

Calmodulin-vermittelte
Desensibilisierung
des olfaktorischen CNG-Kanals

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom Biologin Nicole Ungerer
Juli 2009

Calmodulin-vermittelte
Desensibilisierung
des olfaktorischen CNG-Kanals

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom Biologin Nicole Ungerer
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zoologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg in der Zeit von Januar 2006 bis Juli 2009 unter Anleitung von Prof. Dr. Stephan Frings angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Stephan Frings

PD Dr. Ralf Bischoff

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,

Nicole Ungerer

Danksagung

Mein Dank gilt **allen** Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Physiologie des Instituts für Zoologie für die gute Zusammenarbeit im Laufe der letzten Jahre.

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Stephan Frings für die Überlassung des bearbeiteten Themas und für sein Interesse an dieser Arbeit. Seine stete Diskussionsbereitschaft hat sehr zum Gelingen beigetragen,
- PD Dr. Ralf Bischoff, DKFZ, Heidelberg, für die Übernahme des Koreferats und die Diskussionsbereitschaft,
- Dr. Frank Möhrlen für die ständige Hilfsbereitschaft, laborpraktische Beratung und Korrektur-Lesearbeiten,
- Dr. Sandro Keller, FMP, Berlin-Buch, für die Möglichkeit CD spektroskopische Messungen durchführen zu können,
- Dr. Norbert Mücke, DKFZ, Heidelberg, für zahlreiche Anregungen, seine stete Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei der Durchführung der analytischen Ultrazentrifugationen,
- Dipl. Ing. Jana Bröcker, FMP, Berlin-Buch für die Hilfe bei der Durchführung CD spektroskopischer Experimente,
- Diplom Biologe Clemens Prinz zu Waldeck für viele wertvolle Anregungen und seine große Hilfsbereitschaft,
- Dr. Daniel F. Gilbert für seine stete Unterstützung, wertvolle Tipps bei der Datenanalyse und Hilfe bei Korrektur-Lesearbeiten,
- Diplom Biologin Kerstin Vocke für die nette und fruchtbare Zusammenarbeit,

- Dr. Frank W. Pfrieger, Centre de Neurochimie, Strasbourg, für seine Diskussionsbereitschaft und Korrektur-Lesearbeiten
- Tanja Kellner für ihre kompetente Hilfe bei molekularbiologischen Arbeiten und die angenehme Laboratmosphäre,
- Christine Füllung und Diplom Biologin Graciela Delgado de Moissl für ihre Unterstützung bei Laborarbeiten,
- Tilman Ellwanger für die Hilfe bei der Proteinexpression im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit,
- Michaela Pfitzner, die mit fluoreszenzspektroskopischen Messungen im Rahmen ihrer Diplomarbeit zu dieser Arbeit beigetragen hat,
- Philipp Janz für seine ausgezeichnete Unterstützung im Rahmen seiner Bachelorarbeit,
- Dr. Ulrich Mayer für seine überragende Kollegialität und freundschaftliche Atmosphäre
- Dr. Daniel Klimmeck für die nette Zusammenarbeit und viele interessante Gespräche
- Meinen Kindern Sebastian und Valerian für ihre Geduld und ihr humorvolles Wesen

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung/Summary	1
II	Einleitung	3
1.1	Physiologische Bedeutung von Ionenkanälen im sensorischen System	3
1.2	Das olfaktorische System der Landwirbeltiere	4
1.2.1	Aufbau des olfaktorische Epithels	
1.2.2	Mechanismus der olfaktorischen Signaltransduktion	5
1.2.3	Mechanismen des Abschaltens des olfaktorischen Signalweges	7
1.3	Die Desensitisierung des olfaktorischen CNG-Kanals bei der Duftstoffdetektion	10
1.3.1	Die schnelle Desensitisierung bei der Regulation kurzer Ca^{2+} -Signale	10
1.3.2	Die mögliche Rolle der schnellen Desensitisierung beim Schnüffeln	10
1.3.3	Arbeitshypothese	11
1.4	Struktur und Funktion von CNG – Kanälen	12
1.5	Struktur und Funktion von Calmodulin	15
1.6	Calmodulin - Interaktion mit Calmodulin - Bindemotiven des olfaktorischen CNG – Kanals	18
1.7	Ziel der Arbeit	22
III	Material und Methoden	23
1	Chemikalien und Geräte	23
1.1	Chemikalien	23
1.2	Geräte	23
2	Verbrauchsmaterialien	24
2.1	Produkte für die Durchführung molekularbiologischer Arbeiten	24
2.2	Produkte für die Durchführung von Proteinarbeiten	25
3	Oligonukleotide	25
3.1	Oligonukleotide für die Fusionsproteine	26
3.2	Oligonukleotide für die Sequenzierung	26
3.3	Oligonukleotide für die cDNA - Synthese	26
3.4	Oligonukleotide für die Mutagenese	26
4	Bakterienstämme	27
5	Plasmide	27
6	Enzyme	28
7	Größenstandards und Antikörper	28

7.1	Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese	28
7.2	Größenstandard für die SDS-PAGE	29
7.3	Antikörper	29
8	Protease Inhibitoren	29
9	Peptide	29
10	Verwendete Software und Datenbanken	30
11	Molekularbiologische Methoden	31
11.1	Klonierungsstrategie zur Herstellung von Fusionsproteinen	31
11.2	Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	32
11.2.1	Kultivierung von Flüssig-Bakterienkulturen	33
11.2.3	Agarose – Gelelektrophorese	33
11.2.4	RNA - Isolierung aus olfaktorischem Epithel	33
11.3	Transformation von <i>E.coli</i> durch Elektroporation	34
11.3.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	34
11.3.2	Transformation elektrokompenter <i>E.coli</i> – Stämme	35
11.3.3	Chemische Transformation von <i>E.coli</i> XL10 - Gold [®]	35
11.4	Kultivierung von Flüssig - Bakterienkulturen	35
11.5	Kultivierung auf Agarplatten zur Bakterienselektion	36
11.5.1	Herstellung der Agarplatten	36
11.5.2	Kultivierung auf Agarplatten und Selektion der Rekombinanten	36
11.6	Präparation extrachromosomaler DNA	36
11.7	Agarose - Gelelektrophorese	37
11.8	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	37
11.9	DNA – Sequenzierung	38
11.10	Klonierung die Expression der Fusionsproteine in pET28a(+)	38
11.11	PCR Standardprotokoll für die Klonierung in pGEMT[®]	38
11.12	Synthese eines A - Überhangs und Klonierung in pGEMT[®]	39
11.13	Restriktion und Reinigung der in pGEMT[®] amplifizierten DNA	40
11.14	Restriktion und Dephosphorylierung des Expressionsvektors pET28a(+)	41
11.15	Ligation der DNA-Fragmente mit pET28a(+)	41
11.16	Zielgerichtete Mutagenese	42
11.17	mRNA - Isolierung aus olfaktorischem Epithel	43
11.18	cDNA – Synthese	44
12	Biochemische Methoden	45
12.1	Lösungen für biochemische Arbeiten	45
12.1.1	Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese	45

12.1.2	Lösungen für die Western Blot - Analyse	46
12.1.3	Proteinbestimmung nach der Amidoschwarz – Methode	47
12.1.4	Bradford Proteinbestimmung	47
12.2	Trennung von Proteinen durch Polyacrylamid – Gelelektrophorese	47
12.2.1	Denaturierende SDS - PAGE	47
12.2.2	Native PAGE	48
12.3	Western Blot Analyse: Transfer und Immobilisierung von Proteinen	49
12.4	Immunologischer Nachweis der Meerrettich - Peroxidase Aktivität	50
12.5	Methoden der Proteinbestimmung	51
12.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	51
12.5.2	Die Amidoschwarz – Methode	51
12.5.3	Bestimmung der optischen Dichte am Absorptionsmaximum	52
13	Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine	53
13.1	Das pET28a(+)/ <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS Expressionssystem	53
13.1.1	Standard-Kultivierung von <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS bei der Expression	53
13.1.2	Kultivierung von <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS für die Expression von CNG A4I	54
13.2	Aufreinigung der Fusionsproteine	54
13.2.1	Lösungen für die Standard – Proteinaufreinigung	54
13.2.2	Lösungen für die Proteinaufreinigung von CNG A4I	55
13.2.3	Lyse der Bakterien	55
13.2.4	Isolation der Fusionsproteine mittels Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatographie	56
13.2.5	Isolation von CNG A4I mittels Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatographie	57
13.3	Dialyse der Eluate	57
13.4	Lyophilisierung	57
14	Spektroskopische Methoden	58
14.1	Physikalische Grundlagen der Absorptionsspektroskopie	58
14.2	Lösungen für die Spektroskopie	61
14.3	Zirkulardichroismus (<i>circular dichroism</i>, CD) Spektroskopie	62
14.3.1	Messung von CD Mischspektren zur Analyse von Proteininteraktion	64
14.3.2	Analyse von CD Spektroskopie Daten	65
14.4	Fluoreszenzspektroskopie	66
14.4.1	Einfluß des Lösemittels auf die Fluoreszenz	68
14.4.2	Einfluß der Proteinstruktur auf die Fluoreszenz	69
14.4.3	Badankopplung von CaM ^{T35C}	69
14.4.4	Bestimmung der Ca ²⁺ - Abhängigkeit von Protein - Protein Interaktionen	70
14.4.5	Einfluß der Peptidbindung auf die Ca ²⁺ - Affinität des Calmodulins	71
14.4.6	Analyse der Fluoreszenzspektroskopie Daten	71
14.5	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	72
14.5.1	Physikalische Grundlagen der Sedimentation	73
14.5.2	AUZ zur Analyse löslicher Molekülkomplexe	76

14.5.3	Analyse der AUZ – Daten	76
IV	Ergebnisse	77
1	Gewinnung rekombinanter Proteine	79
2	Überprüfung der Faltung und Homogenität der heterolog exprimierten Proteine	83
2.1	Analyse der Einzel CD - Spektren von CaM bei 0 und 30 μM Ca^{2+}	83
2.2	Analyse der Einzel CD-Spektren von CaM, CaM ¹² , CaM ³⁴ und CaM ¹²³⁴	85
2.3	Analyse der CD-Einzelspektren der CNG-Kanalpeptide	88
2.4	Analyse des Sedimentationsprofils von CaM und den CaM-Mutanten	90
2.5	Analyse des Sedimentationsprofils von den CNG-Kanalpeptiden A4, A4I, B1b, B1bII und B1bI	92
2.6	Zusammenfassung zur Überprüfung der Faltung und Homogenität	94
3	Analyse der Interaktion von CaM und CaM - Mutanten mit Peptiden des olfaktorischen CNG - Kanals mit CD – Spektroskopie	96
3.1	Interaktion von CaM mit A4, A4I, B1b, B1b ^{LE} und B1bI	96
3.2	Interaktion von CaM ¹² und CaM ³⁴ mit A4I, B1b, B1b ^{LE} und B1bI	99
3.3	Interaktion von CaM ¹²³⁴ mit A4I, B1b, B1b ^{LE} und B1bI	101
3.4	Zusammenfassende Darstellung der CD - spektroskopischen Analyse	103
4	Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Ca^{2+}-abhängigen Calmodulin -Interaktion	104
4.1	A4 - Badan Bindung an CaM, CaM ¹² , CaM ³⁴ und CaM ¹²³⁴	104
4.2	A4 ^{LE} -Badan Bindung an CaM, CaM ¹² , CaM ³⁴ und CaM ¹²³⁴	106
4.3	CaM ^{Badan} Bindung an A4 und A4 ^{LE}	108
4.4	B1b-Badan Bindung an CaM, CaM ¹² , CaM ³⁴ und CaM ¹²³⁴	111
4.5	B1b ^{LE} - Badan Bindung an CaM, CaM12, CaM34 und CaM1234	113
4.6	CaM ^{Badan} Bindung an B1b und B1b ^{LE}	115
4.7	CaM ^{Badan} Bindung an A4I und B1bI	117
4.8	CaM ^{F20W} und CaM ^{F93W} Bindung an A4 ^{-W} und B1b	119
4.8.1	CaM ^{Badan} Bindung an A4 ^{-W}	119
4.8.2	CaM ^{F20W} Bindung an B1b und A4 ^{-W}	121
4.8.3	CaM ^{F93W} Bindung an B1b und A4 ^{-W}	123
4.9	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie	125

5	Analyse der Stöchiometrie löslicher Komplexe aus Calmodulin und den Peptiden des olfaktorischen CNG - Kanals	127
5.1	Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Stöchiometrie	128
5.1.1	5.1.1 Stöchiometrie des CaM-A4-B1b Komplex	128
5.1.2	5.1.2 Stöchiometrie des CaM-A4I-B1bI Komplex	130
5.2	Analytische Ultrazentrifugation zur Analyse der Stöchiometrie	132
5.2.1	Stöchiometrie des CaM-A4-B1b Komplex	132
5.2.2	Stöchiometrie des CaM - A4I - B1bI Komplex	134
5.3	Zusammenfassung aller Resultate zur Stöchiometrie	138
V	Diskussion	140
1	Interaktion der LQ - und LE - Peptide mit Calmodulin	141
2	Kanalmodell der Calmodulin - vermittelten Desensibilisierung	146
3	Strukturelle Analyse der Calmodulin – Peptidkomplexe	150
4	Einfluss der Peptidlänge auf die Interaktion mit Calmodulin und Calmodulin - Mutanten	154
5	Einfluss der LQ - Bindestelle auf die Ca²⁺ - Abhängigkeit der Calmodulinbindung	156
6	Ausblick	157
VI	Literaturverzeichnis	158
VII	Abkürzungsverzeichnis	178
VIII	Anhang	183
1	Sequenzen der Fusionsproteine	183
1.1	CNG - Kanalproteine	183
1.2	Calmodulin – Mutanten	183
1.3	OMP (<i>olfactory marker protein</i>)	184
2	Nukleinsäuresequenzen	184
2.1	Klonierung der CNG – Kanalproteine	184
2.2	Klonierung der CaM - Mutanten	184
2.3	DNA zur Klonierung des OMP – Proteins	185
3	Publikationen und Kongreßbeiträge	186

I Zusammenfassung

Das Riechsystem erlaubt Tieren unter einer Vielzahl von Duftstoffen zu unterscheiden, was der Nahrungssuche, aber auch der Identifikation von Partnern oder Feinden, dient. Die Desensibilisierung des olfaktorischen CNG - Kanals spielt dabei eine wichtige Rolle. Sie hilft bei der Beendigung der Reizantwort nach Bindung von Duftstoffmolekülen an die Rezeptoren der Riechneurone und dient so der Wiederherstellung des Ruhepotentials. Dies bildet die Voraussetzung für die schnelle Wiedererregbarkeit der Riechneurone, wodurch andauernde Adaptation verhindert wird. Die Bindung von Duftstoffen an G - Protein gekoppelte Rezeptoren in der Cilienmembran der Riechneurone führt zur Bildung von cAMP, das olfaktorische CNG - Kanäle öffnet, was zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle führt. Ca^{2+} dient unter anderem der Aktivierung des Ca^{2+} -aktivierten Cl^- - Kanals, der die Signalantwort durch den Ausstrom von Cl^- verstärkt, wodurch Aktionspotentiale erst möglich sind. Eine Akkumulation von Ca^{2+} kann durch negative Rückkopplungsmechanismen zur längerfristigen Adaptation des Riechneurons führen. In dieser Arbeit konnte ein molekulares Modell entwickelt werden, das zeigt, wie Calmodulin den Ca^{2+} -Einstrom durch die Desensibilisierung des CNG - Kanals vorübergehend begrenzt und so die längerfristige Adaptation verhindert. Frühere Untersuchungen konnten nachweisen, dass die Calmodulin - Bindung an die LQ - Bindestellen der Untereinheiten CNG B1b und CNG A4 für die schnelle Desensibilisierung des Kanals verantwortlich ist. Das in dieser Arbeit erarbeitete Modell zeigt durch Protein - Interaktionsstudien mit spektroskopischen Methoden, dass Calmodulin bereits beim Ruhepotential des Riechneurons an die CNG B1b Untereinheit des Kanals assoziiert ist. Nach der Aktivierung des Kanals bindet in die Zelle einströmendes Ca^{2+} an Calmodulin, dessen Konformationsänderung die Interaktion mit der CNG A4 Untereinheit und somit das vorübergehende Schließen des Kanals vermittelt. Es konnte auch die Ca^{2+} - Abhängigkeit dieses Mechanismus erarbeitet werden. Die Proteininteraktionsstudien zeigen auch, wie die Ca^{2+} - Affinität und die Bindeeigenschaften des Calmodulins bei der Wechselwirkung mit verschiedenen Peptiden der CNG B1b und - A4 - Untereinheit beeinflusst werden. Es wurden außerdem die LQ - Calmodulin - Bindemotive näher charakterisiert. Die Aminosäuren Leucin (L) und Glutaminsäure (Q) des LQ - Motivs sind nicht, wie angenommen, für die Calmodulinbindung verantwortlich, sondern beeinflussen die Ca^{2+} - Abhängigkeit der Wechselwirkung. Diese Arbeit erweitert bisherige Erkenntnisse, wie die Aktivierbarkeit von Ionenkanälen durch Calmodulin reguliert wird und zeigt, wie beim Riechen die Desensibilisierung des CNG - Kanals die Antwortbereitschaft der Riechneurone erhöht.

I Summary

The olfactory system enables animals to discriminate stimuli from a variety of odor sources, thereby allowing foraging as well as identification of predators and partners for reproduction. In olfactory signal transduction the desensitization of the olfactory CNG channel plays a key role. CNG channel desensitization facilitates response termination upon activation of olfactory receptors and helps restoring the resting potential of the olfactory sensory neuron (OSN). The desensitization of the CNG channel therefore sets the conditions required for repeated excitation and prevents long-term adaptation of the OSN. Binding of odour molecules to ciliary G protein-coupled receptors results in an increase of the intracellular [cAMP]. This in turn triggers the opening of CNG channels, leading to the influx of Ca^{2+} . Increased $[\text{Ca}^{2+}]$ activates calcium-activated Cl^- -channels. This results in an outward-directed Cl^- current that enhances the depolarization of the neuron thus enabling the generation of action potentials. Prolonged activation of CNG channels may lead to the accumulation of $[\text{Ca}^{2+}]$ and long-term adaptation of the OSN. Former studies have shown that calmodulin-binding to the LQ-binding motifs of the subunits CNG B1b and CNG A4 is responsible for the fast desensitization of this channel. This mechanism prevents intraciliary Ca^{2+} -accumulation but an appropriate mechanistic model has not yet been provided. The aim of this thesis was to design a molecular model that accurately describes the interaction of CaM with the LQ-binding sites of CNG B1b and A4. For this purpose CaM interaction studies with peptides of the LQ-binding sites have been performed using spectroscopic techniques. The molecular model created in this thesis shows that CaM is associated with CNG B1b at resting potential. Upon channel activation Ca^{2+} that enters the cilium bind to CaM, resulting in a conformational change that allows CaM-binding to CNG A4. The channel closes and is for a certain period insensitive to cAMP. To elucidate the Ca^{2+} -dependency of this mechanism, the interactions of CaM/ Ca^{2+} and LQ-peptides were analysed in dose-response experiments. Furthermore it was investigated how the Ca^{2+} affinity and binding properties of CaM are affected by the interaction. Moreover the role of leucin (L) and glutamic acid (Q) of the LQ-motif has been examined. It has been hypothesized that these aminoacids are responsible for CaM-binding. Interaction studies with CaM and the corresponding LE-mutants could show that the Ca^{2+} -dependency is affected but that CaM-binding is not prevented. Altogether this work broadens the existing knowledge how calmodulin modulates ion channel activation. Moreover, the model designed explains how the fast desensitization of the olfactory CNG channel enables response termination after odour stimulation of OSNs and thus helps to prevent long-term adaptation of these neurons.

Einleitung

1 Physiologische Bedeutung von Ionenkanälen im sensorischen System

Unter dem Begriff sensorisches System werden Strukturen bezeichnet, die der Erfassung, Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen aus der Umgebung dienen, aber auch Informationen über den Zustand der Körperoberfläche, des Bewegungsapparats und der inneren Organe vermitteln. Die Reize aus der Umwelt oder dem Inneren des Körpers werden dabei über Rezeptoren sensorischer Zellen wahrgenommen. Sensorische Zellen oder Sinneszellen sind Nerven- oder Epithelzellen, die Reize in Abhängigkeit von deren Sinnesmodalität detektieren (Campbell, 1997; Müller & Frings, 2006). Die Übersetzung eines Reizes in elektrische Erregung und die Generierung sensorischer Signale wird als Signaltransduktion bezeichnet und von Ionenkanälen, makromolekularen Poren in der Zellmembran vermittelt (Strock, 2004). Die Poren leiten Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran. Diese Ionenströme bilden das sogenannte Rezeptorpotential und können schließlich in Neuronen Aktionspotentiale auslösen (Abb. 1).

Die Sinnesmodalität eines Reizes ist von seinen physikalischen Eigenschaften abhängig: Geruchsstoffe stimulieren zum Beispiel Riechneurone in der Riechschleimhaut, Licht Photorezeptoren in der Netzhaut und Schall Haarsinneszellen im Innenohr (Abb. 2).



Abb.1: Schematische Darstellung zur Verarbeitung von Reizen.

Im Riechsystem dienen Ionenkanäle der Kodierung und Modulation der Duftstoffinformation. Die Duftstoffmoleküle binden an die Rezeptoren primärer, bipolarer Riechneurone (*olfactory sensory neurons*, OSNs). Die Bindung bewirkt durch das Öffnen von Transduktionskanälen Ionenströme, die die Zelle erregen und Aktionspotentiale auslösen (Kawai et al., 1997; Duchamp-Viret et al., 1999). Ionenkanäle dienen hier als Signalwandler, die das chemische Signal in ein elektrisches Signal umwandeln, ein Vorgang, den man als chemoelektrische Transduktion bezeichnet (Firestein, 1992; Kurahashi & Yau, 1993; Schild & Restrepo, 1998; Zagotta & Siegelbaum, 1996).

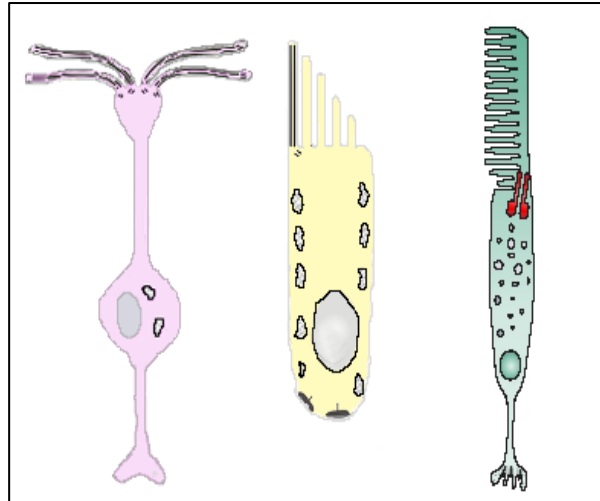


Abb.2: Schematische Zeichnung sensorischer Zellen. (Links) Riechneuron. (Mitte) Haarsinneszelle (Rechts) Photorezeptor - Neuron.

2 Das olfaktorische System der Landwirbeltiere

2.1 Aufbau des olfaktorische Epithels

Das olfaktorische System der Landwirbeltiere besteht wie alle sensorischen Systeme aus einem peripheren und einem zentralen Anteil. Die Anatomie und Struktur (Abb. 3) des Riechepithels reflektiert in hohem Maße seine Fähigkeit zwischen einer Vielzahl unterschiedlicher Geruchsstoffe zu diskriminieren (Firestein, 2001).

Die chemoelektrische Transduktion der Duftstoffinformation findet in den olfaktorischen Cilien statt. Dort befinden sich unter Anderem die Proteine für die olfaktorische Signaltransduktion. Die Cilien entspringen dem dendritischen Knopf der Riechneurone und liegen im Nasenraum eingebettet in den Mukus der Riechschleimhaut. Dort bilden sie eine große Oberfläche und repräsentieren die erste Station der Duftstoffdetektion (Menco, 1980; Buck & Axel, 1991). Der Mukus liefert die für den Riechvorgang notwendigen Elektrolyte und hydrophile Bindeproteine (Pelosi, 1994) für die Bindung der überwiegend hydrophoben Duftmoleküle. Er wird von Drüsenzellen, den Bowman - Drüsen, in den Nasenraum sezerniert.

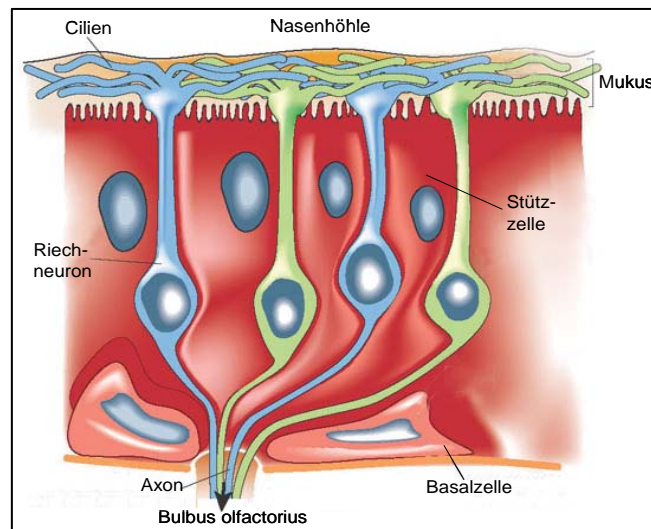


Abb. 3: Schematische Darstellung des Riechepithels. (Mod. Firestein, 2001).

Die Zellkörper der Riechneurone sind eingebettet in eine Schicht palisadenartig angeordneter Stützzellen, die das Riechepithel zur Nasenhöhle hin abgrenzen und die Neurone in einer stabilen Position halten. Sie besitzen außerdem ähnliche Eigenschaften wie die Gliazellen des Zentralnervensystems. Sie puffern das extrazelluläre Milieu (Trotier, 1998; Getchell & Mellert, 1991; Getchell & Getchell, 1982) und phagozytieren abgestorbene Riechneurone, denn die Lebenszeit der Riechneurone ist auf nur etwa vier Wochen begrenzt (Breipohl et al., 1986; Farbman, 1990). Basalzellen, die unterhalb der Stützzellen liegen, dienen zeitlebens als Stammzellen olfaktorischer Neurone (Breipohl et al., 1986; Carr & Farbman, 1993).

Die Axone der Riechneurone münden gebündelt im Riechkolben (*Bulbus olfactorius*), der ersten Station zentralnervöser Verarbeitung. 100 - 1000 Axone von Riechneuronen gleicher Duftstoffselektivität konvergieren dort auf eine Mitralzelle. Die Axone der Mitralzellen projizieren durch den *Tractus olfactorius* in die Riechrinde (*piriformer Cortex*). Vom piriformen Cortex gelangt die Information dann weiter über den Thalamus zum olfaktorischen Cortex.

2.2 Mechanismus der olfaktorischen Signaltransduktion

Die Duftstoffdetektion (Abb. 4, grüne Pfeile) beginnt, wenn Duftstoffmoleküle aus der Atemluft an G - Protein gekoppelte Riechrezeptoren der Cilienmembranen binden (Buck & Axel, 1991; Breer et al., 1994; Zufall et al., 1994; Freitag et al., 1998; Schild & Restrepo, 1998). Die nach Aktivierung des olfaktorischen G - Proteins (G_{olf} ; Jones & Reed, 1989) dissoziierte α - Untereinheit stimuliert eine membranständige Typ III - Adenylatzyklase

(AC III; Pace et al., 1985; Pfeuffer et al., 1989; Bakalyar & Reed, 1990), die den sekundären Botenstoff cAMP synthetisiert. Durch den Anstieg der intrazellulären cAMP - Konzentration (Sklar et al., 1986; Breer et al., 1990; Lowe & Gold, 1993) öffnen zyklisch - Nukleotid gesteuerte Kationenkanäle (CNG - Kanäle) in der Cilienmembran (Nakamura & Gold, 1987; Firestein et al., 1991; Frings et al., 1992) und leiten neben Natrium - Ionen überwiegend Calcium - Ionen in das ciliäre Lumen (Dzeja et al., 1999). Die daraus resultierende Depolarisierung der Membran spielt eine untergeordnete Rolle, entscheidend ist der Anstieg der ciliären Calcium - Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ von etwa 40 nM (Bradley et al., 2005; Leinders-Zufall et al., 1998) in den mikromolaren Bereich. Dieser bewirkt die Öffnung Ca^{2+} -aktivierter Chlorid - Kanäle und den Ausstrom von Chlorid - Ionen (Cl^-), der etwa 80% des Rezeptorstroms trägt. Die Ursache für den Cl^- -Efflux in ORNs liegt in der hohen intrazellulären Cl^- -Konzentration im Bereich der Cilien (Reuter et al., 1998; Kaneko et al., 2004; Reisert et al., 2005). Die Depolarisierung der Cilienmembran durch das Öffnen der CNG - Kanäle wird also wesentlich durch den Ausstrom von Cl^- verstärkt und führt schließlich zur Auslösung von Aktionspotentialen (Kawai et al., 1997; Duchamp - Viret et al., 1999).

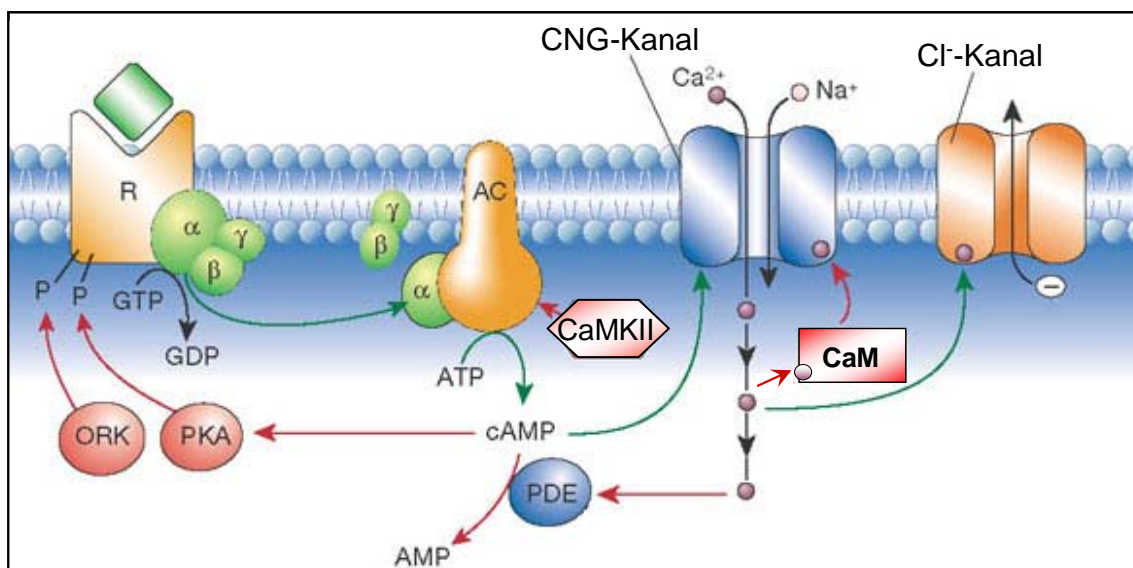


Abb. 4: Schematische Darstellung der olfaktorischen Signaltransduktion in Riechneuronen. (**Grüne Pfeile**): Excitatorische Wege. Die Bindung eines Duftstoffmoleküls (**dunkelgrünes Rechteck**) an den G - Protein gekoppelten Riechrezeptor (**R**) führt zur Dissoziation des G - Proteins (**grüne Kreise, αβγ**). Die α - Untereinheit des G - Proteins (**α**) aktiviert die membranständige Adenylzyklase Typ III (**AC**), die cAMP aus ATP synthetisiert. In Folge der Bindung von cAMP öffnen olfaktorische CNG - Kanäle (**CNG - Kanal**). Der Einstrom von Ca^{2+} (**violett**) öffnet Ca^{2+} -aktivierte Chlorid - Kanäle (**Cl⁻ - Kanal**). Ca^{2+} -Einstrom und Cl^- -Ausstrom führen zur Depolarisation der Zelle. (**Rote Pfeile**): Inhibitorische Wege. Das Ca^{2+} -Bindeprotein (**CaM**) Calmodulin desensitiviert den CNG - Kanal für cAMP; die Ca^{2+} / CaM - Kinase II (**CaMKII**) desensitiviert durch Phosphorylierung die AC III. Ca^{2+} aktiviert eine Phosphodiesterase (**PDE**), die in Folge cAMP hydrolysiert. Rezeptorkinasen (**ORK**): G - Protein gekoppelte Rezeptorkinase; **PKA**: Protein Kinase A) werden durch cAMP aktiviert und phosphorylieren den Riechrezeptor (mod. Firestein, 2001; zur Inhibition siehe Kap. 1.2.3 und Tab. 1).

2.3 Mechanismen des Abschaltens des olfaktorischen Signalweges

Das Abschalten der olfaktorischen Signaltransduktionskaskade beruht auf mehreren negativen Rückkopplungsmechanismen (Abb. 4, rote Pfeile), die durch den Einstrom von Ca^{2+} verursacht werden (Schild & Restrepo, 1998; Menini, 1999; Firestein, 2001; Matthews & Reisert, 2003; Menini et al., 2004). Diese inhibitorischen Effekte verändern vorübergehend die Sensitivität des Riechneurons für Duftstoffe. Ein sehr wichtiger Aspekt ist, daß ihr Auftreten und ihre Dauer wesentlich von der molekularen Identität (Köster, 1971; Dalton et al., 1997; Wysocki et al., 1997), der Konzentration (Firestein, 2001; Dalton, 2000; Reisert & Matthews, 2000; Firestein et al. 1993; Stone et al., 1972), der Länge der Expositionszeit mit einem Duftstoff (Colbert & Bargmann, 1995; Wuttke, 1999; Wuttke & Tompkins, 2000) und letztendlich auch von seiner Verweildauer im sensorischen Gewebe (*odorant clearance*, Dalton, 2000) abhängt. Verschiedene Mechanismen der Inhibition ermöglichen dem Riechneuron demnach dynamisch auf die Stimulation mit Duftstoffen zu reagieren (*concept of a tuning curve*, Firestein, 2001).

Bei der Beendigung der Reizantwort wird die Sensitivität des olfaktorischen CNG - Kanals für cAMP durch die sekundären Botenstoffe Ca^{2+} und Calmodulin moduliert. Öffnet der Kanal in Folge von cAMP - Bindung reicht bereits eine lokale Konzentration von etwa 100 nM Ca^{2+} aus, um den Kanal innerhalb von 500 ms zu schließen (Bradley et al., 2004). Die Ca^{2+} / Calmodulin - Bindung verhindert dabei, vermutlich durch sterische Effekte, die weitere cAMP - Bindung. Diese schnelle Desensibilisierung wurde unter Riechforschern lange Zeit als der maßgebliche Mechanismus für die Adaptation der Riechneurone in Folge wiederholter Stimulation mit Duftstoffen angesehen (Biel, 2009; Song et al., 2008; Boccaccio et al., 2006; Leinders-Zufall et al., 1999). Dies widerlegen jedoch elektrophysiologische Messungen und direkte elektro - olfaktometrische Ableitungen an Neuronen genetisch veränderter Mäuse, deren CNG B1b - Untereinheit (siehe Kap. 1.4) eine Deletion der Calmodulin LQ - Binde-domäne trägt: Die Neurone adaptieren normal in Folge wiederholter Stimulation durch Duftstoffe, aber zeigen entgegen der Erwartung eine langsamere Beendigung der Reizantwort und somit verzögerte Wiederherstellung des Ruhepotentials. Daher generieren diese Neurone weniger Aktionspotentiale pro Zeiteinheit, was eine verminderte Übertragungsrate olfaktorischer Information zum Bulbus olfactorius zur Folge hat (Biel, 2009; Song et al., 2008).

Die Inhibition von Riechneuronen lässt sich also nach Dauer und Funktion in zwei Phasen unterteilen: (1) Die Desensitisierung, die innerhalb von Millisekunden die sofortige Beendigung der Signalkaskade zur Folge hat (*response termination*) und die Zelle sofort in eine erneute Antwortbereitschaft zurückversetzt (*response recovery*). (2) Die Adaptation der Zelle, die mehrere Minuten andauern kann und bewirkt, daß bei andauernder oder wiederholter Stimulation durch einen Duftstoff die Sensitivität gegenüber diesem Duftstoff verringert ist. Der Grad der Adaptation bezeichnet einerseits die Erhöhung der Reizschwelle bei erneuter Applikation des gleichen Duftstoffes (*elevation in odor threshold*, Dalton, P., 2000), andererseits den Zeitraum bis das System in das ursprüngliche Gleichgewicht zurückfindet (*rate of recovery*). Eine Übersicht über einige der bis zum aktuellen Zeitpunkt bekannten Mechanismen der Inhibition, die auf dem Einstrom von Ca^{2+} beruhen, gibt Tabelle 1.

Tab. 1: Inhibitorische Mechanismen, die auf dem Einstrom von Ca^{2+} in die Cilien der Riechneurone beruhen.

Zielprotein	Mediatorprotein	Funktion	Referenz
Riechrezeptor (OR)	Proteinkinase A (PKA)	Phosphorylierung des Rezeptors	Boekhoff & Breer, 1992
	G - Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK)		Dawson et al., 1993 Schleicher et al., 1993 Peppel et al., 1997
	β - Arrestin 2	Rezeptor - Endozytose	Ferguson, 2001 Mashukova et al., 2006 zur Übersicht auch: Menco, 2005
Adenylylcyclase III (ACIII)	Ca^{2+} / CaM - Kinase II (CaM KII)	Phosphorylierung der AC III, Reduktion der cAMP - Produktion	Wei et al., 1996 & 1998 Leinders - Zufall et al., 1999
	G - Protein Regulatorproteine (RGS)	Desensitisierung der AC III	Sinnarajah et al., 2001
CNG - Kanal	Calmodulin und möglicherweise andere bisher nicht identifizierte Ca^{2+} -Bindeproteine	Verringerung der cAMP - Sensitivität	Zufall et al. 1991 Kramer & Siegelbaum, 1992 Lynch & Lindemann, 1994 Chen & Yau, 1994 Liu et al., 1994 Balasubramian et al., 1996 Kurahashi & Menini, 1997 Varnum & Zagotta, 1997 Frings, 1999 Kleene, 1999 Zufall & Leinders - Zufall, 2000 Bradley et al., 2001 Bradley et al., 2004 Biel, 2009
Phosphodiesterase (PDE)	Calmodulin	cAMP - Hydrolyse	Borisy et al., 1992 Yan et al., 1995,
Na^+ / Ca^{2+} - Austauscher (NCX)	olfaktorisches Markerprotein (OMP)	Beeinflußt Ca^{2+} - Export	Reisert, 2007 Kwon, 2009

3 Die Desensitisierung des olfaktorischen CNG-Kanals bei der Duftstoffdetektion

3.1 Die schnelle Desensitisierung bei der Regulation kurzer Ca^{2+} -Signale

Das Riechneuron nutzt die vorübergehend geringe Aktivität des CNG - Kanals und somit das Ausbleiben des Ca^{2+} - Einstroms zur Wiederherstellung des Ruhepotentials. Das wenig Ca^{2+} -sensitive, aber schnelle $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscherprotein (*NCX*, *Na⁺/Ca²⁺-exchanger*; Reisert & Matthews, 1998; Danaceau & Lucero, 2000; Lucero et al., 2000; Castillo et al., 2007; Kwon et al., 2009) transportiert Ca^{2+} hierfür effektiv aus der Zelle. In geringerem Maße trägt auch die langsame, aber sehr Ca^{2+} -sensitive Ca^{2+} -ATPase (*PMCA*, Lischka & Schild, 1993; Weeraratne et al., 2006; Castillo et al., 2007), die man ebenfalls in der Cilienmembran findet, zur Wiederherstellung des Ruhepotentials bei.

Ca^{2+} soll bei der Duftstoffdetektion zunächst durch Aktivierung des Ca^{2+} -aktivierten Chloridionenkanals die Signalantwort verstärken. Eine Akkumulation von Ca^{2+} führt zur längerfristigen Adaptation des Riechneurons. Diese kann von Vorteil sein, wenn störende dauerhaft vorhandene Duftstoffmoleküle im Hintergrund zum Beispiel nicht mehr bewußt wahrgenommen werden sollen und hilft Tieren bei der Nahrungssuche oder dem Wittern natürlicher Feinde. Beim Folgen einer Duftspur jedoch, wäre die Adaptation der Neurone für diesen Duftstoff unerwünscht.

3.2 Die mögliche Rolle der schnellen Desensitisierung beim Schnüffeln

Möglicherweise liefert der Mechanismus der schnellen Desensitisierung des olfaktorischen CNG - Kanals eine Erklärung dafür, wie Tiere Duftstoffgradienten folgen. Das Wittern eines Duftstoffs erfolgt beim Hund, aber auch beispielsweise bei Nagern durch kurzes hochfrequentes Erschnüffeln des entsprechenden Duftstoffs (6 - 10 Hz; Carey et al., 2009; Wesson et al., 2009; Stehen et al., 1996; Thesen et al., 1993) und anschließendem vorübergehendem Verlassen der Spur. Bei der Spurensuche des Hundes resultiert daraus eine Art „Zickzack - Kurs“. Entsprechende Experimente mit Menschen lieferten ähnliche Ergebnisse, darüber hinaus wurde gezeigt, daß die Fähigkeit einer Duftspur zu folgen durch Üben verbessert werden kann (Abb. 5; Porter et al., 2007).



Abb. 5: „Zickzack - Kurs“ beim Folgen einer Duftspur am Beispiel von Hund (**links**) und Mensch (**rechts**). Der Hund folgt der Spur eines Fasans, der Mensch einer Spur aus Schokoladenextrakt (Mod. Porter et al., 2007).

Eine hohe Schnüffelfrequenz im Vergleich zur phasischen Respiration bestimmt wie und von welchen Zellen Signale postsynaptisch im *Bulbus* prozessiert werden. Dies wurde an Ratten mit Hilfe Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe, die Ca^{2+} -Signale in OB-Zellen detektieren, gezeigt (Carey et al., 2009). Aus einer Schnüffelsequenz resultiert aber ein postsynaptisches Folgesignal mit normaler Stromamplitude. Es ist erstaunlich, dass ein Tier die hochfrequente Schnüffelperiode sofort abbricht, sobald die entsprechende Bulbus-Region für den Duftstoff aktiviert wird (Carey et al., 2009; Wesson et al., 2009; Spors et al., 2006; Kay & Laurent, 1999).

3.3 Arbeitshypothese

Die schnelle Desensibilisierung olfaktorischer CNG-Kanäle vermeidet wahrscheinlich die durch die Akkumulation von Ca^{2+} bedingte längerfristige Adaptation der Riechneurone. Dies wird durch die schnüffelnde Aufnahme des Geruchstoffs unterstützt, da eine Dauerexposition vermieden wird. Das nach der Detektion sofortige, vorübergehende Abbrechen der Schnüffelperiode verschafft Kanälen und Riechneuronen Zeit zur erneuten Sensibilisierung und Wiederherstellung des ursprünglichen Ruhepotentials.

Die meisten Untersuchungen zur schnellen Desensibilisierung des olfaktorischen CNG-Kanals basieren auf elektrophysiologischen Analysen der Öffnungs- und Schließkinetik des Kanals. Diese Daten können aber keine Aussagen bezüglich der molekularen Anordnung der am

Schließen des Kanals beteiligten Interaktionspartner treffen. Proteininteraktionsstudien mit Calmodulin und verschiedenen Proteinen der derjenigen Kanaluntereinheiten, die die Calmodulin Bindestellen enthalten, können die bestehenden Daten sinnvoll ergänzen und zur Entwicklung eines molekularen Modells zum Schließmechanismus des Kanals beitragen. Dieses Modell könnte zeigen welche Rolle der olfaktorische CNG - Kanal bei der Regulation kurzer Ca^{2+} - Pulse spielt, die die Grundvoraussetzung der schnellen Duftstoffdetektion beim Schnüffeln bilden. Für die Entwicklung eines solchen Modells sollen die folgenden Abschnitte einen Überblick über die molekularen Eigenschaften von Calmodulin und CNG - Kanälen geben.

4 Struktur und Funktion von CNG - Kanälen

Durch zyklische Nukleotide gesteuerte Kationenkanäle (*cyclic nucleotide gated channels*, CNG - Kanäle) dienen der chemoelektrischen und photoelektrischen Transduktion (Kaupp & Seifert, 2002; Matulef & Zagotta, 2003; Trudeau & Zagotta, 2004). Sie gehören zur Familie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle, die durch die Bindung von zyklischen Nukleotiden aktiviert werden (Craven & Zagotta, 2006). Zu dieser Familie gehören auch die Hyperpolarisations - aktivierten zyklisch - Nukleotid gesteuerten Kanäle (*hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channels*, HCN - Kanäle) und die ERG K^+ -Kanäle (*ether-à-go-go-related gene*, Eag - Kanäle, Guy et al., 1991; Robinson & Siegelbaum, 2003; Trudeau & Zagotta, 2004). HCN - und Eag - Kanäle werden außerdem spannungsgesteuert aktiviert.

CNG - Ströme wurden erstmals Mitte der 80 er Jahre gemessen (Fesenko et al., 1985) und Ende der 80 er Jahre wurde das erste CNG - Gen aus Photorezeptoren kloniert (Kaupp et al., 1989; eine Übersicht gibt Kaupp & Seifert, 2002). Man findet CNG - Kanäle auch in zahlreichen nichtsensorischen Geweben wie der Niere, der Aorta, den Hoden oder dem Herzen, am besten ist ihre Funktion aber in sensorischen Geweben, wie den Riechneuronen und Photorezeptoren untersucht (Craven & Zagotta, 2006; Matulef & Zagotta, 2003; Kaupp & Seifert, 2002).

CNG - Kanäle sind heterotetramere Kanäle, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Bei Säugern sind sechs Untereinheiten bekannt (zur Übersicht: Pfifferli et al., 2006 und Craven & Zagotta, 2006). Man unterscheidet A - Untereinheiten (CNG A1 - 4) von B - Untereinheiten (CNG B1 und CNG B3). Die A - Untereinheiten bilden im Gegensatz zu den B -

Untereinheiten auch funktionsfähige homomere Kanäle (Abb. 6; Hofmann et al., 2005; Kaupp & Seifert, 2002; Picco et al., 1996; Menini, 1995). Eine Ausnahme bildet die A4 - Untereinheit, deren homomere Kanäle nur durch Stickstoffmonoxid (NO), aber nicht durch zyklische Nukleotide aktiviert werden.

Die Zusammensetzung der CNG - Kanäle unterscheidet sich in den unterschiedlichen Geweben und verleiht ihnen die gewebespezifischen physiologischen Eigenschaften. Kanäle unterschiedlicher Zusammensetzung unterscheiden sich in Ionenleitfähigkeit, Öffnungswahrscheinlichkeit, Ligandensensitivität und Calcium/Calmodulin - vermittelter Inhibition (Trudeau & Zagotta, 2004; Kaupp & Seifert, 2002).

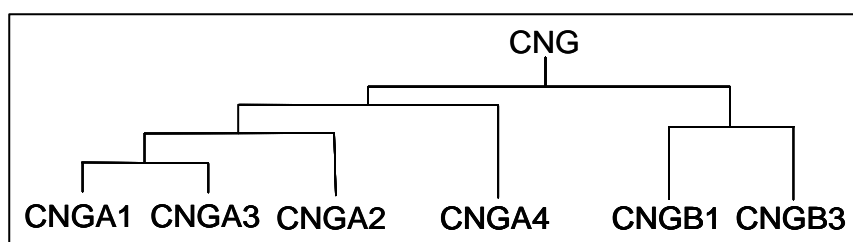


Abb. 6: Phylogenetischer Baum der bis heute bekannten sechs Untereinheiten zyklisch - Nukleotid gesteuerter Kationenkanäle (mod. Biel, 2009).

Alle Untereinheiten besitzen sechs Transmembrandomänen S1 - S6 mit intrazellulären C - und N - Termini. Die leitfähige Pore wird vom jeweils fünften und sechsten Transmembransegment gebildet (Abb. 7). Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den spannungsgesteuerten K⁺-Kanälen besitzen auch die CNG - Kanäle in ihrem S4 - Transmembransegment zahlreiche positiv geladene Aminosäuren, die als Spannungssensor dienen, die aber für die Aktivierung der Kanäle keine Rolle spielen (Pfifferli et al., 2006; Craven & Zagotta, 2006; Tang & Papazian, 1997). Die Bindungstasche für zyklische Nukleotide (CNBD) liegt jeweils im C - Terminus und ist über den so genannten C - Linker mit der S6 - Transmembrandomäne verbunden (Craven & Zagotta, 2006). In den C - und N - terminalen Termini findet man außerdem verschiedene Bindemotive für die Modulation durch Calmodulin, deren Zahl, Art und Aminosäure - Position vom jeweiligen CNG - Kanal Typ abhängt (Trudeau & Zagotta, 2003; Trudeau & Zagotta, 2004).

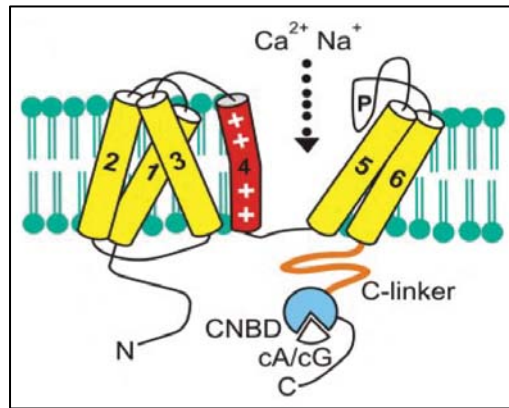


Abb. 7: Schematische Darstellung der Struktur und Membrantopologie der CNG - Kanal Untereinheiten. (**Gelb**) α - helicale Transmembrandomänen S1, S2, S3, S5 und S6. (**Rot, +**): S4 Transmembrandomäne mit positiv geladenen Aminosäuren. (**P**) Kanal schleife (*pore loop*) (**CNBD**) Zyklisch - Nukleotid Bindedomäne. (**cA/ cG**) cAMP beziehungsweise cGMP (mod. Biel, 2009).

Es existieren aktuell mehrere Annahmen, wie der CNG - Kanal durch zyklische Nukleotide geöffnet wird. Neueste Untersuchungen an CNG A1 - Kanälen zeigen, daß die Bindung an die CNBD Konformationsänderungen der C - Linker Region bewirken, die auf die Transmembrandomänen übertragen werden und die Weitung der Pore verursachen (Craven et al., 2008; Johnson & Zagotta, 2005; Taraska & Zagotta, 2007; Trudeau & Zagotta, 2004).

Die CNG - Kanäle olfaktorischer Riechneurone bestehen aus zwei A2 - Untereinheiten, einer B1b - und einer A4 - Untereinheit (Abb. 8; Zheng & Zagotta, 2004; Sautter et al., 1998; Liman & Buck, 1994; Bradley et al., 1994; Ludwig et al., 1990; Dhallan et al., 1990). Der Kanal wird durch cAMP geöffnet und leitet unter physiologischen Bedingungen überwiegend Ca^{2+} -Ionen in das ciliäre Lumen (Bradley, 2005). Die B1b - und A4 - Untereinheiten werden als modulatorisch angesehen, da sie im Gegensatz zu A2 allein keine funktionsfähigen durch cAMP - aktivierbaren Kanäle bilden (Sautter et al., 1998; Bönigk et al., 1999; Liman & Buck, 1994; Trudeau & Zagotta, 2003). In einer kleinen Population olfaktorischer Neurone wird noch ein zweiter CNG - Kanal exprimiert, der dem Kanal der Zapfen - Photorezeptoren entspricht und durch cGMP aktiviert wird (Meyer et al., 2000). Diese Neurone nutzen einen alternativen Mechanismus der Signaltransduktion und ihre Funktion ist noch unbekannt.

In den Untereinheiten des cAMP - aktivierbaren CNG - Kanals wurden bisher zwei verschiedene Bindemotive für die Calmodulin-Bindung beschrieben (siehe 1.5 und Tab. 2): In den A2 - Untereinheiten findet man N - terminal und in der B1b - Untereinheit C - terminal ein Motiv des „Baa - Typs“ (auch: 1-8-14 Motiv; Chen & Yau, 1994; Liu et al., 1994; Varnum & Zagotta, 1997; Grunwald et al., 1999; Zheng et al., 2003; Pfifferi et al., 2006), an das Calmodulin Ca^{2+} -abhängig bindet (Ikura et al., 1992; Meador et al., 1993; Friedberg & Rhoads, 1994; Rhoads & Friedberg, 1997). Die modulatorischen Untereinheiten weisen außerdem LQ - Bindemotive auf, die dem „IQ - Typ“- Motiv ähnlich sind, an das Calmodulin

auch Ca^{2+} -unabhängig bindet. Das LQ - Motiv befindet sich im N - Terminus der B1b - Untereinheit und zwischen der C - Linker Region und der CNBD im C - Terminus der A4 - Untereinheit.

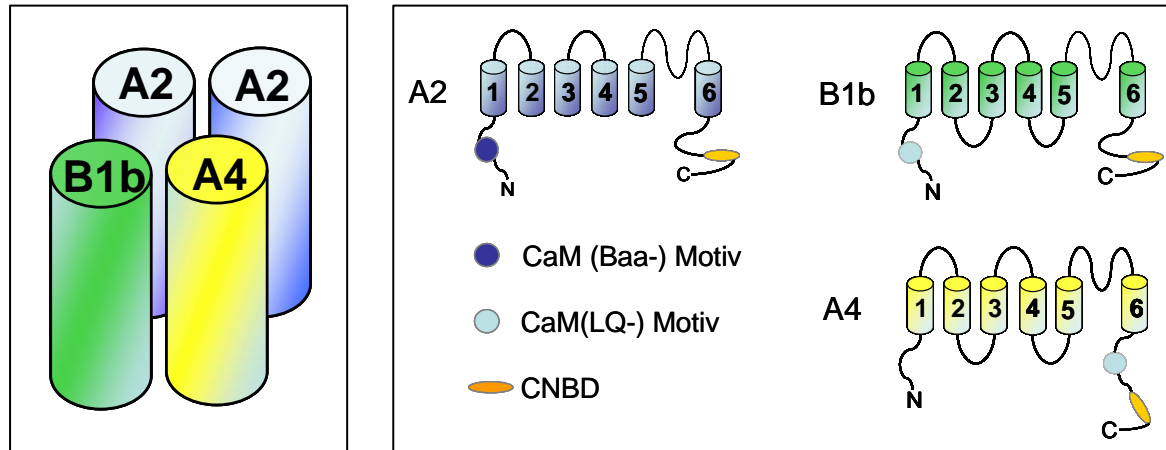


Abb. 8: Schematische Darstellung des olfaktorischen CNG - Kanals. (**Links**) Zusammensetzung des Heterotetramers (**Rechts**) Kanal - Untereinheiten des olfaktorischen CNG - Kanals. (**1 - 6**) S1 - S6 Transmembrandomänen. (**CaM**) Calmodulin - Bindedomäne. (**CNBD**) Zyklisch - Nukleotid Bindedomäne.

5 Struktur und Funktion von Calmodulin

Calmodulin (CaM; Abb. 9 und 10 b) stellt im Komplex mit Ionenkanälen, die Ca^{2+} in das Zellinnere leiten, den Prototyp eines Ca^{2+} -Sensors dar (Tadross et al., 2008). Dieses 16,8 kDa große, 148 Aminosäuren lange Ca^{2+} -Bindeprotein, reagiert auf vielfältige Weise mit zahlreichen Zielproteinen. Es repräsentiert mindestens 0,1 % (10^{-6} - 10^{-5} M) des Proteingehaltes von Zellen (Chin & Means, 2000). Da es Ca^{2+} nicht nur puffert, sondern als Mediatorprotein kleine Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf Zielproteine überträgt, ist es für viele zellphysiologische Vorgänge von besonderer Bedeutung. CaM spielt eine wichtige Rolle zum Beispiel bei Entzündungsreaktionen, im Zellstoffwechsel, bei der Zellteilung, während der Apoptose, bei Muskelkontraktion und im Nervenwachstum. In Säugerzellen wird Calmodulin als hauptsächlicher Vermittler von Ca^{2+} -Signalen angesehen (Vetter & Leclerc, 2003; Eldik & Watterson, 1998; Berridge et al., 1998).

CaM wird auf drei verschiedene Arten von Änderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reguliert: (1) Auf der zellulären Ebene in seiner Verteilung. (2) Auf der molekularen Ebene durch Modulation seiner Bindeeigenschaften. (3) In seiner Eigenschaft

spezifisch Zielproteine zu aktivieren durch Induktion einer Vielfalt möglicher Konformationen (Chin & Means, 2000; Mirzoeva et al., 1999; Peersen et al., 1997).

Calmodulin interagiert konstitutiv gebunden oder als dissoziierbares Element wie eine Kanaluntereinheit mit einer Vielfalt an Ionenkanälen (Saimi & Kung, 2002).



Abb. 9: Bänderdiagramme von Calmodulin. **(Rechts)** Ca^{2+} -freies ApoCalmodulin. **(Links)** Ca^{2+} -ligandiert (mod. Valeyev et al., 2008).

CaM besitzt N- und C-terminal gelegen jeweils eine globuläre Domäne, die durch eine flexible acht bis zehn Aminosäuren lange Linkerregion verbunden ist (Vetter & Leclerc, 2003). Es gehört, wie die meisten Ca^{2+} -Bindenproteine zur Superfamilie der EF-Hand Proteine. Untersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse zeigen, daß diese ausschließlich paarweise auftretenden Ca^{2+} -Bindemotive die globulären Domänen des Calmodulins

dominieren (Vetter & Leclerc, 2003; Babu et al., 1985; Babu et al., 1988). Ihren Namen erhielten die EF-Hand Bindemotive, als sie bei

der röntgenkristallographischen Untersuchung des Parvalbumins vor 36 Jahren erstmalig entdeckt wurden (Lewit-Bentley & Réty, 2000; Kretsinger & Nockolds, 1973): Zwei α -Helices, die in Parvalbumin als Helix E und F bezeichnet werden, sind durch eine Schleife aus 12 Aminosäuren verbunden, die die eigentliche Ca^{2+} -bindende Struktur repräsentiert. Man nennt dieses Motiv deshalb auch *helix-loop-helix* (*hlh*-) Motiv. In Calmodulin werden die E- und F-Helices von jeweils 10 Aminosäuren gebildet. Die N-terminal gelegene E-Helix sieht dabei aus wie der erhobene Zeigefinger der rechten Hand, der senkrecht zur F-Helix, dem Daumen, orientiert ist. Ca^{2+} wird in der Schleife, dem gekrümmten Mittelfinger, 7-fach kooperativ gebunden (Abb. 10a). Die beiden EF-Hand Motive sind innerhalb der globulären Domänen jeweils durch ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt voneinander getrennt (Chattopadhyaya et al., 1992). Die Kooperativität der Ca^{2+} -Bindung innerhalb einer globulären Domäne wird kontrovers diskutiert und hängt sehr stark von der Anwesenheit weiterer Ionen ab (Valeyev et al., 2008; Drake & Falke, 1996; Ogawa & Tanokura, 1984). Hingegen ist allgemein anerkannt, daß zwischen den globulären Domänen keine Kooperativität besteht.

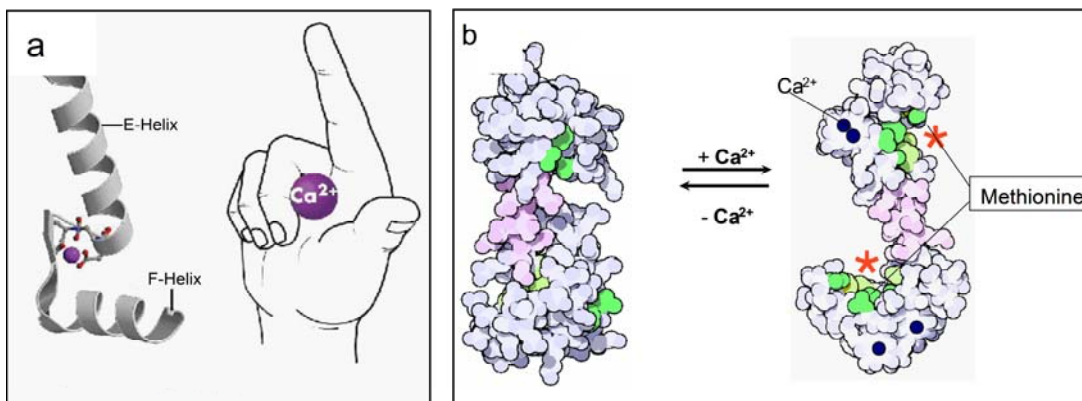


Abb. 10 a: Kooperative Bindung von Ca^{2+} durch das EF-Hand Bindemotiv. (**Links**) Bänderdiagramm. (**Violett**) Ca^{2+} . (**Rechts**) Vergleichende Darstellung der rechten Hand. **Abb. 10 b:** Graphische Darstellung der 3D-Struktur des Calmodulins (**links**) Ca^{2+} -frei (**rechts**) Ca^{2+} -ligandiert. (**Grün**) hydrophobe Bindetaschen (**stern**) Methioninregion. (Mod. (a) www.chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Proteins8.html (c) www.rcsb.org/pdb).

Eine Besonderheit des CaMs ist, daß es auch Ca^{2+} -frei als so genanntes apoCalmodulin (apoCaM) an Zielproteine binden kann, aber durch Ca^{2+} -Bindung aktiviert wird (Tang et al., 2003; Pate et al., 2000; Peersen et al., 1997). Bei der Ca^{2+} -Bindung werden die Sekundärstrukturen der N- und C-terminalen Domänen neu organisiert, ohne daß sich die relativen Anteile der Sekundärstrukturen wesentlich ändern (Chou et al., 2001, Nelson & Chazin, 1998; Finn et al., 1995, Kuboniwa et al., 1995; Klevit, 1983). Durch diese Reorganisation des Proteins ändern sich die interhelikalen Winkel, was den Übergang aus der eher gestauchten in eine gestreckte Konformation zur Folge hat. Die Konformationsänderung bewirkt außerdem, daß hydrophobe Bereiche, die hauptsächlich Methionine enthalten nach außen gekehrt werden (Abb. 10 b). Das kann die Interaktion von CaM mit Effektoren begünstigen (Chin & Means, 2000). Häufig nimmt das Molekül dabei erneut eine gestauchtere Struktur durch Winden beider Termini und häufig auch des Linkers um das Zielprotein an (Abb. 11; Valeyev et al., 2008; Osawa et al., 1999; Ikura et al., 1992).

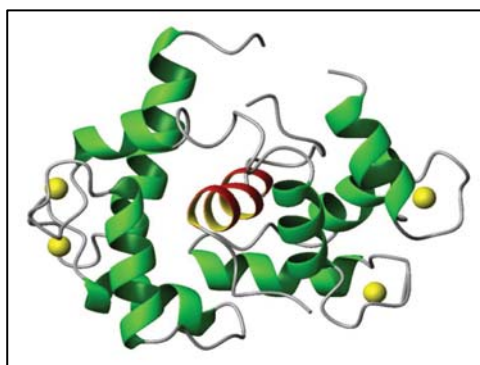


Abb. 11: Bänderdiagramm der Ca^{2+} /Calmodulinbindung an Protein Kinase Kinase (**rote α -Helix**) (mod. Valeyev et al., 2008).

Die Ca^{2+} - Affinitäten der N - und C - terminalen globulären Domänen sind unterschiedlich: C - terminal ist die K_D von etwa $0,2 \mu\text{M}$ sechs - bis zehnfach höher als N - terminal (Potter et al., 1983, Ogawa und Tanokura, 1984; Linse et al., 1991). Der C - Terminus hat außerdem auch im Ca^{2+} - freien Zustand stets eine so genannte „halb geöffnete“ Konformation. Diese begünstigt die Ca^{2+} - unabhängige Bindung an Zielproteine (Chin & Means, 2000) und kann damit seine Bindekinetik für Ca^{2+} erhöhen. Im ungebundenen Zustand ist die Bindekinetik zu gering um auf schnelle Änderungen der Ca^{2+} - Konzentration, wie sie beispielsweise in Neuronen vorkommen, zu reagieren (Putkey et al., 2003). Bei konstitutiver Bindung von CaM an Ionenkanäle (Erickson et al., 2001; Pitt et al., 2001), die Ca^{2+} leiten, dient die in räumlicher Nähe der Pore gebundene C - terminale Domäne deshalb auch als lokaler Ca^{2+} - Sensor, wohingegen die N - terminale Domäne globale Änderungen wahrnimmt (Abb. 12; Tadross et al., 2008).

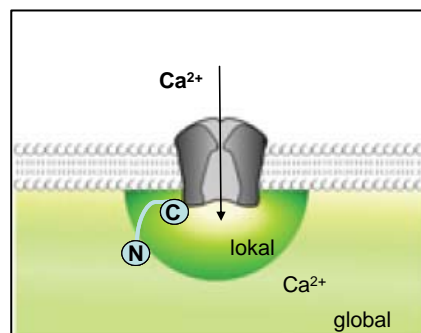


Abb. 12: Duale Funktion von Calmodulin (**blau**) als lokaler und globaler Ca^{2+} -Sensor. (C) C -Terminus (N) N-Terminus (mod. Tadross et al., 2008).

