

Optogenetische Kontrolle von cAMP durch eine photoaktivierte Adenylatzyklase

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Vera Jansen

aus

Jülich

Bonn 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. U. B. Kaupp

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kolanus

Tag der Promotion: 12.12.2014

Erscheinungsjahr: 2015

Zusammenfassung

Viele physiologische Funktionen werden durch den intrazellulären Botenstoff zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) gesteuert. Dazu gehören die Regulation des Herzschlags, der Geruchswahrnehmung und der Spermienfunktion. Da cAMP unterschiedliche Signalwege innerhalb einer Zelle steuert, wird sowohl die Dauer als auch die lokale Ausbreitung eines cAMP-Signals genau kontrolliert. Um die Auswirkungen solcher dynamischen cAMP-Signale zu untersuchen, muss die intrazelluläre cAMP-Konzentration mit hoher räumlicher und zeitlicher Präzision manipuliert werden. Die Optogenetik, bei der lichtaktivierbare Proteine zur Manipulation zellulärer Funktionen verwendet werden, ist dazu eine geeignete Methode. Die photoaktivierte Adenylatzyklase bPAC ist ein optogenetisches Werkzeug, dessen Aktivität - und damit die cAMP-Synthese - durch Licht kontrolliert wird. In meiner Arbeit habe ich bPAC *in vitro* und *in vivo* zur lichtabhängigen Kontrolle von cAMP verwendet. Dabei habe ich versucht, verschiedene subzelluläre Kompartimente gezielt zu manipulieren.

Ein bisher wenig untersuchtes subzelluläres Kompartiment, in dem cAMP eine Rolle spielt, ist das primäre Zilium. Zilien fungieren als „zelluläre Antennen“, die extrazelluläre Signale wahrnehmen und in das Zellinnere weiterleiten. Um bPAC gezielt in primären Zilien zu exprimieren, habe ich bPAC mit ziliären Proteinen fusioniert. Durch Fusion der bPAC mit dem G-Protein-gekoppelten Somatostatin-Rezeptor 3 konnte ich das Enzym gezielt in primäre Zilien von hippocampalen Neuronen und Nierenzellen transportieren.

Flagellen sind motile Zilien, deren Hauptfunktion die Bewegung einer Zelle durch ihre Umgebung ist. So schwimmen beispielsweise Spermien mit Hilfe des Flagellenschlags in Richtung der Eizelle. cAMP ist essentiell für die Spermienfunktion; es steuert unter anderem den Flagellenschlag und die Spermienreifung innerhalb des weiblichen Genitaltrakts. Um cAMP-abhängige Signalwege in Spermien zu untersuchen, habe ich ein transgenes Mausmodell generiert, in dem bPAC spermien-spezifisch exprimiert wird. In transgenen Spermien ließ sich die intrazelluläre cAMP-Konzentration mit Licht steuern. Dies ermöglichte mir, nicht nur den Flagellenschlag dosisabhängig durch Licht zu manipulieren, sondern auch die Fertilität in einem Mausmodell mit defekter cAMP-Synthese wiederherzustellen. Meine Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe von bPAC cAMP-abhängige zelluläre Funktionen durch Licht gesteuert werden können.

Summary

The intracellular second messenger cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP) regulates various physiological functions, including the heartbeat, olfaction, and sperm function. Cyclic AMP is a ubiquitous messenger and is involved in different signaling pathways in the very same cell. Therefore the signal is spatially and temporally restricted. To study the contribution of local cAMP dynamics to cellular signaling, manipulation of cAMP with high temporal and spatial precision is required. Optogenetics is a technique that allows fast and precise manipulation of cellular functions using light-sensitive proteins. The photoactivated adenylyl cyclase bPAC is an optogenetic tool that synthesizes cAMP upon light stimulation. During my PhD thesis, I used bPAC *in vitro* and *in vivo* to manipulate cAMP by light. Furthermore, I aimed to target bPAC to different subcellular compartments to study local cAMP dynamics.

A subcellular compartment, where local cAMP-dependent signal transduction plays a role, is the primary cilium. Primary cilia function as “cellular antennae” that perceive extracellular stimuli and transduce them to the cell body. To target bPAC to primary cilia, I fused bPAC to ciliary proteins. A fusion of bPAC and the G protein-coupled somatostatin receptor 3 was efficiently imported into cilia of both hippocampal neurons and renal cells.

Flagella are structurally related to primary cilia, but their main function is the generation of cell motility. In sperm, the flagellum generates the forward motility that is required to swim towards the egg. Cyclic AMP is essential for different sperm functions, such as motility and sperm maturation inside the female genital tract. I generated a transgenic mouse line with sperm-specific expression of bPAC to analyze cAMP-dependent signaling pathways in sperm. In transgenic sperm, light stimulation increased cAMP levels in sperm and, thereby, the flagellar beat frequency in a light dose-dependent manner. Furthermore, in an infertile mouse model devoid of sperm cAMP signaling, fertility was restored by light stimulation. My results show that bPAC is a suitable tool to control cAMP-dependent cellular functions by light.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	13
1.1 Regulation intrazellulärer Signalwege durch cAMP.....	13
1.2 Optogenetische Methoden.....	15
1.3 cAMP-abhängige Mechanismen synaptischer Plastizität	18
1.4 Lokale Signalverarbeitung in primären Zilien	20
1.5 cAMP-abhängige Regulation der Spermienfunktion	23
2. Material & Methoden	25
2.1 Material	25
2.2 <i>E.coli</i> Zellkultur	26
2.2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmidvektoren.....	26
2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung von Kulturmedien für <i>E.coli</i>	27
2.2.3 Anzucht von <i>E.coli</i> Bakterienkulturen zur Plasmidpräparation.....	27
2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA.....	27
2.3 Präparation von Nukleinsäuren	28
2.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	28
2.3.2 Midi- und Maxipräparation	28
2.3.3 Präparation von genomischer DNA aus Mausegewebe	29
2.4 Reinigung und Auftrennung von Nukleinsäuren	29
2.4.1 Ethanol-Präzipitation.....	29
2.4.2 Aufreinigung mit SureClean	30
2.4.3 Photometrische Quantifizierung von DNA	30
2.4.4 Quantifizierung von DNA im Agarosegel	30
2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	30

2.4.6 Elution von DNA aus Agarosegelen	31
2.5 Modifizierung von Nukleinsäuren	31
2.5.1 Restriktion von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	31
2.5.2 Ligation	32
2.5.3 Transformation	32
2.5.4 DNA-Sequenzierung	32
2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.6.1 Primersynthese	33
2.6.2 Bedingungen für die PCR-Reaktionen.....	33
2.6.3 PCR-Reaktion zur DNA-Mutagenese	34
2.6.4 Reinigung von PCR-Produkten.....	34
2.7 Säugetierzellkultur	34
2.7.1 Sterilarbeit	34
2.7.2 Zelllinien	34
2.7.3 Erhaltung und Splitting	35
2.7.4 Kryokonservierung von Säugetierzellen.....	35
2.7.5 Lipofektion.....	36
2.7.6 Elektroporation.....	36
2.7.7 Generation stabiler Zelllinien.....	37
2.8 Präparation von Proteinen	37
2.8.1 Proteinpräparationen aus Säugetierzellen	37
2.8.2 Proteinpräparationen aus Mausgewebe.....	38
2.8.3 Konzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)	38
2.9 Trennung und Nachweis spezifischer Proteine	38
2.9.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.9.2 Transfer und Immobilisierung von Proteinen mittels Western Blot.....	39
2.9.3 Immunodetektion immobilisierter Proteinen	39
2.9.4 Entfernung von primären und sekundären Antikörpern (Stripping).....	41

2.10 Immunfluoreszenz	41
2.10.1 Immunzytochemie	41
2.10.2 Anfertigen von Gefrierschnitten.....	42
2.10.3 Immunhistochemie	43
2.10.4 Antikörper	43
2.11 Versuchstiere	45
2.11.1 Haltung und Zucht.....	45
2.11.2 Generation einer transgene Mauslinie durch pronukleäre Injektion	45
2.12 Arbeiten mit Mausspermien	46
2.12.1 Präparation von Mausspermien	46
2.12.2 Proteinpräparation aus Mausspermien	46
2.12.3 Analyse des Flagellenschlags.....	47
2.12.4 <i>In-vitro</i> -Fertilisation	47
2.13 Neuronale Primärzellkultur	48
2.13.1 Präparation hippocampaler Primärzellen	48
2.13.2 Transduktion durch rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV).....	49
2.13.3 Transfektion zur Herstellung von rAAVs	49
2.13.4 Präparation und Aufreinigung von rAAVs	50
2.14 Zeitaufgelöste Messungen von Ca ²⁺ und cAMP	50
2.14.1 Beladung von Säugetierzellen mit fluoreszenten Ca ²⁺ -Indikatoren	50
2.14.2 Fluoreszenzmessungen am FLUOstar Platereader.....	51
2.14.3 Fluoreszenzmessungen auf Einzelzellebene	52
2.14.4 cAMP Messungen mit einem FRET-basierten Biosensor.....	52
2.14.5 FRET Messungen an Zellen in Suspension.....	54
2.14.6 FRET Messungen auf Einzelzellebene	54
2.14.7 Bestimmung der cAMP-Menge in Mausspermien (CatchPoint Assay).....	54
3. Ergebnisse	57

3.1	Charakterisierung der bakteriellen photoaktivierten Adenylatzyklase (bPAC).....	57
3.1.1	Herstellung der stabilen Zelllinie HEK-TM-bPAC	57
3.1.2	Charakterisierung von bPAC in Zellpopulationen	60
3.1.3	Charakterisierung der bPAC in Einzelzellen	62
3.2	Expression von bPAC in neuronaler Primärzellkultur.....	64
3.2.1	Kultivierung und Transduktion primärer hippocampaler Neuronen.....	64
3.2.2	Charakterisierung von bPAC über den Ca ²⁺ Einstrom durch CNGA2-TM.....	66
3.2.3	Design und Klonierung eines rotverschobenen FRET-Sensors für cAMP	68
3.2.4	Charakterisierung des rotverschobenen FRET-Sensors	70
3.3	<i>targeting</i> von bPAC in primäre Zilien	72
3.3.1	Vergleich von <i>targeting</i> -Proteinen in MDCK-Zellen	72
3.3.2	SSTR3 als <i>targeting</i> -Protein in IMCD-3-Zellen.....	73
3.3.3	<i>targeting</i> von bPAC in neuronale Zilien	74
3.4	Optogenetische Manipulation von cAMP in Mausspermien	76
3.4.1	Generation der transgenen Mauslinie Prot1-bPAC	76
3.4.2	Selektion von Founder-Linien und Nachweis der bPAC-Expression.....	76
3.4.3	Lichtinduzierte cAMP-Synthese in Prot1-bPAC Spermien	79
3.4.4	Manipulation der flagellaren Schlagfrequenz durch Licht.....	80
3.4.5	Einfluss der bPAC-Basalaktivität auf Prot1-bPAC Spermien	81
3.4.6	Unspezifische Nebeneffekte membrangängiger cAMP-Analoga	83
3.4.7	Ersatz der SACY-Funktion durch bPAC	85
3.4.8	Generation der doppelt-transgenen Mauslinie sNHE-KO/bPAC.....	86
3.4.9	Wiederherstellung von Motilität und Fertilität in sNHE-KO/bPAC-Spermien	87
4.	Diskussion	89
4.1	Manipulation zellulärer Funktionen mit Hilfe von bPAC.....	89
4.2	Funktionale Charakterisierung von bPAC in neuronalen Primärzellen	92
4.3	Manipulation der lokalen cAMP-Konzentration in primären Zilien.....	93
4.4	Optogenetische Kontrolle der Spermienfunktion.....	96

5. Anhang	99
5.1 Primersequenzen	99
5.2 Abbildungsverzeichnis	101
6. Literaturverzeichnis.....	103

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AC	Adenylatzyklase (<i>adenylyl cyclase</i>)
AraC	Cytosine β -D-arabinofuranosid
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BES	N,N,-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	revers-transkribierte DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMV	Cytomegalovirus
CNBD	zyklisch Nukleotid-bindende Domäne (<i>cyclic nucleotide-binding domain</i>)
CNG-Kanal	zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (<i>cyclic nucleotide-gated channel</i>)
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
C-Terminus	Carboxylterminus einer Polypeptidkette
CTS	<i>Ciliary targeting sequence</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
db-cAMP	dibutyryl-cAMP
dd	doppelt destilliert
DIC	Differenzieller Interferenzkontrast (<i>differential interference contrast</i>)
DIV	<i>Days in vitro</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et altera</i>
EtBr	Ethidiumbromid
F	Fluoreszenzintensität
FCS	fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
g	Normal-Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ m x s}^{-1}$)
G	Maßeinheit für die Größe einer Kanüle (<i>gauge</i>)
G418	Geneticinsulfat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde (<i>hour</i>)
HA-Tag	Hämagglutinin A-Tag
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCO_3^-	Bicarbonat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
Ig	Immunglobulin
IMCD	<i>Inner medullary collecting duct</i>
ITR	<i>Inverted terminal repeat</i>
I.U.	<i>International unit</i>
K^+	Kalium

KAc	Kaliumacetat
KAsp	Kaliumaspartat
KO	<i>Knock-out</i>
l	Liter
λ	Wellenlänge
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LED	Licht-emittierende Diode
log	Logarithmus
LTP	<i>Long term potentiation</i>
m	Meter
M	molar
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i>
min	Minute
MM	Molekülmasse
mPIC	<i>Mammalian protease inhibitor cocktail</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
MWP	Multiwellschale (<i>multi-well plate</i>)
n	Anzahl der Experimente
Na ⁺	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaN ₃	Natriumazid
NES	Kernexportsignal (<i>nuclear export signal</i>)
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i>
NeuroH	<i>Neurofilament heavy</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Aminoterminus einer Polypeptidkette
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAC	photoaktivierte Adenylatzyklase (<i>photoactivated adenylyl cyclase</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PKA	Proteinkinase A
PKHD	<i>Polycystic kidney and hepatic disease</i>
PLL	Poly-L-Lysin
Prot	Protamin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SACY	lösliche Adenylatzyklase (<i>soluble adenylyl cyclase</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
sNHE	spermienspezifischer Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
STP	<i>Short term potentiation</i>
Syn	Synapsin
τ	Zeitkonstante
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TE _{RNase}	TE-Puffer mit RNase-Cocktail
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
T _m	Schmelztemperatur
tmAC	<i>Transmembrane adenylyl cyclase</i>
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)1,3-Propanediol
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
ÜNK	über Nacht-Kultur
ü.N.	über Nacht

UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
W	Watt
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
w/v	Massenprozent (<i>weight per volume</i>)
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)
z.B.	zum Beispiel
Zeo	Zeocin

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

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz wurden durch die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Basen abgekürzt. (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin)

Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstabencode abgekürzt:

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

1. Einleitung

1.1 Regulation intrazellulärer Signalwege durch cAMP

Der Botenstoff zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) wird durch Adenylatzyklen synthetisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Signalverarbeitung innerhalb der Zelle. Durch die Bindung extrazellulärer Liganden an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) werden heterotrimere G-Proteine aktiviert, die die Aktivität von transmembranalen Adenylatzyklen (tmACs) entweder stimulieren (G_s) oder inhibieren (G_i). Durch Hydrolyse mit Hilfe von Phosphodiesterasen (PDEs) wird cAMP abgebaut. Dieses dynamische Wechselspiel zwischen Synthese und Hydrolyse reguliert die Amplitude und die Dynamik eines cAMP-Signals. Viele physiologische Vorgänge werden durch cAMP gesteuert, beispielsweise die Regulation des Herzschlags und des Blutzuckerspiegels, oder die Geruchswahrnehmung (Alberts, 2002). Bei all diesen Vorgängen werden extrazelluläre Liganden durch Mitglieder der GPCR-Superfamilie erkannt. Beim Menschen umfasst diese Superfamilie mehr als 800 Mitglieder und ist damit die größte aller bekannten Proteinfamilien (Stevens et al., 2013). Die meisten GPCRs kontrollieren die Aktivität von Adenylatzyklen und damit die cAMP-Synthese. cAMP steuert die weitere Signaltransduktion durch direkte Bindung an verschiedene Zielproteine, wie zum Beispiel Proteinkinase A (PKA). Dabei ist unklar, wie cAMP, das viele unterschiedliche zelluläre Prozesse kontrolliert, eine spezifische Signalantwort erzeugt.

Verschiedene Mechanismen tragen zu einer solchen Spezifität bei. Beispielsweise kann die Affinität von cAMP-Bindungsstellen moduliert werden oder es werden je nach Zelltyp verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert (Iyengar & Birnbaumer, 1990; Kusch et al., 2010). Darüber hinaus ermöglicht die räumliche Abgrenzung von Signalwegen innerhalb einer Zelle, dass nur ein bestimmter Signalweg aktiviert wird. So reichern sich beispielsweise bestimmte GPCRs und Isoformen der Adenylatzyklase bevorzugt in Einstülpungen (Caveolae) der Plasmamembran an, die eine spezielle Lipid- und Proteinzusammensetzung aufweisen (Chun et al., 1994; Okamoto et al., 1998; Ostrom et al., 2001). Zusätzlich bilden Signalproteine supramolekulare Komplexe, was durch sogenannte Gerüstproteine vermittelt wird. Im Fall des cAMP/PKA Signalwegs handelt es sich bei diesen Gerüstproteinen um *A kinase anchoring proteins* (AKAP; Theurkauf & Vallee, 1982), die außer mit PKA noch mit anderen Komponenten des Signalwegs interagieren, beispielsweise

PDEs, Phosphatasen und weiteren Proteinkinasen (Wong & Scott, 2004). Durch die supramolekulare Anordnung von Reaktionspartnern zu funktionellen Einheiten wird die Signalweiterleitung effektiver und eine fehlerhafte Signalweiterleitung wird verhindert (Jurevicius & Fischmeister, 1996). Gleichzeitig beschränkt die Aktivität der PDEs die freie Diffusion von cAMP (Rich et al., 2000). Solche lokalen Signalkomplexe werden als Mikrodomänen bezeichnet (Willoughby & Cooper, 2007).

Ein gut charakterisiertes Beispiel für molekulare Kompartimentierung des cAMP/PKA Signalwegs ist die adrenerge Stimulation von Kardiomyozyten, die zu einem Anstieg der Kontraktionskraft des Herzmuskels und der Herzfrequenz führt. Noradrenalin und Adrenalin aktivieren den β -Adrenorezeptor, was über G-Proteine und Adenylatzyklasen die cAMP-Synthese stimuliert. Anschließend werden durch PKA unter anderem L-Typ Ca^{2+} -Kanäle phosphoryliert, was den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verstärkt (Kamp & Hell, 2000). Die Stimulation mit dem Hormon Prostaglandin-1 bewirkt ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, jedoch werden nicht die gleichen zellulären Antworten ausgelöst wie bei β -adrenerger Stimulation (Hayes et al., 1982; Buxton & Brunton, 1983). Wie kann die Zelle zwischen diesen beiden Signalen unterscheiden? Lokale Stimulation ventrikulärer Myozyten mit Isoprenalin, einem Agonisten des β -Adrenorezeptors, aktiviert nur eine proximale Population von Ca^{2+} -Kanälen; wenn gleichzeitig die PDE-Aktivität gehemmt wird, werden zusätzlich distale Ca^{2+} -Kanäle aktiviert (Jurevicius & Fischmeister, 1996). Dies deutet darauf hin, dass die cAMP-Diffusion im Zytoplasma durch PDEs eingeschränkt werden kann. Mit Hilfe cAMP-sensitiver FRET-Biosensoren konnte schließlich gezeigt werden, dass verschiedene Rezeptoren, die an den cAMP/PKA Signalweg koppeln, tatsächlich unterschiedliche lokale Änderungen der cAMP-Konzentration auslösen (Zaccolo & Pozzan, 2002; Nikolaev et al., 2006).

Bisher wurden cAMP-abhängige Signalwege hauptsächlich mit Hilfe pharmakologischer Agenzien untersucht, die tmACs aktivieren oder PDEs hemmen. Wie jedoch das oben beschriebene Beispiel zeigt, kann ein globales cAMP-Signals eine andere physiologische Konsequenz haben als ein lokales Signal. Um den Bedeutung einzelner Mikrodomänen untersuchen zu können, wäre es wünschenswert, das cAMP-Signal sowohl räumlich als auch zeitlich genau zu kontrollieren. Eine Methode, die dies ermöglicht, ist die Optogenetik.

1.2 Optogenetische Methoden

Optogenetik beschreibt die Kombination genetischer und optischer Methoden zur Kontrolle zellulärer Vorgänge (Deisseroth, 2011). Manche Definitionen der Optogenetik schließen genetisch kodierte fluoreszierende Biosensoren mit ein, die einen zellulären Vorgang nicht manipulieren sondern vielmehr visualisieren. Dazu gehört beispielsweise der Ca^{2+} -Indikator GCaMP (Nakai et al., 2001). Im Allgemeinen wird der Begriff allerdings nur für genetisch kodierte, lichtsensitive Effektorproteine gebraucht (Deisseroth, 2011). Der erste Versuch, eine zelluläre Funktion mit Licht zu steuern, wurde von Boris V. Zemelman und Kollegen vorgestellt: In dieser Arbeit wurden in hippocampalen Neuronen Aktionspotentiale durch Lichtstimulation ausgelöst (Zemelman et al., 2002), wobei allerdings drei Proteine koexprimiert werden mussten (chARGe, Koexpression von Arrestin-2, Rhodopsin und G α_s). Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die Verwendung von mikrobiellen Opsinen. Bakterielle Opsine wie Bacteriorhodopsin (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971) oder Halorhodopsin (Schobert & Lanyi, 1982) fungieren als lichtaktivierte Protonen- bzw. Chloridpumpen und dienen der Ausbildung eines Protonengradienten bzw. der Osmoregulation (Oesterhelt & Stoeckenius, 1973; Bamberg et al., 1984; Müller & Oren, 2003). In den Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Volvox carteri* wurden außerdem die Channelrhodopsine identifiziert (Nagel et al., 2002; Nagel et al., 2003). Diese lichtaktivierten Kationenkanäle vermitteln die Phototaxis der Algen, also die gerichtete Bewegung relativ zu einer Lichtquelle (Berthold et al., 2008; Kianianmomeni et al., 2009). Mikrobielle Opsine besitzen wie die Opsine der Wirbeltiere eine heptahelikale Struktur; sie leiten das Lichtsignal allerdings nicht über G-Proteine und Botenstoffe weiter (metabotrop), sondern über die direkte Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit (ionotrop). Beide Klassen von Opsinen binden kovalent Retinal als Chromophor, wodurch mikrobielle Opsine problemlos in eukaryotischen Zellen funktionell exprimiert werden können. Channelrhodopsin entwickelte sich so zu einem weit verbreiteten optogenetischen Werkzeug, um Zellen - vornehmlich Neuronen - *in vivo* und *in vitro* elektrisch zu erregen (Boyden et al., 2005; Arenkiel et al., 2007). Um die Anwendungsmöglichkeiten der Optogenetik zu erweitern, ist es wünschenswert, auch andere zelluläre Eigenschaften als das Membranpotential mit Licht zu steuern. Mit chimären GPCRs, die aus Rhodopsin und den intrazellulären Schleifen anderer GPCRs bestehen (OptoXRs), wird die Lichtaktivierung von G-Protein-gesteuerten Signalwegen ermöglicht (Abbildung 1).

