und die schnelle Rückkopplungshemmung vermittelt. Diese drei Module erzeugen eine Reaktion auf die niedrige mikromolare cAMP-Konzentration, die während einer Duftstoffstimulation entsteht. Durch die schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Desensibilisierung ist die Reaktion der Kanäle transient, und bestimmt damit den Zeitverlauf afferenter Signale im olfaktorischen System.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abraham, N.M., Spors, H., Carleton, A., Margrie, T.W., Kuner, T. et al. (2004). Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron* 44, 865-876.
- Allen, D., Fakler, B., Maylie, J., and Adelman, J.P. (2007). Organization and regulation of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel multiprotein complexes. *J. Neurosci* 27, 2369-2376.
- Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bonigk, W. et al. (1991). Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 9868-9872.
- Anholt, R.R. (1991). The Perception of Odor. *Science* 252, 321.
- Bahler, M. and Rhoads, A. (2002). Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.* 513, 107-113.
- Bakalyar, H.A. and Reed, R.R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250, 1403-1406.
- Bal, R.S. and Anholt, R.R. (1993). Formation of the extracellular mucous matrix of olfactory neuroepithelium: identification of partially glycosylated and nonglycosylated precursors of olfactomedin. *Biochemistry* 32, 1047-1053.
- Balasubramanian, S., Lynch, J.W., and Barry, P.H. (1996). Calcium-dependent modulation of the agonist affinity of the mammalian olfactory cyclic nucleotide-gated channel by calmodulin and a novel endogenous factor. *Journal of Membrane Biology* 152, 13-23.
- Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A., and Axel, R. (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20, 69-81.
- Bhandawat, V., Reisert, J., and Yau, K.W. (2005). Elementary response of olfactory receptor neurons to odorants. *Science* 308, 1931-1934.
- Biel, M., Zong, X., Distler, M., Bosse, E., Klugbauer, N. et al. (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 3505-3509.
- Biskup, C., Kusch, J., Schulz, E., Nache, V., Schwede, F. et al. (2007). Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels. *Nature* 446, 440-443.
- Bonigk, W., Altenhofen, W., Muller, F., Dose, A., Illing, M. et al. (1993). Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. *Neuron* 10, 865-877.
- Bonigk, W., Bradley, J., Muller, F., Sesti, F., Boehhoff, I. et al. (1999). The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J. Neurosci.* 19, 5332-5347.

- Borisy,F.F., Ronnett,G.V., Cunningham,A.M., Juilfs,D., Beavo,J. et al. (1992). Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *J.Neurosci* 12, 915-923.
- Bradley,J., Bonigk,W., Yau,K.W., and Frings,S. (2004). Calmodulin permanently associates with rat olfactory CNG channels under native conditions. *Nat.Neurosci.* 7, 705-710.
- Bradley,J., Frings,S., Yau,K.W., and Reed,R. (2001a). Nomenclature for ion channel subunits. *Science* 294, 2095-2096.
- Bradley,J., Li,J., Davidson,N., Lester,H.A., and Zinn,K. (1994). Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 8890-8894.
- Bradley,J., Reuter,D., and Frings,S. (2001b). Facilitation of calmodulin-mediated odor adaptation by cAMP-gated channel subunits. *Science* 294, 2176-2178.
- Brunet,L.J., Gold,G.H., and Ngai,J. (1996). General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17, 681-693.
- Buck,L. and Axel,R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187.
- Caggiano,M., Kauer,J.S., and Hunter,D.D. (1994). Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* 13, 339-352.
- Caputo,A., Caci,E., Ferrera,L., Pedemonte,N., Barsanti,C. et al. (2008). TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590-594.
- Carey,R.M., Verhagen,J.V., Wesson,D.W., Pirez,N., and Wachowiak,M. (2009). Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. *J.Neurophysiol.* 101, 1073-1088.
- Chen,T.Y., Peng,Y.W., Dhallan,R.S., Ahamed,B., Reed,R.R. et al. (1993). A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* 362, 764-767.
- Chen,T.Y. and Yau,K.W. (1994). Direct modulation by Ca(2+)-calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature* 368, 545-548.
- Cook,N.J., Hanke,W., and Kaupp,U.B. (1987). Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 585-589.
- Craven,K.B. and Zagotta,W.N. (2006). CNG AND HCN CHANNELS: Two Peas, One Pod. *Annu.Rev.Physiol* 68, 375-401.
- DeMaria,C.D., Soong,T.W., Alseikhan,B.A., Alvania,R.S., and Yue,D.T. (2001). Calmodulin bifurcates the local Ca<sup>2+</sup> signal that modulates P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 411, 484-489.