6 Calmodulin - Interaktion mit Calmodulin - Bindemotiven des olfaktorischen CNG - Kanals

Bradley et al. konnten 2001 zeigen, daß der olfaktorische CNG - Kanal in Folge von Ca^{2+} - Einstrom in weniger als 500 ms schließt und daß dies auf die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin zurück zu führen ist. Es fehlen jedoch Struktur - Daten, die zeigen sollen, welche der Calmodulin - Bindedomänen (Tab. 2) am schnellen Schließen des Kanals beteiligt sind und welche Rolle die verschiedenen Kanaluntereinheiten spielen. Elektrophysiologische

Untersuchungen am nativen Kanal der Riechneurone weisen darauf hin, daß Calmodulin unter physiologischen Bedingungen permanent an eine oder mehrere der Bindestellen assoziiert ist (Bradley et al., 2004).

Tab. 2: Calmodulin - Bindedomänen der Untereinheiten des olfaktorischen CNG - Kanals.

Untereinheit	Terminus	Sequenz	Motiv-Typ
CNG A2	N	⁶⁸ FQRIVRLVGVIRDW ⁸¹	Baa/ 1-5-8-14
CNG B1b	C	⁷⁴⁴ LAHLRARLKELAAL ⁷⁵⁸	Baa/ 1-8-14
CNG B1b	N	¹⁸³ LQELVKMFKERTEK ¹⁹⁶	IQ
CNG A4	C	²⁹² LQHVNKRLERRVID ³⁰⁵	IQ

Das Baa - Motiv der A2 - und B1b - Untereinheit ist ein typisches Calmodulin - Bindemotiv, das durch hydrophobe Aminosäuren in Position 1 und 14 charakterisiert ist und an Position 8 eine weitere aliphatische Aminosäure aufweist (O'Neil & DeGrado, 1990; Friedberg, 1990; Bähler, 1994; Rhoads & Friedberg, 1997; Trudeau & Zagotta, 2003). Ca²⁺/ Calmodulin bindet mit hoher Affinität an diese amphipathische Helix. Die Kinetik der Inhibition von A2 - Kanälen ist allerdings 100 fach geringer als die heteromere Kanäle (Adelman & Herson, 2004; Bradley et al., 2001). Darüber hinaus bindet Ca²⁺/Calmodulin an A2 - Kanäle, die geschlossen sind, was eine primär inhibitorische Funktion in Folge des Ca²⁺ - Einstroms bei Öffnung der Kanäle ausschließt (Pfifferli, 2006; Adelman & Herson, 2004; Bradley et al., 2004). Erstaunlich war daher die Entdeckung, daß eine Deletion der Baa - Bindedomäne die cAMP - Affinität homomere CNG A2 - Kanäle um 10 fach reduziert (Chen & Yau, 1994; Varnum & Zagotta, 1997). Die Ursache ist, daß in Abwesenheit von Ca²⁺/Calmodulin das Baa - Motiv die offene Konformation des Kanals durch Interaktion mit der C - terminalen C - Linker Region stabilisiert und ihr demnach eine so genannte autoexcitatorische, also den Öffnungszustand stabilisierende Funktion zugeschrieben wird. Die Bindung von Ca²⁺/ Calmodulin verhindert die Interaktion der autoexcitatorischen Region mit der C - Linker Region und mindert somit die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (Varnum & Zagotta, 1997; Trudeau & Zagotta, 2003; Craven et al., 2008). In heteromeren Kanälen hat auch eine Deletion des Baa - Motivs im C - Terminus von B1b keinen Einfluß auf die schnelle Inhibition des Kanals durch Ca²⁺/Calmodulin (Bradley et al., 2005; Bradley et al., 2004; Trudeau & Zagotta, 2003). Für die schnelle Inhibition des olfaktorischen CNG - Kanals spielt das Bindemotiv vom Baa - Typ also keine Rolle, möglicherweise ist es an der längerfristigen Adaptation des Kanals beispielsweise in Folge einer andauernden Duftstoffstimulation beteiligt.

Dagegen gibt es mehrere Hinweise, dass die LQ - Bindemotive der modulatorischen Untereinheiten B1b und A4 für die schnelle Desensitisierung des Kanals verantwortlich sind. Das LQ - Bindemotiv leitet sich vom IQ - Bindemotiv mit der allgemeinen Konsensussequenz [I, L, V]QXXXRXXXX [R oder K] ab. An dieses Motiv binden einige Vertreter der EF - Hand Proteinfamilie, darunter Calmodulin, Troponin C und verschiedene Myosine (Trudeau & Zagotta, 2003; Bähler & Rhoads, 2002). Elektrophysiologische Untersuchungen von Kanalmutanten heteromerer olfaktorischer CNG - Kanäle, bei denen jeweils eine modulatorische Untereinheit im LQ - Bindemotiv eine L→E Mutation trägt, zeigen, daß für die schnelle Desensitisierung des Kanals beide Calmodulin - Bindestellen nötig sind (Abb. 13; Bradley et al., 2004). Auch der Vergleich der Schließkinetiken homomerer A2 - und heteromerer A2 A4 B1b - Kanäle zeigt, daß die modulatorischen Untereinheiten B1b und A4 für das schnelle Schließen des Kanals notwendig sind (Pfifferi et al., 2006; Trudeau & Zagotta, 2003) und daß Ca^{2+} /Calmodulin den Kanal unabhängig von seinem Öffnungszustand inhibiert (Bradley et al., 2005; Bradley et al., 2001).

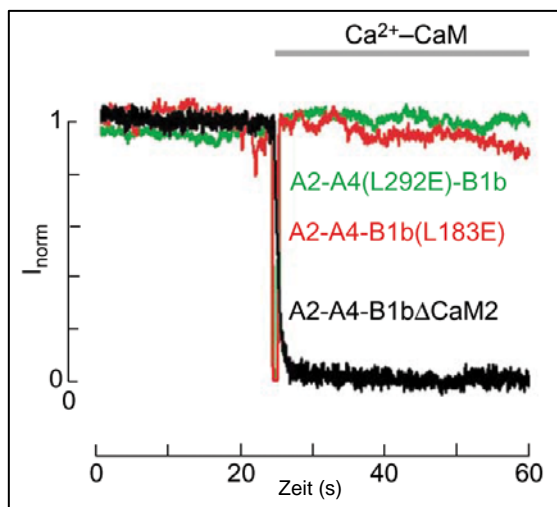


Abb. 13: Elektrophysiologische Analyse der Ca^{2+} /Calmodulin (Ca^{2+} -CaM) vermittelten Inhibition heteromerer olfaktorischer CNG - Kanäle, transfiziert in HEK 293 - Zellen. Normalisierter Stromfluß mit $10 \mu\text{M}$ cAMP und $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} in der Badlösung, *excised inside - out patch*: (1) Maximalstrom, Kanal geöffnet (0) Kanal geschlossen. (Grün) Kanäle mit A4 LQ - Bindestellenmutante (A4 (L292E)). (Rot) Kanäle mit B1b LQ - Bindestellenmutante (B1b (L183E)). (Schwarz) Kanäle mit einer Deletion des Baa - Motivs (ΔCaM2) der B1b - Untereinheit, die entsprechend der Wildtypkanäle (nicht gezeigt) durch Ca^{2+} /Calmodulin inhibiert werden. Kanäle, in denen die A4 - oder B1b - Untereinheit eine Mutation der LQ - Bindestelle aufweist werden nicht durch Ca^{2+} /Calmodulin inaktiviert. (Mod. Bradley et al., 2005).

Dass das LQ - Bindemotiv für die schnelle Desensitisierung hinreichend ist, wurde bereits für die A1 B1a - Kanäle der Stäbchen - Photorezeptoren gezeigt, deren A1 - Untereinheiten keine entsprechende Baa - Calmodulin-Bindestelle aufweist. Calmodulin bindet allerdings nur Ca^{2+} -abhängig an die LQ - Bindedomäne der zur B1b homologen B1a - Untereinheit. Die halbmaximale Ca^{2+} -Konzentration für die Bindung dieser Bindedomäne an Calmodulin beträgt $\text{EC}_{50}(\text{Ca}^{2+}) > 0,13 \mu\text{M}$ (Weitz et al., 1998). Eine Deletion dieser Region macht den Kanal vollkommen unempfindlich für die schnelle Inhibition durch Ca^{2+} /Calmodulin (Bradley et al., 2005; Trudeau & Zagotta, 2003; Trudeau & Zagotta, 2002; Grunwald et al., 1998; Weitz et al., 1998) und deshalb werden auch die LQ - Motive der olfaktorischen CNG -

Kanäle als essentiell für die schnelle Inhibition und möglicherweise für die Beendigung der Reizantwort angesehen.

7 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es ein Modell zum Mechanismus der schnellen Desensibilisierung des olfaktorischen CNG - Kanals zu entwickeln.

Es ist bekannt, daß der olfaktorische CNG - Kanal im Zuge negativer Rückkopplungs - mechanismen, die durch den Einstrom von Ca^{2+} verursacht werden, schnell desensibilisiert. Die LQ - Bindestellen der B1b - und A4 - Untereinheit sind hierfür essentiell. Frühere Arbeiten konnten auch zeigen, daß eine L→E Mutation in einer modulatorischen Untereinheit B1b oder A4 ausreicht, damit der Kanal durch Ca^{2+} /Calmodulin nicht mehr inaktiviert wird und daß Calmodulin oder ein anderes durch Ca^{2+} modulierbares Protein bei physiologischen Ca^{2+} - Konzentrationen bereits mit dem Kanal assoziiert ist.

Die Durchführung von Proteininteraktionsstudien mit jeweils zwei Peptiden der LQ - Bindedomänen der B1b - und A4 - Untereinheit und Calmodulin soll zeigen, ob Calmodulin mit den Bindestellen der modulatorischen Untereinheiten wechselwirkt. Durch den Einsatz von Peptiden zweier verschiedener Längen soll außerdem geprüft werden, ob die Zahl der die Bindestelle flankierenden Aminosäuren die Bindungseigenschaften der Peptide beeinflusst. Die Ca^{2+} - Abhängigkeit der Bindung von Calmodulin an die Bindestellen soll Aufschluß geben, ob Calmodulin bereits unter physiologischen Bedingungen an eine oder beide Kanaluntereinheiten assoziiert ist. Bei Ca^{2+} - abhängiger Bindung soll außerdem durch den Einsatz von Calmodulin - Mutanten überprüft werden, ob Calmodulin voll- oder teilligandiert mit den Bindestellen wechselwirkt.

Untersuchungen zur Stöchiometrie der beteiligten Interaktionspartner bei sättigender Ca^{2+} - Konzentration sollen außerdem zeigen, welche strukturelle Umordnung der Komplex in Folge der Erhöhung der lokalen Ca^{2+} - Konzentration beim Öffnen des Kanals erfährt. Darüber hinaus soll das LQ - Bindemotiv von A4 und B1b durch Verwendung von Mutanten dieser Bindestelle näher charakterisiert werden.

III Material und Methoden

1 Chemikalien und Geräte

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in p.a. - Qualität von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Fluka Chemie GmbH (Buchs, CH), Grüssing (Filsum), J.T. Baker (Deventer, NL), MBI Fermentas GmbH (St. Leon - Rot), Merck KGaA (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe) und Sigma - Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen.

Zum Ansetzen der Puffer - Lösungen wurde ausschließlich Milli - Q Wasser mit einem Widerstand von 18,2 MΩ verwendet. Für molekularbiologische Lösungen wurde steriles Wasser verwendet, für LB - Medien voll entsalztes (VE) Wasser.

1.2 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
PCR-Maschine Biometra Tpersonal	Biometra GmbH (Göttingen)
PCR-Maschine Biometra Tgradient	
Mini-Zentrifuge neoLab Spectrafuge®	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg)
Equibio Easyjet Plus	peqLab Biotechnologie (Erlangen)
Bakterieninkubator Certomat® H für Flüssig-Bakterienkulturen	Braun Biotech International GmbH (Melsungen)
Kreisschüttler für Flüssig-Bakterienkulturen, GFL 3017	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel)
Bakterien-Brutschrank BB6060	Heraeus GmbH (Hanau)
Agarose-Gelelektrophoresekammer	peqLab Biotechnologie (Erlangen)
Agarose-Gelschlitten	
UV-Platte II 350-K	Bachofer Laboratoriumsgeräte (Reutlingen)
Kamera und Drucker für Agarose-Gelbilder UP-895CE	Sony (USA)
Zentrifuge Centricon H-401	Kontron (München)
Festwinkel-Rotor AS6.14	
Nanodrop Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Delaware, USA)
Sonifikators Sonoplus HD 3200	Bandelin Electronic GmbH & Co KG (Berlin)
KE-76-Spitze	
Kühlzentrifuge Z323 K	Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen)
Peristaltische Pumpe Peristaltik Pump P1	Pharmacial Fine Chemicals (Uppsala, Schweden)
Durchflussphotometer 2158 UVICORD SD	LKB-Bromma (Bromma, Schweden)
Fraktionssammler FoxyJr ISCO	(Lyncoln, USA)
Durchflusskühlgerät Kryo-Thermat 350	HAAKE Mess-Technik (Karlsruhe)

<p>Gefriertrocknungsanlage VirTis Drehschieber-Vakuumölpumpe Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer PerfectBlue™ Vertical Electrophoresis System, Twin S & Twin M Spannungsgerät E 443 Consort Semi Dry Western-Blot-Apparatur SV20-SDB Flachbettscanner Power Look II Millipore Filterfritte UV/ VIS Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro UV/ VIS Spektrophotometer Ultrospec Lambda 25 Ultra-Mikro Quarzküvetten QS, 10mm, V=100µL Tischzentrifuge Heraeus Biofuge pico Spekro-Fluorometer LS-50 Ultra-Mikro Quarzküvette QS, 10 x 2mm, V=100µL CD-Spektrophotometer Jasco J-720 Peltierelement Jasco PTC-4235/ 15 Peltierkühlung NESLAB RTE-111 Quarz-Küvette Suprasil 110-QS, V=200µL Sonderanfertigung Ultra Mikrowaage SE mit Ionisationsgebläse/ Statik -Eliminierer Analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A An-60Ti (4-Loch)-Rotor 12 mm Sektorzellen</p>	<p>VirTis (Gardiner, New York, USA) Vacuubrand GmbH & Co KG (Wertheim) peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) Consort nv (Turnhout, Belgien) Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) UMAX Systems GmbH (Willich) Millipore GmbH (Schwalbach) GE Healthcare (München) Perkin Elmer GmbH (Rodgau - Jügesheim) Hellma GmbH & Co KG (Müllheim) Thermo Electron Cooperation (Langensfeld) (Perkin Elmer GmbH (Rodgau - Jügesheim) Hellma GmbH & Co KG (Müllheim) Jasco GmbH (Groß-Umstadt) Neslab B.V. (Kempen) Hellma GmbH & Co KG (Müllheim) Sartorius AG (Göttingen) Beckman Coulter GmbH (Krefeld)</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2 Verbrauchsmaterialien

2.1 Produkte für die Durchführung molekularbiologischer Arbeiten

Verbrauchsmaterial	Hersteller
<p>0,2mL PCR-Reaktionsgefäße Küvetten für die Elektroporation 9 cm corning sterile Petrischalen Agarose 6x Ladepuffer GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit PureYield™ Midipreps Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit NucleoSpin® Extract II Kit QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit RevertAid First Strand cDNA-Synthese Kit 10x PCR-Puffer mit MgCl₂</p>	<p>Kisker GbR (Steinfurt) Bridge Bioscience Corporation (Providence, USA) Corning Incorporated (New York, USA) Invitrogen (Karlsruhe) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) Promega GmbH (Mannheim) Promega GmbH (Mannheim) Stratagene (La Jolla, USA) Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) Stratagene (La Jolla, USA) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)</p>

dNTP-Mix 10x PCR Puffer B 10x Puffer für die Restriktion 10x Ligationspuffer mit ATP 5x Reaktionspuffer für die cDNA-Synthese 25mM MgCl ₂ QuikSolution PCR-Puffer 2mM dATP 10x Puffer B (Mg ²⁺ -frei) für die RT-PCR ddH ₂ O doppelt destilliertes Wasser	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Axon Labortechnik GmbH (Kaiserslautern) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Stratagene (La Jolla, USA) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) Stratagene (La Jolla, USA)
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.2 Produkte für die Durchführung von Proteinarbeiten

Verbrauchsmaterial	Hersteller
PS-Halb-Mikro Küvetten, 10mm, V=1,6mL 15mL/ 50mL Falcon-Reaktionsgefäße 7mL Schnappdeckel Gläser porablot® PVDF-Membranen (0,2µm) Whatman-Filterpapiere, 3mm ECI™ Plus MPO-Detektionssystem Filme (Hyperfilm™, ECI™) Tetenal Superfix Plus Filmfixierer AGFA Neuto NE Film-Entwicklerlösung HisTrap™ FF crude, 1mL Chromatographie-Säulen Rotilabo®-Spritzenfilter; 0,45µM BlueSlick™ Glas-/ Küvettenbeschichtung Hellmanex® II Lösung zur Küvettenreinigung Dialyseschläuche MEMBRA-CEL®, 16mm, MWCO 3,5kDa SERRVAPOR®, 6 und 16mm, MWCO 12-14kDa Nitrocellulose Membranfilter, Porengröße 0,45µm	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg) Greiner Bio-One GmbH (Solingen-Wald) Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) Schleicher & Schüll (Dassel) Amersham Biosciences, (Freiburg) Foto Erhardt (Westerkappeln) GE Healthcare (München) Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) Hellma GmbH & Co KG (Müllheim) Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) Millipore GmbH (Schwalbach)

3 Oligonukleotide

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Oligonukleotide (*Primer*) im Synthesemaßstab 0,02 µmol von der Firma ThermoHybaid, Heidelberg bezogen. Die Lyophilisate wurden nach Angaben des Herstellers in DEPC - Wasser verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.1 Oligonukleotide für die Fusionsproteine

Fusionsprotein	Bezeichnung	Sequenz
CaM CaM ¹² CaM ³⁴ CaM ¹²³⁴	F108 R109	AAC TTA AGC ATA TGA TGG CTG ACC AAC TGA CTG AAG AGG ATC CTC ACT TCG CTG TCA TCA TTT GTA C
CNG A4I	F181 R182	AAG CAT ATG AAC ACT GCA GAT GCG GCC TTC AAG GAT CCT CAA CAG TTC TGG AAG ATC TGT AC
CNG B1bI	F184 R186	AAG CAT ATG GCT GAT GGC GAG GAC CGT GC AAG GAT CCT TAG TCG ATG CTC TGG GGG AAC T
CNG B1bII	F185 R187	AAG CAT ATG GGA CCG TGC GGC CTC CAC AG AAG GAT CCC TAG AAC TTG CAG CAG AGC ATG TC
OMP	F383 R384	AAG GAT CCA TGG CAG AGG ACG GGC CAC ATT GCG GCC GCT CAG AGC TGG TTA AAC ACC

3.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
sp6	TAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T7 terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

3.3 Oligonukleotide für die cDNA - Synthese

Die Oligonukleotide für die cDNA - Synthese stammen von der Firma Fermentas GmbH (St. Leon - Rot).

Bezeichnung	Sequenz
Oligo d(T) 18-mer	TTT TTT TTT TTT TTT TTT

3.4 Oligonukleotide für die Mutagenese

Fusionsprotein	Bezeichnung	Sequenz
CaM ^{T35C}	F200 R201	CAA CCA AGG AGC TGG GGT GTG TGA TGC GGT CTC TGG CCA GAG ACC GCA TCA CAC ACC CCA GCT CCT TGG TTG
CaM ^{F20W}	F202 R203	AAG AAG CTT TCT CCC TAT GGG ACA AGG ACG GGG ATG GG CC CAT CCC CGT CCT TGT CCC ATA GGG AGA AAG CTT CTT
CaM ^{F93W}	F204 R205	CAG AGC TTC GCC AGT GTG GGA TAA GGA TGG CAA TGG CT AG CCA TTG CCA TCC TTA TCC CAC ACT GGC GAA GCT CTG

4 Bakterienstämme

Escherichia coli XL 1 - Blue

Stamm zur Vermehrung von pcDNA3.1, pGEM[®]T und pET28a(+) Vektoren und ihrer Rekombinanten (Stratagene, Heidelberg).

Escherichia coli BL21(DE3) pLysS

Dieser Stamm zur Expression der Fusionsproteine enthält das Plasmid pLysS mit dem T7 Lysozym-kodierenden Gen. T7 Lysozym dient der Minimierung der Hintergrund-Expression von Genen, die unter der Kontrolle des T7 Promotors stehen (Studier & Moffatt, 1986; Stratagene, La Jolla, USA)

Escherichia coli XL10 - Gold[®]

Chemisch - ultrakompetente Zellen zur Transformation nach Mutagenese (Stratagene, La Jolla, USA).

5 Plasmide

pGEM[®]T

pGEM[®]T Easy Vector System I und II (promega GmbH, Mannheim) zur Blau - Weiß Selektion nach Transformation von *Escherichia coli* XL 1 - Blue.

pET28a(+)

Expressionsvektor für die Expression von Fusionsproteinen (Novagen, Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK)

pWhitescript[™]

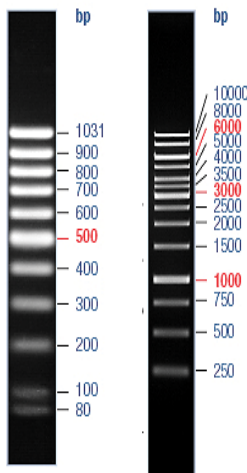
Mutagenese Kontrollplasmid zur Blau - Weiß Selektion nach Transformation von *E.coli* XL 10 - Gold[®] (Stratagene, La Jolla, USA).

6 Enzyme

Enzym	Aktivität	Hersteller
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/ μ L	Finnzymes Oy (Espoo, Finland)
Taq-Polymerase	U/ μ L	Axon Labortechnik GmbH (Kaiserslautern)
T7 DNA-Polymerase		
PfuUltra® High Fidelity DNA polymerase	2,5 U/ μ L	Stratagene (La Jolla, USA)
M-MuLV Reverse Transcriptase	20 U/ μ L	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor	20 U/ μ L	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Restriktions-Endonukleasen:		
Bam HI		
Nde I	U/ μ L	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Not I		
Dpn I		
T4 DNA-Ligase	U/ μ L	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
CIAP Dephosphatase	1 U/ μ L	promega GmbH (Mannheim)
Desoxyribonuklease I Lyophilisat	2 U/ μ L	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Lysozym	500 U/ μ L	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

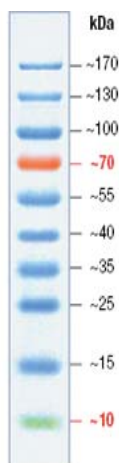
7 Größenstandards und Antikörper

7.1 Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese



Als Größenmarker für die DNA - Elektrophorese diente standardmäßig der *GeneRuler™* 1 kb DNA Ladder (links, ~ 250 bis 10000 bp). Für Gele der Größe 7 x 8 x 0,5 cm wurde ein Volumen von 4 μ L eingesetzt. Für DNA - Fragmente bis 1000 bp wurden 5 μ L des *MassRuler™* DNA Ladder Low Range (rechts) verwendet (Fermentas GmbH, St. Leon - Rot).

7.2 Größenstandard für die SDS-PAGE



Als Größenstandard für die SDS-PAGE diente der *PageRuler™ Protein Ladder (ready to use)* SM 0671 mit Molekulargewichten von ~ 10000 bis 180000 Da (Dalton). Die Konzentrationen der rekombinanten, in *E. coli* exprimierten, Farbstoff - gekoppelten Proteine liegen zwischen $0,1 - 0,2$ mg/ml. Für Gele der Größe $5,5 \times 8,5 \times 0,15$ cm wurde ein Volumen von $5 \mu\text{l}$ eingesetzt (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot).

7.3 Antikörper

Bezeichnung	Spender	Isotyp	Spezifität	Hersteller
α Penta - His , BSA-frei	Maus	Monoklonal	5x His -tag	Qiagen GmbH (Hilden)
α Maus IgG, Meerrettich - Peroxidase konjugiert	Ziege	Polyklonal	Maus IgG	Sigma - Aldrich GmbH (Steinheim)

8 Protease Inhibitoren

Bei der Bakterienlyse wurde als Protease - Inhibitor standardmäßig, sofern nicht anders angegeben, eine 100 mM PMSF - Stammlösung (Sigma - Aldrich GmbH, Steinheim) verwendet. Die Endkonzentration betrug $0,5$ mM.

9 Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Firma *Peptide Specialty Laboratories GmbH* (Heidelberg) nach der Fmoc - Methode auf einem *Continuous Flow Synthesizer* synthetisiert. Die N - terminale Fmoc - Schutzgruppe wurde mit 25% Piperidin in DMF abgespalten. Die Peptide wurden jeweils durch Zugabe von 95% TFA, 4% Triethylsilan, 1% MilliQ - Wasser vom Trägerharz abgespalten. Die Aufreinigung erfolgte

mittels RP - HPLC. Die verwendete C₁₈-HPLC Säule *Gemini* stammte von der Firma Phenomenex Ltd. Deutschland (Aschaffenburg). Die Peptide, die im Anschluß an die Synthese an den Fluoreszenzfarbstoff Badan gekoppelt wurden, wurden nach der Aufreinigung in 20 mM Tris, pH 7,4 gelöst und mit dem 10 fachen Überschuß Badan (Invitrogen, Karlsruhe) in DMF über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Kopplungsansatz mittels RP - HPLC gereinigt. Die Überprüfung der Peptidmasse erfolgte durch MALDI - TOF Massenspektrometrie. Die Peptide wurden anschließend lyophilisiert.

Bezeichnung	Sequenz	Molekülgewicht (Da)
B1b ^C	AIINDRLQELVKMFKERTEKVKEKLI	3276
B1b	AIINDRLQELVKMFKERTEKVKEKLI	3173
A4 ^C	VKKYMKLQHVNKRLERRVIDWYQHLQIC	3627
A4	VKKYMKLQHVNKRLERRVIDWYQHLQI	3524
A4 ^{-W}	VKKYMKLQHVNKRLERRVIDAYQHLQI	3409
B1b ^{LE}	AIINDREQELVKMFKERTEKVKEKLI	3292
A4 ^{LE}	VKKYMKEQHVNKRLERRVIDWYQHLQI	3540
B1b ^{Badan}	AIINDRLQELVKMFKERTEKVKEKLI-BADAN	3488
A4 ^{Badan}	VKKYMKLQHVNKRLERRVIDWYQHLQIC-BADAN	3838
B1b ^{LE/Badan}	AIINDREQELVKMFKERTEKVKEKLI-BADAN	3504
A4 ^{LE/Badan}	VKKYMKEQHVNKRLERRVIDWYQHLQIC-BADAN	3854

10 Verwendete Software und Datenbanken

OligoAnalyzer 3.1 (IDT, Leuven, Belgien)

Origin[®] 7G-SR1; v7.0303 (Origin Lab Corporation, Northampton, USA)

Protein Calculator v3.3 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>)

EMBL Isoelectric Point Service (<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>)

Microsoft[®] Office[®] XP (Microsoft Corporation, USA)

SEDNTERP v1.07 und DCTC+TM, v.2.0 (<http://www.jphilo.mailway.com>)

CD Deconvolution/ CD Mix/ (Dr. S. Keller, FMP, Berlin Buch)

Spectra ManagerTM II (Jasco GmbH, Groß Umstadt)

Winmaxc32 Chelator (Patton, <http://www.stanford.edu/~cpatton/downloads.htm>)

FLWinLab 2.0 (Perkin Elmer GmbH, Rodgau - Jügesheim)

Rasmol v.2.7 (Bernstein & Bernstein www.rasmol.org)

Hydropro (de la Torre et al, 2000)

RCSB PDB Daten Bank (*protein database*, La Jolla, CA, USA)

11.2 Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

11.2.1 Kultivierung von Flüssig-Bakterienkulturen

LB - Medium	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl pH 7,5 autoklaviert
SOB - Medium	2% Bacto - Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,06% NaCl 0,02% KCl autoklaviert Lagerung: 4°C
SOC - Medium	10 ml SOB - Medium + 100 µl 1 M MgCl ₂ - Stammlösung + 100 µl 1 M MgSO ₄ - Stammlösung + 100µl 2M Glucose-Stammlösung Lagerung: 4°C
Carbenicillin - Stammlösung	50mg/ml sterilfiltriert Lagerung: -20°C
Kanamycin - Stammlösung	50mg/ml sterilfiltriert Lagerung: -20°C

11.2.2 Kultivierung auf Agarplatten

LB - Agar	1% Bacto - Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,05% NaCl pH 7,5 1% Agar autoklaviert
IPTG	20% IPTG in Milli - Q sterilfiltriert Lagerung: -20°C
X - Gal	2% X - gal in DMF sterilfiltriert Lagerung: -20°C

11.2.3 Agarose - Gelelektrophorese

50x TAE	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8 - 8,5
Ethidiumbromid - Detektionslösung	0,0005% in Milli - Q
Gebrauchsfertige 1% Ethidiumbromid - Stammlösung in Wasser (Carl Roth GmbH), Lagerung 4°C	

11.2.4 RNA - Isolierung aus olfaktorischem Epithel

Stamm – Lösung P	120 mM NaCl 5 mM KCl 1,6 mM KHPO ₄ 25 mM NaHCO ₃ 7,5 mM D - Glucose pH 7,4
------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

DEPC - Wasser:	1 l Milli - Q 1 ml DEPC geschüttelt, über Nacht bei RT lagern autoklaviert
Natriumacetat - Lösung:	2 M $C_2H_3NaO_2$ pH 4,0/ Essigsäure + 100 μ l DEPC - Wasser geschüttelt, über Nacht bei RT lagern autoklaviert
Natriumcitrat - Lösung:	750 mM $C_6H_5Na_3O_7$ pH 7,0/ NaOH + 50 μ l DEPC - Wasser geschüttelt, über Nacht bei RT lagern autoklaviert
Lösung D:	4 M Guanidinthiocyanat 25 mM $C_6H_5Na_3O_7$ 0,5% N - Lauroylsarcosine 0,1 M β - Mercaptoethanol
Chloroform/Isoamylalkohol 49 :1	

11.3 Transformation von *E.coli* durch Elektroporation

Die Transformation der elektro(porations)kompetenten *E.coli* Stämme XL-1 Blue und BL21/DE3 erfolgte nach der modifizierten Methode von Dower (Dower et al., 1988).

11.3.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die folgenden Schritte wurden im Kältelabor durchgeführt: Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde 500 ml LB - Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zum Erreichen einer optischen Dichte $OD_{600nm} = 0,5$ inkubiert. Danach wurde die Kultur für 15 min auf Eis gestellt und anschließend 10 Minuten bei 4°C und 4000 g zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterienzellen wurden zunächst

zweimal mit 500 ml eiskaltem MilliQ - Wasser und anschließend mit 40 ml 10% Glycerin gewaschen und wie bereits angegeben zentrifugiert. Die nun kompetenten Zellen wurden dann in 5 ml 10% Glycerin aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert (-80°C).

11.3.2 Transformation elektrokompetenter *E.coli* - Stämme

Für die Elektroporation wurden 50 µl der elektrokompetenten Zellen auf Eis angetaut. Vom Ligationsansatz wurde 1 µl dazu pipettiert. Bei der Transformation mit gereinigter Plasmid - DNA wurde ein Volumen, das 5 - 10 ng DNA entspricht verwendet. Der Ansatz wurde sofort in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte für 5 ms bei 2,5 kV, 25 µF und 201 Ω. Anschließend wurde 1 ml SOC - Medium zum Transformationsansatz gegeben, dieser in ein 5 ml Reagenzglas überführt und für 30 Minuten bei 37°C, 220 rpm auf dem Schüttelinkubator belassen. Bei Transformation von Ligationsansätzen wurde die Kultur anschließend 2 Minuten bei 8000 g in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet in 200 µl LB - Medium aufgenommen und auf LB - Agar ausplattiert. Bei Verwendung gereinigter Plasmid - DNA wurde der Transformationsansatz zur Kultivierung in LB - Medium mit Selektionsantibiotikum überführt.

11.3.3 Chemische Transformation von *E.coli* XL10 - Gold[®]

Die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* XL10 - Gold[®] nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983) erfolgte im Anschluß an die Mutagenese nach Angabe des Herstellers (Stratagene, La Jolla, USA).

11.4 Kultivierung von Flüssig - Bakterienkulturen

E.coli Flüssigkulturen in LB - Medium wurden zur Amplifizierung der Plasmid - DNA über Nacht bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Die Konzentration des Antibiotikums zur Selektion der gewünschten Transformanten betrug 50 µg/ml Am nächsten Tag wurde die DNA mit Hilfe einer Reaktions-Komplettausstattung präpariert. Zum Anlegen einer Dauer - Bakterienkultur (Glycerinstock) wurden 600 µl der Kultur mit 200 µl sterilem 80% Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Glycerinstock wurde bei -80°C gelagert. Das Gesamtvolumen des Glasgerätes bei der Kultivierung von Bakterien

in LB - Medien entsprach generell dem vierfachen Volumen der Bakterienkultur, um eine optimale Sauerstoffversorgung der Bakterien zu gewährleisten.

11.5 Kultivierung auf Agarplatten zur Bakterienselektion

11.5.1 Herstellung der Agarplatten

Vor dem Gießen der Platten wurde der bei Raumtemperatur feste Agar zunächst durch Erhitzen verflüssigt. Nach dem Abkühlen auf etwa 40°C wurde das Antibiotikum zugegeben und die Platten sofort gegossen. Die Antibiotikumkonzentration betrug 100 µg/ml, die Höhe des Agars etwa 0,5 cm. Für die Blau - Weiß-Selektion wurden zusätzlich vor dem Gießen 16 µl IPTG- und 160 µl X - Gal - Stammlösung zugegeben.

11.5.2 Kultivierung auf Agarplatten und Selektion der Rekombinanten

Für die Kultivierung zur Selektion transformanter und rekombinanter Bakterienstämme nach der Elektroporation wurde der Transformationsansatz nach dem Einengen entweder vollständig bei bekannter geringer Transformationseffizienz oder in Portionen von 10 µl, 50 µl und 100 µl durch Ausstreichen ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C im Inkubatorschrank. Bei Antibiotikumselektion wurden am nächsten Tag 5 - 10 Klone mit einem Zahnstocher durch Einstechen in 5 ml LB/ Antibiotikum - Medium überführt und bis zum nächsten Tag, wie beschrieben inkubiert. Bei Verwendung von IPTG/X - Gal - Platten wurden jeweils 180 µl und 300 µl des Transformationsansatzes ausplattiert. Am nächsten Tag wurden nur die weißen und somit rekombinanten Klone überführt.

11.6 Präparation extrachromosomaler DNA

Für die Plasmid - Präparationen wurden ausschließlich die aufgeführten Reaktions - Komplettausstattungen benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im letzten Schritt der Präparation wurde die Plasmid - DNA mit maximal 40 µl Elutionspuffer eluiert.

11.7 Agarose - Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR - Produkte, der Plasmid - DNA Präparationen, der Testverdaue und zur Durchführung der Gelextraktion wurde je nach Größe der Nukleinsäuren ein 1 - 1,5% iges Agarosegel angefertigt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 100 ml 1 x TAE - Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, kurz gerührt und in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde das Gel entweder sofort verwendet oder bis zu einer Woche in einer Gelkammer mit 1 x TAE - Puffer gelagert. Zur qualitativen und quantitativen Analyse der DNA -Proben wurden 1 - 5 μ l DNA-Lösung mit 1 μ l 6x DNA - Probenpuffer versetzt, mit H_2O_{molbio} auf ein Volumen von 6 μ l gebracht und dann direkt aufgetragen. Für die DNA - Extraktion wurden vor dem Gießen des Gels zwei bis drei Zähne des Probenkamms mit Tesa™ Film verbunden, so dass das gesamte Probenvolumen nach dem Verdau oder der PCR aufgetragen werden konnte. Vom DNA - Größenmarker wurden jeweils 0,5 μ g aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE bei 100 V so lange bis die Bromphenolbande des Probenpuffers zwei Drittel des Agarosegels durchlaufen hatte. Danach wurden die DNA-Banden für 20 Minuten in Ethidiumbromid auf dem Taumler gefärbt, auf dem UV - Transluminator überprüft und ein Photo aufgenommen.

11.8 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäurelösungen wurde am Absorptionsmaximum der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurde ein Tropfen DNA-Lösung mit dem NanoDrop Spektrophotometer vermessen. Die optische Dichte von $OD = 1$ entspricht gemäß der Formel $[\text{dsDNA}] (\mu\text{g/ml}) = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$, einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurde am UV/VIS Spektrophotometer ein Spektrum zwischen 340-220nm aufgenommen. Dafür wurde die RNA - Probe 1 : 50 in DEPC - Wasser verdünnt. Die optische Dichte von $OD = 1$ entspricht gemäß der Formel $[\text{RNA}] (\mu\text{g/ml}) = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$, einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/mL}$ RNA. Das Verhältnis der OD_{260}/OD_{280} diene der Reinheitskontrolle der Nukleinsäurelösungen. Ein Quotient 2,0 für DNA - Lösungen und 2,0 für RNA - Lösungen wurde dabei als rein erachtet.

11.9 DNA - Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma *Sequence Laboratories GmbH* (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden 600 ng DNA und 20 pmol Oligonukleotid zusammengegeben. Der Ansatz wurde anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{molbio}}$ auf ein Volumen von 7 μl gebracht.

11.10 Klonierung die Expression der Fusionsproteine in pET28a(+)

Für die Klonierung der DNA von Calmodulin (CaM) und der Calmodulin-Mutanten (CaM - Mutanten) CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴ (Erickson et al., 2001) in den Expressionsvektor pET28a(+), wurde die entsprechende Nukleinsäuresequenz mittels Polymerase - Kettenreaktion (PCR) aus pcDNA3 amplifiziert. Die pcDNA3 - Plasmide der Calmodulin - Mutanten wurden freundlicherweise von Herrn D.T. Yue (*Johns Hopkins University School of Medicine*, Baltimore, MA) zur Verfügung gestellt. Die EF - Hand Ca²⁺ - Bindedomänen sind jeweils durch einen D→A Austausch deaktiviert (Keen et al., 1999):

CaM ¹² :	D20A; D56A
CaM ³⁴ :	D93A; D129A
CaM ¹²³⁴ :	D20A; D56A; D93A; D129A

Als Ursprungs - DNA für die PCR - Amplifizierung der Calmodulin - Bindedomänen CNG A4I, CNG B1bII und CNG B1bI (siehe Anhang) diente die Plasmid - DNA der Wildtyp - Kanaluntereinheiten CNG A4 und CNG B1b in pcDNA3.1(+).

Die PCR - Fragmente wurden zur Selektion und Amplifizierung zunächst in pGEMT[®] kloniert. Nach der Sequenzierung wurden die bestätigten DNA - Klone für die Umklonierung in den prokaryotischen Expressionsvektor pET28a(+) verwendet.

11.11 PCR Standardprotokoll für die Klonierung in pGEMT[®]

Für die PCR - Amplifizierung wurde die *Phusion™ High-Fidelity DNA - Polymerase* mit Korrekturlesefunktion der Firma *Finnzymes Oy* (Espoo, Finnland) verwendet. Die Synthesegeschwindigkeit dieser DNA - Polymerase beträgt 1,3 - 1,5 kb/Minute, die Elongationszeit wurde entsprechend der Länge der zu amplifizierenden Sequenz gewählt.

Reaktionskomponente	Volumen (µl)	Konzentration/ Menge
10x <i>High Fidelity PCR Buffer</i> mit MgCl ₂	5	1,5 mM MgCl ₂
10mM dNTP-Mix	1	0,2 mM
<i>forward Primer</i>	1	10 pmol
<i>reverse Primer</i>	1	10 pmol
Ausgangs-DNA	x	5 ng
Phusion™ HF DNA-Pol.	0,5	0,02 U/µl
H ₂ O _{molbio}	ad 50	

Reaktionszyklus (32 Zyklen)	Temperatur (°C)	Dauer
Denaturierung	94	3 min
Denaturierung	94	30 s
Annealing	50-65	30 s
Elongation	72	40-60 s
Syntheseende	72	8 min

Die PCR - Produkte wurden bis zu ihrer Weiterverwendung bei 4°C gelagert. Zur Reinigung der PCR - Fragmente wurde der gesamte PCR - Ansatz auf ein 1,5% Agarosegel geladen. Nach dem Färben mit Ethidiumbromid wurden die DNA - Banden unter Fluoreszenzlicht bei 365 nm mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorf - Gefäß überführt. Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey - Nagel GmbH & Co. KG, Düren). Das Elutionsvolumen betrug 25 µl.

11.12 Synthese eines A - Überhangs und Klonierung in pGEMT®

Die *Phusion™ High-Fidelity* DNA-Polymerase synthetisiert wie die meisten korrekturlesenden DNA - Polymerasen glatte Enden. Die Klonierung in pGEMT® erfordert jedoch einen A - Überhang, da der bereits vom Hersteller restringierte Vektor zur Minimierung der Eigenligation einen T - Überhang aufweist. Der A - Überhang musste daher standardmäßig vor der Klonierung des gereinigten PCR - Fragments in pGEMT® synthetisiert werden.

Reaktionskomponente	Volumen (µl)
PCR-Fragment	6
10x PCR-Puffer B	1
2mM dATP	1 (0,2 mM)
25mM MgCl ₂	0,6 (1,5 mM)
Axon Taq-Polymerase	1
H ₂ O _{molbio}	ad 10

Der Ansatz wurde 25 Minuten bei 70°C in der PCR - Maschine inkubiert und anschließend bis zur Ligation mit pGEMT® bei 4°C gelagert. Das *pGEMT® Easy Vector System* (promega

GmbH, Mannheim) erfordert keinen Restriktionsverdau der PCR - Produkte und des Vektors. Die Ligation erfolgte nach der Synthese des A - Überhangs nach den Angaben des Herstellers.

Reaktionskomponente	Volumen (µl)
H ₂ O _{molbio}	1
PCR-Fragment	1
2x <i>Rapid</i> Ligationspuffer	5
pGEMT [®]	1
T4 DNA-Ligase	1

Der Ligationsansatz wurde für 3 Stunden bei 22°C in der PCR - Maschine inkubiert und anschliessend ein Volumen von 1 µl mittels Elektroporation in *E.coli* XL1 Blue transformiert. Anschließend wurden die Bakterien wie in Abschnitt 11.5.2 angegeben ausplattiert, die rekombinanten Klone selektioniert und in 5 ml LB - Medium amplifiziert. Zur Umklonierung in pET28a(+) selektierte Klone, wurden außerdem wie in Abschnitt 11.9 beschrieben, sequenziert.

11.13 Restriktion und Reinigung der in pGEMT[®] amplifizierten DNA

Für die Klonierung in pET28a(+) enthielten die für die Amplifizierung synthetisierten Oligonukleotid - Paare für die Fusionsproteine je eine Sequenz für die Synthese einer Restriktionsschnittstelle für BamHI oder NdeI. Die gereinigten und durch Sequenzierung bestätigten DNA - Klone in pGEMT[®] wurden deshalb entsprechend verdaut.

Reaktionskomponente	Volumen (µl)
H ₂ O _{molbio}	ad 40
10x Yellow Tango [™]	8
BamHI	2
NdeI	2
DNA 5 µg	x

Der Ansatz wurde in der PCR - Maschine für 4 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend wurde die Restriktion durch 10 minütiges Erhitzen bei 80°C beendet. Die verdaute DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Reinigung erfolgte nach der Agarose - Gelelektrophorese (siehe Kapitel 11.7) nach Angaben des Herstellers mit dem *NucleoSpin[®] Extract II Kit* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

11.14 Restriktion und Dephosphorylierung des Expressionsvektors pET28a(+)

Für die Ligation mit BamHI/ NdeI verdauten und gereinigten DNA - Fragmenten wurde der Expressionsvektor pET28a(+) für 5 Stunden bei 37°C mit den Restriktionsenzymen entsprechend verdaut. Anschließend wurde der Verdau durch 10 minütiges Erhitzen auf 80°C gestoppt.

Reaktionskomponente	Volumen (µl)
H ₂ O _{molbio}	32
10x Yellow Tango™	14
BamHI	2
NdeI	2
5µg pET28a(+)	20

Um die Eigenligation des Vektors zu verhindern wurde nach dem Verdau dessen 5' Ende mit einer alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (*CIAP*, *calf intestine alkaline phosphatase*, promega GmbH, Mannheim) dephosphoryliert.

Reaktionskomponente	Volumen (µl)
pET28a(+) Verdau	30
CIAP 10x Reaktionspuffer	4
CIAP	0,4
H ₂ O _{molbio}	5,6

Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37°C, anschließend wurde das CIAP - Enzym durch 15 minütiges Erhitzen auf 85°C inaktiviert. Die Aufreinigung wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit dem *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* der Firma promega GmbH, Mannheim, durchgeführt.

11.15 Ligation der DNA-Fragmente mit pET28a(+)

Für die Ligation mit pET28a(+) wurden die DNA-Fragmente im vierfachen molaren Überschuß eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde zunächst für 5 Stunden, bei 22°C und anschließend für 8 Stunden bei 16°C in der PCR-Maschine inkubiert.

Reaktionskomponente	Volumen (µl)
H ₂ O _{molbio}	ad 20
DNA - Fragment	x
pET28a(+) Verdau	x
10x Ligationspuffer	2
T4 DNA - Ligase	2

Danach wurde 1 µl des Ligationsansatzes in elektrokompetente *E.coli* XL1 Blue transformiert und der gesamte Transformationsansatz, wie in Abschnitt 11.5.2 beschrieben, ausplattiert. Am nächsten Tag wurde zur Identifizierung rekombinanter Klone zunächst eine Kolonie - PCR durchgeführt. Dazu wurden mit dem Zahnstocher 10 Klone in jeweils einen PCR - Ansatz überführt und das Ergebnis anschließend auf einem 1,5% Agarosegel analysiert.

Reaktionskomponente	Volumen (µL)	Konzentration/ Menge
10x PCR Puffer B	2	
25mM MgCl ₂	2	2,5mM
10mM dNTP-Mix	0,4	0,2mM
<i>forward</i> Primer	1	10pmol
<i>reverse</i> Primer	1	10pmol
Ausgangs-DNA	x	
Axon Taq-Polymerase	0,5	U
H ₂ O _{molbio}	ad20µL	

Reaktionszyklus (32 Zyklen)	Temperatur (°C)	Dauer
Denaturierung	94	3min
Denaturierung	94	30s
Annealing	50	30s
Elongation	72	40
Syntheseende	72	8min

Von den positiven Klonen wurde anschließend eine frische 5 ml Übernachtskultur angelegt. Nach der Präparation und Reinigung wurde von zwei bis drei Klonen jeweils 1 µl Plasmid - DNA wie in Abschnitt 11.14 beschrieben mit BamHI und NdeI verdaut und mittels Agarose - Gelelektrophorese analysiert. Die positiven Klone wurden wie in Abschnitt 11.9 beschrieben sequenziert. Sequenz - bestätigte Klone wurden dann in *E.coli* BL21(DE3) pLysS transformiert. Von diesem Transformationsansatz wurde ein Glycerinstock, wie in Kapitel 14.4 beschrieben, angelegt.

11.16 Zielgerichtete Mutagenese

Für die Expression der Fusionsproteine Cam^{T35C}, CaM^{F20W} und CaM^{F93W} wurde in die DNA des Wildtyp - Calmodulins nach der Klonierung in pET28a(+) mittels Mutagenese - PCR eine Punktmutation eingeführt. Hierfür wurde der *QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Die Oligonukleotide mit der Punktmutation wurden nach den Angaben des Herstellers synthetisiert.

Reaktionskomponente	Volumen (µl)	Konzentration/ Menge
10x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	5	
10mM dNTP-Mix	1	0,2 mM
<i>forward</i> Primer	1	10 pmol
<i>reverse</i> Primer	1	10 pmol
CaM/ pET28a(+)	x	25 ng
QuikSolution™	3	
H ₂ O _{molbio}	ad 50µl	
Axon Taq-Polymerase	1	0,05 U

Reaktionszyklus (18 Zyklen)	Temperatur (°C)	Dauer
Denaturierung	95	1 min
Denaturierung	95	50 s
Annealing	60	50 s
Elongation	68	5 min 40 s
Syntheseende	68	7 min

Nach der Mutagenese - PCR wurde die methylierte Ursprungs-DNA für 1 Stunde mit DpnI verdaut. Das Enzym wurde anschließend für 10 Minuten bei 80°C deaktiviert. Die Transformation von jeweils 2µl des DpnI - Verdaus in chemisch kompetente *E. coli* XL10 - Gold® wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Danach wurden je 200 und 300 µl des Transformationsansatzes auf LB/Kanamycinplatten ausplattiert. Die Transformation des Kontroll - Ansatzes wurde entsprechend auf IPTG/X - Gal - Platten ausgestrichen. Zur Selektion der rekombinanten Bakterien wurde weiter wie bereits in Kapitel 11.5.2 beschrieben vorgegangen.

11.17 mRNA - Isolierung aus olfaktorischem Epithel

Die OMP - Nukleinsäuresequenz für die Klonierung des olfaktorischen Markerproteins (*OMP*, *olfactory marker protein*) in pET28a(+) wurde aus der cDNA des olfaktorischen Epithels amplifiziert. Zur Gewinnung der Gesamt - RNA für die cDNA - Synthese wurde zunächst das olfaktorische Epithel der Ratte isoliert. Die Präparation der Nase wurde wie bereits beschrieben (Ungerer, 2005; Mayer, 2008) durchgeführt. Die Konchen des olfaktorischen Epithels wurden mit einer feinen Pinzette entnommen und in Stammlösung P getaucht um eventuell anhaftende Haare und Blutreste zu entfernen. Danach wurde das Gewebe in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Konchen wurden zunächst auf Eis in 1 ml Lösung D homogenisiert. Die mRNA - Isolierung erfolgte mittels Phenol - Chloroform Extraktion (Chomczynski & Sacchi, 1987). Das homogene Gewebe wurde dazu mit 500 µl Phenol, 100 µl Natriumacetat und 200 µl

Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Nach dem Mischen wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 Minuten bei 14000 g und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues RNase - freies 1,5 ml Eppendorf - Gefäß überführt. In einem zweiten Reinigungsschritt wurde die wässrige Phase erneut mit 500 µl Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und wie beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues RNase - freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei -80°C. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert, der Überstand verworfen, das RNA - Pellet in 100 µl Lösung D aufgenommen und erneut durch Zugabe von 100 µl Isopropanol für 30 min bei -80°C gefällt. Anschließend wurde wiederum zentrifugiert und durch Zugabe von 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Das RNA - Pellet wurde dann luftgetrocknet und unter kurzem Erwärmen bei 65°C in 50 – 100 µl DEPC - Wasser gelöst.

11.18 cDNA - Synthese

Die cDNA - Synthese wurde mit dem *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers in der *T Gradient PCR-Maschine* (Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt.

Reaktionskomponente	Volumen (µl)	Konzentration/ Menge
RNA	2	20 µg
oligo dT-Primer	4	400 pmol
DEPC-Wasser	ad 48 µl	
Inkubation	5 min, 70°C	
5x Reaktionspuffer	16	
10mM dNTP Mix	8	1 mM
RiboLock™	4	80 U
RNase-Inhibitor	4	
H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	4	800 U
Inkubation	120 min, 42°C	
Stoppen der Reaktion	10 min, 70°C	

Die OMP - DNA wurde mittels Standard - PCR amplifiziert und direkt in pET28a(+) kloniert. Dazu wurden das PCR - Produkt und der Vektor mit NotI und BamHI wie in Kapitel 11.14 beschrieben verdaut.

12 Biochemische Methoden

12.1 Lösungen für biochemische Arbeiten

12.1.1 Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese

5x SDS-Probenpuffer	10% (v/v) Glycerol 2% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 62,6mM Tris pH6.8
5x Nativ-Probenpuffer	10% (v/v) Glycerol 0,01% (w/v) Bromphenolblau 62,6mM Tris pH6.8
20x DTT	2M DTT Lagerung: -20°C

Gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige, 30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 37,5:1

Stabilisierte, gebrauchsfertige, 2%ige N,N'-Methylenbisacrylamid - Stammlösung

Sammelgelpuffer	1M Tris/HCl, pH 6,8
Standard Trenngelpuffer	1M Tris/HCl, pH 8.8
Nativ - PAGE Trenngelpuffer	2M Tris/HCl, pH 8.8
SDS - Lösung	10% (w/v) SDS
APS - Lösung	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Gebrauchsfertige 99% Tetramethyldiamin - Lösung (TEMED)

10x SDS - Elektrodenpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 2% (w/v) SDS pH 8.3 - 8,4
----------------------------	--------------------------------------------------------------

1x Nativ - Elektrodenpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin pH 8,3 - 8,4
Coomassie - Färbelösung	0,15 % Coomassie Brilliant Blue G250 50% Ethanol 10% Eisessig

12.1.2 Lösungen für die Western Blot - Analyse

Transferpuffer	25mM Tris 0,19M Glycin 20% (v/v) Methanol pH 8,3 - 8,4
1x PBS	8,1mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,9mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,13M NaCl pH 7,4
Milchpulver - Blocklösung	5% (w/v) Milchpulver in 1x PBS Lagerung: 4 - 8°C; 0,02 % NaN ₃
Milchpulver - Lösung	1% (w/v) Milchpulver in 1x PBS kurz vor Gebrauch angesetzt
Wasch - Puffer	0,1% (v/v) Triton X - 100 in 1x PBS
AGFA Neutol Entwicklerlösung; AGFA Leverkusen	
Superfix Fixierlösung; Tetenal AG (Norderstedt)	
ECL - Plus Detektionslösung	Lösung A zu Lösung B im Verhältnis 40 : 1 kurz vor Gebrauch angesetzt, lichtempfindlich

12.1.3 Proteinbestimmung nach der Amidoschwarz - Methode

Tris/SDS - Lösung	1M Tris/ HCl pH 7,5 1% (w/ v) SDS
Färbe - Lösung	0,5% (w/ v) Amidoschwarz B10 45% (v/ v) Methanol 10% (v/ v) Essigsäure
Entfärbe - Lösung	90% (v/ v) Methanol 2% (v/ v) Essigsäure 50% (v/ v) Ethanol
Elutions - Lösung	25 mM NaOH 50 µl EDTA

12.1.4 Bradford Proteinbestimmung

Bradford - Lösung	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 4,7% (w/v) Ethanol 8,5% (w/v) Phosphorsäure Proteinstandard BSA 1 µg/µl
-------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

12.2 Trennung von Proteinen durch Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Proteine wurden nach der klassischen Methode von Lämmli (Lämmli, 1970) durch denaturierende und native Polyacrylamid - Gelelektrophorese (PAGE) getrennt.

12.2.1 Denaturierende SDS - PAGE

Die Expression der Fusionsproteine und ihre Reinheit nach der Affinitätschromatographie wurde unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS - PAGE überprüft. Als Kammersystem diente das Modell Twin S mit einer Trenngelgröße von 5,5 x 8,5 cm und einer Geldicke von 1,5 mm. Es wurden 15 %ige Trenn - und 3,8%ige Sammelgele verwendet.

Reaktionskomponente	Konzentration Stammlösung	3,8% Sammelgel	15% Trenngel
Milli Q -Wasser		7,1 ml	1,9 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	30/ 0,8	1,25 ml	10 ml
1M Tris pH 6,8	1 M	1,25 ml	-
Tris pH 8,8	1 M	-	7,5 ml
SDS - Lösung	10%	0,2 ml	0,4 ml
APS	10%	0,1 ml	0,2 ml
TEMED	99%	0,01 ml	0,02 ml

Bei der Probenvorbereitung wurden 8 μ l Proteinlösung mit 1/5 des Endvolumens 5x Probenpuffer und 1/20 des Endvolumens 20x DTT versetzt. Nach dem Mischen wurden die Proben für 10 Minuten bei 90°C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurden sie kurz gevortext und für 3 Minuten bei 13000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Proben wurden aus dem Überstand in die Geltaschen pipettiert. Bei einer Stromstärke von 20 mA im Sammel - und 35 mA im Trenngel betrug die Elektrophoresedauer etwa 3 Stunden. Da alle exprimierten Fusionsproteine kleiner 20 kDa waren, wurde die Elektrophorese gestoppt, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers ein Zentimeter oberhalb des unteren Gelrandes angelangt war. Die Proteine wurden über Nacht auf dem Taumler in 50 ml Standard Coomassie Lösung gefärbt. Am nächsten Tag wurde das Entfärben in Wasser durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle so lange wiederholt, bis der Hintergrund des Gels vollständig entfärbt war.

12.2.2 Native PAGE

Zur Überprüfung der Kopplungseffizienz nach Kopplung von CaM^{T35C} mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6 - Bromoacetyl – 2 - Dimethylaminonaphthalen (*Badan*, Owenius et al., 1999), wurde nach der Farbstoffkopplung und Dialyse (siehe Abschnitt 14.4.3 und 13.3) eine native PAGE durchgeführt. Da die Trennung bei der nativen PAGE auf dem isoelektrischen Punkt der Proteine basiert und somit auf ihrer Ladung bei gegebenem pH - Wert, ist es mit dieser Methode auch möglich geringe Größenunterschiede aufzulösen. Als Kammersystem diente das Modell Twin L mit einer Trenngelgröße von 11,5 x 18,2 cm und einer Geldicke von 1,5 mm. Es wurden 15 %ige Trenn- und 3,8 %ige Sammelgele verwendet. Eine Erhöhung des Vernetzungsgrades von C = 0,8 auf C = 3 erwies sich für die Trennleistung als günstig.

Daher wurde, außer der kommerziell erhältlichen Polyacrylamid/Bisacrylamid Stammlösung, noch eine 2 %ige Bisacrylamid - Stammlösung verwendet.

Reaktionskomponente	Konzentration Stammlösung	3,8% Sammelgel	15% Trenngel
Milli Q-Wasser		14,8 ml	1,9 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid	30/ 0,8	2,5 ml	25 ml
Bisacrylamid	2%	-	8,26 ml
Tris pH 6,8/ Ca ²⁺	1M/1mM	2,5 ml	-
Tris pH 8,8/ Ca ²⁺	2M/2mM	-	9,38 ml
APS	10%	0,2 ml	0,5 ml
TEMED	99%	0,02 ml	0,05 ml

Bei der Probenvorbereitung wurde ein Volumen, das 10 µg Protein enthält, mit der entsprechenden Menge an 5x Nativ - Probenpuffer versetzt. Die Probe wurde kurz gevortext und anschließend für 15 Minuten bei 40°C im Heizblock inkubiert. Danach wurde für 3 Minuten bei 13000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der gesamte Überstand aufgetragen. Der isoelektrische Punkt von Calmodulin beträgt 4,1 und es wandert deshalb im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Bei einer Stromstärke von 35 mA im Sammelgel und 50 mA im Trenngel wurde die Elektrophorese nach 8 Stunden beendet. Als weiterer Indikator für die Laufgeschwindigkeit wurde 0,005% Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in 1x Nativ - Probenpuffer auf das Gel geladen. Das Gel wurde anschließend wie beschrieben gefärbt und entfärbt.

12.3 Western Blot Analyse: Transfer und Immobilisierung von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis von Histidin (His - tag) wurden die Fusionsproteine nach der Affinitätschromatographie auf PVDF-Membranen transferiert. Der Transfer erfolgte nach dem *Semi Dry* - erfahrung. Dazu wurden pro Gel 16 *Whatman*[®] - Papiere (3 mm *Chromatography paper, Whatman*[®] *International Ltd.*, Brentford, UK) und eine Membran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Das Gel und die *Whatman*[®] - Papiere wurden für 5 Minuten in Transfer - Puffer äquilibriert. Die PVDF - Membran wurde zunächst für 5 Minuten in Methanol aktiviert, anschließend ebenfalls in Transfer - Puffer äquilibriert. Auf die Anode der Blot - Apparatur wurden dann 8 Filterpapiere, die Membran, das Gel und abschließend 8 Filterpapiere in dieser Reihenfolge, blasenfrei, zum sogenannten *Blot* -

Sandwich aufgetürmt. Für einen optimalen Stromfluss wurde die Anodenplatte um das *Sandwich* getrocknet. Pro cm² Gelfläche wurde mit 1,8 mA, jedoch insgesamt mit nicht mehr als 450 mA, 90 Minuten geblottet.

12.4 Immunologischer Nachweis der Meerrettich - Peroxidase Aktivität

Nach dem Transfer wurden zunächst unspezifische Bindestellen auf der Membran durch Inkubation mit Milchpulver - Blockierlösung besetzt. Blockiert wurde über Nacht bei 4°C oder für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde für 90 Minuten mit Erstantikörper (siehe Abschnitt 7.3) in 4 ml einer 1 : 1000 Verdünnung in Milchpulver - Lösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte in 50 ml Falcon - Röhrchen, die mit dem Falcon - Ständer an einem mechanischen Rührer, wie er in der präparativen Chemie verwendet wird, angebracht wurden. Der Rührer wurde vertikal an einem Stativ befestigt. Danach wurden die Membranen dreimal für 5 Minuten auf dem Schüttler mit Wasch - Puffer und einmal für 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Die Inkubation mit Zweitantikörper (2.7.3) erfolgte für 60 Minuten in 10 ml Antikörper - Verdünnungslösung (1 : 30000) mit Hilfe der oben beschriebenen apparativen Vorrichtung. Anschließend wurde erneut dreimal für 5 Minuten in Wasch - Puffer gewaschen, dann einmal für 5 Minuten mit Wasser. Die Membranen wurden daraufhin in einer Filmentwickler - Kassette (*Hypercassette*[™], Amersham Biosciences, Freiburg) in feuchte Frischhaltefolie eingeschlagen.

Die Aktivität der Zweitantikörper - gekoppelten Meerrettich - Peroxidase (HRP) wurde mit dem ECL[™] Plus - System (Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert. Das Detektions - reagenz enthält zyklisches Diacylhydrazid (Lumigen PS - 2), das in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und mit Hilfe der Meerrettich - Peroxidase, die als Katalysator der Reaktion fungiert, zu einem Acridiniumester umgesetzt wird. Durch weitere Oxidation werden Teilchen (Elektronen) energetisch angeregt, die vorübergehend auf höheren Energie - Niveaus verweilen und schließlich ihre Energie durch Abgabe von Lichtquanten (Photonen) verlieren. Man bezeichnet diesen Vorgang als Chemilumineszenz. Im Falle des ECL[™] Plus - Systems dient der Acridiniumester für bis zu 24 Stunden nach Beginn der Reaktion als eine Art „Lichtspeicher“.

12.5 Methoden der Proteinbestimmung

In dieser Arbeit wurden gemäß den Anforderungen nach einer möglichst hohen Genauigkeit parallel zum Teil verschiedene Methoden der Konzentrationsbestimmung von Protein angewandt.

12.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Der Farbstoff Coomassie Brilliant-Blau G250 bildet in Lösung mit basischen und hydrophoben Aminosäuren einen Komplex. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm. Bei einer Proteinkonzentration zwischen 1 µg/ml und 20 µg/ml liegt diese Verschiebung im linearen Bereich. Als Referenzprotein zum Erstellen einer Eichgerade wurde Rinder Serumalbumin (*BSA, bovine serum albumine*) in den Konzentrationen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 µg/ml in 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,6, verwendet (Standardlösungen). Der molare Extinktionskoeffizient ϵ von BSA beträgt $44020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die genaue Konzentration der BSA-Stammlösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, wobei eine Konzentration von 1 mg/ml einer optischen Dichte $OD_{280} = 0,667$ entspricht. Von den Proben unbekannter Proteinkonzentration (Proteinlösungen) wurden drei Verdünnungen gemessen. Sofern die Absorptionen im linearen Bereich der Eichgerade lagen wurden die Ergebnisse gemittelt. Von den Standard-, als auch den Proteinlösungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende Menge der Proteinlösung mit 0,02 M Phosphatpuffer auf ein Volumen von 100 µl gebracht, gemischt und mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach dem Mischen wurden die Proben für 5 Minuten inkubiert und anschließend die OD_{595} im Photometer vermessen.

12.5.2 Die Amidoschwarz - Methode

Bei der Amidoschwarz-Methode, auch Schaffner/Weissman-Methode (Schaffner und Weissmann, 1973) genannt, wird gelöstes Protein durch Zugabe von Säure ausgefällt und das Präzipitat mit dem Farbstoff Amidoschwarz angefärbt. Dies hat den Vorteil, dass Störsubstanzen, wie Detergenzien oder Lipide, durch die Säurefällung entfernt werden. Als Proteinstandard wurde 1 mg/ml BSA in 0,02 M Phosphatpuffer verwendet. Bezüglich der eingesetzten Proteinmengen und der genauen Bestimmung der Konzentration der Eichlösung

wurde wie bei der Methode nach Bradford (siehe Kapitel 12.5.1) verfahren. Die Proteinlösungen wurden mit Wasser auf ein Endvolumen von 200 μ l gebracht, mit 20 μ l 10% (w/v) SDS versetzt und gründlich gemischt um die Proteine zu solubilisieren. Anschließend wurden 30 μ l 1 M Tris/HCl mit 1% SDS zugegeben. Nach dem Mischen wurden die Proteine durch Zugabe von je 60 μ l 100% (w/v) TCA für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurden sie auf einen Nitrocellulose Membranfilter aufgetragen, der zuvor mit 3 ml 6% (w/v) TCA gewaschen wurde. Der Membranfilter befand sich dazu auf einer Filterfritte, die über einen Gummikonus auf einer Saugflasche montiert war. Dadurch wurde eine starke Dispersion der Probe während des Auftragens vermieden. Der Filter wurde anschließend für 3 min in eine Petrischale ($\varnothing = 9$ cm) mit Färbe - Lösung gelegt, kurz mit H₂O gespült und schließlich dreimal, für je 2 Minuten mit Entfärbe - Lösung behandelt. Im Anschluss wurde der Filter an der Luft getrocknet, die gefärbten Bereiche ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorf - Gefäß, das 1 ml Elutions - Lösung enthielt, gegeben. Im nächsten Schritt wurden die gefärbten Proben für 20 min bei Raumtemperatur einrotiert. Dazu wurde der mechanischer Rührer (siehe Kapitel 12.4) und ein Ständer für Eppendorf - Gefäße verwendet. Nach dem Eluieren wurde die optische Dichte bei $\lambda = 630$ nm (OD_{630}) gemessen. Im linearen Bereich der Eichkurve (1 - 10 μ g) entspricht eine OD_{630} von 0,03 etwa 1 μ g Protein.