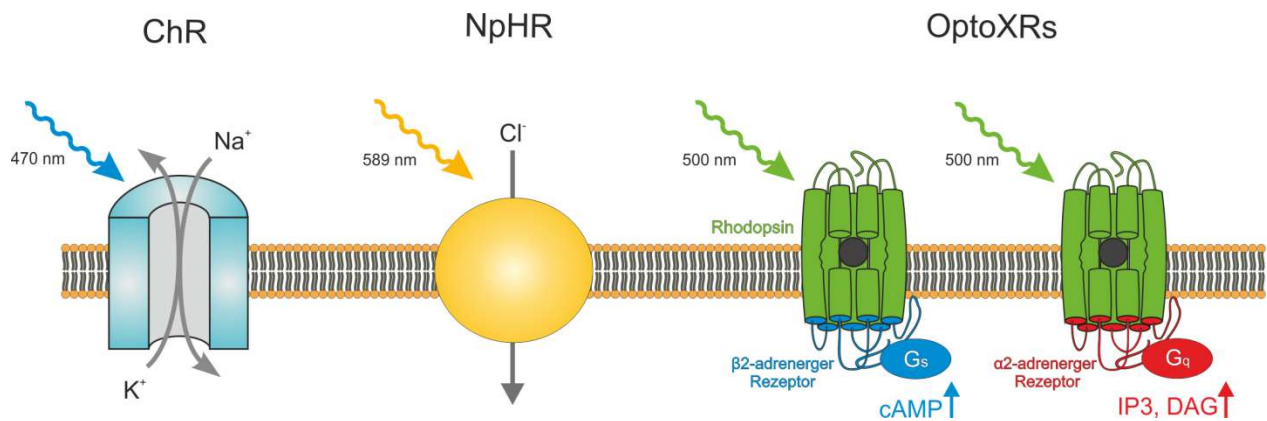


Abbildung 1: Schematische Darstellung optogenetischer Werkzeuge. Channelrhodopsin (ChR) ist ein lichtaktivierter Kationenkanal, der zur Membrandepolarisation genutzt wird. Mit Hilfe von Halorhodopsin (NpHR), einer Chloridpumpe, können Zellen hyperpolarisiert werden. OptoXRs bestehen aus chimären Rhodopsinen, bei denen die intrazellulären Schleifen durch die von anderen GPCRs ersetzt wurden. So können durch Licht verschiedene G-Protein-gesteuerte Signalwege aktiviert werden.

Mit einem OptoXR, das an G_s -Proteine koppelt, können zum Beispiel cAMP-abhängige Signalwege angesteuert werden (Airan et al., 2009).

Eine andere Möglichkeit, die intrazelluläre cAMP-Konzentration mit Licht zu modulieren, ist die Verwendung natürlich vorkommender, photoaktivierter Adenylatzyklasen (*photoactivated adenyl cyclases*; PACs). Die erste PAC wurde in *Euglena gracilis* identifiziert (egPAC) und vermittelt die Phototaxis dieses Einzellers (Iseki et al., 2002; Ntefidou et al., 2003). Weitere PACs wurden in dem Flagellaten *Naegleria gruberi* sowie in den Bakterien *Microcoleus chthonoplastes* und *Beggiatoa* sp. (bPAC) entdeckt (Ryu et al., 2010; Stierl et al., 2011; Raffelberg et al., 2013; Yasukawa et al., 2013). PACs sind Flavoproteine, die den Kofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Chromophor nutzen und diesen über sogenannte LOV- (*light-oxygen-voltage sensing*) oder BLUF-Domänen (*sensors of blue light using FAD*) binden (Gomelsky & Klug, 2002; Crosson et al., 2003). LOV-Domänen sind in Phototropinen zu finden, einer Klasse der Blaulichtrezeptoren höherer Pflanzen (Demarsy & Fankhauser, 2009), während BLUF-Domänen vor allem von Bakterien und niederen Eukaryoten genutzt werden (Gomelsky & Klug, 2002).

In dieser Arbeit habe ich bPAC zur lichtabhängigen Kontrolle der intrazellulären cAMP-Konzentration verwendet. bPAC ist ein Dimer; jedes Monomer besteht aus einer BLUF-Domäne und einer C-terminalen Adenylatzyklase (Stierl et al., 2011). Der lichtabhängige Übergang von bPAC in den aktivierten Zustand (*signaling state*) geht mit einer spektralen Rotverschiebung der Absorption um etwa 12 nm einher, wie es auch für andere BLUF-Photorezeptoren beschrieben worden ist (Hasegawa et al., 2004; Masuda et al., 2004).

Obwohl der gesamte Photozyklus - die Dauer bis zur Wiederherstellung des Grundzustands - ca. 12 s lang ist (Stierl et al., 2011), laufen die photochemischen Reaktionen, die zum aktivierten Zustand führen, innerhalb von Pikosekunden ab (Gauden et al., 2005; Zirak et al., 2006; Toh et al., 2008). Im Gegensatz zu Opsinen, bei denen der Retinal-Chromophor durch Lichtabsorption isomerisiert, sind innerhalb des FAD-Chromophors der BLUF-Domänen nur minimale strukturelle Änderungen möglich. Die Signalweiterleitung innerhalb des Moleküls erfolgt hier durch eine Restrukturierung der Wasserstoffbrücken in der direkten Chromophorumgebung (Masuda et al., 2004).

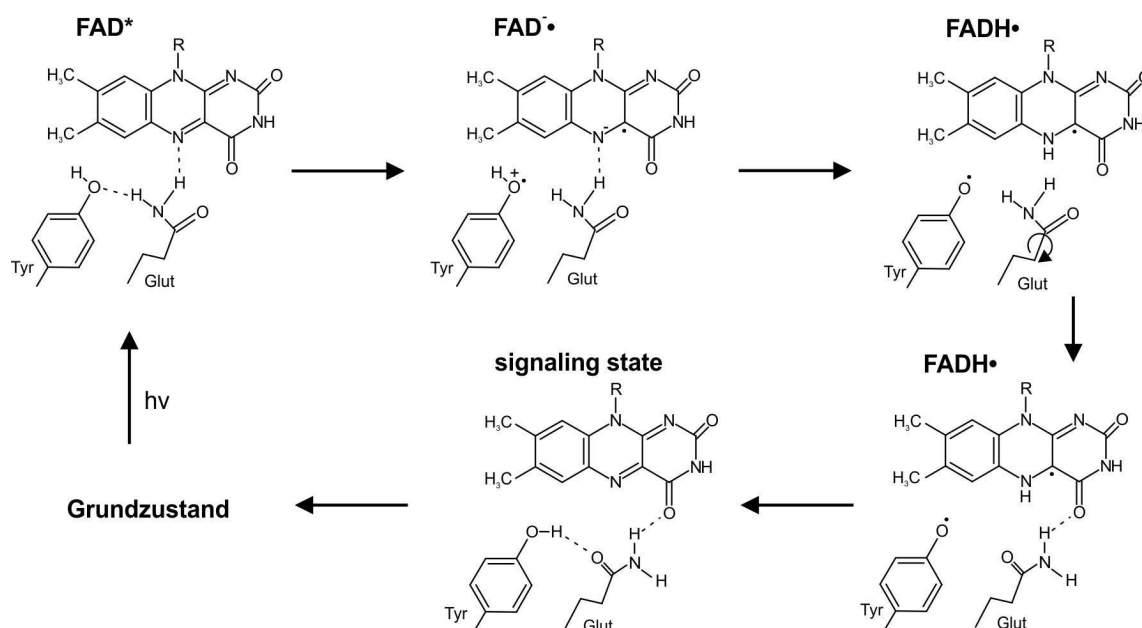


Abbildung 2: Mechanismus der Photoaktivierung in BLUF-Domänen. Details im Text (modifiziert nach Gauden et al., 2006).

Der Anregung von FAD vom S_0 - in den S_1 -Zustand (FAD^*) folgt eine Elektronenübertragung von einem konservierten Tyrosinrest in der FAD-Bindungstasche, wodurch sich das anionische Radikal $FAD^{\bullet-}$ bildet (Gauden et al., 2006; Bonetti et al., 2009). Durch anschließende Übertragung eines Protons entsteht das neutrale Semiquinon $FADH^{\bullet}$ (Toh et al., 2008). Dadurch wird gleichzeitig die Wasserstoffbrücke zwischen dem Tyrosin und einem konservierten Glutaminrest unterbrochen, was eine freie Rotation des Glutamins und die Ausbildung einer neuen Wasserstoffbrücke zwischen der Aminogruppe des Glutamins und dem O4-Atom des FAD ermöglicht (Masuda et al., 2004; Anderson et al., 2005; Gauden et al., 2006). Ein alternatives Modell geht von einer Tautomerisierung des Glutamins aus (Domratcheva et al., 2008; Khrenova et al., 2011); diese Annahme beruht allerdings auf

theoretischen Berechnungen und Simulationen und wurde bisher nicht experimentell nachgewiesen. Durch Rekombination des Radikalpaars wird das Tyrosin in der Bindungstasche reprotoniert und der Chromophor kehrt in seinen Ausgangszustand zurück. Die Hydroxylgruppe des Tyrosinrests geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylgruppe des Glutamins ein, was das rotierte Glutamin in dieser Position verankert. Diese Konformation des *signaling state* ist wegen der hohen Energiebarrieren relativ langlebig (Sekunden bis Minuten), und bestimmt hauptsächlich die Dauer des Photozyklus (Gauden et al., 2006).

Sowohl egPAC als auch bPAC wurden bereits erfolgreich zur lichtaktivierten cAMP-Synthese in verschiedenen Modellsystemen *in vivo* eingesetzt (Nagahama et al., 2007; Bucher & Buchner, 2009; Weissenberger et al., 2011; Efetova et al., 2013; Hartmann et al., 2013). bPAC bietet einige entscheidende Vorteile gegenüber egPAC. So ist die dimere Struktur und die geringere Molekülmasse von bPAC (41 kDa) ein Vorteil gegenüber der Verwendung von egPAC, einem Heterotetramer aus PAC α (94 kDa) und PAC β (110 kDa) (Iseki et al., 2002). Die geringere Größe erlaubt weiterhin die Konstruktion von Fusionen mit anderen Proteinen (wie z.B. GFP; *green fluorescent protein*), ohne die für virale Transduktion kritische Größe von 3-4 kb zu überschreiten (Wu et al., 2010). Nachteilig ist auch die hohe Basalaktivität von egPAC. Ebenso ist die Lichtempfindlichkeit von egPAC gegenüber bPAC deutlicher geringer, wodurch zur Anregung höhere Lichtintensitäten mit möglicherweise phototoxischen Effekten erforderlich sind (Schröder-Lang et al., 2007; Stierl et al., 2011). Ein Vorteil von egPAC ist dagegen, dass ihr Photozyklus deutlich schneller verläuft (Stierl et al., 2011).

In meiner Arbeit habe ich bPAC in verschiedenen Zellsystemen verwendet, um die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu manipulieren. Dabei war vor allem die Manipulation lokaler cAMP-Signale das Ziel, denn die Verwendung optogenetischer Techniken bietet eine bessere räumliche Auflösung als z.B. pharmakologische Methoden und wie bereits beschrieben unterscheiden sich die physiologischen Konsequenzen globaler und lokaler cAMP-Signale. Ich habe bPAC unter anderem in Neuronen eingesetzt, um die lokale Regulation der synaptischen Plastizität durch cAMP zu untersuchen.

1.3 cAMP-abhängige Mechanismen synaptischer Plastizität

Neuronale Plastizität bezeichnet die Fähigkeit des Nervensystems, sich aktivitätsabhängig zu verändern, und ist die physiologische Grundlage für Lernprozesse und Gedächtnisbildung. Dabei spielt vor allem die synaptische Plastizität, die Anpassung der synaptischen

Übertragung an Stimulationsbedingungen, eine entscheidende Rolle. Die Grundlagen synaptischer Plastizität wurden von James Schwartz und Eric Kandel in der Meeresschnecke *Aplysia californica* erforscht. Sie fanden heraus, dass elektrische Stimulation isolierter Abdominalganglien zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration führt. Dieser cAMP-Anstieg kann durch Stimulation mit Serotonin und Dopamin imitiert werden (Cedar et al., 1972; Cedar & Schwartz, 1972). Die Injektion von cAMP direkt in den Zellkörper verstärkte die synaptische Übertragung ohne vorherige elektrische Stimulation (Brunelli et al., 1976). Der zugrundeliegende Mechanismus ist die Modulation eines K^+ -Kanals durch PKA: Durch Phosphorylierung des Kanals wird der K^+ -Ausstrom verringert und so das Aktionspotential verbreitert. Durch die länger anhaltende Depolarisation strömt mehr Ca^{2+} durch spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle in die präsynaptische Endigung und verstärkt die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt (Klein & Kandel, 1980).

Mittlerweile wurden eine ganze Reihe von cAMP-abhängigen Mechanismen identifiziert, die zur synaptischen Potenzierung beitragen (Nguyen & Woo, 2003). An der präsynaptischen Endigung wird beispielsweise durch Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs die Transmitterausschüttung modifiziert, indem sowohl die Anzahl als auch die Ausschüttungswahrscheinlichkeit der bereitgestellten Vesikel steigt (Trudeau et al., 1998; Kaneko & Takahashi, 2004; Yao & Sakaba, 2010). Dieser Vorgang findet innerhalb weniger Sekunden bis Minuten statt. Man bezeichnet diese kurzfristigen Änderungen als posttetanische Potenzierung (PTP), die einer der Mechanismen der Kurzzeitplastizität ist (STP, *short term potentiation*) (Zucker & Regehr, 2002; Purves, 2008). Dagegen gehören langandauernde Veränderungen der Synapse zur Langzeitpotenzierung (LTP, *long term potentiation*). Die LTP umfasst permanente strukturelle Veränderungen des neuronalen Netzwerks durch Regulation der Genexpression und wird daher als zelluläre Grundlage für die Speicherung von Gedächtnisinhalten betrachtet (Purves, 2008). Auch die Ausbildung der LTP wird durch cAMP moduliert. So werden beispielsweise morphologisch bereits angelegte aber inaktive Synapsen durch PKA funktionell aktiviert (Ma et al., 1999; Liao et al., 2001). Ein gut untersuchter Mechanismus zur aktivitätsabhängigen Änderung der Genexpression ist die Aktivierung von CREB (*cAMP responsive element-binding protein*; Montminy et al., 1990). CREB ist ein Transkriptionsfaktor, der nach seiner Phosphorylierung durch PKA an CRE-Elemente der DNA bindet. Dies verstärkt die Transkription von *immediate early*-Genen, was zu strukturellen Veränderungen der Nervenzelle führt, wie z.B. die Ausbildung zusätzlicher Synapsen (Dash et al., 1990; Yin et al., 1994; Kandel, 2001).

Bei den cAMP-abhängigen Mechanismen, die zur synaptischen Plastizität beitragen, spielen

ebenfalls lokale Signale eine Rolle; hier werden z.B. prä- und postsynaptische Mechanismen voneinander unterschieden (Bacskai et al., 1993). Auf der Seite der präsynaptischen Endigung wird wie oben beispielhaft beschrieben vor allem die Ausschüttung von Neurotransmittern reguliert, während in der postsynaptischen Region die Anzahl und Sensitivität der Rezeptoren moduliert wird (Rosenmund et al., 1994; Banke et al., 2000; Crump et al., 2001). Um genauer zu untersuchen, wie sich lokale Änderungen der cAMP-Konzentration auf die synaptische Übertragung auswirken, wird im Rahmen dieser Arbeit bPAC in neuronalen Primärzellen eingesetzt.

1.4 Lokale Signalverarbeitung in primären Zilien

Ein bisher wenig verstandenes Kompartiment mit lokaler Signalverarbeitung sind die primären Zilien. Zilien sind aus Mikrotubuli aufgebaute Zellausläufer, die seit ihrer erstmaligen Beschreibung durch K. W. Zimmermann im Jahr 1898 in fast jedem eukaryotischen Zelltyp identifiziert wurden (Zimmermann, 1898; Wheatley et al., 1996). Dabei unterscheidet man motile Zilien von nicht-motilen/primären Zilien. Die unterschiedliche Funktion spiegelt sich in strukturellen Unterschieden wieder: Beide Arten von Zilien sind aus einer typischen Anordnung von neun Mikrotubuli-Duplets, dem Axonem, aufgebaut, aber nur motile Zilien enthalten ein zusätzliches zentrales Mikrotubuli-Duplet. Zusammen mit dem Motorprotein Dynein und den Radialspeichen, die innere und äußere Mikrotubuli miteinander verbinden, ermöglicht diese 9+2 Konfiguration den Zilienschlag. Primäre Zilien besitzen dagegen eine 9+0 Konfiguration und sind daher immotil (Satir & Christensen, 2007).

Die Funktion einiger Zilien, wie die der olfaktorischen Zilien auf den Riechsinneszellen der Säuger, ist schon lange beschrieben; dagegen wurden primäre Zilien lange Zeit als funktionsloses Rudiment betrachtet (Bloodgood, 2009). Erst durch die Entdeckung, dass eine Reihe von schwerwiegenden genetischen Erkrankungen auf die Dysfunktion von Zilien zurückzuführen ist, wurde erkannt, dass primäre Zilien eine Funktion erfüllen. Diesen Ziliopathien wurden einige schon lange beschriebene Syndrome zugeordnet, unter anderem das Bardet-Biedl-Syndrom, Meckel-Gruber-Syndrom, Joubert-Syndrom, Alström-Syndrom, Nephronophthisis, Oro-fazio-digitales-Syndrom, Senior-Loken-Syndrom, polyzystische Nierenerkrankung (PKD) und Primäre Ciliäre Dyskinesie bzw. Kartager-Syndrom (Badano et al., 2006; Tobin & Beales, 2009). Da Zilien in vielen unterschiedlichen Zelltypen vorkommen, wirkt sich eine Dysfunktion des Ziliums auf mehrere Organe gleichzeitig aus.

Ziliopathien betreffen daher selten einzelne Organe, sondern sind oft pleiotrope Syndrome mit teilweise ähnlichen Symptomen. (Badano et al., 2006; Oh & Katsanis, 2012). Ein häufiges Symptom ist z.B die Ausbildung von Zystennieren, die unter anderem mit Mutationen in PKD1/2 (*polycystic kidney disease*) oder PKHD1 (*polycystic kidney and hepatic disease*) einhergehen. Die von diesen Genen kodierten Proteine Polycystin-1/2 bzw. Fibrocystin sind in primäre Zilien lokalisiert und spielen vermutlich eine Rolle bei Wachstum und Differenzierung des renalen Sammelrohrepithels (Pazour et al., 2002; Nauli et al., 2003; Ward et al., 2003). Primäre Zilien sind weiterhin am mTOR- (*mechanistic target of rapamycin*) und Wnt/PCP-Signalweg (*planar cell polarity*) beteiligt, die wichtig für die Zellentwicklung und -differenzierung sind (Shillingford et al., 2006; Jones et al., 2008). Dass ziliäre Signalmechanismen an der Zellentwicklung beteiligt sind, spiegelt sich auch darin wieder, dass bei einigen Ziliopathien die Embryonalentwicklung gestört ist (Goetz & Anderson, 2010).

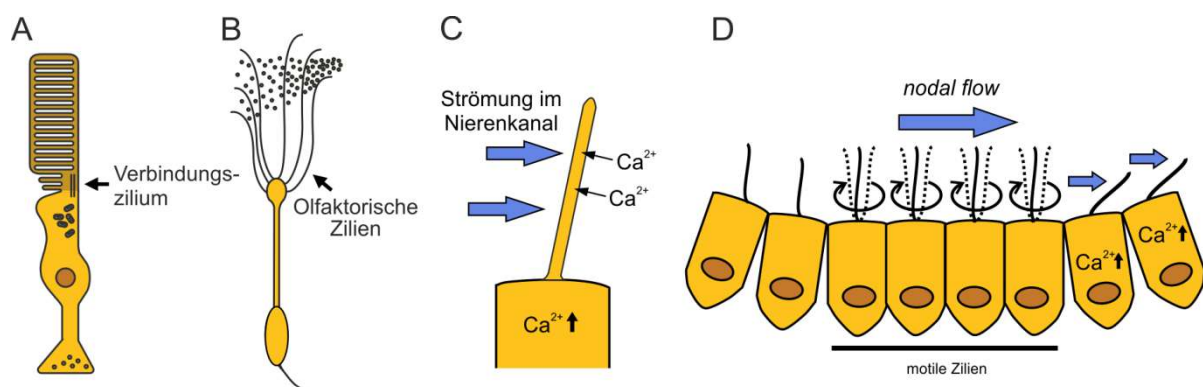


Abbildung 3: Sensorische Funktionen primärer Zilien. (A) Im Wirbeltier-Photorezeptor sind das Innen- und Außensegment über das Verbindungszilium miteinander verbunden. (B) Die olfaktorischen Zilien der Riechsinneszellen enthalten Rezeptoren, mit denen Geruchsstoffe detektiert werden. (C) Die Biegung von Zilien induziert einen Ca^{2+} -Einstrom in Nierenepithelzellen. (D) Motile Zilien im ventralen Knoten des Wirbeltierembryos erzeugen durch Rotation einen Flüssigkeitsstrom. Durch die Biegung immotiler Zilien am Rand des Knotens wird ein Ca^{2+} -Signal induziert.

Primäre Zilien erfüllen vor allem sensorische Funktionen (Singla & Reiter, 2006). Am besten charakterisiert ist die Rolle von Zilien bei der Olfaktion und Photorezeption der Wirbeltiere (Abbildung 3A-B; Insinna & Besharse, 2008; Jenkins et al., 2009). Im Nierenepithel fungiert das Zilium außerdem als Mechanosensor: Die Biegung des Axonems durch einen Flüssigkeitsstrom löst hier einen Ca^{2+} -Einstrom aus (Abbildung 3C; Praetorius & Spring, 2001; Praetorius & Spring, 2003). Dieser Ca^{2+} -Einstrom erfolgt durch Polycystin, einen ziliären Ca^{2+} -Kanal, der bei Patienten mit polyzystischen Nierenerkrankungen häufig mutiert ist (Nauli et al., 2003; Delling et al., 2013). Auch bei der Ausbildung der Links/Rechts-Asymmetrie in Wirbeltieren sind mechanosensitive Zilien entscheidend. Während der

Gastrulation des Wirbeltierembryos bildet sich eine als ventraler Knoten (*ventral node*) bezeichnete transiente Vertiefung, deren Zellen Zilien aufweisen (Hirokawa et al., 2006). Motile Zilien in der Mitte des Knotens erzeugen einen gerichteten Strom (*nodal flow*), der die Krümmung der immotilen Zilien nur auf einer Seite des Knotens hervorruft (Abbildung 3D). Dies führt zur Generation eines Ca^{2+} -Signals nur auf dieser Seite des Knotens und reguliert so die Ausbildung der Asymmetrie im Embryo (Nonaka et al., 1998; McGrath et al., 2003).