- Dhallan,R.S., Yau,K.W., Schrader,K.A., and Reed,R.R. (1990). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347, 184-187.
- Di Virgilio,F., Fasolato,C., and Steinberg,T.H. (1988). Inhibitors of membrane transport system for organic anions block fura-2 excretion from PC12 and N2A cells. *Biochem.J.* 256, 959-963.
- Dick,I.E., Tadross,M.R., Liang,H., Tay,L.H., Yang,W. et al. (2008). A modular switch for spatial Ca<sup>2+</sup> selectivity in the calmodulin regulation of CaV channels. *Nature* 451, 830-834.
- Dunlap,K. (2007). Calcium channels are models of self-control. *J.Gen.Physiol* 129, 379-383.
- Dzeja,C., Hagen,V., Kaupp,U.B., and Frings,S. (1999). Ca<sup>2+</sup> permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* 18, 131-144.
- Ellgaard,L. and Helenius,A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev.Mol.Cell Biol.* 4, 181-191.
- Fakler,B. and Adelman,J.P. (2008). Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59, 873-881.
- Farbman,A.I. (1990). Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosci* 13, 362-365.
- Farbman,A.I. and Buchholz,J.A. (1992). Growth of olfactory epithelial tissue in vitro: lectin staining of axons. *Microsc.Res.Tech.* 23, 173-180.
- Firestein,S., Darrow,B., and Shepherd,G.M. (1991a). Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. *Neuron* 6, 825-835.
- Firestein,S., Zufall,F., and Shepherd,G.M. (1991b). Single odor-sensitive channels in olfactory receptor neurons are also gated by cyclic nucleotides. *J.Neurosci.* 11, 3565-3572.
- Frings,S. (2001). Chemolectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates. *Cell Mol.Life Sci.* 58, 510-519.
- Frings,S., Lynch,J.W., and Lindemann,B. (1992). Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity, and blockage. *J.Gen.Physiol* 100, 45-67.
- Frings,S., Seifert,R., Godde,M., and Kaupp,U.B. (1995). Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15, 169-179.
- Gerstner,A., Zong,X., Hofmann,F., and Biel,M. (2000a). Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina. *J.Neurosci* 20, 1324-1332.

- Gerstner,A., Zong,X., Hofmann,F., and Biel,M. (2000b). Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina. *J.Neurosci* 20, 1324-1332.
- Gordon,S.E. and Zagotta,W.N. (1995). Localization of regions affecting an allosteric transition in cyclic nucleotide-activated channels. *Neuron* 14, 857-864.
- Goulding,E.H., Ngai,J., Kramer,R.H., Colicos,S., Axel,R. et al. (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., and Siegelbaum,S.A. (1994). Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation. *Nature* 372, 369-374.
- Grunwald,M.E., Yu,W.P., Yu,H.H., and Yau,K.W. (1998). Identification of a domain on the beta-subunit of the rod cGMP-gated cation channel that mediates inhibition by calcium-calmodulin. *J.Biol.Chem.* 273, 9148-9157.
- Gu,C., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2003). A conserved domain in axonal targeting of Kv1 (Shaker) voltage-gated potassium channels. *Science* 301, 646-649.
- Harding,J., Graziadei,P.P., Monti Graziadei,G.A., and Margolis,F.L. (1977). Denervation in the primary olfactory pathway of mice. IV. Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section. *Brain Res.* 132, 11-28.
- Hartzell,H.C., Yu,K., Xiao,Q., Chien,L.T., and Qu,Z. (2008). Anoctamin / TMEM16 family members are Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *J.Physiol.*
- Haynes,L.W. (1992). Block of the cyclic GMP-gated channel of vertebrate rod and cone photoreceptors by l-cis-diltiazem. *J.Gen.Physiol* 100, 783-801.
- Haynes,L.W. (1995). Permeation and block by internal and external divalent cations of the catfish cone photoreceptor cGMP-gated channel. *J.Gen.Physiol* 106, 507-523.
- Henn,D.K., Baumann,A., and Kaupp,U.B. (1995). Probing the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 7425-7429.
- Heusser,K. and Schwappach,B. (2005). Trafficking of potassium channels. *Curr.Opin.Neurobiol.* 15, 364-369.
- Horton,A.C. and Ehlers,M.D. (2003). Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40, 277-295.
- Jan,L.Y. and Jan,Y.N. (1990). A superfamily of ion channels. *Nature* 345, 672.
- Jenkins,P.M., Hurd,T.W., Zhang,L., Mcewen,D.P., Brown,R.L. et al. (2006). Ciliary targeting of olfactory CNG channels requires the CNGB1b subunit and the kinesin-2 motor protein, KIF17. *Current Biology* 16, 1211-1216.
- Jespersen,T., Rasmussen,H.B., Grunnet,M., Jensen,H.S., Angelo,K. et al. (2004). Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. *J.Cell Sci.* 117, 4517-4526.