12.5.3 Bestimmung der optischen Dichte am Absorptionsmaximum

Die Proteinkonzentration kann am Absorptionsmaximum von Tryptophan bei der Wellenlänge $\lambda = 280$ nm (OD_{280}) nach dem Lambert - Beer Gesetz $E = cd\varepsilon$ spektrophotometrisch bestimmt werden (E : Absorption, d : Lichtweg, ε : molarer Absorptionskoeffizient). Dazu wurden die molaren Extinktionskoeffizienten der Fusionsproteine zu Beginn der vorliegenden Arbeit nach der Formel $\varepsilon = (n(W) \times 5500) + (n(Y) \times 1490) + (n(C) \times 125)$ errechnet (Gill & Hippel, 1989; Pace et al., 1995) und später mit Hilfe des Programms SEDNTERP v1.07 ermittelt. Mit Ausnahme der Calmodulin - Mutanten CaM^{F20W} und CaM^{F93W} wurde die Protein - Konzentration der Calmoduline am Absorptionsmaximum der Tyrosine bei der Wellenlänge $\lambda = 276$ nm (OD_{280}) bestimmt, da Wildtyp - Calmodulin keine Tryptophane enthält. Der Absorptionswert durch Streulicht bei $\lambda = 320$ nm (OD_{320}) wurde von der OD_{280} bzw. OD_{276} subtrahiert.

13 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine

13.1 Das pET28a(+)/ *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Expressionssystem

Die in dieser Arbeit exprimierten Fusionsproteine in dem IPTG - induzierbaren Vektor pET28a(+) wurden ausschließlich in *E.coli* BL21(DE3) pLysS exprimiert. Die entstehenden Gene wurden dazu stromabwärts vom starken T7 - Promotors in den Vektor kloniert. Vor der Induktion mit IPTG verhindert das lacI - Repressorprotein, das konstitutiv exprimiert wird, die Transkription des Zielgens. Dieser Promotor wird nicht durch die Bakterien eigene RNA - Polymerase erkannt und somit werden bis zu einer bestimmten Bakteriendichte wertvolle Energieressourcen, die dem Wachstum der Bakterien zur Verfügung stehen müssen, gespart. Für die Expression der T7 RNA - Polymerase enthält der *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Bakterienstamm ein Plasmid, das unter der Kontrolle des IPTG - induzierbaren lacUV5 - Promotors steht und dessen Transkription ebenfalls durch den lacI - Repressor unterbunden wird. Die Bindung von IPTG bewirkt durch Induktion von Konformationsänderungen des Repressorproteins, dass dieses nicht länger an die T7 Promotoren binden kann. Die Induktion der Proteinexpression mit IPTG bewirkt also zunächst die Expression der T7 RNA - Polymerase und schließlich die Transkription des Zielgens.

13.1.1 Standard-Kultivierung von *E.coli* BL21 (DE3) pLysS bei der Expression

Zum Animpfen der Flüssig-Kulturen für die Expression der Calmodulin - Mutanten wurde der bei -70°C gelagerte Glycerinstock verwendet (siehe 11.4). Dazu wurde mit Hilfe einer Gilson - Pipettenspitze eine geringe Menge des noch gefrorenen Glycerinstocks in 50 ml LB/Kanamycin - Vorkultur überführt. Zum Animpfen der Vorkulturen für die Expression der CNG - Kanalproteine wurden 500 µl Transformationsansatz verwendet. Dazu wurde die DNA für 30 Minuten vor dem Ansetzen der Vorkultur wie in Abschnitt 11.3.2 beschrieben, in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert. Die Vorkultur wurde standardmäßig über Nacht auf dem Bakterienschüttler bei 220 rpm und 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro 250 ml LB/Kanamycin - Expressionskultur 4 ml der Übernachtskultur überführt und wie in Abschnitt 11.4 beschrieben, bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 0,7 - 0,8$ geschüttelt. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe einer sterilen 1 M IPTG - Stammlösung in Milli - Q Wasser gestartet. Die Konzentration von IPTG in der Kultur betrug 1 mM. Unter den gleichen

Bedingungen wurde für weitere vier Stunden inkubiert. Danach wurden die Bakterien in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 4000 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Anschluss gleich lysiert (siehe Abschnitt 2.41 und 2.42) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

13.1.2 Kultivierung von *E.coli* BL21 (DE3) pLysS für die Expression von CNG A4I

Eine Expression des CNG A4I-Proteins konnte nur durch Inkubation der Expressionskultur bei Raumtemperatur erreicht werden. Für die Vorkultur bei der Expression des CNG - Kanalproteins A4I wurde wie Abschnitt 11.3.2 beschrieben transformiert. Die Vorkultur wurde anschließend über Nacht auf dem Bakterienschüttler bei 220 rpm und 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro 250 ml LB/Kanamycin - Expressionskultur 5 ml der Übernachtskultur zum Animpfen verwendet. Die Inkubation der Kultur bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,9 - 1,0$ erwies sich hier als günstig für die Proteinausbeute. Im nächsten Schritt wurde die Proteinexpression wie in Kapitel 12.6.2 beschrieben induziert und die Kultur anschließend auf dem Bakterienschüttler bei 220 rpm (RT) inkubiert. Die weitere Vorgehensweise entspricht der in Kapitel 12.6.2 beschriebenen.

13.2 Aufreinigung der Fusionsproteine

13.2.1 Lösungen für die Standard - Proteinaufreinigung

Bindepuffer 1	8,1 mM $Na_2HPO_4 \times H_2O$
	1,9 mM $NaH_2PO_4 \times H_2O$
	650 mM NaCl
	30 mM Imidazol
	pH 7,4, sterilfiltriert
Waschpuffer 1	8,1 mM $Na_2HPO_4 \times H_2O$
	1,9 mM $NaH_2PO_4 \times H_2O$
	650 mM NaCl
	60 mM Imidazol
	pH 7,4, sterilfiltriert

Rebindingpuffer1	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,9 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 650 mM NaCl pH 7,4, sterilfiltriert
Elutionspuffer	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,9 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 650 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 7,4, sterilfiltriert
20% EtOH	21 ml Ethanol 96% + 79 ml Milli - Q sterilfiltriert
PMSF	200 mM in 100% Ethanol, Lagerung: -20°C
Lysozym	25 mg/ ml, Lagerung: -20°C

13.2.2 Lösungen für die Proteinaufreinigung von CNG A4I

Bindepuffer 2	0,02 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 10 mM Imidazol pH 8,1
Waschpuffer 2	0,02 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 30 mM Imidazol pH 8,1
Rebindingpuffer 2	0,02 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 8,1

13.2.3 Lyse der Bakterien

Gefrorene Pellets wurden zunächst für 20 Minuten auf Eis aufgetaut. Zur Lyse der Bakterien wurden die Pellets durch Vortexen in 7 ml Bindepuffer 1 resuspendiert. Bakterien, die das CNG A4I Protein enthielten, wurden entsprechend in Bindepuffer 2 aufgenommen. Nach dem Resuspendieren wurden 280 µl Lysozym- und 35 µl PMSF - Stammlösung zugegeben, durch

zweimaliges Invertieren des Zentrifugenbechers gemischt und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate in ein 50 ml Falcon - Gefäß überführt und auf Eis mit einem Sonifikator sonifiziert. Die Sonifizierung erfolgte bei 60 Watt und einer Amplitude von 20%, für 2 Minuten in Zyklen, bei denen 2 s Ultraschall mit 1 s Pause abwechselten. Danach wurde für 25 Minuten bei 9000g und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand wurde über einen 45 µM Feinfilter filtriert. Anschließend wurde das Lysat mittels Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 13.2.4) gereinigt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Lysate, die das CNG B1bI - Protein enthielten, mussten sofort weiterverarbeitet werden, da das Protein beim Auftauen irreversibel ausfiel.

13.2.4 Isolation der Fusionsproteine mittels Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie

Für ihre Isolierung vom Gesamtprotein der Bakterien enthalten die Fusionsproteine N-terminal einen *His* - tag. Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte mittels einer FPLC - Anlage bestehend aus einer peristaltischen Pumpe, einer 1 ml Ni²⁺-NTA Chromatographiesäule, einem Durchflussphotometer, einem Schreiber und einem Fraktionssammler. Die Anlage wurde immer mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 - 1,5ml/min betrieben. Vor dem Wechseln der Lösungen für die Proteinaufreinigung wurde die Pumpe abgeschaltet, um zu vermeiden, dass Luftblasen ins System gelangen. Die Absorption des Säulendurchflusses wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280\text{nm}$ detektiert. Vor dem Auftragen des Lysats wurde die in 20% Ethanol gelagerte Säule mit 10 ml Elutionspuffer gespült und anschließend mit 5 – 10 ml Bindepuffer 1 äquilibriert. Lysate, die das CNG B1bI Protein enthielten wurden vor dem Auftragen auf die Säule in einem Verhältnis von 1 : 5 mit Bindepuffer 1 verdünnt. Pro Aufreinigungsschritt wurde maximal eine Lysatmenge, die 500 ml Bakterienkultur - Volumen entspricht, aufgetragen. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Proteine durch Spülen mit 10 ml Waschpuffer 1 von der Säule gewaschen. Die Durchflüsse des Lysats und der Waschlösung wurden in Falcon - Gefäßen getrennt aufbewahrt. Bei der Aufreinigung von CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴ wurde der Durchfluss des Lysats um die Proteinausbeute zu erhöhen ein zweites Mal über die Säule gegeben. Bei der Elution der Proteine wurde das Eluat in maximal 10 Fraktionen von 750 µl gesammelt. Die Hauptmenge an Protein befand sich stets in den Fraktionen 3 - 5. Nach der Aufreinigung wurden je 8 µl Lysat, Durchflüsse des Lysats und der Waschlösung 1 und die Elutionsfraktionen 2 - 8 mittels SDS - PAGE analysiert. In den meisten Fällen war der Grad der Verunreinigung nach der ersten

Aufreinigung > 10%. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen, wurden deshalb die Fraktionen, die das Fusionsprotein enthielten vereint und im Verhältnis von 1 : 16,6 mit Rebindingpuffer 1 verdünnt. Dadurch wird eine Imidazolkonzentration von 30 mM erreicht, die die erneute Bindung des Fusionsproteins an die Ni²⁺-NTA Matrix ermöglicht. Die weitere Vorgehensweise ist in den Kapiteln 13.3 und 13.4 beschrieben. Die Ni²⁺-NTA Affinitäts-säulen wurden für maximal fünf Aufreinigungen verwendet. Danach wurden die Säulen nach den Angaben des Herstellers gereinigt und regeneriert.

13.2.5 Isolation von CNG A4I mittels Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung des CNG A4I Proteins erfolgte gemäß der unter 13.2.4 beschriebenen Vorgehensweise, wurde jedoch unter „Niedrigsalz“-Bedingungen durchgeführt. Entsprechend wurden der Bindepuffer 2, Waschpuffer 2 und Rebindingpuffer 2 verwendet. Für die zweite Aufreinigung wurden zum Erreichen einer Imidazolkonzentration von 10 mM die vereinten Eluate im Verhältnis 1 : 50 verdünnt.

13.3 Dialyse der Eluate

Damit die Proteine nach der Aufreinigung ohne Rückstände von Puffersubstanzen und Salzen gewonnen werden konnten, wurden die Eluate gegen Milli-Q Wasser dialysiert. Für die Dialyse der Calmodulin-Mutanten wurden Schläuche mit einer Ausschlussgrenze von 12 – 14 kDa verwendet. Die Dialyse der CNG-Proteine erfolgte in Schläuchen mit einer Ausschlussgrenze von 3,5 kDa. Um die Schläuche von Schwermetallrückständen, wie sie bei ihrer Produktion entstehen, zu reinigen, wurden sie zunächst für 15 min in 10 mM EDTA-Lösung, pH 8, gekocht und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur in Milli-Q Wasser belassen. Die Vorbereitung der Schläuche erfolgte unter Rühren auf einem Magnetrührgerät. Die Dialyse der Proteine erfolgte gegen 5 l Milli-Q Wasser bei 8°C über Nacht unter Rühren im Kühlschrank.

13.4 Lyophilisierung

Die Lyophilisierung der Fusionsproteine erfolgte in der Gefriertrocknungsanlage (siehe 1.2). Für die Gefriertrocknung der Calmodulin-Mutanten wurden die dialysierten Proteinlösungen am nächsten Tag in tarierte Falcon-Gefäße überführt. Die Gefriertrocknung der CNG-

Proteine erfolgte in tarierten 7 ml Schnappdeckelgläsern, da das Lyophilisat später leichter überführt werden kann. Nach dem Überführen wurden die Lösungen zunächst für mindestens 20 min in der -80°C Kühltruhe vorgekühlt. Die Gefäße wurden mit einem Parafilm verschlossen und diese mit einer feinen Pinzette durchlöchert um das Verdampfen des Lösungsmittels zu gewährleisten. Abhängig vom Volumen wurden die Proben für 2 - 4 Tage lyophilisiert und anschließend zur Ausbeutebestimmung gewogen. Die Lyophilisate wurden bei -20°C gelagert.

14 Spektroskopische Methoden

Spektroskopische Methoden umfassen mehrere Verfahren, die untersuchen, wie elektromagnetische Strahlung und Materie in Wechselwirkung treten. Elektromagnetische Strahlen treten in „Paketen“, den so genannten Lichtquanten auf. Die Energie eines Lichtquants ist nach Einstein proportional zur Frequenz und umgekehrt proportional zur Länge der Welle und beträgt:

$$E = h \nu = hc \frac{1}{\lambda}$$

E Energie
h 6,6262 • 10³⁴ Js Planck Wirkungsquantum
ν Frequenz
c Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
λ Wellenlänge

Die verschiedenen spektroskopischen Methoden finden unter Anderem eine breite Anwendung im Bereich der Proteinanalytik. Hier spielen sie eine große Rolle bei der Qualitätsanalyse und Quantifizierung von Proteinen. Darüber hinaus dienen sie der Struktur - aufklärung und der Analyse von Protein - Wechselwirkungen.

14.1 Physikalische Grundlagen der Absorptionsspektroskopie

Ausgangspunkt von spektroskopischen Untersuchungen in der Proteinanalytik ist die Absorption elektromagnetischer Wellen durch das Protein, die zu einer Ladungsverschiebung im Molekül führt. Bei der Absorption nimmt die Intensität des einfallenden Lichts (I_0) in verdünnter Lösung exponentiell gemäß dem *Lambert - Beer Gesetz* mit dem zurückgelegten Weg (d) und abhängig vom molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ), sowie der Konzentration der Lösung (c) ab:

$$I = I_0 e^{-\epsilon cd}$$

$$\lg \frac{I_0}{I} = \epsilon cd = E$$

E Extinktion/Absorption

Welcher Spektralbereich absorbiert wird, hängt von den möglichen Energieübergängen und somit von den Absorptionseigenschaften im Protein ab. Das eingestrahle Licht wird durch den Absorptionsvorgang geschwächt. Die Energiezustände in Molekülen sind quantisiert, das heißt die Elektronen (e^-) können nur diskrete Energieniveaus besetzen und damit nur bestimmte Wellenfunktionen (Orbitale) und e^- -Dichteverteilungen im Raum einnehmen. Entspricht die Energie eines Photons, das auf ein Molekül trifft genau der Energiedifferenz zweier Energieniveaus, also ist $\Delta E = h\nu$ so kann diese elektromagnetische Strahlung genau ein e^- - des Proteins auf ein höheres Energieniveau anheben (Resonanzbedingung, Abb. 14). Der erste angeregte Zustand besitzt dabei in der Regel eine mehr als 30 kJ/mol höhere Energie.

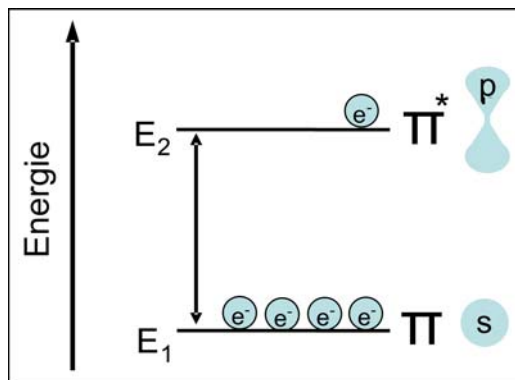


Abb. 14: Resonanzbedingung: Die Energiedifferenz (ΔE) zweier Energieniveaus (E_1 , E_2) entspricht der Energie eines eingestrahlt Photons ($h \cdot \nu$) und bewirkt die Anhebung von Elektronen (e^-). (π) Valenz- e^- im Grundzustand. (π^*) Valenz- e^- im angeregten Zustand. (p) Lappensymmetrisches p-Orbital. (s) Kugelsymmetrisches s-Orbital.

Bei dem Bestrahlen einer Messprobe mit Licht können, neben der Schwächung des eingestrahlt Lichts durch Absorption, noch weitere Prozesse stattfinden, wie beispielsweise die Emission von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz (Winter & Noll, 1998).

Die in dieser Arbeit verwendeten spektroskopischen Methoden basieren ausschließlich auf der Absorption elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren (*VIS*) und ultravioletten (*UV*) Bereich. Die Absorption basiert in diesem Spektralbereich auf Übergängen von Valenz-elektronen (π -Elektronen, $\pi - e^-$), die hier als *Chromophore* (griech.: farbtragend) dienen. In Proteinen findet man solche π -Elektronensysteme in der Peptidbindung und in den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin, sowie in der Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen (Galla, 1988; Lottspeich & Zorbas, 1998).

Bei der Absorption von Photonen im *UV - VIS* Bereich werden $\pi - e^-$ in Orbitale höherer Energieniveaus delokalisiert (π^*). Der energetische Zustand der e^- unterscheidet sich aber nicht nur durch das jeweils besetzte Orbital. Insgesamt existiert das e^- in vier Quantenzuständen. Ein wichtiger Quantenzustand ist der Eigendrehimpuls (Spin) des e^- . In so genannten Singulett - System sind die Elektronenspinmomente ungleichnamig und heben sich gegeneinander auf. Das Triplett - System besitzt e^- mit parallelen Elektronenspins (Vollhardt & Schore, 1995). Ob eingestrahelte Photonen absorbiert und somit geschwächt werden oder ob Fluoreszenz oder Phosphoreszenz auftritt, hängt auch vom Spin der e^- bei der Energieabgabe ab (Abb. 15).

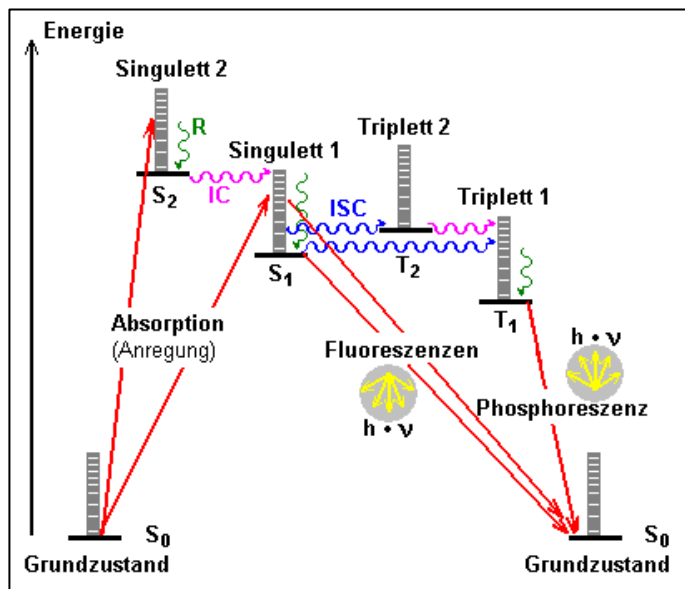


Abb. 15: Arten der Energieübergänge von Valenz- e^- nach Absorption von Photonen. Der Energieaustausch beruht auf Singulett - Singulett und Singulett - Triplett - Übergängen. Emission in Form von Fluoreszenz erfolgt nur aus den Übergängen von Singulett 1 (S_1) in den Grundzustand (S_0). Emission in Form von Phosphoreszenz erfolgt aus den Übergängen von Triplett 1 (T_1) nach S_0 . (**R**) Relaxation: Photonen - freier Übergang zum Abbau der Schwingung mit Energieverlust. (**ISC**) *Intersystem crossing*: Singulett - Triplett Übergang (**IC**) *Internal conversion*: Weiterer möglicher photonenfreier Übergang neben der Relaxation. (Mietke, www.elektroniktutor.de)

14.2 Lösungen für die Spektroskopie

Puffer A	20 mM Tris 10 mM EGTA 100 mM NaCl pH 7,2; sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Puffer A/TCEP	20 mM Tris 10 mM EGTA 100 mM NaCl 1 mM TCEP pH 7,2; sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Puffer B	20mM Tris 10mM EGTA 100mM NaCl 10mM CaCl ₂ pH 7,2; sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Puffer B/ TCEP	20mM Tris 10mM EGTA 100mM NaCl 10mM CaCl ₂ 1mM TCEP pH 7,2; sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
HE-Puffer	20mM Tris 20mM HEDTA 100mM NaCl pH 7,2; sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
HE-Puffer/ TCEP	20mM Tris 20mM HEDTA 100mM NaCl 1mM TCEP pH 7,2; sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

HEC - Puffer	20 mM Tris 20 mM HEDTA 100 mM NaCl 20 mM CaCl ₂ pH 7,2; sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
HEC - Puffer/TCEP	20 mM Tris 20 mM HEDTA 100 mM NaCl 20 mM CaCl ₂ 1 mM TCEP pH 7,2; sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
CC - Puffer	100 µL 2M CaCl ₂ ad 10 mL HEC - Puffer pH 7,2, sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
CC - Puffer/TCEP	100 µL 2M CaCl ₂ ad 10mL HEC - Puffer 1 mM TCEP pH 7,2, sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
FCS - Puffer	20 mM Tris 100 mM NaCl 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2, sterilfiltriert

14.3 Zirkulardichroismus (*circular dichroism*, CD) Spektroskopie

Die CD - Spektroskopie wurde in dieser Arbeit zum Nachweis der Bindung von Calmodulin und Calmodulinmutanten an Peptide und Proteine des olfaktorischen CNG - Kanals angewendet. Die CD Spektroskopie ist eine chiroptische Methode und stellt eine Variante der Absorptionsspektroskopie dar, die die Chiralität und somit die optische Aktivität von Molekülen ausnutzt (Woody, 1994; Kelly et al., 2005). Sie zählt mit der optischen Rotationsdispersion (ORD) zu den empfindlichsten niederauflösenden Methoden zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen und Nukleinsäuren. Der Zirkulardichroismus entsteht, wenn optisch aktive Substanzen rechts und links zirkular polarisiertes Licht (Abb. 16) unterschiedlich stark absorbieren. Zirkular polarisiertes Licht

resultiert aus zwei linear polarisierten Wellen gleicher Frequenz, die im rechten Winkel zueinander und mit einem Gangunterschied einer Viertel Wellenlänge ($\pi/2$) überlagert werden (Kleinschmidt, 2000).

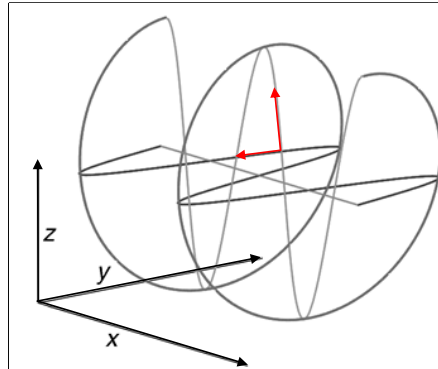


Abb. 16: Links zirkular polarisiertes Licht nach Überlagerung zweier linear polarisierter Wellen deren elektrische Feldvektoren senkrecht zueinander stehen (rote Pfeile), mit einer Phasenverschiebung von $\pi/2$.

Die Amplituden des aus der Probe austretenden rechts und links zirkular polarisierten Lichts sind unterschiedlich, was nach der vektoriellen Addition elliptisch polarisiertes Licht ergibt. Die Messgröße der CD Spektroskopie ist die Elliptizität (θ), die als der Arcustangens des Verhältnisses von kleiner zu großer Hauptachse der Ellipse definiert ist (siehe Abb. 17; Atkins & de Paula, 2005; Winter & Noll, 1998). In der praktischen CD Spektroskopie wird die Wellenlängen abhängige Elliptizität θ_λ gemessen und wie folgt definiert:

$$\tan \theta_\lambda = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L}$$

$I_{R/L}$ Intensität des rechts und links zirkular polarisierten Lichts nach der Absorption

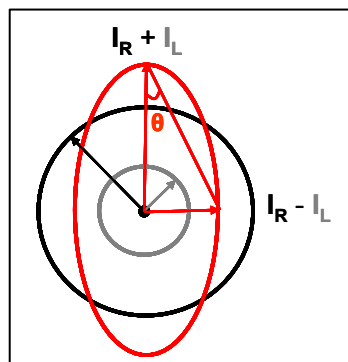


Abb. 17: Elliptisch polarisiertes Licht (**rot**) der Überlagerung absorbierten links (**grau**) und rechts (**schwarz**) zirkular polarisierten Lichts. Die Elliptizität ist definiert als der Arcustangens des Verhältnisses von kleiner zu großer Hauptachse der Ellipse. ($I_{R/L}$) Intensität des rechts bzw. links polarisierten Lichts nach Absorption.

Die Lichtintensitäten sind nach dem *Lambert - Beer Gesetz* mit den Extinktionskoeffizienten verknüpft. Durch Einsetzen erhält man näherungsweise für kleine θ :

$$\theta_{\lambda} = \frac{\ln 10 \cdot 180}{4\pi(\varepsilon_L - \varepsilon_R)c_m d}$$

$$[\theta_M]_{\lambda} = [\theta]_{\lambda} \frac{M}{100} \quad M \text{ Mittlere molare Masse}$$

Bei Makromolekülen wie Proteinen, wird die molare Elliptizität $[\theta M]_{\lambda}$ auf die mittlere molare Masse (*mean residue weight*, MRW) aller enthaltenen Aminosäurereste bezogen. Der Unterschied in der Absorption rechts und links polarisierten Lichts ist sehr gering und liegt in der Größenordnung von wenigen Hundertstel eines Grads. Zur schnelleren Berechnung der Differenz der Extinktionskoeffizienten aus der molaren Elliptizität faßt man die Konstanten zusammen und erhält (Winter & Noll, 1998):

$$[\theta M]_{\lambda} \approx 3300\Delta E$$

$$[[\theta M]_{\lambda}] = \frac{^{\circ}cm^2}{dmol} = m \text{ deg}$$

14.3.1 Messung von CD Mischspektren zur Analyse von Proteininteraktion

Bei Messungen in der Fern-UV- (220 - 250 nm) und in der Amid-Region (170 - 220 nm) wird das Licht vorwiegend von der Peptidbindung absorbiert. Dem entsprechend wurden die Spektren von Proteinlösungen standardmäßig bei einer Wellenlänge λ von 195 - 260 nm und mit einer Geschwindigkeit von 100 nm/min aufgenommen. Es wurden drei Akkumulationen gemessen. Die Temperatur betrug 25°C, der Probenhalter wurde permanent mit Stickstoff gespült. Das Spektropolarimeter ist mit einem Computer für die Datenaufnahme verbunden. Die während der Messung am Photodetektor angelegte Spannung wurde überprüft und bei einer Überspannung > 1000 V wurde der Wellenlängenbereich entsprechend angepaßt. Bei Proteinbindung ändern sich die relativen Sekundärstrukturanteile von Calmodulin. Um dies zu überprüfen wurden zunächst die Einzelspektren der potentiellen Bindungspartner gemessen. Dazu wurde 20 nM Protein eingesetzt. Für die Analyse der Mischspektren war die Konzentration beider Bindungspartner entsprechend 20 nM Protein. Die Messungen erfolgten Ca²⁺-frei in Puffer A und Puffer A/TCEP sowie in Anwesenheit von 30 µM Ca²⁺ in Puffer B und Puffer B/TCEP. Die Pufferspektren wurden entsprechend aufgezeichnet. Puffer- und Einzelspektren wurden am gleichen Meßtag wie die Mischspektren analysiert. Als

Proteinstocklösungen für die Vorbereitung der Meßlösung zur Analyse der Mischspektren dienten die gleichen Lösungen, die auch zur Analyse der Einzelspektren eingesetzt wurden.

14.3.2 Analyse von CD Spektroskopie Daten

Mit dem CD Spektrometer wurden Sekundärstrukturanteile von Proteinen (α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel) und ihre Änderungen bei Protein-Protein Interaktionen quantifiziert. Die Elliptizität ist abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts und charakteristisch für Sekundärstrukturen von Proteinen. Zur Analyse der Sekundärstrukturänderungen von Calmodulin allein und in Anwesenheit potentieller Bindungspartner dienten standardmäßig die CD - Spektren von Poly - L Lysin (Greenfield & Fasman, 1969; Myer, 1970; Greenfield, 1996; Abb. 18). Diese Referenzspektren zeigen, daß die α -Helix zwei negative Banden bei 208 - 210 sowie 222 nm und eine positive Bande bei 192 nm ausbildet. Das β -Faltblatt weist ein Minimum bei 216 - 218 nm und ein Maximum zwischen 195 und 200 nm auf.

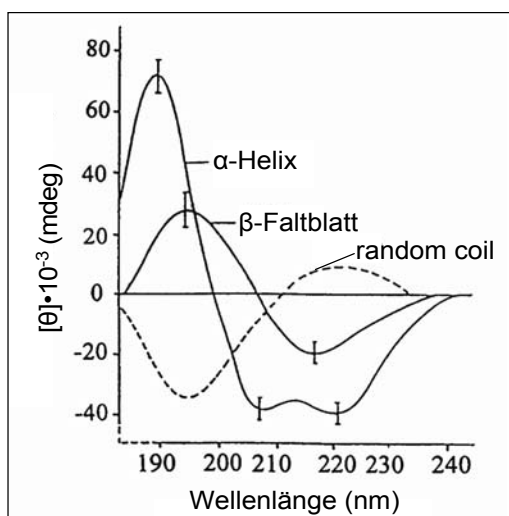


Abb. 18: CD - Spektren von Poly - L Lysin in wässriger Lösung (mod. Greenfield & Fasman, 1969).

Für die Dekonvolution der CD - Daten wurden die Programme *CD Deconvolution* und *CD Mix* die von Herrn Dr. Sandro Keller, FMP, Berlin Buch, entwickelt wurden, verwendet. Mit diesen Programmen wurden die CD - Spektren der Peptide nach der Methode von Reed (Reed & Reed, 1997) und die Protein-/Mischspektren nach der Methode von Brahms (Brahms & Brahms, 1980) gefittet. Das Spektropolarimeter arbeitet bis zu einer Detektorspannung von etwa 600 V linear. Daher wurden bei der Auswertung keine Elliptizitätswerte berücksichtigt,

die bei einem Spannungswert > 600 V aufgenommen wurden. Die Glättung der CD - Spektren erfolgte nach der Analyse mit den oben genannten Computer Programmen mit Origin[®] 7G-SR1, v7.0303.

14.4 Fluoreszenzspektroskopie

Mit der Fluoreszenzspektroskopie wurde die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung von Calmodulin an Peptide und Proteine des olfaktorischen CNG - Kanals untersucht. Außerdem wurde geprüft, ob die Ca^{2+} -Affinität der C - und N - terminalen Ca^{2+} - Bindestellen des Calmodulins durch Bindung an Peptide des CNG - Kanals beeinflusst wird. Voraussetzung für die Durchführbarkeit fluoreszenzspektroskopischer Untersuchungen ist das Vorhandensein von Fluorophoren im Protein. Analysen, die auf intrinsischer Fluoreszenz beruhen, sind im Wesentlichen auf das Vorhandensein von Tryptophan und Cofaktoren wie zum Beispiel Häm - Gruppen begrenzt. Tyrosin ist zwar ebenfalls stark fluoreszierend, dennoch wird die Fluoreszenzemission in gefalteten Proteinen zu 90% von Tryptophan getragen, da die Tyrosinemission durch Wasserstoffbrückenbindung und Energietransfer auf Tryptophane stark gequencht wird (Steiner & Kolinski, 1968). Die Quantenausbeute der Fluoreszenz von Phenylalanin ist für fluoreszenzspektroskopische Analysen zu gering (Tab. 2.1). Bei der Analyse findet die Anregung des Tryptophans außerhalb des Absorptionsmaximums bei 295 nm statt, um die Anregung von Tyrosin zu vermeiden (Lottspeich & Zorbas, 1998; Callis, 1997; Lakowicz; 1983; Abb.19).

Tab. 2.1: Eigenschaften der fluoreszierenden Aminosäuren

	Tryptophan (W)	Tyrosin (Y)	Phenylalanin (F)
Häufigkeit (%)	1,1	3,5	3,5
Quantenausbeute (%)	13	14	2
λ_{max} (nm)	278	275	260
ϵ (L/ mol • cm)	$5,6 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$0,2 \cdot 10^3$

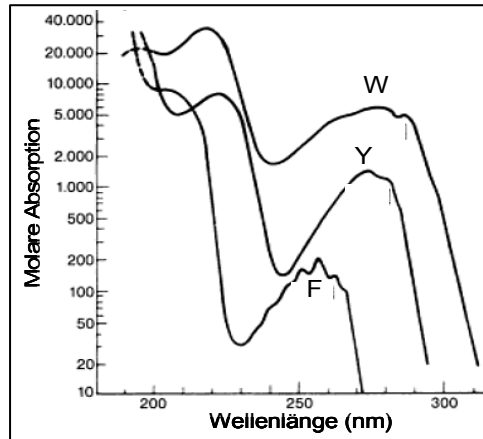


Abb. 19: Absorptionsspektrum von Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) und Tryptophan (W). Im Wellenlängenbereich oberhalb 230 nm sind die aromatischen Seitenketten für die Absorption verantwortlich. (Mod. Wettlaufer, 1962).

Für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung können Proteine auch mit extrinsischen Fluorophoren modifiziert werden. Solche Fluoreszenzsonden werden kovalent an SH - oder NH_2 - Gruppen gebunden. Vorteilhaft ist, daß eventuell störende intrinsische Fluoreszenz bei der Verwendung extrinsischer Fluoreszenzsonden auf Grund verschiedener Absorptionsmaxima keine Rolle spielen.

Die Fluoreszenzspektroskopie zur Analyse von Proteininteraktion beruht auf der Tatsache, dass das absorbierte Licht wellenlängenverschoben emittiert werden kann (Stryer, 1968). Die Energie der emittierten Photonen ist stets geringer als die absorbierte Energie. Das Emissionsspektrum ist also im Vergleich zum Absorptionsspektrum rotverschoben (Abb. 20).

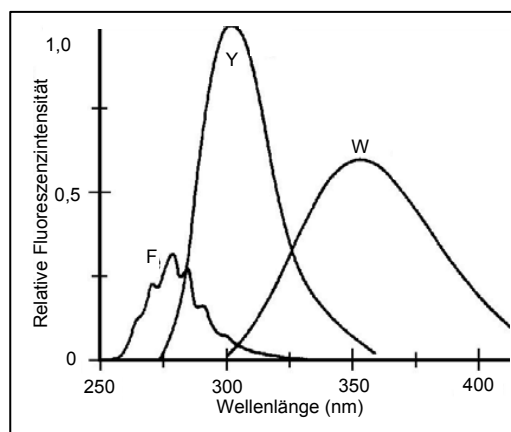


Abb. 20: Fluoreszenz - Emissionsspektrum von Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) und Tryptophan (W). (Mod. Lakowicz, 1983).

Diese Eigenschaft bezeichnet man nach ihrem Entdecker als *Stokes shift* (Winter & Noll, 1998). Bei der Energieabgabe liefert das emittierte Licht aufgrund der Wechselwirkung des Fluorophors mit Lösemittelmolekülen oder benachbarten inter- und intramolekularen Gruppen zusätzliche Informationen über die Fluorophorumgebung (Lakowicz, 1999). Die emittierte Fluoreszenz zeigt so bezüglich der Lage des Emissionsmaximums und der Quantenausbeute eine starke Abhängigkeit von der Umgebungspolarität (Callis, 1997; Sipior & Sulkes, 1988). Die Umgebungsabhängigkeit bei den intrinsischen Fluorophoren ist bei Tryptophan am stärksten ausgeprägt. Sein Emissionsmaximum liegt je nach Lösemittel zwischen 353 und 308 nm.

14.4.1 Einfluß des Lösemittels auf die Fluoreszenz

Lösemittelleffekte auf die emittierte Fluoreszenz sind einerseits auf die Eigenschaft des Lösemittels als dielektrisches Medium zurückzuführen, andererseits auf molekulare Wechselwirkungen, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindung, wie sie zwischen dem Fluorophor und dem Lösemittel auftreten können. Generell wird der Einfluß des Lösemittels auf die Fluoreszenz als Lösemittelrelaxation bezeichnet (Callis, 1997). Die Lösemittelrelaxation bewirkt durch Stabilisierung des angeregten Zustands S1 (Abb. 15) eine Polarisierung der Lösemittelmoleküle, die das Dipolmoment des Fluorophors abschwächt. Bei starker Polarität des Lösemittels beobachtet man deshalb eine stärkere Rotverschiebung des Emissionsspektrums, als in weniger polaren Lösemitteln. Die *Lippert - Gleichung* beschreibt den lösemittelabhängigen *Stokes shift* ($\nu_{\text{Abs}} - \nu_{\text{Fluo}}$) als eine vom Brechungsindex η und der dielektrischen konstante ε abhängige Eigenschaft (Atkins, 1990; Lakowicz, 1999):

$$\nu_{\text{Abs}} - \nu_{\text{Fluo}} = \frac{2}{hc} \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{\eta^2 - 1}{2\eta^2 + 1} \right) \left(\frac{(\mu^* - \mu)^2}{a^3} \right) + \text{const.}$$

$(\mu^* - \mu)^2$ Differenz der Dipolmomente des angeregten
und des Grundzustandes
 a Radius der Kavität, in der sich der Fluorophor
befindet

14.4.2 Einfluß der Proteinstruktur auf die Fluoreszenz

Auch beim Einfluß der Proteinstruktur auf die emittierte Fluoreszenz ist die Umgebungspolarität sowohl des intrinsischen als auch des extrinsischen Fluorophors entscheidend. Die aromatischen Aminosäuren sind relativ unpolar und liegen deshalb oft im Innern der Proteine. Eine stärkere Exposition zum Lösemittel oder die Änderung der räumlichen Nähe zu bestimmten Aminosäuren auf Grund einer Konformationsänderung des Proteins, wie sie auch bei der Wechselwirkung mit einem zweiten Protein auftritt, kann das Fluoreszenzverhalten des Fluorophors ändern. Die Tryptophanfluoreszenz kann zum Beispiel intrinsisch durch räumliche Nähe zu Cystin und bestimmte Aminosäuren, wie Prolin, Methionin und Histidin stark gequencht werden (Cowgill, 1967; Steiner & Kirby, 1969; Van Gilst & Hudson, 1996).

14.4.3 Badankopplung von CaM^{T35C}

Für fluoreszenzspektroskopische Interaktionsstudien von Calmodulin mit Peptiden und Proteinen des CNG-Kanals wurde die CaM^{T35C}- Mutante mit dem Fluoreszenzfarbstoff Badan (6-Bromoacetyl - 2-dimethylaminonaphthalen, invitrogen, Karlsruhe, Abb.21) gekoppelt. Badan dient in den Experimenten somit als umgebungssensitiver Fluoreszenzreporter, dessen Emission sich in Abhängigkeit von der Polarisierbarkeit der Umgebung ändert.

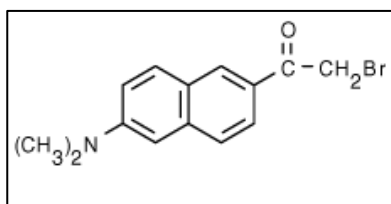


Abb. 21: 6 - Bromoacetyl-2dimethylaminonaphthalen (Badan, invitrogen).

Dafür wurden potentielle Cystine durch Dimerisierung von Calmodulinen an der Aminosäureposition 35 zunächst reduziert und die SH - Gruppen anschließend mit dem Haloalkylderivat Badan alkylert. Dabei entsteht eine Thioetherbindung.



Für die Kopplungsreaktion wurden 1,7 mg CaM^{T35C} in 400 μL 20 mM Tris, pH 7,4 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 100 μL 1,5 M KCl und 4 μL 0,5 M TCEP (Tris(2 - Carboxyethyl) Phosphin, invitrogen, Karlsruhe) gegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei RT auf dem Taumler inkubiert. Für die Farbstoffkopplung wurden 2,5 mg Badan in 500 μL DMF gelöst. Beide Lösungen wurden durch langsames Tropfen der wäßrigen Proteinlösung in die Farbstofflösung im Dunkeln vereint. Das molare Verhältnis von Badan zu CaM^{T35C} betrug 10 : 1. Die Proteinkonzentration im Gesamtansatz betrug 100 μM . Der Ansatz wurde anschließend für 4 Stunden im Dunkeln bei RT auf dem Taumler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von β - Mercaptoethanol (Endkonzentration 30 mM) gestoppt. Um die Präzipitation von CaM-Badans zu verhindern, wurde der Kopplungsansatz 1 : 10 in Tris (20 mM, pH 7,4) verdünnt und anschließend gegen 5 l Milli - Q - Wasser über Nacht wie in Kapitel 13.3 beschrieben dialysiert. Am nächsten Tag wurde das Kopplungsprodukt lyophilisiert.

14.4.4 Bestimmung der Ca^{2+} - Abhängigkeit von Protein - Protein Interaktionen

Die fluoreszenzspektroskopische Analyse der Ca^{2+} - Abhängigkeit der Bindung basiert auf der Fluoreszenz von Badan - gekoppeltem Protein bzw. Peptid in An - und Abwesenheit eines Bindungspartners. Es wurde sowohl die Position des Emissionsmaximums als auch die Intensität der emittierten Strahlung des Badans analysiert. Die Werte wurden gegen den dekadischen Logarithmus der Ca^{2+} - Konzentration dargestellt und falls möglich eine Dosis - Wirkungskurve erstellt.

Zunächst wurden standardmäßig von allen Interaktionspartnern 80 – 150 μM Stocklösungen in Puffer A hergestellt. Bei der Verwendung von Peptiden mit C - terminalem Cystein (siehe Kapitel 9) und CNG A4I wurde Puffer A/TCEP verwendet. Die Konzentration des Badan-gekoppelten Proteins im 100 μl Reaktionsansatz betrug 1,5 μM , die der potentiellen Bindungspartner 3,0 μM . Die Messungen wurden bei Ca^{2+} - Konzentration von 0 – 1 mM Ca^{2+} durchgeführt. Es wurden mindestens drei Replikate, das heißt drei verschiedene Reaktionsansätze, vorbereitet und gemessen. Im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 1 μM Ca^{2+} wurde Puffer A mit Puffer B in den entsprechenden Verhältnissen gemischt. Für Ca^{2+} - Konzentrationen $> 1 \mu\text{M}$ wurden die HE -, HEC - und CC - Puffer entsprechend verwendet. Die freie Ca^{2+} - Konzentration wurde mit dem Programm winmaxc 32 berechnet und zusätzlich mit dem Ca^{2+} - Fluoreszenzindikator Fura-2 nach Angaben des Herstellers (F1221, invitrogen, Karlsruhe) überprüft (Grynkiewicz et al., 1985). Für Experimente mit Peptiden mit

N - terminalem Cystein wurden die Puffer mit 1 mM TCEP verwendet. Der Reaktionsansatz wurde durch kurzes Vortexen gemischt und anschließend in der Mini - Tischzentrifuge (neolab) herunterzentrifugiert. Die Proben wurden vor der Analyse für 10 Minuten bei 25°C, in einem Thermostat inkubiert. Um das Anhaften geladener Peptide an die Glasoberfläche zu verhindern, wurde die Küvette mit *BlueSlick*[™] (Serva) hydrophob nach den Angaben des Herstellers beschichtet. Nach der Inkubation wurden die Proben mit einer Pipette blasenfrei in die Küvette überführt. Das Emissionsspektrum der Badanfluoreszenz bei Anregungslängen von 400 - 600nm wurde im Spektrofluorometer am Absorptionsmaximum $\lambda = 387\text{nm}$, mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 100 nm/Minute, aufgenommen. Die Spaltbreite der Anregung betrug 5 mm, die der Emission 10 mm.

14.4.5 Einfluß der Peptidbindung auf die Ca^{2+} - Affinität des Calmodulins

Die Frage, ob die C - und N - terminalen Ca^{2+} - Bindestellen von Calmodulin durch Bindung B1b- und A4-Peptide des CNG-Kanals in ihrer Ca^{2+} -Affinität beeinflusst werden, wurde ebenfalls fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die Experimente basierten auf der Tryptophan abhängigen, intrinsischen Fluoreszenz der Calmodulin Mutanten CaM^{F20W} und CaM^{F93W} . In den Mutanten wurde die Aminosäure (F) an den Positionen 20 und 93 durch Tryptophan (W) ersetzt um Konformationsänderung von Calmodulin bei Bindung von Kalzium untersuchen zu können. Die Lage der Emissionsmaxima und die Intensitäten der Tryptophan-Fluoreszenz wurden bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen in An- und Abwesenheit der Peptide verglichen. Da das A4- Wildtyppeptid C - terminal der LQ - Bindestelle ein Tryptophan enthält, wurde für dieses Experiment die entsprechende W→A Mutante A4^{W} verwendet. Das Experiment wurde wie in Abschnitt 14.4.4 beschrieben durchgeführt. Da die Quantenausbeute von Tryptophan geringer ist als die des Badan - Fluorophors, wurden die Experimente mit den Tryptophan Mutanten mit je 9 μM $\text{CaM}^{\text{F20W/F93W}}$ und 18 μM Peptid eingesetzt.

14.4.6 Analyse der Fluoreszenzspektroskopie Daten

Die Analyse der Ca^{2+} -abhängigen Verschiebung des Emissionsmaximums und der Emissionsintensität erfolgte mit dem Programm Origin[®] 7G-SR1, v7.0303. Dazu wurden die Werte der Emissionsmaxima und der maximalen Intensitäten von mindestens 3 Replikaten pro gemessener Ca^{2+} -Konzentration gemittelt. Zum Berechnen der Dissoziationskonstante

von Ca^{2+} (EC_{50} (Ca^{2+})) wurde die Dosis - Wirkung - Kurve mit variabler Steigung angewendet.

14.5 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) diene in dieser Arbeit der Analyse der Stöchiometrie löslicher Molekülkomplexe aus Calmodulin und den Peptiden und Proteinen des olfaktorischen CNG - Kanals. Außerdem wurde die Reinheit der exprimierten Proteine und Peptide mit der AUZ überprüft. Durch den Vergleich von Sedimentationskoeffizienten wurde des Weiteren untersucht, ob die Sekundärstruktur der exprimierten Calmodulinmutanten der charakteristischen Faltung von Wildtyp Calmodulin entspricht.

Bei der AUZ wird die zu untersuchende Probe in eine sektorförmige Probenzelle eingebracht und im Rotor der Zentrifuge auf maximal 60000 U/min beschleunigt. Die Zentrifugalkraft erreicht so das 250000 fache der Erdgravitation. Die gelösten Partikel sedimentieren gemäß ihrer Oberfläche und ihrer Masse in Richtung des Bodens der Probenzelle. Das Sedimentationsverhalten der beschleunigten Partikel und ihre Verteilung in der Meßzelle wird während der Zentrifugation über eine Absorbtiionsoptik gemessen (siehe Abb. 22).

Prinzipiell werden bei der AUZ zwei Analyseverfahren angewendet: Beim Sedimentationsgeschwindigkeitslauf wird die Radialgeschwindigkeit des Rotors so gewählt, daß die gelösten Partikel zum Zellboden sedimentieren. Dieses Verfahren dient der Analyse des Sedimentationskoeffizienten. Beim Sedimentationsgleichgewichtslauf wird die Drehgeschwindigkeit des Rotors so gewählt, daß sich sedimentierende und rückdiffundierende Partikel über das ganze Zentrifugalfeld verteilen. Die Zeit, die die Teilchen für die Ausbildung eines sich nicht mehr ändernden Konzentrationsgradienten, das Gleichgewicht, benötigen, hängt von der Molekülmasse der zu untersuchenden Partikel, der Temperatur sowie der Dichte des Lösungsmittels ab und liegt typischerweise zwischen 4 Stunden und mehreren Tagen. Mit einem Sedimentationsgleichgewichtslauf kann so die Molekülmasse formunabhängig bestimmt werden.

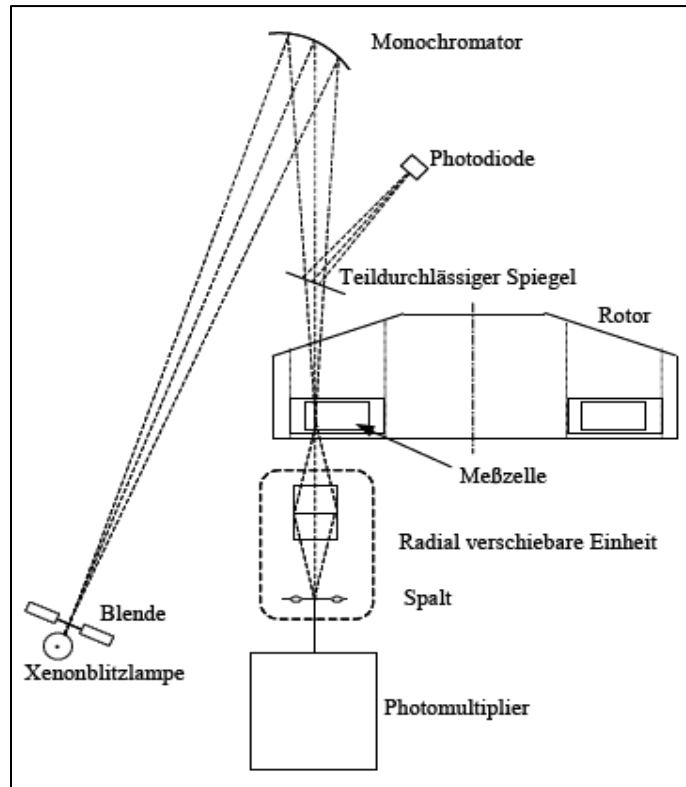


Abb. 22: Schematische Darstellung der Absorptionsoptik der analytischen Ultrazentrifuge. Lichtpulse, die von der Xenonblitzlampe abgestrahlt werden, sind mit der rotierenden Meßzelle synchronisiert. Die Messung der radialen Absorption erfolgt über den gesamten Radius der Meßzelle, so daß alle sedimentierenden Partikel erfaßt werden. (Mod. Hwww. nanolytics.de/auzH; Mücke, 2008).

14.5.1 Physikalische Grundlagen der Sedimentation

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe durchgeführt. Das physikalische Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß jedes Molekül eine von der Molekülmasse abhängige Zentrifugalkraft F_z , eine von der Dichte des Lösungsmittels abhängige Auftriebskraft F_a und eine geschwindigkeitsabhängige Reibungskraft F_r erfährt. Zwischen diesen Kräften stellt sich ein Gleichgewicht ein:

$$0 = F_z + F_a + F_r$$

Mit:

$$F_z = m\omega^2 r$$

$$F_a = -m^0 \omega^2 r$$

$$F_r = -fu$$

m	Masse des Teilchens
ω	Winkelgeschwindigkeit des Rotors
r	Abstand des Teilchens von der Rotorachse
m^0	Masse des verdrängten Puffers
v	partielles spezifisches Volumen des Teilchens
ρ	Dichte des Puffers
f	Reibungskoeffizient
u	Geschwindigkeit des Teilchens

$$m^0 = m\bar{v}\rho$$

ergibt sich:

$$\frac{m(1-\bar{v}\rho)}{f}\omega^2 r - fu = 0$$

Der Sedimentationskoeffizient s ist eine Proportionalitätskonstante. Durch Umstellen der Gleichung erhält man:

$$\frac{u}{\omega^2 r} = \frac{m(1-\bar{v}\rho)}{f} \equiv s$$

$$[s] = (10^{-13} s) \text{ oder } (S) \text{ Svedberg}$$

Während des Ultrazentrifugenlaufs wird die Konzentration der Partikel in Abhängigkeit von der Zeit als Funktion des Abstandes zur Drehachse gemessen. Es ergeben sich zeitabhängige Verschiebungen der Wendepunkte der Sedimentationsbanden r_{bnd} (Abb. 23). Die zeitliche Verschiebung der Wendepunkte in Bezug zum Meniskus des Lösemittels r_m hängt ebenfalls von s ab. Die logarithmische Auftragung des Verhältnisses r_{bnd}/r_m über dem Laufzeitintegral $\int \omega^2 dt$ ergibt eine Gerade mit der Steigung s (Abb. 24).

$$\ln \frac{r_{bnd}}{r_m} = s \int \omega^2 dt$$

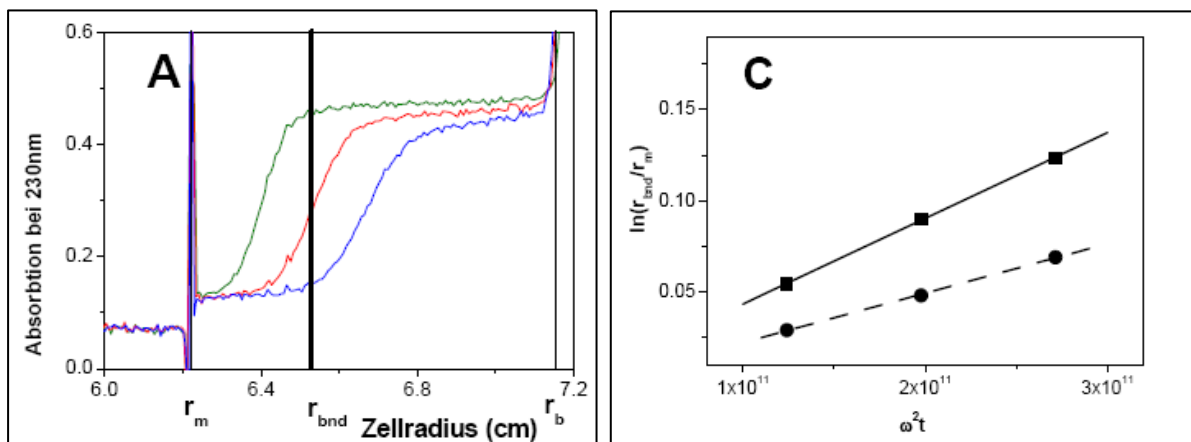


Abb. 23 (links): Zeitabhängige Bewegung der Sedimentationsbanden in einem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment. Der Wendepunkt der Sedimentationsbanden entspricht der mittleren Bandengeschwindigkeit r_{bnd} (siehe Text). **Abb. 24 (rechts):** Bei Auftragung der Bandengeschwindigkeit gegen das Laufzeitintegral (siehe Text) entspricht die Steigung der Geraden dem Sedimentationskoeffizienten s . (Mod. Mücke, 2008).

Die Sedimentationsbanden verbreitern sich auf Grund von Diffusion zunehmend entlang des Konzentrationsgradienten. Daher wird anstelle des Wendepunkts die Sedimentationskoeffizientenverteilung $g(s^*)$ zur Berechnung über die gesamte Zelle verwendet (Stafford, 1992). Hierzu werden aufeinanderfolgende Sedimentationsprofile (S-Profile) subtrahiert. Kleine Zeitabstände zwischen den Absorptionmessungen ergeben eine gute Näherung der zeitlichen Ableitung dc/dt an jeder radialen Position. Der radiale Abstand r steht mit s^* unter Berücksichtigung des Laufzeitintegrals in folgender Beziehung:

$$s^* = \frac{1}{\omega^2 t} \ln\left(\frac{r}{r_m}\right)$$

Die s^* - transformierten Kurven können nun unter Berücksichtigung der radialen Verdünnung c_p der Ausgangskonzentration c_0

$$c_p = c_0 \left(\frac{r_m}{r_{bnd}}\right)^2$$

übereinandergelegt und gemittelt werden:

$$g(s^*) = \left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_{corr} \left(\frac{1}{c_0}\right) \left(\frac{\omega^2 t^2}{\ln r_m / r}\right) \left(\frac{r}{r_m}\right)^2$$

Für eine ideale Lösung, die nur eine Teilchenspezies enthält, kann eine Gauß - Kurve an die $g(s^*)$ Funktion angepasst werden. Das Maximum gibt den Sedimentationskoeffizienten an (siehe Abb. 25).

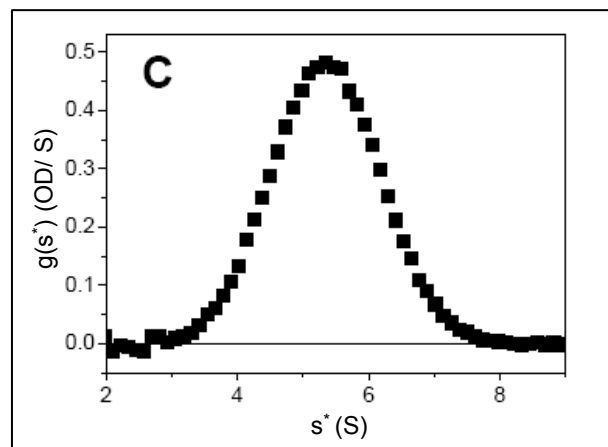


Abb. 25: Gauß-Verteilung mit gutem Signal-zu-Rauschen Verhältnis. Der Hochpunkt der Kurve entspricht dem s -Wert der Molekülspezies. (Mod. Mücke, 2008).

14.5.2 AUZ zur Analyse löslicher Molekülkomplexe

Für die analytische Ultrazentrifugation wurden die Proteinkonzentrationen bei den Einzelmolekülstudien so gewählt, daß die optische Dichte bei $\lambda = 230$ nm zwischen 0,1 und 0,5 betrug. Dies entsprach bei den verwendeten Peptiden und Proteinen einer Konzentration zwischen 0,1 und 0,2 g/l. Als Verdünnungspuffer diente der FCS - Puffer mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM. Für die Analyse der Komplexbildung wurde 0,15 g/l Calmodulin eingesetzt. Die Mengen der Interaktionspartner wurden entsprechend äquimolar beziehungsweise als Vielfache der molaren Menge gewählt. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe erfolgten bei 25°C in Doppelsektorzellen. Die Drehzahl des Rotors betrug 60000 U/min. Zur Optimierung des Signal – Rausch - Verhältnisses wurde ein Sedimentationsprofil (S - Profil) erstellt.

14.5.3 Analyse der AUZ - Daten

Die S - Profile wurden mit dem Programm *DCTC+™*, v.2.0 analysiert. Die S - Profile wurden so ausgewählt, dass das Plateau deutlich sichtbar war. Die Beschränkung der Anzahl der S - Profile erfolgte nach den Angaben des Programmentwicklers (Philo, 2000). Die s - Werte wurden in Bezug auf Dichte und Viskosität des Wassers bei 25°C auf Standardbedingungen umgerechnet (Cantor et al. 1980).

IV Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Interaktion von Calmodulin und Calmodulin - Mutanten mit den Peptiden und Proteinen A4, A4^{LE}, A4I, B1b, B1b^{LE}, B1bII und B1bI der Calmodulin - Bindestelle des olfaktorischen CNG - Kanals untersucht werden. Das Ziel war dabei die Entwicklung eines molekularen Modells zum Schließmechanismus des CNG - Kanals. Der folgende Ergebnisteil gliedert sich in 5 Abschnitte: Abschnitt 1 beschreibt die Gewinnung rekombinanter Proteine. Die Überprüfung der Faltung der Proteine und Peptide und der Homogenität der Molekülspezies ist Bestandteil von Abschnitt 2. Die Analyse der Interaktion von Calmodulin und Calmodulin - Mutanten in An - und Abwesenheit von Ca²⁺ mit Peptiden des olfaktorischen CNG - Kanals ist in Abschnitt 3 beschrieben, Abschnitt 4 analysiert die Ca²⁺- Abhängigkeit dieser Bindungsereignisse. Die Untersuchungen zur Stöchiometrie der Komplexe aus Calmodulin und den CNG - Peptiden in Ca²⁺- Lösung sind in Abschnitt 5 aufgeführt. Die Unterkapitel zu den Einzelexperimenten sind dabei immer in drei Teile gegliedert: Die *Einführung* beschreibt kurz die Absicht des Versuches, *Messdaten* beschreibt detailliert die erhaltenen Meßdaten und die *Zusammenfassung* fasst kurz die wichtigsten Ergebnisse zusammen. Zur besseren Übersicht sind die in dieser Arbeit verwendeten CNG - Peptide und Calmoduline im Folgenden schematisch illustriert (Abb. 26 – 29):

CNG-Peptide

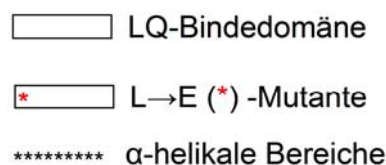
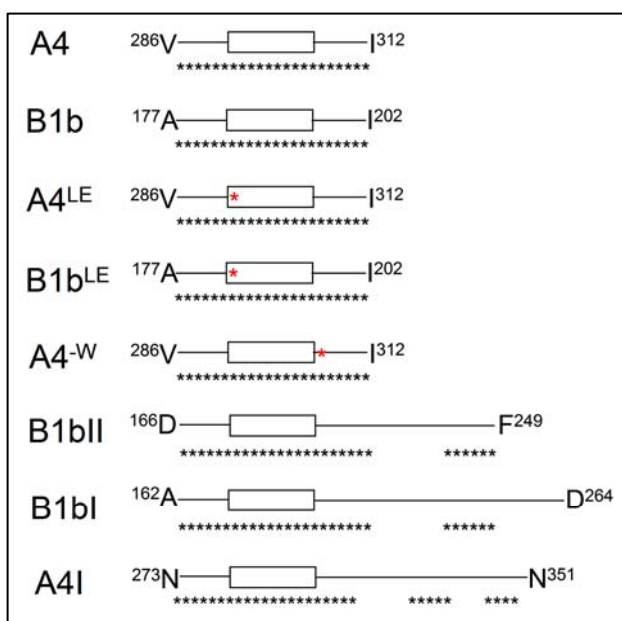


Abb. 26: Liste der CNG - Peptide
A4 und **B1b**: < 30 Aminosäuren lange LQ - Bindestellenpeptide.
A4^{LE} und **B1b^{LE}**: < 30 Aminosäuren lange Bindestellenpeptide mit einem L→E Austausch.
A4^W: A4 LQ - Bindestellenpeptid mit einem W→A Austausch (*).
B1bII/ B1bI: 83/ 102 Aminosäuren langes LQ - Bindestellenpeptid, mit C-terminal gelegener kurzer α - Helix.
A4I: 77 Aminosäuren langes LQ - Bindestellenpeptid, mit C - terminal zwei weiteren α - Helices.

Calmoduline

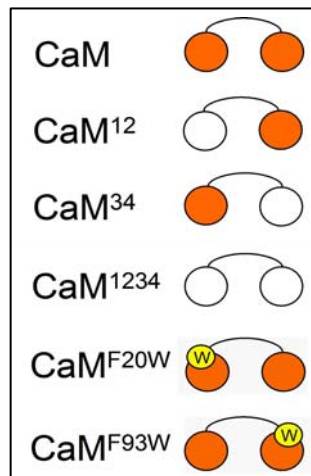


Abb. 27:
Verwendete Calmoduline: **Kreise** repräsentieren die globulären EF-Hand-Bindedomänen **Rot**: Intakte EF-Hand-Bindedomänen **Weiß**: D→A-Austausch in den EF-Hand-Bindedomänen verhindert in dieser Ca²⁺-Bindestelle die Ca²⁺-Bindung. **(W)** In die N- (F20W) bzw. C-terminale (F93W) Ca²⁺-Bindestelle eingeführtes Tryptophan für fluoreszenzspektroskopische Experimente

Fluoreszenzreporter- (Badan-) gekoppelte Peptide

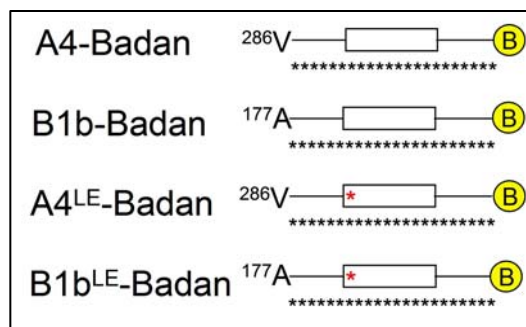


Abb. 28:
Beschreibung der Sequenzmerkmale: siehe CNG-Peptide. Die Peptide enthalten für die Badan-Kopplung C-terminal ein Cystein. **Gelber Kreis (B)**: Badan-Fluoreszenzreporter.

Fluoreszenzreporter - (Badan -) gekoppeltes Calmodulin



Abb. 29: CaM^{T35C}-Mutante an den Badan gekoppelt für fluoreszenzspektroskopische Experimente. **Gelber Kreis (B)**: Badan-Fluoreszenzreporter.