Dass Zilien viele wichtige Zellfunktionen regulieren ist mittlerweile unumstritten. Die Signalmechanismen, die im Zilium wirken, sind aber weiter unklar. Primäre Zilien sind ein lokal begrenztes Kompartiment mit vom Zytoplasma unabhängigen Ca^{2+} -Signalen, was darauf hinweist, dass Botenstoffe im Zilium lokal wirken (DeCaen et al., 2013; Delling et al., 2013). Neben dem Botenstoff Ca^{2+} spielen vermutlich auch zyklische Nukleotide eine Rolle (Johnson & Leroux, 2010). Mehrere GPCRs, die an die Adenylatzyklase koppeln, sowie die Adenylatzyklase Typ 3 (ACIII) sind unter anderem in hippocampalen Pyramidalneuronen spezifisch in Zilien lokalisiert (Händel et al., 1999; Brailov et al., 2000; Bishop et al., 2007; Berbari et al., 2008; Domire et al., 2011). Genetische Ablation des ziliären GPCRs Somatostatin-Rezeptor 3 (SSTR3) oder von ACIII führt bei Mäusen zu Gedächtnisdefekten, ohne die Zilienstruktur zu beeinträchtigen (Einstein et al., 2010; Wang et al., 2011). Dies deutet auf eine Rolle von ziliären cAMP-Signalen im adulten neuronalen System hin. Auch bei der Entwicklung des Neuralrohrs gibt es Hinweise auf ziliäre cAMP-Signale. Hier ist der Hedgehog-Signalweg von Bedeutung, bei dem durch den Liganden *sonic hedgehog* (Shh) die Aktivität der Transkriptionsfaktoren Gli2/Gli3 und so die Expression von Zielgenen reguliert wird. Die Aktivität dieser beiden Transkriptionsfaktoren wird durch PKA negativ reguliert, die am Basalkörper akkumuliert (Barzi et al., 2010; Tuson et al., 2011). Ein ziliärer, konstitutiv aktiver GPCR (Gpr161) koppelt an die Adenylatzyklase und reguliert den Shh-Signalweg ebenfalls negativ (Mukhopadhyay et al., 2013). Möglicherweise ist also ein lokales cAMP-Signal im Zilium oder an der Basis des Ziliums entscheidend für die Regulation des Shh-Signalwegs.

Bisher bekannte Methoden erlauben keine lokale Manipulation der cAMP-Konzentration, was die Analyse von cAMP-Signalen in Zilien erschwert. In dieser Arbeit habe ich daher versucht, bPAC über Importsequenzen in Zilien zu transportieren, um so die ziliäre cAMP-Konzentration mit Licht zu steuern.

1.5 cAMP-abhängige Regulation der Spermienfunktion

In Säugetierspermien reguliert cAMP eine Reihe von Mechanismen, die zur erfolgreichen Fertilisierung notwendig sind. Nach abgeschlossener Spermatogenese im Hoden befinden sich Spermien in einem unreifen Zustand, sie durchlaufen daher noch weitere Reifungsprozesse im Nebenhoden und im weiblichen Genitaltrakt. Während der Passage durch den Nebenhodenkopf (*Caput epididymis*) und den Nebenhodenkörper (*Corpus epididymis*) erlangen die Spermien durch Wechselwirkungen mit den umgebenden Epithelzellen und mit verschiedenen sekretierten Faktoren die Fähigkeit zur Motilität (Dacheux et al., 2003). Schließlich erreichen die Spermien den Nebenhodenschwanz (*Cauda epididymis*), in dem sie bis zur Ejakulation gelagert werden. Nach der Ejakulation sind Säugerspermien allerdings immer noch nicht zur Befruchtung fähig. Um diese Fähigkeit zu erlangen, müssen sie noch weiter reifen.

C. R. Austin und M. C. Chang waren die ersten, die entdeckten, dass sich ejakulierte Spermien zur effektiven Befruchtung der Oozyte eine gewissen Zeitspanne im weiblichen Genitaltrakt befinden müssen (Chang, 1951; Austin, 1952). Die molekularen und strukturellen Veränderungen während dieses Reifungsprozesses werden unter dem Begriff Kapazitiering zusammengefasst. *In vitro* können Spermien durch Inkubation mit bovinem Serumalbumin (BSA) und Bicarbonat (HCO_3^-) kapazitiert werden (Visconti et al., 1995a). Kapazitierte Spermien sind fähig zur Akrosomreaktion, der exozytotischen Ausschüttung hydrolytischer Enzyme, und zeigen eine charakteristische Form des Flagellenschlags, die als Hyperaktivierung bezeichnet wird (Florman et al., 2008; Suarez, 2008). Beide Mechanismen dienen der Überwindung der Zona pellucida, einer schützenden Glykoproteinschicht, die die Oozyte umgibt. Auf molekularer Ebene sind die Vorgänge, die zur Kapazitierung führen, bisher nur unvollständig verstanden, aber es wurde gezeigt, dass cAMP eine Schlüsselrolle spielt (Visconti et al., 1995b).

Durch Inkubation mit HCO_3^- kommt es in Spermien zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration (Okamura et al., 1985). HCO_3^- stimuliert eine atypische, lösliche Adenylatzyklase (*soluble adenylyl cyclase*; SACY), die im Gegensatz zu tmACs nicht durch G-Proteine reguliert wird (Buck et al., 1999; Chen et al., 2000). In Spermien ist die Aktivierung von PKA und die anschließende Phosphorylierung von Zielproteinen eine der Hauptfunktionen von cAMP (Harrison, 2004). In einem PKA-abhängigen Prozess verändert sich unter anderem die Lipidzusammensetzung der Zellmembran durch die Aktivität des Enzyms *Scramblase*, einem Mitglied der Phospholipid-Flippasen, das den Lipidaustausch

zwischen den beiden Lipideinzelschichten der Zellmembran ermöglicht (Gadella & Harrison, 2000; de Vries et al., 2003). Ein weiterer Effekt von cAMP während der Kapazitierung ist die PKA-abhängige Phosphorylierung von Tyrosinresten (Visconti et al., 1995a).

Die verschiedenen Signalvorgänge, die an der Kapazitierung beteiligt sind, sind komplex und eng miteinander verknüpft. Die wichtigsten Botenstoffe in diesem Prozess sind cAMP und Ca^{2+} . Ein Ca^{2+} -Einstrom ins Spermium durch CatSper-Ionenkanäle (*cation channel of sperm*) ist für die Ausbildung der hyperaktiven Motilität notwendig (Ren et al., 2001). Auch cAMP moduliert die Spermienmotilität: Die Erhöhung der cAMP-Konzentration durch HCO_3^- beschleunigt den Flagellenschlag (Wennemuth et al., 2003). Die HCO_3^- -stimulierte Aktivität der SACY wird hierbei zusätzlich durch Ca^{2+} reguliert, es gibt also einen *crossstalk* zwischen diesen beiden Signalwegen (Jaiswal & Conti, 2003; Carlson et al., 2007). Es ist allerdings umstritten, ob umgekehrt auch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von cAMP abhängt.

Membranpermeable Analoga zyklischer Nukleotide oder Aktivatoren von tmACs lösen einen Ca^{2+} -Einstrom in Spermien aus (Kobori et al., 2000; Ren et al., 2001; Wertheimer et al., 2013). Als molekularer Mechanismus wurde unter anderem die Aktivierung von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (*cyclic nucleotide-gated*; CNG-Kanäle) vorgeschlagen. Obwohl Transkriptionsanalysen und Immunfärbungen auf die Existenz solcher Kanäle in Säugerspermien hindeuten, konnten CNG-Kanäle nie funktionell in Spermien oder Hodengewebe nachgewiesen werden (Weyand et al., 1994; Feng et al., 1996; Kirichok et al., 2006). In *knockout*-Mäusen der CNG-Kanaluntereinheiten A2 und A3 wurden außerdem keine Fertilitätsdefekte festgestellt, was darauf hinweist, dass CNG-Kanäle keine oder nur eine untergeordnete Rolle in Säugerspermien spielen (Brunet et al., 1996; Biel et al., 1999). Durch elektrophysiologische Untersuchungen wurde schließlich gezeigt, dass membrangängige cAMP-Analoga in menschlichen Spermien den Ionenkanal CatSper (*cation channel of sperm*) über eine extrazelluläre Bindestelle unspezifisch aktivieren (Brenker et al., 2012). Der beobachtete Ca^{2+} -Einstrom wird also nicht durch intrazelluläres cAMP ausgelöst, sondern es handelt sich hierbei um einen pharmakologischen Nebeneffekt auf den CatSper-Kanal und damit um ein Laborartefakt. Um solche Artefakte zu vermeiden, werden andere Methoden als Pharmakologie zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration benötigt.

In meiner Arbeit habe ich eine transgene Maus generiert, die bPAC spermien-spezifisch exprimiert. So konnte ich die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Spermien mit Licht manipulieren und cAMP-abhängige Mechanismen in Spermien ohne unspezifische Nebeneffekte analysieren.

2. Material & Methoden

2.1 Material

Es wurden Chemikalien in p. A. Qualität der Firmen AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Biozym (Hess. Oldendorf), GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK), Merck-Millipore (Darmstadt), MWG Biotech (Ebersberg), Pierce (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Thermo Scientific (Waltham, USA), NEB (Schwalbach), und Roche (Mannheim) geliefert. Oligonukleotide (Primer) wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Für die Erhaltung und Vermehrung von Bakterienkulturen wurden Medien der Firma Sigma verwendet. Es wurden Chemikalien und Medien für die Zellkultur von LifeTechnologies (Carlsbad, USA) verwendet. Sekundäre Antikörper und Reagenzien für immunologische Nachweise wurden von Dianova (Hamburg), Li-Cor Biosciences (Lincoln, USA), LifeTechnologies (Carlsbad, USA) und Jackson Immuno Research Laboratories (Suffolk, UK) bezogen. Es wurden Objektträger der Firma Menzel (Braunschweig) verwendet. Proteine wurden auf die PVDF-Membranen Immobilon P und Immobilon FL der Firma Millipore (Eschborn) transferiert.

Alle Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Soweit erforderlich wurden Lösungen durch Autoklavieren (20 min, 121 °C) sterilisiert.

2.2 *E. coli* Zellkultur

2.2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmidvektoren

Die in Tabelle 1 aufgelisteten *E. coli* K12 Stämme wurden zur Anreicherung von Plasmid-DNA verwendet. Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidvektoren.

Tabelle 1: *E. coli* Stämme zur Anreicherung von Plasmid DNA und zur Proteinexpression.

Stammbezeichnung (Referenz)	Genotyp
XL1-Blue (Bullock et al., 1987; Stratagene)	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsd-R17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44, relA1, lac</i> [F' <i>proAB, lacI^qΔM15, Tn10</i> (Tet ^r)]
TOP10F' (Life Technologies)	F' [<i>lacIq Tn10</i> (Tet ^r)], <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1araD139 Δ(ara-leu)7697, galU galK rpsL endA1 nupG</i>
BL21 Codon Plus (DE3) RIL (Stratagene)	F' <i>ompT hsdS</i> (r_B^- , m_B^-) <i>dcm⁺ Tet^r gal endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam^r</i>]

Tabelle 2: Verwendete Plasmidvektoren.

Plasmid (Referenz)	Verwendung
pBluescript SK- (Short et al., 1988; Stratagene)	Klonierung und Sequenzierung von rekombinanter DNA
pcDNA3.1(+)/pcDNA3.1Zeo(+) (Life Technologies)	Transiente und stabile Genexpression in der Zelllinie HEK293
pEGFP-N1 (Clontech)	Transiente und stabile Genexpression in den Zelllinien mIMCD-3 und MDCK
VP179, VP180, VP181 (Dr. Susanne Schoch McGovern, Klinik für Epileptologie, Universität Bonn)	Bereitstellung der <i>rep</i> und <i>cap</i> Gene zur Replikation und Verpackung von AAV Vektoren
pAAV-Syn-MCS / pAAV-CMV-MCS (Dr. Susanne Schoch McGovern, Klinik für Epileptologie, Universität Bonn)	Klonierung und Herstellung von AAV Vektoren mit Synapsin I bzw. CMV Promotor

Fortsetzung Tabelle 2

Plasmid (Referenz)	Verwendung
pPrCExV-1 (Robert E. Braun, Jackson Laboratories, Maine, USA)	Genexpression über den Protamin-1-Promotor in einer transgene Mauslinie

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

Zur Anzucht von *E. coli* Kulturen wurde LB-Medium (Roth) in folgender Zusammensetzung verwendet: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl. LB-Agarplatten enthielten zusätzlich 15 g/l Agar. Die Flüssigmedien wurden in Flaschen autoklaviert (20 min, 121 °C) und bei RT gelagert. Agar enthaltende Medien nach dem Autoklavieren in sterile Petrischalen gegossen. Bei Bedarf wurden Antibiotika kurz vor dem Gießen der Platten in den höchstens noch 60 °C heißen Agar gegeben. Die Endkonzentrationen betrug für Ampicillin 100µg/ml und für Kanamycin 30µg/µl. Die Platten wurden bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.3 Anzucht von *E.coli* Bakterienkulturen zur Plasmidpräparation

E.coli Zellen einer Einzelkolonie wurden mindestens 8 h in LB-Medium bei 37 °C in einem Rotationsinkubator oder in einem Warmluftschüttler inkubiert. Zur Selektion auf transformierte Plasmide wurde das Medium mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt.

2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA

Kompetente Zellen wurden mit einer modifizierten CaCl₂-Methode hergestellt (Mandel & Higa, 1970). 0,5 ml einer *E.coli* Übernachtskultur wurden in 50 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert (entspricht einer Bakterienkonzentration von 2 x 10⁸ Zellen/ml) und 10 min bis 2 h auf Eis abgekühlt. Bei den nachfolgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen ständig auf Eis gehalten und ausschließlich vorgekühlte Gefäße und Lösungen verwendet. Die Zellen wurden zentrifugiert (10min, 5.000 g, 4 °C), das Pellet in 1 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und auf 25 ml aufgefüllt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert, in 1 ml 0,1 M CaCl₂/25 % Glycerin resuspendiert und auf 5 ml aufgefüllt. Nach weiteren 2 h auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3 Präparation von Nukleinsäuren

DNA wurde in TE bzw. TE_{RNase} aufgenommen:

TE

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

TE/RNase

TE mit 4 µl/ml RNase-Cocktail (Ambion)

2.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Plasmid-DNA wurden durch alkalische Lyse präpariert (Birnboim & Doly, 1979). 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (1 min, 10.000 g, RT) pelletiert und in 150 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 180 µl Lösung II und vorsichtigem Mischen (Invertieren) lysieren die Zellen, wobei die chromosomale DNA an der Zellwand gebunden bleibt. Zur Präzipitation der Zelltrümmer und Proteine wurden 225 µl Lösung III zugegeben, durch Invertieren gemischt und zentrifugiert (7 min, 18.000 g, 4 °C). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 700 µl Ethanol aus dem Überstand präzipitiert und abzentrifugiert (7 min, 18.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 500µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (7 min, 18.000 g, 4 °C), getrocknet und in 20 µl TE_{RNase} aufgenommen.

Lösung I

25 mM Tris/HCl, pH 7,5

10 mM EDTA

Lösung II

0,2 M NaOH

1 % SDS

Lösung III

3 M KAc, pH 4,8

2.3.2 Midi- und Maxipräparation

Um Ausbeute und Reinheit der DNA-Präparationen für die Transfektion von Säugetierzellen zu erhöhen, wurde das NucleoBond Xtra Kit (Macherey-Nagel) verwendet. 200-500 ml einer

E. coli Übernachtskultur wurden pelletiert (15 min, 5.000 g, 4 °C) und nach Herstellerangaben alkalisch lysiert. Das Lysat wurde anschließend über eine Anionenaustauschersäule gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde eluiert, mit Isopropanol ausgefällt und pelletiert (45 min, 15.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 200-300 µl TE aufgenommen.

2.3.3 Präparation von genomischer DNA aus Mausgewebe

Zur Amputation der Schwanzspitzen wurden drei Wochen alte Mäuse mit Isofluran (Curamed Pharma) betäubt. Nach Setzen der Ohrlochmarkierungen wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze amputiert. Die Gewebestücke wurden in je 500 µl Lysispuffer bei 56 °C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz mehrmals invertiert und zentrifugiert (18.000 g, 5 min, RT). Anschließend wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol die DNA aus dem Überstand gefällt. Nach einer Zentrifugation (18.000 g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert (18.000 g, 5 min, 4 °C). Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 100 µl TE gelöst.

Tail-Lysispuffer:

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

100 mM EDTA, pH 8,0

0,5% SDS

1 mg/ml Proteinase K

2.4 Reinigung und Auftrennung von Nukleinsäuren

2.4.1 Ethanol-Präzipitation

Um DNA aufzukonzentrieren oder umzupuffern, kann DNA aus einer salzhaltigen Lösung durch Alkoholzugabe präzipitiert werden. Die DNA-Lösung wurde hierfür auf eine Natriumacetat-Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit dem dreifachen Volumen an Ethanol gemischt. Durch Zentrifugieren (30-60 min, 17.000 g, 4 °C) wurde die DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wurde schließlich mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE oder H₂O aufgenommen.

2.4.2 Aufreinigung mit SureClean

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an SureClean (Bioline) versetzt, nach Herstellerangaben zentrifugiert und pelletiert und schließlich mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 20 µl TE resuspendiert.

2.4.3 Photometrische Quantifizierung von DNA

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration wurde die DNA in TE verdünnt und die Absorption bei 260 nm (OD_{260}) gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml. Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten konnten durch den Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm beurteilt werden, der nicht kleiner als 1,8 sein sollte. Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung am Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Products) nach dem gleichen Prinzip.

2.4.4 Quantifizierung von DNA im Agarosegel

Durch den Vergleich der Bandenintensitäten mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größenstandard wurde die DNA-Menge einer Probe im Agarosegel abgeschätzt. Das Agarosegel wurde hierfür mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt, um die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar zu machen.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

In Agarosegelen werden Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach aufgetrennt. Für Trennungen im Bereich von 500-10.000 bp wurden 1%ige Gele verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TAE vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf 60 °C wurde die Gellösung mit 1 µg/ml EtBr versetzt und in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen. Die Proben wurden mit 10 x Ladepuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 120 V für 20 min. Anschließend wurden die Nukleinsäurebanden unter UV-Licht ausgewertet. Als DNA-Größenstandards für Agarosegele wurden Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker und GeneRuler 1 kb DNA ladder (beide Thermo Scientific) verwendet.

50 x TAE

2 M Tris/Acetat pH 7,5

50 mM EDTA

10 x Ladepuffer

10 x TAE

50% Glyzerin

0,25% Xylencyanol

2.4.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin Extract II-Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Die DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, mit 200 µl Puffer NT pro 100 mg Agarose versetzt und die DNA nach Herstellerangaben aus der Agarose eluiert.

2.5 Modifizierung von Nukleinsäuren**2.5.1 Restriktion von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde die DNA in Reaktionspuffer des jeweiligen Herstellers (Roche bzw. New England Biolabs) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert (meist 37 °C). Restriktionen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. War dies nicht möglich, wurde zwischen den einzelnen Inkubationen das benötigte Restriktionsfragment aus einem präparativen Agarosegel eluiert. Pro µg DNA wurde 1-3 Units des Restriktionsenzym eingesetzt, dabei sollte das Volumen eingesetzter Nukleasen 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da das in der Enzymlösung enthaltene Glyzerin unspezifische Aktivität bzw. Inaktivierung bei bestimmten Enzymen hervorruft. Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 15-20 µl durchgeführt und nach 1-2 h Inkubation vollständig auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach vollständiger Restriktion wurde der komplette Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und die gewünschte Bande mit dem NucleoSpin Extract II-Kit (Macherey-Nagel) aus dem Gel eluiert.

2.5.2 Ligation

In einer Ligation wurden ca. 50 ng geschnittener Vektor und ein 3-5-facher molarer Überschuss des DNA-Fragments in 1 x Ligasepuffer (Roche) eingesetzt. Bei einer Ligation von zwei DNA-Fragmenten in den Vektor wurden beide Fragmente in gleicher Molarität eingesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurde mit 1 U T4 DNA-Ligase (Roche) 60 min bei RT bzw. über Nacht bei 16 °C ligiert.

2.5.3 Transformation

5 µl eines Ligationsansatzes wurden mit 5 µl 10 x CM versetzt, mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und kurz auf Eis gekühlt. 50 µl kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit dem Ligationsansatz gemischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für 1 min bei 42 °C inkubiert und im Anschluss für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl LB-Medium ohne Antibiotika wurden die Zellen bei 37 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 800 rpm geschüttelt. Nach 30 min wurden die Zellen auf LB-Agar mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Retransformation wurde benutzt, um Plasmid-DNA aus einer Plasmidpräparation erneut amplifizieren zu können. Dazu wurden ca. 0,5 µg Plasmid-DNA mit 50 µl kompetenten Zellen versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB-Agar mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

10 x CM

100 mM CaCl₂

400 mM MgCl₂

2.5.4 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon in Auftrag gegeben. Hierfür wurden 1,5 µg Plasmid-DNA aus Mini-Präparationen mit H₂O auf 15 µl aufgefüllt und versendet.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente spezifischer Länge und Sequenz amplifiziert werden. In mehreren Zyklen wird die

Matrizen-DNA hitzedenaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden (Primern) hybridisiert und diese mit einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis et al., 1986).

2.6.1 Primersynthese

Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert und als Lyophilisat geliefert. Die Primer wurden mit TE auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Bedingungen für die PCR-Reaktionen

Die Reaktionen wurden in einem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) oder in einem TRIO-Thermoblock (Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 95 °C denaturiert. Während der Zyklen wurde für jeweils 45 s denaturiert bzw. hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer, die nach folgender Formel bestimmt wird:

$$T_m = (G/C) \times 4 \text{ °C} + (A/T) \times 2 \text{ °C} - (\text{Basenfehlpaarung}) \times 4 \text{ °C} - 4 \text{ °C}$$

Die Länge der Elongationsphase bei 72 °C richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments (1 min pro 1000 bp). Bei Klonierungen wurde nach 10 Zyklen die Hybridisierungstemperatur um 6 °C heraufgesetzt, insgesamt wurden 30-40 Zyklen durchgeführt. Anschließend erfolgte eine letzte Elongation bei 72 °C für 10 min. Zur Klonierung wurde die KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen) verwendet.

PCR-Ansatz für Klonierungen

50 ng Plasmid-DNA

5 µl je Primer (10 µM)

5 µl 10 x PCR buffer

5 µl dNTP-Mix (2 mM)

5 µl MgCl₂ (25 mM)

1 µl KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/µl)

ad 50 µl mit H₂O

Für die Genotypisierung von transgenen Mäusen wurde der DreamTaq PCR Mastermix (Thermo Scientific) verwendet. Hierbei wurden in einem 30 µl PCR-Ansatz 1,5 µl Schwanzspitzen-DNA und je 1,5 µl Primer verwendet.

2.6.3 PCR-Reaktion zur DNA-Mutagenese

Mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) wurden gezielt Mutationen in Plasmid-DNA eingefügt. Dazu wurden mit dem Programm QuikChange Primer Design zunächst mutagene Primer erstellt. Anschließend wurde eine PCR-Reaktion mit der *Pfu Turbo* DNA Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt und der Ansatz mit dem Enzym *DpnI* für 1 h bei 37 °C verdaut. Dieser Schritt entfernt das methylierte Original-Plasmid, das nicht die gewünschte Mutation enthält. Danach wurden 10 µl des Ansatzes in *E. coli* transformiert, die Plasmid-DNA von Einzelklonen präpariert und die Mutation durch Sequenzierung überprüft.

2.6.4 Reinigung von PCR-Produkten

Je 5 µl eines PCR-Ansatzes für Klonierungen wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Fragmente analysiert. Der Rest des Ansatzes wurde mit Hilfe des SureClean Kits (Bioline) aufgereinigt. Falls auf dem Agarosegel Nebenprodukte der PCR-Reaktion sichtbar waren, wurde der PCR-Ansatz auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, das korrekte PCR-Fragment ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Extract II-Kits (Macherey-Nagel) eluiert.