- Jones,D.T. and Reed,R.R. (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244, 790-795.
- Jung,A., Lischka,F.W., Engel,J., and Schild,D. (1994). Sodium/calcium exchanger in olfactory receptor neurones of *Xenopus laevis*. *Neuroreport* 5, 1741-1744.
- Kaneko,H., Mohrlen,F., and Frings,S. (2006). Calmodulin contributes to gating control in olfactory calcium-activated chloride channels. *J.Gen.Physiol* 127, 737-748.
- Kaneko,H., Putzier,I., Frings,S., Kaupp,U.B., and Gensch,T. (2004). Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons. *J.Neurosci.* 24, 7931-7938.
- Kaupp,U.B., Niidome,T., Tanabe,T., Terada,S., Bonigk,W. et al. (1989). Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* 342, 762-766.
- Kaupp,U.B. and Seifert,R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* 82, 769-824.
- Keen,J.E., Khawaled,R., Farrens,D.L., Neelands,T., Rivard,A. et al. (1999). Domains responsible for constitutive and Ca(2+)-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca(2+)-activated potassium channels. *J.Neurosci* 19, 8830-8838.
- Kim,E.Y., Rumpf,C.H., Fujiwara,Y., Cooley,E.S., Van Petegem,F. et al. (2008). Structures of CaV2 Ca<sup>2+</sup>/CaM-IQ domain complexes reveal binding modes that underlie calcium-dependent inactivation and facilitation. *Structure* 16, 1455-1467.
- Kleene,S.J. (1993). Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron* 11, 123-132.
- Kleene,S.J. (2000). Spontaneous gating of olfactory cyclic-nucleotide-gated channels. *J.Membr.Biol.* 178, 49-54.
- Kleene,S.J. (2008). The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chem.Senses* 33, 839-859.
- Kleene,S.J. and Gesteland,R.C. (1991). Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J.Neurosci.* 11, 3624-3629.
- Koch,K.W., Cook,N.J., and Kaupp,U.B. (1987). The Cgmp-Dependent Channel of Vertebrate Rod Photoreceptors Exists in 2 Forms of Different Cgmp Sensitivity and Pharmacological Behavior. *Journal of Biological Chemistry* 262, 14415-14421.
- Korschen,H.G., Illing,M., Seifert,R., Sesti,F., Williams,A. et al. (1995). A 240 kDa protein represents the complete beta subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor. *Neuron* 15, 627-636.
- Kurahashi,T. and Yau,K.W. (1993). Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* 363, 71-74.