1 Gewinnung rekombinanter Proteine

Für Proteininteraktionsstudien wurden die rekombinanten Calmodulinmutanten CaM¹², CaM³⁴, CaM¹²³⁴, CaM^{F20W}, CaM^{F93W} und CaM^{T35C} und die Peptide A4I, B1bII und B1bI des olfaktorischen CNG - Kanals, sowie als Kontrolle das OMP - Protein (*olfactory marker protein*) mit dem pET28a(+)/ *E.coli* BL21 (DE3) pLysS System exprimiert und mittels zweimaliger Ni²⁺- NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mit Ausnahme des A4I - Proteins konnten alle Fusionsproteine standardmäßig bei 37°C und 4 - stündiger Induktionszeit mit IPTG exprimiert werden. Die Kontrolle der Proteinexpression erfolgte mittels SDS - Polyacrylamidelektrophorese (SDS - PAGE) und ist exemplarisch für CaM³⁴ in Abbildung 30 a dargestellt. Die Testexpression aller in dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine verlief mit Ausnahme von A4I analog. In Spur I des Gels zum Zeitpunkt t = 0 h ist vor der Zugabe von IPTG noch keine CaM³⁴- Proteinbande bei 18 kDa erkennbar. Erst 1 h (Spur II) nach Zugabe von IPTG erscheint die Bande bei etwa 18kDa und wird mit der Dauer der Expression deutlicher. Nach 4 h (Spur V) wurde eine ausreichende Menge Protein detektiert, die bei längerer Inkubation nicht mehr gesteigert werden konnte. Bei der Durchführung des Standardprotokolls zur Expression des A4I - Proteins war im Verlauf der Testexpression zu keinem Zeitpunkt eine entsprechende Proteinbande von 10 - 11 kDa im Gel detektierbar. Die Expression konnte erst nach Inkubation der Vorkultur bei 30°C und anschließender Expression bei RT erreicht werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 30 b dargestellt. Zum Zeitpunkt t = 0 h (Spur I) vor der Zugabe von IPTG ist das A4I - Protein auch bei RT noch nicht bei der erwarteten Größe von etwa 12 kDa erkennbar. Nach der Induktion wurden nach 1, 2, 3 und 4 Stunden (Spur II - V) die entsprechenden Proteinbanden detektiert. Die Stärke der Expression nimmt jedoch mit der Expressionsdauer nur geringfügig zu. Bei gleicher Protein - Gesamtmenge ist im Vergleich zur Testexpression von CaM³⁴ das Expressionsniveau von A4I in jeder Spur des Gels geringer. Eine Steigerung der Proteinsynthese in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS konnte auch durch Variation der Mengen an IPTG, Zugabe von 2,5% Glucose und/ oder 1 mM Magnesiumsulfat nicht erreicht werden (Studier, 2005).

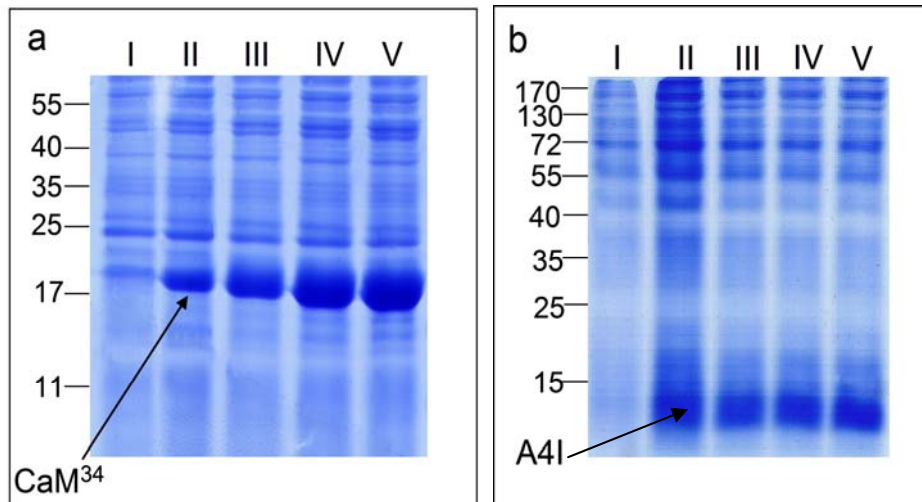


Abb. 30: SDS - PAGE, Coomassie - Färbung zur Expressionskontrolle von (a) CaM^{34} und (b) A4I. (I - V) 8 μL Probe von 1 mL Lysat 0 h (I), 1 h (II), 2 h (III), 3 h (IV) und 4 h (V) nach Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG. CaM^{34} zeigt deutlich eine stündliche Zunahme des Expressionsniveaus (a), erkennbar an der stärker werdenden Bande bei 18 kDa, bei A4I (b) keine Zunahme der 11 kDa - Bande über die Zeit nach Induktion erkennbar.

Um einen optimalen Reinheitsgrad $\geq 95\%$ zu erzielen, mußten alle Fusionsproteine nach der Bakterienlyse zweimal über Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie gereinigt werden. Eine zweite Aufreinigung über hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose führte in jedem Fall zu einem 90%igen Ausbeuteverlust und wurde deshalb nicht angewendet. Mit Ausnahme des A4I - Proteins konnte die Lyse und Aufreinigung aller Proteine standardmäßig unter Hochsalz - Bedingungen unter Verwendung von Binde - und Waschpuffer 1 durchgeführt werden. In Abbildung 31 ist das Ergebnis der SDS - PAGE und der Western Blot Analyse nach der zweimaligen Aufreinigung der Calmodulin - Fusionsproteine mittels Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie dargestellt und in Abbildung 32 entsprechend das der CNG - Peptide und des OMP - Proteins. Aufgetragen sind je 8 μL der Fraktion, die bei der Proteinelution die größte Proteinmenge enthielt. In Spur a (Abb. 31 und 32) erkennt man jeweils das Coomassie - gefärbte Protein bei dem erwarteten Molekulargewicht. In Spur b wird im Western Blot mit dem α - Penta His Antikörper durch das ECL Signal nachgewiesen, daß es sich bei dem Protein tatsächlich um das aufgereinigte Fusionsprotein handelt. Die Untersuchung der Reinheit der in Abbildung 31 und 32 dargestellten Peptide und Proteine mittels SDS - PAGE und die densitometrische Analyse ergab, daß bei der Expression aller Fusionsproteine ein Reinheitsgrad $> 95\%$ erreicht werden konnte. Man erkennt dies daran, daß neben der deutlichen Fusionsproteinbande in keiner der Proben weitere klar erkennbare Proteinbanden detektiert wurden. Im Fall von A4I konnte unter Hochsalz - Bedingungen keine Bindung des Proteins an die Ni^{2+} -NTA Affinitätssäule erreicht werden, deshalb konnte das Fusionsprotein in diesen Puffern nicht isoliert werden.

Eine Proteinbande, die der Größe dieses Proteins entspricht, war bei der Überprüfung des Aufreinigungserfolgs mittels SDS - PAGE nur im Lysat und im Durchfluß detektierbar. In den Elutionsfraktionen konnte A4I nicht nachgewiesen werden. Die Bindung dieses Fusionsproteins an die Säule gelang nur unter Niedrigsalz - Bedingungen. Deshalb wurde für die Bakterienlyse und die Affinitätschromatographie entsprechend der Binde - und Waschpuffer 2, der außer 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8,1 kein zusätzliches Salz enthielt, eingesetzt. Die Ausbeute des A4I - Proteins war zu gering, um den Reinheitsgrad entsprechend zu analysieren. Deshalb wurde von A4I nach der Dialyse und Gefriertrocknung eine Proteinmenge, die 10 μg Protein entspricht, aufgetragen.

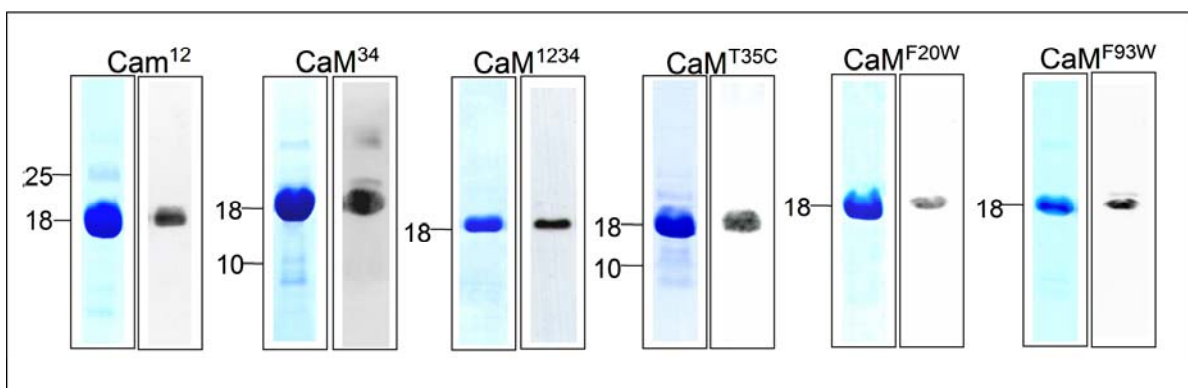


Abb. 31: SDS - PAGE, Coomassie - Färbung (a) und Western Blot Analyse (b) der Expression der Calmodulin - Mutanten (CaM) nach zweimaliger Ni^{2+} -NTA Aufreinigung. Für alle Fusionsproteine wurde ein Reinheitsgrad $> 95\%$ erzielt; der *His* - tag aller Proteine wurde immunologisch nachgewiesen. **Proteinmenge:** 8 μl der Elutionsfraktion beziehungsweise 10 μg A4I. **Antikörper:** α - Penta His (Maus): 1 : 1000; α - Maus IgG, HRP - konjugiert: 1 : 30000. Größen der detektierten Proteine: (CaM¹², CaM³⁴, CaM¹²³⁴, CaM^{T35C}, CaM^{F20W}, CaM^{F93W}): 18 kDa.

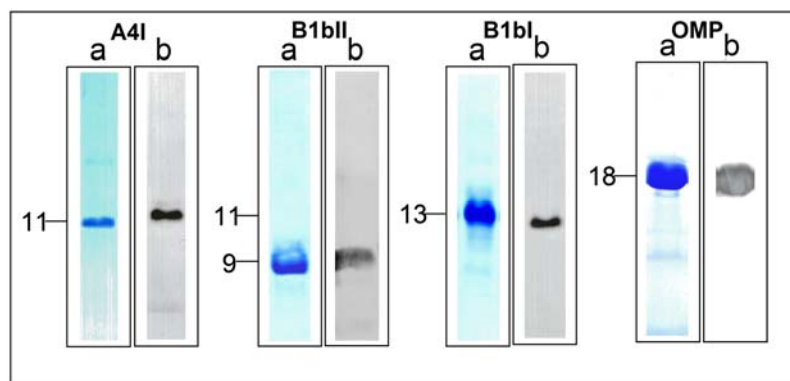


Abb. 32: SDS - PAGE, Coomassie - Färbung (jeweils links) und Western Blot Analyse (jeweils rechts) der Expression der CNG - Peptide und des OMP - Proteins nach zweimaliger Ni^{2+} -NTA Aufreinigung. Für alle Fusionsproteine wurde ein Reinheitsgrad $> 95\%$ erzielt; der *His* - tag aller Proteine wurde immunologisch nachgewiesen. Proteinmenge: 8 μL der Elutionsfraktion mit dem höchsten Proteingehalt und 10 μg A4I. Antikörper: α - Penta His (Maus) 1 : 1000; α - Maus IgG, HRP - konjugiert, 1 : 30000. Größen der detektierten Proteine: (A4I) 11 kDa, (B1bII) 9 kDa, (B1bI) 13 kDa, (OMP) 18 kDa.

Die Proteinausbeuten nach der Aufreinigung der Fusionsproteine bezogen auf 1 L LB - Medium waren unterschiedlich. Die größte Ausbeute und Reinheit wurde für das OMP - Protein erzielt, gefolgt von den Calmodulin - Mutanten. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die Proteinausbeute der in dieser Arbeit exprimierten und aufgereinigten Proteine.

Mit Ausnahme von A4I konnten alle Fusionsproteine in einer genügend hohen Ausbeute $\geq 0,8$ mg/l LB - Medium exprimiert und aufgereinigt werden. In einem l LB - Medium betrug diese für A4I nur 0,1 mg/l.

Tab. 3.1: Ausbeuten der in dieser Arbeit exprimierten Fusionsproteine bezogen auf 1 l Expressionskultur.

Protein	Ausbeute (mg)	Protein	Ausbeute (mg)
CaM ^{I2}	3,5	A4I	0,1
CaM ³⁴	2,5	B1bII	0,8
CaM ^{I234}	2	B1bI	0,8
CaM ^{T35C}	5	OMP	8
CaM ^{F20W}	2		
CaM ^{F93W}	3		

2 Überprüfung der Faltung und Homogenität der heterolog exprimierten Proteine

In der Zelle wird die korrekte Faltung und räumliche Konformation von Proteinen von Faltungshelfern und der molekularen Umgebung beeinflusst. Die Experimente in dieser Arbeit wurden *in vitro* das heißt in Lösung und somit ohne den Einfluß von Faltungshelfern und anderen molekularen Einflüssen der Zelle durchgeführt. Darüber hinaus wurden für Interaktionsstudien mit Calmodulin (CaM) ausschließlich Peptide der CNG - Kanaluntereinheiten verwendet, die lediglich die CaM Bindedomänen und einige flankierende Sequenzen beinhalten. Mittels CD Spektroskopie wurde die Sekundärstruktur von CaM, CaM¹², CaM³⁴, CaM¹²³⁴ und den Peptiden B1b, B1b^{LE}, B1bI, B1bII, A4 und A4I unter den in den Spektroskopie - Experimenten angewendeten Temperatur - und Pufferbedingungen analysiert. Die Kenntnis der Sekundärstrukturen unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ist wichtig für die spätere Interpretation der Daten der Interaktionsstudien.

Aufgrund der Reibungskraft die auf ein Molekül mit einer bestimmten räumlichen Struktur wirkt (siehe Kapitel III, 14.5.1), liefert sein Sedimentationsverhalten Informationen über die Konformation und den Oligomerisierungsgrad eines Proteins. Bei gleicher Konformation und Homogenität sollte das Sedimentationsprofil der rekombinanten CaM - Mutanten dem von Wildtyp - CaM entsprechen. Zur Überprüfung wurden in der analytischen Ultrazentrifuge in 1 mM Ca²⁺ Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe mit diesen Proteinen durchgeführt und die Resultate anschließend verglichen. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe dienten über die SDS - PAGE hinaus der Überprüfung der Homogenität der CNG - Kanalpeptide.

2.1 Analyse der Einzel CD - Spektren von CaM bei 0 und 30 µM Ca²⁺

Einführung

Die Analyse der Einzel - CD Spektren von CaM bei 0 Ca²⁺ und 30 µM Ca²⁺ sollte prüfen, ob sich die Sekundärstrukturen dieses Proteins bereits bei der Ca²⁺- Aufnahme signifikant verändern, was in späteren Experimenten berücksichtigt werden muss. Es ist bekannt, daß die Sekundärstruktur von CaM überwiegend α - helikal ist und nur wenig β - Faltblattstruktur aufweist (Ikura, 1991; Ikura et al., 1992). Die Strukturänderung Ca²⁺- freien Calmodulins bei Ca²⁺- Sättigung ist im Wesentlichen durch eine Änderung der interhelikalen Winkel gekennzeichnet. Die relativen Sekundärstrukturanteile ändern sich kaum (Chattopadhyaya et al., 1992; Jackson et al., 1987, Yuan et al, 1999). Die Sekundärstruktur von CaM wurde CD -

spektroskopisch bei 0 und 30 μM Ca^{2+} verglichen und ist in Abbildung 33 dargestellt. Das zugehörige Balkendiagramm zeigt entsprechend die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen nach Dekonvolution der Spektren. Der Datenfit nach Brahms (Brahms & Brahms, 1980) wurde auf die Meßwerte zwischen 205 und 250 nm angewendet.

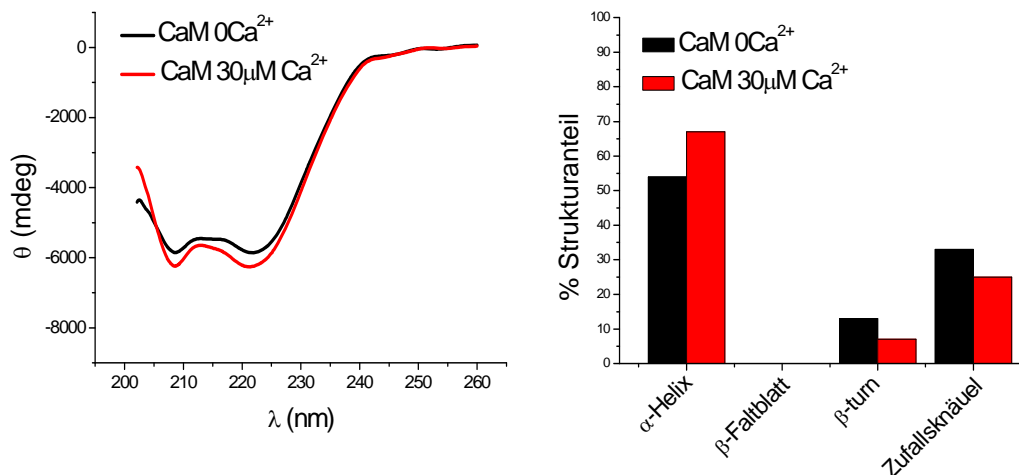


Abb. 33: (Links) CD - Spektroskopische Analyse von Calmodulin (**CaM**) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} . Relative molare Elliptizität θ (mdeg) als Funktion der Wellenlänge λ (nm) von 20 nM CaM, Ca^{2+} - frei (**schwarz**) und in 30 μM Ca^{2+} (**rot**). Glättung: origin, v 7. (Rechts) Balkendiagramme zur Darstellung der relativen Strukturanteile nach Dekonvolution der Einzelspektren.

Messdaten

Dargestellt ist die relative molare Elliptizität θ in Milligrad (mdeg) als Funktion der Wellenlänge λ in nm bei 25°C. Unter beiden Bedingungen, sowohl in Ca^{2+} -freier Lösung als auch in 30 μM Ca^{2+} beobachtet man die für α -helikale Anteile typischen Minima im Spektrum bei 222 und 208 nm. Die negative molare Elliptizität θ bei 208 nm ist unter Ca^{2+} -freien Bedingungen für CaM 6% kleiner (schwarzes Spektrum) als in 30 μM Ca^{2+} (rotes Spektrum). Bei dieser Ca^{2+} -Konzentration ist CaM voll mit Ca^{2+} ligandiert ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$). Bei 222 nm ist die negative θ etwa 8% geringer für CaM Ca^{2+} -frei, als für $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Die Spektren zeigen keine weiteren erkennbaren strukturellen Merkmale. Die nach dem Datenfit und der Dekonvolution der Spektren erhaltenen Sekundärstrukturanteile sind graphisch im Balkendiagramm (rechts) dargestellt. In Ca^{2+} -freier Lösung wurde für CaM (schwarze Balken) unter den gegebenen Bedingungen mit 54% ein geringerer α -helikaler Anteil gefunden als für vollligandiertes CaM (rote Balken). In 30 μM Ca^{2+} beträgt der α -helikale Anteil 67%. Entsprechend findet man für Ca^{2+} -freies CaM mit 33% einen 8% höheren Anteil an unstrukturiertem Zufallsknäuel, als für $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (25%). Der Anteil an Rückfaltung beim Ca^{2+} -freien CaM ist mit 13% gegenüber 7% beim vollligandierten CaM erhöht.

Zusammenfassung

Die Analyse der Einzel - CD Spektren von CaM bei 0 Ca²⁺ und 30 µM Ca²⁺ ergab, daß der Sekundärstrukturanteil von Ca²⁺-ligandiertem CaM unter den gegebenen Reaktions - bedingungen 13% höher liegt, was in späteren Untersuchungen berücksichtigt werden muß.

2.2 Analyse der Einzel CD-Spektren von CaM, CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴

Einführung

Die Analyse der Einzel CD - Spektren von CaM und den rekombinanten CaM - Mutanten CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴ diente dem Vergleich der Sekundärstrukturen dieser Proteine in 30 µM Ca²⁺. Die Mutanten tragen in den EF - Hand Bindemotiven 1,2 (CaM¹²), 3,4 (CaM³⁴) und 1,2,3,4 (CaM¹²³⁴) jeweils einen Asparaginsäure (D) → Alanin (A) Austausch, der die Ca²⁺ - Bindung verhindert (Erickson et al., 2001). Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die Anwesenheit des Reduktionsmittels TCEP (*Tris(2-carboxyethyl)phosphin*) im Puffersystem die Sekundärstrukturen der Calmoduline beeinflusst.

Für die Interaktionsstudien von CaM und CaM - Mutanten mit Peptiden mit C - terminalem Cystein, wie sie für die Badankopplung synthetisiert wurden, wurde den Puffern A und B jeweils 1 mM TCEP zugesetzt um die Oxidation des endständigen Cysteins zu verhindern. In Abbildung 34 a - d sind die Einzel CD - Spektren nach der Dekonvolution von Calmodulin und den Mutanten CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴ zur Analyse der Sekundärstruktur in Puffer B in An - und Abwesenheit von jeweils 1 mM TCEP dargestellt. Der Datenfit erfolgte für die Meßwerte zwischen 205 und 250 nm.

Messdaten

Die CD - Einzelspektren aller Calmoduline weisen unter beiden Bedingungen, sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von 1 mM TCEP die für α - helikale Anteile typischen Minima bei 222 und 208 nm auf. Die negative molare Elliptizität θ bei 208 nm ist für CaM mit 4 %, CaM³⁴ mit 4% und CaM¹²³⁴ 5% geringfügig kleiner (schwarzes Spektrum) als in Anwesenheit von 1 mM TCEP (grünes Spektrum). Für CaM¹² liegen die Minima bei 208 nm bezogen auf die molare Elliptizität gleich. Bei 222 nm ist die negative θ für alle Calmoduline in Abwesenheit von TCEP ebenfalls geringer, um 4 % für CaM, 3% für CaM¹², 7,8% für CaM³⁴ und 8% für CaM¹²³⁴. Weitere strukturelle Merkmale sind nicht erkennbar. Auffällig ist die im Vergleich zum CaM größere negative θ der CaM - Mutanten, trotz gleicher Proteinkonzentration. Die nach dem Datenfit und der Dekonvolution der Spektren erhaltenen Sekundärstrukturanteile sind vergleichend im Balkendiagramm dargestellt. In Abwesenheit

von TCEP (schwarze Balken) betragen die α -helikalen Anteile unter den gegebenen Bedingungen 67% für CaM, 61% für CaM¹², 54% für CaM³⁴ und 53% für CaM¹²³⁴. In 1 mM TCEP sind sie mit 66% für CaM und 58% für CaM¹² geringer und mit 59% für CaM³⁴ und 63% für CaM¹²³⁴ höher als unter TCEP-freien Bedingungen. Für CaM¹² in 1 mM TCEP und CaM¹²³⁴ wurde außerdem 3% β -Faltblattstruktur detektiert. Der Anteil an Rückfaltung ist in TCEP-freier Lösung geringer für CaM mit 7%, CaM¹² mit 10% und CaM³⁴ mit 13% gegenüber 12% für CaM, 11% für CaM¹² und 14% für CaM³⁴ unter TCEP-haltigen Pufferbedingungen. Die Analyse der Einzelspektren von CaM¹²³⁴ ergab mit 12% Rückfaltung entsprechend einen höheren Anteil im TCEP-freien Milieu, als unter TCEP-haltigen Bedingungen (10%). Der Anteil an unstrukturiertem Zufallsknäuel beträgt TCEP-frei 25% für CaM, 29% für CaM¹², 33% für CaM³⁴ und 34% für CaM¹²³⁴. In Anwesenheit von 1 mM TCEP wurde 23% Zufallsknäuel für CaM, 29% für CaM¹², 27% für CaM³⁴ und 26% für CaM¹²³⁴ detektiert.

Zusammenfassung

Die Analyse der Einzel CD-Spektren von CaM und den CaM-Mutanten CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴ diente dem Vergleich der Sekundärstrukturen dieser Proteine und ergab, daß die CaM-Mutanten signifikant geringere Anteile α -helikaler Strukturen aufweisen und daß dies bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muß. Dies ist nicht verwunderlich, da der Anteil an α -Helix bei Ca²⁺-Aufnahme des CaM leicht steigt und die Mutanten weniger (CaM¹², CaM³⁴) bis kein Ca²⁺ (CaM¹²³⁴) aufnehmen können. Dem entsprechend ist der Anteil an Zufallsknäuel bei den CaM-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die Anwesenheit des Reduktionsmittels TCEP im Reaktionsgemisch beeinflusst geringfügig die Sekundärstrukturen aller Calmoduline und spielt somit eine Rolle beim Vergleich von Daten, die unter TCEP-haltigen und TCEP-freien Bedingungen ermittelt wurden. Dies ist insofern unerwartet, da Calmodulin keine Cysteine enthält, die reduziert werden könnten. Wahrscheinlich hängt dies mit der Veränderung der Ionenstärke bei der Korrektur des pH-Wertes nach der Zugabe von TCEP zusammen.

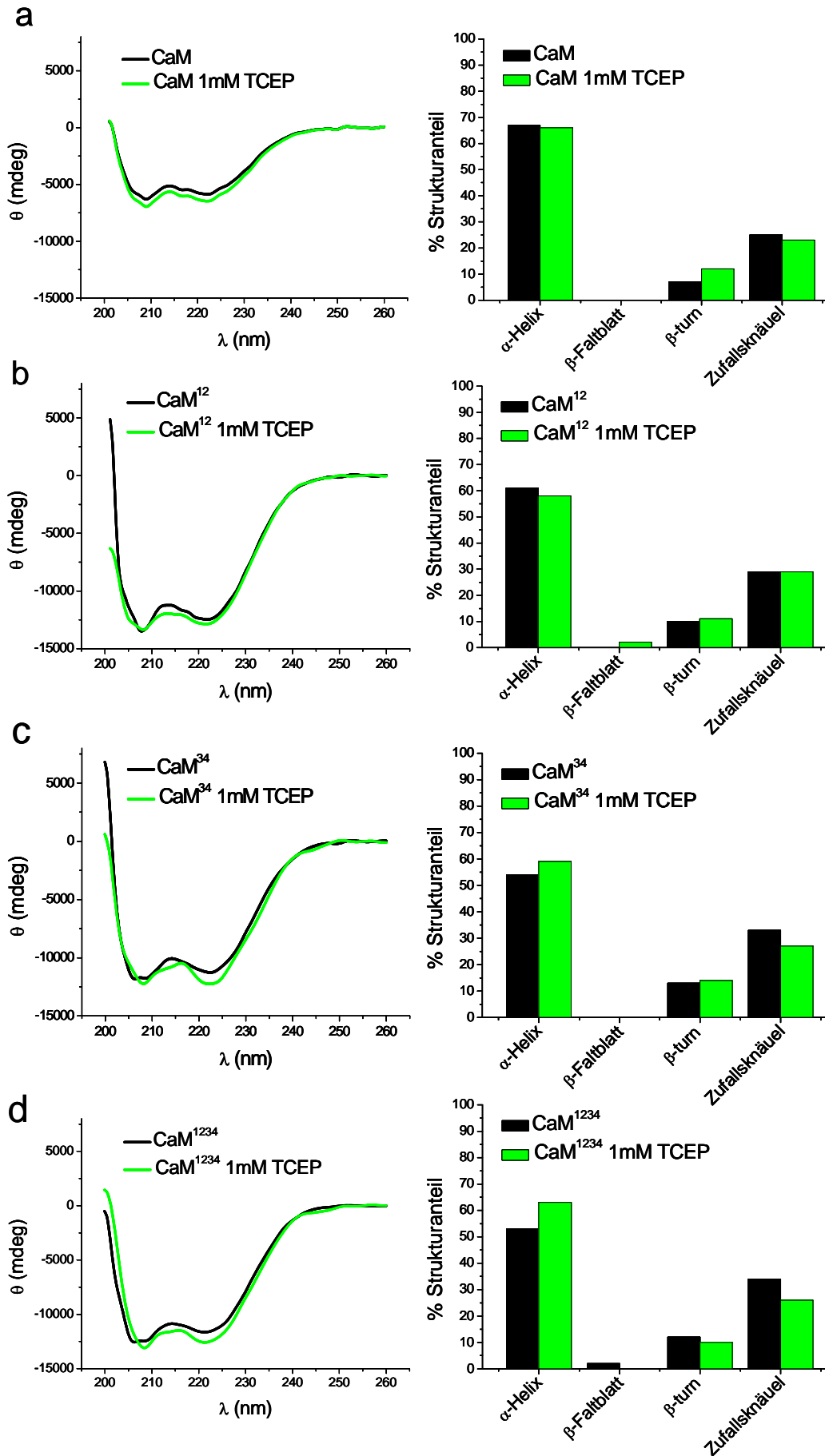


Abb. 34: (Links) CD - Spektroskopische Analyse von Calmodulin (**a**) CaM (**b-d**) Calmodulin - Mutanten CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴ in An- (**grün**) und Abwesenheit (**schwarz**) von 1 mM TCEP. Relative molare Elliptizität θ (mdeg) als Funktion der Wellenlänge. Eingesetzte Proteinkonzentration: Jeweils 20 nM CaM, CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴, eingesetzte Ca²⁺-Konzentration: 30 μ M. (**Rechts**) Balkendiagramme zur Darstellung der relativen Strukturanteile nach Dekonvolution der Einzelspektren.

2.3 Analyse der CD-Einzelspektren der CNG-Kanalpeptide

Einführung

Die Analyse der CD - Einzelspektren der CNG - Kanalpeptide sollte zeigen, ob diese Peptide für die Interaktion mit CaM bereits Sekundärstrukturen besitzen oder ob diese erst bei der Wechselwirkung ausgebildet werden. Diese Untersuchung ist wichtig für die Interpretation der Daten der Proteininteraktionsstudie in Kapitel 3, in der analysiert werden soll, ob die CNG - Peptide Ca²⁺ - abhängig oder - unabhängig mit CaM wechselwirken.

Zur Überprüfung der Faltung der CNG - Peptide B1b, B1b^{LE} B1bI, B1bII, A4 und A4I wurden die CD - Einzelspektren analysiert. Das A4^{LE} - Peptid stand zum Versuchszeitpunkt noch nicht zur Verfügung und konnte deshalb nicht analysiert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen in Ca²⁺ - freier Lösung und in 30 μ M Ca²⁺ sind in Abbildung 35 a und b dargestellt.

Messdaten

Die CNG - Peptide setzen sich sowohl in Ca²⁺ - freier Lösung (Abb. 35 a) als auch bei einer Konzentration von 30 μ M Ca²⁺ (Abb. 35 b) überwiegend aus unstrukturiertem Zufallsknäuel zusammen. Erkennbar ist dies an der typischen Zunahme der negativen molaren Elliptizität θ ab einer Wellenlänge von 210 nm zu kleineren Wellenlängen hin. Bei 195 nm besitzt das Spektrum des Zufallsknäuels üblicherweise ein Minimum. Aufgrund des starken Detektorrauschens bei dieser Wellenlänge wurden die Spektren standardmäßig erst ab einer Wellenlänge von 200 nm analysiert. Dennoch kann man erkennen, daß das Minimum für das Zufallsknäuel für alle CNG - Peptide im Spektrum links vorhanden ist. Mit Ausnahme von A4, das ein Minimum bei 206 nm aufweist, liegen die Minima bei etwa 203 nm. Die Ursache für die Linksverschiebung der Minima liegt in dem geringen Anteil α - helikaler Strukturen, die mit Ausnahme von B1bII, nach der Dekonvolution und dem Datenfit für alle CNG - Peptide sowohl unter Ca²⁺ - freien Bedingungen, als auch in 30 μ M Ca²⁺ gefunden wurden.

Die prozentualen Anteile α -helikaler Strukturen, die für die Interaktion mit CaM von Bedeutung sind, sind in den Balkendiagrammen der Abbildung 35 a und b dargestellt.

Für A4, B1b und B1b^{LE} ist der Anteil an α -Helices Ca^{2+} -unabhängig und beträgt für A4 23%, für B1b 19% und für B1b^{LE} 26%. Unter Ca^{2+} -freien Bedingungen wurde für A4I ein Anteil α -helikaler Sekundärstrukturen von 10% und für B1bI von 31% identifiziert. In $30 \mu\text{M Ca}^{2+}$ beliefen sich die Anteile auf 3% für A4I und 33% für B1bI. Für B1bII konnten unter keinen Bedingungen Sekundärstrukturmerkmale nachgewiesen werden.

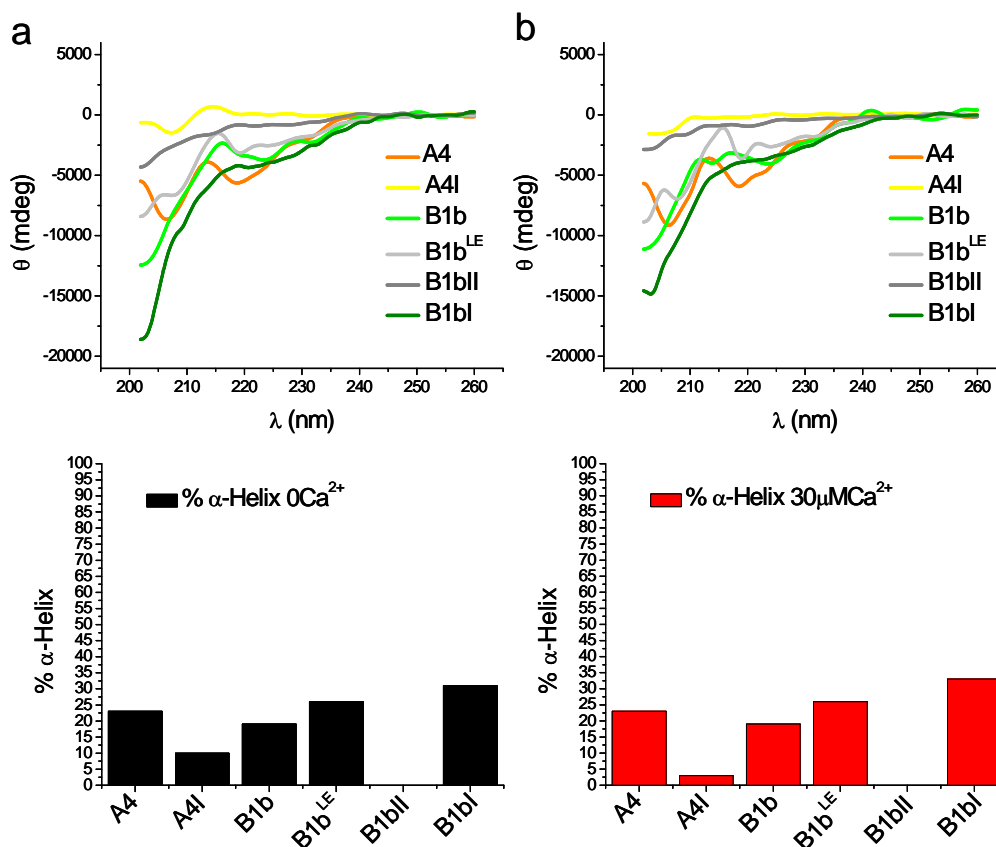


Abb. 35: CD - Spektroskopische Analyse der CNG - Kanalpeptide (a) in Anwesenheit und (b) in Abwesenheit von Ca^{2+} . (oben) Relative molare Elliptizität θ (mdeg) als Funktion der Wellenlänge. Analysiert wurde eine 20 nM Peptidlösung. (Unten) Balkendiagramme zur Darstellung der α -helikalen relativen Strukturanteile nach Dekonvolution der Einzelspektren Ca^{2+} -frei (schwarz) und in $30 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (rot).

Zusammenfassung

Die Analyse der Einzel CD - Spektren von B1b, B1b^{LE}, B1bI, B1bII, A4 und A4I ergab, daß alle Peptide, außer B1bII in geringem Maße α -helikale Strukturen aufweisen. Für B1bII konnten keine Sekundärstrukturen detektiert werden. Die Ergebnisse der Analyse sind in späteren Interaktionsstudien zu berücksichtigen, jedoch sind Peptide, die sich überwiegend aus unstrukturiertem Zufallsknäuel zusammensetzen dennoch für diese Experimente geeignet, da in vielen Fällen ein großer Anteil der für die Interaktion benötigten Sekundärstrukturen erst

bei der Wechselwirkung mit dem Interaktionspartner ausgebildet (siehe z.B. Yuan et al., 1999) wird.

2.4 Analyse des Sedimentationsprofils von CaM und den CaM-Mutanten

Einführung

Um bei den Proteininteraktionsstudien den direkten Vergleich zwischen CaM und den Mutanten CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴ anstellen zu können, wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation das Sedimentationsverhalten dieser Proteine überprüft. Das Sedimentationsprofil eines Proteins erlaubt eine Aussage über die Homogenität der Teilchenspezies. Bei vergleichbarer Molekülkonformation weisen gleiche Proteine darüber hinaus gleiche Sedimentationskoeffizienten auf. Aus diesem Grund wurden auch die Sedimentationsprofile von CaM^{T35C}, CaM^{F20W} und CaM^{F93W} untersucht. Eine Inhomogenität der Teilchenspezies oder eine von CaM abweichende Molekülkonformation müßte bei der Interpretation der Daten zur Proteininteraktion und Ca²⁺-Abhängigkeit von Bindungsereignissen mit einbezogen werden.

Die Reibung, die ein Molekül bei der Sedimentation erfährt, ist abhängig vom Oberfläche zu Volumen Verhältnis und somit von der Molekülkonformation. Mit Hilfe von Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge wurde der Sedimentationskoeffizient s von CaM in Ca²⁺-Sättigung bestimmt und mit den Sedimentationskoeffizienten der exprimierten Calmodulinmutanten CaM¹², CaM³⁴, CaM¹²³⁴, CaM^{T35C}, CaM^{F20W} und CaM^{F93W} verglichen.

Die Sedimentationskoeffizienten von Ca²⁺-freiem CaM und vollligandiertem CaM wurden außerdem mit dem Programm *Hydropro 5A* (Bioinformatics Core Facility, University of Texas, USA) bestimmt. Mit diesem Programm kann an Hand der *pdb*-Strukturen (*protein database*, La Jolla, USA) unter Berücksichtigung der Temperatur T und Viskosität σ des Lösemittels der Sedimentationskoeffizient eines Proteins errechnet werden. Dieser beträgt für Ca²⁺-freies und Ca²⁺-ligandiertes CaM 1,7 S. Die der Berechnung zu Grunde liegenden *pdb*-Strukturen von CaM sind in Abbildung 36 dargestellt.

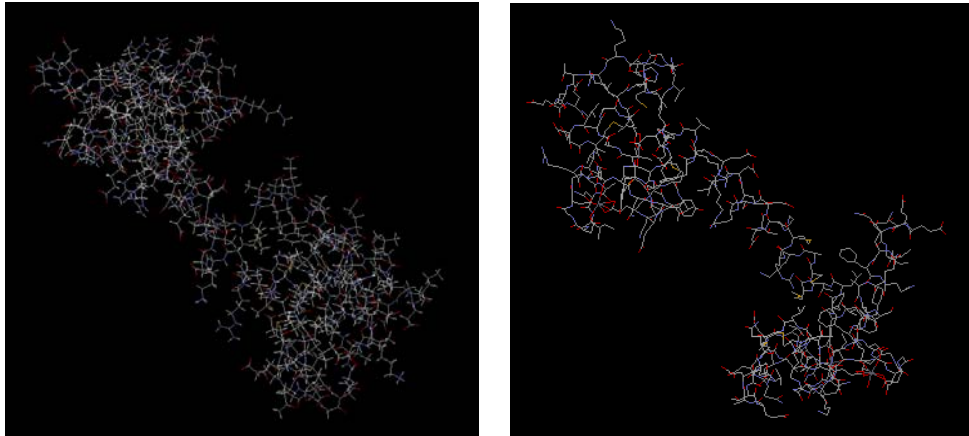


Abb. 36: **(Links)** 3D/4D – NMR - Struktur von Calmodulin, Ca^{2+} -frei (1CFD.pdb; Kuboniwa et al., 1995). **(Rechts)** 2,2 Å Kristallstruktur von Ca^{2+} /Calmodulin (3CLN.pdb; Babu et al., 1988). Graphikprogramm zur Visualisierung der Proteinstrukturen: Rasmol v.2.7 (Bernstein & Bernstein; www.rasmol.org).

Messdaten

Die Ergebnisse der experimentellen Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten sind in Abbildung 37 dargestellt. Bei den Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen der CaM - Mutanten wurde pro Protein nur eine Teilchenspezies identifiziert und so konnte eine Gauß - Kurve an die Sedimentationskoeffizientenverteilung $g(s^*)$ angepasst werden. Die Gauß - Kurven der $g(s^*)$ Funktionen sind in Abbildung 33 dargestellt. Das Maximum der Gauß - Verteilung entspricht dem Sedimentationskoeffizienten s (s - Wert) der Molekülspezies.

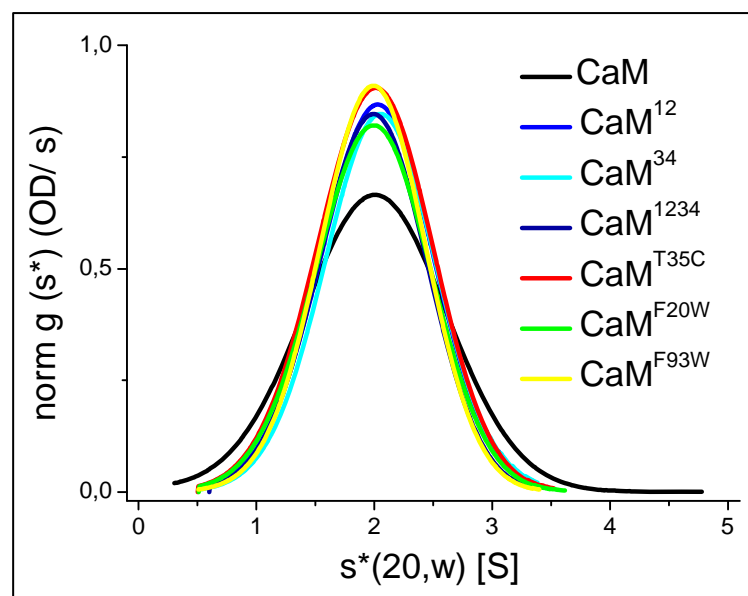


Abb. 37: Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit von CaM und den CaM - Mutanten CaM^{12} , CaM^{34} , CaM^{1234} , $\text{CaM}^{\text{T}35\text{C}}$, $\text{CaM}^{\text{F}20\text{W}}$ und $\text{CaM}^{\text{F}93\text{W}}$ in Doppelsektorzellen. Gauß - Kurven der normalisierten Sedimentationskoeffizientenverteilungen $g(s^*)$ über die gesamte Meßzelle, nach Analyse mit dem Programm *DCTC+™*. Die Maxima der Gauß - Kurven entsprechen dem jeweiligen s - Wert der Probe und betragen für alle Calmoduline 2,0 - 2,1 S. Analysetemperatur: 25°C, Proteinkonzentration: 0,15 g/l, Rotationsgeschwindigkeit: 60000 g.

Die Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe erfolgte mit dem Programm *DCDT+*TM. Die Gauß - Verteilungen sind für alle Proben ideal und besitzen ein distinktes Maximum, in keiner der Proben wurden also Proteinaggregate oder weitere Molekülspezies nachgewiesen. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen betrug der *s* - Wert auf zwei Nachkommastellen gerundet für CaM 2,01 S, CaM¹² 2,06 S, CaM³⁴ 2,08 S, CaM¹²³⁴ 2,02 S, CaM^{T35C} 2,05 S, CaM^{F20W} 2,03 S, und CaM^{F93W} 2,02 S. In Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wird zu verschiedenen Zeiten die Absorption der sedimentierenden Partikel als Funktion des Abstandes von der Drehachse gemessen. Bei der Berechnung der Sedimentationskoeffizientenverteilung werden aufeinanderfolgende Absorptionsspektren voneinander subtrahiert. Die Absorption von CaM, erkennbar an der Größe der Fläche unter der Kurve, ist im Vergleich zu den CaM - Mutanten 10 - 20% geringer, was auf eine geringere Konzentration des Proteins zurückzuführen ist.

Zusammenfassung

Das Sedimentationsverhalten von CaM und den untersuchten CaM - Mutanten ist unter den gegebenen Reaktionsbedingungen identisch. Für alle Calmoduline wurde ein *s* - Wert gerundet zwischen 2,0 und 2,1 S identifiziert. Diese *s* - Werte liegen etwa 15% höher im Vergleich zu den theoretisch ermittelten Werten der pdb - Strukturen, was den Erwartungen entspricht. Die CaM - Mutanten CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴, die nur teilweise bzw. nicht Ca²⁺ - ligandiert vorliegen, besitzen kein signifikant unterschiedliches Sedimentationsprofil im Vergleich zu vollligandiertem CaM. Dies entspricht der Erwartung, da auch für die pdb - Strukturen in An - und Abwesenheit von Ca²⁺ identische *s* - Werte berechnet wurden. Darüber hinaus wurde in jeder Probe nur eine Teilchenspezies identifiziert. Demnach kann bei der Interpretation der späteren Analysen zur Proteininteraktion und zur Ca²⁺ - Abhängigkeit der Bindungsereignisse von einer korrekten Molekülkonformation und Homogenität der Calmoduline ausgegangen werden.

2.5 Analyse des Sedimentationsprofils von den CNG-Kanalpeptiden A4, A4I, B1b, B1bII und B1bI

Einführung

Die Durchführung von Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge diente auch der Bestimmung des Sedimentationsverhaltens der CNG - Kanalpeptide um die Homogenität insbesondere der heterolog exprimierten Teilchenspezies B1bI, B1bII und A4I zu überprüfen. Zur Berechnung der Sedimentationskoeffizienten der

Peptide wurden die anhand der Wendepunkte der S - Profile pro Zeiteinheit gemessenen Konzentrationsänderungen der sedimentierenden Partikel (dc/dt) entlang der radialen Achse verwendet. Die Normalisierung der Sedimentationskoeffizientenverteilung $g(s^*)$ über die gesamte Meßzelle konnte für die Peptide A4, B1b, A4I und B1bI aufgrund der Polydispersität der wandernden Bande nicht erreicht werden. Für B1bII konnte wegen der Inhomogenität der Teilchenspezies kein zeitabhängiges Konzentrationsprofil und somit kein s - Wert bestimmt werden. Die Ergebnisse der Gauß - Kurven der dc/dt - Analysen als Funktion des s - Wertes sind in Abbildung 38 für die Peptide A4, B1b, B1bI und A4I im Vergleich mit CaM dargestellt.

Messdaten

In Abbildung 38 ist erkennbar, daß die Gauß - Verteilungen der Peptidproben nicht ideal sind, denn bei keiner der Kurven liegt der arithmetische Mittelwert der Kurve exakt im Schwerpunkt der Verteilung. In den Gauß - Kurven von A4, B1b und A4I sind dennoch distinkte Maxima, vergleichbar derer des CaMs, erkennbar. Unter den gegebenen Bedingungen betrug der s - Wert auf eine Nachkommastelle gerundet für A4 0,6 S, für B1b 0,5 S, für A4I 1,7 S und für CaM 2,0 S. Für B1bI ist die Gauß - Verteilung am wenigsten ideal. Mit dem Programm *DCTC+*TM wurde ein gerundeter s - Wert von 1,4 S mit einem prozentualen Anteil der zweiten Molekülspezies von 10 % ermittelt. Für B1bII konnte aufgrund seiner Heterogenität kein s - Wert bestimmt werden.

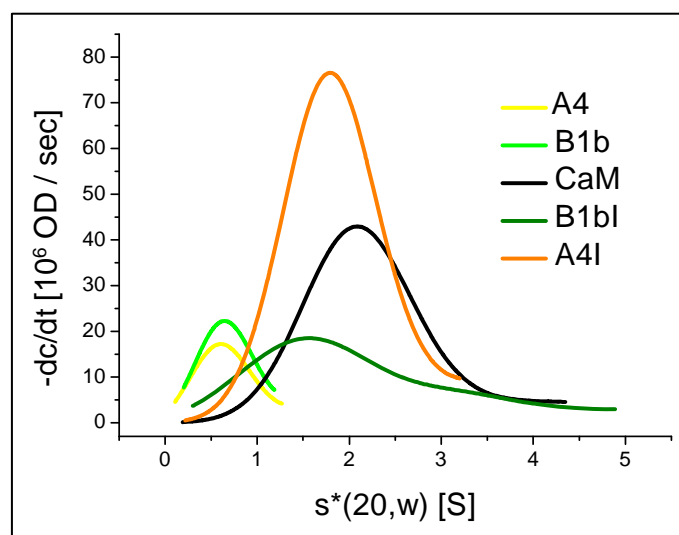


Abb. 38: Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit von den CNG - Kanalpeptiden B1b, A4, B1bI und A4I und CaM in Doppelsektorzellen. Gauß - Kurven der zeitabhängigen Änderung des S - Profils dc/dt nach Analyse mit dem Programm *DCTC+*TM. Die Maxima der Gauß - Kurven entsprechen dem jeweiligen s - Wert der Probe. Analysetemperatur: 25°C, Proteinkonzentration: 0,15 g/l, Rotationsgeschwindigkeit: 60000 g.

In Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen konnte für die CNG - Kanalpeptide B1b, A4, B1bI und A4I ein s - Wert aus den Maxima der Gauß - Verteilungen der dc/dt -Analyse extrahiert werden. Die Sedimentationsprofile der nach der Fmoc - Methode synthetisierten Peptide A4, B1b und des heterolog exprimierten A4I - Peptids verhalten sich im Sedimentationsfeld annähernd ideal. Für B1bI wurde mit 10% eine zweite Teilchenspezies identifiziert. Die B1bII - Probe war zu inhomogen, als dass bei den Absorptionsmessungen der wandernden Teilchen im Zentrifugalfeld eine entsprechende Gauß - Verteilung ermittelt werden konnte.

Zusammenfassung

Durch die Analyse der Sedimentationsprofile konnte also eine Aussage über die Homogenität der Proben getroffen werden. Von den heterolog exprimierten CNG - Peptiden ist nur A4I homogen, B1bI ist annähernd homogen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei der mit etwa 10% angegebenen zweiten Teilchenspezies um das gleiche B1bI - Peptid mit abweichender Faltung. Für B1bII konnte aufgrund von Inhomogenität kein s - Wert bestimmt werden, weshalb dieses Peptid für weitere Analysen nicht mehr eingesetzt wurde.

2.6 Zusammenfassung zur Überprüfung der Faltung und Homogenität

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse dienen dem Ziel, eine Aussage über die Sekundärstruktur, Konformation und Homogenität der in dieser Arbeit verwendeten Calmoduline und Peptide des CNG - Kanals zu treffen. Für CaM wurde in Ca^{2+} - Lösung ein 13% höherer Anteil an α - Helices identifiziert als in Ca^{2+} - freier Lösung. Die α - helikalen Anteile der CaM - Mutanten CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴, deren EF - Hand Bindemotive durch einen Asparaginsäure (D) \rightarrow Alanin (A) Austausch teilweise (CaM¹² und CaM³⁴) bzw. überhaupt kein (CaM¹²³⁴) Ca^{2+} binden können sind in Ca^{2+} - Lösung entsprechend geringer. Die Sekundärstrukturanteile aller untersuchten CNG - Peptide betrug maximal 33% und die Peptide bestehen überwiegend aus Zufallsknäuel. Bei der Analyse der Sedimentationsprofile mittels analytischer Ultrazentrifugation wurden s - Werte für die in dieser Arbeit verwendeten CaM - Mutanten identifiziert, die dem von Wildtyp - CaM entsprachen, was auf eine korrekte Konformation dieser Proteine hindeutet. Darüber hinaus wurden für alle CaM - Mutanten nur homogene Teilchenspezies gefunden. Die Sedimentationsprofile der CNG - Peptide dienen hauptsächlich der Überprüfung der Homogenität der in dieser Arbeit heterolog exprimierten Teilchenspezies. Exemplarisch für die nach der Fmoc - Methode synthetisierten Peptide und weil diese auch in später beschriebenen Analysen mittels analytischer Ultrazentrifugation verwendet wurden, wurden die s - Werte von B1b und A4 bestimmt. Mit Ausnahme von B1bI

und B1bII wurden homogene Teilchenspezies identifiziert. Für B1bII konnte kein s - Wert bestimmt werden, weshalb dieses Peptid in weiteren Analysen nicht mehr eingesetzt wurde.

3 Analyse der Interaktion von CaM und CaM - Mutanten mit Peptiden des olfaktorischen CNG - Kanals mit CD - Spektroskopie

Die Interaktion eines Proteins mit einem zweiten Partner führt in den meisten Fällen zu einer Veränderung der Konformation und somit der Sekundärstruktur der Interaktionspartner. Mittels CD - Spektroskopie können Sekundärstrukturänderungen eines Proteins bei Bindung an einen Liganden durch die resultierende Änderung der relativen molaren Elliptizität θ schnell detektiert werden (eine Übersicht gibt Pelton & McLean, 2000). Die Interaktion von CaM und den Mutanten CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴ mit den Peptiden B1b, B1bI, B1b^{LE}, A4 und A4I in 0 und 30 μM Ca²⁺ wurde CD - spektroskopisch untersucht. Hierzu wurden zunächst die CD - Einzelspektren und danach die Mischspektren der potentiellen Interaktionspartner unter gleichen Bedingungen und bei gleicher Proteinkonzentration analysiert und nach der Dekonvolution der Spektren und dem Datenfit verglichen. Mit dem Programm *CD - Mix* (Dr. Sandro Keller, FMP, Berlin - Buch) wurde die arithmetische Summe der relativen molaren Elliptizität der Einzelspektren berechnet und mit der relativen molaren Elliptizität des gemessenen Mischspektrums graphisch dargestellt und verglichen. Bei Bindung weicht das gemessene Mischspektrum deutlich vom kalkulierten Summenspektrum ab und die Spektren sind in Folge nicht deckungsgleich. Die in den Graphen ebenfalls dargestellten Einzelspektren wurden bereits in den Abschnitten 2.1 bis 2.3 beschrieben.

3.1 Interaktion von CaM mit A4, A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI

Einführung

Mittels CD - Spektroskopie wurde die Interaktion von CaM mit den Peptiden A4, A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI in 0 μM Ca²⁺ und 30 μM Ca²⁺ analysiert. Die Mutante A4^{LE} stand zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung, weswegen solche Analysen mit diesem Peptid nicht durchgeführt werden konnten. Die Ergebnisse der Analyse der Interaktion in 0 μM Ca²⁺ (jeweils links, grüne Mischspektren) und 30 μM Ca²⁺ (jeweils rechts, rote Mischspektren) sind in Abbildung 39 a - e dargestellt.

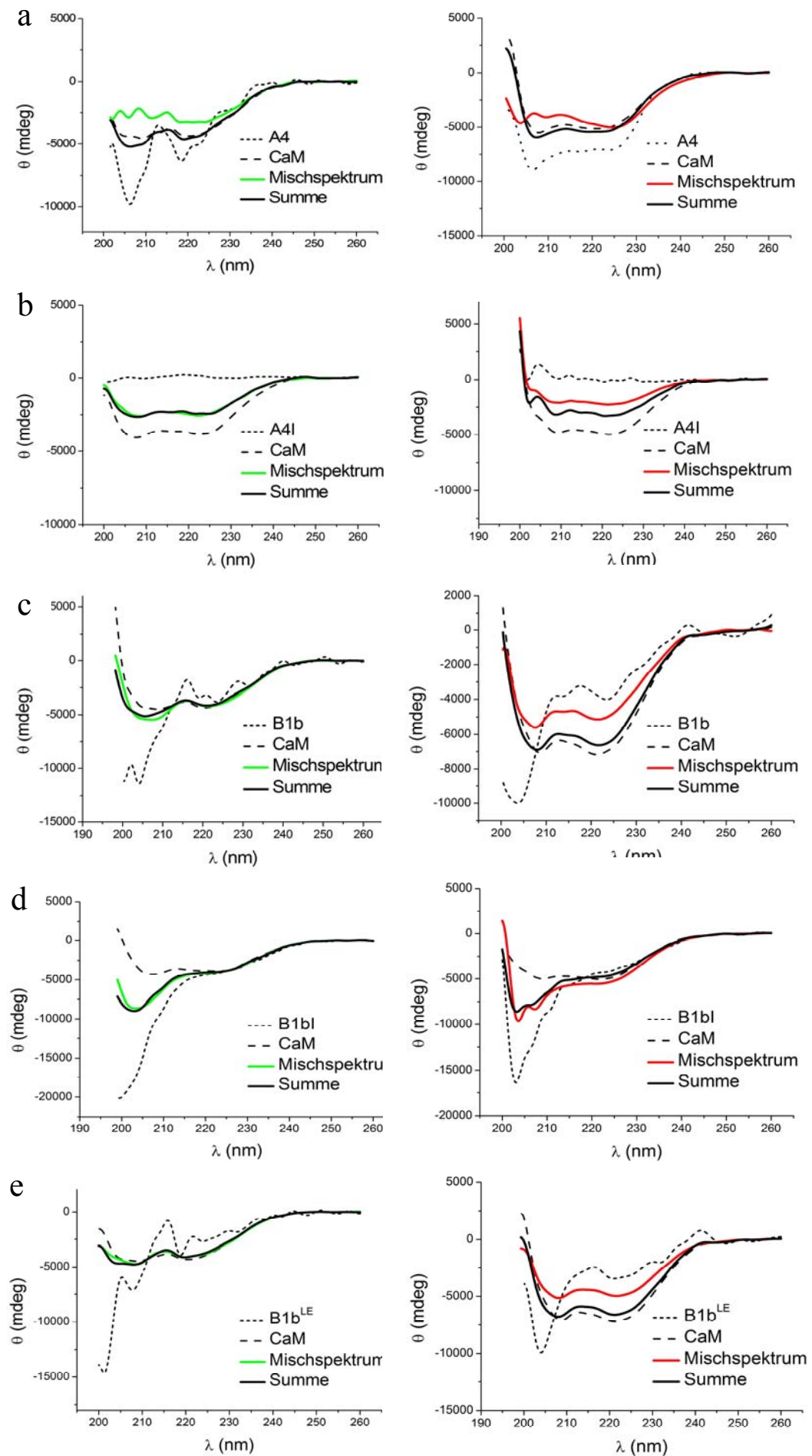


Abb. 39: (a - e) CD - spektroskopische Analyse der Interaktion von CaM (**gestrichelt**) mit den Peptiden A4, A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI (**gepunktet**) in 0 μM Ca^{2+} (**links, grüne Mischspektren**) und 30 μM Ca^{2+} (**rechts, rote Mischspektren**). Graphischer Vergleich der Mischspektren mit den arithmetischen Summenspektren (**schwarz, Summe**). (a) A4 und CaM. (b) A4I und CaM. (c) B1b und CaM. (d) B1bI und CaM. (e) B1b^{LE} und CaM. Die Konzentration von CaM und den Peptiden in der Meßlösung betrug 20nM. Analysetemperatur: 25°C. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm CD - Mix, die Glättung der Graphen in origin v.7.

Meßdaten

Die Mischspektren von A4 mit CaM (a) weichen deutlich von den kalkulierten Summenspektren ab. Die negative molare Elliptizität des Komplex aus CaM und A4 ist sowohl in Ca^{2+} -freier Lösung als auch in 30 μM Ca^{2+} verringert. Die für α -helikale Strukturen typischen lokalen Minima von CaM bei 208 nm sind nicht mehr erkennbar und bei 222 nm deutlich reduziert. Daraus läßt sich ableiten, daß A4 an CaM bindet und diese Bindung Ca^{2+} -unabhängig ist. Im Gegensatz dazu erfolgt die Bindung der Peptide A4I (b), B1b (c), B1bI (d) und B1b^{LE} (e) nur in Anwesenheit von 30 μM Ca^{2+} an CaM. In 0 Ca^{2+} sind die gemessenen Mischspektren (b - e, links, grün) deckungsgleich mit den errechneten Summenspektren. A4I, B1b, B1bI und B1b^{LE} binden demnach nicht an Ca^{2+} -freies CaM. Die Sekundärstrukturanteile der Einzelproteinproben verhalten sich in der Probemischung ausschließlich additiv. In 30 μM Ca^{2+} ist die negative molare Elliptizität des Mischspektrums von A4I und CaM (b) im Vergleich zum Summenspektrum reduziert, lokale Minima bei 208 und 222 nm waren im Mischspektrum erkennbar. Die Elliptizität des Mischspektrums durch die Bindung von B1b an CaM ist in 30 μM Ca^{2+} im Vergleich zum Summenspektrum ebenfalls deutlich reduziert. Das Mischspektrum weist außerdem für α -helikale Strukturen typische ausgeprägte lokale Minima bei 208 und 222 nm auf. Die Ca^{2+} -abhängige Bindung von B1bI an CaM (d) ist im Gegensatz zur Bindung aller anderen Peptide mit einer geringen Zunahme der relativen molaren Elliptizität θ verbunden, wohingegen die Bindung von B1b^{LE} (e) von einer deutlichen Verringerung von θ gekennzeichnet ist.

Zusammenfassung

In 0 Ca^{2+} waren die kalkulierten Summenspektren und die gemessenen Spektren für die Interaktion der CNG - Peptide B1b, B1b^{LE}, B1bI und A4I deckungsgleich. Die Sekundärstrukturen verhalten sich demnach in der Probelösung der Mischung additiv. Diese Peptide binden also nicht Ca^{2+} -unabhängig an CaM. Eine Ausnahme bildet die A4 - Bindung. Das kalkulierte Summenspektrum weicht in 0 Ca^{2+} deutlich vom Mischspektrum ab, es wurden also Änderungen der Sekundärstrukturen bei Bindung detektiert. A4 bindet demnach Ca^{2+} -unabhängig an CaM. In Ca^{2+} -Lösung binden dagegen alle hier untersuchten CNG - Peptide an CaM. Auffallend ist außerdem, daß B1b^{LE} an CaM bindet, weil ein

L (Leucin) → E (Glutaminsäure) Austausch im LQ - Bindemotiv die Bindung an CaM angeblich (siehe z.B. Bradley et al., 2004) verhindert.

3.2 Interaktion von CaM¹² und CaM³⁴ mit A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI

Einführung

Die CD - spektroskopische Analyse der Bindung von A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI an die CaM - Mutanten CaM¹² bzw. CaM³⁴, die N - bzw. C - terminal kein Ca²⁺ binden können, sollte zeigen, ob C - bzw. N - terminal mit Ca²⁺ teiligandiertes CaM an diese Kanalpeptide binden kann. Da die Bindung von A4 an CaM Ca²⁺ - unabhängig erfolgt, wurde dieses Peptid nicht mehr für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Die Abbildungen 40 a - d und 41 a - d zeigen die Ergebnisse der Untersuchung der CD - Mischspektren (rot) von CaM¹² bzw. CaM³⁴ und den CNG - Peptiden im Vergleich zu den aus den Einzelspektren mit dem Programm *CD - Mix* errechneten Summenspektren. Alle Untersuchungen wurden in 30 µM Ca²⁺ durchgeführt.

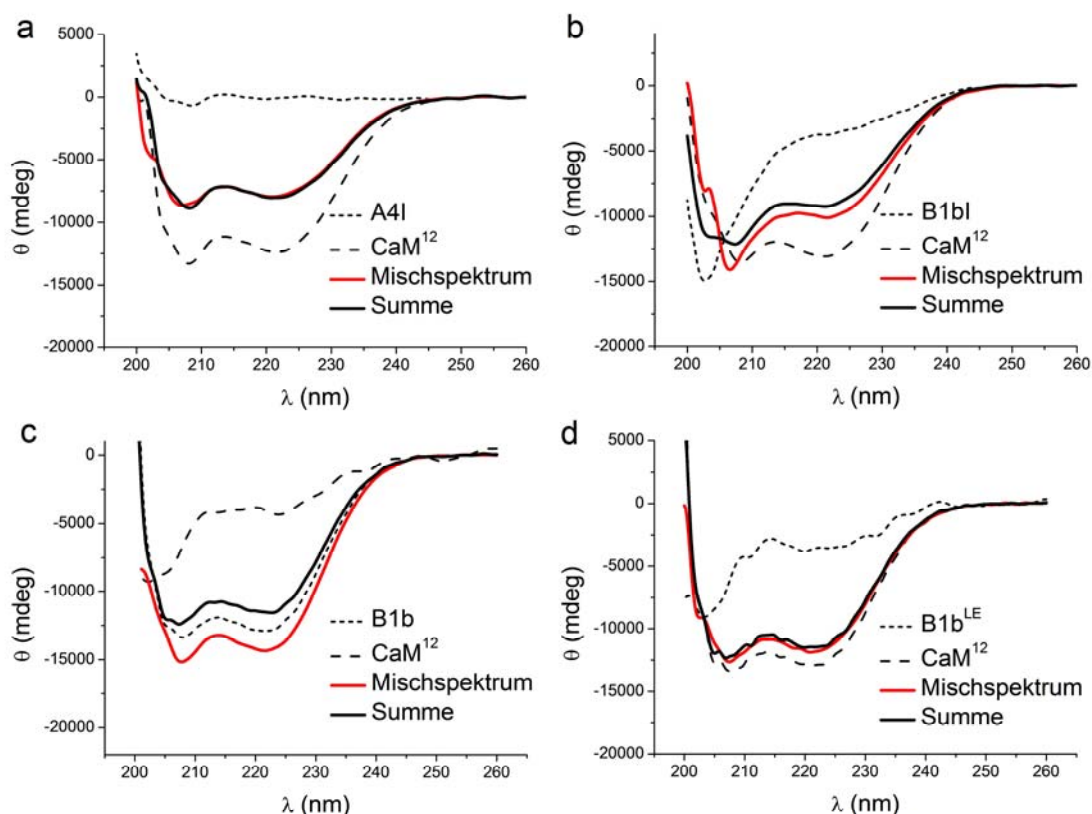


Abb. 40: (a - d) CD - spektroskopische Analyse der Interaktion von CaM¹² (**gestrichelt**) mit den Peptiden A4, A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI (**gepunktet**) in 30 µM Ca²⁺. Graphischer Vergleich der Mischspektren (rot) mit den arithmetischen Summenspektren (**schwarz, Summe**). (a) A4I und CaM¹², keine Bindung. (b) B1bI und CaM¹², Bindung. (c) B1b und CaM¹², Bindung. (d) B1b^{LE} und CaM¹², keine Bindung. Die Konzentration von CaM¹² und den Peptiden in der Meßlösung betrug 20 nM. Analysetemperatur: 25°C. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm *CD - Mix*, die Glättung der Graphen in origin v.7.