2.7 Säugetierzellkultur

2.7.1 Sterilarbeit

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Umluftwerkbank (Herasafe, Thermo Scientific) mit Handschuhen durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Sanyo) bei 37 °C, 7,5 % CO₂ und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.7.2 Zelllinien

Die in dieser Arbeit zur heterologen Proteinexpression verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Säugerzelllinien

Zelllinie (ATCC-Zellbank Nr.)	Organismus
HEK293 (ATCC-CRL-1573)	<i>Homo sapiens</i>
mIMCD-3 (ATCC-CRL-2123)	<i>Mus musculus</i>
MDCK (ATCC-CC-34)	<i>Canis familiaris</i>

2.7.3 Erhaltung und Splitting

Säugerzellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 9 cm) kultiviert. Dabei wurden die Zellen in DMEM+GlutaMAX (Life Technologies) + 10 % FCS (Biochrom) erhalten, lediglich mIMCD-3 Zellen wurde in DMEM/F-12 + 10 % FCS kultiviert. Bei ca. 75 % Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 3-5 ml sterilem PBS gewaschen und durch Inkubation mit 0,8-1 ml 0,05 % Trypsin-EDTA (Life Technologies) für 2-3 min bei 37 °C auf einer Heizplatte abgelöst. Die Reaktion wurde mit 5 ml Medium gestoppt, die Zellen resuspendiert und 0,2-1 ml der Zellsuspension auf neuen Schalen mit frischem Medium ausgesät. Nach 30-40 Passagen wurden die Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Erhaltung verwendet.

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

6,5 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

pH 7,4

2.7.4 Kryokonservierung von Säugetierzellen

Für die Kryokonservierung wurden Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (60-70% Konfluenz) befanden. Die Zellen wurden zunächst mit 3-5 ml PBS gewaschen und durch 2-3 min Inkubation mit 0,8-1 ml 0,05% Trypsin-EDTA bei 37 °C auf einer Heizplatte abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 200 g, RT) geerntet und die Zellzahl mit frischem Medium auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. In Kryoröhrchen (Nunc A/S, Thermo Scientific) wurden 100 µl DMSO vorgelegt, 900 µl Zellsuspension dazugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Zellen wurden über Nacht in einem Kryocontainer (Mr. Frosty, Thermo Scientific) bei -80 °C stufenweise heruntergekühlt und in

flüssigem Stickstoff gelagert. Um zuvor eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen kurz im Wasserbad bei 37 °C erwärmt bis die Suspension vollständig aufgetaut war. Die Zellen wurden in ca. 10 ml warmem Kulturmedium vorsichtig durch Pipettieren resuspendiert und zur Entfernung des DMSO im Einfriermedium 5 min bei 200 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und 300 µl und 600 µl der Suspension auf Zellkulturschalen (Ø 9 cm) ausgesät.

2.7.5 Lipofektion

Für die Transfektion mit Lipofectamine2000 (Life Technologies) wurden die Zellen so ausgesät, dass diese am Tag der Transfektion ca. 70 % konfluent waren. Pro Transfektion wurde zunächst die geeignete DNA-Menge in OptiMEM Medium (Life Technologies) verdünnt und in einem parallelen Ansatz OptiMEM mit Lipofectamine2000 gemischt. Die beiden Ansätze wurden 5 min bei RT inkubiert, vereinigt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen, die Zellen zwei Mal in PBS gewaschen und anschließend OptiMEM zu den Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz wurde auf den Zellen verteilt und 4-12 h im Inkubationsschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in frischem Medium weiterkultiviert. Für immunzytochemische Analysen wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion auf PLL-beschichteten Glasplättchen umgesetzt.

2.7.6 Elektroporation

Für die Elektroporation wurde das Neon Transfection System (Life Technologies) verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und trypsiniert. Nach Zugabe von Medium wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 200 g) und zwei Mal mit je 10 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen und die Zellzahl dabei auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 125 µl Zellsuspension in ein Eppi überführt, pelletiert (5 min, 200 g) und in 125 µl Puffer R (Life Technologies) aufgenommen. Zum Transfektionsansatz wurden 2 µg Plasmid-DNA gegeben. Der Ansatz wurde mit einer Goldspitze aufgezogen, nach Herstellerangaben elektroporiert und auf 5 cm Zellkulturschalen mit frischem Medium ausgesät.

2.7.7 Generation stabiler Zelllinien

24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in 10 ml frischem Medium aufgenommen und auf eine 9 cm Zellkulturschale ausgesät. Auf weiteren Schalen wurde jeweils 9 ml Medium vorgelegt und ausgehend von der ersten Platte schrittweise zehnfache Verdünnungen ausgesät. Nach weiteren 48 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium auf gegen frisches Medium mit entsprechenden Antibiotika ausgetauscht. G418 wurde hierbei in einer Konzentration von 1,2 mg/ml eingesetzt, Zeocin in einer Konzentration von 200 µg/ml. Die Zellen wurden nachfolgend für 10-12 Tage weiter im Brutschrank inkubiert, dabei wurde das Medium zwei Mal wöchentlich gewechselt. Nachdem sich aus vereinzelt angewachsenen Zellen Kolonien von etwa 50 Zellen gebildet hatten, wurde die Position dieser Klone auf der Unterseite der Platte markiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Ethanol sterilisierte Klonierungsringe wurden über jedem Einzelklon positioniert. Durch Zugabe von je 30 µl Trypsin in jeden dieser Ringe wurden die Zellen der Kolonie von der Platte gelöst und in eine 96er Multiwellplatte mit frischem Medium überführt. Im Verlauf der Kultivierung wurden die Zellklone vermehrt und immer auf die nächstgrößere Multiwellplatte umgesetzt. Hier betragen die finale Antibiotikakonzentrationen 0,8 mg/ml (G418) bzw. 100 µg/ml (Zeocin). Um die stabile Expression des Zielproteins nachzuweisen wurden Western Blot-Analysen durchgeführt, im Falle eines Fluoreszenzmarkers wurden positive Klone am Fluoreszenzmikroskop (Nikon) identifiziert.

2.8 Präparation von Proteinen

2.8.1 Proteinpräparationen aus Säugetierzellen

Zur Präparation der gesamten Proteine aus Zellkulturlinien wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit Hilfe eines Gummispatels vom Schalenboden geschabt. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 200 g pelletiert. Das Pellet wurde in 200-500 µl Lysispuffer aufgenommen, mit Hilfe einer Kanüle (Ø 0,55 mm) mechanisch aufgeschlossen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (5 min, 10.000 g, 4 °C) und der Überstand bei -80 C gelagert.

Lysispuffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,6

140 mM NaCl

1 mM EDTA

1 % Triton X-100

1:500 mPIC

2.8.2 Proteinpräparationen aus Mausgewebe

Mäuse wurden mit Isofluran (Curamed Pharma) narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die entsprechenden Gewebe wurden freipräpariert und entweder direkt zur Proteinpräparation eingesetzt oder bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert. Zur Proteinpräparation wurde das Gewebe zunächst mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend in 1-3 ml Lysispuffer in einem Potter-Homogenisator bei 300-500 u/min homogenisiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden Gewebereste abzentrifugiert (5 min, 10.000 g, 4 °C) und der Überstand bei -80°C gelagert.

2.8.3 Konzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Um die Proteinkonzentration von Lösungen zu bestimmen wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce) verwendet. Die Bestimmung wurde in einer 96er Multiwellplatte durchgeführt. Die Probe wurde mit H₂O 1:5 und 1:10 verdünnt, es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Jeweils 10 µl dieser Verdünnungen wurden in jedes well pipettiert, mit 190 µl Farbreagenz (Reagenz A gemischt mit Reagenz B im Verhältnis 50:1) vermischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Danach wurden die Proben auf RT abgekühlt und die Absorption bei 570 nm an einem Platerader (Packard Instrument Company) bestimmt. Zur Kalibrierung einer Eichgeraden wurden definierte Mengen an BSA zwischen 0 und 2 mg/ml bestimmt.

2.9 Trennung und Nachweis spezifischer Proteine

2.9.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen wurde mit Hilfe von denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die SDS-PAGE erfolgte in „Mini Twin“-Kammern (Biometra) mit Gelen mit den Maßen 0,1 x 8 x 10 cm. Es wurden 5%ige Sammelgele und 7,5-12,5%ige Trenngele verwendet. Die Proben wurden mit einem

entsprechenden Volumen an 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5-15 min bei 95 °C aufgeköcht. Die elektrophoretische Auftrennung in SDS-Laufpuffer erfolgte bei 12-15 mA im Sammelgel und 20-25 mA im Trenngel. Als Größenstandard wurde der Protein Marker VI prestained (Appllichem) verwendet.

<u>SDS-Laufpuffer</u>	<u>4 x SDS-Probenpuffer</u>
25 mM Tris/HCl	200 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,1% SDS	8 % SDS
192 mM Glyzin	4 % β -Mercaptoethanol
	50 % Glyzerin
	0,04 % Bromphenolblau

2.9.2 Transfer und Immobilisierung von Proteinen mittels Western Blot

In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden in Anlehnung an Towbin auf PVDF-Membranen (Immobilon P bzw. Immobilon FL, Millipore) transferiert (Towbin et al., 1979). Die Proteine wurden im *semi-dry* Verfahren in einem Milliblot-Graphit Elektroblot-System (Millipore) vom Gel auf die Membran übertragen. Die Transferzeit betrug 50 min bei 2,4 mA/cm² Gelfläche. Ein erfolgreicher Transfer konnte durch den sichtbaren Transfer des gefärbten Größenstandards überprüft werden. Für den Fall, dass die Membran vor der Immunodetektion geschnitten werden musste, wurde die Membran mit 0,2 % Ponceau S (Sigma) in 2 % Essigsäure angefärbt.

2.9.3 Immunodetektion immobilisierter Proteinen

Zunächst wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran blockiert und die Membran anschließend mit dem primären Antikörper (Erstantikörper) inkubiert. Durch Waschen der Membran in PBS-T wurde überschüssiger Erstantikörper entfernt und der spezifische Antigen-Antikörperkomplex dann mit einem sekundären Antikörper (Zweitantikörper) nachgewiesen, der an Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) oder einen Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Vor der Detektion der Immunkomplexe wurde die Membran erneut mit PBS-T gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf einem Taumler. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst. War der Zweitantikörper an HRP gekoppelt, wurde die Membran mit dem

ECL-Reagenz des Chemiluminescence Detection Kit for Horseradish Peroxidase (AppliChem) für 2-5 min im Dunkeln inkubiert und die Detektion fand am LAS-3000 Luminescent Image Analyzer (FUJIFILM) statt. War der Zweitantikörper mit einem Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff versehen, wurde die Membran am Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences) gescannt.

Tabelle 4: Arbeitsschritte und Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen bei der Immunodetektion am LAS-3000.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit	Inkubationslösung
Blockierung	30 min (RT)	2 % Trockenmilch in PBS-T
Waschen (2 x)	10 min (RT)	PBS-T
Erstantikörper	Über Nacht (4 °C)	1. Antikörper in PBST-T
Waschen (2 x)	10 min	PBS-T
Zweitantikörper	45 min (RT)	2. Antikörper in PBST-T
Waschen (2 x)	10 min (RT)	PBS-T
Waschen (2 x)	5 min (RT)	PBS

Tabelle 5: Arbeitsschritte und Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen bei der Immunodetektion am Odyssey Infrared Imaging System.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit	Inkubationslösung
Blockierung	30 min (RT)	PBS-T + Li-Cor Blockierungslösung (1:1)
Waschen (2 x)	15 min (RT)	PBS-T
Erstantikörper	Über Nacht (4 °C)	Antikörper in PBST-T + Blockierungslösung (1:1)
Waschen (2 x)	15 min	PBS-T
Zweitantikörper	45 min (RT)	Antikörper in PBST-T + Blockierungslösung (1:1)
Waschen (2 x)	15 min (RT)	PBS-T
Waschen (2 x)	5 min (RT)	PBS

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

6,5 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

0,05 % Tween-20

pH 7,4

2.9.4 Entfernung von primären und sekundären Antikörpern (Stripping)

Um bereits gebundene Antikörper von einer Membran zu entfernen, wurde die Membran gestriipt. Dies ermöglichte den immunologischen Nachweis von Proteinen unter Verwendung anderer Antikörper. Bereits getrocknete Membranen wurden für 1 min in Methanol reaktiviert. Die Membran wurde zum Strippen für 40 min bei 65 °C in Stripping-Puffer geschwenkt und anschließend 5 x mit TBS gewaschen. Die Blockierung und erneute Immunodetektion erfolgten wie oben beschrieben.

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris/HCl pH 6,8

2 % SDS

2 % β -Mercaptoethanol

TBS

137 mM NaCl

3 mM KCl

25 mM Tris

pH 7,8

2.10 Immunfluoreszenz

2.10.1 Immunzytochemie

Für die immunzytochemische Analyse von Säugerzellen wurden die Zellen 24-48 h nach der Transfektion, mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS bei RT fixiert. Konfluente MDCK Zellen wurden für 15 min mit 2,5 % PFA fixiert. Die immunzytochemische Färbung erfolgte in drei Schritten: Im ersten Schritt wurden die Zellen mit einer Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Im dritten Schritt wurde der Antigen-Antikörperkomplex mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Zur Anfärbung des Zellkerns wurde DAPI (1:10.000, Life Technologies) zu der Zweitantikörper-Inkubationslösung gegeben. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen, sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden mit dem Eindeckelmedium Aqua Poly/Mount (Polysciences) auf einem Objektträger versiegelt. Die Zellen wurden unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Fluoview FV 1000, Olympus) betrachtet. Durchlichtaufnahmen wurden ebenfalls mit dem konfokalen Mikroskop und einer differenziellen Interferenzkontrast (DIC) Optik aus einer einzigen Bildebene aufgezeichnet.

Tabelle 6: Arbeitsschritte und Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen bei immunzytochemischen Färbungen.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit	Inkubationslösung
Waschen	5 min (RT)	PBS
Fixierung	5/15 min (RT)	4 %/2,5 % PFA in PBS
Waschen (3 x)	5 min (RT)	PBS
Blockierung	30 min (RT)	CT
Erstantikörper	1 h (RT)	1. Antikörper in CT
Waschen (2 x)	10 min (RT)	PBS
Zweitantikörper	30 min (RT)	2. Antikörper in CT
Waschen (2 x)	10 min (RT)	PBS

CT

5 % Chemiblocker (Millipore)

0,5 % Triton X-100

in PBS

2.10.2 Anfertigen von Gefrierschnitten

Adulte männliche Mäuse wurden mit Isofluran (Curamed Pharma) narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Der Hoden wurde freipräpariert, von umliegendem Gewebe befreit und mit einer Kanüle zwei Mal punktiert und über Nacht bei RT in 4 % PFA inkubiert. Nach einmaligem Waschen in PBS für 10 min wurde der Hoden für 1 h in eine 10 %ige Saccharoselösung überführt und anschließend über Nacht bei 4 °C in 30 % Saccharose inkubiert. Danach wurde der Hoden in Tissue TEK Einbettmedium (Sakura Finetek) überführt, in flüssigem Stickstoff kurz angefroren und für mindestens eine Nacht bei -80 °C gelagert. Vor dem Schneiden wurden die Gewebe 2 h auf -20 °C erwärmt. Es wurden 16-20 µm dicke Querschnitte in einem 2800 Frigocut-E Kryostaten (Reichert-Jung, Nussloch oder HM560 M, Microm, Neuss) bei einer Umgebungstemperatur von -30 °C, einer Messertemperatur von -22 °C und einer Objekttemperatur von -23 °C bis -28 °C angefertigt. Die Schnitte wurden auf SuperFrost Plus Objektträger (Menzel) aufgenommen, kurz angetrocknet und bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

2.10.3 Immunhistochemie

Die gefrorenen Schnitte wurden aufgetaut, mit einem hydrophoben Marker (ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen, Vector Laboratories) umrandet und 10 min bei RT mit 4 % PFA fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung in drei Schritten: Zunächst wurde das Gewebe mit einer Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Im letzten Schritt wurde der spezifische Antigen-Antikörperkomplex mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Zur Kernfärbung wurde DAPI (1:5.000 verdünnt; Invitrogen) zur Zweitantikörper-Inkubationslösung gegeben. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Deckgläschen und dem Eindeckmedium Aqua Poly/Mount (Polysciences) versiegelt. Die Schnitte wurden unter einem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Fluoview FV 1000, Olympus) analysiert. Durchlichtaufnahmen wurden ebenfalls mit dem konfokalen Mikroskop und einer Differenziellen Interferenzkontrast-Optik (DIC) digital aus einer Bildebene aufgezeichnet.

Tabelle 7: Arbeitsschritte und Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen bei immunhistochemischen Färbungen

Arbeitsschritt	Inkubationszeit	Inkubationslösung
Waschen	5 min (RT)	PBS
Fixierung	5/15 min (RT)	4 %/2,5 % PFA in PBS
Waschen (3 x)	5 min (RT)	PBS
Blockierung	30 min (RT)	CT
Erstantikörper	Über Nacht (4 °C)	1. Antikörper in CT
Waschen (2 x)	10 min (RT)	PBS
Zweitantikörper	30 min (RT)	2. Antikörper in CT
Waschen (2 x)	10 min (RT)	PBS

2.10.4 Antikörper

Monoklonale und polyklonale Erstantikörper wurden kommerziell erworben oder in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum München) durch Immunisierung von Ratten mit Peptiden (Peptide Specialty Laboratories) hergestellt. Alle verwendeten monoklonalen Erstantikörper sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Zweitantikörper sind in Tabelle 9 aufgeführt. In der Spalte „Konjugat“ ist

angegeben, ob der Antikörper mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder mit einem Fluorophor gekoppelt ist. Die Antikörper wurden im Western Blot (WB) oder in der Immunzytochemie (IZC) eingesetzt.

Tabelle 8: Verwendete Erstantikörper.

Antikörper	Spezies	Subklasse	Antigen	Hersteller	WB	IZC
anti-ACIII	Kaninchen	poly	ADCY3	Santa Cruz		1:400
anti-Calnexin	Kaninchen	poly	Calnexin	Sigma	1:20.000	
anti-GFAP	Kaninchen	poly	GFAP	abcam		1:500
anti-GFP	Kaninchen	poly	GFP	abcam	1:5.000	
anti-HA	Ratte	IgG1	HA tag	Kremmer	1:5.000	1:1.000
anti-His	Maus	IgG2b	poly-His tag	Millipore	1:1.000	
anti-MAP2	Huhn	IgY	MAP2	abcam		1:5.000
anti-NeuN	Maus	IgG1	Neuronale Nuclei	Millipore		1:500
anti-NFH	Maus	IgG1	Neurofilament H	abcam		1:500
anti-Phospho-PKA-Substrat	Kaninchen	IgG	Phospho-PKA Substrat	Cell Signaling	1:1.000	
anti-PKA[C]	Maus	IgG2b	Proteinkinase A	BD	1:4.000	
anti-pY 4G10	Maus	IgG2bκ	Phosphotyrosin	Millipore	1:2.000	
anti-RFP	Kaninchen	poly	RFP	MBL		1:500
anti-sAC R21	Maus	IgG1	sAC	CEP Biotech	1:1.000	
anti-bovine α -tubulin	Maus	IgG1	α -tubulin	Molecular Probes		1:200
anti-tubulin	Maus	IgG1	tubulin	Sigma	1:5.000	

Tabelle 9: Verwendete Zweitantikörper

Antikörper	Spezies	Konjugat	Hersteller	WB	IZC
anti-ch (Huhn)	Esel	Cy2	Dianova		1:200
anti-rb (Kaninchen)	Esel	HRP	Dianova	1:5.000	
anti-rb (Kaninchen)	Esel	IRDye800	Li-Cor Biosciences	1:20.000	
anti-rb (Kaninchen)	Ziege	Alexa488	Life Technologies		1:500
anti-rb (Kaninchen)	Esel	Cy3	Dianova		1:400
anti-rb (Kaninchen)	Esel	DyeLight 649	Dianova		1:400
anti-ms (Maus)	Schaf	HRP	Dianova	1:5.000	
anti-ms (Maus)	Esel	IRDye680	Li-Cor Biosciences	1:20.000	
anti-ms (Maus)	Esel	IRDye800	Li-Cor Biosciences	1:20.000	
anti-ms (Maus)	Ziege	Alexa488	LifeTechnologies		1:400
anti-rt (Ratte)	Ziege	HRP	Dianova	1:5.000	
anti-rt (Ratte)	Ziege	IRDye680	Li-Cor Biosciences	1:20.000	
anti-rt (Ratte)	Esel	Alexa488	Dianova		1:400
anti-rt (Ratte)	Esel	Cy3	Dianova		1:400

2.11 Versuchstiere

2.11.1 Haltung und Zucht

In dieser Arbeit verwendete Mäuse wurden im Forschungszentrum caesar in Bonn gehalten. Die Tiere wurden *ad libitum* mit einer Zuchtdiät für Ratten und Mäuse (1314 Standard; Altromin) und mit Trinkwasser versorgt. Nachkommen wurden im Alter von drei Wochen von ihren Müttern abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und genotypisiert. Um das genaue Alter der Embryonen bestimmen zu können, wurden Mäuse kontrolliert über eine Nacht verpaart. Am Morgen nach der Verpaarung wurden die Weibchen auf Vaginalpfropf (*plug*) untersucht. War dieser vorhanden, wurde dieser Tag als embryonaler Tag 0,5 (E0,5) festgelegt.

2.11.2 Generation einer transgene Mauslinie durch pronukleäre Injektion

Zur Generation der transgenen Mauslinie Prot1-bPAC wurde ein bPAC-HA-Fragment mit PCR amplifiziert, mit BamHI geschnitten und in den Vektor pPrCEXV-1 (Robert E. Braun, Jackson Laboratories, Maine, USA) ligiert. Der Vektor wurde für die Injektion linearisiert. Die pronukleäre Injektion wurde am Haus für Experimentelle Therapie (HET) am Universitätsklinikum Bonn durchgeführt, dabei wurde ein Standardprotokoll für diese

Methode verwendet (Ittner & Götz, 2007). Der Nachwuchs wurde per PCR genotypisiert und die individuellen Founder-Tiere mit Wildtyp-Tieren weiterverpaart. Insgesamt wurden 5 weibliche und 7 männliche Founder-Tiere zur weiteren Analyse vom HET geliefert.

2.12 Arbeiten mit Mausspermien

2.12.1 Präparation von Mausspermien

Adulte männliche Mäuse wurden mit Isofluran (Curamed Pharma) narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Nebenhodenschwänze (*cauda epididymis*) wurden freipräpariert, von Fettgewebe befreit und in jeweils 500 µl TYH platziert (Toyoda & Chang, 1974). Inzisionen ins Gewebe ermöglichten ein Ausschwimmen der Spermien in den Puffer. Nach 15-30 min Inkubation bei RT wurde die Spermiesuspension vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellzahl bestimmt. Zur Kapazitierung enthielt das Medium 110 mM NaCl und es wurden 25 mM NaHCO₃ und 3 mg/ml BSA hinzugefügt.