- Kwon,H.J., Koo,J.H., Zufall,F., Leinders-Zufall,T., and Margolis,F.L. (2009). Ca extrusion by NCX is compromised in olfactory sensory neurons of OMP mice. *PLoS ONE*. *4*, e4260.
- Leinders-Zufall,T., Rand,M.N., Shepherd,G.M., Greer,C.A., and Zufall,F. (1997). Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J.Neurosci*. *17*, 4136-4148.
- Liang,H., DeMaria,C.D., Erickson,M.G., Mori,M.X., Alseikhan,B.A. et al. (2003). Unified mechanisms of Ca<sup>2+</sup> regulation across the Ca<sup>2+</sup> channel family. *Neuron* *39*, 951-960.
- Liman,E.R. and Buck,L.B. (1994). A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* *13*, 611-621.
- Liu,D.T., Tibbs,G.R., and Siegelbaum,S.A. (1996). Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* *16*, 983-990.
- Liu,M.Y., Chen,T.Y., Ahamed,B., Li,J., and Yau,K.W. (1994). Calcium-Calmodulin Modulation of the Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel. *Science* *266*, 1348-1354.
- Ludwig,J., Margalit,T., Eismann,E., Lancet,D., and Kaupp,U.B. (1990). Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett*. *270*, 24-29.
- Lynch,J.W. and Barry,P.H. (1991). Properties of transient K<sup>+</sup> currents and underlying single K<sup>+</sup> channels in rat olfactory receptor neurons. *J.Gen.Physiol* *97*, 1043-1072.
- Lynch,J.W. and Lindemann,B. (1994). Cyclic nucleotide-gated channels of rat olfactory receptor cells: divalent cations control the sensitivity to cAMP. *J.Gen.Physiol* *103*, 87-106.
- Ma,D. and Jan,L.Y. (2002). ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr.Opin.Neurobiol*. *12*, 287-292.
- Matulef,K. and Zagotta,W.N. (2003). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol*. *19*, 23-44.
- Maylie,J., Bond,C.T., Herson,P.S., Lee,W.S., and Adelman,J.P. (2004). Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and calmodulin. *J.Physiol* *554*, 255-261.
- Menco,B.P. (1980). Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and nasal respiratory epithelial surfaces of frog, ox, rat, and dog. II. Cell apices, cilia, and microvilli. *Cell Tissue Res*. *211*, 5-29.
- Menco,B.P. (1997). Ultrastructural aspects of olfactory signaling. *Chem.Senses* *22*, 295-311.
- Menco,B.P., Bruch,R.C., Dau,B., and Danho,W. (1992). Ultrastructural localization of olfactory transduction components: the G protein subunit Golf alpha and type III adenylyl cyclase. *Neuron* *8*, 441-453.
- Menco,B.P. and Farbman,A.I. (1992). Ultrastructural evidence for multiple mucous domains in frog olfactory epithelium. *Cell Tissue Res*. *270*, 47-56.



- Menini,A. (1999). Calcium signalling and regulation in olfactory neurons. *Curr.Opin.Neurobiol.* 9, 419-426.
- Michalakis,S., Reisert,J., Geiger,H., Wetzels,C., Zong,X.G. et al. (2006). Loss of CNGB1 protein leads to olfactory dysfunction and subciliary cyclic nucleotide-gated channel trapping. *Journal of Biological Chemistry* 281, 35156-35166.
- Molday,R.S., Molday,L.L., Dose,A., Clark-Lewis,I., Illing,M. et al. (1991). The cGMP-gated channel of the rod photoreceptor cell characterization and orientation of the amino terminus. *J.Biol.Chem.* 266, 21917-21922.
- Monod,J., WYMAN,J., and CHANGEUX,J.P. (1965). ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. *J.Mol.Biol.* 12, 88-118.
- Mori,M.X., Vander Kooi,C.W., Leahy,D.J., and Yue,D.T. (2008). Crystal structure of the CaV2 IQ domain in complex with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin: high-resolution mechanistic implications for channel regulation by Ca<sup>2+</sup>. *Structure* 16, 607-620.
- Munger,S.D., Lane,A.P., Zhong,H., Leinders-Zufall,T., Yau,K.W. et al. (2001). Central role of the CNGA4 channel subunit in Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent odor adaptation. *Science* 294, 2172-2175.
- Nache,V., Schulz,E., Zimmer,T., Kusch,J., Biskup,C. et al. (2005). Activation of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channels is highly cooperative. *J.Physiol* 569, 91-102.
- Nakamura,T. and Gold,G.H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325, 442-444.
- Pace,U., Hanski,E., Salomon,Y., and Lancet,D. (1985). Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* 316, 255-258.
- Pate,P., Mochca-Morales,J., Wu,Y., Zhang,J.Z., Rodney,G.G. et al. (2000). Determinants for calmodulin binding on voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *J.Biol.Chem.* 275, 39786-39792.
- Pelosi,P. and Maida,R. (1995). Odorant-binding proteins in insects. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 111, 503-514.
- Peng,C., Rich,E.D., and Varnum,M.D. (2004). Subunit configuration of heteromeric cone cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 42, 401-410.
- Pfeuffer,E., Mollner,S., Lancet,D., and Pfeuffer,T. (1989). Olfactory adenylyl cyclase. Identification and purification of a novel enzyme form. *J.Biol.Chem.* 264, 18803-18807.
- Quandt,F.N., Nicol,G.D., and Schnetkamp,P.P. (1991). Voltage-dependent gating and block of the cyclic-GMP-dependent current in bovine rod outer segments. *Neuroscience* 42, 629-638.
- Reisert,J., Lai,J., Yau,K.W., and Bradley,J. (2005). Mechanism of the excitatory Cl<sup>-</sup> response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron* 45, 553-561.