Meßdaten der CaM¹²-Interaktion

Der Vergleich der CD - Mischspektren mit den Summenspektren von CaM¹² mit den CNG - Kanalpeptiden A4I, B1bI, B1b und B1b^{LE} (Abb. 40) ergab, daß B1bI (b) und B1b (c) an CaM¹² binden. Die CaM - Mutante CaM¹² trägt in jeder der beiden N - terminalen Ca²⁺- Bindedomänen eine D → A Mutation, die die Bindung von Ca²⁺ verhindert (Erickson et al., 2001). Somit ist nur die C - terminale EF - Hand Bindedomäne des CaMs mit Ca²⁺ ligandiert. Bei der Bindung von B1bI an CaM¹² ist analog zur Bindung an CaM eine Zunahme der negativen molaren Elliptizität θ im Vergleich zum kalkulierten Summenspektrum erkennbar. Die Bindung von B1b an CaM¹² führt ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der negativen Elliptizität. Somit unterscheidet sich die Elliptizität des Mischspektrums bei der Bindung von B1b an CaM¹² von dem der Bindung an CaM, bei der eine deutliche Verringerung der negativen molaren Elliptizität beobachtet wurde. Die für α - helikale Strukturen typischen lokalen Minima im Spektrum bei 208 nm und bei 222 nm sind sowohl bei der Bindung von B1b an CaM¹² als auch bei der Bindung von B1bI an CaM¹² erkennbar. Im Gegensatz dazu binden die Peptide A4I (a) und B1b^{LE} (d) nicht an teilligandiertes CaM¹². Die gemessenen Mischspektren sind deckungsgleich mit den errechneten Summenspektren aus den Einzelspektren und die Sekundärstrukturanteile der Einzelproteine verhalten sich in der Probemischung lediglich additiv. Die C - terminale Ca²⁺- Sättigung von CaM ist somit nicht hinreichend für die Bindung an die CNG - Kanalpeptide A4I und B1b^{LE}.

Meßdaten der CaM³⁴-Interaktion

Die Analyse der CD - Mischspektren von CaM³⁴ mit den CNG - Kanalpeptiden A4I, B1bI, B1b und B1b^{LE} (Abb. 41) ergab, daß die Peptide B1bI (b) und B1b (c) auch an die CaM - Mutante CaM³⁴ binden. Das Mischspektrum von B1bI und CaM³⁴ zeigt wie bei der Bindung an CaM und CaM¹² eine deutliche Zunahme der negativen molaren Elliptizität θ im Vergleich zum Summenspektrum. Auch die Bindung von B1b an CaM³⁴ führt wie bei der Bindung an CaM¹² zu einer deutlichen Zunahme der negativen Elliptizität. Die CaM - Mutante CaM³⁴ trägt in jeder der beiden C - terminalen Ca²⁺-Bindedomänen eine D → A Mutation, die die Bindung von Ca²⁺ verhindert (Erickson et al., 2001). Somit ist nur die N - terminale EF - Hand Bindedomäne des CaMs mit Ca²⁺ ligandiert. Analog zur Bindung an CaM¹² sind bei der Bindung von B1bI und B1b an CaM³⁴ deutlich die lokalen Minima α - helikaler Strukturmerkmale im Spektrum bei 208 nm und bei 222 nm erkennbar. Die Peptide A4I (a) und B1b^{LE} (d) binden nicht an CaM³⁴. Die Sekundärstrukturanteile der Einzelproteine verhalten sich in der Probemischung lediglich additiv, erkennbar an den zu den Summenspektren deckungsgleichen Mischspektren. Die N - terminale Ca²⁺- Sättigung von

CaM³⁴ ist somit nicht hinreichend für die Bindung der CNG - Kanalpeptide A4I und B1b^{LE}. Dies entspricht dem Ergebnis der Analyse der Mischspektren von A4I und B1b^{LE} in Anwesenheit von CaM¹². Diese Peptide binden demnach nicht an teilligandiertes CaM.

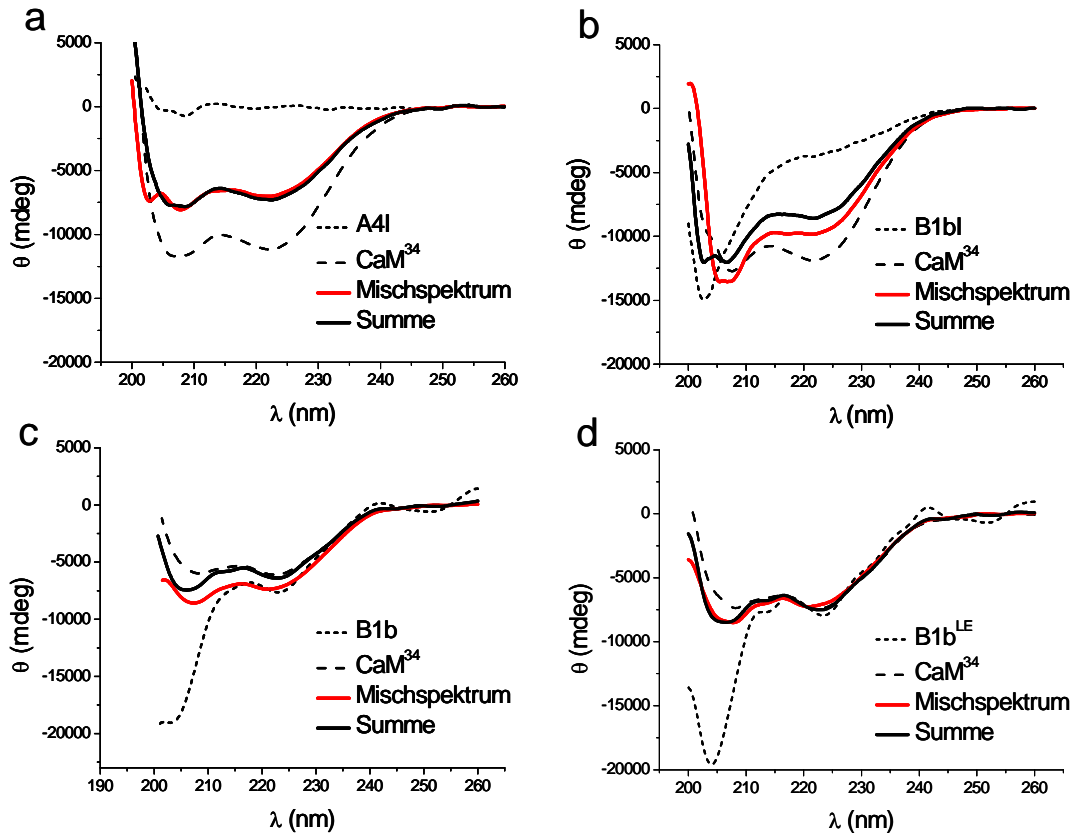


Abb. 41: (a-d) CD - spektroskopische Analyse der Interaktion von CaM³⁴ (**gestrichelt**) mit den Peptiden A4, A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI (**gepunktet**) in 30 μM Ca²⁺. Graphischer Vergleich der Mischspektren (rot) mit den arithmetischen Summenspektren (**schwarz, Summe**). (a) A4I und CaM³⁴, keine Bindung. (b) B1bI und CaM³⁴, Bindung. (c) B1b und CaM³⁴, Bindung. (d) B1b^{LE} und CaM³⁴, keine Bindung. Die Konzentration von CaM³⁴ und den Peptiden in der Meßlösung betrug 20 nM. Analysetemperatur: 25°C. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm CD - Mix, die Glättung der Graphen in origin v.7.

Zusammenfassung

Zusammenfassend ergaben die bisherigen Untersuchungen, daß zwar alle CNG - Peptide an CaM binden, aber nur B1b und B1bI mit N - und C - terminal teilligandiertem CaM interagieren. Lediglich die Bindung von A4 ist dabei Ca²⁺ - unabhängig.

3.3 Interaktion von CaM¹²³⁴ mit A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI

Einführung

Die Untersuchung der Interaktion von A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI mit der CaM¹²³⁴-Mutante, die weder N - noch C - terminal funktionale Ca²⁺- Bindestellen aufweist, diente als

Kontrollexperiment für die allgemeine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindeereignisse. Sie besitzt in jeder der vier EF-Hand-Bindedomänen einen D → A Austausch (Erickson et al., 2001) und bindet somit kein Ca^{2+} .

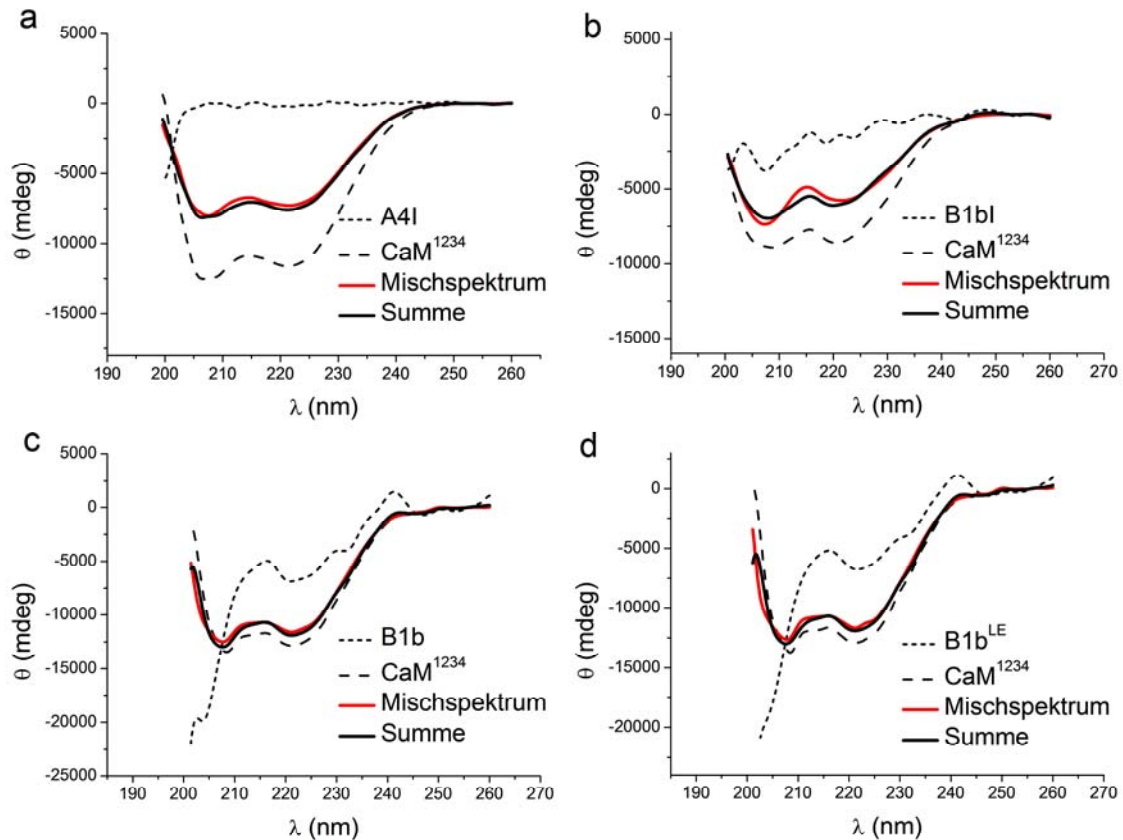


Abb. 42: (a - d) CD - spektroskopische Analyse der Interaktion von CaM^{1234} (**gestrichelt**) mit den Peptiden A4, A4I, B1b, B1b^{LE} und B1bI (**gepunktet**) in $30 \mu\text{M Ca}^{2+}$. Graphischer Vergleich der Mischspektren (**rot**) mit den arithmetischen Summenspektren (**schwarz, Summe**). (a - d) Keines der Peptide bindet an CaM^{1234} . Die Konzentration von CaM^{1234} und den Peptiden in der Meßlösung betrug 20 nM . Analysetemperatur: 25°C . Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm CD - Mix, die Glättung der Graphen in origin v.7.

Meßdaten/ Zusammenfassung

Die Analyse der Wechselwirkung von CaM^{1234} mit A4I, B1bI, B1b und B1b^{LE} ist in Abbildung 42 a - d dargestellt. Wie in der Abbildung deutlich zu erkennen ist, bindet keines der Kanalpeptide an CaM^{1234} . Die Mischspektren sind mit den kalkulierten Summenspektren der Einzelproteinanalysen deckungsgleich. Dies bestätigt die vorherigen Resultate, dass keines der Peptide A4I, B1bI, B1b und B1b^{LE} Ca^{2+} -unabhängig an CaM bindet.

3.4 Zusammenfassende Darstellung der CD - spektroskopischen Analyse

Die CD - spektroskopische Analyse der Interaktion der CNG - Peptide A4, A4I, B1b, B1bI und B1b^{LE} ergab, dass mit Ausnahme von A4 alle Peptide Ca²⁺-abhängig mit CaM wechselwirken. Nur die Peptide B1b und B1bI interagieren dabei auch mit teilligandiertem CaM. Für A4I und B1b^{LE} konnte keine solche Interaktion festgestellt werden.

Dies ist insofern bemerkenswert, da entgegen der Erwartung ein Austausch der Aminosäure Leucin (L) gegen Glutaminsäure (E) des LQ - Bindemotivs die Bindung des Peptids B1b^{LE} an CaM nicht verhindert. Das B1b^{LE} - Peptid bindet analog zu B1b Ca²⁺-abhängig an CaM. Der Unterschied liegt dennoch in der Ca²⁺- Abhängigkeit der Bindung. Während B1b sowohl an CaM¹² als auch an CaM³⁴ bindet, wurde keine solche Bindung von B1b^{LE} an diese CaM - Mutanten detektiert. Die Interaktion von B1b^{LE} erfolgt also im Gegensatz zu der von B1b nur mit Ca²⁺ vollligandiertem CaM.

4 Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Ca^{2+} -abhängigen Calmodulin - Interaktion

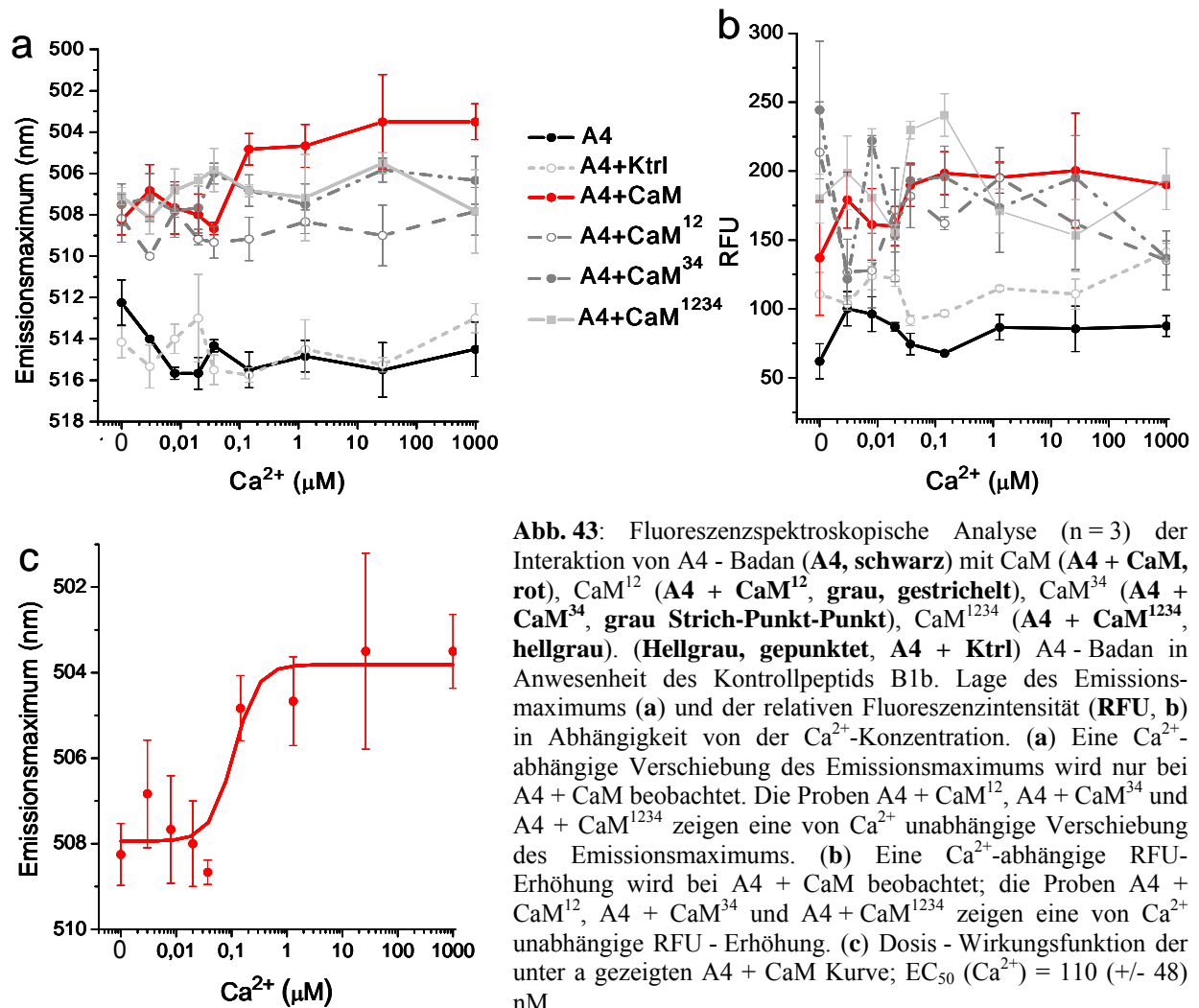
Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung von CaM und CaM - Mutanten an die Peptide des CNG-Kanals wurde fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Fluoreszenzfarbstoff Badan entweder an CaM oder an die Peptide A4, B1b, B1b^{LE} und A4^{LE} gekoppelt (siehe Abbildung 28 und 29). Nach Anregung bei $\lambda = 387 \text{ nm}$ liefert dieser umgebungssensitive Fluoreszenzfarbstoff anhand der Lage des Emissionsmaximums und der Intensität der emittierten Strahlung (RFU) am Emissionsmaximum Informationen über die Fluorophorumgebung. Bei Änderung der Fluorophorumgebung durch Bindung oder Konformationsänderung der Bindungspartner wird das Fluoreszenzlicht in der Wellenlänge verschoben und mit geringerer oder größerer RFU emittiert. Zur genaueren Analyse der Ca^{2+} -Abhängigkeit dieser Ereignisse, wurden die Emissionsmaxima und die RFU der Farbstoffgekoppelten Peptide und des CaMs bei den Ca^{2+} -Konzentrationen (μM) 0, 0,003, 0,008, 0,02, 0,037, 0,144, 1,3 und 1000 gemessen. Anschließend wurde dieses Experiment in Anwesenheit potentieller Interaktionspartner wiederholt und die detektierten Emissionsmaxima und RFUs beider Experimente bei den jeweiligen Ca^{2+} -Konzentrationen verglichen. Dazu wurden die Lage der Emissionsmaxima und die Beträge der maximalen Intensitäten von mindestens 3 Versuchsansätzen pro gemessener Ca^{2+} -Konzentration gemittelt und als Funktion der logarithmischen $[\text{Ca}^{2+}]$ dargestellt. Zur Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration der halbmaximalen Änderung des Emissionsmaximums ($\text{EC}_{50}(\text{Ca}^{2+})$) wurde, wenn möglich, ein sigmoidaler Datenfit mit Steigung 2 angewendet, da so die Kurve am besten im Bereich der Meßwerte lag.

4.1 A4 - Badan Bindung an CaM, CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴

Einführung

Die Ca^{2+} -unabhängige Bindung des A4 - Peptids an CaM wurde bereits CD - spektroskopisch nachgewiesen. Die fluoreszenzspektroskopische Analyse der Interaktion von Badan - gekoppeltem A4 (A4 - Badan) mit CaM und den CaM - Mutanten CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴ diente der Messung von Änderungen der Fluorophorumgebung in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. Darüber hinaus sollte eine Dosis - Wirkungskurve in Abhängigkeit von $[\text{Ca}^{2+}]$ erstellt werden. Die Ergebnisse der Untersuchung der Lage der Emissionsmaxima und der Größe der Fluoreszenzintensität als Funktion der Ca^{2+} -Konzentration sind in Abbildung 43 a

und b dargestellt. Eine Dosis - Wirkungsfunktion konnte nur für die A4 - Bindung an CaM ermittelt werden und ist in Abbildung 43 c dargestellt. Für das Kontrollexperiment diente das nicht an Fluorophor - gekoppelte B1b - Peptid, das nicht an A4 bindet.



Messdaten

Wie in Abbildung 43 a dargestellt führt die Anwesenheit des B1b Kontrollpeptids (hellgrau, gepunktet, A4+Ktrl) beziehungsweise eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration allein noch nicht zu einer Verschiebung der Lage des Emissionsmaximums von A4 - Badan (schwarz, A4). Die Meßwerte von A4 + Ktrl liegen bei allen Ca²⁺-Konzentrationen innerhalb der Fehlerbalken von A4. Bei Zugabe von CaM (rot, A4 + CaM) und den CaM - Mutanten CaM¹² (grau, gestrichelt), CaM³⁴ (grau, Strich - Punkt - Punkt) und CaM¹²³⁴ (hellgrau) zu A4 verschiebt sich das Emissionsmaximum bereits bei 0 Ca²⁺ um 4 - 5 nm. Die Verschiebung des Emissionsmaximums ist > 0 Ca²⁺ in Anwesenheit aller Calmoduline etwa 5 - 7nm, für CaM + A4 ab > 20 nM Ca²⁺ liegt das Maximum weiter im blauen Bereich des Spektrums.

Zwischen 20 nM und 1 mM Ca^{2+} beträgt die Differenz der Lage des Emissionsmaximums von A4 + CaM im Vergleich zu A4 dann 11 - 12 nm. Für die A4 + CaM Probe wurde demnach eine Ca^{2+} -abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums nachgewiesen. Die EC_{50} (Ca^{2+}) konnte für die Dosis - Wirkungsfunktion (Abb. 43 c) von der A4 + CaM - Probe ermittelt werden und beträgt 110 (+/- 48) nM Ca^{2+} .

In Abbildung 43 b dargestellt sind die Ergebnisse der RFU - Änderung bei Zugabe von B1b (hellgrau, gepunktet, Ktrl), CaM (rot), CaM^{12} (grau, gestrichelt), CaM^{34} (grau, Strich - Punkt - Punkt) und CaM^{1234} (hellgrau) zu A4-Badan (schwarz, A4). Im Vergleich zur Analyse der Lage des Emissionsmaximums fällt auf, daß sich bei Zugabe des Kontrollpeptids eine Änderung der Emissionseigenschaften, in diesem Fall eine Zunahme der relativen Fluoreszenz, zwischen 10 und 60 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) ereignet. Die Zunahme der RFU bei Zugabe von CaM bis zu einer Ca^{2+} -Konzentration von 20 nM liegt aber mit 60 - 100 RFU höher, ab einer Ca^{2+} -Konzentration > 20 nM sogar deutlich höher, als in Anwesenheit der Kontrolle. Die Änderung der RFU von A4 - Badan in Anwesenheit von CaM^{12} , CaM^{34} und CaM^{1234} liegt bei allen Ca^{2+} -Konzentrationen in der Größenordnung von 60 - 200.

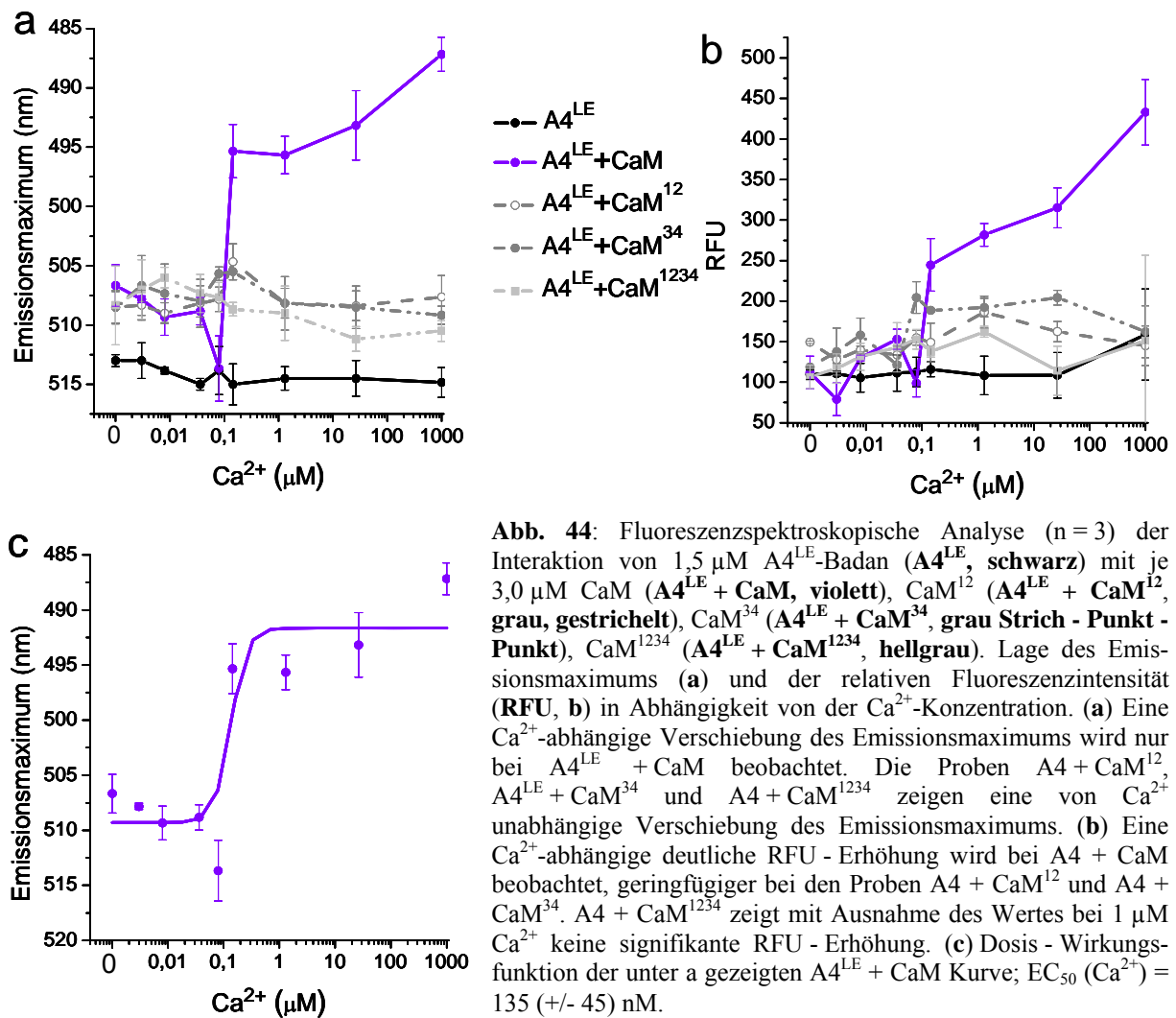
Zusammenfassung

Die beschriebene Analyse ergab, daß das Badan - gekoppelte A4 an CaM und die CaM-Mutanten CaM^{12} , CaM^{34} und CaM^{1234} bindet, eine weitere Bestätigung für die Ca^{2+} -unabhängige Bindung dieses Peptids an CaM. Eine Ca^{2+} -abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums wurde nur für die Bindung an CaM detektiert. Die EC_{50} (Ca^{2+}) der Dosis - Wirkungsfunktion für A4 + CaM betrug 110 (+/- 48) nM.

4.2 A4^{LE} -Badan Bindung an CaM, CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴

Einführung

Die Bindung von A4^{LE} an CaM beziehungsweise an die CaM - Mutanten wurde nicht CD - spektroskopisch untersucht, da dieses Peptid zum Analysezeitpunkt nicht zur Verfügung stand. Deshalb sollte mittels Fluoreszenzspektroskopie auch die Bindung von A4^{LE}- Badan an CaM und die CaM - Mutanten CaM^{12} , CaM^{34} und CaM^{1234} analysiert werden. Darüber hinaus sollte wieder die Ca^{2+} -Abhängigkeit von Bindeereignissen, die Ca^{2+} -abhängige Veränderung der Fluorophorumgebung und eine Dosis - Wirkungskurve für Ca^{2+} erstellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 a - c dargestellt.



Messdaten

Die Ergebnisse der Änderung der Positionen des Emissionsmaxima von A4^{LE} -Badan (schwarz, A4^{LE}) bei Zugabe von CaM (violett, $\text{A4}^{\text{LE}} + \text{CaM}$), CaM^{12} (grau, gestrichelt), CaM^{34} (grau, Strich-Punkt-Punkt) und CaM^{1234} (hellgrau) sind in a dargestellt. Die Kontrollmessung von A4^{LE} -Ktrl erfolgte nur bei 0 und 1,3 μM Ca^{2+} und ergab keine Änderung der Emission von A4^{LE} -Badan bei Zugabe des Kontrollpeptids (nicht dargestellt). Auch für A4^{LE} wurde durch die Ca^{2+} -Erhöhung allein noch keine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften detektiert. Wie bei der Interaktion von A4 mit CaM und den CaM - Mutanten verschiebt sich auch von A4^{LE} -Badan die Position des Emissionsmaximums bei Zugabe aller Calmoduline um 4 - 5nm und nur bei Zugabe von CaM kommt es ab 20 - 30 nM Ca^{2+} zu einer Ca^{2+} -abhängigen Verschiebung des Emissionsmaximums. Zunächst wurde eine leichte Rechtsverschiebung des Maximums, ab 100 nM Ca^{2+} eine starke Linksverschiebung detektiert. Die Differenz der Lage des Maximums von $\text{A4}^{\text{LE}} + \text{CaM}$ zu der von A4^{LE} beträgt bei 1 mM Ca^{2+} 27 nm. Die Änderung der Positionen der Emissionsmaxima von A4^{LE} -Badan

in Anwesenheit von CaM¹² und CaM³⁴ liegt bei allen Ca²⁺-Konzentrationen in der Größenordnung 8 - 10nm. Bei der Zugabe von CaM¹²³⁴ sind die Änderungen etwas geringer und betragen 5 - 6 nm. Die EC₅₀ (Ca²⁺) für die Ca²⁺-abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums konnte nur für A4^{LE} + CaM ermittelt werden (Abb. 44 c) und beträgt auf zwei Nachkommastellen gerundet 135 (+/- 45) nM Ca²⁺.

In Abbildung 44 b dargestellt sind die Ergebnisse der RFU - Änderung von A4^{LE}-Badan bei Zugabe von CaM (violett), CaM¹² (grau, gestrichelt), CaM³⁴ (grau, Strich – Punkt - Punkt) und CaM¹²³⁴ (hellgrau) zu A4^{LE}-Badan (schwarz, A4^{LE}). Bei allen Messungen außer für A4^{LE}-Badan alleine und in Anwesenheit von CaM¹²³⁴, wird um 100 nM Ca²⁺ eine Zunahme der RFU beobachtet, die für CaM + A4^{LE} aber deutlich stärker (150 - 225 RFU) ist, als in Anwesenheit der CaM – Mutanten. Bis 20 µM Ca²⁺ beträgt die Intensitätssteigerung von A4^{LE} in Anwesenheit von CaM¹² und CaM³⁴ 75 - 100 RFU und fällt bei 1 mM Ca²⁺ auf null.

Zusammenfassung

Die Bindung von Badan - gekoppeltem A4^{LE} an CaM konnte eindeutig gezeigt werden. Die Emissionseigenschaften des umgebungssensitiven Badans werden bei der Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration stark beeinflusst. Dies ist auf die A4^{LE}- Bindung an CaM und eine Konformationsänderung des CaMs bei Ca²⁺- Aufnahme zurückzuführen. Die Analyse der RFU - Änderung von A4^{LE}, im Vergleich zur RFU-Änderung wie sie für die A4 Bindung an die CaM - Mutanten gefunden wurde, deutet insbesondere bei Anwesenheit von CaM¹²³⁴ im Reaktionsansatz, auf eine Ca²⁺- abhängige Bindung hin. Eine Ca²⁺- abhängige Bindung an CaM³⁴ konnte außerdem mit hoher Wahrscheinlichkeit detektiert werden, da sich bei der Analyse eine Änderung der Emission des Badans im Bereich der Ca²⁺-Konzentration ereignet, wie sie auch bei der A4^{LE}- Bindung an CaM beobachtet wurde. Eine Dosis - Wirkungsfunktion für die Änderung der Fluorophorumgebung in Abhängigkeit von [Ca²⁺] konnte für A4^{LE} + CaM ermittelt werden. Die ermittelte EC₅₀ (Ca²⁺) betrug 145 (+/- 45) nM Ca²⁺.

4.3 CaM^{Badan} Bindung an A4 und A4^{LE}

Einführung

In den vorherigen Experimenten war Badan als umgebungssensitiver Reporter an das CNG - Peptid gekoppelt. Wird dieser Fluoreszenzfarbstoff dagegen an CaM gekoppelt (CaM^{Badan}) und nicht an das Peptid, kann er als Reporter für die Konformationsänderung von CaM dienen. Durch dieses Experiment können Rückschlüsse auf den Einfluß bindender Peptide auf

die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung und somit auch auf eine veränderte Ca^{2+} -Affinität des CaMs gezogen werden. Um den Einfluß der bindenden Peptide A4 und A4^{LE} auf die Konformation des Calmodulins zu untersuchen, wurde fluoreszenzspektroskopisch zunächst die Lage der Emissionsmaxima und die Fluoreszenzintensität von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ alleine in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration analysiert. Im nächsten Schritt wurde diese Messung in Anwesenheit eines der Peptide A4 beziehungsweise A4^{LE} wiederholt und die Emissionseigenschaften mit denen von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ verglichen. Als Kontrollprotein diente das OMP - Protein (*olfactory marker protein*), das weder an CaM, noch an die CNG - Peptide bindet. Für die Ca^{2+} -abhängigen Änderungen der Emission sollten außerdem Dosis - Wirkungsfunktionen für Ca^{2+} erstellt werden. In Abbildung 45 a - c sind die Ergebnisse der Analyse der Änderung der Emissionseigenschaften von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ als Funktion der Ca^{2+} -Konzentration dargestellt.

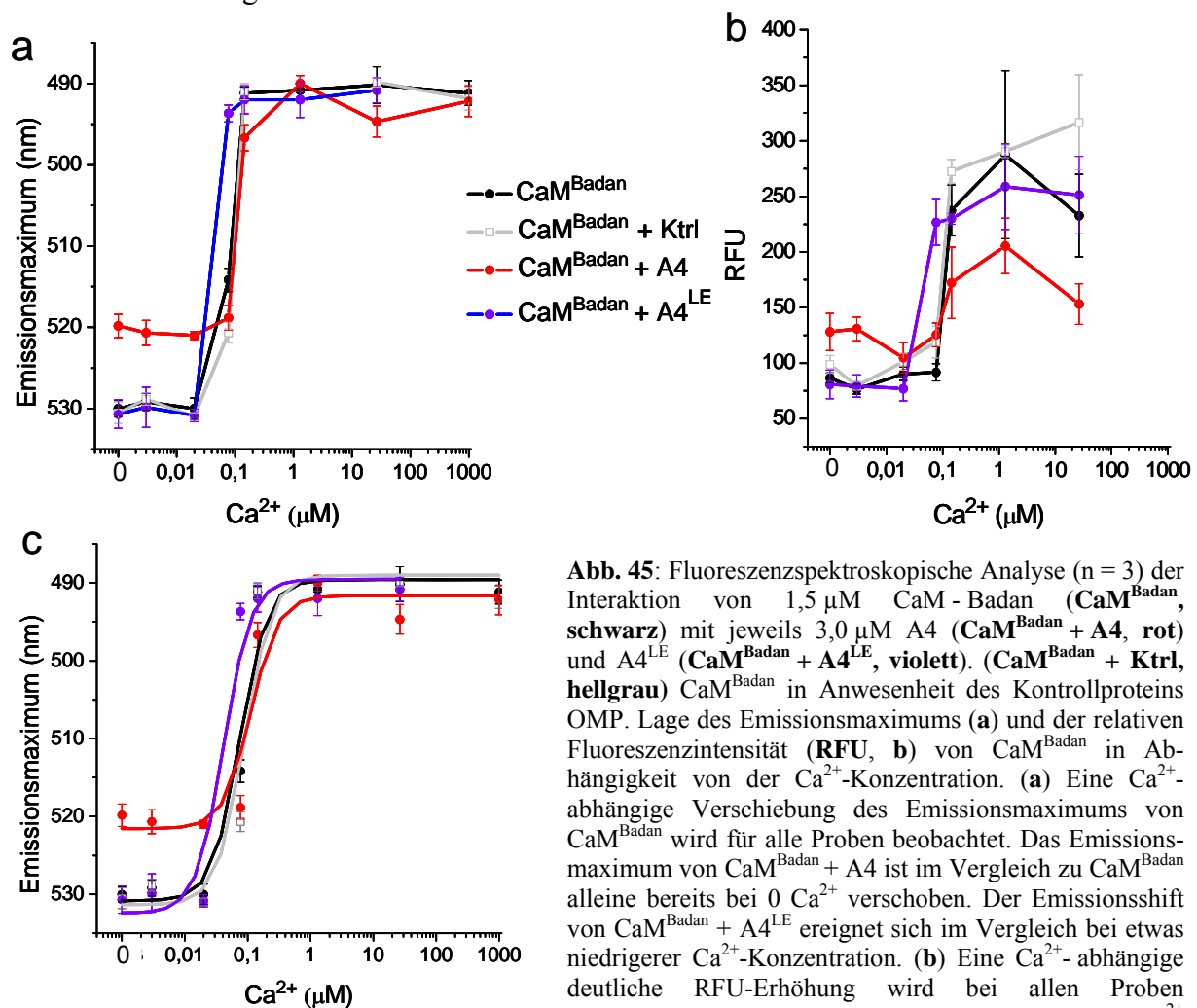


Abb. 45: Fluoreszenzspektroskopische Analyse ($n = 3$) der Interaktion von $1,5 \mu\text{M}$ $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$, schwarz) mit jeweils $3,0 \mu\text{M}$ A4 ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$, rot) und A4^{LE} ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{LE}}$, violett). ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$, hellgrau) $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Anwesenheit des Kontrollproteins OMP. Lage des Emissionsmaximums (a) und der relativen Fluoreszenzintensität (RFU, b) von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. (a) Eine Ca^{2+} -abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ wird für alle Proben beobachtet. Das Emissionsmaximum von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$ ist im Vergleich zu $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ alleine bereits bei 0 Ca^{2+} verschoben. Der Emissionsshift von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{LE}}$ ereignet sich im Vergleich bei etwas niedrigerer Ca^{2+} -Konzentration. (b) Eine Ca^{2+} -abhängige deutliche RFU-Erhöhung wird bei allen Proben beobachtet. Ein geringerer, aber bereits bei 0 Ca^{2+} detektierbarer Anstieg wird bei $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$ beobachtet. (c) Dosis - Wirkungsfunktion der unter a gezeigten Kurven. EC_{50} (Ca^{2+}) - Werte: ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$) = 75 (± 15) nM ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$) = 88 (± 26) nM, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$) = 112 (± 32) nM, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{LE}}$) = 41 (± 12) nM.

Messdaten

Die Analyse der Verschiebung der Emissionsmaxima von CaM^{Badan} (schwarz, CaM^{Badan}), CaM^{Badan} und A4 (rot, CaM^{Badan} + A4), CaM^{Badan} und A4^{LE} (violett, CaM^{Badan} + A4^{LE}) und im Kontrollexperiment (hellgrau, CaM^{Badan} + Ktrl) bei Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration ist in Abb. 45 a dargestellt. Für CaM^{Badan} alleine wurde zwischen 20 und 120 nM Ca²⁺ eine starke Verschiebung des Emissionsmaximums um 40 nm in den blauen Bereich nachgewiesen. Bei Zugabe des Kontrollproteins ist keine signifikante Änderung des Emissionsspektrums bezüglich der Lage der Emissionsmaxima erkennbar. Die Anwesenheit von A4 führt jedoch bereits bei 0 Ca²⁺ zu einer Verschiebung der Position des Emissionsmaximums um 10 nm. Bei etwa 20 nM Ca²⁺ verschiebt sich das Emissionsmaximum von CaM^{Badan} + A4 analog zu CaM^{Badan} um weitere 30 nm. Eine Änderung der Lage des Emissionsmaximums bei 0 Ca²⁺ im Vergleich zu CaM - Badan alleine, wurde bei Zugabe von A4^{LE} zu CaM^{Badan} nicht beobachtet. Der Kurvenverlauf entspricht dem von CaM^{Badan}, jedoch ist die Kurve zu niedrigeren Ca²⁺-Konzentrationen hin leicht nach links verschoben.

Die Analyse der Fluoreszenzintensität (b) ergab, daß sowohl bei der Zugabe des Kontrollproteins als auch bei der Zugabe von A4^{LE} zu CaM^{Badan} keine signifikante Änderung der RFU im Vergleich zu CaM^{Badan} beobachtet wird. Im Gegensatz dazu, steigt bei Anwesenheit von A4 im Reaktionsgemisch die Intensität der emittierten Strahlung bis 10 nM Ca²⁺ um etwa 30 RFU leicht an und steigt weiter > 10 nM bis 200 nM Ca²⁺. > 200nM erreicht der Wert der emittierten Strahlung sein Maximum, ist jedoch im Vergleich zu CaM^{Badan} 50 - 60 RFU geringer. In Abbildung 45 c sind die Dosis - Wirkungs - Sigmoidfunktionen zur Analyse der EC₅₀ (Ca²⁺) für die Graphen in a dargestellt. Der EC₅₀ (Ca²⁺) - Wert der Analyse der Emissionsmaxima in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration beträgt für CaM^{Badan} 75 (+/15) nM, für CaM^{Badan} + Ktrl 88 (+/- 26) nM, für CaM^{Badan} + A4 112 (+/- 32) nM und für CaM^{Badan} + A4^{LE} 41 (+/- 12) nM Ca²⁺.

Zusammenfassung

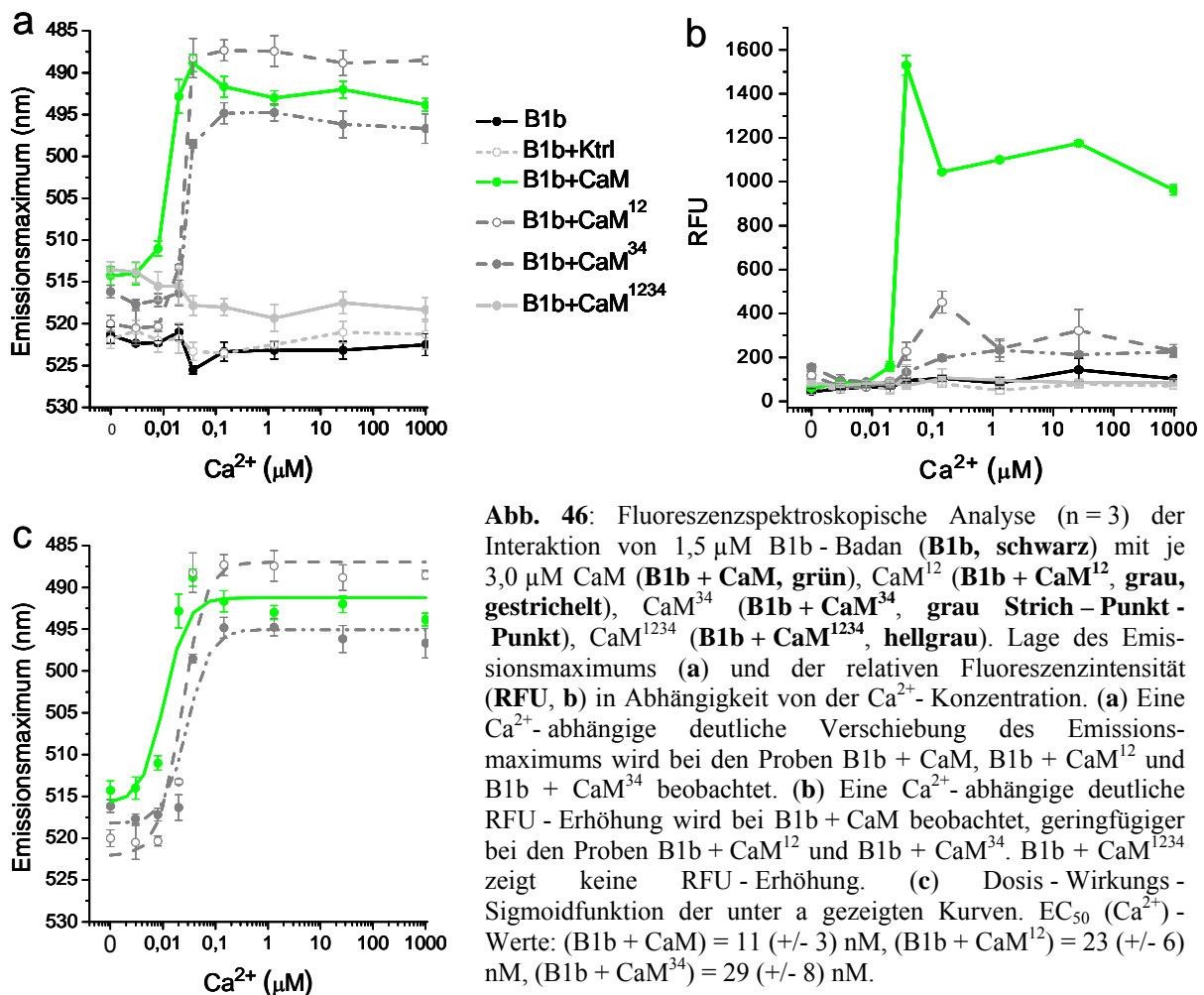
Die Untersuchungen zur Bindung von A4 und A4^{LE} an CaM^{Badan} bestätigen die zuvor CD - und fluoreszenzspektroskopisch ermittelten Resultate zur Bindung beider Peptide an CaM. Auch in diesem Experiment konnte anhand der Wirkung von A4 auf die Konformation von CaM^{Badan} bereits bei 0 Ca²⁺ gezeigt werden, daß die Bindung von A4 Ca²⁺-unabhängig erfolgt. Bei 0 Ca²⁺ konnte noch kein Einfluß von A4^{LE} auf die Konformation von CaM^{Badan} detektiert werden, erst bei Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration bewirkt die Bindung von A4^{LE} (EC₅₀ (Ca²⁺) von 41 (+/- 12) nM) eine leichte Erhöhung der Ca²⁺-Affinität von CaM^{Badan} ((EC₅₀ (Ca²⁺) von 75 (+/- 15) nM). Erstaunlicherweise wird im Gegensatz dazu die Ca²⁺-

Affinität von CaM^{Badan} bei A4 - Bindung mit einer EC₅₀ (Ca²⁺) von 112 (+/- 32) nM verringert. Somit ist fluoreszenzspektroskopisch auch für die LQ - Bindestelle von A4 gezeigt worden, dass ein L (Leucin) → E (Glutaminsäure) Austausch im LQ - Bindemotiv die Bindung an CaM^{Badan} nicht verhindert.

4.4 B1b-Badan Bindung an CaM, CaM¹², CaM³⁴ und CaM¹²³⁴

Einführung

Die Ca²⁺- abhängige Bindung des B1b - Peptids an CaM und die CaM - Mutanten CaM¹² und CaM³⁴ wurde ebenfalls CD - spektroskopisch bestätigt. Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Bindung von B1b - Badan an die Calmoduline sollte weitere Erkenntnisse über die Ca²⁺- Abhängigkeit der Bindung und die Änderung der Fluorophorumgebung in Abhängigkeit von der Ca²⁺- Konzentration liefern. Darüber hinaus sollten wieder Dosis - Wirkungskurven für Ca²⁺ erstellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 a - c dargestellt.



Messdaten

Eine Änderung der B1b - Badan Emission bei Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 46 a - c) wurde für CaM - Badan alleine (schwarz) und in Anwesenheit des Kontrollpeptids (A4; hellgrau, gepunktet) nicht detektiert. Die Positionen der Maxima von B1b - Badan in Anwesenheit von CaM (grün, B1b + CaM) CaM^{12} (grau, gestrichelt, B1b + CaM^{12}), CaM^{34} (grau, Strich - Punkt - Punkt, B1b + CaM^{34}) und CaM^{1234} (hellgrau, B1b + CaM^{1234}) sind in Abbildung 46 a dargestellt. Bei Zugabe von CaM und den CaM - Mutanten, außer CaM^{1234} , zu B1b ereignet sich um 20 nM Ca^{2+} eine deutliche Verschiebung des Emissionsmaximums in den blauen Bereich, beginnend bei etwa 6 nM Ca^{2+} für B1b + CaM (33 - 35 nm) und beginnend bei etwa 20 nM Ca^{2+} für B1b + CaM^{12} (35 nm) und B1b + CaM^{34} (28 - 30 nm). Bei Zugabe von CaM^{1234} zu B1b findet keine solche starke Verschiebung des Emissionsmaximums statt. Die Differenz der Wellenlängen der Positionen der Maxima ist hier konstant 4 - 6 nm.

Die Analyse der RFU ist in b dargestellt. Auch hier findet man in Anwesenheit vom Kontrollpeptid und CaM^{1234} keine Ca^{2+} -abhängige Änderung der relativen Fluoreszenzintensität im Vergleich zur B1b - Messung. Die Anwesenheit von CaM in der Reaktionsmischung mit B1b führt hingegen bei 20 nM Ca^{2+} zu einer sehr starken Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität von 1500 RFU. >100 nM Ca^{2+} ist dann ein Rückgang der Intensität um 400 RFU sichtbar. Die Zugabe der CaM - Mutanten CaM^{12} und CaM^{34} führt vergleichsweise zu einem geringen Anstieg der Fluoreszenzintensität von 60 - 80 RFU, außer bei 100 nM Ca^{2+} für die Mischung B1b + CaM^{12} . In diesem Fall wurde eine Zunahme der RFU von 270 RFU detektiert. Die EC_{50} (Ca^{2+}) für die Vergrößerung der Differenz der Positionen des Emissionsmaximums konnte nur für B1b + CaM, B1b + CaM^{12} und B1b + CaM^{34} ermittelt werden und beträgt auf zwei Nachkommastellen gerundet 11 (+/- 3) nM Ca^{2+} für B1b + CaM, 23 (+/- 6) nM Ca^{2+} für B1b + CaM^{12} und 29 (+/- 8) nM Ca^{2+} für B1b + CaM^{34} .

Zusammenfassung

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse bestätigen die CD - spektroskopischen Daten der Ca^{2+} -abhängigen B1b - Bindung an CaM und an die CaM - Mutanten CaM^{12} und CaM^{34} . Die Emissionseigenschaften des umgebungssensitiven Badans werden bei der Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch die Bindung und Konformationsänderung von CaM stark beeinflusst. Die RFU - Änderung bei der Bindung von B1b an CaM^{12} und CaM^{34} ist allerdings deutlich geringer als bei der Bindung an CaM, die Bindung an die Mutanten unterscheidet sich also von der an den Wildtyp. Die EC_{50} (Ca^{2+}) für B1b + CaM beträgt 11 (+/- 3) nM Ca^{2+} . Dagegen

waren die EC_{50} -Werte für die B1b-Bindung an CaM^{12} mit einer $EC_{50}(Ca^{2+}) = 23 (+/- 6)$ etwa doppelt so hoch und für die Bindung an CaM^{34} mit einer $EC_{50}(Ca^{2+}) = 29 (+/- 8)$ nM fast dreifach so hoch.

4.5 B1b^{LE} - Badan Bindung an CaM, CaM12, CaM34 und CaM1234

Einführung

Die Bindung von B1b^{LE} an CaM und die CaM-Mutanten wurde bereits CD-spektroskopisch analysiert. Diese Analyse ergab, daß B1b^{LE} wie B1b Ca^{2+} -abhängig mit CaM interagiert. Eine Bindung der CaM-Mutanten CaM^{12} und CaM^{34} an B1b^{LE} wurde nicht nachgewiesen. Die fluoreszenzspektroskopische Analyse der Interaktion von B1b^{LE} mit CaM sollte weitere Erkenntnisse über die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Bindeereignisses und Ca^{2+} -abhängige Änderungen der Fluorophorumgebung liefern. Darüber hinaus sollte wieder eine Dosis-Wirkungskurve in Abhängigkeit von $[Ca^{2+}]$ erstellt werden. Die Untersuchung der Emissionseigenschaften von B1b^{LE} in Anwesenheit von CaM^{12} , CaM^{34} und CaM^{1234} wurde ebenfalls zur Kontrolle analysiert. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 47 a - c dargestellt.

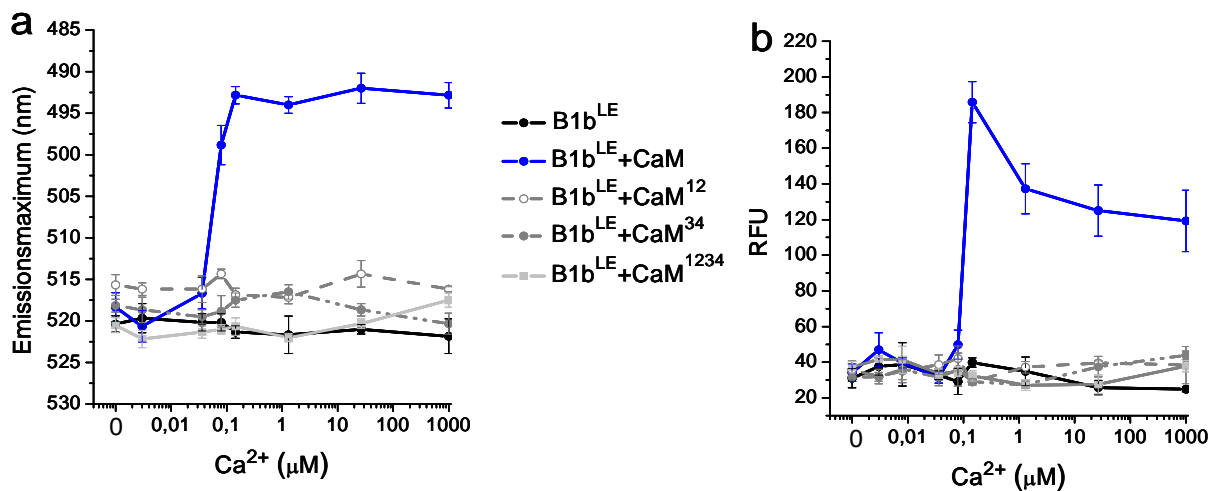


Abb. 47: Fluoreszenzspektroskopische Analyse ($n = 3$) der Interaktion von $1,5 \mu M$ B1b^{LE}-Badan (B1b^{LE}, schwarz) mit je $3,0 \mu M$ CaM (B1b^{LE} + CaM, violett), CaM^{12} (B1b^{LE} + CaM¹², grau, gestrichelt), CaM^{34} (B1b^{LE} + CaM³⁴, grau Strich – Punkt – Punkt), CaM^{1234} (B1b^{LE} + CaM¹²³⁴, hellgrau). Lage des Emissionsmaximums (a) und der relativen Fluoreszenzintensität (RFU, b) in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. (a) Eine Ca^{2+} -abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums wird nur bei B1b^{LE} + CaM beobachtet. Die Proben B1b^{LE} + CaM¹² und B1b^{LE} + CaM³⁴ zeigen eine von Ca^{2+} -unabhängige sehr geringe Verschiebung, B1b^{LE} + CaM¹²³⁴ zeigt außer gering bei 1 mM Ca^{2+} keine Änderung der Lage des Emissionsmaximums im Vergleich zu B1b^{LE}. (b) Eine Ca^{2+} -abhängige deutliche RFU-Erhöhung wird bei B1b^{LE} + CaM beobachtet. Bei allen anderen Proben wird keine RFU-Erhöhung detektiert. (c) Dosis-Wirkungsfunktion der unter a gezeigten B1b^{LE} + CaM Kurve; $EC_{50}(Ca^{2+}) = 56 (+/- 11)$ nM.

Messdaten

Die Änderung der Positionen der Emissionsmaxima von B1b^{LE}-Badan (schwarz, B1b^{LE}) bei Zugabe von CaM (blau, B1b^{LE}+CaM), CaM¹² (grau, gestrichelt, B1b^{LE}+CaM¹²), CaM³⁴ (grau, Strich - Punkt - Punkt, B1b^{LE}+CaM³⁴) und CaM¹²³⁴ (hellgrau, B1b^{LE}+CaM¹²³⁴) sind in a dargestellt. Die Kontrollmessung zur Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von B1b^{LE} bei Zugabe des A4 - Peptids erfolgte nur bei 0 und 1,3 μM Ca²⁺ und ergab keine signifikante Änderung der Emission im Vergleich zu B1b^{LE}-Badan alleine (nicht dargestellt). Der Vergleich der Positionen der Emissionsmaxima ergab ab 80 nM Ca²⁺ eine deutliche Verschiebung bei B1b^{LE}+CaM um 27 nm in den blauen Bereich. Bei Zugabe von CaM¹² und CaM³⁴ zu B1b^{LE} wurde keine Änderung beobachtet. Die Verschiebung der Maxima war konstant 2 - 6nm. Mit Ausnahme der Messung bei 1 mM Ca²⁺ wurde für B1b^{LE}+CaM¹²³⁴ keine Änderung des Emissionsmaximums im Vergleich zur B1b^{LE}-Analyse nachgewiesen.

Die Änderungen der Fluoreszenzintensität sind in b dargestellt. Für B1b^{LE} konnte in Anwesenheit der CaM - Mutanten keine Änderung der RFU nachgewiesen werden. B1b^{LE}+CaM hingegen, zeigt analog der Analyse von B1b+CaM einen steilen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei einer Ca²⁺-Konzentration von 100 nM. Die Intensitäts - Steigerung um 180 RFU ist für B1b^{LE}+CaM wesentlich geringer als für B1b+CaM. >200 nM Ca²⁺ bis 1 mM fällt die Intensität um etwa 80 RFU wieder ab. Für die Verschiebung des Emissionsmaximums konnte für B1b^{LE}+CaM die EC₅₀ (Ca²⁺) ermittelt werden (Abb. 47 c) und beträgt auf zwei Nachkommastellen gerundet 56 (+/- 11) nM Ca²⁺.

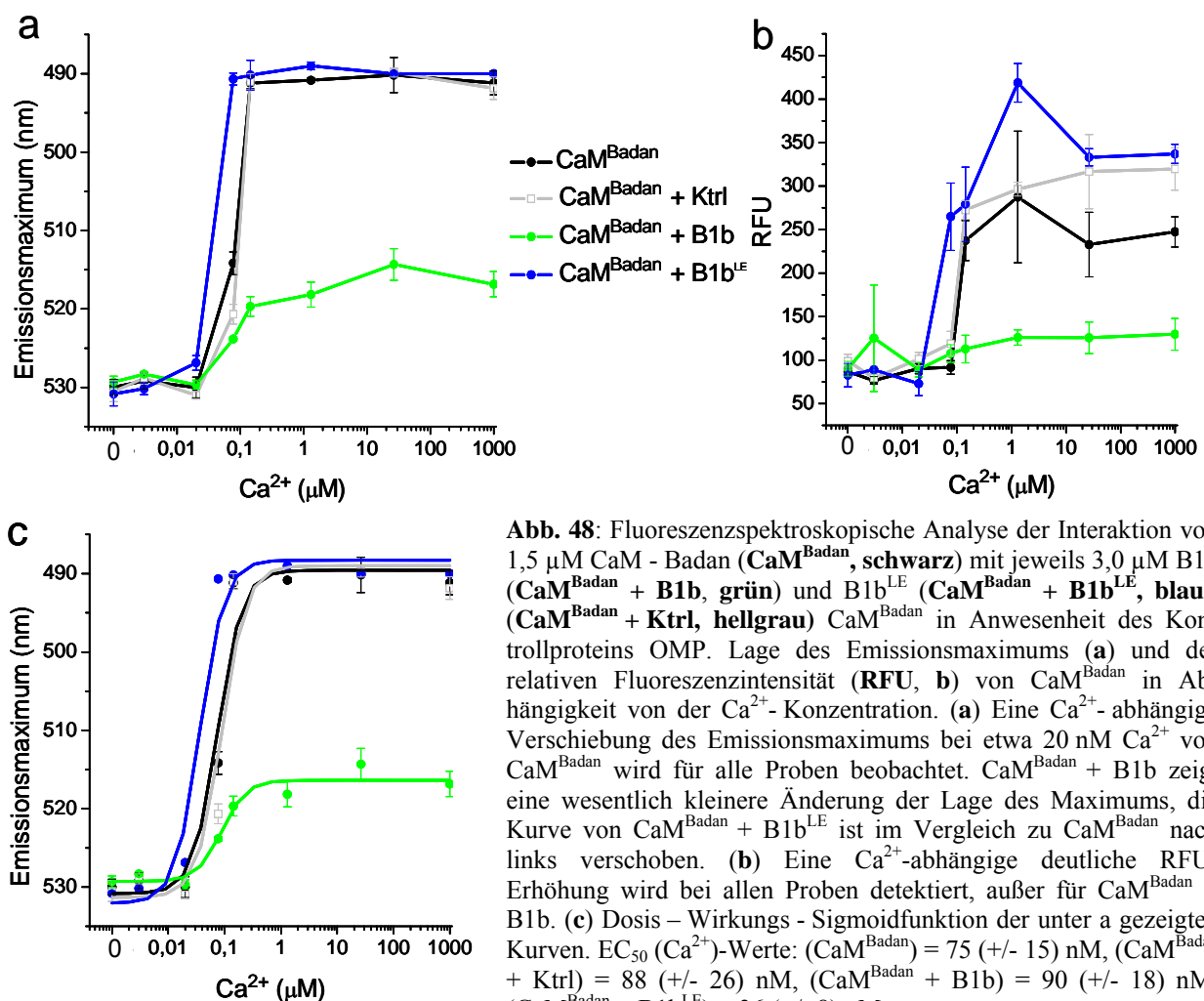
Zusammenfassung

Die B1b^{LE}- Mutante bindet wie B1b Ca²⁺- abhängig an CaM und das bestätigt das Ergebnis der CD - Spektroskopie. Damit wurde bereits gezeigt, daß das LQ - Motiv von B1b nicht wie angenommen (Bradley et al., 2004) verantwortlich für die CaM - Bindung ist. Der Unterschied liegt vielmehr in der Ca²⁺- Abhängigkeit der Bindung. Während B1b auch an teilligandiertes CaM binden kann bindet B1b^{LE} nur an vollligandiertes CaM und daher nicht an CaM¹² und CaM³⁴. Für die Ca²⁺- abhängige Änderung der Fluorophorumgebung wurde für B1b^{LE} ein EC₅₀ (Ca²⁺) Wert von 56 (+/- 11) nM gefunden. Die Peptidbindung beziehungsweise Ca²⁺- abhängige Konformationsänderung des CaMs ereignete sich also in der Gegenwart der B1b^{LE} Mutante bei einer höheren Ca²⁺-Konzentration als in Gegenwart des B1b Wildtyps.

4.6 CaM^{Badan} Bindung an B1b und B1b^{LE}

Einführung

In diesem Experiment wurde der Fluoreszenzreporter Badan wiederum an CaM (CaM^{Badan}) gekoppelt. Badan diente auch hier der Analyse der Änderung der Ca²⁺-abhängigen Konformationsänderung von CaM. Durch dieses Experiment können Rückschlüsse eine veränderte Ca²⁺-Affinität des CaMs bei Peptidbindung gezogen werden. Wieder sollten außerdem Dosis - Wirkungskurven in Abhängigkeit von [Ca²⁺] erstellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 a - c dargestellt.



Messdaten

Die Beschreibung der Analysen der Fluoreszenzeigenschaften von CaM^{Badan} (schwarz) und CaM^{Badan} + Ktrl (hellgrau) in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration wurde bereits bei der Analyse der CaM^{Badan}-Bindung an die Peptide A4 und A4^{LE} vorgenommen. In Abbildung 48 a dargestellt ist die Untersuchung der Emissionsmaxima von CaM^{Badan} in Anwesenheit der

Peptide B1b (grün) beziehungsweise B1b^{LE} (blau). Wie die CaM^{Badan}-Probe zeigt auch CaM^{Badan} + B1b ab einer Ca²⁺-Konzentration von 20 nM eine Verschiebung des Spektrums in den blauen Bereich, die jedoch deutlich kleiner (10-12 nm) ausfällt, als für CaM^{Badan} alleine (40 nm). Die Verschiebung der Emissionsmaxima von CaM^{Badan} in Anwesenheit von B1b^{LE} dagegen entspricht der, wie sie auch für CaM^{Badan} gefunden wurde. Die Kurve zeigt jedoch wie die Analyse des Emissionsspektrums von CaM^{Badan} + A4^{LE} eine leichte Verschiebung nach links zu niedrigeren Ca²⁺-Konzentrationen hin.