TYH

137,5 mM NaCl

4,8 mM KCl

2 mM CaCl₂

1,2 mM KH₂PO₄

1 mM MgSO₄

5,6 mM Glucose

10 mM HEPES

0,5 mM Natriumpyruvat

10 mM L-Lactat

pH 7,4

2.12.2 Proteinpräparation aus Mausspermien

Die Spermien wurden bei 700 g für 7 min abzentrifugiert, in 25 µl Lysispuffer pro 2×10^6 Spermien aufgenommen und mehrmals durch eine Kanüle gezogen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen zusätzlich für 3×15 s sonifiziert und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (5 min, 10.000 g, 4 °C). Alternativ zur Präparation von Proteinen durch Lyse wurden $1-2 \times 10^6$ Spermien für 5 min bei 5.000 g pelletiert, in 20 µl $2 \times$ SDS Probenpuffer

aufgenommen und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die komplette Probe wurde geladen und über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.12.3 Analyse des Flagellenschlags

Die Motilität von Spermien wurde in flachen Messkammern mit 150 µm Tiefe analysiert. Für Einzelaufnahmen von Spermien wurde die BSA-Konzentration durch Verdünnung auf 0,3 mg/ml eingestellt, so dass die Spermien nur mit dem Kopf an der Glasoberfläche hafteten und das Flagellum frei beweglich war. Aufnahmen von Spermien wurden an einem inversen Mikroskop (IX71; Olympus) mit Dunkelfeld-Kondensator mit einem 10 x Objektiv (UPlanFL, NA 0.3; Olympus), und zusätzlicher 1.6 x Vergrößerung angefertigt (16 x finale Vergrößerung). Durch Verwendung eines Inkubators (Life Imaging Services) wurde die Temperatur auf 37 °C eingestellt. Mit einer roten LED (M660L3-C1; Thorlabs) wurden die Proben stroboskopisch belichtet (2 ms Belichtungszeit), die Kamera und die LED wurden mit Hilfe eines Funktionsgenerators (33220A; Agilent) synchronisiert. Videos wurden mit einer Bildfrequenz von 90 Hz (frei schwimmend) oder 200 Hz (nur das Flagellum beweglich) mit einer CMOS-Kamera aufgenommen (11 µm Pixelgröße, Dimax; PCO). Zur Stimulation von bPAC wurde zusätzliche eine UV-LED (365 nm, ~12 mW) in den Epifluoreszenz-Eingang des Mikroskops eingekoppelt (M365L2-C1; Thorlabs) und die Belichtungszeit über einen TTL Frequenzgenerator eingestellt (UTG100; ELV). Die Quantifizierung des Flagellenschlags erfolgte über ein eigens dafür angefertigtes MATLAB-Analyseprogramm (Dr. Luis Alvarez, Forschungszentrum caesar).

2.12.4 *In-vitro*-Fertilisation

Durch intraperitoneale Injektion von 10 I.U. Intergonan (SimposiumVet) 3 Tage vor der Eizellenpräparation wurde in Mausweibchen die Superovulation ausgelöst. 14 h vor der Präparation wurden den Weibchen 10 I.U. Ovogest (SimposiumVet) injiziert. KSOM-Medium (EmbryoMax Modified M16 Medium; Millipore) wurde im Verhältnis 1:1 mit Mineralöl (Sigma-Aldrich) vermischt und über Nacht bei 37 °C equilibriert. Am Tag der Präparation wurden die Eileiter der Weibchen entfernt und in DMEM-Medium +10 % FCS +20 mM HEPES überführt. Einzelne Tropfen frisches KSOM-Medium wurden in einer 6er Multiwellplatte platziert (je 100 µl) und mit der Medium-Öl-Mischung überschichtet. Eizellen wurden inklusive der Kumuluszellen präpariert und zu dem Mediumtropfen gegeben. Pro Ansatz wurden 1×10^5 Spermien dazugegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂

wurden die Eizellen in frisches KSOM-Medium überführt, die Auszählung der Zweizellstadien erfolgte nach 24 h.

2.13 Neuronale Primärzellkultur

2.13.1 Präparation hippocampaler Primärzellen

Schwangere Weibchen wurden an Embryonaltag 16,5-17,5 mit Isofluran (Curamed Pharma) narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Gehirne der Embryonen wurden in 4 °C kaltem HBSS (Life Technologies) isoliert und von Blutgefäßen und Hirnhäuten befreit. Durch einen Sagittalschnitt wurden die Hemisphären getrennt und durch Entfernung von Hirnstamm und Mittelhirn der Hippocampus freigelegt. Die kompletten Hippocampi wurden mit einer Präzisionspinzette entfernt und in HBSS auf Eis gesammelt. In einem Falcon wurden die Hippocampi mit 2-3 ml 0,05 % Trypsin-EDTA bedeckt und im Wasserbad bei 37 °C für 8 min unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml Plating-Medium wurde die Reaktion abgestoppt. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml vorgewärmtem HBSS vorsichtig durch Pipettieren resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde mit Medium auf 30-50 ml aufgefüllt und es wurden 8×10^4 Zellen pro well in eine 24er Multiwellplatte ausgesät. Für Immunfärbungen oder Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen auf 13 mm Glasplättchen ausgesät. Die Plättchen wurden vorher für 2 h bei 37 °C mit 50 µg/ml Poly-D-Lysin (Sigma) in PBS beschichtet und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden über Nacht oder mindestens 8 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, danach wurde das Medium durch 1 ml frisches Neurobasal-Medium +B27 +GlutamaxI +Penicillin/Streptomycin (alles Life Technologies) ersetzt.

Plating Medium

DMEM (4,5 g/l Glucose, Life Technologies)

50 u/ml Penicillin/Streptomycin

10 % Pferdeserum

1 mM Natriumpyruvat

2 mM L-Glutamin

Drei Tage nach der Präparation wurde 1 ml Neurobasal Medium mit 1 µM AraC (Sigma) zugegeben, um die Proliferation von Astrozyten in der Mischkultur zu inhibieren. Die Primärzellen wurden über 3-4 Wochen in Kultur gehalten. Einmal wöchentlich wurde ein

Medienwechsel durchgeführt, bei dem maximal die Hälfte des Mediums ersetzt wurde.

2.13.2 Transduktion durch rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV)

Die heterologe Expression von Proteinen in neuronaler Zellkultur erfolgte durch Transduktion mit rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (rAAV). AAVs gehören zur Familie der Parvoviren, besitzen keine bisher bekannte Pathogenität und sind wegen ihrer hohen Transduktionseffizienz bei nicht-proliferierenden Zelltypen eine für neuronale Zellen geeignete Methode. Das ca. 4,7 kb lange Genom eines AAV ist aus einzelsträngiger DNA (ssDNA) aufgebaut und beinhaltet die endständigen ITR-Sequenzen (*inverted terminal repeat*) sowie *rep* und *cap*, zwei *open reading frames* (ORF), die jeweils für mehrere Proteine codieren. Während die *rep* Genprodukte für die Umschreibung der ssDNA in doppelsträngige DNA und die Replikation des Virusgenoms zuständig sind, codiert *cap* für die Capsidproteine des Viruspartikels (Weitzman & Linden, 2011). AAVs sind replikationsdefizient und können nur in Anwesenheit eines Helfervirus (z.B. Adenovirus) neue Viruspartikel generieren. Die von den Helferviren benötigten Faktoren zur erfolgreichen AAV-Vermehrung sind allerdings bekannt und können *in trans* bereitgestellt werden, was eine Koinfektion der Wirtszelle mit diesen oft pathogenen Viren überflüssig macht (Matsushita et al., 1998). Das gleiche gilt für *rep* und *cap*, was die Insertion beliebiger Sequenzen zwischen die ITRs und somit die Herstellung rekombinanter AAVs ermöglicht.

2.13.3 Transfektion zur Herstellung von rAAVs

Die Zelllinie HEK293-AAV und die Helferplasmide zur Herstellung von rAAVs wurden mir von Dr. Susanne Schoch McGovern (Klinik für Epileptologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. 3×10^5 HEK293-AAV Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf 6er Multiwellplatten ausgesät, 3 h vor Beginn der Transfektion wurde das Kulturmedium durch 2 ml IMDM (Life Technologies) mit 5 % FCS ersetzt. Für einen Transfektionsansatz wurden DNA und H₂O in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, CaCl₂ dazugegeben und der Ansatz kurz gevortext. Pro Ansatz wurden dann unter ständigem langsamem Vortexen 240 µl 2 x HeBS tropfenweise hinzugefügt und im Anschluss wurde der gesamte Ansatz für 15 s auf der höchsten Stufe gevortext. Der Ansatz wurde tropfenweise auf den Zellen verteilt und die Zellen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 3 ml frisches DMEM + 10 % FCS ersetzt.

Transfektionsansatz für AAVs

0,5 µg Plasmid-DNA (pAAV Vektor)
 1 µg VP179
 0,25 µg VP180
 0,25 µg VP181
 26,5 µl CaCl₂ (2,5 M)
 ad 240 µl mit H₂O

2 x HeBS

50 mM HEPES
 280 mM NaCl
 1,5 mM Na₂HPO₄
 pH 6,9-7,05

2.13.4 Präparation und Aufreinigung von rAAVs

Drei bis vier Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit einem Gummispatel von der Platte gekratzt, zusammen mit dem Medium in ein Falcon überführt und abzentrifugiert (5 min, 200 g, RT). Das überstehende Medium wurde bis auf etwa 500 µl abgesaugt, die Zellen im restlichen Medium resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37 °C. Das Lysat wurde für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert, der Überstand mit den Viruspartikeln (*crude extract*) in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen und bei 4 °C aufbewahrt. Es wurde keine Titerbestimmung durchgeführt. Für eine Transfektion neuronaler Primärzellen wurden 1-10 µl Virusüberstand pro well benutzt. Die Aufreinigung von rAAV-Partikeln durch Affinitätschromatographie über eine Heparinsäule wurde durch das Institut für Epileptologie (AG Schoch) in Bonn durchgeführt.

2.14 Zeitaufgelöste Messungen von Ca²⁺ und cAMP**2.14.1 Beladung von Säugetierzellen mit fluoreszenten Ca²⁺-Indikatoren**

Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in Zellen wurden mit dem Ca²⁺-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 (Life Technologies) verfolgt. Dieser Ca²⁺-Indikator ist ein chimäres Molekül, bestehend aus einem Ca²⁺-chelatierenden EGTA-Derivat und dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 288, einem Fluorescein-Derivat. Die Fluoreszenz von Fluo-4 ist abhängig von der Ca²⁺-Konzentration. In seiner Ca²⁺-freien Form ist Fluo-4 praktisch nicht fluoreszent, die Fluoreszenz des Farbstoffs nimmt jedoch durch die Bindung von Ca²⁺ um mehr als das 100-fache zu. Fluo-4 bindet Ca²⁺ mit einem KD-Wert von 345 nM. Das Anregungsmaximum von Fluo-4 liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 516 nm. Um Zellen mit Fluo-4 zu beladen, wurden sie mit dem Fluo-4-Acetoxymethylester (Fluo-4

AM) inkubiert, bei dem die geladenen, Ca^{2+} -chelatierenden Carbonsäuren verestert sind. Fluo-4 AM bindet in dieser Form kein Ca^{2+} , ist ungeladen und membrangängig. Innerhalb der Zelle werden die Acetoxymethylestergruppen von Fluo-4 AM durch unspezifische Esterasen hydrolysiert und so in den fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikator Fluo-4 überführt. Da Fluo-4 mehrfach geladen und deshalb nicht membrangängig ist, verbleibt der Farbstoff in der Zelle. Manche Zelltypen besitzen aktive Transportmechanismen, die Fluo-4 wieder aus der Zelle entfernen, was gegebenenfalls durch den Inhibitor Probenecid verhindert werden kann. Zum Beladen von HEK293-Zellen wurde das Medium in jedem Well durch eine Beladungslösung ersetzt. Die Beladungslösung setzte sich aus ES-Lösung mit 2 μM Fluo-4 AM und 0,01 % Pluronic F127 zusammen. Nach 1 h Inkubation wurde die Beladungslösung durch ES-Lösung ersetzt und die Zellen wurden sofort für die Messung verwendet. Primären Neuronen wurden die Zellen für 20 min in konditioniertem Medium mit 5 μM Fluo-4 beladen und in ES-Lösung gemessen. Für manche Messungen wurde der rotverschobene fluoreszente Ca^{2+} -Indikator GFP-Certified FluoForte (ENZO Lifesciences) in einer Konzentration von 2 μM verwendet. Für Ca^{2+} -Messungen an Mausspermien wurden die präparierten Spermien in Anwesenheit von 0,02 % Pluronic mit FluoForte (20 μM) oder CAL-520 (5 μM , AAT Bioquest) für 45 min bei 37 °C beladen. Nach der Beladung wurde der überschüssige Farbstoff durch drei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte (7 min, 700 g) entfernt. Alle Ca^{2+} -Messungen an Spermien wurden in TYH-Puffer durchgeführt.

ES-Lösung

140 mM NaCl

5,4 mM KCl

1 mM MgCl_2

1,8 mM CaCl_2

5 mM HEPES

5 mM Glucose

2.14.2 Fluoreszenzmessungen am FLUOstar Platereader

Für die Fluoreszenzmessungen in Multiwellplatten wurde der FLUOstar Omega Platereader (BMG Labtech) verwendet. Die zeitaufgelösten Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte in 96er Multiwellplatten. Zur parallelen Messung mehrerer Wells in einem Experiment wurde die Multiwellplatte an einem optischen Messkopf vorbeigeführt und die Fluoreszenzintensität für jedes well bestimmt. Die Fluoreszenz wurde mit einer Blitzentladungslampe angeregt. Die

Zeitauflösung eines Experimentes hing dabei von der Anzahl parallel gemessener wells ab; in einem Experiment konnten dabei bis zu 250 Messzyklen pro well aufgenommen werden. Die Fluoreszenz wurde von der Unterseite der Multiwellplatte angeregt und detektiert (*bottom read*). Jeder Fluoreszenzwert wurde als Mittelwert aus mindestens 3 Einzelmesswerten bestimmt. Für die Auswertung der Daten wurden die Programme Mars 2.41 (BMG Labtech) und OriginPro 8G (Origin Lab) verwendet.

2.14.3 Fluoreszenzmessungen auf Einzelzellebene

Die Fluoreszenzmessungen an einzelnen Zellen wurden am cell^R-Imagingsystem (Olympus) durchgeführt. Dieses System besteht aus einem motorisierten Inversmikroskop (IX8) mit einer monochromen CCD-Kamera (XM10) und einem Beleuchtungssystem mit Filterrad (MT20, 150 W Xenonlampe). Für die Messungen wurden ein 20 x 0,75 Objektiv (UPlanSApo) und ein 40 x 0,6 Objektiv (LUCPlanFLN) verwendet. Die Fluo-4 Fluoreszenz wurde mit dem Filterblock U-MNIBA3 gemessen (Anregungsfilter BP470-495, Dichromatic DM505, Emissionsfilter BP510-550), für FluoForte wurde der Filterblock U-MNIGA3 verwendet (Anregungsfilter BP540-550, Dichromatic DM570, Emissionsfilter BP575-625). Um bei Messungen mit FluoForte bPAC anzuregen, wurde der Anregungsfilter aus dem Filterblock entfernt, im externen Filterrad platziert und im Verlauf der Messungen mit einem 585/10 Anregungsfilter abgewechselt. Für die Steuerung, Bildbearbeitung und Analyse wurde die cell^R Software verwendet. Für weitere Analyse und graphische Aufbereitung der Daten wurden die Programme ImageJ und GraphPad Prism 5 verwendet. In dieser Arbeit wurde die Änderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bei adhärent wachsenden HEK293-Zellen bestimmt. Dafür wurden die Zellen am Vortag der Messung auf einer PLL-beschichteten (0,1 mg/ml) 96er-Multiwellplatte in einer Zelldichte von 5 x 10⁴ Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden für 90 min bei 37 °C mit 50 µl Fluo4-AM beladen (2.6.2). Nach dem Beladen wurde die Beladungslösung durch 90 µl ES-Lösung ersetzt.

2.14.4 cAMP Messungen mit einem FRET-basierten Biosensor

Beim Förster-Resonanzenergietransfer oder Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) wird die Energie eines Chromophors im angeregten Zustand (Donor) auf einen anderen Chromophor (Akzeptor) übertragen. Hierbei erfolgt der Energieübertrag nicht über Emission und Absorption von Photonen, sondern findet strahlungsfrei statt. Die Effizienz des Transfers ist extrem abhängig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor, der für eine effektive

Übertragung typischerweise zwischen 0,5 und 10 nm liegt. So kann die Änderung der FRET-Effizienz Informationen über Interaktionen geben, in denen sich die Distanz zwischen zwei Molekülen verändert. Diese starke Abhängigkeit vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor macht man sich auch bei FRET-Biosensoren zunutze, bei denen die Chromophore und eine spezifische Sensordomäne auf der gleichen Polypeptidkette liegen. Bei Bindung eines Liganden an die Sensordomäne kommt es zu einer intramolekularen Konformationsänderung, infolge derer sich die Distanz zwischen Donor und Akzeptor verändert. So kann die Bindung eines Liganden über die Änderung der FRET-Effizienz nachgewiesen werden (Abbildung 4). In dieser Arbeit wurden FRET-Biosensoren verwendet, deren Sensordomäne cAMP bindet. Dabei handelte es sich einerseits um die cAMP-bindende Domäne des GEF-Proteins (*guanine triphosphate exchange factor*) Epac2. (Nikolaev et al., 2004), andererseits um die cAMP-bindende Domäne eines CNG (*cyclic nucleotide-gated*)-Kanals des Bakteriums *Mesorhizobium loti* (mlCNBD; Cukkemane et al., 2012).

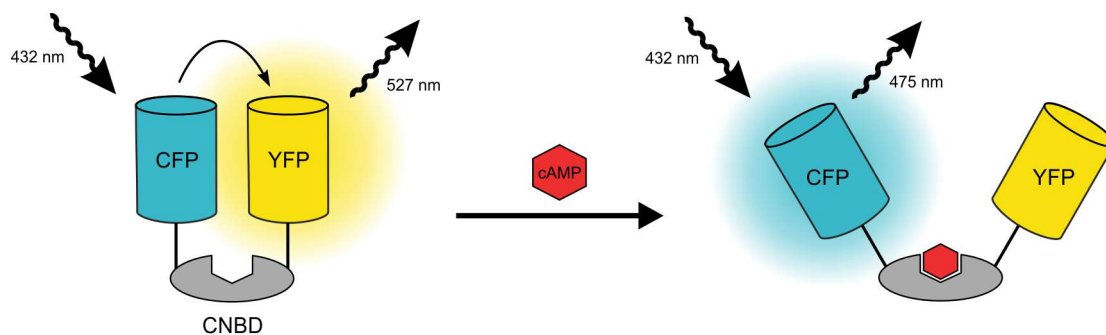


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines FRET-Biosensors für cAMP. Ohne gebundenen Liganden findet ein strahlungsfreier Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor statt; bei Anregung von CFP ist daher YFP-Fluoreszenz zu beobachten. Die Bindung von cAMP an die Sensordomäne induziert eine intramolekulare Konformationsänderung, die den Abstand zwischen den beiden Fluorophoren vergrößert und die Effektivität des Energietransfers verringert.

Eine weitere Voraussetzung für FRET ist die spektrale Überlappung der FRET-Partner. Der Energietransfer ist besonders effizient, wenn sich das Emissionsspektrum des Donors stark mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überschneidet. Ein ideales FRET-Paar bilden hierbei CFP und YFP. In Kombination mit den oben beschriebenen Sensordomänen wurden die leicht veränderten Varianten Cerulean (Anregungsmaximum: 433 nm, Emissionsmaximum: 475 nm) und mCitrine (Anregungsmaximum: 516 nm, Emissionsmaximum: 529 nm) verwendet, die sich durch verbesserte Photostabilität und eine höhere Quantenausbeute auszeichnen (Shaner et al., 2005). Weiterhin wurde in Kombination mit mlCNBD ein FRET-Biosensor verwendet, der mOrange2 (Anregungsmaximum: 549 nm,

Emissionsmaximum: 565 nm) als Donor und mCherry (Anregungsmaximum: 516 nm, Emissionsmaximum: 610 nm) als Akzeptor beinhaltet.

2.14.5 FRET Messungen an Zellen in Suspension

Die FRET-Änderung an Zellen in Suspension wurde mit einem QuantaMaster Fluoreszenzspektrometer aufgezeichnet (PTI). Zur Anregung wurden eine 75 W Xenon-Lampe und ein Monochromator (DeltaRAM XTM, PTI) verwendet. Zellen, die den FRET-Sensor stabil exprimierten wurden mit Trypsin abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und in 500 µl ES-Lösung resuspendiert. Die Messungen wurden in einer 1 cm Quarzküvette unter Rühren durchgeführt.

2.14.6 FRET Messungen auf Einzelzellebene

Die Messungen auf Einzelzellebene wurden ebenfalls am cell^R System (s. oben) durchgeführt. Hierbei wurden ein 40 x 0,6 Objektiv (LUCPlanFLN) und eine 60 x 1,42 Objektiv (PlanApoN) verwendet. Im Filterblock wurde ein dichroitischer Spiegel positioniert, der für die Anregungswellenlängen von CFP und YFP durchlässig ist (). Für die Anregung wurden Filter mit den Bandbreiten 430/25 (CFP) und 500/20 (YFP) verwendet, als Emissionsfilter wurden X470-GFP (CFP) und X535-TRITC (YFP) benutzt.

2.14.7 Bestimmung der cAMP-Menge in Mausspermien (CatchPoint Assay)

Die Bestimmung der absoluten cAMP-Menge in Spermien erfolgte über einen antikörperbasierten kompetitiven Immunoassay (CatchPoint cAMP Fluorescent Assay Bulk Kit; Molecular Devices). Bei diesem Assay konkurriert das cAMP der Probe mit HRP-gekoppeltem cAMP um die Bindung an einen Erstantikörper. Die Detektion erfolgt über ein fluoreszierendes Substrat von HRP. In Abwesenheit von cAMP bindet ausschließlich HRP-gekoppeltes cAMP an den Erstantikörper und die Fluoreszenz ist hoch. Je mehr cAMP die Proben enthalten, desto weniger HRP-gekoppeltes cAMP kann am Erstantikörper binden und die Fluoreszenz nimmt entsprechend ab. Für den Assay wurden Mausspermien verwendet, die durch Zugabe von 0,5 Volumen 1,5 M HClO₄ abgestoppt und in flüssigem Stickstoff kurz eingefroren wurden. Die Proben wurden nach dem Auftauen durch Zugabe von 0,5 Volumen 1 M K₃PO₄ neutralisiert und das ausfallende Kaliumperchlorat abzentrifugiert (15 min, 20.000 g, 4 °C). Die Proben und der Standard wurden acetyliert. Acetyliertes cAMP wird vom Erstantikörper besser erkannt und so die Sensitivität des Assays erhöht. Dazu wurden 135 µl

der Proben mit 6,75 μ l Acetylierungsreagenz behandelt (1:20). Anschließend wurden 2 x 40 μ l der Proben im Assay eingesetzt. Abweichend von den Herstellerangaben wurden der Erstantikörper und das HRP-gekoppelte cAMP in einer Verdünnung von 1:40 eingesetzt, um die Stabilität des Assays zu erhöhen. Die Fluoreszenzintensität wurde am FLUOstar gemessen (Anregung: 530 nm, Emission: 590 nm).

20x Acetylierungsreagenz

1,8 mM Essigsäureanhydrid

3 mM Triethylamin

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit habe ich die photoaktivierte Adenylatzyklase aus dem Bodenbakterium *Beggiatoa* charakterisiert und in verschiedenen Zelltypen exprimiert, um die intrazelluläre cAMP-Konzentration mit Licht zu steuern. Der erste Abschnitt des Ergebnisteils beschäftigt sich mit der Charakterisierung des bPAC-Enzyms in HEK293-Zellen. Im zweiten Teil gehe ich auf die heterologe Expression von bPAC in hippocampalen Neuronen ein. Durch die Fusion von bPAC mit Signalsequenzen für verschiedene Organellen sind cAMP-Signale mit subzellulärer Auflösung möglich. Der dritte Abschnitt des Ergebnisteils beschreibt den Versuch, bPAC über eine solche Signalsequenz in primäre Zilien zu importieren. Im letzten Abschnitt beschreibe ich die Generation und Charakterisierung einer transgenen Mauslinie, die bPAC ausschließlich in Spermien exprimiert.