- Reisert, J. and Matthews, H.R. (1998). Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells. *J.Gen.Physiol* 112, 529-535.
- Reuter, D., Zierold, K., Schroder, W.H., and Frings, S. (1998). A depolarizing chloride current contributes to chemolectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. *J.Neurosci.* 18, 6623-6630.
- Rhoads, A.R. and Friedberg, F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *Faseb Journal* 11, 331-340.
- Rinberg, D., Koulakov, A., and Gelperin, A. (2006). Speed-accuracy tradeoff in olfaction. *Neuron* 51, 351-358.
- Rivera, J.F., Ahmad, S., Quick, M.W., Liman, E.R., and Arnold, D.B. (2003). An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K<sup>+</sup> channels mediates dendritic targeting. *Nat Neurosci* 6, 243-250.
- Ruiz, M., Brown, R.L., He, Y., Haley, T.L., and Karpen, J.W. (1999). The single-channel dose-response relation is consistently steep for rod cyclic nucleotide-gated channels: Implications for the interpretation of macroscopic dose-response relations. *Biochemistry* 38, 10642-10648.
- Ruiz, M. and Karpen, J.W. (1999). Opening mechanism of a cyclic nucleotide-gated channel based on analysis of single channels locked in each liganded state. *J.Gen.Physiol* 113, 873-895.
- Ruiz, M.L. and Karpen, J.W. (1997). Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states. *Nature* 389, 389-392.
- Saimi, Y. and Kung, C. (2002). Calmodulin as an ion channel subunit. *Annu.Rev.Physiol* 64, 289-311.
- Sautter, A., Zong, X., Hofmann, F., and Biel, M. (1998). An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel beta subunit expressed in olfactory neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 4696-4701.
- Schild, D. and Restrepo, D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev.* 78, 429-466.
- Schroeder, B.C., Cheng, T., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134, 1019-1029.
- Seifert, R., Eismann, E., Ludwig, J., Baumann, A., and Kaupp, U.B. (1999). Molecular determinants of a Ca<sup>2+</sup>-binding site in the pore of cyclic nucleotide-gated channels: S5/S6 segments control affinity of intrapore glutamates. *EMBO J.* 18, 119-130.
- Sesti, F., Straforini, M., Lamb, T.D., and Torre, V. (1994). Gating, selectivity and blockage of single channels activated by cyclic GMP in retinal rods of the tiger salamander. *J.Physiol* 474, 203-222.
- Song, Y., Cygnar, K.D., Sagdullaev, B., Valley, M., Hirsh, S. et al. (2008). Olfactory CNG channel desensitization by Ca<sup>2+</sup>/CaM via the B1b subunit affects response termination but not sensitivity to recurring stimulation. *Neuron* 58, 374-386.