Die Untersuchung der Fluoreszenzintensität ergab eine signifikante Änderung der RFU ab 100 nM Ca²⁺ von CaM^{Badan} + B1b im Vergleich zu den Messungen von CaM^{Badan} alleine. Es finden sich bei dieser Probe jedoch keine Ca²⁺-abhängigen Änderungen der Fluoreszenzintensität und die Werte der RFU pendeln um 70 - 125 relative Fluoreszenzeinheiten. In Anwesenheit von B1b^{LE} im Reaktionsgemisch wurde eine geringfügige Änderung der RFU im Vergleich zur CaM^{Badan}-Messung detektiert und die Kurve ist leicht nach links verschoben. Die RFU der CaM^{Badan} + B1b^{LE} Probe steigt außerdem bis zu einer Ca²⁺-Konzentration von 1 μ M um 320 RFU stetig an. In Abbildung 48 c sind die Dosis-Wirkungsfunktionen zur Analyse der EC₅₀ (Ca²⁺) für die Graphen in a dargestellt. Die EC₅₀ (Ca²⁺)-Werte betragen für CaM^{Badan} 75 (+/- 15) nM, für CaM^{Badan} + Ktrl 88 (+/- 26) nM, für CaM^{Badan} + B1b 90 (+/- 18) nM und für CaM^{Badan} + B1b^{LE} 36 (+/- 8) nM Ca²⁺.

Zusammenfassung

Auch bei diesem Experiment wurde die zuvor bereits CD- und fluoreszenzspektroskopisch ermittelte Ca²⁺-abhängige Bindung der Peptide B1b und B1b^{LE} bestätigt. Die Ca²⁺-Abhängigkeit erkennt man daran, daß bei 0 Ca²⁺ noch kein Einfluß dieser Peptide auf die Konformation des CaM^{Badan} zu erkennen ist. Die Analyse bestätigt außerdem erneut, daß der L (Leucin) \rightarrow E (Glutaminsäure) Austausch im LQ-Bindemotiv die Bindung an CaM^{Badan} nicht verhindert. Auffällig ist der deutliche Einfluß der Bindung von B1b auf die Fluoreszenzeigenschaften von CaM^{Badan}. Eine Ca²⁺-Sättigung des CaMs, erkennbar an der maximalen Verschiebung des Emissionsmaximums, tritt bei Bindung von B1b^{LE} mit einer EC₅₀ (Ca²⁺) von 36 (+/- 8) nM Ca²⁺ bei einer deutlich niedrigeren Ca²⁺-Konzentration ein, als dies in Abwesenheit dieses Peptids (EC₅₀ (Ca²⁺) von 75 (+/- 15) nM) beobachtet wurde. Somit steigert die B1b^{LE}-Bindung, wie auch die A4^{LE}-Bindung die Ca²⁺-Affinität des CaMs. Erstaunlicherweise bleibt im Gegensatz dazu die Ca²⁺-Affinität von CaM^{Badan} bei B1b-Bindung mit einer EC₅₀ (Ca²⁺) von 90 (+/- 18) nM gleich.

4.7 CaM^{Badan} Bindung an A4I und B1bI

Einführung

Auch die Interaktion von A4I und B1bI mit CaM und den CaM - Mutanten wurde bereits CD - spektroskopisch untersucht. Beide Peptide binden Ca²⁺-abhängig an CaM und B1bI interagiert im Gegensatz zu A4I auch mit teilligandiertem CaM. Die heterolog exprimierten CNG - Peptide wurden nicht an Badan gekoppelt, da das B1bI Peptid drei Cysteine enthält und somit für die Kopplung nicht geeignet ist. Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der B1bI und A4I - Bindung an CaM wurden deshalb ausschließlich mit CaM^{Badan} als Reporterprotein durchgeführt. Die Analyse der Einflüsse der CNG - Peptide auf die Konformationsänderung von CaM^{Badan} bei Ca²⁺-Aufnahme sollte weitere Rückschlüsse auf die Ca²⁺-Abhängigkeit der Bindungsereignisse zulassen. Hierfür sollten wieder Dosis-Wirkungskurven für [Ca²⁺] erstellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 a - c dargestellt. Die Beschreibung der Emissionseigenschaften von CaM^{Badan} (schwarz) und CaM^{Badan} + Ktrl (hellgrau) in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration wurde bereits in vorherigen Analysen vorgenommen.

Messdaten

Die Analyse der Lage der Emissionsmaxima von CaM^{Badan} + A4I (orange) und CaM^{Badan} + B1bI (dunkelgrün) in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration (Abb. 49) im Vergleich zu CaM^{Badan} (schwarz) und CaM^{Badan} + Ktrl (hellgrau) ist in a dargestellt. Die Verschiebung des Emissionsmaximums von CaM^{Badan} um 40 nm in den blauen Bereich des Spektrums bei Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration in Anwesenheit der Peptide A4I und B1bI entspricht der von CaM^{Badan} alleine. Die Analysen der CaM^{Badan} + A4I und CaM^{Badan} + B1bI Messungen zeigen jedoch eine unterschiedliche Ca²⁺- Abhängigkeit der Änderung der Lage der Emissionsmaxima. Im Fall von CaM^{Badan} ereignet sich die Verschiebung des Maximums bei einer Konzentration zwischen 20 und 100 nM Ca²⁺, in Anwesenheit von A4I zwischen 200 nM und 1 µM Ca²⁺ und bei Zugabe von B1bI bei etwa geringerer Ca²⁺-Konzentration. Der Vergleich der RFU - Änderungen (Abb. 45b) bestätigt diese Daten. Für alle drei Proben, CaM^{Badan}, CaM^{Badan} + A4I und CaM^{Badan} + B1bI wurde ein Anstieg der Fluoreszenzintensität um etwa 200 RFU gemessen, der aber mit A4I bei etwa 10 fach höherer und mit B1bI bei etwas geringerer Ca²⁺-Konzentration detektiert wurde. Für die Kurven in Abbildung 46 a konnten die Dosis - Wirkungsfunktionen (Abb. 45 c) zur Analyse der EC₅₀ (Ca²⁺)-Werte ermittelt werden und betragen für CaM^{Badan} 75 (+/- 15) nM, für CaM^{Badan} + Ktrl 88 (+/- 26) nM, für CaM^{Badan} + B1bI 39 (+/- 12) nM und für CaM^{Badan} + A4I 470 (+/- 18) nM Ca²⁺.

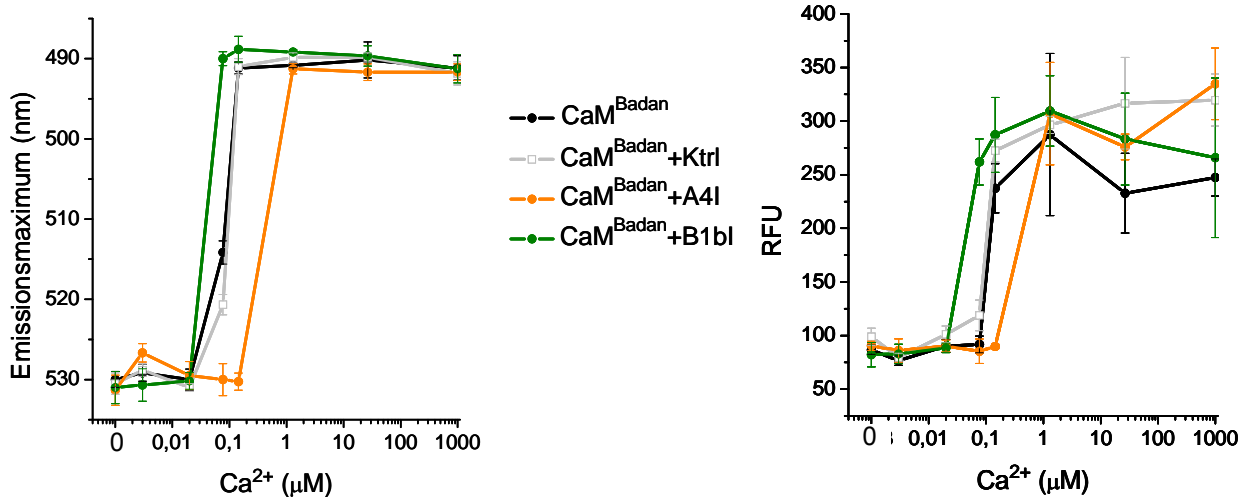


Abb. 49: Fluoreszenzspektroskopische Analyse ($n = 3$) der Interaktion von $1,5 \mu\text{M}$ CaM - Badan ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$, **schwarz**) mit jeweils $3,0 \mu\text{M}$ B1bI ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1bI}$, **dunkelgrün**) und A4I ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I}$, **orange**). ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$, **hellgrau**) CaM^{Badan} in Anwesenheit des Kontrollproteins OMP. Lage des Emissionsmaximums (**a**) und der relativen Fluoreszenzintensität (**RFU**, **b**) von CaM^{Badan} in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration. (**a**) Eine Ca²⁺-abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums bei etwa 20 nM Ca²⁺ von CaM^{Badan} wird für alle Proben beobachtet. Die Kurve von CaM^{Badan} + B1bI ist im Vergleich zur Kurve des CaM^{Badan} nach links verschoben, die von CaM^{Badan} + A4I ist rechtsverschoben. (**b**) Eine Ca²⁺-abhängige nicht von CaM^{Badan} verschiedene RFU - Erhöhung wird bei allen Proben detektiert. Die Kurven sind entsprechend der Analysen der Emissionsmaxima in a verschoben. (**c**) Dosis - Wirkungsfunktion der unter a gezeigten Kurven. EC_{50} (Ca²⁺)-Werte: ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$) = $75 (+/- 15) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$) = $88 (+/- 26) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1bI}$) = $39 (+/- 12) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I}$) = $470 (+/- 18) \text{ nM}$.

Zusammenfassung

Das Experiment bestätigt die zuvor CD - und fluoreszenzspektroskopisch ermittelte Ca²⁺-abhängige Bindung der Peptide B1bI und A4I an CaM. Bei 0 Ca^{2+} konnte noch kein Einfluß dieser Peptide auf die Konformation von CaM^{Badan} detektiert werden. Die Anwesenheit von B1bI im Reaktionsansatz bewirkt eine bei geringeren Ca²⁺-Konzentrationen auftretende Ca²⁺-Sättigung von CaM. Die EC_{50} (Ca²⁺) liegt für CaM^{Badan} + B1bI mit $39 (+/- 12) \text{ nM}$ Ca²⁺ deutlich niedriger als für CaM^{Badan} ($\text{EC}_{50} (\text{Ca}^{2+}) = 75 (+/- 15) \text{ nM}$). Dagegen erhöht die Bindung von A4I die Ca²⁺-Konzentration bei der die Ca²⁺-Sättigung des CaM eintritt dramatisch. Der EC_{50} (Ca²⁺)-Wert liegt für CaM^{Badan} + A4I mit $470 (+/- 12) \text{ nM}$ Ca²⁺ deutlich höher als für CaM^{Badan}. B1bI beeinflusst die Ca²⁺-abhängige Konformationsänderung des CaMs bei wesentlich niedrigeren Ca²⁺-Konzentrationen (um 20 nM), als dies für die A4I Bindung gezeigt werden konnte, bei der im Vergleich zu CaM^{Badan} alleine erst ab 100 nM

Ca^{2+} ein solcher Einfluß auf die Konformation detektiert wurde. Die Bindung von B1b an CaM erfolgt demnach bei 5-10 fach niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen als die von A4I.

4.8 CaM^{F20W} und CaM^{F93W} Bindung an A4^{-W} und B1b

Fluoreszenzspektroskopisch wurde auch die Bindung der Peptide A4^{-W} und B1b an die CaM-Mutanten CaM^{F20W} und CaM^{F93W} untersucht. Mit dieser Methode sollte die Änderung der Konformation des C- und N-Terminus von Calmodulin bei Ca^{2+} -Aufnahme analysiert werden (siehe z.B. Black et al., 2005). Die Bindung von Peptiden kann die Ca^{2+} -Affinität der Bindestellen verändern. Für das Experiment wurde in CaM^{F20W} die Aminosäure Phenylalanin (F) an der Position 20 und in CaM^{F93W} entsprechend die Aminosäure Phenylalanin (F) an der Position 93 durch Tryptophan (W) ersetzt. Die Tryptophane dienen als Reporter für die Konformationsänderung der Termini bei Ca^{2+} -Bindung. Für dieses Experiment musste ausserdem das C-terminal der LQ-Bindestelle gelegene Tryptophan (W) des A4-Wildtyppeptids durch Alanin (A) ausgetauscht werden. Im ersten Experiment wurde deshalb fluoreszenzspektroskopisch die Bindung dieser Mutante an CaM^{Badan} untersucht und das Ergebnis mit der Analyse der Bindung von CaM^{Badan} an A4 und A4^{LE} verglichen. Im nächsten Schritt wurden die Positionen der Emissionsmaxima und die Intensitäten der Tryptophan-Fluoreszenz der CaM-Mutanten bei Ca^{2+} -Bindung detektiert. Im Anschluß wurden die Experimente in Anwesenheit von A4^{-W} oder B1b wiederholt.

4.8.1 CaM^{Badan} Bindung an A4^{-W}

Einführung

Durch die fluoreszenzspektroskopische Analyse der CaM^{Badan} Bindung an A4^{-W} sollte überprüft werden, ob sich die Bindungseigenschaften dieser Tryptophan-Mutante von der des Wildtyp-Peptids A4 unterscheiden. In Abbildung 50 a - c ist das Ergebnis dieser Untersuchung im Vergleich zu den Analysen der A4 und A4^{LE}-Bindung an CaM^{Badan} dargestellt.

Messung

Die Untersuchungen zur Lage der Emissionsmaxima und der Fluoreszenzintensität von CaM^{Badan} (schwarz), CaM^{Badan} + Ktrl (hellgrau), CaM^{Badan} + A4 (rot) und CaM^{Badan} + A4^{LE} (violett) sind zum Vergleich erneut dargestellt. In Abbildung 50 a ist die Analyse der

Emissionsmaxima. Die $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{W}}$ -Probe (helltürkis) zeigt wie die $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ - Probe ab einer Ca^{2+} -Konzentration von 20 nM eine Verschiebung des Spektrums in den blauen Bereich (40 nm). Das Ergebnis entspricht in etwa dem, wie es für das Emissionsspektrum von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{LE}}$ gefunden wurde, man beobachtet ebenso eine leichte Verschiebung der Kurve nach links zu niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen hin.

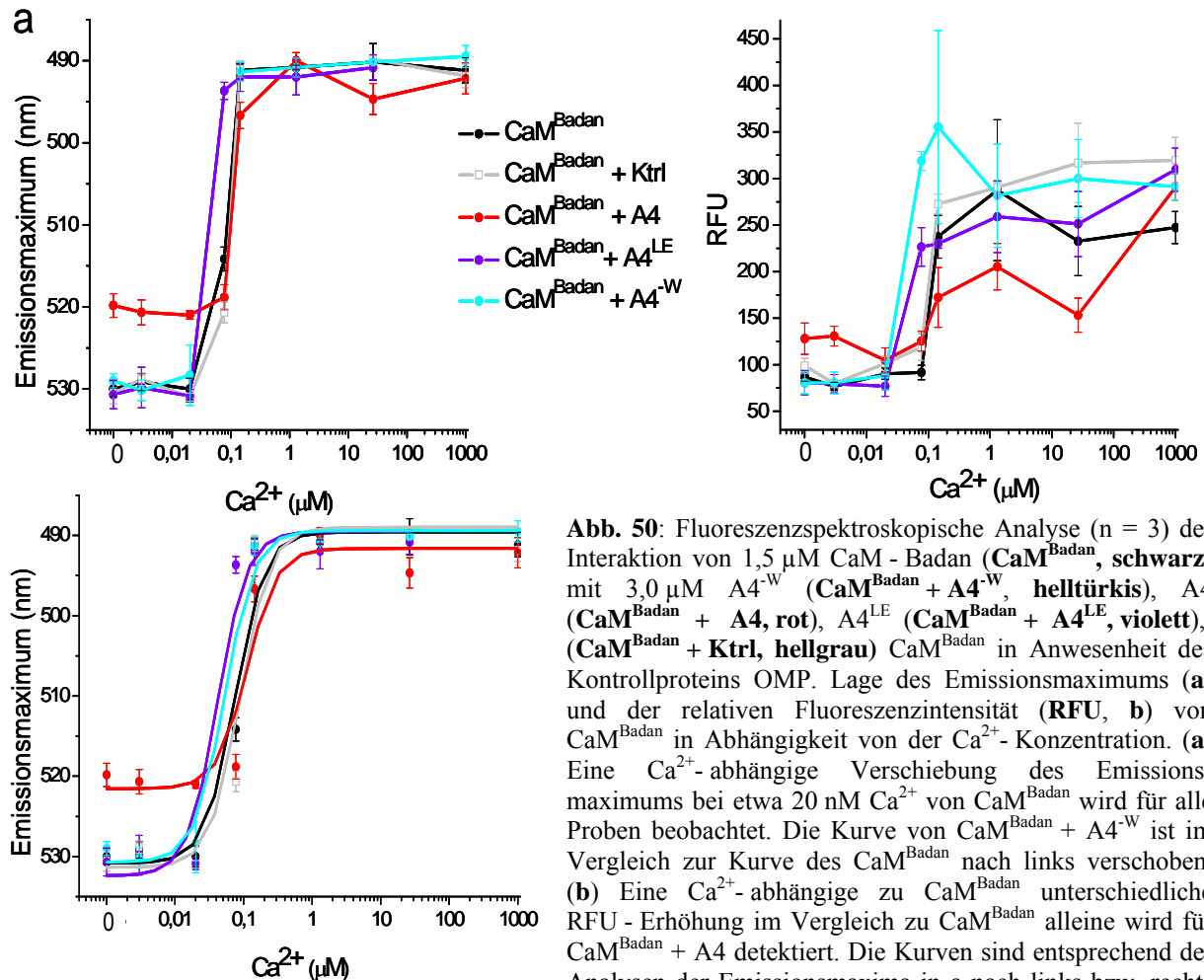


Abb. 50: Fluoreszenzspektroskopische Analyse ($n = 3$) der Interaktion von $1,5 \mu\text{M}$ $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$, schwarz) mit $3,0 \mu\text{M}$ A4^{W} ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{W}}$, helltürkis), A4 ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$, rot), A4^{LE} ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{LE}}$, violett), ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$, hellgrau) $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Anwesenheit des Kontrollproteins OMP. Lage des Emissionsmaximums (a) und der relativen Fluoreszenzintensität (RFU, b) von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. (a) Eine Ca^{2+} -abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums bei etwa 20 nM Ca^{2+} von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ wird für alle Proben beobachtet. Die Kurve von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{W}}$ ist im Vergleich zur Kurve des $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ nach links verschoben. (b) Eine Ca^{2+} -abhängige zu $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ unterschiedliche RFU-Erhöhung im Vergleich zu $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ alleine wird für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$ detektiert. Die Kurven sind entsprechend der Analysen der Emissionsmaxima in a nach links bzw. rechts verschoben. (c) Dosis - Wirkungs - Sigmoidfunktion der unter a gezeigten Kurven. EC_{50} (Ca^{2+}) - Werte: ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$) = $75 (+/- 15)$ nM, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$) = $88 (+/- 26)$ nM, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$) = $112 (+/- 32)$ nM, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{LE}}$) = $41 (+/- 12)$ nM, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{W}}$) = $52 (+/- 12)$ nM.

Bei der Untersuchung der Fluoreszenzintensität von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{W}}$ (Abb. 50 b) wurde kein Unterschied der Änderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ detektiert. Die RFU - Werte von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ liegen im Bereich der Fehlerbalken von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}^{\text{W}}$. Die RFU-Steigerung entspricht der von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ und ist von einem steilen Anstieg um 250 RFU bei 100 nM Ca^{2+} gekennzeichnet. Die Kurve ist aber, wie bei der Analyse der Emissionsmaxima, nach links verschoben. In Abbildung 50 c sind die Dosis - Wirkungsfunktionen zur Analyse der EC_{50} (Ca^{2+}) für die Graphen in a dargestellt. Der EC_{50}

(Ca²⁺) - Wert der Analyse der Emissionsmaxima in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration beträgt für CaM^{Badan} 75 (+/- 15) nM, für CaM^{Badan} + Ktrl 88 (+/- 26) nM, für CaM^{Badan} + A4 112 (+/- 32) nM, für CaM^{Badan} + A4^{LE} 41 (+/- 11) nM Ca²⁺ und für CaM^{Badan} + A4^W 52 (+/- 12) nM.

Zusammenfassung

Durch die Analyse der Bindung von A4^W an CaM^{Badan} wurde überprüft, ob sich dieses Peptid bei der Bindung an CaM wie das Wildtyppeptid A4 verhält. Die Ergebnisse zeigen, daß die Bindeeigenschaften dieser Tryptophanmutante von denen des Wildtyps abweichen und dieses Peptid ähnlich der A4^{LE}- Mutante mit CaM^{Badan} interagiert. Der EC₅₀ (Ca²⁺) - Wert beträgt 52 (+/- 12) nM und ist somit vergleichbar mit dem von CaM^{Badan} + A4^{LE} (41 (+/- 11) nM Ca²⁺). Im Gegensatz zur A4- Bindung konnte bei 0 Ca²⁺ auch keine A4^W- Bindung an CaM detektiert werden.

4.8.2 CaM^{F20W} Bindung an B1b und A4^W

Einführung

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Interaktion von A4^W mit CaM^{Badan} hat gezeigt, dass die A4^W- Mutante nicht wie A4 an CaM bindet. Da die gefundenen Resultate aber denen der Bindung von A4^{LE} an CaM^{Badan} gleichen, wurde diese Mutante für die Interaktionsstudie mit CaM^{F20W} verwendet. Diese Analyse und entsprechend die Untersuchung der B1b Interaktion mit CaM^{F20W} sollte Erkenntnisse über den Einfluß den kurze Peptide auf die N - terminale Ca²⁺ - Bindetselle ausüben, liefern. Darüber hinaus sollten wieder Dosis - Wirkungskurven in Abhängigkeit von [Ca²⁺] erstellt werden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 51 a - d dargestellt.

Messdaten

Die Analyse der Verschiebung der Emissionsmaxima bei der Ca²⁺-Aufnahme von CaM^{F20W} (schwarz) im Vergleich zu den Proben CaM^{F20W} + A4^W (helltürkis) und CaM^{F20W} + B1b (grün) ist in Abb. 51 a dargestellt. Für CaM^{F20W} alleine beobachtet man eine Verschiebung des Emissionsmaximums um 6 nm zwischen 50 und 700 nM Ca²⁺ in den blauen Bereich. Bei der Zugabe von A4^W und B1b detektiert man eine etwas größere Verschiebung des Maximums und die Kurve ist deutlich nach links verschoben. Darüber hinaus liegt für die CaM^{F20W} + B1b - Probe das Maximum im Vergleich zur CaM^{F20W} Probe bereits bei 20 nM Ca²⁺ leicht in den blauen Bereich verschoben vor. Die EC₅₀ (Ca²⁺) - Werte der Dosis-

Wirkungsfunktionen für die Graphen in a (Abb. 51 b) beträgt für CaM^{F20W} 198 (+/- 24) nM, für $\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{A4}^{-\text{W}}$ 91 (+/- 19) nM und für $\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{B1b}$ 83 (+/- 42) nM.

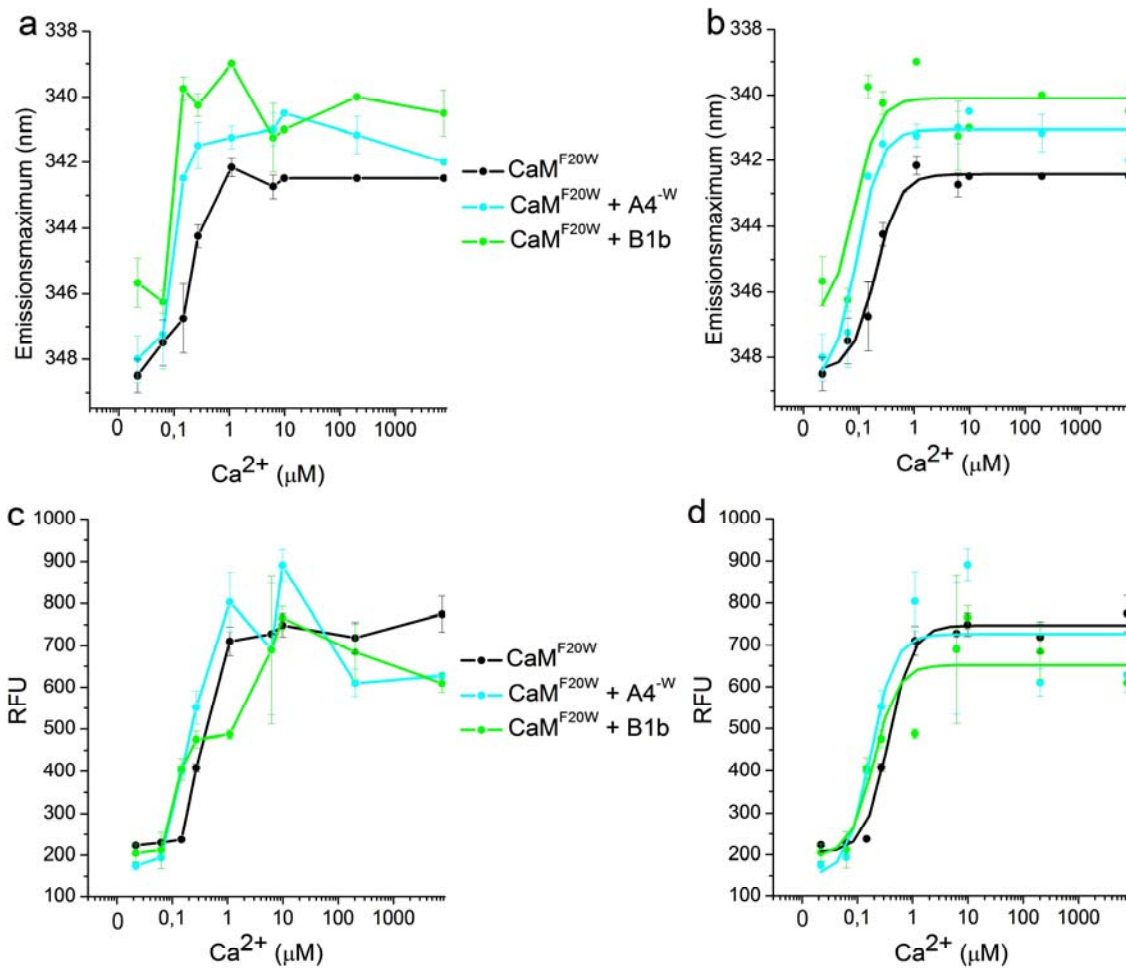


Abb. 51: Fluoreszenzspektroskopische Analyse der CaM^{F20W} Bindung an $\text{A4}^{-\text{W}}$ und B1b ($n = 3$). Proteinmenge jeweils 8 μM CaM^{F20W} , 16 μM $\text{A4}^{-\text{W}}$, 16 μM B1b. (**schwarz**) CaM^{F20W} , (**helltürkis**) $\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{A4}^{-\text{W}}$, (**grün**) $\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{B1b}$. Gemessen wurde die Ca^{2+} -abhängige Änderung der Tryptophanfluoreszenz von CaM^{F20W} . (**a**, **b**) Ca^{2+} -abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums von CaM^{F20W} um 6 nm in den blauen Bereich des Spektrums. Die Zugabe von $\text{A4}^{-\text{W}}$ und B1b bewirkt bei > 50 nM Ca^{2+} eine im Vergleich zu $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ stärkere Verschiebung des Maximums um 8 nm, Kurven deutlich nach links verschoben. EC_{50} (Ca^{2+})-Werte: (CaM^{F20W}) 198 (+/- 24) nM, ($\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{A4}^{-\text{W}}$) 91 (+/- 19) nM, ($\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{B1b}$) 83 (+/- 42) nM. (**c**, **d**) Ca^{2+} -abhängige Änderung der Fluoreszenzintensität am Maximum. (CaM^{F20W}) Bei Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration wird zwischen 100 nM und 1 μM Ca^{2+} eine starke Zunahme der Fluoreszenz beobachtet. In Anwesenheit von B1b (**grün**) ist die RFU-Zunahme mit 450 RFU kleiner als für CaM^{F20W} und $\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{A4}^{-\text{W}}$, bei denen eine Steigerung von 550 RFU beobachtet wird. EC_{50} (Ca^{2+})-Werte: (CaM^{F20W}) 369 (+/- 44) nM, ($\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{A4}^{-\text{W}}$) 172 (+/- 60) nM, ($\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{B1b}$) 197 (+/- 73) nM.

Die Untersuchungen zur Änderung der Fluoreszenzintensitäten von CaM^{F20W} bei Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (c) ergaben für alle Proben bei > 70 nM Ca^{2+} eine Steigerung der RFU um etwa 700. In Anwesenheit von B1b (grün) ist die Zunahme der Fluoreszenz mit 450 RFU kleiner als für CaM^{F20W} (schwarz) und $\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{A4}^{-\text{W}}$ (helltürkis), bei denen eine Steigerung von 550 RFU beobachtet wird. Die EC_{50} (Ca^{2+})-Werte für die Graphen in c

dargestellt in Abb. 51 d betragen: (CaM^{F20W}) 369 (+/- 44) nM, (CaM^{F20W} + A4^{-W}) 172 (+/- 60) nM und (CaM^{F20W} + B1b) 197 (+/- 73) nM.

Zusammenfassung

Die fluoreszenzspektroskopische Analyse der A4^{-W}- und B1b Interaktion mit CaM^{F20W} konnte zeigen, dass die Peptide beide einen Einfluss auf die N - terminale Ca²⁺-Bindestelle des CaM ausüben. Erkennbar ist dies daran, dass in Anwesenheit der Peptide die Ca²⁺-abhängige Änderung der Tryptophanemission von CaM^{F20W} verändert ist. Die EC₅₀ (Ca²⁺)-Werte für die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften sind bei Bindung beider Peptide nur etwa halb so hoch, wie für CaM^{F20W} alleine, was auf etwa eine 2 fache Erhöhung der Ca²⁺-Affinität schließen läßt.

4.8.3 CaM^{F93W} Bindung an B1b und A4^{-W}

Einführung

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Interaktion von A4^{-W} und B1b mit CaM^{F20W} hat gezeigt, dass beide Peptide einen Einfluss auf die N - terminale Ca²⁺-Bindestelle von CaM ausüben. Im nächsten Schritt sollte nun das gleiche Experiment unter Verwendung der CaM - Mutante CaM^{F93W} durchgeführt werden. In dieser Mutante dient das Tryptophan entsprechend in der C - terminalen CaM - Domäne als Fluoreszenzreporter für die Ca²⁺- und Peptidbindung. Auch hier sollten wieder Dosis - Wirkungskurven in Abhängigkeit von [Ca²⁺] erstellt werden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 52 a - d dargestellt.

Messdaten

Die Analyse der Verschiebung der Emissionsmaxima bei der Ca²⁺- Aufnahme von CaM^{F93W} (schwarz) im Vergleich zu den Proben CaM^{F93W} + A4^{-W} (helltürkis) und CaM^{F93W} + B1b (grün) ist in Abb. 52 a dargestellt. Alle Proben zeigen eine deutliche Verschiebung des Emissionsmaximums in den blauen Bereich, die für CaM^{F93W} mit 7 nm etwas kleiner als für CaM^{F93W} + B1b ausfällt, bei der eine Verschiebung von 10 nm beobachtet wurde. Die Positionen der Maxima von CaM^{F93W} + A4^{-W} entsprechen denen von CaM^{F93W}, so daß hier kein Einfluß dieses Peptids auf die C - terminale Domäne des CaMs detektiert werden konnte. Die Kurve der CaM^{F93W} + B1b Probe ist deutlich nach links verschoben. Der EC₅₀ (Ca²⁺) - Wert der Dosis - Wirkungs - Sigmoidfunktionen für die Graphen in a (Abb. 52 b) beträgt für CaM^{F93W} 93 (+/- 25) nM, für CaM^{F93W} + A4^{-W} 93 (+/-30) nM und für CaM^{F93W} + B1b 11 (+/- 12) nM.

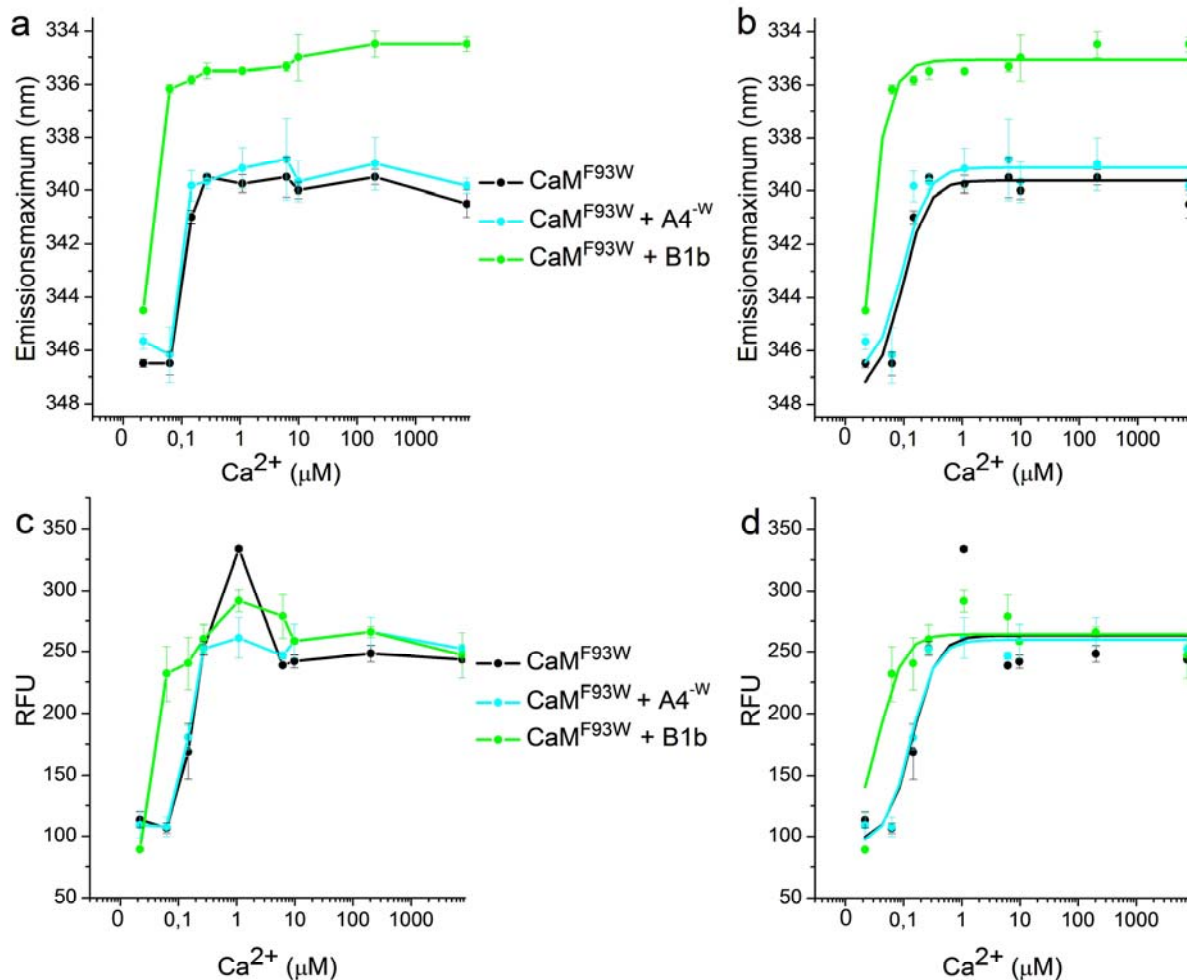


Abb. 52: Fluoreszenzspektroskopische Analyse der CaM^{F93W} Bindung an A4^{W} und B1b ($n=3$). Proteinmenge jeweils $8 \mu\text{M}$ CaM^{F93W} , $16 \mu\text{M}$ A4^{W} , $16 \mu\text{M}$ B1b. (**schwarz**) CaM^{F93W} , (**helltürkis**) $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{A4}^{\text{W}}$, (**grün**) $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{B1b}$. Gemessen wurde die Ca^{2+} -abhängige Änderung der Tryptophanfluoreszenz von CaM^{F93W} . (a) Alle Proben zeigen eine signifikante Verschiebung des Emissionsmaximums in den blauen Bereich. Für CaM^{F93W} beträgt diese 7 nm , für $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{B1b}$ 10 nm . Die Positionen der Maxima von $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{A4}^{\text{W}}$ entsprechen denen von CaM^{F93W} . Die Kurve von $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{B1b}$ ist im Vergleich nach links verschoben. (b) Dosis - Wirkungsfunktion der Ca^{2+} -abhängigen Verschiebung des Emissionsmaximums; EC_{50} (Ca^{2+}) - Werte: (CaM^{F93W}) $93 (\pm 25) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{A4}^{\text{W}}$) $93 (\pm 30) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{B1b}$) $11 (\pm 12) \text{ nM}$. (c) Ca^{2+} -abhängige Änderung der Fluoreszenzintensität von CaM^{F93W} . Für alle Proben CaM^{F93W} (schwarz), $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{A4}^{\text{W}}$ (helltürkis) und $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{B1b}$ (grün) wurde eine Steigerung um 150 RFU detektiert. Die Kurve von $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{B1b}$ ist links verschoben. (d) Die EC_{50} (Ca^{2+})-Werte für die Graphen in b dargestellt betragen: (CaM^{F93W}) $141 (\pm 65) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{A4}^{\text{W}}$) $131 (\pm 24) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{B1b}$) $37 (\pm 31) \text{ nM}$.

Die Untersuchungen zur Änderung der Fluoreszenzintensitäten von CaM^{F93W} bei Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (c) ergab für die Proben CaM^{F93W} (schwarz) und $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{A4}^{\text{W}}$ (helltürkis) eine identische Steigerung um 150 RFU , die auch bei $\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{B1b}$ (grün) detektiert wurde, jedoch ist die Kurve dieser Proben deutlich zu niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen hin verschoben. Die EC_{50} (Ca^{2+}) - Werte für die Graphen in c (Abb. 52 d) dargestellt betragen: (CaM^{F93W}) $141 (\pm 65) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{F93W}} + \text{A4}^{\text{W}}$) $131 (\pm 24) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{F20W}} + \text{B1b}$) $37 (\pm 31) \text{ nM}$.

Zusammenfassung

Die fluoreszenzspektroskopische Analyse der A4^W- und B1b - Interaktion mit CaM^{F93W} hat gezeigt, dass nur B1b einen starken Einfluss auf die C - terminale Ca²⁺-Bindestelle des CaM ausübt. In Anwesenheit von B1b im Reaktionsgemisch ist die Ca²⁺- abhängige Änderung der Tryptophanemission im Vergleich zu CaM^{F93W} alleine deutlich verändert. Die EC₅₀ (Ca²⁺) - Werte für die Änderung der Tryptophanemission bei Anwesenheit von B1b liegen, sowohl was die RFU betrifft als auch die Lage der Emissionsmaxima, deutlich niedriger als für CaM^{F93W}.

4.9 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den fluoreszenzspektroskopischen Experimenten die Ergebnisse der CD - Spektroskopie bestätigt werden konnten. Die CNG - Peptide binden alle an CaM. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß auch die A4^{LE}- Mutante mit CaM wechselwirkt und daß A4 mit den CaM - Mutanten CaM¹² und CaM³⁴ interagiert. Wie bereits CD - spektroskopisch für B1b^{LE} gezeigt, verhindert der L (Leucin) → E (Glutaminsäure) Austausch im LQ - Bindemotiv nicht, wie angenommen (siehe z.B. Bradley et al., 2004), die Bindung an CaM. Dies wurde fluoreszenzspektroskopisch auch für A4^{LE} bestätigt.

Deutliche Unterschiede wurde für die Ca²⁺- Abhängigkeit der Bindungsereignisse detektiert. In den Versuchen bei denen der Fluoreszenzreporter Badan an CaM gekoppelt war, waren die EC₅₀ (Ca²⁺) - Werte für die Ca²⁺-abhängige Konformationsänderung des CaMs in Anwesenheit der Peptide A4^{LE} und B1b^{LE} und B1bI kleiner als für CaM^{Badan} alleine. Im Gegensatz dazu waren diese in Anwesenheit von A4 erhöht und bei Zugabe von A4I im Vergleich sogar dramatisch erhöht, für die B1b - Bindung bleibt der Wert annähernd gleich. Die EC₅₀ (Ca²⁺) - Werte ergaben für die Badan - Peptide B1b und B1b^{LE} niedrigere Werte als für die Peptide A4 und A4^{LE} und jeweils für die LE - Mutanten höhere Werte als für die Wildtyp - Peptide.

Sowohl bei den CaM^{Badan} Experimenten als auch bei den Peptid^{Badan} Experimenten muß berücksichtigt werden, daß die beobachteten Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des Reporters sowohl auf die Bindung als auch auf eine durch die Ca²⁺- Bindung verursachte Konformationsänderung des CaMs zurückgeführt werden kann. Bei den CaM^{Badan} Messungen sind die Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften bei Ca²⁺- Bindung durch die vorherige Analyse von CaM^{Badan} alleine bekannt, so daß jede Änderung dieser Eigenschaften auf ein

vorangegangenes Peptid - Bindeereignis zurückgeführt werden muss. Bei den Peptid^{Badan} Experimenten können Änderungen der Emission nach erfolgter Bindung an CaM ebenfalls infolge der Ca²⁺ - abhängigen Konformationsänderung des CaMs auftreten.

Bei den fluoreszenzspektroskopische Analyse der Interaktion von A4^{-W} und B1b mit den Tryptophanmutanten CaM^{F20W} und CaM^{F93W} konnte gezeigt werden, daß beide Peptide einen unterschiedlichen Einfluß auf die Ca²⁺-Bindestellen des CaMs ausüben. Während B1b sowohl die C - als auch die N - terminale Ca²⁺-Affinität des CaMs deutlich erhöht, wurde dies für A4^{-W} nur für die N - terminale Bindestelle detektiert. Die EC₅₀ (Ca²⁺)-Werte für die Ca²⁺-abhängige Änderung der Tryptophanfluoreszenz waren bei Bindung der Peptide stets kleiner als für CaM^{F20W} und CaM^{F93W} alleine. Dies ist gewöhnlich auf eine Erhöhung der Ca²⁺-Affinität des entsprechenden Terminus zurückzuführen (siehe z.B. Black et al., 2005).

5 Analyse der Stöchiometrie löslicher Komplexe aus Calmodulin und den Peptiden des olfaktorischen CNG - Kanals

Die vorherigen Untersuchungen dienten der Analyse der Bindung und der Untersuchung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Wechselwirkung von CaM mit den Peptiden des olfaktorischen CNG - Kanals. In diesem Abschnitt der Arbeit soll nun die Stöchiometrie löslicher Molekülkomplexe aus CaM und den Wildtyp - Peptiden B1b, A4, B1bI und A4I untersucht werden. Diese Analyse soll zeigen, ob die CNG - Kanaluntereinheiten gleichzeitig bei der schnellen Desensibilisierung des Kanals mit CaM interagieren können und ob ein oder zwei Calmoduline an einem solchen Komplex beteiligt sind. Zur Untersuchung der Stöchiometrie der CaM-Komplexe wurden zwei Methoden verwendet. Fluoreszenzspektroskopisch diente Badan-gekoppeltes CaM wie zuvor als Reporter für die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung des CaMs. Diese Konformationsänderung wurde diesmal in Anwesenheit der Peptide A4 und B1b beziehungsweise A4I und B1bI bei 0 Ca^{2+} und bei den Ca^{2+} -Konzentrationen (μM) 0,003, 0,008, 0,02, 0,037, 0,144, 1,3 und 1000 analysiert. Die Resultate dieser Experimente wurden mit den Analysen vorheriger Experimente bei denen neben $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ nur jeweils eines der Peptide A4, B1b, A4I und B1bI im Reaktionsansatz vorlag, verglichen. Für die Ca^{2+} -abhängigen Änderungen der Emission sollten wieder Dosis -Wirkungsfunktionen in Abhängigkeit von $[\text{Ca}^{2+}]$ erstellt werden.

Als zweite Methode zur Analyse löslicher Molekülkomplexe aus CaM und den Peptiden A4, B1b, A4I und B1bI diente die analytische Ultrazentrifugation (AUZ). In Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wurde das Sedimentationsverhalten zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten (s - Werte) unter sättigenden $[\text{Ca}^{2+}]$ von CaM in Anwesenheit eines der Peptide A4, B1b, A4 und A4I analysiert. Im Anschluß wurde die Sedimentation unter den gleichen Bedingungen für CaM in Anwesenheit der Peptide A4 und B1b beziehungsweise A4I und B1bI wiederholt und die gefundenen s - Werte mit denen vorheriger Analysen verglichen. Da die s - Werte von der Molekülmasse der sedimentierenden Teilchen abhängen, können Aussagen über die Zusammensetzung der gefundenen Molekülspezies getroffen werden.

5.1 Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Stöchiometrie

5.1.1 Stöchiometrie des CaM-A4-B1b Komplex

Einführung

Die fluoreszenzspektroskopische Analyse der CaM - Bindung an A4 und B1b konnte zeigen, daß beide Peptide an CaM binden. Die Bindung von A4 erfolgte dabei im Gegensatz zur B1b Bindung Ca^{2+} -unabhängig. Die fluoreszenzspektroskopische Analyse der $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ - Bindung in Anwesenheit beider Peptide im Reaktionsansatz soll klären, ob im Vergleich zu den vorherigen Experimenten Unterschiede in der Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung des CaMs detektiert werden können. Darüber hinaus sollten wieder Dosis - Wirkungskurven in Abhängigkeit von $[\text{Ca}^{2+}]$ erstellt werden. Die Ergebnisse der $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ Interaktion mit A4 und B1b im Vergleich zur Analyse von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ alleine, in Anwesenheit der Kontrolle ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + Ktrl), von A4 ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + A4) und von B1b ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + B1b) ist in Abbildung 53 a - c dargestellt.

Messdaten

Die Analysen der Fluoreszenzeigenschaften von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ (schwarz), $\text{CaM}^{\text{Badan}}+\text{Ktrl}$ (hellgrau), $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + A4 (rot) und $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + B1b (grün) in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration wurden bereits zuvor beschrieben. In Abbildung 53 a dargestellt ist die Analyse der Lage der Emissionsmaxima in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. Die Positionen der Emissionsmaxima der $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + A4 + B1b-Probe (blau) entsprechen bis zu einer Ca^{2+} -Konzentration von etwa 80 nM Ca^{2+} denen von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + A4 und im Vergleich zu $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ ist das Emissionsmaximum um 12 nm in den blauen Bereich verschoben. > 80 nM verschiebt sich das Maximum um weitere 2 nm und die $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + A4 + B1b-Probe verhält sich nun was die Lage der Maxima betrifft wie die $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + B1b-Probe.

Die Analyse der Fluoreszenzintensität von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + A4 + B1b (Abb. 53 b) entspricht bis 80 nM Ca^{2+} den Ergebnissen wie sie auch für die Verschiebung des Emissionsmaximums gefunden wurden. Die RFU-Werte entsprechen bis 100 nM Ca^{2+} etwa denen der $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + A4 Probe. Dann steigt die RFU um etwa 50 RFU. Die RFU der $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + A4 Probe steigt hingegen um 150 – 250 RFU an. Die RFU liegt bis 30 μM Ca^{2+} im Vergleich zur $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + B1b Probe etwas höher. > 30 μM entsprechen die RFU-Werte schließlich wieder den Werten wie sie für die $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ + B1b-Probe detektiert wurden. In Abbildung 53 c sind die Dosis-Wirkung-Sigmoidfunktionen zur Analyse der EC_{50} (Ca^{2+}) für die Graphen in a

dargestellt. Für die Funktion der $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4} + \text{B1b}$ -Probe wurde eine Standardabweichung $> 2\text{mM Ca}^{2+}$ ermittelt. Auf diese Angabe wurde deshalb verzichtet. Die $\text{EC}_{50} (\text{Ca}^{2+})$ -Werte der Analysen der Emissionsmaxima betragen für $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ 75 (± 15) nM, für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$ 88 (± 26) nM, für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$ 112 (± 32) nM, für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1b}$ 90 (± 18) nM und für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4} + \text{B1b}$ 133 nM Ca^{2+} .

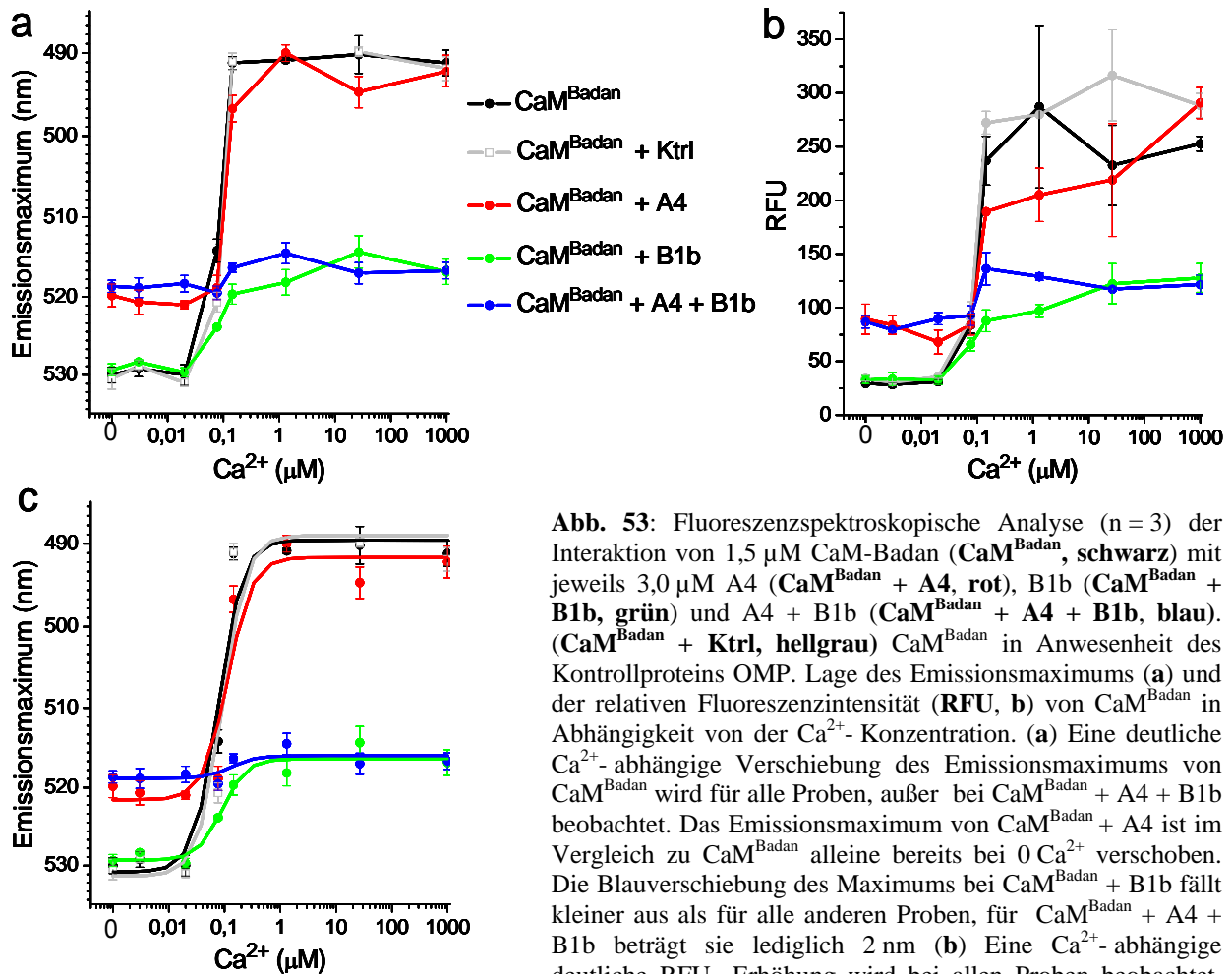


Abb. 53: Fluoreszenzspektroskopische Analyse ($n = 3$) der Interaktion von $1,5 \mu\text{M CaM-Badan}$ ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$, schwarz) mit jeweils $3,0 \mu\text{M A4}$ ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$, rot), B1b ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1b}$, grün) und $\text{A4} + \text{B1b}$ ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4} + \text{B1b}$, blau). ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$, hellgrau) $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Anwesenheit des Kontrollproteins OMP. Lage des Emissionsmaximums (a) und der relativen Fluoreszenzintensität (RFU, b) von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. (a) Eine deutliche Ca^{2+} -abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ wird für alle Proben, außer bei $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4} + \text{B1b}$ beobachtet. Das Emissionsmaximum von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$ ist im Vergleich zu $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ alleine bereits bei 0 Ca^{2+} verschoben. Die Blauverschiebung des Maximums bei $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1b}$ fällt kleiner aus als für alle anderen Proben, für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4} + \text{B1b}$ beträgt sie lediglich 2 nm (b) Eine Ca^{2+} -abhängige deutliche RFU-Erhöhung wird bei allen Proben beobachtet. Ein geringerer, aber bereits bei 0 Ca^{2+} detektierbarer Anstieg wird bei $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$ beobachtet. Für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4} + \text{B1b}$ wird ein Anstieg um 50 RFU detektiert, der $> 30 \mu\text{M Ca}^{2+}$ wieder leicht abfällt. (c) Dosis - Wirkungsfunktion der unter a gezeigten Kurven. $\text{EC}_{50} (\text{Ca}^{2+})$ -Werte: ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$) = $75 (\pm 15) \text{ nM}$ ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$) = $88 (\pm 26) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4}$) = $112 (\pm 32) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1b}$) = $90 (\pm 18) \text{ nM}$, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4} + \text{B1b}$) 133 (Standardabweichung keine Angabe, siehe Text).

Zusammenfassung

Bei der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung der Bindung beider Peptide A4 und B1b im Vergleich zur Bindung der einzelnen Peptide an $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ konnte gezeigt werden, daß die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung des $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Anwesenheit von B1b und A4 deutlich verschieden ist. Auch in dieser Probe wurde bereits eine Bindung bei 0 Ca^{2+} detektiert. Anschließend sind die Emissionseigenschaften ähnlichen denen der

CaM^{Badan} + B1b - Probe. Der EC₅₀ (Ca²⁺) - Wert der Dreiermischung liegt mit 133 nM Ca²⁺ etwas höher als bei den Proben CaM^{Badan} + A4 (112 (+/- 32) nM) und CaM^{Badan} + B1b (90 (+/- 18) nM). Wahrscheinlich sind die Unterschiede in den Spektren und EC₅₀ (Ca²⁺) - Werten Folge der Bildung eines Komplex bestehend aus CaM, A4 und B1b. Eine andere Möglichkeit wäre, dass bis zu einer Ca²⁺-Konzentration von 80 nM Ca²⁺ nur A4 gebunden ist und anschließend durch B1b verdrängt wird. Bei der RFU - Analyse wurden aber für die Dreiermischung im Bereich zwischen 80 nM und 30 µM Ca²⁺ von der CaM^{Badan} + B1b - Probe abweichende Werte der RFU detektiert, was auf das vorübergehende Vorhandensein eines Komplex aus den drei Reaktionspartnern schließen läßt.

5.1.2 Stöchiometrie des CaM-A4I-B1bI Komplex

Einführung

Dass die Peptide A4I und B1bI Ca²⁺-abhängig an CaM^{Badan} binden und auch, daß A4 und B1b mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Komplex aus CaM, B1b und A4 bilden wurde bereits gezeigt. Mittels der fluoreszenzspektroskopischen Analyse der CaM^{Badan}-Bindung mit den Peptiden A4I und B1bI im Reaktionsansatz soll nun geklärt werden, ob gleiche Resultate für die Ca²⁺-abhängige Konformationsänderung des CaMs erzielt werden können. Darüber hinaus sollten wieder Dosis - Wirkungskurven in Abhängigkeit von [Ca²⁺] erstellt werden. Die Ergebnisse der CaM^{Badan} Interaktion mit A4I und B1bI ist im Vergleich zu den vorherigen Analysen der Ca²⁺-abhängigen Konformationsänderung von CaM^{Badan} alleine und in Anwesenheit der Kontrolle (CaM^{Badan} + Ktrl), von A4I (CaM^{Badan} + A4I) und B1bI (CaM^{Badan} + B1bI) in Abbildung 54 a - c dargestellt.

Messung

Die Analyse der Lage der Emissionsmaxima von CaM^{Badan} + A4I (orange) und CaM^{Badan} + B1bI (dunkelgrün) in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration (Abb. 54) im Vergleich zu CaM^{Badan} (schwarz) und CaM^{Badan} + Ktrl (hellgrau) wurde bereits vorgenommen. Die Verschiebung des Emissionsmaximums um 40 nm in den blauen Bereich des Spektrums in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration von CaM^{Badan} wurde für alle Proben detektiert. Für die CaM^{Badan} + A4I + B1bI-Probe (violett) wurden exakt die gleichen Emissionswerte detektiert wie für CaM^{Badan} + B1bI. Die Kurven sind deckungsgleich.

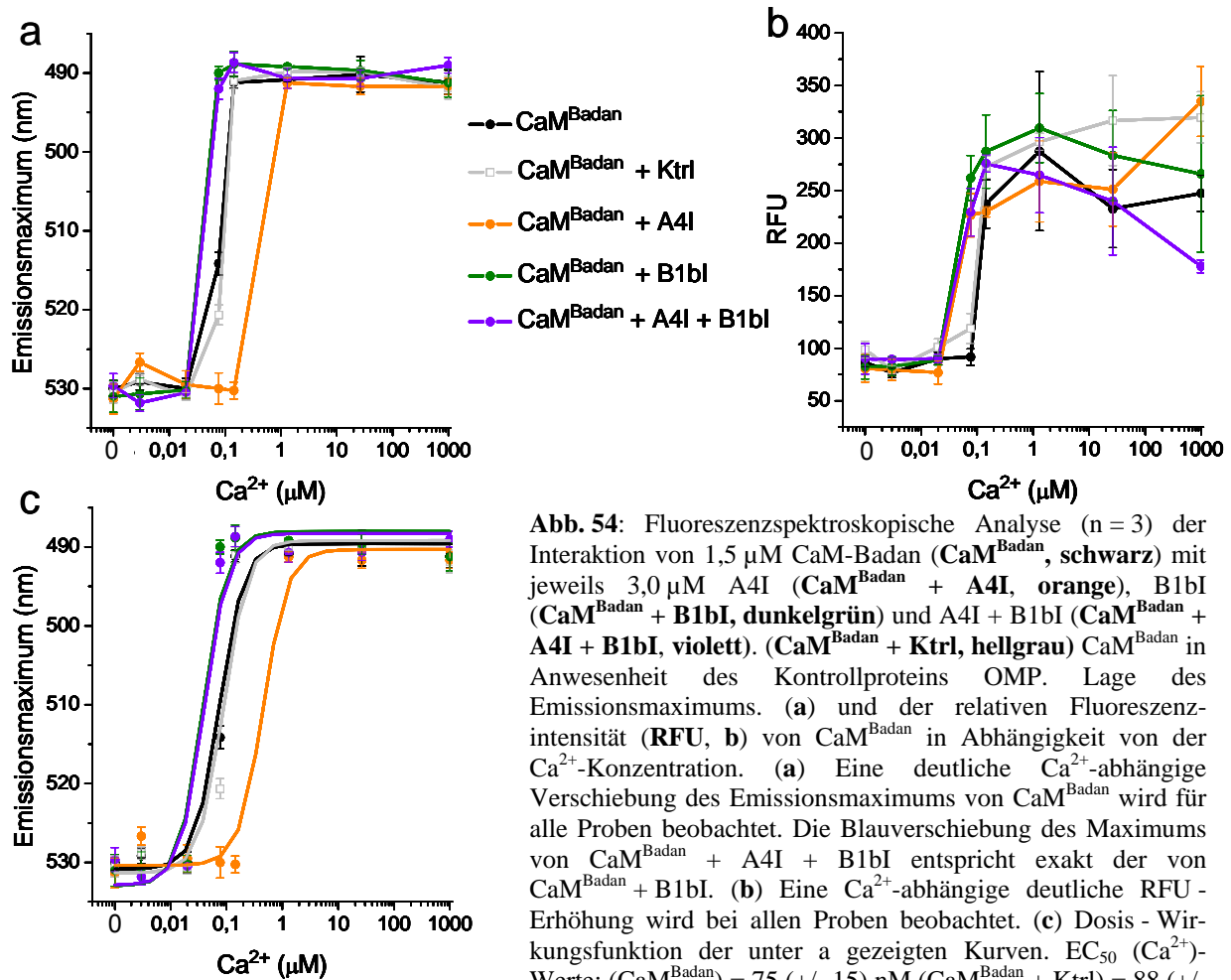


Abb. 54: Fluoreszenzspektroskopische Analyse ($n = 3$) der Interaktion von $1,5 \mu\text{M}$ CaM-Badan ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$, schwarz) mit jeweils $3,0 \mu\text{M}$ A4I ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I}$, orange), B1bI ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1bI}$, dunkelgrün) und A4I + B1bI ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I} + \text{B1bI}$, violett). ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$, hellgrau) $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Anwesenheit des Kontrollproteins OMP. Lage des Emissionsmaximums. (a) und der relativen Fluoreszenzintensität (RFU, b) von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. (a) Eine deutliche Ca^{2+} -abhängige Verschiebung des Emissionsmaximums von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ wird für alle Proben beobachtet. Die Blauverschiebung des Maximums von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I} + \text{B1bI}$ entspricht exakt der von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1bI}$. (b) Eine Ca^{2+} -abhängige deutliche RFU-Erhöhung wird bei allen Proben beobachtet. (c) Dosis - Wirkungsfunktion der unter a gezeigten Kurven. EC_{50} (Ca^{2+})-Werte: ($\text{CaM}^{\text{Badan}}$) = $75 (+/- 15)$ nM ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$) = $88 (+/- 26)$ nM, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I}$) = $470 (+/- 18)$ nM, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1bI}$) = $39 (+/- 12)$ nM, ($\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I} + \text{B1bI}$) $39 (+/- 11)$ nM Ca^{2+} .

Die Fluoreszenzintensität aller Proben (b) steigt zwischen 20 und 100 nM Ca^{2+} stark an. Die Kurven der Proben $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I}$ (orange), $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1bI}$ (dunkelgrün) und $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I} + \text{B1bI}$ (violett) sind leicht nach links zu niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen hin verschoben. Der $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I} + \text{B1bI}$ Graph ist nicht, wie für die Lage der Emissionsmaxima gefunden wurde vollkommen deckungsgleich zur RFU der $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1bI}$ -Probe. Die EC_{50} (Ca^{2+})-Werte der Analysen der Emissionsmaxima (c) betragen für $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ $75 (+/- 15)$ nM, für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{Ktrl}$ $88 (+/- 26)$ nM, für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I}$ $470 (+/- 18)$ nM, für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1bI}$ $39 (+/- 12)$ nM und für $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{A4I} + \text{B1bI}$ $39 (+/- 11)$ nM Ca^{2+} .

Zusammenfassung

Die fluoreszenzspektroskopische Analyse der Bindung beider Peptide A4I und B1bI an $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ ergab, daß sich die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung des $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Anwesenheit beider Peptide gleich wie die von $\text{CaM}^{\text{Badan}} + \text{B1bI}$ verhält. Dennoch kann aufgrund dieses Ergebnisses die Bildung eines Komplex aus CaM, A4I und B1bI nicht

ausgeschlossen werden, da mit dieser Analysemethode nur die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung des $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ untersucht werden kann. Die Konformationsänderung des CaM wird möglicherweise durch die Bindung von B1bI bei etwa 20 nM Ca^{2+} und der daraus resultierenden Erhöhung der Ca^{2+} -Affinität bereits abgeschlossen, so daß bei Bindung von A4I um 100 nM Ca^{2+} keine Änderungen der CaM - Konformation mit dieser Methode mehr detektiert werden konnten.

5.2 Analytische Ultrazentrifugation zur Analyse der Stöchiometrie

5.2.1 Stöchiometrie des CaM-A4-B1b Komplex

Einführung

Die fluoreszenzspektroskopische Analyse zur Stöchiometrie der Bindung von A4 und B1b an CaM hat gezeigt, daß die Konformation von $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Anwesenheit beider Peptide A4 und B1b von der abweicht, wie sie für $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ in Anwesenheit eines der Peptide A4 oder B1b gefunden wurde. In Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wurde nun unter sättigenden Ca^{2+} -Konzentrationen das Sedimentationsverhalten der Dreiermischung bestehend aus CaM, A4 und B1b analysiert und mit dem von CaM alleine und von CaM in Anwesenheit eines der Peptide A4 oder B1b verglichen. Die Peptide wurden bei allen Analysen im molaren Überschuss eingesetzt. Dies ist bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen, da eine zweite Molekülspezies in Form von freiem Peptid die Sedimentationsprofile und somit den Sedimentationskoeffizienten (s - Wert) beeinflusst. Aufgrund der Monodispersität der wandernden Banden in der Ultrazentrifuge, konnten die Resultate als Gauß - Kurven an die Sedimentationskoeffizientenverteilung $g(s^*)$ angepasst werden. Die Gauß - Kurven der $g(s^*)$ Funktionen sind in Abbildung 55 dargestellt. Das Maximum der Gauß - Verteilung entspricht dem Sedimentationskoeffizienten s (s - Wert) der Molekülspezies.