3.1 Charakterisierung der bakteriellen photoaktivierten Adenylatzyklase (bPAC)

3.1.1 Herstellung der stabilen Zelllinie HEK-TM-bPAC

Um bPAC zu charakterisieren, wurde das Protein in HEK293-Zellen stabil exprimiert. Die Zelllinie enthielt zusätzlich eine Variante des zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals A2 (CNGA2-TM) aus dem olfaktorischen Epithel des Rindes; diese Variante weist eine hohe cAMP-Sensitivität auf. Die DNA für den cAMP-Biosensor und die Zelllinie HEK-TM wurden von H.G. Körschen zur Verfügung gestellt. Mithilfe dieses Kanals kann die cAMP-Synthese in lebenden Zellen verfolgt werden: Ein Anstieg der cAMP-Konzentration bewirkt die Kanalöffnung und vermittelt so einen Ca^{2+} -Einstrom, der mit fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikatoren nachgewiesen werden kann (Abbildung 5).

Zellen der HEK-TM-Linie wurden durch Elektroporation mit pcDNA-bPAC-mCherry (kloniert von Dr. Birgit Lör) transfiziert und positive Klone wurden anhand ihrer mCherry-Fluoreszenz ausgewählt. Um zu testen, ob diese Klone bPAC funktionell exprimierten, wurden Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) zeitaufgelöst gemessen. Die verschiedenen Klone wurden dazu in Multiwellplatten ausgesät, im Dunkeln mit dem Ca^{2+} -Farbstoff Fluo-4 beladen und am FLUOstar-Platereader vermessen.

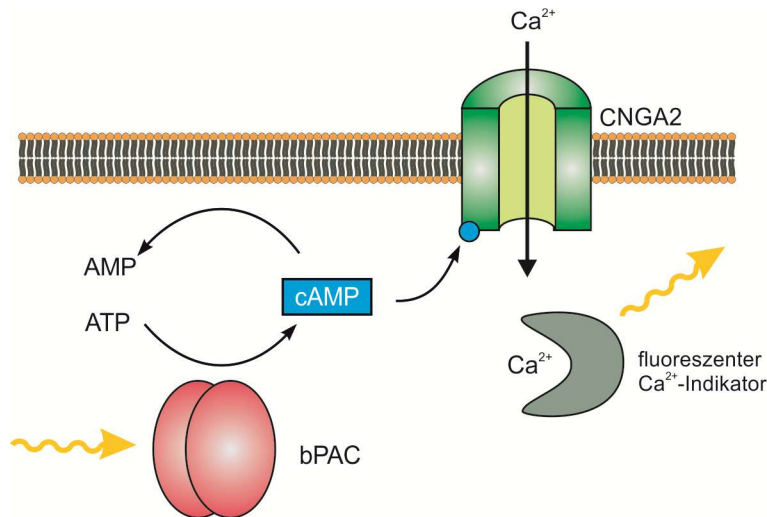


Abbildung 5: Nachweis lichtinduzierter cAMP-Synthese über den CNGA2-TM-Ionenkanal. Details im Text.

Da die Anregungsspektren von Fluo-4 und bPAC stark überlappen (Stierl et al., 2011), wäre es möglich, dass man bPAC aktiviert während man $[Ca^{2+}]_i$ fluorometrisch zu messen versucht. Dies war allerdings in keinem der untersuchten Klone der Fall (Abbildung 6). In einer Zelle besteht stets ein Gleichgewicht zwischen der cAMP-Synthese durch Adenylatzyklen und der cAMP-Hydrolyse durch Phosphodiesterasen. Da mein Messprotokoll keinen Ca^{2+} -Einstrom auslöste, war entweder die Lichtdosis nicht ausreichend, um bPAC zu aktivieren, oder die hydrolytische Aktivität der PDEs verhinderte einen messbaren cAMP-Anstieg durch die nur geringe Aktivierung von bPAC.

Am FLUOstar-Platereader wird die Lichtdosis, mit der die Proben bestrahlt werden, nicht über die Änderung der Blitzintensität sondern über die Anzahl der Blitze reguliert. Wurde die Blitzzahl von 1 auf 50 Blitze pro Messzyklus erhöht, wurde in Klon #B22 ein deutliches Ca^{2+} -Signal beobachtet (Abbildung 6). Daher wurde dieser Klon für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Da ein Belichtungsprotokoll mit nur einem Blitz pro Messzyklus nicht zu einem Ca^{2+} -Einstrom führte, konnte ich die Aktivität von bPAC trotz spektraler Überlappung mit Fluo-4 mit diesem Farbstoff weiter untersuchen.

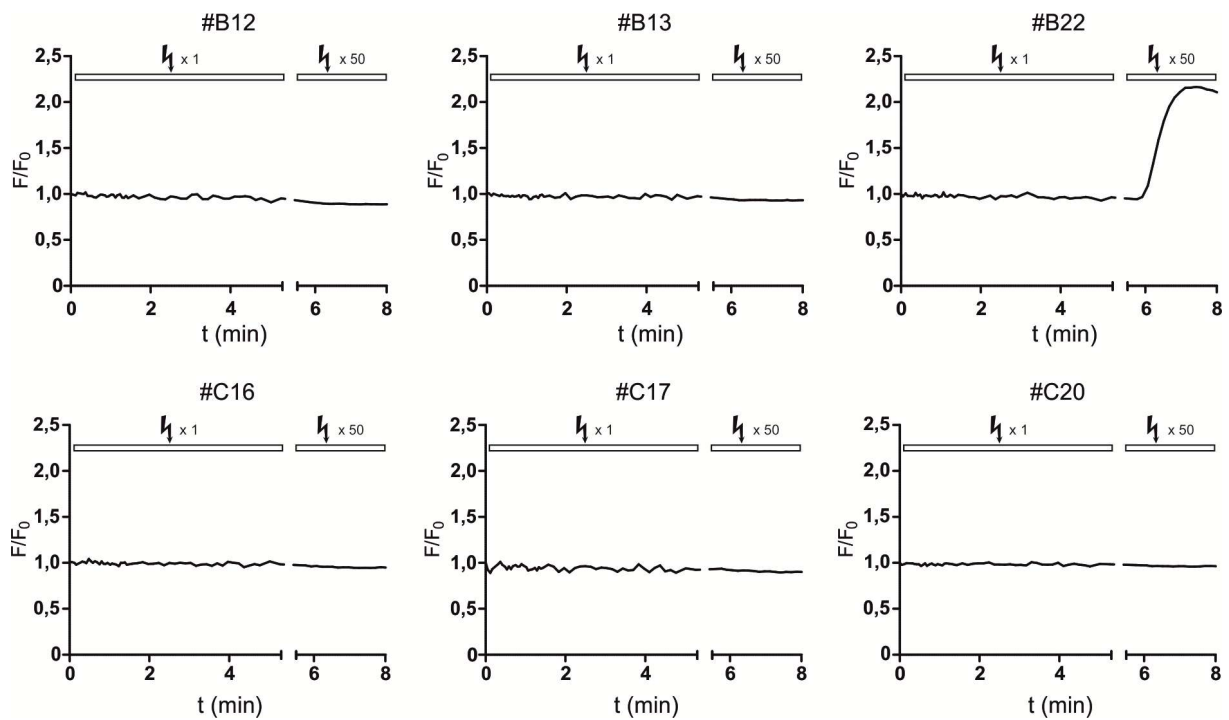


Abbildung 6: Lichtinduzierte Ca^{2+} -Signale verschiedener Klone der Zelllinie HEK-TM-bPAC. Zellen verschiedener Klone wurden in 96er Multiwellplatten ausgesät (je 2×10^4), mit Fluo-4 beladen und am FLUOstar untersucht. Die Zellen wurden zunächst alle 8 s mit einem Lichtblitz (485 nm) stimuliert, die Fluoreszenz von Fluo-4 wurde bei 520 nm ausgelesen. Im zweiten Teil der Messungen wurde die Lichtdosis auf 50 Blitze pro Messzyklus (Dauer: 9 s) erhöht. Die Messwerte wurden jeweils auf den ersten Wert normiert. Der Klon #B22 reagiert mit einem Ca^{2+} -Signal auf die erhöhte Lichtdosis.

Die Expression von bPAC-mCherry in der Zelllinie HEK-TM-bPAC #B22 wurde im Western Blot bestätigt (Abbildung 7).

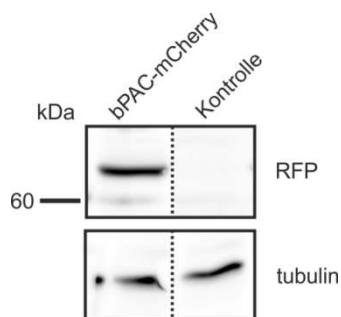


Abbildung 7: Western Blot-Analyse der stabilen Zelllinie HEK-TM-bPAC. 40 μg Gesamtprotein aus HEK-TM-bPAC-Zellen (Klon #B22) wurde in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurde Gesamtprotein aus HEK-TM-Zellen aufgetragen. Der Nachweis von bPAC-mCherry (70 kDa) erfolgte mit einem anti-RFP Antikörper, für die Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin-Antikörper verwendet.

3.1.2 Charakterisierung von bPAC in Zellpopulationen

Die Aktivität von bPAC wurde wie oben beschrieben durch Ca^{2+} -Messungen mit dem Farbstoff Fluo-4 genauer charakterisiert. Zunächst wurde die Kontrolle HEK-TM mit der Zelllinie HEK-TM-bPAC verglichen. Die Zellen wurden dazu mit dem Adenylatzyklase-Agonisten NKH477 stimuliert und über den gesamten Messzeitraum mit nur einem Lichtblitz belichtet, der in HEK-TM-bPAC-Zellen kein Ca^{2+} -Signal auslöst. In beiden Zelllinien induzierte NKH477 dosisabhängig Ca^{2+} -Signale (Abbildung 8).

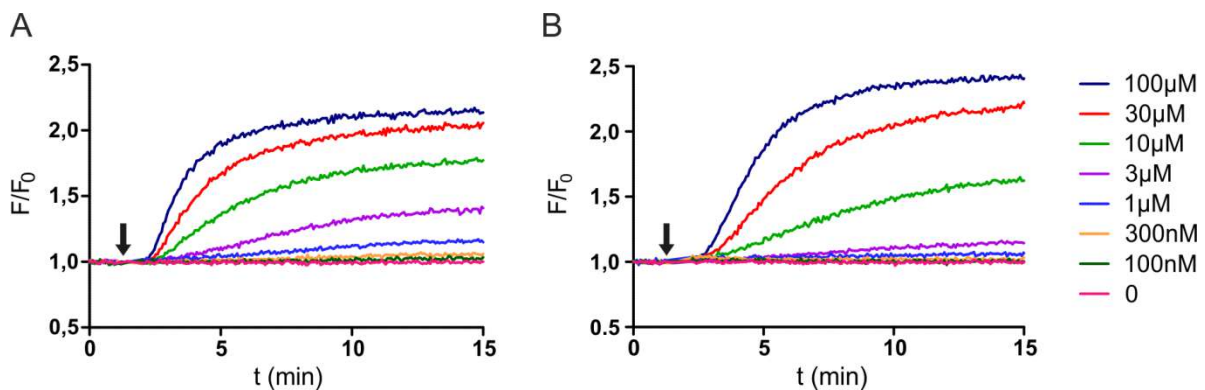


Abbildung 8: Ca^{2+} -Signale in HEK-TM und HEK-TM-bPAC-Zellen bei Stimulation mit NKH477. Die Zelllinien HEK-TM (A) bzw. HEK-TM-bPAC (B) wurden in 96er Multiwellplatten ausgesät und mit Fluo-4 beladen. Die Änderung der Fluoreszenzintensität wurde nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen NKH477 aufgezeichnet. In jedem Messzyklus (Dauer: 4 s) wurden die Zellen mit jeweils einem Lichtblitz belichtet, NKH477 wurde nach Messzyklus 20 hinzugegeben (s. Pfeil). Die relativen Änderungen der Fluoreszenz beziehen sich jeweils auf den Mittelwert der ersten fünf Messwerte. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus jeweils drei Wiederholungen.

Als nächstes habe ich untersucht, ob die Aktivität von bPAC reversibel ist. Dazu habe ich HEK-TM-bPAC-Zellen mit 200 Lichtblitzen pro Messzyklus stimuliert. Diese hohe Lichtdosis löste ein schnelles Ca^{2+} -Signal aus, was die beschleunigte Synthese von cAMP durch bPAC widerspiegelt (Abbildung 9A). Nachdem die Lichtdosis wieder auf einen Lichtblitz pro Zyklus reduziert worden war, sank das intrazelluläre Ca^{2+} wieder ab. bPAC kehrt wieder in den Ruhezustand zurück, die CNG-Kanäle schließen und Ca^{2+} wird aus dem Zytoplasma transportiert. Der Zeitverlauf kann allerdings nicht dazu genutzt werden, um auf die Dauer des Photozyklus von bPAC zu schließen, denn die hier aufgenommenen Signale werden durch eine Reihe anderer Mechanismen beeinflusst, wie z.B. die Kanaldichte auf der Zelloberfläche oder die Effektivität des Ca^{2+} -Transports aus der Zelle. Weiterhin konnte ich mit Hilfe dieses Assays zeigen, dass bPAC repetitiv aktiviert werden kann: Bei mehrmaliger Stimulation der bPAC durch Messzyklen mit je 200 Lichtblitzen wurden jeweils ähnliche

Ca^{2+} -Signale ausgelöst (Abbildung 9B). Weiterhin habe ich untersucht, wie die Lichtdosis die bPAC-Aktivität beeinflusst. Dazu wurden HEK-TM-bPAC-Zellen mit unterschiedlicher Blitzzahl bei gleichbleibender Zykluslänge stimuliert. Die lichtinduzierte Änderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ korrelierte mit der Blitzzahl (Abbildung 10A). Auch die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nahm mit der Erhöhung Lichtdosis zu. Die bPAC-Aktivität und damit die cAMP-Synthese lassen sich also durch die Lichtdosis kontrollieren.

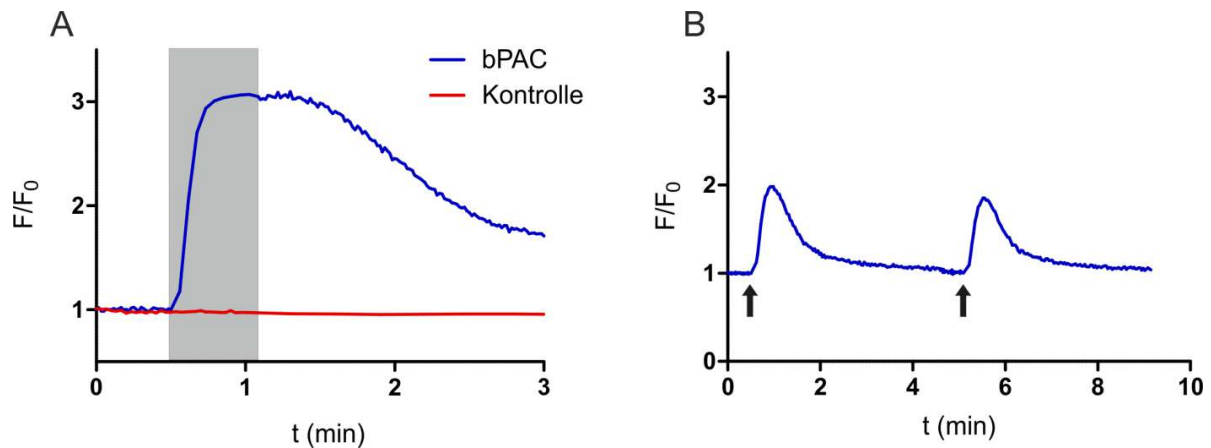


Abbildung 9: Lichtinduzierte Ca^{2+} -Signale in der Zelllinie HEK-TM-bPAC. Zellen wurden in 96er Multiwellplatten ausgesät und mit Fluo-4 beladen. Die Fluoreszenzintensität wurde bei verschiedenen Blitzzahlen aufgezeichnet. **(A)** Für 30 Messzyklen (Dauer insgesamt: 30 s) wurden die Zellen mit nur einem Lichtblitz belichtet, danach für 20 Messzyklen mit 200 Blitzen (grau unterlegt). Nach der Stimulation wurde bis zum Ende der Messung wieder nur mit einem Blitz belichtet. Als Kontrolle wurden Zellen der Linie HEK-TM verwendet. **(B)** Die Zellen wurden mit einem Blitz pro Messzyklus belichtet. Zur Stimulation der bPAC Aktivität wurde für jeweils einen Messzyklus mit 200 Blitzen belichtet (s. Pfeile). Die relativen Änderungen der Fluoreszenz beziehen sich jeweils auf den Mittelwert der ersten fünf Messwerte. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Wiederholungen.

Optogenetische Werkzeuge weisen oft eine Basalaktivität auf. Um die Lichtantwort genau kontrollieren zu können, ist keine oder zumindest eine niedrige Basalaktivität notwendig. Daher habe ich die Basalaktivität der bPAC untersucht. Dazu wurden HEK-TM-bPAC-Zellen mit dem PDE-Inhibitor IBMX behandelt.

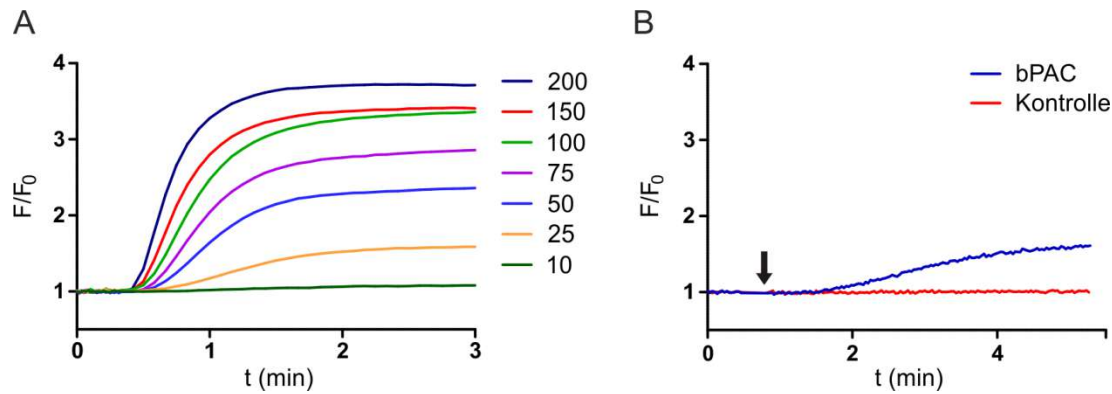


Abbildung 10: Dosisabhängigkeit und Basalaktivität der bPAC. Zellen wurden in 96er Multiwellplatten ausgesät und mit Fluo-4 beladen. Die Fluoreszenzintensität wurde bei verschiedenen Blitzzahlen aufgezeichnet. **(A)** Für 30 Messzyklen (Dauer insgesamt: 30 s) wurden die Zellen mit nur einem Lichtblitz belichtet, danach für den Rest der Messung mit einer unterschiedlichen Blitzzahl. Dabei wurde eine einheitliche Zykluslänge von 3,5 s gewählt. **(B)** Die Zellen wurden mit einem Blitz pro Messzyklus belichtet. Zur Inhibition der PDE-Aktivität wurde 200 μ M IBMX dazugegeben (s. Pfeil). Die relativen Änderungen der Fluoreszenz beziehen sich jeweils auf den Mittelwert der ersten fünf Messwerte. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Wiederholungen.

In Kontrollzellen veränderte die Stimulation mit 200 μ M IBMX $[Ca^{2+}]_i$ nicht (Abbildung 10B); daraus schließe ich, dass in diesen Zellen die basale cAMP-Synthese gering ist. Im Gegensatz dazu steigt $[Ca^{2+}]_i$ in HEK-TM-bPAC Zellen nach IBMX-Zugabe langsam an. Hier akkumuliert cAMP durch die Inhibition der PDEs, was auf eine basale bPAC-Aktivität hinweist. Möglich wäre auch, dass die Stimulation der Zellen mit 1 Blitz pro Messzyklus zur Anregung des Fluo-4-Farbstoffs doch zu einer geringen Aktivierung von bPAC führt. Durch PDE-Inhibition reicht diese geringe cAMP-Synthese nun aus, um die CNG-Kanäle zu öffnen und einen Ca^{2+} -Einstrom auszulösen.

3.1.3 Charakterisierung der bPAC in Einzelzellen

Um bPAC auch in einzelnen Zellen zu untersuchen, wurden mit Fluo-4 beladene Zellen am cell[^]R-Imagingsystem (Olympus) untersucht. Während am FLUOstar $[Ca^{2+}]_i$ mit Fluo-4 gemessen werden konnte, ohne bPAC gleichzeitig zu aktivieren, war dies bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am cell[^]R nicht möglich: Selbst bei niedrigsten Lichtintensitäten wurde innerhalb weniger Sekunden ein Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst (Abbildung 11). Daher wurde ein Ca^{2+} -Farbstoff benötigt, dessen Absorptionsspektrums nicht mit dem der bPAC überlappt.

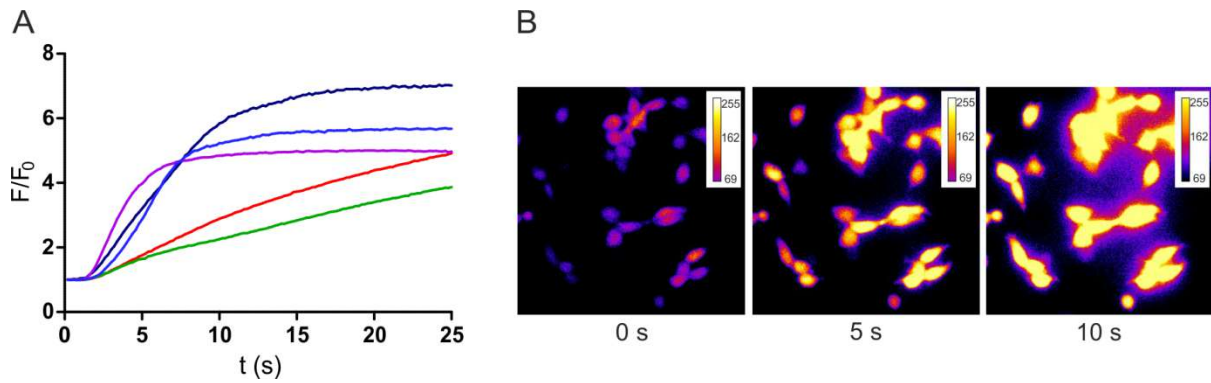


Abbildung 11: Messungen von $[Ca^{2+}]_i$ am cellⁱR-Imagingsystem. Zellen wurden in 4er-Multiwellplatten ausgesät und mit Fluo-4 beladen. Die Fluoreszenzintensität wurde am cellⁱR-System aufgezeichnet. Bei 1 % Intensität der Lampe wurden die Zellen alle 200 ms für 80 ms belichtet. **(A)** Ca^{2+} -Signale individueller Zellen. Mithilfe der Software ImageJ wurden einzelne Zellen markiert und die Fluoreszenzintensität der markierten Bereiche über die Zeit analysiert. Dargestellt sind relative Änderungen, bezogen auf den jeweils ersten Messwert. **(B)** Bildliche Darstellung des Sichtfelds aus A im Verlauf der Messung. Die Fluoreszenzintensität wird in Falschfarben dargestellt.