- Stern, J.H., Kaupp, U.B., and MacLeish, P.R. (1986). Control of the light-regulated current in rod photoreceptors by cyclic GMP, calcium, and 1-cis-diltiazem. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 1163-1167.
- Tadross, M.R., Dick, I.E., and Yue, D.T. (2008). Mechanism of local and global Ca<sup>2+</sup> sensing by calmodulin in complex with a Ca<sup>2+</sup> channel. *Cell* 133, 1228-1240.
- Takeuchi, H. and Kurahashi, T. (2005). Mechanism of signal amplification in the olfactory sensory cilia. *J.Neurosci* 25, 11084-11091.
- Tareilus, E., Noe, J., and Breer, H. (1995). Calcium signals in olfactory neurons. *Biochim.Biophys.Acta* 1269, 129-138.
- Teasdale, R.D. and Jackson, M.R. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 12, 27-54.
- Tibbs, G.R., Goulding, E.H., and Siegelbaum, S.A. (1997). Allosteric activation and tuning of ligand efficacy in cyclic-nucleotide-gated channels. *Nature* 386, 612-615.
- Tibbs, G.R., Liu, D.T., Leypold, B.G., and Siegelbaum, S.A. (1998). A state-independent interaction between ligand and a conserved arginine residue in cyclic nucleotide-gated channels reveals a functional polarity of the cyclic nucleotide binding site. *J.Biol.Chem.* 273, 4497-4505.
- Tomaru, A. and Kurahashi, T. (2005). Mechanisms determining the dynamic range of the bullfrog olfactory receptor cell. *J.Neurophysiol.* 93, 1880-1888.
- Torre, V., Straforini, M., Sesti, F., and Lamb, T.D. (1992). Different Channel-Gating Properties of 2 Classes of Cyclic Gmp-Activated Channel in Vertebrate Photoreceptors. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 250, 209-215.
- Trudeau, M.C. and Zagotta, W.N. (2003). Calcium/calmodulin modulation of olfactory and rod cyclic nucleotide-gated ion channels. *J.Biol.Chem.* 278, 18705-18708.
- Varnum, M.D., Black, K.D., and Zagotta, W.N. (1995). Molecular mechanism for ligand discrimination of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15, 619-625.
- Varnum, M.D. and Zagotta, W.N. (1997). Interdomain interactions underlying activation of cyclic nucleotide-gated channels. *Science* 278, 110-113.
- Wayman, G.A., Impey, S., and Storm, D.R. (1995). Ca<sup>2+</sup> inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo. *J.Biol.Chem.* 270, 21480-21486.
- Wei, J., Zhao, A.Z., Chan, G.C., Baker, L.P., Impey, S. et al. (1998). Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* 21, 495-504.
- Weiler, E. and Farbman, A.I. (1997). Proliferation in the rat olfactory epithelium: age-dependent changes. *J.Neurosci.* 17, 3610-3622.

- Weitz,D., Ficek,N., Kremmer,E., Bauer,P.J., and Kaupp,U.B. (2002). Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron* 36, 881-889.
- Weitz,D., Zoche,M., Muller,F., Beyermann,M., Korschen,H.G. et al. (1998). Calmodulin controls the rod photoreceptor CNG channel through an unconventional binding site in the N-terminus of the beta-subunit. *EMBO J.* 17, 2273-2284.
- Wesson,D.W., Carey,R.M., Verhagen,J.V., and Wachowiak,M. (2008a). Rapid encoding and perception of novel odors in the rat. *PLoS Biol.* 6, e82.
- Wesson,D.W., Donahou,T.N., Johnson,M.O., and Wachowiak,M. (2008b). Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem.Senses* 33, 581-596.
- Wesson,D.W., Verhagen,J.V., and Wachowiak,M. (2009). Why sniff fast? The relationship between sniff frequency, odor discrimination, and receptor neuron activation in the rat. *J.Neurophysiol.* 101, 1089-1102.
- Weyand,I., Godde,M., Frings,S., Weiner,J., Muller,F. et al. (1994). Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 368, 859-863.
- Williams,D.A., Becker,P.L., and Fay,F.S. (1987). Regional changes in calcium underlying contraction of single smooth muscle cells. *Science* 235, 1644-1648.
- Wong,S.T., Trinh,K., Hacker,B., Chan,G.C., Lowe,G. et al. (2000). Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27, 487-497.
- Xia,X.M., Fakler,B., Rivard,A., Wayman,G., Johnson-Pais,T. et al. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395, 503-507.
- Yan,C., Zhao,A.Z., Bentley,J.K., Loughney,K., Ferguson,K. et al. (1995). Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 9677-9681.
- Yang,Y.D., Cho,H., Koo,J.Y., Tak,M.H., Cho,Y. et al. (2008b). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210-1215.
- Yang,Y.D., Cho,H., Koo,J.Y., Tak,M.H., Cho,Y. et al. (2008a). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210-1215.
- Zerangue,N., Schwappach,B., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K-ATP channels. *Neuron* 22, 537-548.
- Zheng,J., Trudeau,M.C., and Zagotta,W.N. (2002). Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* 36, 891-896.
- Zheng,J., Varnum,M.D., and Zagotta,W.N. (2003). Disruption of an intersubunit interaction underlies Ca<sup>2+</sup>-calmodulin modulation of cyclic nucleotide-gated channels. *J.Neurosci.* 23, 8167-8175.