Messung

Die Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe erfolgte mit dem Programm *DCDT+*TM. Die Gauß - Verteilungen sind außer für die CaM + A4 + B1b-Probe für alle Proben ideal, das heißt der arithmetische Mittelwert der Kurve liegt exakt im Schwerpunkt der Verteilung und besitzt ein distinktes Maximum. In den Proben CaM + A4, CaM + B1b und CaM alleine konnten keine Proteinaggregate oder weitere Molekülspezies nachgewiesen werden. Die in der CaM + A4 + B1b-Probe gefundene zweite Teilchenspezies, erkennbar am

deutlichen Anstieg der Kurve ab etwa 1 S zu niedrigeren s - Werten hin, ist auf freies Peptid in der Lösung zurückzuführen. Dies ist zu erwarten, da das eingesetzte molare CaM zu Peptid Verhältnis 1 : 2 : 2 (CaM : A4 : B1b) betrug. Interessanterweise wurde in den CaM + A4 - und CaM + B1b - Proben kein freies Peptid nachgewiesen. In diesen Proben findet man keinen entsprechenden Anstieg der Kurve bei s - Werten < 1 . Die Peptide bilden beide demnach einen 1 : 2 Komplex (CaM : A4 bzw. CaM : B1b), wie dies mittels NMR (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*) bereits für Peptide der CaM - Bindeststelle der Stäbchen B - Untereinheit (Orsale et al., 2003) nachgewiesen worden ist. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen betragen die s - Werte gerundet für CaM 2,0 S, CaM + A4 2,4 S, CaM + B1b 2,3 S und CaM + A4 + B1b 2,2 S. Der gefundene s - Wert unterscheidet sich nur geringfügig von dem, wie er für die Proben CaM + A4 und CaM + B1b gefunden wurde. In der CaM - B1b - A4 Probe resultiert der gefundene s - Wert aus der Überlagerung der Gauß-Kurve der Peptide mit der des gefundenen Komplex. Die Anwesenheit freier Peptide im Gemisch verschiebt demnach den s - Wert des Komplex zu niedrigeren Werten hin. Der tatsächliche s - Wert des Komplex liegt demnach etwas höher als der durch das Programm *DCDT*TM ermittelte.

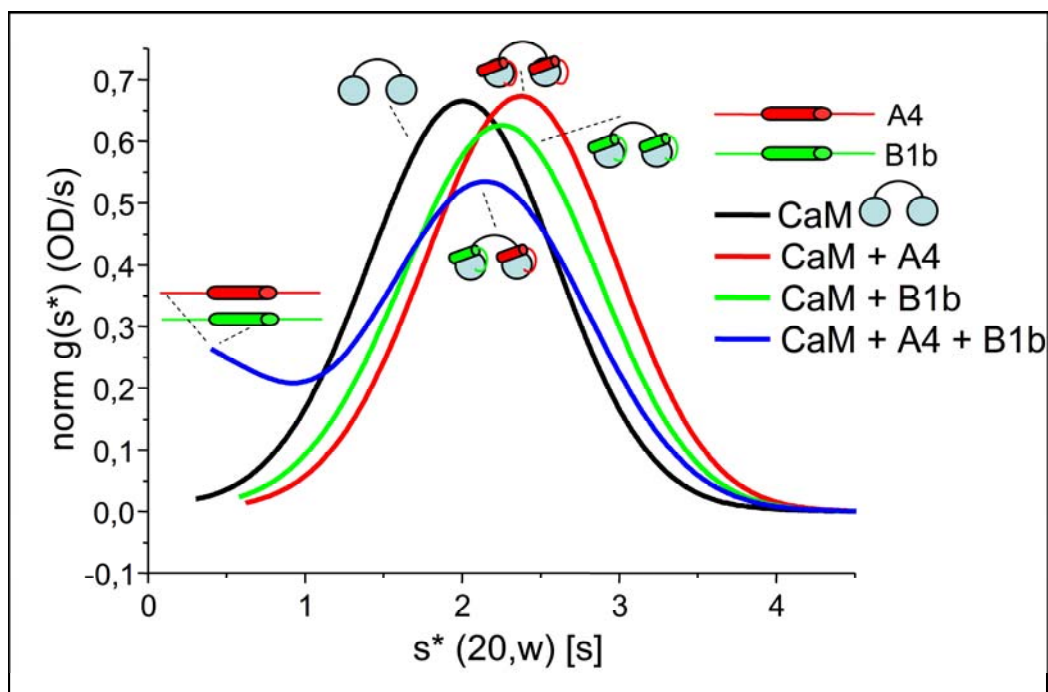


Abb. 55: Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit von CaM, CaM + A4, CaM + B1b und CaM + A4 + B1b in Doppelsektorzellen. Gauß - Kurven der normalisierten Sedimentationskoeffizientenverteilungen $g(s^*)$ über die gesamte Meßzelle, nach Analyse mit dem Programm *DCTC+™* (Philo, 2000). Die Maxima der Gauß - Kurven entsprechen dem jeweiligen s - Wert der Probe: CaM 2,0 S, CaM + A4 2,4 S, CaM + B1b 2,3 S, CaM + A4 + B1b 2,2 S, in dieser Probe wurde noch eine zweite Teilchenspezies identifiziert. Analysetemperatur: 25°C, Proteinkonzentrationen: 9 μ M CaM, jeweils 18 μ M Peptid, Rotationsgeschwindigkeit: 60000 g.

Zusammenfassung

Durch die Analyse der s - Werte der Zweiermischungen CaM + A4 (1 : 2) und CaM + B1b (1 : 2) in Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen konnte gezeigt werden, daß die Peptide A4 und B1b unter den gegebenen Reaktionsbedingungen einen 1 : 2 (CaM : Peptid) Komplex bilden. Für B1b ergänzt dieses Ergebnis die Daten der CaM^{F20W} und CaM^{F93W}-Messungen, in denen gezeigt wurde, dass B1b sowohl die N - als auch die C - terminale Ca²⁺-Bindestelle des CaM in ihrer Ca²⁺-Affinität beeinflusst. Der s - Wert der Dreiermischung aus CaM, A4 und B1b liegt mit 2,2 S größtmäßig zwischen den s - Werten von CaM alleine (2,0 S), CaM + A4 (2,4 S) und CaM + B1b (2,3 S). Die Überlagerung der Gauß - Verteilung des gefundenen Komplex > 2 S mit dem der zweiten Teilchenspezies < 1 S bewirkt für die CaM + A4 + B1b - Probe eine Verschiebung des Maximums der Gauß - Kurve zu kleineren Werten hin. Dies bewirkt für den Komplex > 2 S einen scheinbar geringeren s - Wert, der in Wirklichkeit etwas höher liegt. Es ist anzunehmen, daß der Komplex, wie er in der Dreiermischung identifiziert wurde aus den Peptiden A4 und B1b und aus CaM besteht.

5.2.2 Stöchiometrie des CaM - A4I - B1bI Komplex

Einführung

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Interaktion von A4I und B1bI mit CaM^{Badan} konnte zeigen, dass B1bI und A4I beide Ca²⁺- abhängig mit CaM interagieren und dass die Interaktion von B1bI bei 5 - 10fach niedrigerer Ca²⁺- Konzentrationen erfolgt als die von A4I. In Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen sollte deshalb unter sättigenden Ca²⁺- Konzentrationen die Zusammensetzung eines Komplexes aus CaM, A4I und B1bI analysiert werden. Die Peptide wurden wie in der Graphik angegeben im molaren Überschuß eingesetzt. Die für die Analyse der Dreierkomplexe interessanten Molekülspezies wurden graphisch illustriert. (Abb. 56). Die CaM - B1bI Interaktion wurde außer in den im Graphen (Abb. 56) dargestellten molaren Verhältnis von 2 : 1 und 4 : 1 (B1bI : CaM) noch in den Verhältnissen

0,5 : 1, 1 : 1 und 3:1 analysiert (Abb. 57). Dies sollte der Untersuchung der CaM : B1b Stöchiometrie dienen. Ein entsprechendes Experiment konnte mit dem Peptid A4I nicht durchgeführt werden, da eine signifikante Interaktion überhaupt nur im Verhältnis 4 : 1 (A4I : CaM) nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Monodispersität der wandernden Banden in der Ultrazentrifuge, konnten alle Resultate als Gauß - Kurven an die Sedimentationskoeffizientenverteilung $g(s^*)$ angepasst werden. Die Gauß - Kurven der $g(s^*)$ Funktionen und Illustrationen der Komplexe aus CaM und den Peptiden, sind in Abbildung 56 und 57 dargestellt.

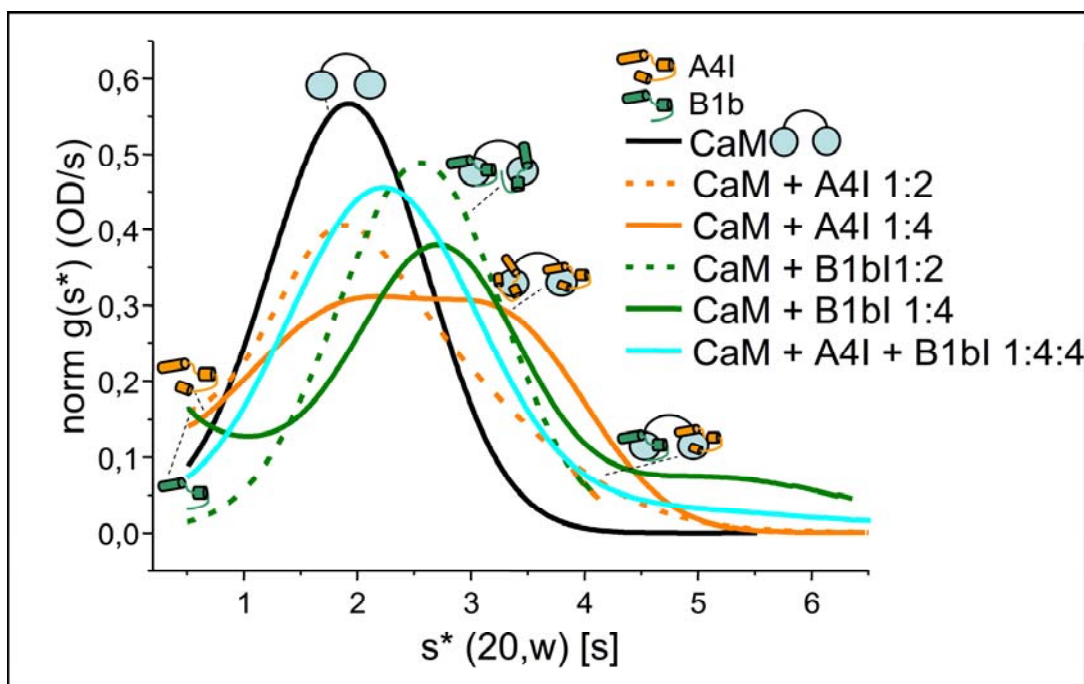


Abb. 56: Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit von CaM, CaM + A4I, CaM + B1bI und CaM + A4 + B1b in Doppelsektorzellen in den angegebenen Verhältnissen. Gauß - Kurven der normalisierten Sedimentationskoeffizientenverteilungen $g(s^*)$ über die gesamte Meßzelle, nach Analyse mit dem Programm *DCTC+™* (Philo, 2000). Die Maxima der Gauß - Kurven entsprechen dem hauptsächlich gefundenen s - Wert der Probe, mit dem Programm *DCTC+™* wurden weitere Molekülspezies identifiziert: (CaM) 2,0 S, (CaM + A4I 1:2) 1,9 S und 2,4 S, (CaM + A4I 1:4) 2,2 S und 3,5 S, (CaM + B1bI 1:2) 2,6 S, (CaM + B1bI 1:4) 2,8 S, (CaM + A4I + B1bI 1:4:4) 2,3 S und 4,4 S (20 %). Analysetemperatur: 25°C, Proteinkonzentrationen: 9 μ M CaM, jeweils 18 bzw. 36 μ M Peptid, Rotationsgeschwindigkeit: 60000 g.

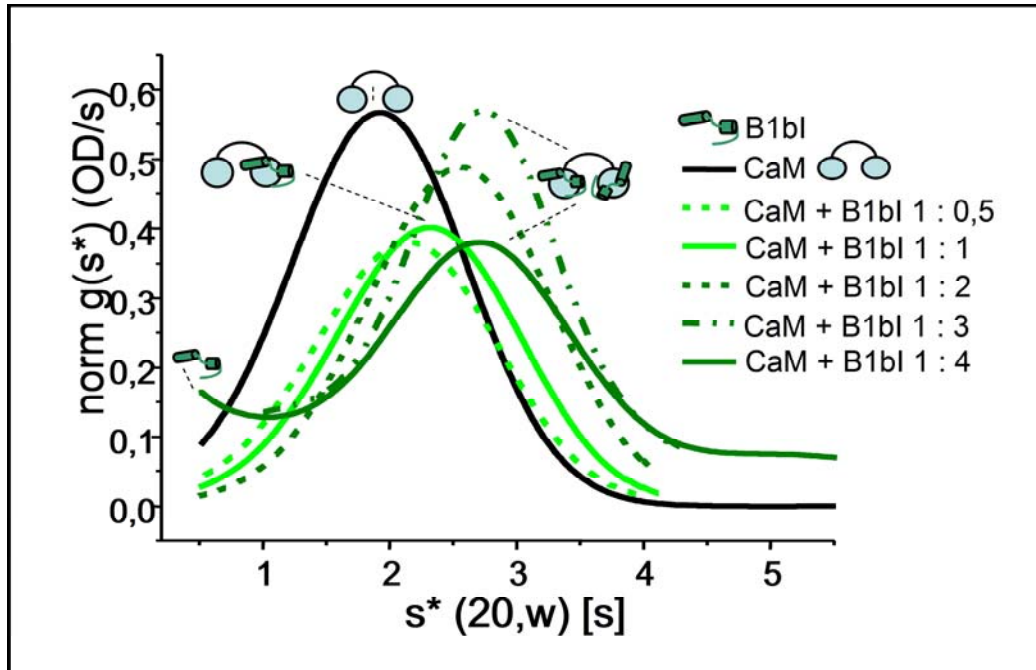


Abb. 57: Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit von CaM und CaM + B1bl, in Doppelsektorzellen in den angegebenen Verhältnissen. Gauß - Kurven der normalisierten Sedimentationskoeffizientenverteilungen $g(s^*)$ über die gesamte Meßzelle, nach Analyse mit dem Programm *DCTC+™* (Philo, 2000). Die Maxima der Gauß-Kurven entsprechen dem jeweiligen s - Wert der Probe: (CaM) 2,0 S, (CaM + B1bl 1:0,5) 2,2 S, (CaM + B1bl 1:1) 2,4 S, (CaM + B1bl 1:2) 2,6 S, (CaM + B1bl 1:3) 2,7 S, (CaM + B1bl 1:4) 2,8 S. Analysetemperatur: 25°C, Proteinkonzentrationen: 9 μ M CaM und 4,5 μ M; 9 μ M; 18 μ M; 27 μ M; 36 μ M Peptid, Rotationsgeschwindigkeit: 60000 g.

Messung

In Abbildung 56 dargestellt ist die Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe der CaM - A4I und CaM - B1bl Proben im Vergleich zu dem Dreiergemisch, bestehend aus CaM, A4I und B1bl. Die Gauß - Verteilung ist für keine der Proben außer CaM ideal, aber dennoch besitzen alle Verteilungen ein deutliches Maximum. Erstaunlich ist, dass der hauptsächliche s - Wert der CaM + A4I (1 : 2) mit 1,9 S sogar geringer ausfällt, als für CaM alleine. Dies liegt daran, dass viel freies Peptid in der Lösung vorliegt, erkennbar an der nicht gegen Null abfallenden Kurve bei kleinen s - Werten, was den s - Wert durch die Überlagerung der Gauß - Kurven scheinbar senkt. Mit dem Programm *DCDT+™* konnte für diese Probe jedoch mit einem Anteil von 25 % bei 2,4 S eine zweite Molekülspezies identifiziert werden, was am Graphen selbst nicht zu erkennen ist. Für die Probe CaM : A4I (1 : 4) wurden ebenfalls 2 Teilchenspezies identifiziert. Etwa 60 % entfallen auf einen 2,2 S Komplex und 40 % auf einen 3,5 S-Komplex. Auch hier wurde, erkennbar an der enormen Verbreiterung und der nicht gegen Null gehenden linken Basis der Gauß - Kurve viel freies A4I gefunden. Für die CaM + B1bl-Proben wurde für das Verhältnis 1 : 2 ein s -Wert von 2,6 S detektiert und für das

1 : 4 Verhältnis von 2,8 S. Das ist für das 1 : 4 Verhältnis verwunderlich da bei einem 1 : 2 Komplex (CaM : B1bI) von 2,6 S, die Kurve nach links verschoben sein müsste zu Werten < 2,6 S, aufgrund viel freien Peptids in der Lösung. Das freie B1bI ist erkennbar am starken Anstieg der Kurve im vorderen Bereich hin zu kleinen s - Werten. Die Probe CaM + B1bI 1 : 4 bildet aber im Bereich zwischen 4,5 und 5,5 S eine zweite Molekülspezies aus, die durch das Programm zwar nicht angegeben wurde, aber dennoch erkennbar ist. Möglicherweise ist diese Teilchenspezies verantwortlich für die Verschiebung des s - Wertes in den höheren Bereich in den 1 : 3 und 1 : 4 (CaM : B1bI) - Proben (siehe auch Abb. 57). Für CaM + A4I + B1bI im Verhältnis 1 : 4 : 4 wurden zwei s - Werte identifiziert, zu 80 % eine Teilchenspezies von 2,3 S und zu 20 % von 4,4 S.

Die in Abbildung 57 dargestellte Analyse der Sedimentation von CaM + B1bI in den Verhältnissen 1 : 0,5, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 und 1 : 4 zeigen, dass die s - Werte bis zu einem Verhältnis von 1 : 2 (CaM : B1bI) steigen, ohne dass sich freies Peptid in der Lösung anreicherte. Die s - Werte betragen (CaM : B1bI) entsprechend 2,2 S (1 : 0,5), 2,4 S (1 : 1) und 2,6 S (1 : 2). Erst ab einem Verhältnis (CaM : B1bI) von 1 : 3 wird auch freies B1bI in der Lösung detektiert, erkennbar am Anstieg der Kurve im vorderen s-Wert Bereich. Ab dem Verhältnis 1 : 3 (CaM : B1bI) wird neben dem abgegrenzten Hochpunkt bei 2,7 S die schon oben beschriebene zweite Teilchenspezies in geringer Menge im Bereich um 5,0 S detektiert.

Zusammenfassung

Die Experimente zeigen, dass unter den gegebenen Bedingungen nur eine schwache Wechselwirkung zwischen CaM und A4I stattfindet. Erkennbar ist dies an der großen Menge freien Proteins in der Lösung. CaM : A4I - Komplexe wurden nur im molaren Verhältnis 4 : 1 (A4I : CaM) gefunden. 60 % der angegebenen Teilchenspezies sedimentieren mit 2,2 S. Höchstwahrscheinlich befindet sich hier viel freies CaM in der Lösung. Der zweite s - Wert wurde mit 3,5 S (40 %) angegeben. Für das 1 : 2 Verhältnis (CaM : A4I) wurde außerdem in geringer Menge ein 2,4 S Komplex identifiziert. Für die Interaktion von B1bI mit CaM konnten mehrere Molekülspezies, abhängig vom Verhältnis der Partner zueinander detektiert werden. Bereits im Verhältnis 1 : 0,5 (CaM : B1bI) wurde ein Komplex von 2,2 S detektiert. Bis zum Verhältnis 1 : 2 (CaM : B1bI) kam es zu keiner Anreicherung freien Peptids in der Lösung, was nur durch die Bildung von Komplexen aus CaM und zwei B1bI - Peptiden im molaren Verhältnis 2 : 1 (B1bI : CaM) zu erklären ist. Bei weiterer Erhöhung der Peptidkonzentration wurde in geringem Maße auch eine Teilchenspezies im Bereich von 5,0 S detektiert bei gleichzeitiger Anreicherung von freiem B1bI in der Lösung. Beide Peptide,

sowohl A4I als auch B1bI bilden also im 4 fachen Überschuß zu CaM einen noch größeren Komplex aus. Für die Dreiermischung CaM : A4I : B1bI im Verhältnis 1 : 4 : 4 wurde zu 80 % ein Komplex von 2,3 S detektiert und zu 20 % ein zweiter Komplex bei 4,4 S identifiziert, bei dem es sich um einen Komplex aus CaM, A4I und B1bI handeln könnte.

5.3 Zusammenfassung aller Resultate zur Stöchiometrie

Die Analysen zur Stöchiometrie der CaM - Interaktion mit den CNG - Peptiden wurden sowohl fluoreszenzspektroskopisch als auch mittels analytischer Ultrazentrifugation durchgeführt. Sie dienen der Identifizierung löslicher Proteinkomplexe von CaM bei Interaktion mit den Peptiden A4, A4I, B1b und B1bI. Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Interaktion von CaM^{Badan} mit beiden Peptiden B1b und A4 ergab, dass die Partner mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Dreierkomplex bilden, denn die Emissionsspektren unterscheiden sich deutlich von denen von CaM + B1b und CaM + A4. Mit analytischer Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass CaM sowohl mit B1b als auch mit A4 einen 2:1 Komplex (Peptid : CaM) bildet. Für die Dreiermischung CaM - B1b - A4 wurde ein etwas kleinerer s - Wert als für CaM - B1b oder CaM - A4 identifiziert, aber dies ist auf den hohen Anteil freien Peptids in der Lösung zurückzuführen, der eine Verschiebung der Gauß - Kurve verursacht.

Mittels Fluoreszenzspektroskopie konnte für CaM, B1bI und A4I kein Dreierkomplex detektiert werden. Allerdings gilt zu bedenken, dass man mit dieser Methode in erster Linie die Konformationsänderung von CaM^{Badan} bei Ca²⁺-Aufnahme untersucht. Die Bindung von B1bI an CaM erfolgt bei 5-10fach geringeren Ca²⁺-Konzentrationen als die von A4I. Somit kann die Konformationsänderung des CaM durch eine Erhöhung der Ca²⁺-Affinität bei Bindung an B1bI schon abgeschlossen sein. Deshalb wird bei Bindung von A4I keine Änderung der Konformation von CaM mehr detektiert. Die Bestimmung der Stöchiometrie löslicher Komplexe von CaM und A4I mittels analytischer Ultrazentrifugation konnte darüber hinaus zeigen, dass A4I nur eine schwache Wechselwirkung mit CaM eingeht. Bei Interaktion wurde hauptsächlich ein 2 : 1 Komplex (A4I : CaM) detektiert, bei den anderen gefundenen s - Werten kann von einem hohen Anteil freien Calmodulins ausgegangen werden.

B1bI bindet CaM im Verhältnis 2 : 1 (B1bI :CaM), aber auch 1 : 1 Komplexe wurden nachgewiesen. Für die Dreiermischung aus CaM + A4I + B1bI wurde zu 20% ein 4,4S Komplex detektiert und zu 80% ein 2,3S Komplex. Es wurden weder bei 2,6 S noch bei 3,5 S weitere Teilchenspezies identifiziert, was darauf hinweist, dass in der Dreiermischung nicht

ausschließlich Zweierkomplexe aus CaM + B1bI oder A4I gebildet werden und es sich deshalb bei dem 4,4 S Komplex um einen Dreierkomplex aus CaM und den Peptiden handelt.

V Diskussion

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines molekularen Modells zur Calmodulin - vermittelten schnellen Desensibilisierung des olfaktorischen CNG - Kanals. Ein solches Modell ist wichtig für das Verständnis der Vorgänge, welche die Beendigung der Reizantwort und damit die Wiederherstellung des Ruhepotentials bestimmen.

Mit den erzielten Resultaten konnte ein Modell zum Mechanismus der schnellen Desensibilisierung des olfaktorischen CNG - Kanals entwickelt werden. Darüber hinaus konnte eine Aussage darüber getroffen werden, wie sich die Konformation und Ca^{2+} - Affinität von Calmodulin bei der Bindung an die CNG - Peptide ändert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die Peptide in ihrer Eigenschaft mit voll - und teilligandiertem CaM zu interagieren, unterscheiden. Untersuchungen zur Stöchiometrie zeigten auch, welche Partner an dem Schließkomplex aus Calmodulin und den CNG - Peptiden, wie er im desensibilisierten Zustand des Kanals bei erhöhter Ca^{2+} - Konzentration auftritt, beteiligt sind. Zusammengenommen ermöglichen die Ergebnisse eine Aussage darüber zu treffen, welche strukturelle Umordnung ein Komplex in Folge des Ca^{2+} - Einstroms erfährt. Daneben konnte gezeigt werden, dass das LQ - Bindemotiv nicht, wie angenommen (Bradley, 2004), für die Calmodulinbindung verantwortlich ist, sondern vielmehr die Ca^{2+} - Abhängigkeit der Bindung beeinflusst. Der Einsatz zweier verschieden langer LQ - Peptide derselben Kanaluntereinheit beweist außerdem, dass die Ergebnisse, die durch die Verwendung kurzer Bindestellenpeptide in Interaktionsstudien erzielt werden, unter Umständen nicht geeignet sind, komplexe physiologische Fragestellungen zu klären.

Der Diskussionsteil gliedert sich in fünf Kapitel. Zur Übersicht illustriert Kapitel 1, wie die verschiedenen Peptide der LQ - Bindestellen mit Calmodulin wechselwirken. Der Mechanismus der schnellen Desensibilisierung des CNG - Kanals wird in Kapitel 2 hergeleitet. Kapitel 3 erörtert die Konsequenzen der Peptidbindung auf die Calmodulinkonformation. LQ - Peptide unterschiedlicher Länge der gleichen Kanal - Untereinheit wechselwirken auf verschiedene Art und Weise mit Calmodulin, was in Kapitel 4 diskutiert wird. Zuletzt wird in Kapitel 5 diskutiert, dass die Aminosäuren Leucin (L) und Glutaminsäure (Q) des LQ - Motivs nicht wie angenommen für die Calmodulinbindung verantwortlich sind, wie die Experimente mit den LE - Mutanten zeigen konnten.

1 Interaktion der LQ - und LE - Peptide mit Calmodulin

In der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionen zwischen Calmodulin und Calmodulin - Mutanten mit Peptiden der LQ - Bindemotive der CNG - Kanal Untereinheiten CNG B1b (B1b) und CNG A4 (A4) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, welche Partner bei verschiedenen Ca^{2+} - Konzentrationen miteinander wechselwirken.

Zur Übersicht werden an dieser Stelle die Ergebnisse aller Interaktionsstudien zunächst zusammengeführt. Im Folgenden wird deshalb schematisch illustriert wie die verschiedenen Peptide der LQ - Bindestellen unter den gegebenen Bedingungen mit Calmodulin (CaM) wechselwirken.

A4 - Wechselwirkung

Das A4 - Peptid bindet im Gegensatz zu allen anderen in dieser Arbeit verwendeten Peptiden bei 0 Ca^{2+} an CaM (IV, Kap. 3.1) und auch die Interaktion mit teilligandiertem CaM wurde nachgewiesen (IV, Kap. 4.1). Die Analyse zur Stöchiometrie in 1 mM Ca^{2+} (IV, 5.2.1) zeigt außerdem, dass zwei Peptide mit CaM interagieren können. Die Resultate, wie sie durch Einsatz des A4^W - Peptids erzielt wurden (IV, Kap. 4.8.2), zeigen außerdem, dass die A4 - Bindung die N - terminale Ca^{2+} - Affinität des CaMs erhöht.

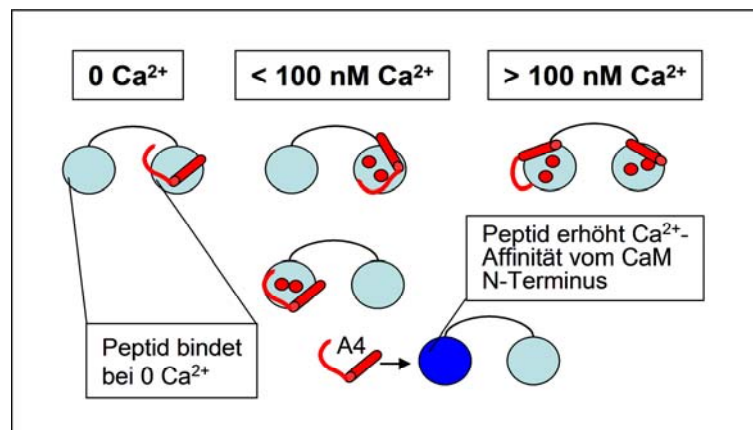


Abb. 58: A4 - Wechselwirkung mit Calmodulin (Erläuterung siehe Text). **Calmodulin:** blaue Kreise: Globuläre Domänen, (**links**) N - Terminus, (**rechts**) C - Terminus, (**hellblau**) Ca^{2+} - Affinität unter den gegebenen Bedingungen, (**dunkelblau**) erhöhte Ca^{2+} - Affinität, **rote Kreise:** Calcium - Ion.

B1b - Wechselwirkung

B1b bindet Ca^{2+} - abhängig an CaM (IV, Kap. 3.1) und auch die Interaktion mit teilligandiertem CaM wurde gezeigt (IV, Kap. 3.2). B1b erhöht außerdem die N - und C -

terminale Ca^{2+} -Affinität des CaM (IV, Kap. 4.8.2 und 4.8.3), unabhängig davon wurde gezeigt, dass B1b CaM im Verhältnis 2 : 1 (B1b : CaM; IV, Kap. 5.2.1) bindet.

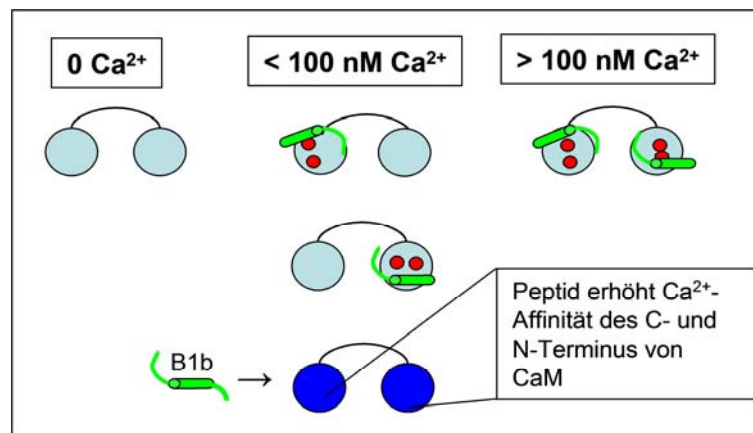


Abb. 59: B1b - Wechselwirkung mit Calmodulin (Erläuterung siehe Text). **Calmodulin:** blaue Kreise: Globuläre Domänen, (**links**) N - Terminus, (**rechts**) C - Terminus, (**hellblau**) Ca^{2+} -Affinität unter den gegebenen Bedingungen, (**dunkelblau**) erhöhte Ca^{2+} -Affinität, **rote Kreise:** Calcium - Ion.

A4 - und B1b - Wechselwirkung

Es wurde gezeigt, dass A4 im Gegensatz zu B1b Ca^{2+} -unabhängig mit CaM wechselwirkt, weswegen in Anwesenheit beider Peptide im Reaktionsansatz A4 bereits bei 0 Ca^{2+} an CaM bindet (IV, Kap. 3.1). Eine solche Interaktion findet höchstwahrscheinlich am C -Terminus von CaM statt (siehe zum Bsp. Chin & Means, 2000), was die N - terminale Ca^{2+} -Affinität von CaM erhöht (siehe zum Bsp. Peersen et al., 1997) und die Bindung eines zweiten Peptids an diesen Terminus ermöglicht. Unter sättigenden Ca^{2+} - Bedingungen wurde in Teil IV, Kap. 5.2.1 gezeigt, dass beide Peptide im Verhältnis 2 : 1 an CaM binden können, weshalb unter gleichen Bedingungen auch von der Bildung des Dreierkomplex aus CaM, B1b und A4 ausgegangen werden muss.

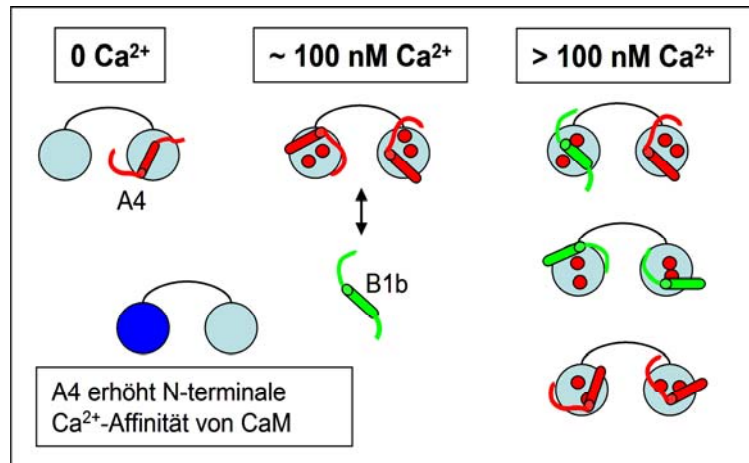


Abb. 60: A4 - und B1b - Wechselwirkung mit Calmodulin, beide Peptide im Reaktionsansatz (Erläuterung siehe Text). **Calmodulin:** blaue Kreise: Globuläre Domänen, (**links**) N - Terminus, (**rechts**) C - Terminus, (**hellblau**) Ca^{2+} - Affinität unter den gegebenen Bedingungen, (**dunkelblau**) erhöhte Ca^{2+} - Affinität, **rote Kreise:** Calcium - Ion.

A4I - Wechselwirkung

A4I bindet im Gegensatz zu A4 Ca^{2+} - abhängig an CaM (IV, Kap. 3.1) und interagiert nur mit vollligandiertem CaM (IV, Kap. 3.2). Die Ca^{2+} - Affinität des CaMs wird bei A4I - Bindung außerdem stark erniedrigt (IV, Kap. 4.7). Es wurde außerdem gezeigt, dass die A4I - Wechselwirkung nur schwach ist und das Peptid mit CaM im Verhältnis 2 : 1 (A4I : CaM) wechselwirkt (IV, Kap. 5.2.2).

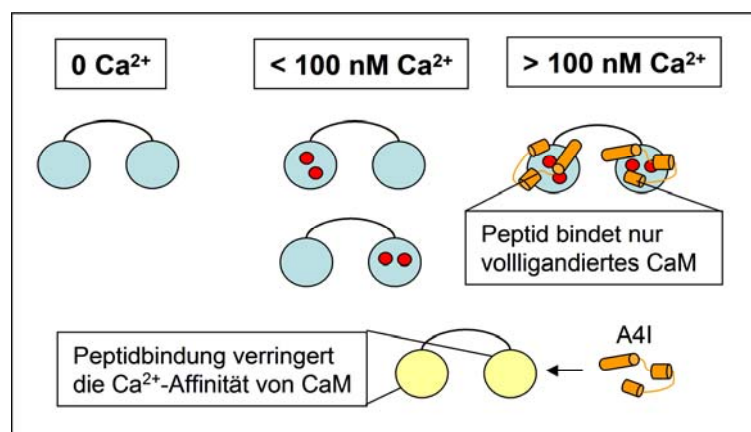


Abb. 61: A4I - Wechselwirkung mit Calmodulin (Erläuterung siehe Text). **Calmodulin:** blaue Kreise: Globuläre Domänen, (**links**) N - Terminus, (**rechts**) C - Terminus, (**hellblau**) Ca^{2+} - Affinität unter den gegebenen Bedingungen, (**hellgelb**) erniedrigte Ca^{2+} - Affinität. **Rote Kreise:** Calcium - Ion.

B1bI - Wechselwirkung

B1bI bindet Ca^{2+} -abhängig an CaM (IV, Kap. 3.1) und interagiert wie B1b auch mit teilligandiertem CaM (IV, Kap. 3.2). Die Ca^{2+} -Affinität des CaM wird bei B1bI-Bindung leicht erhöht (IV, Kap. 4.7). Es wurde außerdem gezeigt, dass B1bI sowohl im Verhältnis 1 : 1 als auch 2 : 1 (B1bI : CaM) mit CaM wechselwirken kann (IV, Kap. 5.2.2).

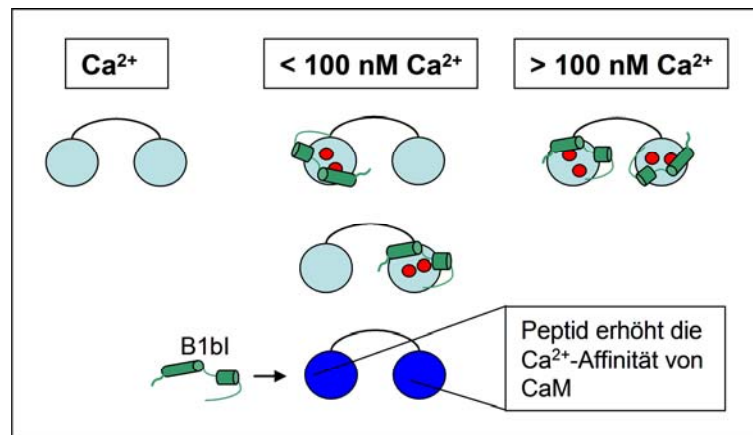


Abb. 62: B1bI - Wechselwirkung mit Calmodulin (Erläuterung siehe Text). **Calmodulin:** blaue Kreise: Globuläre Domänen (**links**) N-Terminus (**rechts**) C-Terminus (**hellblau**) Ca^{2+} -Affinität unter den gegebenen Bedingungen (**dunkelblau**) erhöhte Ca^{2+} -Affinität, **rote Kreise:** Calcium-Ion.

A4I - und B1bI - Wechselwirkung

Beide Peptide A4I und B1bI binden nicht Ca^{2+} -unabhängig an CaM (IV, Kap. 3.1). Allerdings konnte gezeigt werden, dass B1bI bei etwa 10-fach geringerer Ca^{2+} -Konzentration an CaM bindet als A4I und darüber hinaus die Ca^{2+} -Affinität des CaM erhöht (IV, Kap. 4.7). Unter sättigenden Ca^{2+} -Bedingungen wurde in Teil IV, Kap. 5.2.1 außerdem gezeigt, dass beide Peptide im Verhältnis 2 : 1 an CaM binden können. Die Wechselwirkung von B1bI und CaM ist dabei stabiler als die von A4I mit CaM. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Affinität von CaM durch B1bI (IV, Kap. 4.7) dient der A4I-Bindung, das nur an vollligandiertes CaM binden kann (IV, Kap. 3.2). Bei Bindung erniedrigt A4I die Ca^{2+} -Affinität von CaM (IV, Kap. 4.7), so dass nur ein vorübergehender instabiler Dreier-Komplex gebildet wird (IV, Kap. 5.2.2).

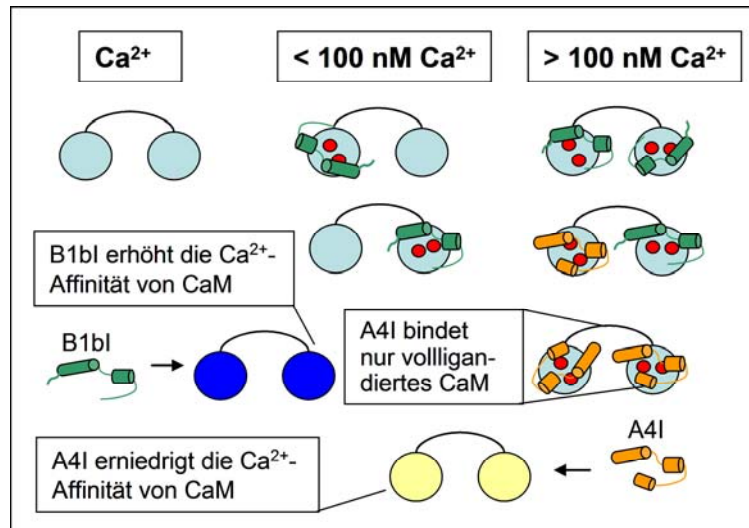


Abb. 63: A4I - und B1b1 - Wechselwirkung mit Calmodulin, beide Peptide im Reaktionsansatz (Erläuterung siehe Text). **Calmodulin:** blaue/ hellgelbe Kreise: Globuläre Domänen, (**links**) N – Terminus, (**rechts**) C - Terminus, (**hellblau**) Ca²⁺- Affinität unter den gegebenen Bedingungen, (**dunkelblau**) erhöhte Ca²⁺- Affinität, (**hellgelb**) erniedrigte Ca²⁺-Affinität, **rote Kreise:** Calcium - Ion.

A4^{LE} -Wechselwirkung

Das A4^{LE}-Peptid bindet Ca²⁺-abhängig an CaM, aber nicht wie A4 bereits bei 0 Ca²⁺ (IV, Kap. 4.1 bis 4.3). Es interagiert außerdem nicht mit teilligandiertem CaM (IV, Kap. 4.2), weshalb davon auszugehen ist, dass CaM für die Interaktion vollligandiert vorliegen muß. Es wurde außerdem gefunden, dass A4^{LE} die Ca²⁺-Affinität von CaM leicht erhöht (IV, Kap. 4.3).

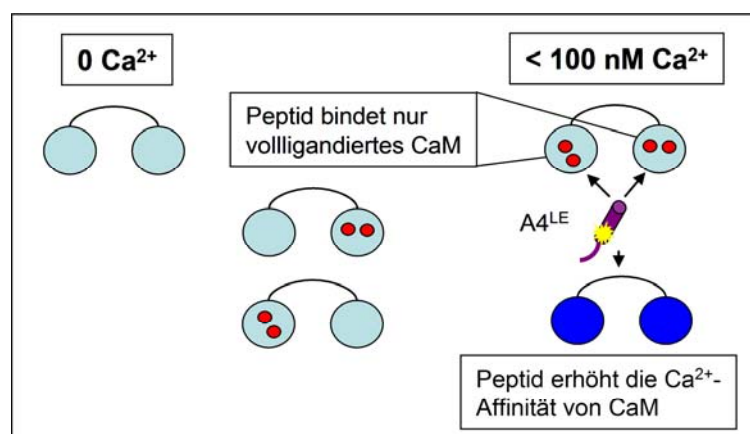


Abb. 64: A4^{LE} - Wechselwirkung mit Calmodulin (Erläuterung siehe Text). **Calmodulin:** blaue Kreise: Globuläre Domänen, (**links**) N – Terminus, (**rechts**) C - Terminus, (**hellblau**) Ca²⁺- Affinität unter den gegebenen Bedingungen, (**dunkelblau**) erhöhte Ca²⁺- Affinität, **rote Kreise:** Calcium - Ion, (**gelber Stern**) L → E - Austausch.

B1b^{LE}-Wechselwirkung

Das B1b^{LE}- Peptid bindet wie B1b Ca²⁺- abhängig an CaM (IV, Kap. 3.1). Auch für diese Mutante wurde gezeigt, dass eine Interaktion nur mit vollligandiertem CaM möglich ist (IV, Kap. 3.2), wohingegen B1b auch mit teilligandiertem CaM wechselwirken kann. Es erhöht bei der Wechselwirkung außerdem leicht die Ca²⁺- Affinität von CaM (IV, Kap. 4.6).

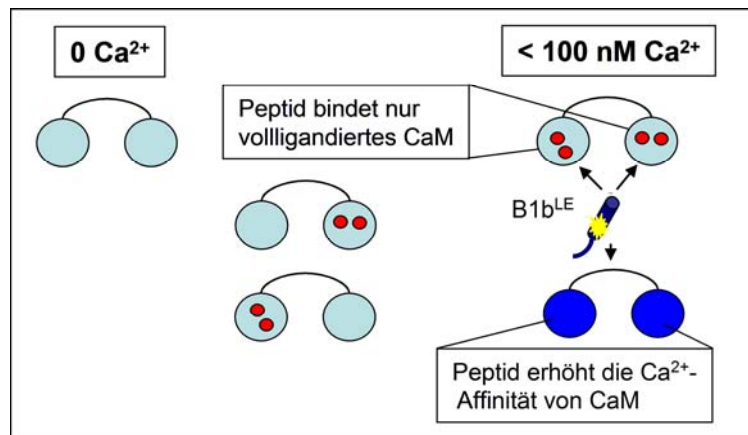


Abb. 65: B1b^{LE} - Wechselwirkung mit Calmodulin (Erläuterung siehe Text). **Calmodulin:** blaue Kreise: Globuläre Domänen (**links**) N - Terminus (**rechts**) C - Terminus (**hellblau**) Ca²⁺ - Affinität unter den gegebenen Bedingungen, (**dunkelblau**) erhöhte Ca²⁺ -Affinität, , **rote Kreise:** Calcium - Ion, (**gelber Stern**) L→E - Austausch.

2 Kanalmodell der Calmodulin - vermittelten Desensibilisierung

Für die Entwicklung des molekularen Modells zur Calmodulin - vermittelten schnellen Desensibilisierung des olfaktorischen CNG - Kanals, wurde untersucht, ob und unter welchen Bedingungen die CNG - Peptide an Calmodulin binden. Es wurden pro Untereinheit zwei verschieden lange Peptide verwendet, die jeweils die LQ - Bindestelle und eine unterschiedliche Zahl flankierender Aminosäuren enthalten. Die längeren Peptide A4I und B1bI wurden in der Annahme eingesetzt, dass diese Peptide eher native Sekundär - beziehungsweise Tertiärstrukturen ausbilden, als dies bei Verwendung der kurzen Peptide der Fall ist. Darüber hinaus enthält das B1bI - Peptid noch eine und A4I sogar zwei zusätzliche potentiell helikale Regionen, die bei der Bindung an Calmodulin eine Rolle spielen könnten. Allerdings wurde gezeigt, dass die Länge der Peptide nicht die Ausbildung von Sekundärstrukturen beeinflusst. Während das B1bI - Peptid etwas höhere Anteile α - helikaler Strukturen besitzt als B1b, wurde gefunden, dass A4I deutlich weniger α - helikale Bereiche aufweist als A4. Bei allen bekannten Calmodulin - Bindemotiven handelt es sich um kurze

amphipathische α - Helices (Yamniuk & Vogel, 2004; Friedberg et al., 2003), die sich insbesondere bei der Verwendung von Peptiden häufig erst bei der Wechselwirkung mit dem Interaktionspartner ausbilden (Pelton & McLean, 2000; Davidson et al., 1998). Dies wurde in Interaktionsstudien auch für Calmodulin - Wechselwirkungen mit Peptiden mehrfach gezeigt (Friedberg et al., 2003, Yuan et al., 1999; Meador et al., 1993), weswegen die zum Teil fehlende Faltung der in dieser Arbeit verwendeten Peptide kein Hindernis für die Experimente darstellte. Der Einsatz kurzer und langer Peptide in den Interaktionsstudien hat vielmehr gezeigt, dass die Peptidlänge einen entscheidenden Einfluß hat auf die Ca^{2+} - Abhängigkeit der Bindung an Calmodulin. Der Einfluß der Peptidlänge auf die Kanal - Calmodulin Interaktion wird in Abschnitt 3 gesondert diskutiert.

Wie die schnelle Desensibilisierung des olfaktorischen CNG - Kanals zur Beendigung der Reizantwort und somit zur Wiederherstellung des Ruhepotentials der ORNs beiträgt, ist in Abbildung 66 dargestellt. Die Daten, die die Grundlage für die Aufstellung dieses Modells darstellen, basieren auf den Interaktionsstudien mit den Peptiden A4I und B1bI mit Calmodulin, da A4I und B1bI aufgrund ihrer Länge die *in vivo* Situation am Kanal besser repräsentieren als die kleinen Peptide. Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass beim Ruhepotential, wenn der Kanal geschlossen und sensitiv für cAMP ist (Ruhezustand), Calmodulin bereits über die B1b - Untereinheit mit dem Kanal assoziiert ist. Die spektroskopischen Messungen haben gezeigt, dass das B1bI - Peptid Ca^{2+} - abhängig an Calmodulin bindet und dass die Bindung bereits bei einer Ca^{2+} - Konzentration von 20 nM erfolgt. Im Ruhezustand beträgt die ciliäre Ca^{2+} - Konzentration etwa 40 nM (Bradley et al., 2005, Leinders - Zufall et al., 1998), ist also ausreichend hoch für die Assoziation von Calmodulin an die B1b - Untereinheit. Eine Präassoziation von Calmodulin an die modulatorischen Untereinheiten wurde bereits 2004 von Bradley et al. postuliert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen haben auch gezeigt, dass die Ca^{2+} - Affinität des Calmodulins durch die B1bI - Bindung erhöht wird (Abb.: Dunkelblaue globuläre Domäne des Calmodulins).

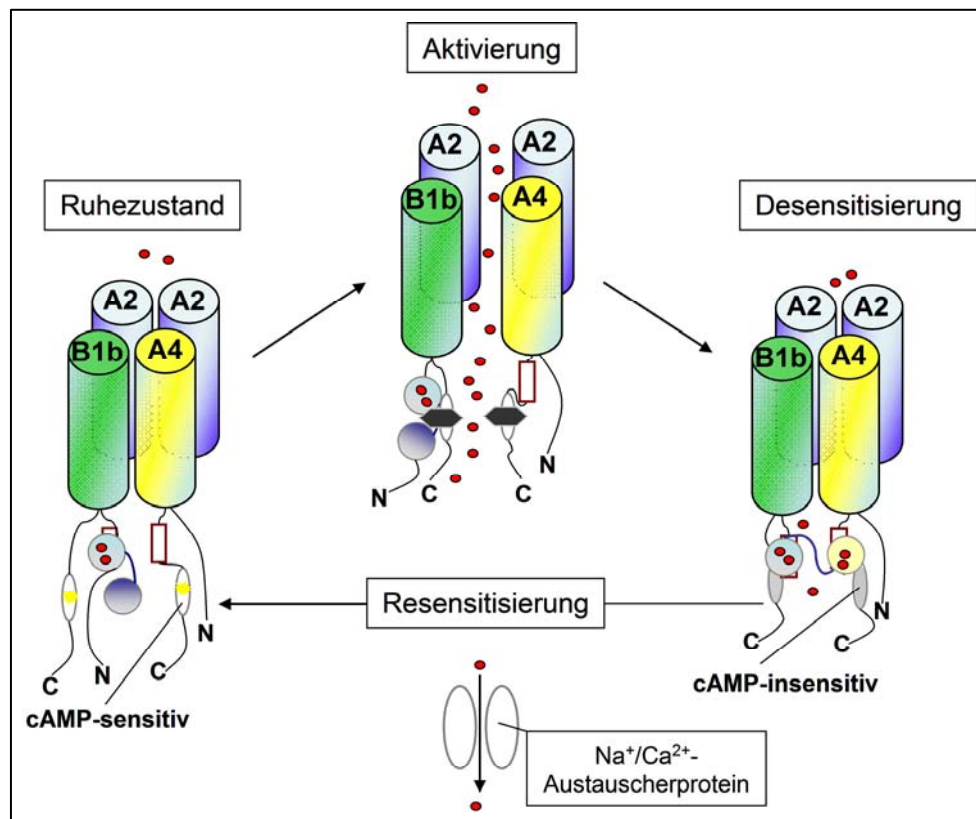


Abb. 66: Modell der schnellen Calmodulin - vermittelten Desensibilisierung des olfaktorischen CNG - Kanals. (Säulen) Untereinheiten (blau: A2; grün: B1b; gelb: A4). Es sind nur die intrazellulären Endigungen der modulatorischen Untereinheiten eingezeichnet. (Ellipse) cAMP - Bindestelle: Stern cAMP - sensitiv; grau: - insensitiv. (Kreise) Globuläre Domänen des Calmodulins, (hellblau) Ca²⁺-Sensitivität unter den gegebenen Bedingungen, (dunkelblau) erhöhte Ca²⁺- Sensitivität, (hellgelb) verringerte Ca²⁺-Sensitivität, (rote Vierecke) LQ - Bindestellen, (schwarzes Sechseck) cAMP, (rote Kreise) Calcium - Ionen. Erläuterung: siehe Text.

Wie Calmodulin an die B1b - Untereinheit bindet, ob mit seiner C - oder N - terminalen Domäne oder sogar mit der flexiblen Linkerregion kann in dieser Arbeit nicht ganz geklärt werden. Mit Hilfe der Calmodulin - Tryptophanmutanten CaM^{F20W} und CaM^{F93W} konnte jedoch gezeigt werden, dass das kleine B1b - Peptid die Ca²⁺ - Affinität sowohl der N - als auch der C - terminalen EF - Hand Domänen beeinflusst, was eine Bindung dieses Peptids an beide globuläre Domänen sehr wahrscheinlich macht. Mittels NMR (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*) konnte dies bereits für das homologe Peptid der B - Untereinheit des CNG - Kanals der Stäbchen - Photorezeptoren nachgewiesen werden (Orsale et al., 2003). Im Gegensatz dazu beeinflusst A4^{-W}, ein zu A4 homologes Peptid, dessen N - terminal zur LQ - Bindestelle gelegenes Tryptophan durch Alanin ersetzt wurde, nur die N - terminale Tryptophanfluoreszenz von CaM^{F20W}. Wahrscheinlich bindet die B1b - Untereinheit Calmodulin C - terminal. Bei konstitutiver Bindung von Calmodulin an

Ionenkanäle (Erickson et al., 2001; Pitt et al., 2001), die Ca^{2+} leiten, dient die gebundene C - terminale Domäne auch oft als lokaler Ca^{2+} - Sensor, wohingegen die N - terminale Domäne kleine globale Änderungen wahrnimmt (Abb. 12; Tadross et al., 2008) und das freie Ende des Moleküls darstellt.

Bei der Aktivierung öffnet der Kanal in Folge der Bindung von cAMP (Abb.: Schwarze Sechsecke) und die ciliäre Ca^{2+} -Konzentration steigt schnell in den mikromolekularen Bereich an. Durch den Ca^{2+} -Einstrom kommt es zu einer Ca^{2+} -Sättigung des Calmodulins. Die resultierende Konformationsänderung bewirkt, dass vollgesättigtes Calmodulin auch an die A4 - Untereinheit des Kanals binden kann und der Kanal schließt innerhalb von 500ms. In dieser Arbeit wurde sowohl gezeigt, dass A4I erst ab einer Ca^{2+} -Konzentration $> 100 \text{ nM}$ Ca^{2+} an Calmodulin bindet, als auch, dass A4I nur mit vollligandiertem Calmodulin wechselwirken kann. Die A4 - Untereinheit benötigt für die Interaktion mit Calmodulin also die Aktivierung des Kanals durch cAMP und die in Folge des Ca^{2+} -Einstroms erhöhte Ca^{2+} -Konzentration.

Der geschlossene Kanal ist vorübergehend unsensitiv für cAMP und befindet sich im desensitisierten Stadium (Desensibilisierung). Für kurze Zeit sind beide modulatorischen Untereinheiten an Calmodulin assoziiert, was mittels analytischer Ultrazentrifugation nachgewiesen wurde. Ein hypothetischer Mechanismus der Desensibilisierung ist, dass das gebundene Calmodulin die cAMP - Bindung sterisch behindert und damit den Einstrom von Ca^{2+} begrenzt. Die analytische Ultrazentrifugation konnte auch zeigen, dass nur wenig A4I - Peptid an Calmodulin bindet, was auf eine schwache Bindung hinweist. Die spektroskopischen Messungen konnten außerdem nachweisen, dass die Bindung von A4I die Ca^{2+} -Affinität des Calmodulins erniedrigt (Abb.: Hellgelbe globuläre Domäne des Calmodulins). Vollligandiertes Calmodulin bildet allerdings die Voraussetzung für die A4I - Bindung, was ebenfalls bewiesen wurde. Das Ca^{2+} wird aus dem Cilium hauptsächlich durch das $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscherprotein (*NCX*, *Na⁺/Ca²⁺-exchanger*; Reiser & Matthews, 1998; Danaceau & Lucero, 2000; Lucero et al., 2000; Castillo et al., 2007; Kwon et al., 2009) entfernt. Die Erniedrigung der Ca^{2+} -Affinität von Calmodulin bei der Bindung an A4I, bewirkt eine schwache Bindung dieses Peptids. Zusätzlich sinkt die Ca^{2+} -Konzentration im Cilium durch das NCX - Protein. Zusammengenommen bilden diese Mechanismen die Voraussetzung für die schnelle Resensibilisierung des Kanals. Die schnell sinkende Ca^{2+} -Konzentration bewirkt außerdem, dass das Ruhepotential der Zelle schnell wieder hergestellt wird.

Der Mechanismus der schnellen Desensibilisierung des olfaktorischen CNG - Kanals kann eine Erklärung dafür liefern, warum Tiere eine Duftspur schnüffelnd verfolgen. Der „Zickzack-Kurs“ eines Hundes resultiert aus dem kurzen hochfrequenten Erschnüffeln eines Duftstoffes (6-10 Hz; Carey et al., 2009; Wesson et al., 2008; Thesen et al., 1993) und anschließend vorübergehendem Verlassen der Spur. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestärken Hypothesen, wie sie bereits 1979 erstmals von Schmitt & Ache aufgestellt worden waren, dass das Schnüffeln primär der Erhöhung der Antwortbereitschaft olfaktorischer Neurone (ORNs) dient und weniger die zentralnervöse Prozessierung beeinflusst (Wesson et al., 2008; Youngentob et al., 1987; Schmitt & Ache, 1979). In *in vitro* elektrophysiologischen Messungen wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass die Dauer von der Expositionszeit mit einem Duftstoff bis zur Zellantwort der ORNs zwischen 150 und 600 Millisekunden beträgt (Wesson et al., 2008; Firestein et al., 1990; Ma et al., 1999). *In vivo* nimmt die Ratte, sowie auch der Mensch einen Duftstoff schon 140 bis 260 Millisekunden bewußt wahr. Das Besondere ist, dass die Reaktion auf einen Duftstoff bereits erfolgt ist, noch bevor in den von einem Duftstoff aktivierten Glomeruli der maximale Ca^{2+} -Einstrom und somit eine maximale Aktivierung detektiert werden konnte (Carey et al., 2009; Wesson et al., 2008). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass nicht alle ORNs, deren Cilien die Rezeptoren für einen bestimmten Duftstoff tragen zu jedem Zeitpunkt in gleichem Maße aktiv sind. Dies ist einerseits die Folge der unterschiedlichen Transduktionsgeschwindigkeit verschiedener Neurone, andererseits sind die Neurone nach der Duftstoffdetektion sofort vorübergehend desensibilisiert, was der Wiederherstellung des Ruhepotentials dient. Dieser Mechanismus dient also in erster Linie der Wiedererregbarkeit der Neurone und somit auch einer besseren zeitlichen und räumlichen Auflösung der Duftstoffsignale aus der Umwelt. Durch die schnelle Desensibilisierung des CNG - Kanals wird vermieden, dass zuviel Ca^{2+} in das Cilium einströmt, denn das Ca^{2+} soll hauptsächlich der Aktivierung des Ca^{2+} -aktivierten Chloridionenkanals dienen um die Signalantwort durch den resultierenden Cl^- -Ausstrom zu verstärken. Eine Akkumulation von Ca^{2+} würde zur längerfristigen Adaptation des Riechneurons führen, was dem Prozeß des Schnüffelns nicht dienlich wäre.

3 Strukturelle Analyse der Calmodulin – Peptidkomplexe

Alle Methoden, die in dieser Arbeit zur Analyse der Interaktion von Calmodulin mit den Peptiden des olfaktorischen CNG-Kanals eingesetzt wurden, können dem indirekten Nachweis von Änderungen der Calmodulinstruktur bei Bindung dienen. Dies wird im

Folgenden für die CD - spektroskopische Analyse und die fluoreszenzspektroskopische Analyse der Interaktionsstudien beschrieben. CD - spektroskopisch wurden Änderungen der relativen Sekundärstrukturanteile von Calmodulin und den Calmodulin - Mutanten CaM¹² und CaM³⁴ bei Bindung an die Peptide B1b, B1bI, B1b^{LE}, A4 und A4I nachgewiesen. Die Calmoduline sind hauptsächlich α - helikal, weshalb diese Änderungen im CD - Spektrum als Änderungen der relativen molaren Elliptizität θ der für α - Helices typischen lokalen Minima bei 208 und 222 nm detektiert wurden. Mit Ausnahme der Bindung von B1bI an Calmodulin wurde bei allen Bindereignissen eine Abnahme der negativen relativen molaren Elliptizität θ und Verringerung der α - Helizität festgestellt. Für die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurde gezeigt, dass diese überwiegend aus unstrukturiertem Zufallsknäuel bestehen, weshalb der relative Anteil an Zufallsknäuel im Komplex mit Calmodulin bei der Interaktion steigt. Gleichzeitig nimmt der Anteil an α - Helices ab, was im Spektrum, außer bei der Bindung von B1bI, als eine Abnahme der negativen Elliptizität θ detektiert wurde. Im Gegensatz dazu steigt die negative Elliptizität θ im Spektralbereich für das Zufallsknäuel bei der Interaktion von B1bI mit Calmodulin. Gleichzeitig wurde eine Verringerung der α - Helizität detektiert. Der Anstieg der negativen Elliptizität hängt mit der Größe des B1bI zusammen, das im Komplex mit Calmodulin einen hohen Anteil an Zufallsknäuel beisteuert. Aussagen über absolute Sekundärstrukturanteile sind in Interaktionsstudien basierend auf CD - Spektroskopie kritisch zu sehen, da für deren Berechnung die Proteinkonzentrationen der Interaktionspartner sehr exakt angegeben werden müssen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration ist ein allgemeines Problem der Proteinanalytik und eine einigermaßen zuverlässige Quantifizierung von Peptiden ist nur mit aufwändigen Methoden, wie zum Beispiel der sauren Hydrolyse mit anschließender Kjeldahl - Bestimmung möglich (Kjeldahl, 1883). Eine +/- 20% Abweichung der Proteinkonzentration stellte für die CD - spektroskopische Untersuchung der Proteininteraktion kein Problem dar, da die Proteinlösungen für die Messung der Einzel - und Mischspektren jeweils aus den gleichen Proteinstocklösungen hergestellt wurden. Somit erfolgte die Kalkulation des Summenspektrums auf Grundlage der zuvor gemessenen Einzelspektren. Unter diesen Voraussetzungen konnte jede im Mischspektrum detektierte Änderung der relativen molaren Elliptizität θ im Vergleich zum aus den Einzelspektren berechneten Summenspektrum als Bindeereignis gedeutet werden.

Fluoreszenzspektroskopisch konnten Einflüsse der Peptide auf die Ca²⁺ - abhängige Konformationsänderung des Calmodulins detektiert werden. Ob Veränderungen im Fluoreszenzspektrum aber auf ein Bindungsereignis oder auf die Ca²⁺ - Aufnahme von Calmodulin zurückzuführen sind, konnte mit den Peptid - Badan Messungen nur schwer beurteilt werden.

Mit den $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ Messungen konnten jedoch Änderungen der Badanfluoreszenz auf eine veränderte Ca^{2+} -Affinität zurückgeführt werden. Eine Veränderung wurde für die Bindung aller CNG - Peptide, außer B1b, detektiert. Für die Bindung von A4^{LE} , B1b^{LE} und B1bI wurde eine Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität von Calmodulin gefunden, wohingegen A4 diese leicht erniedrigt. Die A4I - Bindung führte zu einer starken Erniedrigung der Ca^{2+} -Sensitivität von CaM .

Für A4 wurde gezeigt, dass es Ca^{2+} -unabhängig an Calmodulin bindet. Die Änderungen der Emissionseigenschaften, wie sie bei der A4 - Badan Analyse gefunden wurden, sind demnach auf die Konformationsänderung von Calmodulin bei Ca^{2+} -Bindung zurückzuführen. Für die B1b - Badan Analyse ereignet sich die entsprechende Änderung der Fluoreszenzeigenschaft bei sehr niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen. In der $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ Analyse wurde gezeigt, dass Änderungen der Emission in Anwesenheit von B1b durch die Ca^{2+} - Bindung von Calmodulin bei wesentlich höheren Ca^{2+} -Konzentrationen auftreten. Daher ist die Änderung der Fluoreszenzeigenschaft für die B1b - Badan Analyse auf die Bindung von B1b an CaM zurückzuführen. Im Gegensatz zu A4 bindet A4^{LE} Ca^{2+} -abhängig an CaM . Der EC_{50} (Ca^{2+})-Wert der Fluoreszenzänderung, der für die Interaktion von A4^{LE} -Badan mit Calmodulin gefunden wurde liegt höher als der der $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ Bindung an A4^{LE} . Betrachtet man die Rohdaten der Änderungen der Emissionsmaxima der A4^{LE} -Badan- Messungen, kann man erkennen, dass bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen zunächst eine Rotverschiebung und ab 100 nM Ca^{2+} eine Blauverschiebung stattfindet. Dies zeigt, dass es bei diesen Analysen essentiell ist, auch die Rohdaten zu betrachten, denn hier konnten vermutlich zwei Effekte detektiert werden: Bei etwa 30 nM die Bindung von A4^{LE} - Badan an Calmodulin, was mit den $\text{CaM}^{\text{Badan}}$ Daten gut übereinstimmt, ab 100nM Ca^{2+} eine weitere Änderung der Emission, was auf die Konformationsänderung des Calmodulins durch Ca^{2+} -Aufnahme zurückzuführen ist. Auffällig ist dass von 1 μM bis 1 mM Ca^{2+} weiterhin eine Blauverschiebung des Maximums bei den A4^{LE} - Badan Daten detektiert wurde, obwohl Calmodulin bei diesen Ca^{2+} -Konzentrationen normalerweise gesättigt sein sollte. Möglicherweise liegt dies am Einfluss der Peptidbindung auf die Ca^{2+} -Affinität des Calmodulins. B1b^{LE} bindet wie A4^{LE} Ca^{2+} -abhängig an Calmodulin. Die Mutante bindet wie das Wildtyp - Peptid bei sehr geringen Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Art und Weise, wie die LE - Mutante an Calmodulin bindet unterscheidet sich dennoch von der des Wildtyps, denn es wurde gezeigt, dass B1b^{LE} nicht an CaM^{12} und CaM^{34} bindet.