Alle weiteren Ca^{2+} -Messungen am cellⁱR-System wurden daher mit dem rotverschobenen Farbstoff FluoForte (GFP-Certified FluoForte; ENZO Lifesciences) durchgeführt. So konnte ich den lichtinduzierten Ca^{2+} -Einstrom in einzelnen HEK-TM-bPAC-Zellen verfolgen. Auch hier war die Änderung von $[Ca^{2+}]_i$ abhängig von der Lichtdosis (Abbildung 12).

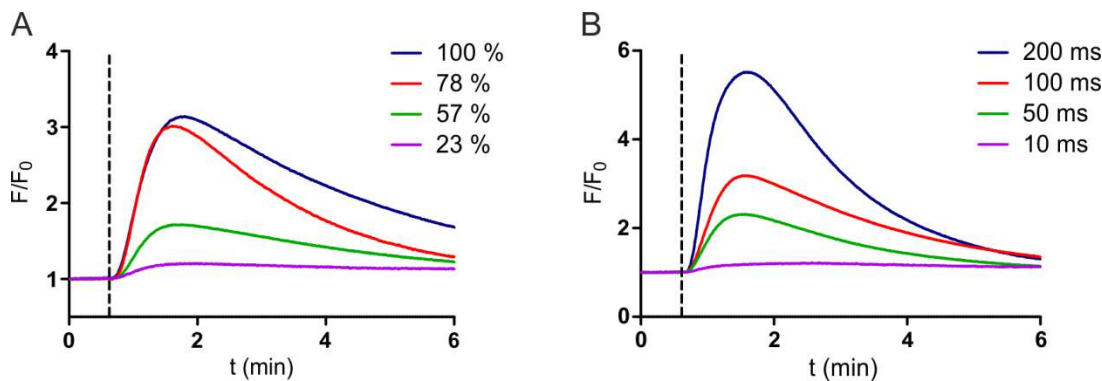


Abbildung 12: Messungen zur Dosisabhängigkeit von bPAC auf Einzelzellebene. HEK-TM-bPAC Zellen wurden mit FluoForte beladen. Die Fluoreszenzintensität wurde am cellⁱR aufgezeichnet. **(A)** Die Zellen wurden 50 s nach Beginn der Messung mit einem einzelnen Lichtblitz variabler Intensität belichtet (Belichtungsdauer 10 ms). Die Prozentangaben in der Legende beziehen sich auf die maximale Intensität der Xenonlampe. **(B)** Die Zellen wurden 50 s nach Beginn der Messung mit einem einzelnen Lichtblitz unterschiedlicher Länge belichtet (Lampenintensität 12 %).

3.2 Expression von bPAC in neuronaler Primärzellkultur

3.2.1 Kultivierung und Transduktion primärer hippocampaler Neuronen

Zunächst habe ich die Kultivierung und die Transduktion neuronaler Primärzellen etabliert. Da in dieser Arbeit der Einfluss von cAMP auf die synaptische Übertragung im Hippocampus untersucht werden sollte, wurden hippocampale Neurone aus Mausembryonen isoliert und in Kultur genommen. Die kultivierten Zellen wurden mit Hilfe von rAAVs transduziert. Dabei habe ich zunächst den Einfluss unterschiedlicher Promotoren auf die Expression untersucht. Mit dem ubiquitären CMV-Promotor wurde das bPAC-mCherry Fusionsprotein vornehmlich in nicht-neuronalen Zelltypen wie beispielsweise Astrozyten exprimiert (Abbildung 13).

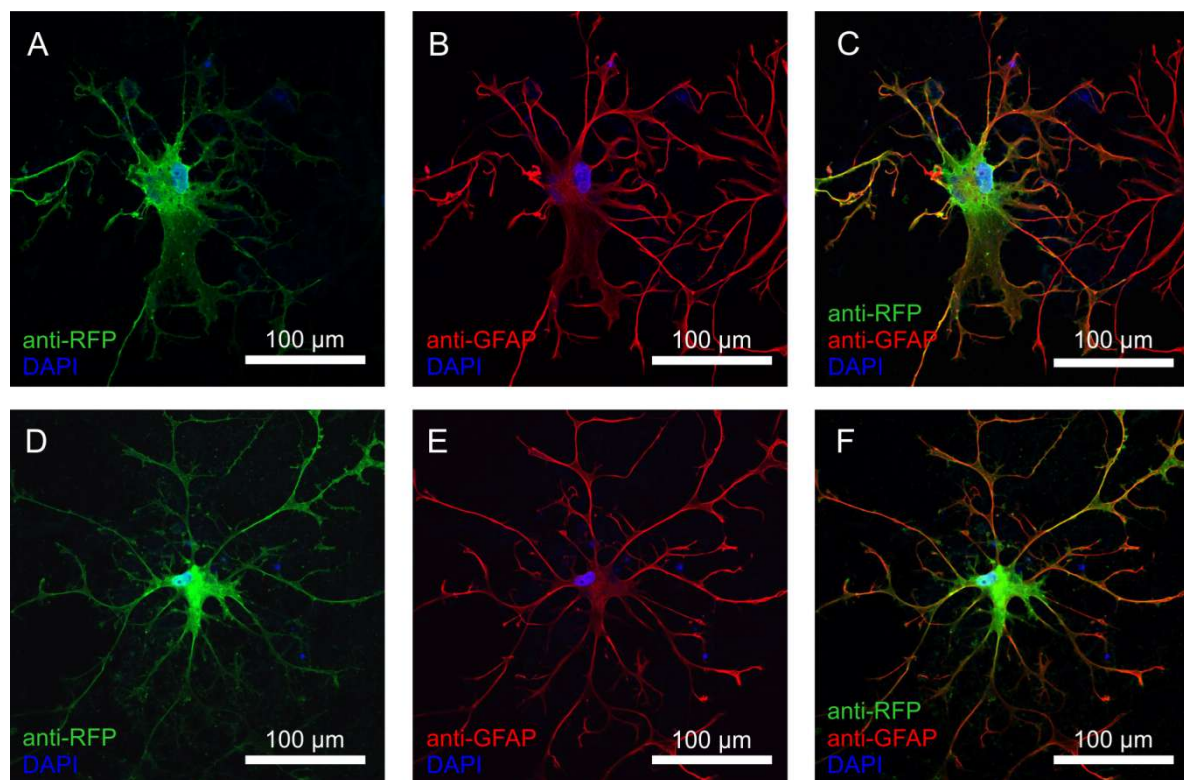


Abbildung 13: Expression von bPAC-mCherry in neuronalen Primärzellen über den CMV-Promotor. Hippocampale Primärzellen wurden mit CMV-bPAC-mCherry-Virusüberständen infiziert und 5 Tage nach Infektion fixiert. Das bPAC-mCherry-Fusionsprotein wurde mit einem anti-RFP-Antikörper angefärbt (A, D), ein anti-GFAP-Antikörper wurde zur Identifikation von Astrozyten verwendet (B, E). DAPI wurde zur Markierung des Zellkerns verwendet. Überlagerungen der Fluoreszenzaufnahmen sind in C und F gezeigt.

Aus diesem Grund habe ich als nächstes den Synapsin1-Promotor (Syn) verwendet. Mit diesem Promotor wurde keine Expression in Astrozyten beobachtet (Abbildung 14). Die

Morphologie der bPAC-mCherry-positiven Zellen deutet auf unipolare (Abbildung 14A-C) und multipolare (Abbildung 14D-F) Neurone hin.

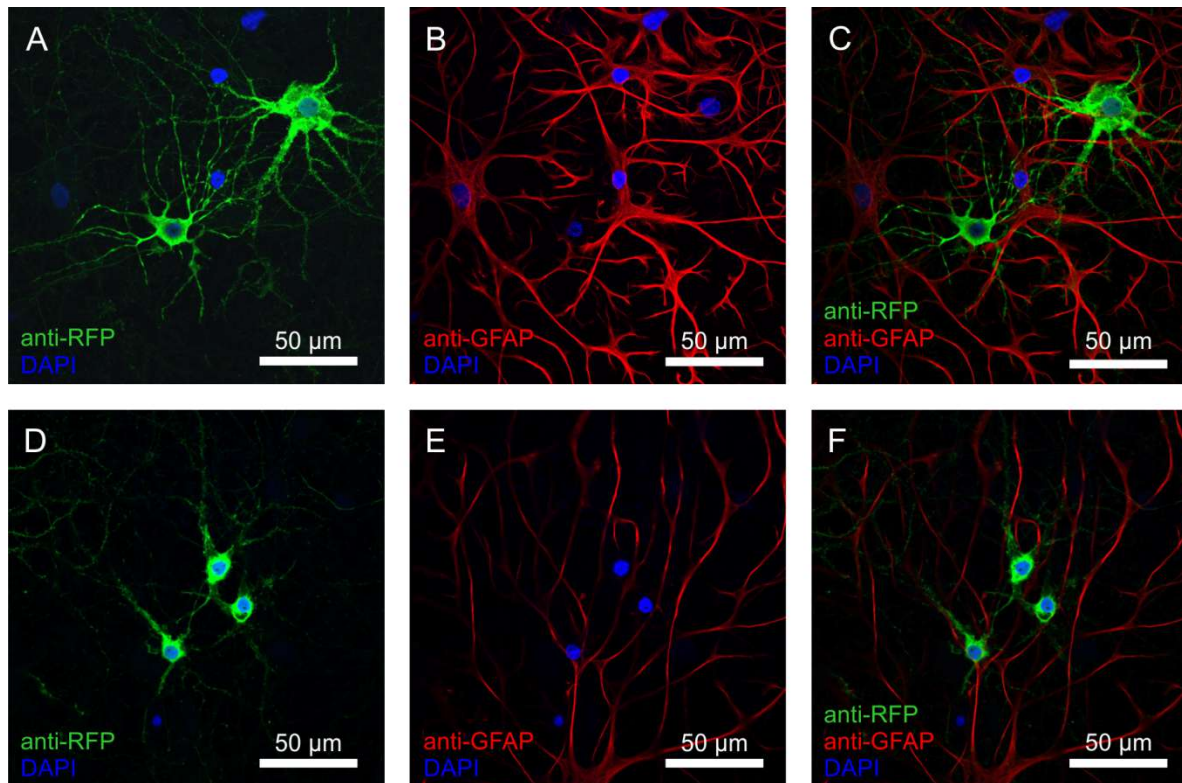


Abbildung 14: Expression von bPAC-mCherry in neuronalen Primärzellen über den Syn-Promotor. Hippocampale Primärzellen wurden mit Syn-bPAC-mCherry-Virusüberständen infiziert und 5 Tage nach Infektion fixiert. Das bPAC-mCherry Fusionsprotein wurde mit einem anti-RFP Antikörper angefärbt (A, D), ein anti-GFAP Antikörper wurde zur Identifikation von Astrozyten verwendet (B, E). DAPI wurde zur Markierung des Zellkerns verwendet. Überlagerungen der Fluoreszenzaufnahmen sind in C und F gezeigt.

Eine Identifizierung dieser Zelltypen wurde mit Antikörperfärbungen gegen die neuronalen Marker NeuN und NFH durchgeführt. Der anti-NeuN Antikörper (*Neuronal nuclei*) erkennt ein neuronenspezifisches, DNA-bindendes Protein im zentralen und peripheren Nervensystem aller Vertebraten. NFH ist die schwerste Untereinheit der Neurofilamente (*Neurofilament heavy*), die als Intermediärfilamente im neuronalen Zytoskelett vorkommen. Wurden rAAV-transduzierte Primärkulturen mit diesen Antikörpern angefärbt, kolokalisierte die Färbung mit der bPAC-mCherry-Expression (Abbildung 15). Ich schließe daraus, dass sich der Syn-Promotor für die heterologe Expression in Neuronen einer Mischkultur gut eignet.

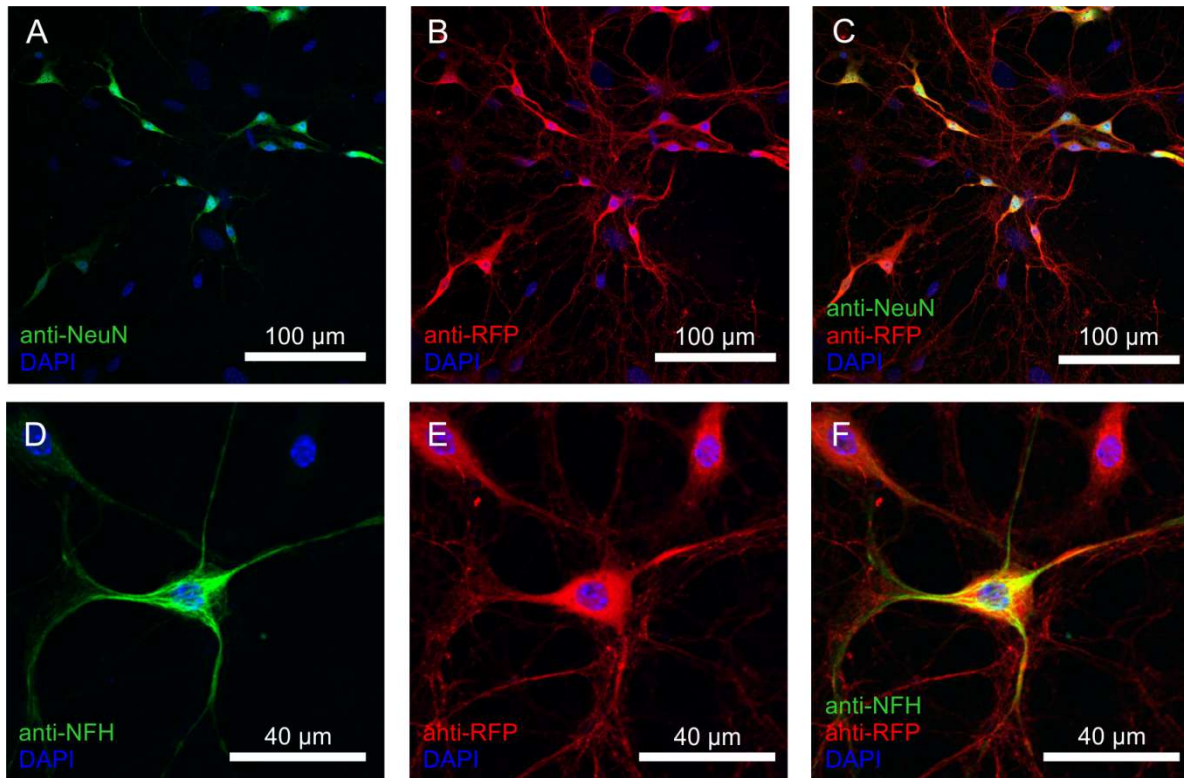


Abbildung 15: Kolokalisation von bPAC mit neuronalen Markern. Hippocampale Primärzellen wurden mit Syn-bPAC-mCherry-Virusüberständen infiziert und 5 Tage nach Infektion fixiert. Markerantikörper gegen NeuN und NFH wurden zur Identifikation von Neuronen verwendet (A, D). Das bPAC-mCherry-Fusionsprotein wurde mit einem anti-RFP Antikörper angefärbt (B, E). DAPI wurde zur Markierung des Zellkerns verwendet. Überlagerungen der Fluoreszenzaufnahmen sind in C und F gezeigt.

3.2.2 Charakterisierung von bPAC über den Ca^{2+} Einstrom durch CNGA2-TM

bPAC sollte in hippocampalen Neuronen mit dem gleichen Ansatz charakterisiert werden wie zuvor in HEK293 Zellen: Durch Koexpression von bPAC-mCherry und CNGA2-TM sollte die lichtgesteuerte cAMP-Synthese über den Ca^{2+} -Einstrom untersucht werden. Dazu wurden die Primärzellen mit beiden Konstrukten transduziert und die Proteinexpression über Immunfärbung nachgewiesen (Abbildung 16). Das Konstrukt Syn-CNGA2-TM war dazu mit einem Hämagglutinin(HA)-Tag versehen.

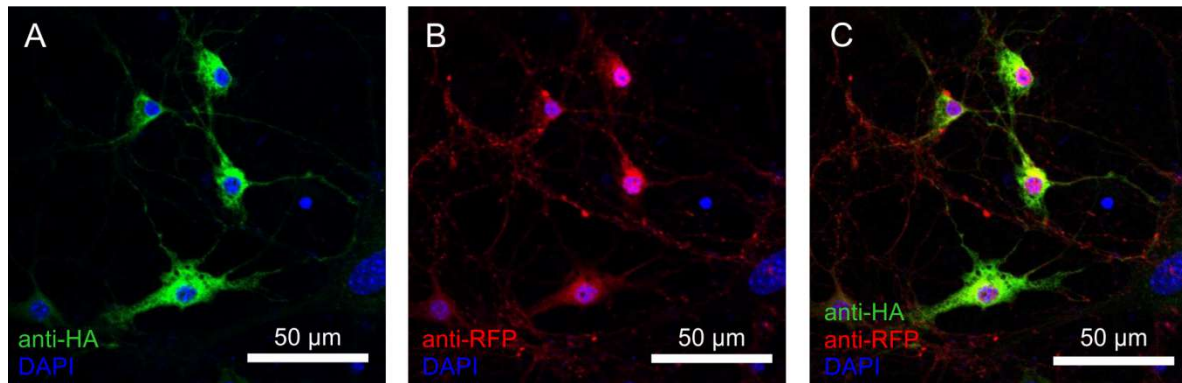


Abbildung 16: Koexpression von CNGA2-TM und bPAC in neuronalen Primärzellen. Hippocampale Primärzellen wurden mit Syn-bPAC-mCherry- und Syn-CNGA2-TM-Virusüberständen infiziert und 5 Tage nach Infektion fixiert. (A) Die Expression von CNGA2-TM wurde über einen anti-HA-Antikörper nachgewiesen. (B) Das bPAC-mCherry-Fusionsprotein wurde mit einem anti-RFP Antikörper angefärbt. DAPI wurde zur Markierung des Zellkerns verwendet. Eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen ist in C gezeigt.

Da der Farbstoff FluoForte in Neuronen noch nicht etabliert war, habe ich zunächst Kontrollmessungen mit Fluo-4 durchgeführt. Dazu wurden Neuronen nur mit CNGA2-TM transduziert, mit Fluo-4 beladen und am cell[^]R-System untersucht. Als Positivkontrolle wurden diese Neuronen mit NKH477 stimuliert, hierbei konnte ich aber keinen Anstieg des Ca²⁺-Signals beobachten (Abbildung 17A). Als Kontrolle der Messbedingungen und Reagenzien habe ich daher in einem parallelen Experiment HEK-TM-Zellen mit NKH477 stimuliert. Dabei kam es zu einem deutlichen Ca²⁺-Einstrom (Abbildung 17B).

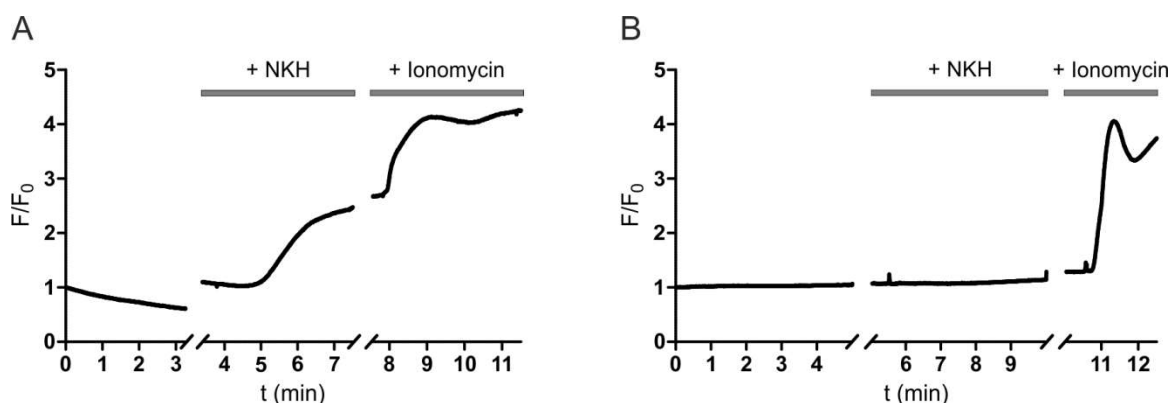


Abbildung 17: Kontrollmessungen zur Funktion von CNGA2-TM in HEK-Zellen und hippocampalen Neuronen. Zellen der stabilen Linie HEK-TM (A) bzw. neuronale Primärzellen transduziert mit CNGA2-TM (B) wurden mit Fluo-4 beladen und am cell[^]R-System untersucht. Die Zellen wurden nach Messung des Basalwerts zunächst mit 40 µM NKH477 und anschließend mit 3 µM Ionomycin stimuliert. Die relativen Änderungen der Fluoreszenz beziehen sich jeweils auf den ersten Wert der Messung. Dargestellt sind Mittelwerte aus jeweils zehn Zellen.

In einer weiteren Kontrolle habe ich überprüft, ob Fluo-4 in Neuronen funktionell war. Dazu wurden die Zellen mit Ionomycin behandelt, einem Ionophor, der die Permeabilität der Zellmembran für Ca^{2+} drastisch erhöht. Durch Zugabe von Ionomycin stieg $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowohl in HEK-Zellen als auch in neuronalen Zellen stark an (Abbildung 17).

Mit diesen Kontrollen habe ich ausgeschlossen, dass der Ca^{2+} -Indikator, die Zusammensetzung der Extrazellulärlösung oder NKH477 der Grund für das Fehlen des cAMP-induzierten Ca^{2+} -Einstroms in Neuronen ist. Mögliche Ursachen wären ein unvollständiger Transport oder eine fehlerhafte Insertion des Ionenkanals in die Zellmembran. Da es mir nicht gelungen ist, einen cAMP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in Neuronen nachzuweisen, habe ich versucht, die cAMP-Synthese in Neuronen mit einer anderen Methode nachzuweisen.

3.2.3 Design und Klonierung eines rotverschobenen FRET-Sensors für cAMP

Eine weitere Möglichkeit, Veränderungen der cAMP-Konzentration nachzuweisen, ist die Verwendung von FRET-Biosensoren. Da sich das Anregungsspektrum der üblicherweise genutzten Fluorophore CFP und YFP mit dem Anregungsspektrum von bPAC überschneidet, musste eine andere Donor-Akzeptor-Kombination verwendet werden. Die Auswahl geeigneter Fluorophore hängt hierbei von einer Vielzahl an Faktoren ab, wie beispielsweise der Quantenausbeute, der Photostabilität und der Umgebungssensitivität.

Die nativen rotverschobenen Fluoreszenzproteine aus Anthozoen wie *Discosoma* sp. (z.B. DsRed) sind für FRET-Anwendungen problematisch, da sie Tetramere bilden und eine geringere Quantenausbeute aufweisen als Fluoreszenzproteine aus *Aequora victoria*. Durch gerichtete Evolution und anschließende Screeningverfahren konnten jedoch die intrinsischen Eigenschaften rotverschobener Fluorophore in den letzten Jahren verbessert werden (Shaner et al., 2004).