Zheng,J. and Zagotta,W.N. (2004). Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 42, 411-421.

Zufall,F. and Firestein,S. (1993). Divalent cations block the cyclic nucleotide-gated channel of olfactory receptor neurons. *J.Neurophysiol.* 69, 1758-1768.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

$\tau$	Zerfallskonstante
AM	Acetoxymethyl (-Esther)
ACIII	Adenylylzyclase Typ 3
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
$\text{Ca}^{2+}$	Kalzium-Ionen
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
CaM	Calmodulin
cAMP	3',5',-zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	3',5',-zyklisches Guanosinmonophosphat
CNG	Cyclic Nucleotid-Gated
cNBD	zyklischen-Nukleotid Bindedomäne
EGTA	[Ethylen-bis-(Oxyethylen-Nitrilo)]-Tetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HEK 293-Zellen	Zellen der menschlichen embryonalen Nierezelllinie 293
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
I	elektrischer Strom
$I_{\max}$	Maximalstrom
$\Delta I_D$	Desensibilisierungs-induzierte Stromdifferenz
$I_{nD}$	Reststrom der nicht durch die Desensibilisierung unterdrückt wurde
$\text{K}^+$	Kalium-Ionen
$K_{1/2}$	Aktivierungskonstante
n	Hill-Koeffizient
MDCK-Zellen	Madin-Darby Canine Kidney Zellen
ORN	olfaktorische Rezeptorneurone
$P_o$	Öffnungswahrscheinlichkeit
PDE	Phosphodiesterase
RFP	Rot fluoreszierendes Protein

## 7 Publikationen

### Bereits veröffentlichte Publikation:

Waldeck, C., Frings, S. 2005. „Die molekularen Grundlagen der Geruchswahrnehmung - Wie wir riechen, was wir riechen“ *Biol. Unserer Zeit*. 5: 302-305.

### Kongressbeiträge:

Waledck C., Vocke K., Ungerer N., Frings S., Möhrle F.; “Molecular mechanism of calmodulin-mediated fast desensitization of olfactory CNG-Channels” Biophysical Discussions, “Calmodulin Modulation of Ion Channels“, 30. Oktober – 2. November, 2008 Asilomar/California (Poster)

Hengl T., Vocke K., Kaneko H., Waldeck C., Hagen V., Frings S., Möhrle F.; “Odora: A model cell line for chlorid based signal amplification” 25th Blankenese Conference, „Sensory Signalling and Information Processing“, 25. – 29. Mai 2008, Hamburg. (Poster)

Kaneko H., Waldeck C., Möhrle F.; „Calmodulin contributes to gating control in olfactory calcium-activated chloride channels” Gordon Research Conference “Ligand Recognition & Molecular Gating”, 11. - 16. Juni 2006, Il Ciocco, Italien. (Poster)

### Publikation in Vorbereitung:

Waledck C., Vocke K., Ungerer N., Frings S., Möhrle F.; (2009) “Activation and Desensitization of the Olfactory cAMP-gated Transduction Channel - Identification of Functional Modules” *Plos Biology*, under revision.