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Fluoreszenzdaten herangezogen werden können, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Peptide auf verschiedene Art und Weise an

Calmodulin binden. Die Peptid - Badan Messungen haben ergeben, dass nur B1b und A4 an CaM¹² und CaM³⁴ binden. Die Spektren der B1b - Bindung an CaM¹² und CaM³⁴ sind dabei deutlich verschieden von denen der A4 - Bindung an CaM¹² und CaM³⁴. Dies zeigt, dass der Reporter Badan durch die Ca²⁺-Aufnahme des Calmodulins bei der B1b - Bindung anders beeinflusst wird, als bei der A4 - Bindung, wie dies auch für die Peptidbindung an Wildtyp - Calmodulin nachgewiesen wurde. Die A4 - Peptide binden demnach Calmodulin anders als die B1b - Peptide. Was bei der Interaktion von B1b - Badan mit Calmodulin im Vergleich zur Interaktion mit den Mutanten CaM¹² und CaM³⁴ auffällig ist, sind die unterschiedlichen Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität bei Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration. Bei der Bindung an Wildtyp - Calmodulin steigt die RFU dramatisch bei Ca²⁺-Erhöhung, während dies bei der CaM¹²- und CaM³⁴-Bindung nicht beobachtet wurde.

Eine solche Veränderung der RFU bei Bindung an Wildtyp - Calmodulin im Vergleich zu den Mutanten, kann nur durch den Einfluß der Ca²⁺- Aufnahme des Calmodulins in der Nähe des Reporters erfolgen. Demnach diene die Peptid - Badan Analyse hier auch dem Nachweis der Bindung der Peptide an die Termini von Calmodulin. Es wurde gezeigt, dass die Ca²⁺- Aufnahme einen großen Einfluß auf die Fluoreszenzeigenschaften des Reporters ausübt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die fluoreszenzspektroskopische Analyse der Calmodulin - Interaktion erste Einblicke geben kann, wie Peptide mit Calmodulin wechselwirken. Damit kann diese Methode andere Daten, wie zum Beispiel Strukturdaten sinnvoll ergänzen. Der Informationsgehalt, der von einer solchen Studie abgeleitet werden kann, hängt von der Position des Reporters ab. Dies wird beim Vergleich der Peptid - Badan Messungen mit den CaM^{Badan} und CaM^{F20W/F93W} Analysen deutlich.

Es wurde auch gefunden, dass bei den CaM^{Badan}- Experimenten die EC₅₀ (Ca²⁺) - Werte, die man erhält nicht mit den Dissoziationskonstanten der EF - Hand Bindemotive der C - und N - terminalen Ca²⁺- Bindestellen gleichzusetzen sind. Der Reporter Badan ist an der Position 35 zwar relativ nahe am N - Terminus von Calmodulin lokalisiert, kann aber dennoch nur eine Ca²⁺- abhängige Konformationsänderung des Gesamtmoleküls wiedergeben. Dem entsprechend wurde für CaM^{Badan} mit 75 nM ein EC₅₀ - Wert detektiert, der etwa fünffach geringer ist als der der N - terminalen Ca²⁺-Bindedomäne. Die Änderungen, die im Vergleich bei der Peptidbindung an Calmodulin detektiert wurden, sind vielmehr auf die Umstrukturierung der zentralen Linkerregion des Calmodulins zurückzuführen. Eine Einführung des Reporters Badan in die EF - Hand Bindedomänen des Calmodulins wurde bisher noch nicht beschrieben. Mit 292 g/mol ist dieser Reporter recht klein, aber für die Kopplung im Bereich der EF - Hand Motive müsste zunächst ein Cystein in die Ca²⁺-

Bindedomänen eingefügt werden und daran anschließend der Farbstoff gekoppelt werden. Es wäre denkbar, dass die Einführung eines Cysteins und von Badan die Ca^{2+} -Affinität der Ca^{2+} -Bindedomänen beeinflusst.

Für die Überprüfung der Ca^{2+} -Bindung in den EF-Hand Motiven wurden daher die Calmodulin-Mutanten CaM^{F20W} und CaM^{F93W} eingesetzt. Die gefundenen EC_{50} -Werte dieser Mutanten in Abwesenheit eines Interaktionspartners stimmten mit den Literaturwerten der Ca^{2+} -Affinität des N- und C-Terminus von Calmodulin überein (zum Beispiel Chin & Means, 2000). Der Nachteil dieser Methode ist, dass mit diesen Mutanten in der Regel nur Peptide für Interaktionsstudien verwendet werden können, die kein Tryptophan besitzen, denn die Überlagerung der Emissionsspektren mehrerer Tryptophane macht die Ergebnisse in den meisten Fällen nicht interpretierbar.

Wie am Beispiel von A4^{LE} -Badan gezeigt wurde, dürfen bei den Fluoreszenzstudien nicht nur die gefitteten Daten betrachtet werden. Es wurde gefunden, dass die EC_{50} (Ca^{2+})-Werte mehrere Veränderungen der Emissionseigenschaften zusammenfassen. Der Vergleich der Ca^{2+} -abhängigen Änderungen der Fluoreszenzemission bei der Analyse der A4-Badan Bindung an Calmodulin mit der B1b-Badan Analyse zeigt auch, dass die Änderungen, die detektiert werden nur innerhalb eines Experiments verglichen werden können. Vergleicht man die Analysen untereinander, wird deutlich, dass beispielsweise die Änderung der Lage des Emissionsmaximums, die bei der A4-Badan Analyse detektiert wurde, viel geringer ausfällt als bei der B1b-Badan Analyse. Dennoch im Vergleich zur Kontrolle beziehungsweise zu den Analysen mit CaM^{12} und CaM^{34} konnte für die A4-Badan Analyse schon eine kleine Verschiebung des Emissionsmaximums als spezifischer Effekt gedeutet werden. Dieser Unterschied in den Analysen ist nicht verwunderlich, da dies ein weiterer Beweis dafür ist, dass die Peptide auf unterschiedliche Art und Weise mit Calmodulin interagieren.

4 Einfluss der Peptidlänge auf die Interaktion mit Calmodulin und Calmodulin - Mutanten

Für alle Experimente wurden pro Kanaluntereinheit zwei verschieden lange Wildtyppeptide verwendet, die jeweils die LQ-Bindestelle und eine unterschiedliche Zahl flankierender Aminosäuren enthalten. Die Annahme, dass die längeren Peptide A4I und B1bI eher native Sekundär- beziehungsweise Tertiärstrukturen ausbilden, konnte nicht bestätigt werden. Für A4 und A4I im Vergleich konnte aber gezeigt werden, dass sich beide Peptide unterschiedlich

in Bezug auf die Ca^{2+} - Abhängigkeit der Bindung und den Einfluß, den die Peptide auf die Konformation des Calmodulins ausüben, verhalten. Während A4 bereits bei 0 Ca^{2+} an Calmodulin bindet, erfolgt die Bindung von A4I erst ab einer Konzentration von etwa 100 nM Ca^{2+} . Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Bindung von A4I die Ca^{2+} - Affinität des Calmodulins senkt, was die schnelle Dissoziation von Calmodulin bei der Desensibilisierung des Kanals begünstigt. Auch für die Peptide B1b und B1bI wurden Unterschiede im Einfluß, den die Peptide auf Calmodulin ausüben, detektiert.

Insgesamt wurden bedeutsame Unterschiede im Verhalten der Peptide derselben Kanaluntereinheit in Abhängigkeit von der Länge bei der Bindung an Calmodulin festgestellt. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Arbeiten basierend auf Interaktionsstudien von Calmodulin mit Peptiden < 30 Aminosäuren der Konsensussequenzen [I, L,V]QXXXXRXXXX [R oder K] herangezogen, komplexe physiologische Aussagen über die Calmodulin - vermittelte Regulation von Ionenkanälen zu treffen. Hierzu gehören zum Beispiel Untersuchungen zur Regulation spannungsgesteuerter Ca^{2+} - Kanäle (Ca_v) des L-, P/Q-, N- und R-Typs (van Petegem et al., 2005; Black et al., 2004; Pate et al., 2000) und spannungsgesteuerter Natriumkanäle (Na_v ; Deschênes et al, 2001; Theoharis et al., 2008). Diese Arbeiten erörtern auf der Basis von Peptid - Interaktionsstudien beispielsweise, ob die Regulation durch Calmodulin die Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals erhöhen kann oder inhibitorische Funktionen erfüllt. In dieser Arbeit, aber auch in früheren Untersuchungen, konnte gezeigt werden, dass aber auch Sequenzen, die außerhalb der [I, L,V] Q - Bindestellen liegen für die Calmodulin Interaktion notwendig sein können (Pate et al., 2000; Soldatov et al., 1998), was bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muß. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass bereits der Austausch von Tryptophan C -terminal der LQ - Bindestelle von A4, deutlichen Einfluß auf die Interaktion mit Calmodulin nimmt. Für die CNG A2 Untereinheit des olfaktorischen CNG - Kanals wurde in früheren Arbeiten beschrieben, dass diese im N - Terminus eine Sequenz FQRIVRLVGVIRDW besitzt, die für die Calmodulin - Bindung hinreichend ist (Trudeau & Zagotta, 2003; Chen & Yau, 1994). In der Tat fällt beim Vergleich der Sequenzen auf, dass auch die A4 - Sequenz LQHVNKRLERRVIDW einige Homologien zu dieser Sequenz aufweist (Q, RL, VI, DW) und möglicherweise spielt das Tryptophan (W) eine Rolle bei der Bindung an Calmodulin.

5 Einfluss der LQ - Bindestelle auf die Ca^{2+} - Abhängigkeit der Calmodulinbindung

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Aminosäuren Leucin (L) und Glutamin (Q) der LQ - Bindestellen der A4 - und B1b - Untereinheit nicht, wie angenommen (Bradley et al., 2004; Trudeau & Zagotta, 2003) für die Calmodulin - Bindung verantwortlich sind. Die Mutanten B1b^{LE} und A4^{LE}, deren Leucin durch Glutaminsäure (E) ersetzt wurde, können an Calmodulin binden. Unterschiede in der Bindung an Calmodulin wurden aber in der Ca^{2+} - Abhängigkeit der Bindung detektiert. Während die Wildtyppeptide A4 und B1b auch an teilligandiertes Calmodulin binden können, wurde für die LE - Mutanten gezeigt, dass diese nur mit Wildtyp - Calmodulin wechselwirken. Die Peptide interagieren demnach nur mit vollligandiertem Calmodulin. Für die Bindung von A4^{LE} ergibt sich daraus noch ein weiterer Unterschied im Vergleich zum Wildtyp, da A4 auch Ca^{2+} - unabhängig an Calmodulin bindet. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die LE - Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp - Peptiden die Ca^{2+} - Affinität des Calmodulins erhöhen.

Elektrophysiologisch konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass heterolog exprimierte CNG - Kanäle, in denen eine modulatorische Untereinheit einen entsprechenden L → E Austausch in der Calmodulinbindestelle trägt, nicht mehr durch Calmodulin inhibiert werden (Bradley et al., 2005; Bradley et al., 2004). Daraufhin wurde postuliert, dass die Aminosäuren Leucin (L) und Glutamin (Q) für die Calmodulinbindung essentiell sind. Dies wurde in dieser Arbeit widerlegt. Es wurde vielmehr gezeigt, dass bei Kanälen, deren B1b - Untereinheit diese Mutation trägt, die Präassoziation des Calmodulins im Ruhezustand des Kanals verhindert wird, da Calmodulin für die Interaktion mit dem LE - Motiv vollligandiert vorliegen muß. Unter physiologischen Bedingungen ist der N - Terminus des Calmodulins jedoch erst zwischen 0,1 - 1 μM Ca^{2+} gesättigt, so dass am Ruhepotential kein vollligandiertes CaM zur Verfügung steht. Bei Kanälen deren A4 - Untereinheit diese Mutation trägt, könnte die Änderung der Ca^{2+} - Affinität des Calmodulins bei Bindung an die LE - Domäne dafür verantwortlich sein, dass die schnelle Desensibilisierung nicht mehr möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung an ein LE - Motiv die Ca^{2+} - Affinität des Calmodulins erhöht. Hingegen wurde für die Bindung von A4I gezeigt, dass die Ca^{2+} - Affinität des Calmodulins bei Bindung verringert wird. Eine solche Veränderung beeinflusst die Ca^{2+} - abhängige Änderung der Calmodulinkonformation.

Möglicherweise bewirkt aber der Aminosäureaustausch auch, dass die Calmodulin - Bindestelle in einer veränderten Konformation vorliegt, denn wie in der vorliegenden Arbeit auch die Untersuchung der A4^W-Mutante gezeigt hat, kann schon der Austausch einer einzelnen Aminosäure wesentlich die Bindung an Calmodulin beeinflussen. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass beide Bindestellen der heterolog exprimierten Kanäle nicht mehr ausreichend funktionstüchtig sind für die schnelle Inhibition durch Calmodulin.

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Resultate erweitern das Wissen, wie die Empfindlichkeit und somit Aktivierbarkeit von Ionenkanälen durch Calmodulin reguliert wird. Die verwendeten spektroskopischen Methoden können aber keine hochauflösende Strukturanalyse ersetzen und wie die in der Arbeit verwendeten Peptide genau an Calmodulin binden, kann zukünftig nur durch NMR - (*nuclear magnetic resonance*) oder Röntgenstruktur - Analyse endgültig geklärt werden. Die Vorbereitungen für solche Analysen sind relativ aufwändig und deshalb konnten diese Methoden im Rahmen der Arbeit nicht mehr angewendet werden.

Eine Alternative, wie die Interaktion von Calmodulin mit den modulatorischen Untereinheiten CNG B1b und A4 fluoreszenzbasiert in Zellen nachgewiesen werden kann, bietet die FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) - Methode (Förster, 1948; Lakowicz, 1999). Die FRET - basierte Analyse könnte bei der Markierung der modulatorischen Untereinheiten an geeigneter Stelle in der Nähe der Calmodulin - Bindestellen mit jeweils dem Donor - oder dem Akzeptorfluorophor zeigen, ob sich die Domänen bei der Desensibilisierung durch Calmodulin nähern.

Die Analyse der Calmodulinkomplexe mit den CNG B1b und A4 - Peptiden mittels analytischer Ultrazentrifugation bei verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen wird in zukünftigen Versuchen zeigen, unter welchen Bedingungen sich der stabilste Dreierkomplex aus den Partnern bildet. Bei dieser Ca²⁺-Konzentration kann dann in einem Gleichgewichtslauf die genaue molare Masse und somit exakte Zusammensetzung dieses Komplex bestimmt werden.

VI Literatur

Adelman, J.P. & Herson, P.S., 2004. Making scents of olfactory adaptation. *Nat. Neurosci.* **7** (7): 689-690.

Atkins, P.W. & de Paula, J., 2008. Kurzlehrbuch Physikalische Chemie. Vierte Auflage. Wiley Vch, Weinheim.

Atkins, W.M. & Sligar, S.G., 1990. Tyrosine-96 as a natural spectroscopic probe of the Cytochrome P-450 cam active site. *Biochemistry.* **29** (5): 1271-1275.

Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R. & Cook, W.J., 1985. Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* **315** (6014): 37-40.

Babu, Y.S., Bugg, C.E. & Cook, W.J., 1988. Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol.* **204** (1): 191-204.

Bähler, M., Kroschewski, R., Stöffler, H.E. & Behrmann, T., 1994. Rat myr 4 defines a novel subclass of myosin I: identification, distribution, localization, and mapping of calmodulin-binding sites with differential calcium sensitivity. *J Cell Biol.* **126** (2): 375-389.

Bähler, M. & Rhoads, A., 2002. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.* **513** (1): 107-13.

Bakalyar, H. A. & Reed, R. R., 1990. Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* **250**: 1403-1406.

Balasubramanian, S., Lynch, J. W. & 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. *J Membrane Biol.* **152**: 13-23.

Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Lipp, P., 1998. Calcium - a life and death signal. *Nature* **395** (6703): 645-648.

Biel, M., 2009. Cyclic nucleotide-regulated cation channels. *J. Biol. Chem.* **284** (14): 9017-9021.

- Black, D.J., Halling, D.B., Mandich, D.V., Pedersen, S.E., Altschuld, R.A. & Hamilton, S.L., 2005. Calmodulin interactions with IQ peptides from voltage-dependent calcium channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* **288** (3):C669-676.
- Boccaccio, A., Lagostena, L., Hagen, V. & Menini, A., 2006. Fast adaptation in mouse olfactory sensory neurons does not require the activity of phosphodiesterase. *J. Gen. Physiol.* **128** (2): 171-184.
- Boekhoff, I. & Breer, H., 1992. Termination of second messenger signaling in olfaction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**: 471–474.
- Boenigk, W., Bradley, J., Muller, F., Sesti, F., Boekhoff, I., Ronnett, G. V., Kaupp, U. B. & Frings, S., 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. & Snyder, S. H., 1992. Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *J. Neurosci.* **12**: 915-923.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Bradley, J., Li, J., Davidson, N., Lester, H.A. & Zinn, K., 1994. Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (19): 8890-8894.
- Bradley, J., Reuter, D. & Frings, S., 2001. Facilitation of calmodulin-mediated odor adaptation by cAMP-gated channel subunits. *Science* **294** (5549): 2176-2178.
- Bradley, J., Böningk, W., Yau, K.-W. & Frings, S., 2004. Calmodulin permanently associates with rat olfactory CNG-channels under native conditions. *Nature Neurosci.* **7**: 705-710.
- Bradley, J., Reisert, J. & Frings, S., 2005. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Current Opinion in Neurobiology* **15**:343–349.
- Brahms, S. & Brahms, J., 1980. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol.* **138** (2): 149-178.

- Breer, H., Boekhoff, I. & Tareilus, E., 1990. Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* **345**: 65-68.
- Breer, H., Raming, K. & Krieger, J. 1994. Signal recognition and transduction in olfactory neurons. *Biochim. Biophys. Acta.* **1224**: 227-287.
- Breipohl, W., Mackay-Sim, A., Grandt, D., Rehn, B. & Darrelmann, C., 1986. Neurogenesis in the vertebrate main olfactory epithelium. In: W. Breipohl (ed.). *Ontogeny of Olfaction*. Berlin: Springer -Verlag, pp 21-33.
- Buck, L., Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odor recognition: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**: 175.
- Callis, P.R., 1997. 1La and 1Lb transitions of tryptophan: applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins. *Methods Enzymol.* **278**: 113-150.
- Campbell, N.A., 1997. *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Cantor, C.R. & Schimmel, P.R., 1980. *Biophysical Chemistry*. New York, Freeman.
- Carey, R.M., Verhagen, J.V., Wesson ,D.W., Pérez, N. & Wachowiak, M., 2009. Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. *J. Neurophysiol.* **101** (2): 1073-1088.
- Carr, V. M. & Farbman, A. I., 1993. The dynamics of cell death in the olfactory epithelium. *Exp. Neurol.* **124**: 308-314.
- Castillo, K., Delgado, R. & Bacigalupo, J., 2007. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in the cilia of olfactory receptor neurons: possible role in Ca^{2+} clearance. *Eur J Neurosci.* **26** (9): 2524-2531.
- Chattopadhyaya, R., Meador, W.E., Means, A.R. & Quioco, F.A., 1992. Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol.* **228** (4): 1177-1192.
- Chen, T.Y. & Yau, K.W., 1994. Direct modulation by Ca^{2+} -calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature* **368** (6471): 545-548.

- Chin, D. & Means, A.R., 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* **10** (8): 322-328. Erratum in: *Trends Cell Biol* 2000 (**10**): 428.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162** (1): 156-159.
- Chou, J.J., Li, S., Klee, C.B. & Bax, A., 2001. Solution structure of Ca²⁺ calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains. *Nat Struct Biol.* **8** (11): 990-997.
- Colbert, H.A. & Bargmann, C.I., 1995. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. Elegans*. *Neuron* **14**: 803-812.
- Cowgill, R.W., 1967. Fluorescence and the structure of proteins. XII. Pancreatic trypsin inhibitor. *Biochim Biophys Acta.* **140** (3): 552-554.
- Craven, K.B. & Zagotta, W.N., 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol.* **68**: 375-401.
- Craven, K.B., Olivier, N.B. & Zagotta, W.N., 2008. C-terminal movement during gating in cyclic nucleotide-modulated channels. *J Biol Chem.* **283** (21): 14728-14738.
- Dalton, P., Psychophysical and Behavioral Characteristics of Olfactory Adaptation. *Chem. Senses* **25**: 487-492, 2000.
- Dalton, P., Wysocki, C.J., Brody, M.J. & Lawley, H.J., 1997. Perceived odor, irritation, and health symptoms following short-term exposure to acetone. *Am J Ind Med.* **31** (5):558-569.
- Danaceau, J.P. & Lucero, M.T., 2000. Electrogenic Na⁺ /Ca²⁺ exchange. A novel amplification step in squid olfactory transduction. *J Gen Physiol.* **115** (6):759-768.
- Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F. & George, J. M., 1998. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **273**: 9443-9449.
- Dawson, T.M., Arriza, J.L., Jaworsky, D.E., Borisy, F.F., Attramadal, H., Lefkowitz, R.J. & Ronnett, G.V., 1993. β -Adrenergic receptor kinase-2 and β -arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitization. *Science* **259**: 825-829.

- Deschênes, I., Trottier, E. & Chahine, M., 2001. Implication of the C-terminal region of the alpha-subunit of voltage-gated sodium channels in fast inactivation. *J Membr Biol.* **183** (2):103-114.
- Dhallan, R.S., Yau, K.W., Schrader, K.A. & Reed, R.R., 1990. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* **347** (6289):184-187.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W., 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16** (13): 6127-6145.
- Drake, S.K. & Falke, J.J., 1996. Kinetic tuning of the EF-hand calcium binding motif: the gateway residue independently adjusts (i) barrier height and (ii) equilibrium. *Biochemistry* **35** (6): 1753-1760.
- Duchamp-Viret, P., Chaput, M.A. & Duchamp, A., 1999. Odor Response Properties of Rat Olfactory Receptor Neurons. *Science* **284**: 2171-2174.
- Dzeja, C., Hagen, V., Kaupp, U.B., Frings, S. (1999) Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* **18**, 131-144.
- Erickson, M.G., Alseikhan, B.A., Peterson, B.Z. & Yue, D.T., 2001. Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca²⁺ channels revealed by FRET in single living cells. *Neuron* **31** (6): 973-985.
- Farbman, A. I., 1990. Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosc.* **13**: 362-365.
- Ferguson, S.S., 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* **53** (1):1-24.
- Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. & Lyubarsky, A.L., 1985. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313** (6000): 310-313.
- Finn, B.E., Evenäs, J., Drakenberg, T., Waltho, J.P., Thulin, E. & Forsén, S., 1995. Calcium-induced structural changes and domain autonomy in calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* **2** (9): 777-783.

- Firestein, S., Zufall, F., & Shepherd, G. M., 1991. Single odor-sensitive channels in olfactory receptor neurons are also gated by cyclic nucleotides. *J. Neurosci.* **11**: 3565-3572.
- Firestein, S., 1992. Electrical signals in olfactory transduction. *Curr Opin Neurobiol.* **2** (4): 444-448.
- Firestein, S., Picco, C. & Menini A, 1990. The relation between stimulus and response in olfactory receptor cells of the tiger salamander. *J Physiol.* **468**: 1-10.
- Firestein, S., 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* **413**: 211-218.
- Förster, T., 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik* **6** (2): 55.
- Freitag, J., Ludwig, G., Andreini, I., Rössler, P. & Breer, H., 1998. Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *J. Comp. Physiol.* **183**: 635-650.
- Friedberg, F., 1990. Species comparison of calmodulin sequences. *Protein Seq Data Anal.* **3** (4): 335-337.
- Friedberg, F. & Rhoads, A.R., 1994. Calmodulin's warm embrace. *Bioessays* **16** (11): 853-855.
- Friedberg, F., Saunders, A.A. & Rhoads, A.R., 2003. Conservation of the 3'-untranslated regions of calmodulin mRNAs in cetaceans. *Mol Biol Rep.* **30** (3): 193-198.
- Frings, S., Lynch, J. W., & Lindemann, B., 1992. Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity and blockage. *J. Gen. Physiol.* **100**: 45-67.
- Frings, S., 1999. Tuning Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *J. Gen. Physiol.* **113**: 795-797.
- Galla, H.J., 1988. Spektroskopische Methoden in der Biochemie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Getchell, M. L. & Mellert, T. K., 1991. Olfactory mucus secretion, in: *Smell and Taste in Health and Disease*, Getchell, T. V., Doty, R., Bartoshuk, L. & Snow, J. B. (eds.), pp 83-95. Raven Press, New York.

Getchell, T. V. & Getchell, M. L., 1982. Physiology of Vertebrate Olfactory Chemoreception, in: *Fragrance Chemistry*, pp 1-25, Academic Press, Inc., New York.

Gill, S.C. & von Hippel, P.H., 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182** (2): 319-326. *Erratum in: Anal. Biochem.*, 1990: **189** (2): 283.

Greenfield, N. & Fasman, G.D., 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* **8** (10): 4108-4116.

Greenfield, N.J., 1996. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem.* **235** (1):1-10.

Grunwald, M.E., Zhong, H., Lai, J. & Yau, K.W., 1999. Molecular determinants of the modulation of cyclic nucleotide-activated channels by calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96** (23): 13444-13449.

Grynkiewicz, G.; Poenie, M. & Tsien, R. Y., 1985. A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Fluorescence Properties. *J. Biol. Chem.* **260** (6): 3440 - 3450.

Guy, H.R., Durell, S.R., Warmke, J., Drysdale, R. & Ganetzky, B., 1991. Similarities in amino acid sequences of *Drosophila* eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Science.* **254** (5032): 730.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166** (4): 557-580.

Hofmann, F., Biel, M. & Kaupp, U.B., 2005. International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and structure-function relationships of cyclic nucleotide-regulated channels.

Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B. & Bax, A., 1992. Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* **256** (5057): 632-638.

- Johnson, J.P. Jr & Zagotta, W.N., 2005. The carboxyl-terminal region of cyclic nucleotide-modulated channels is a gating ring, not a permeation path. *Proc Natl Acad Sci U SA* **102** (8): 2742-2747.
- Jones, D. T. & Reed, R. R., 1989. G_{olf}: an olfactory neuron-specific G-Protein involved in odorant signal transduction. *Science* **244**: 790-795.
- Kaneko, H., Putzier, I., Frings, S., Kaupp, U.B. & Gensch, T., 2004. Chloride accumulation in Mammalian olfactory sensory neurons. *J Neurosci* **24** (36): 7931-7938.
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H. & Hirose, T., et al., 1989. Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342** (6251): 762-766.
- Kaupp, U.B. & Seifert, R., 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* **82** (3): 769-824.
- Kawai, F., Kurahashi, T. & Kaneko, A., 1997. Quantitative analysis of Na²⁺ and Ca²⁺ current contributions on spike initiation in the newt olfactory receptor cell. *Jap. J. Physiol.* **47**: 367-376.
- Kay, L.M. & Laurent, G., 1999. Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. *Nat Neurosci.* **2** (11): 1003-1009.
- Keen, J.E., Khawaled, R., Farrens, D.L., Neelands, T., Rivard, A., Bond, C.T., Janowsky, A., Fakler, B., Adelman, J.P. & Maylie, J., 1999. Domains responsible for constitutive and Ca²⁺-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca²⁺activated potassium channels. *J Neurosci.* **19** (20): 8830-8838.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta.* **1751** (2): 119-139.
- Kleene, S.J., 1999. Both external and internal calcium reduce the sensitivity of the olfactory cyclic-nucleotide-gated channel to cAMP. *J Neurophysiol.* **81** (6): 2675-2682.

- Kleinschmidt, J.H., Wiener, M.C. & Tamm, L.K., 1999. Outer membrane protein A of *E. coli* folds into detergent micelles, but not in the presence of monomeric detergent. *Protein Sci.* **8** 2065-2071.
- Klevit, R.E., 1983. Spectroscopic analyses of calmodulin and its interactions. *Methods Enzymol.* **102**: 82-104.
- Köster, E.P., 1971. Adaptation and cross-adaptation in olfaction. Dissertation, *University of Utrecht*.
- Kramer, R.H. & Siegelbaum, S.A., 1992. Intracellular Ca^{2+} regulates the sensitivity of cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor neurons. *Neuron* **9** (5): 897-906.
- Kretsinger, R.H. & Nockolds, C.E., 1973. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem.* **248** (9):3313-3326.
- Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C.B. & Bax, A., 1995. Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat Struct Biol.* **2** (9): 768-776.
- Kurahashi, T. & Yau, K.-W., 1993. Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* **363**: 71-74.
- Kurahashi, T. & Menini, A., 1997. Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature* **385** (6618): 725-9.
- Kwon, H.J., Koo, J.H., Zufall, F., Leinders-Zufall, T. & Margolis, F.L., 2009. Ca extrusion by NCX is compromised in olfactory sensory neurons of OMP mice. *PLoS One.* **4** (1): e4260.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680-685.
- Lakowicz, J. R., 1983. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York.
- Lakowicz, J., 1999. *Protein fluorescence. In: Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Kluwer Academic.

- Leinders-Zufall, T., Greer C.A., Shepherd, G.M. & Zufall, F., 1998. Imaging odor-induced calcium transients in single olfactory cilia: specificity of activation and role in transduction. *J Neurosci* **18** (15):5630-5639.
- Leinders-Zufall, T., Ma, M. & Zufall, F., 1999. Impaired Odor Adaptation in Olfactory Receptor Neurons after Inhibition of Ca²⁺/Calmodulin Kinase II. *J Neurosci* **19** (14): RC19.
- Leinders-Zufall, T., Greer, C.A., Shepherd, G.M. & Zufall, F., 1999. Visualizing odor detection in olfactory cilia by calcium imaging. *Ann N Y Acad Sci.* **855**: 205-207.
- Lewit-Bentley, A. & Réty, S., 2000. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol.* **10** (6): 637-643.
- Liman, E.R. & Buck, L.B., 1994. A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* **13** (3): 611-621.
- Linse, S., Helmersson, A. & Forsén, S., 1991. Calcium binding to calmodulin and its globular domains. *J Biol Chem.* **266** (13): 8050-8054.
- Lischka, F.W. & Schild, D., 1993. Standing calcium gradients in olfactory receptor neurons can be abolished by amiloride or ruthenium red. *J Gen Physiol.* **102** (5): 817-831.
- Liu, M., Chen, T.Y., Ahamed, B., Li, J. & Yau, K.W., 1994. Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Science* **266** (5189): 1348-1354. Erratum in: *Science* **266** (5193): 1933.
- Lowe, G. & Gold, G. H., 1993. Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* **366**: 283-286.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (Hrsg.), 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lucero, M.T., Huang, W. & Dang, T., 2000. Immunohistochemical evidence for the Na⁺/Ca²⁺- exchanger in squid olfactory neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **355** (1401): 1215-1218.
- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D. & Kaupp, U.B., 1990. Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* **270** (1-2): 24-29.

- Lynch, J.W. & Lindemann, B., 1994. Cyclic nucleotide-gated channels of rat olfactory receptor cells: divalent cations control the sensitivity to cAMP. *J. Gen. Physiol.* **103** (1): 87-106.
- Ma, M., Chen, W.R. & Shepherd, G.M., 1999. Electrophysiological characterization of rat and mouse olfactory receptor neurons from an intact epithelial preparation. *J Neurosci Methods.* **92** (1-2): 31-40.
- Mashukova, A., Spehr, M., Hatt, H. & Neuhaus, E.M., 2006. Beta-arrestin2-mediated internalization of mammalian odorant receptors. *J Neurosci.* **26** (39): 9902-9912.
- Matthews, H.R. & Reisert, J., 2003. Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation. *Curr Opin Neurobiol.* **13** (4): 469-475.
- Matulef, K. & Zagotta, W.N., 2003. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **19**: 23-44.
- Mayer, U., 2008. Dissertation. Charakterisierung des Proteoms olfaktorischer Cilien zur Identifizierung von Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen der Ratte. Universität Heidelberg.
- Meador, W.E., Means, A.R. & Quioco, F.A., 1993. Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures. *Science* **262** (5140): 1718-1721.
- Menco, B. P. M., 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**: 5-30.
- Menco, B.P., 2005. The fine-structural distribution of G-protein receptor kinase 3, beta-arrestin-2, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and phosphodiesterase PDE1C2, and a Cl^- -cotransporter in rodent olfactory epithelia. *J Neurocytol.* **34** (1-2): 11-36.
- Menini, A., 1995. Cyclic nucleotide-gated channels in visual and olfactory transduction. *Biophys Chem.* **55** (3): 185-96.
- Menini, A., 1999. Calcium signalling and regulation in olfactory neurons. *Curr Opin Neurobiol.* **9** (4): 419-426.

- Menini, A., Lagostena, L. & Boccaccio, A., 2004. Olfaction: from odorant molecules to the olfactory cortex. *News Physiol Sci.* **19**: 101-104.
- Meyer M. R., Angele A., Kremmer E., Kaupp U. B. & Muller F., 2000. A cGMP signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10595–10600.
- Mirzoeva, S., Weigand, S., Lukas, T.J., Shuvalova, L., Anderson, W.F., & Watterson, D.M., 1999. Analysis of the functional coupling between Calmodulin's calcium binding and peptide recognition properties. *Biochemistry* **38** (42): 14117-14118.
- Mücke, N., 2008. Dissertation. Biophysikalische Untersuchung des muskelspezifischen Intermediärfilament-Proteins Desmin und Mutanten. Medizinische Fakultät Mannheim/Universität Heidelberg.
- Müller, W.A. & Frings, S., 2006. Tier- und Humanphysiologie. Dritte überarbeitete Auflage, Springer Verlag, Berlin.
- Myer, Y.P., 1970. A new method for the conformational analysis of proteins and polypeptides from circular dichroism spectra. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **1** (5): 607-616.
- Nakamura, T. & Gold, G. H., 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**: 442-444.
- Nelson, M.R. & Chazin, W.J., 1998. Structures of EF-hand Ca^{2+} - binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca^{2+} binding. *Biometals* **11** (4): 297-318.
- Nelson, M.R. & Chazin, W.J. 1998. An interaction-based analysis of calcium-induced conformational changes in Ca^{2+} sensor proteins. *Protein Sci.* **7** (2): 270-282.
- Ogawa, Y. & Tanokura, M., 1984. Calcium binding to calmodulin: effects of ionic strength, Mg^{2+} pH and temperature. *J Biochem.* **95** (1): 19-28.
- O'Neil, K.T. & DeGrado, W.F., 1990. How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices. *Trends Biochem Sci.* **15** (2): 59-64.
- Orsale, M., Melino, S., Contessa, G.M., Torre, V., Andreotti, G., Motta, A., Paci, M., Desideri, A. & Cicero, D.O., 2003. Two distinct calcium-calmodulin interactions with N-

terminal regions of the olfactory and rod cyclic nucleotide-gated channels characterized by NMR spectroscopy. *FEBS Lett.*; **548** (1-3): 11-16.

Osawa, M., Kuwamoto, S., Izumi, Y., Yap, K.L., Ikura, M., Shibamura, T., Yokokura, H., Hidaka, H. & Matsushima, N., 1999. Evidence for calmodulin inter-domain compaction in solution induced by W-7 binding. *FEBS Lett.* **442** (2-3):173-177.

Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T., 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4** (11): 2411-2423.

Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y. & 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., Serysheva, I.I., Williams, B.Y., Anderson, M.E. & Hamilton, S.L., 2000. Determinants for calmodulin binding on voltage-dependent Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* **275** (50): 39786-39792.

Peersen, O.B., Madsen, T.S. & Falke, J.J., 1997. Intermolecular tuning of calmodulin by target peptides and proteins: differential effects on Ca²⁺ binding and implications for kinase activation. *Protein Sci.* **6** (4): 794-807.

Pelosi, P. 1994. Odorant-binding proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**: 199-228.

Pelton, J.T. & McLean, L.R., 2000. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem.* **277** (2):167-76.

Peppel, K., Boekhoff, I., McDonald, P., Breer, H., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J., 1997. G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **272**: 25425–25428.

Pfeuffer, E., Mollner, S., Lancet, D. & Pfeuffer, T., 1989. Olfactory adenylyl cyclase. Identification and purification of a novel enzyme form. *J. Biol. Chem.* **264**: 18803-18807.

Philo, J.S., 2000. Sedimentation equilibrium analysis of mixed associations using numerical constraints to impose mass or signal conservation. *Methods Enzymol.* **321**: 100-120.

Picco, C., Sanfilippo, C., Gavazzo, P. & Menini, A., 1996. Modulation by internal protons of native cyclic nucleotide-gated channels from retinal rods. *J Gen Physiol.* **108** (4): 265-276.

- Pifferi, S., Boccaccio, A. & Menini, A., 2006. Cyclic nucleotide-gated ion channels in sensory transduction. *FEBS Lett.* **580** (12): 2853-2859.
- Pitt, G.S., Zühlke, R.D., Hudmon, A., Schulman, H., Reuter, H. & Tsien, R.W., 2001. Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* **276** (33): 30794-30802.
- Porter, J., Craven, B., Khan, R.M., Chang, S.J., Kang, I., Judkewitz, B., Volpe, J., Settles, G. & Sobel, N., 2007. Mechanisms of scent-tracking in humans. *Nat Neurosci.* **10** (1): 27-29. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2007 Feb;10 (2): 263. Judkewicz, Benjamin [corrected to Judkewitz, Benjamin].
- Potter, J.D., Strang-Brown, P., Walker, P.L. & Iida, S., 1983. Ca²⁺ binding to calmodulin. *Methods Enzymol.* **102**: 135-143.
- Putkey, J.A., Kleerekoper, Q., Gaertner, T.R. & Waxham, M.N., 2003. A new role for IQ motif proteins in regulating calmodulin function. *J Biol Chem.* **278** (50): 49667-49670.
- Reed, J. & Reed, T.A., 1997. A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem.* **254** (1): 36-40.
- Reisert, J. & Matthews, H.R., 1998. Na⁺-dependent Ca²⁺ extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells. *J Gen Physiol.* **112** (5): 529-535.
- Reisert, J., Lai, J., Yau, K.W. & Bradley, J., 2005. Mechanism of the excitatory Cl⁻ response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron* **45** (4): 553-561.
- Reisert, J. & Matthews, H.R., 2000. Adaptation-induced changes in sensitivity in frog olfactory receptor cells. *Chem. Senses* **25** (4): 483-486.
- Reisert, J., Yau, K.W. & Margolis, F.L., 2007. Olfactory marker protein modulates the cAMP kinetics of the odour-induced response in cilia of mouse olfactory receptor neurons. *J Physiol.* **585** (Pt 3): 731-740.
- Reuter, D., Zierold, K., Schroeder, W. & Frings, S., 1998. A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. *J. Neurosci.* **18**: 6623-6630.

- Rhoads, A.R. & Friedberg, F., 1997. Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* **11** (5): 331-340.
- Robinson, R.B. & Siegelbaum, S.A., 2002. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol.* **65**: 453-480.
- Saimi, Y. & Kung, C., 2002. Calmodulin as an ion channel subunit. *Annu Rev Physiol.* **64**: 289-311.
- Sambrook & Russell, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sautter, A., Zong, X., Hofmann, F. & 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** (8): 4696-4701.
- Schaffner, W. & Weissmann, C., 1973. A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**: 502-514.
- Schild, D. & Restrepo, D., 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.* **78**: 429-466.
- Schleicher, S., Boekhoff, I., Arriza, J., Lefkowitz, R.J. & Breer, H., 1993. A β -adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**: 1420-1424.
- Schmitt, B.C. & Ache, B.W., 1979. Olfaction: Responses of a Decapod Crustacean Are Enhanced by Flicking. *Science.* **205** (4402): 204-206.
- Schore, N.E. & Vollhardt, K.P.C., 1995. *Organische Chemie*. Zweite korrigierte Auflage. Wiley-VCH, Weinheim.
- Sinnarajah, S., Dessauer, C.W., Srikumar, D., Chen, J., Yuen, J., Yilma, S., Dennis, J.C., Morrison, E.E., Vodyanoy, V. & Kehrl, J.H., 2001. RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature* **409** (6823): 1051-1055.

Sipior, J. & Sulkes, M., 1988. Spectroscopy of tryptophan derivatives in supersonic expansions: Addition of solvent molecules. *J. Chem. Phys.* **88**: 6146-6156.

Sklar, P. B., Anholt, R. R. & Snyder, S. H., 1986. The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells: differential stimulation by distinct classes of odorants. *J. Biol. Chem.* **261**: 15538-15543.

Soldatov, N.M., Oz, M., O'Brien, K.A., Abernethy, D.R. & Morad, M., 1998. Molecular determinants of L-type Ca²⁺ channel inactivation. Segment exchange analysis of the carboxyl-terminal cytoplasmic motif encoded by exons 40-42 of the human alpha1C subunit gene. *J Biol Chem.* **273** (2): 957-963.

Song, Y., Cygnar, K.D., Sagdullaev, B., Valley, M., Hirsh, S., Stephan, A., Reisert, J. & Zhao, H., 2008. Olfactory CNG channel desensitization by Ca²⁺ /CaM via the B1b subunit affects response termination but not sensitivity to recurring stimulation. *Neuron* **58** (3):374-386.

Spors, H., Wachowiak, M., Cohen, L.B. & Friedrich, R.W., 2006. Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. *J Neurosci.* **26** (4): 1247-1259.

Stafford, W.F., 1992. 3rd. Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile. *Anal Biochem.* **203** (2): 295-301.

Steiner, R.F. & Kolinski, R., 1986. The phosphorescence of oligopeptides containing tryptophan and tyrosine. *Biochemistry.* **7** (3): 1014-1018.

Steiner, R.F. & Kirby, E.P., 1969. The interaction of the ground and excited states of indole derivatives with electron scavengers. *J Phys Chem.* **73** (12): 4130-4135.

Stone, H., Pryor, G.T. & Steinmetz, G., 1972. A comparison of olfactory adaptation among seven odorants and their relationship with several physicochemical properties. *Percept Psychophys.* **12**: 501-504.

Strock, J. & Diversé-Pierluissi, M.A., 2004. Ca²⁺ channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons. *Mol. Pharmacol.* **66** (5): **1071-1076**.

- Stryer, L., 1968. Fluorescence spectroscopy of proteins. *Science*. **162** (853): 526-533.
- Tadross, M.R., Dick, I.E. & Yue D.T., 2008. Mechanism of local and global Ca^{2+} sensing by calmodulin in complex with a Ca^{2+} channel. *Cell* **133** (7): 1228-1240.
- Tang, C.Y. & Papazian, D.M., 1997. Transfer of voltage independence from a rat olfactory channel to the *Drosophila* ether-à-go-go K^+ channel. *J Gen Physiol*. **109** (3): 301-311.
- Tang, W., Halling, D.B., Black, D.J., Pate, P., Zhang, J.Z., Pedersen, S., Altschuld, R.A. & Hamilton, S.L., 2003. Apocalmodulin and Ca^{2+} calmodulin-binding sites on the $\text{Ca}_v1.2$ channel. *Biophys J*. **85** (3): 1538-1547.
- Taraska, J.W. & Zagotta, W.N., 2007. Structural dynamics in the gating ring of cyclic nucleotide-gated ion channels. *Nat Struct Mol Biol*. **14** (9): 854-860.
- Theoharis, N.T., Sorensen, B.R., Theisen-Toupal, J. & Shea, M.A., 2007. The neuronal voltage-dependent sodium channel type II IQ motif lowers the calcium affinity of the C-domain of calmodulin. *Biochemistry*. **47** (1): 112-123.
- Thesen, A., Steen, J.B. & Døving, K.B., 1993. Behaviour of dogs during olfactory tracking. *J Exp Biol*. **180**: 247-251.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* **24**: 145-149.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76** (9): 4350-4354.
- Trotier, D., 1998. Electrophysiological properties of frog olfactory supporting cells. *Chem. Senses* **23**: 363-369.
- Trudeau, M.C. & Zagotta, W.N., 2003. Calcium/calmodulin modulation of olfactory and rod cyclic nucleotide-gated ion channels. *J Biol Chem*. **278** (21): 18705-18708.

- Trudeau, M.C. & Zagotta, W.N., 2004. Dynamics of Ca^{2+} -calmodulin-dependent inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels measured by patch-clamp fluorometry. *J Gen Physiol.* **124** (3): 211-223.
- Ungerer, N., 2005. Diplomarbeit. Isolierung und Charakterisierung von Membranproteinen aus Riechzellen der Ratte. Universität Heidelberg.
- Valeyev, N.V., Bates, D.G., Heslop-Harrison, P., Postlethwaite, I. & Kotov, N.V., 2008. Elucidating the mechanisms of cooperative calcium-calmodulin interactions: a structural systems biology approach. *BMC Syst Biol.* **2**: 48.
- Van Eldik, L. J. & Watterson, D. M. in Nelson, M. R. & Chazin, W. J., 1998: *Calmodulin and Signal Transduction*. Seite 17-64, *Academic Press*, San Diego.
- Van Gilst, M. & Hudson, B.S., 1996. Histidine-tryptophan interactions in T4 lysozyme: 'anomalous' pH dependence of fluorescence. *Biophys Chem.* **63** (1): 17-25.
- Van Petegem, F., Chatelain, F.C. & Minor, D.L. Jr., 2005. Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the $\text{Ca}_v1.2$ IQ domain- Ca^{2+} /calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol.* **12** (12): 1108-1115.
- Varnum, M.D. & Zagotta, W.N., 1997. Interdomain interactions underlying activation of cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **278** (5335): 110-113.
- Vetter, S.W. & Leclerc, E., 2003. Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *Eur J Biochem.* **270** (3): 404-414.
- Weeraratne, S.D., Valentine, M., Cusick, M., Delay, R. & Van Houten, J.L., 2006. Plasma membrane calcium pumps in mouse olfactory sensory neurons. *Chem Senses.* **31** (8): 725-730.
- Wei, J., Wayman, G. & Storm, D.R., 1996. Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *J Biol Chem.* **271** (39): 24231-24235.
- Weitz, D., Zoche, M., Müller, F., Beyermann, M., Körschen, H.G., Kaupp, U.B. & Koch, K.W., 1998. Calmodulin controls the rod photoreceptor CNG channel through an

unconventional binding site in the N-terminus of the beta-subunit. *EMBO J.* **17** (8): 2273-2284.

Wesson, D.W., Verhagen, J.V. & Wachowiak, M., 2008. Why sniff fast? The relationship between sniff frequency, odor discrimination, and receptor neuron activation in the rat. *J Neurophysiol.* **101** (2): 1089-1102.

Wesson, D.W., Donahou, T.N., Johnson, M.O. & Wachowiak, M., 2008. Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem Senses.* **33**(7): 581-96.

Wettlaufer, D. B., 1962. *Advances in Protein chemistry.* Acad. Press London.

Wie, J., Zhao, A.Z., Chan, G.C., Baker, L.P., Impey, S., Beavo, J.A. & Storm, D.R., 1998. Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* **21** (3): 495-504.

Winter, R. & Noll, F., 1998. Methoden der biophysikalischen Chemie. Seite 296-300. Verl. B.G. Teuber, Stuttgart.

Woody, R.W., 1994. Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur Biophys J.* **23** (4): 253-262.

Wuttke, M.S., 1999. Olfactory adaptation in *Drosophila melanogaster* larvae. Dissertation, Temple University.

Wuttke, M.S. & Tomkins, L., 2000. Olfactory adaptation is TRP-independent in *Drosophila* larvae. *J. Neurogen.* **14**: 43-62.

Wysocki, C.J., Dalton, P., Brody, M.J. & Lawley, H.J., 1997. Acetone odor and irritation thresholds obtained from acetone-exposed factory workers and from control (occupationally unexposed) subjects. *Am Ind Hyg Assoc J.* **58** (10):704-712.

Yamniuk, A.P. & Vogel, H.J., 2004. Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides. *Mol Biotechnol.* **27** (1): 33-57.

Yan, C., Zhao, A. Z., Bentley, J. K., Loughney, K., Ferguson, K., & Beavo, J. A., 1995. Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9677-9681.

- Youngentob, S.L., Mozell, M.M., Sheehe, P.R. & Hornung, D.E., 1987. A quantitative analysis of sniffing strategies in rats performing odor detection tasks. *Physiol Behav.* **41** (1): 59-69.
- Yuan, T., Walsh, M.P., Sutherland, C., Fabian, H. & Vogel, H.J., 1999. Calcium-dependent and -independent interactions of the calmodulin-binding domain of cyclic nucleotide phosphodiesterase with calmodulin. *Biochemistry.* **38** (5): 1446-1455.
- Zagotta, W.N. & Siegelbaum, S.A., 1996. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci* **19**:235-263.
- Zheng, J., Varnum, M.D. & Zagotta, W.N., 2003. Disruption of an intersubunit interaction underlies Ca²⁺-calmodulin modulation of cyclic nucleotide-gated channels. *J Neurosci.* **23** (22): 8167-8175.
- Zheng, J. & Zagotta, W.N., 2004. Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **42** (3): 411-421.
- Zufall, F., Shepherd, G.M. & Firestein, S., 1991. Inhibition of the olfactory cyclic nucleotide gated ion channel by intracellular calcium. *Proc. Biol. Sci.* **246** (1317): 225-230.
- Zufall, F., Firestein, S. & Shepherd, G. M., 1994. Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* **23**: 577-607.
- Zufall, F. & Leinders-Zufall, T., 2000. The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chem Senses.* **25** (4): 473-481.

VII Abkürzungen

Es wurden die üblichen Abkürzungen des *Système International* und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von Dezimalen und Teilen verwendet.

A	Adenosin
α	anti-
A2	CNG A2 Untereinheit des CNG - Kanals
A4	CNG A4 Untereinheit des CNG - Kanals
Abb.	Abbildung
AC III	<i>Adenylylcyclase III</i>
apoCaM	Apocalmodulin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
Baa	<i>basic amphipathic α-helix</i>
B1b	CNG B1b Untereinheit des CNG – Kanals
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bsp.	Beispiel
Bulbus	Bulbus olfactorius
c	Konzentration
C	Vernetzungsgrad, Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium - Ion
CaM	Calmodulin
cAMP	<i>cyclicAMP</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat
CaM KII	CaM Kinase II
cDNA	Revers transkribierte <i>copyDNA</i>
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CNBD	<i>cyclic nucleotide binding domain</i>

CNG	<i>cyclic nucleotide gated</i>
d	Schichtdicke
D→A	Asparaginsäure → Alanin Austausch
Da	Dalton
DEPC	<u>Di</u> ethylenpyro <u>car</u> bonat
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	<u>D</u> ithio <u>thre</u> ithol
E	Extinktion, Glutaminsäure
Eag	<i>éther-à-go-go</i>
ε	Molarer Extinktionskoeffizient
E _{C50}	Mittlere effektive Konzentration
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<u>E</u> thylend <u>ia</u> mintetra <u>ac</u> etat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
et al.	Et alii
F	Phenylalanin
F20W	Phenylalanin → Tryptophan Austausch an der Aminosäureposition 20
F93W	Phenylalanin → Tryptophan Austausch an der Aminosäureposition 93
g	Gramm
G	Guanin
G _{olf}	Olfaktorisches G – Protein
GRK	<i>G-protein-coupled receptor kinase</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrochlorid
HCN	<i>hyper-polarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel</i>
HEK 293	<i>human embryonic kidney cells 293</i>
<i>His-tag</i>	Histidin-tag
hllh	<i>helix loop helix</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
I	Isoleucin

K ⁺	Kalium - Ion
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
λ	Wellenlänge
l	Liter
L	Leucin
L→E	Leucin → Glutaminsäure Austausch
LB	Luria-Bertani
μ	Mikro
μF	Mikrofarad
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
M	Molar
mA	milli <i>Ampère</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser Desorption/Ionisation-Time of Flight</i>
mdeg	<i>milli degree</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MΩ	Mega Ohm
Mod.	Modifiziert
ms	Millisekunde, Maus
Na ⁺	Natrium - Ion
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatrium Hydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natrium Dihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCX	Natrium/Calcium – Austauscher
ng	Nanogramm
NH ₂ -	Amin-
Ni ²⁺	Nickel - Ion

nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i>
OD	Optische Dichte
OMP	<i>olfactory marker protein</i>
ORK	<i>olfactory receptor kinase</i>
ORN	<i>olfactory receptor neuron</i>
OSN	<i>olfactory sensory neuron</i>
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> e <u>l</u> elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
$\pi - e^-$	Pi-Elektron
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ Konzentration einer Lösung
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
RFU	Relative Fluoreszenzintensität
RGS	G-Protein Regulatorprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP-HPLC	<i>r</i> everse <i>p</i> hase <i>h</i> igh <i>p</i> erformance <i>l</i> iquid <i>c</i> hromatography
rpm	<i>r</i> ounds <i>p</i> er <i>m</i> inute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S1 - S6	Transmembransegment 1-6
SDS	<i>s</i> odium <i>d</i> odecyl <i>s</i> ulfate
SH-	Sulfhydryl-
s-Wert	Sedimentationskoeffizient
[S]	<i>s</i> vedberg

T	Thymin, Tyrosin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Essigsäure EDTA
T35C	Tyrosin → Cystein Austausch an Aminosäureposition 35
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N',N',N',N'- Tetraethylmethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
VIS	sichtbar
W	Tryptophan

VIII Anhang

1 Sequenzen der Fusionsproteine

1.1 CNG - Kanalproteine

B1b II (D₁₆₆ – F₂₄₉)

DRAASTASQNSAIINDRLQELVKMFKERTEKVKEKLIDPDVTSDEESPKPSPAKKAPDSAPAQKPAEAEA
AEEEHYCDMLCCKF

B1b I (A₁₆₂ – D₂₆₄)

ADGEDRAASTASQNSAIINDRLQELVKMFKERTEKVKEKLIDPDVTSDEESPKPSPAKKAPDSAPAQKA
EAEAAEEEHYCDMLCCKFKRRPWKMYQFPQSID

A4 I (N₂₇₃ – N₃₅₁)

NTADAAFYPDHALVKKYMKLQHVNKRRRVIDWYQHLQINKKMTNEVAILQHLPERLRAEVAVSVH
LSTLSRVQIFQN

1.2 Calmodulin - Mutanten

*CaM*¹² (D₂₀ → A; D₅₆ → A)

MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGAGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVAADGNGTIDFPEF
LTMMARKMKDSTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQ
VNYEEFVQMMTAK

*CaM*¹² (D₂₀ → A; D₅₆ → A)

MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGAGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEF
LTMMARKMKDSTDSEEEIREAFRVFAKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREAAIDGDGQ
VNYEEFVQMMTAK

*CaM*¹²³⁴ (D₂₀ → A; D₅₆ → A)

MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGAGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVAADGNGTIDFPEF
LTMMARKMKDSTDSEEEIREAFRVFAKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREAAIDGDGQ
VNYEEFVQMMTAK

CaM^{T35C} (T₃₅ → C)

MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGAGTITTKELGCVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEF
LTMMARKMKDSTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQ
VNYEEFVQMMTAK

CaM^{F20W} (F₂₀ → W)

MADQLTEEQIAEFKEAFSLWDKDGDGAGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEF
LTMMARKMKDSTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQ
VNYEEFVQMMTAK

CaM^{F20W} (F₉₃ → W)

MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEF
 LTMARKMKDSTDSEEEIREAFRVWDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQ
 VNYEEFVQMMTAK

1.3 OMP (*olfactory marker protein*)

OMP

MAEDGPQKQQLDMPLVLDQDLTKQMRLRVESLKQRGEKKQDGEKLLRPAESVYRLDFIQQKQLQFDH
 WNV VLDKPGKVTI TGTSQNWTPD LTNLMTRQLLDPAAIFWRKEDSDAMDWNEADALEFGERLSDLA
 KIRKVMYFLITFGEGVEPANLKASVVFNQL

2 Nukleinsäuresequenzen

Ausgangs - DNA/- Plasmide siehe Teil III, Kap. 11.1. Primer, siehe Teil III, Kap. 3. pET -28a (+)
 (Novagen, # 69864-3); Klonierung der DNA zur Expression der CNG – Kanalproteine und
 Calmodulin - Mutanten: Nde I/Bam HI; His-tag (N-terminal, 140-157, Thrombin-Schnittstelle);
 OMP - Protein: Not I/ Bam HI.

2.1 Klonierung der CNG - Kanalproteine

B1b II

GGACCGTGCGGCCTCCACAGCCAGCCAGAACAGTGCCATCATCAACGACCGGCTCCAGGAGCTGG
 TGAAGATGTTCAAGGAGCGACAGAGAAGGTGAAGGAGAAGCTCATTGACCCTGACGTCACCTCCG
 ATGAGGAGAGCCCCAAGCCCTCCCCAGCCAAGAAGGCCCCAGACTCAGCCCCAGCCCAGAAGCCG
 GCGGAGGCAGAGGCGGCAGAGGAGGAGCACTACTGTGACATGCTCTGCTGCAAGTTCTAG

B1b I

GCTGATGGCGAGGACCGTGCGGCCTCCACAGCCAGCCAGAACAGTGCCATCATCAACGACCGGCT
 CCAGGAGCTGGTGAAGATGTTCAAGGAGCGGACAGAGAAGGTGAAGGAGAAGCTCATTGACCCTG
 ACGTCACCTCCGATGAGGAGAGCCCCAAGCCCTCCCCAGCCAAGAAGGCCCCAGACTCAGCCCCA
 GCCCAGAAGCCGGCGGAGGCAGAGGCGGCAGAGGAGGAGCACTACTGTGACATGCTCTGCTGCAA
 GTTCAAGCGCAGGCCCTGGAAGATGTACCAGTTCCCCCAGAGCATCGACTAA

A4 I

AACACTGCAGATGCGGCCTTCTACCCAGACCATGCGCTGGTAAAGAAGTACATGAAGCTGCAGCAT
 GTCAACAAGAGGCTGGAGCGGCGAGTTATTGACTGGTACCAGCATCTTCAGATCAACAAGAAGAT
 GACCAACGAGGTAGCCATCTTGACGACCTGCCTGAGCGGCTGCGGGCGGAGGTTGCTGTGTCCGT
 GCACCTGTCTACCCTGAGCCGAGTACAGATCTTCCAGAAGTGTGA

2.2 Klonierung der CaM - Mutanten

*CaM*¹²

GCCGCGCGGCAGCCATATGATGGCTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTCAAAGAAG
 CTTTCTCCCTATTTGCCAAGGACGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATG
 CGGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGCTGCCGA
 CGGTAATGGCACAATCGACTTCCCTGAATTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAG
 ACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTTTGATAAGGATGGCAATGGCTACATCAGT
 GCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGA
 AATGATCAGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTTGTACAAATGA
 TGACAGCGAAGTGAGGATCCGAATTCGAGCT

*CaM*³⁴

GCCGCGCGGCAGCCATATGATGGCTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTCAAAGAAG
 CTTTCTCCCTATTTGACAAGGACGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATG
 CGGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGATGCCGA
 CGGTAATGGCACAATCGACTTCCCTGAATTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAG
 ACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTTTGCTAAGGATGGCAATGGCTACATCAGT
 GCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGA
 AATGATCAGGGAAGCAGCCATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTTGTACAAATGA
 TGACAGCGAAGTGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTC

*CaM*¹²³⁴

GCGCGGCAGCCATATGATGGCTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTCAAAGAAGCTT
 TCTCCCTATTTGCCAAGGACGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATGCGG
 TCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGCTGCCGACGG
 TAATGGCACAATCGACTTCCCTGAATTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAGACA
 GTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTTTGCTAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGCA
 GCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGAAAT
 GATCAGGGAAGCAGCCATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTTGTACAAATGATGA
 CAGCGAAGTGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGT

CaM^{T35C}

TGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGATGGCTGACCAACTGACCGAAGAGCAGATCCGAGAATTCAA
 GAAGCTTTCTCCCTATTTGACAAGGACGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGTGCCT
 GATGCGGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGA TG
 CCGACGGTAATGGCACAATCGACTTCCCTGAATTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGAC
 ACAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTTTGATAAGGATGGCAATGGCTACAT
 NAAAAANARMAGAGCTTNGNSNNGGNGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGG
 TTGATGAAATGATCAGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTTGT
 CAAATGATGACAGCGAAGTGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCTGA

CaM^{F20W}

TGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGATGGCTGACCAACTGACCGAAGAGCAGATCGCAGAATTCAA
 GAAGCTTTCTCCCTATGGGACAAGGACGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGT
 GAGCGGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGATGC
 CGACGGTAATGGCACAATCGACTTCCCTGAATTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACA
 CAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTTTGATAAGGATGGCAATGGCTACATN
 AAAAAANARMAGAGCTTNGNSNNGGNGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGT
 TGATGAAATGATCAGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTTGTAC
 AAATGATGACAGCGAAGTGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCTGACAAGC

CAM^{F93W}

CCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGATGGCTGACCAACTGACCGAAGAGCAGATCGCAGAATTCAA
 AA GAAGCTTTCTCCCTATTTGACAAGGACGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGG GGAC
 GGTGATGCGGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAG
 ATGCCGACGGT AATGGCACAATCGACTTCCCTGAATTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAA
 GACACAGACAGTGAAGAAGAAATTAG AGAAGCGTTC CGTGTGTGGGATAAGGATG GCAATGGCT
 ACATNAAAAANARMAGAGCTTNGNSNNGGNGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAG
 AGGTTGATGAAATGATCAGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTT
 GTACAAATGATGACAGCGAAGTGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGA

2.3 DNA zur Klonierung des OMP - Proteins

OMP

GGACAGCAAATGGGTCGCGATGGCAGAGGACGGGCCACAGAAGCAGCAGCTGGATATGCCGCTGG
 TTCTGGACCAGGACCTGACTAAGCAGATGCGGCTCCGAGTAGAGAGCCTGAAGCAGCGCGGGGAG
 AAGAAGCAGGATGGTGAGAAGCTGCTCCGGCCGGCTGAGTCTGTCTACCGCCTTGATTCATCCAG
 CAGCAGAAGCTGCAGTTCGATCACTGGAACGTGGTTCTGGACAAGCCGGGCAAGGTCACCATCAC
 GGGCACCTCGCAGAACTGGACGCCAGACCTACCAACCTCATGACACGCCAGCTGCTGGACCCTGC
 TGCCATCTTCTGGCGCAAGGAAGACTCCGATGCCATGGATTGGAATGAGGCAGACGCCCTGGAGTT
 TGGGGAGCGCCTTTCTGACCTGGCCAAGATCCGCAAGGTCATGTATTCCTCATCACCTTTGGCGAG
 GGTGTGGAGCCCGCCAACCTAAAGGCCTCTGTGGTGTAAACCAGCTCTGAGGCCGCACTCGAGCA
CCACCA

3 Publikationen und Kongreßbeiträge

Bereits veröffentlichte Publikationen:

Klimmeck D, Mayer U, Ungerer N, Warnken U, Schnölzer M, Frings S, Möhrle F. Calcium-signaling networks in olfactory receptor neurons. *Neuroscience*. 2008 Feb 6;151(3):901-12. Epub 2007 Nov 29.

Mayer U, Ungerer N, Klimmeck D, Warnken U, Schnölzer M, Frings S, Möhrle F. Proteomic analysis of a membrane preparation from rat olfactory sensory cilia. *Chem Senses*. 2008 Feb;33(2):145-62. Epub 2007 Nov 20.

Kongressbeiträge:

Ungerer N, Waldeck C, Vocke K, Möhrle F, Frings S.

„Molecular mechanism of calmodulin-mediated fast desensitization of olfactory CNG-Channels“. 30.10.-2.11.2008. Biophysical Society Discussions "Calmodulin Modulation of Ion Channels", Asilomar, CA, USA (Poster).

Mayer U, Klimmeck D, Ungerer N, Schnölzer M, Warnken U, Frings S, Möhrle F. „Calcium-signaling networks in olfactory receptor neurons“. Symposium: 'Olfactory Information Processing', 28.9.-29.9.2007, Universität Heidelberg (Poster).

Mayer U, Klimmeck D, Ungerer N, Schnölzer M, Warnken U, Frings S, Möhrle F. „Calcium-signaling networks in olfactory receptor neurons“. IZN Retreat 2007, 'Neuronal Networks: From Cell Biology to Cognition?', 8.7.-9.7.2007, Kloster Schöntal (Poster).

Mayer U, Klimmeck D, Ungerer N, Schnölzer M, Warnken U, Frings S, Möhrle F. „Calmodulin-binding proteins and molecular signaling in olfactory sensory neurons“, Gordon Conference, 'Ligand Recognition and Molecular Gating', 11.6.-16.6.2006, Il Ciocco/Italien (Poster).

Warnken U, Mayer U, Ungerer N, Klimmeck D, Möhrle F, Frings S, Schnölzer M. „Identification of the ciliary membrane proteome in rat olfactory sensory neurons“, 54th ASMS Conference on Mass Spectroscopy Proceedings, 28.5.-1.6.2006, Seattle/Washington (Poster).

Teilpublikation in Vorbereitung:

Ungerer N, Mücke N, Bröcker J, Keller S, Möhrle F, Frings S. A model for the fast response termination in olfactory sensory neurons via calmodulin binding to the olfactory cAMP-gated ion channel.

Ungerer N, Bröcker J, Keller S, Frings S, Möhrle F. Functional role of the LQ-binding motif in the CNGB1 subunit of the olfactory cAMP-gated ion channel.

Waldeck C, Vocke K, Ungerer N, Frings S, Möhrle F. Activation and rapid desensitization of the olfactory cAMP-gated ion channel - identification of functional channel modules.