Als Donor in einem rotverschobenen FRET-Sensor können orange Fluoreszenzproteine dienen. In diesem Wellenbereich gibt es zwei Optionen: mKO, eine monomere Version des Korallenproteins Kusabira Orange (Karasawa et al., 2004), und mOrange, eine monomere DsRed-Variante. mKO ist im Vergleich zu mOrange weniger pH-sensitiv (Shaner et al., 2005), allerdings führt die Anregung von mKO mit Blaulicht zur Photokonversion des Chromophors (Goedhart et al., 2007), was die parallele Anwendung von bPAC unmöglich macht.

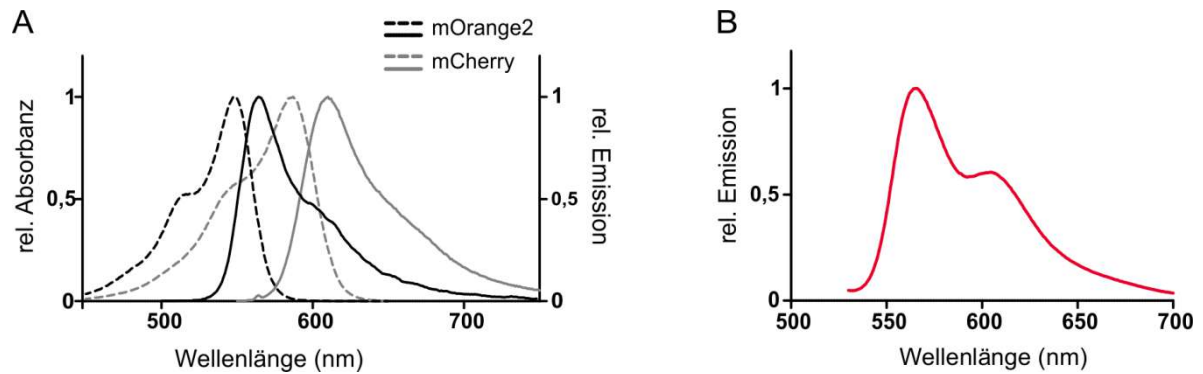


Abbildung 18: Fluoreszenzspektren von mOrange2, mCherry und mCNBD-FRETred. (A) Gestrichelte Linien stellen die normalisierten Absorptionsspektren dar, durchgezogene Linien die jeweiligen Emissionsspektren (modifiziert nach R. Tsien). (B) Emissionsspektrum von mCNBD-FRETred gemessen in stabil transfizierten HEK-Zellen in Suspension. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 515 nm.

Aus diesem Grund habe ich mich für mOrange als FRET-Donor entschieden. Von diesem Fluorophor wurde bereits eine photostabilere Mutante beschrieben (mOrange2; Shaner et al., 2008). Als Akzeptor wurde mCherry verwendet, das bereits erfolgreich mit mOrange als FRET-Paar kombiniert wurde (Goedhart et al., 2007; Ouyang et al., 2010). Die Fluoreszenzspektren von mOrange2 und mCherry sind in Abbildung 18A dargestellt.

Abbildung 19 zeigt eine schematische Darstellung der Klonierung des rotverschobenen FRET-Konstrukts (mCNBD-FRETred). Die cAMP-Sensordomäne (mCNBD) und die beiden Fluorophore wurden mit PCR amplifiziert und passende Restriktionsschnittstellen durch die Primer eingebaut (PCR-Reaktionen #1/#2/#4, Abbildung 19). Über eine rekombinante PCR auf den Produkten der Reaktionen #1 und #2 wurden mOrange2 und mCNBD zu einem Modul kombiniert (PCR-Reaktion #3), über den 5'-Primer wurde zusätzlich eine Kozak-Sequenz eingebaut (Kozak, 1984). Am C-terminalen Ende des Konstrukts wurde zum leichteren Nachweis und zur Aufreinigung die kodierende Sequenz für einen Polyhistidin-Tag angefügt. Nach Restriktion der PCR-Produkte wurden das mOrange2-mCNBD-Modul und das mCherry-Modul mit dem Zielvektor pcDNA3.1 ligiert.

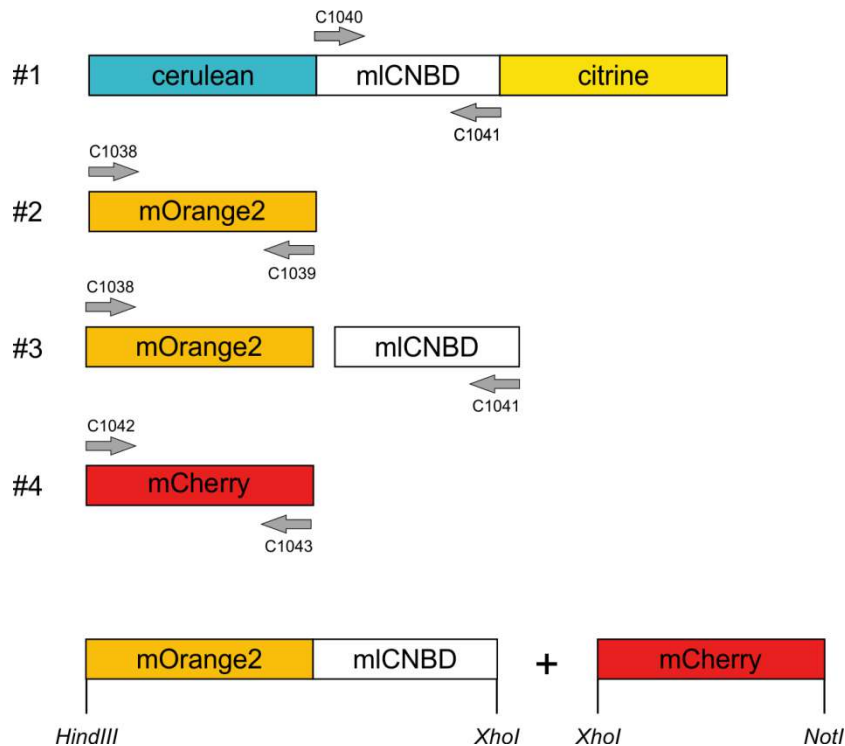


Abbildung 19: Klonierung des mlCNBD-FRETred-Biosensors. Schnittstellen sowie eine Kozak-Sequenz wurden über die Primer (graue Pfeile) eingefügt. Für eine detaillierte Beschreibung der Klonierung siehe Text.

3.2.4 Charakterisierung des rotverschobenen FRET-Sensors

Die Eigenschaften des FRET-Sensors wurden in einer stabilen HEK293-Zelllinie untersucht (HEK-mlCNBD-FRETred). Das Emissionsspektrum des FRET-Sensors in Zellen weist zwei Maxima bei 565 nm und 605 nm auf, was etwa den einzelnen Emissionsmaxima von mOrange2 (565 nm) und mCherry (610 nm) entspricht (Abbildung 18B). Um zu testen, ob der FRET-Sensor Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration nachweisen kann, wurden HEK-mlCNBD-FRETred-Zellen in Suspension mit NKH477 stimuliert und am Fluoreszenzspektrometer analysiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 515 nm. Unter diesen Bedingungen konnte keine Änderung der Fluoreszenzintensität an den lokalen Maxima des Emissionsspektrums beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Da die Emission der beiden Fluorophore stark überlappt (Abbildung 18A), werden eventuell Intensitätsänderungen des Donors durch die Änderung des Akzeptors überlagert. Bindet cAMP an mlCNBD, verringert sich die FRET-Effizienz des Sensors. Dadurch steigt die Fluoreszenzintensität des Donors während die des Akzeptors sinkt. Überlappen die Emissionsspektren stark, ist die Summe der Änderungen sehr klein. Zur besseren Trennung der einzelnen Intensitäten wurde daher die Fluoreszenz nicht an den lokalen Maxima, sondern

in den Flanken des Spektrums bei 540 und 690 nm aufgezeichnet. Unter diesen Bedingungen konnte bei 540 nm eine Änderung der Fluoreszenzintensität nach NKH477-Stimulation beobachtet werden, bei 690 nm blieb die Fluoreszenzintensität unverändert (Abbildung 20A).

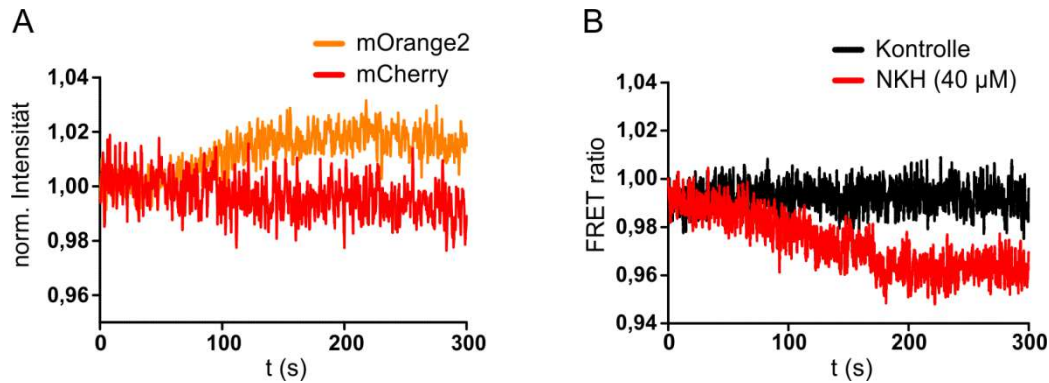


Abbildung 20: Analyse der intrazellulären cAMP-Konzentration mit mlCNBD-FRETred. HEK-mlCNBD-FRETred Zellen wurden am Fluoreszenzspektrometer untersucht. (A) Die Fluoreszenzintensität wurde bei 540 nm (mOrange2) bzw. 690 nm (mCherry) aufgezeichnet, die Anregung erfolgte bei 515 nm. Nach 30 s wurde NKH477 dazugegeben (40 µM). Die Intensität wurde jeweils auf den Mittelwert der ersten 5 s normiert. Die dargestellte Kurve wurde mit der Software GraphPad Prism um den Faktor 4 geglättet, d. h. es wurden die Mittelwerte von jeweils vier benachbarten Werten gebildet und aufgetragen. (B) Änderung der FRET ratio (relatives Verhältnis der mCherry-Intensität zur mOrange2 Intensität) nach Zugabe von 40 µM NKH477 bzw. ES-Lösung (Kontrolle). Die dargestellte Kurve wurde um den Faktor 30 geglättet.

Da sich die Intensität des Akzeptor mCherry nicht verändert, ist dementsprechend die Änderung des Akzeptor/Donor-Intensitätsverhältnisses (FRET ratio) sehr gering: Durch Stimulation der Zellen mit einer sättigenden Konzentration von NKH477 ändert sich die FRET ratio um lediglich ca. 2-3 % (Abbildung 20B).

NKH477 aktiviert alle G-Protein-regulierten Adenylatzyklen. Physiologisch relevante cAMP-Signale, die durch GPCR-Aktivierung ausgelöst werden, sind deutlich kleiner, und können daher wahrscheinlich nicht durch mlCNBD-FRETred detektiert werden. Bei der Analyse von einzelnen HEK-mlCNBD-FRETred-Zellen am cell[^]R konnte mit NKH477 keine Änderung der Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Daher konnte mlCNBD-FRETred nicht für den funktionellen Nachweis von bPAC in Neuronen verwendet werden.

3.3 targeting von bPAC in primäre Zilien

3.3.1 Vergleich von *targeting*-Proteinen in MDCK-Zellen

Die Ausbildung und Resorption eines primären Ziliums ist eng an den Verlauf des Zellzyklus gekoppelt: Nur nicht-proliferierende Zellen in der G_0/G_1 Phase bilden ein Zilium aus, das bei Eintritt in die Mitose wieder resorbiert wird (Tucker et al., 1979; Plotnikova et al., 2008). In Zelllinien - wie beispielsweise MDCK-Zellen - kann durch Serumentzug oder Kontaktinhibition eine G_0 -Phase ausgelöst und so die Bildung eines primären Ziliums induziert werden. Das Zilium kann mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper angefärbt werden (Abbildung 21).

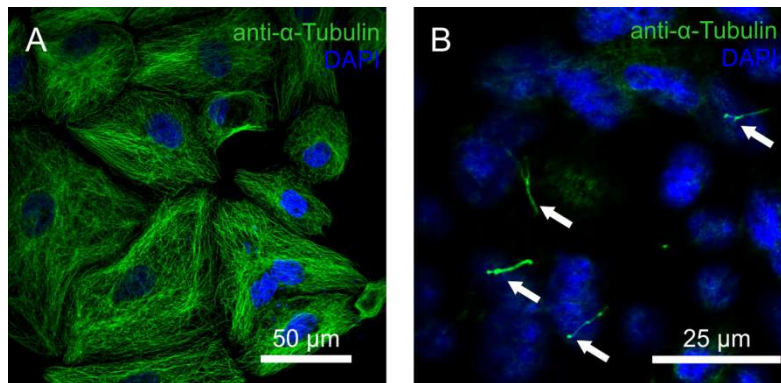


Abbildung 21: Induktion primärer Zilien in MDCK-Zellen. 5.000 (A) bzw. 10.000 (B) MDCK-Zellen wurden auf PLL-beschichteten Glasplättchen ausgesät und für fünf Tage kultiviert. Während bei geringerer Zelldichte α -Tubulin durch die gesamte Zelle verteilt ist, konzentriert sich bei ausreichender Kontaktinhibition die Färbung auf die primären Zilien (s. Pfeile).

Die Verwendung optogenetischer Werkzeuge zur Manipulation zellulärer Funktionen hat den Vorteil, dass die ganze Bandbreite gentechnischer Methoden für die gezielte Expression zur Verfügung steht. Dazu zählt nicht nur die Auswahl eines zelltypspezifischen Promotors, sondern auch die Verwendung von Signalsequenzen, beispielsweise des Kernlokalisierungssignals (*nuclear localization signal*; NLS) oder des Kernexportsignals (*nuclear export signal*; NES), die den nukleären Import bzw. Export von Proteinen regulieren (Kalderon et al., 1984; Fischer et al., 1995).

Auch der Import von Proteinen in das primäre Zilium ist ein regulierter Prozess. Zwischen dem Zytoplasma und dem ziliären Lumen besteht eine Diffusionsbarriere (Lin et al., 2013); der Transport wird durch eine ziliäre Pore reguliert, die Ähnlichkeiten zum Kernporenkomplex aufweist (Dishinger et al., 2010; Kee et al., 2012). Trotz dieser

Ähnlichkeiten wurden bisher keine allgemeingültigen ziliären Signalsequenzen identifiziert, die heterolog exprimierte Proteine in jedem Zelltyp ins primäre Zilium importieren. Daher habe ich getestet, ob eine Fusion mit einem ziliären Protein oder einer putativen Signalsequenz GFP in Zilien von MDCK-Zellen importieren kann.

Eines dieser Proteine ist Arl13b (*ADP-ribosylation factor-like protein 13b*), eine GTPase aus der Arf-Subfamilie (*ADP-ribosylation factor*). Es befindet sich in primären Zilien, wo es an Proteintransport und Stabilisierung des Ziliums beteiligt ist (Duldulao et al., 2009; Cevik et al., 2010; Larkins et al., 2011). Weiterhin habe ich Fusionskonstrukte mit dem GPCR Somatostatinrezeptor 3 (SSTR3; Händel et al., 1999; Berbari et al., 2008) und mit der Signalsequenz JAF99 aus Fibrocystin getestet (Follit et al., 2010).

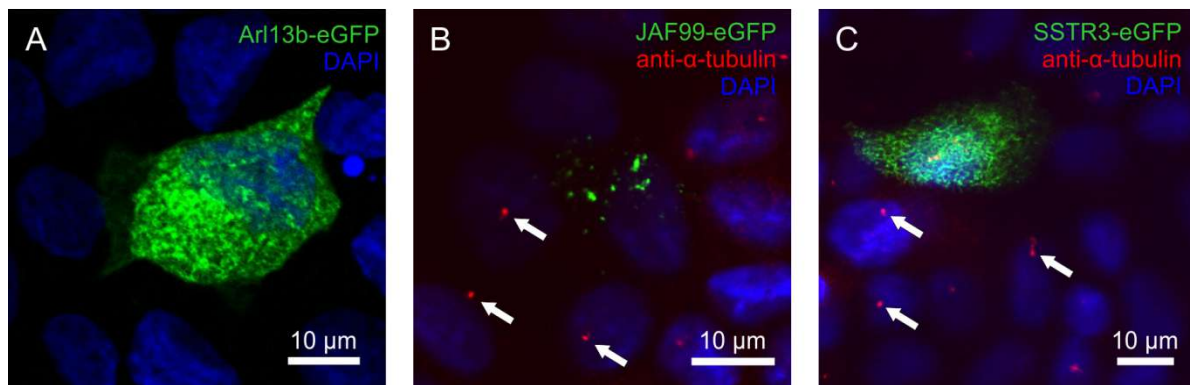


Abbildung 22: Vergleich verschiedener Fusionskonstrukte in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden transfiziert und zur Induktion von Zilien für fünf Tage kultiviert. Die native GFP-Fluoreszenz der Fusionskonstrukte mit Arl13b (A), JAF99 (B) und SSTR3 (C) ist grün dargestellt. Zilien wurden mit einem anti- α -Tubulin Antikörper angefärbt (rot, s. Pfeile), DAPI wurde zur Markierung des Zellkerns verwendet.

Keines der drei Fusionsproteine lokalisierte in Zilien von MDCK-Zellen (Abbildung 22). In meinen Experimenten bildete nur ein geringer Anteil von MDCK-Zellen Zilien aus und die Transfektionseffizienz war sehr niedrig. Dies erschwerte den Nachweis einer möglichen Kolokalisation von eGFP und dem Zilienmarker α -Tubulin erheblich. Aus diesem Grund wurde eine weitere renale Zelllinie (IMCD-3; Rauchman et al., 1993) verwendet.

3.3.2 SSTR3 als *targeting*-Protein in IMCD-3-Zellen

Es wurden stabile IMCD-3-Zelllinien generiert und die subzelluläre Lokalisation der eGFP-Fusionskonstrukte in kontaktinhibierten Zellen untersucht. Dabei wurde die Anreicherung von SSTR-eGFP in Zilien beobachtet (Abbildung 23A). Dieses Ergebnis ermutigte mich dazu, ein

SSTR3-bPAC-mCherry-Fusionskonstrukt zu klonieren, um bPAC ebenfalls spezifisch in Zilien zu transportieren. SSTR3-bPAC-mCherry kolokalisierte mit der Antikörperfärbung des Zilienmarkers α -Tubulin (Abbildung 23B-C). In IMCD-3-Zellen ist es also möglich, die bPAC mit Hilfe von SSTR3 in Zilien anzureichern.

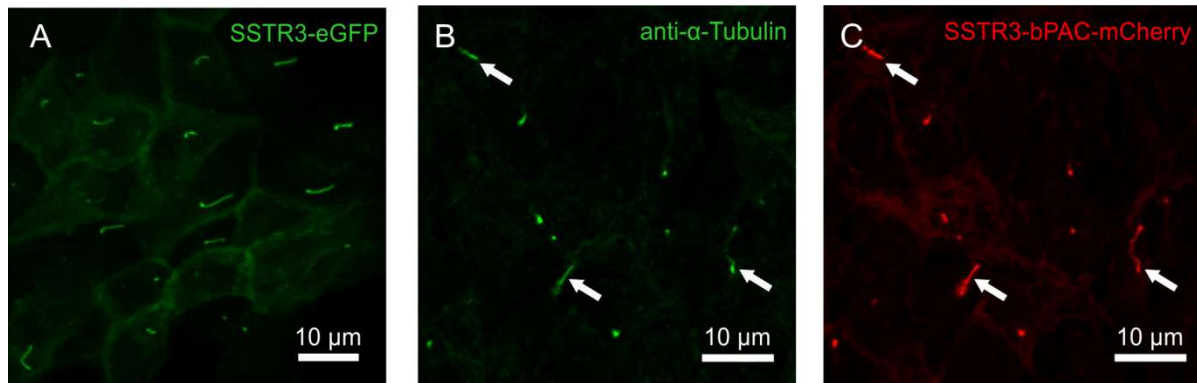


Abbildung 23: Lokalisation von SSTR3-Fusionskonstrukten in IMCD-3 Zellen. IMCD-3-Zellen wurden transfiziert und zur Induktion von Zilien konfluent weiterkultiviert. (A) Das SSTR3-eGFP Fusionsprotein befindet sich in primären Zilien von IMCD-3-Zellen. Die native GFP-Fluoreszenz des Fusionskonstrukts ist grün dargestellt. (B) IMCD-3 Zellen, die SSTR3-bPAC-mCherry stabil exprimierten, wurden fixiert; Zilien wurden mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper angefärbt (s. Pfeile). Die mCherry-Fluoreszenz des Fusionsproteins (C) kolokalisiert mit dem Zilienmarker.

3.3.3 targeting von bPAC in neuronale Zilien

Neuronale Primärzellen entwickeln in Kultur primäre Zilien, in denen sich die Adenylatzyklase Typ 3 (ACIII) spezifisch anreichert (Bishop et al., 2007). Daher kann ACIII in Primärkultur als Zilienmarker verwendet werden (Abbildung 24). Um gezielt Proteine in neuronalen Zilien anzureichern, wurden rAAVs von den oben beschriebenen SSTR3-Fusionskonstrukten hergestellt. Nach Transduktion primärer Neuronen wurde die Kolokalisation von ACIII sowohl mit SSTR3-eGFP (Abbildung 25A-B) als auch SSTR3-bPAC-mCherry (Abbildung 25C-D) beobachtet.

Mit Hilfe von SSTR3 können heterolog exprimierte Proteine also auch in neuronale Zilien transportiert werden. Aufgrund von Zeitmangel konnten keine Versuche zum funktionellen Nachweis der bPAC-Aktivität in Zilien durchgeführt werden.

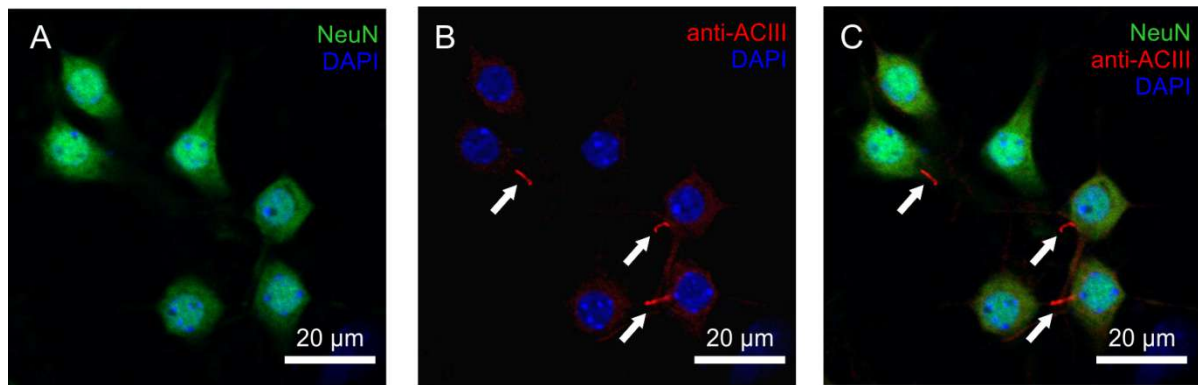


Abbildung 24: ACIII als ziliärer Marker in neuronalen Primärzellen. Hippocampale Primärzellen wurden nach 10 DIV fixiert und mit Markerantikörpern gegen NeuN (A) und ACIII (B) angefärbt. DAPI wurde zur Markierung des Zellkerns verwendet, eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen ist in C gezeigt.

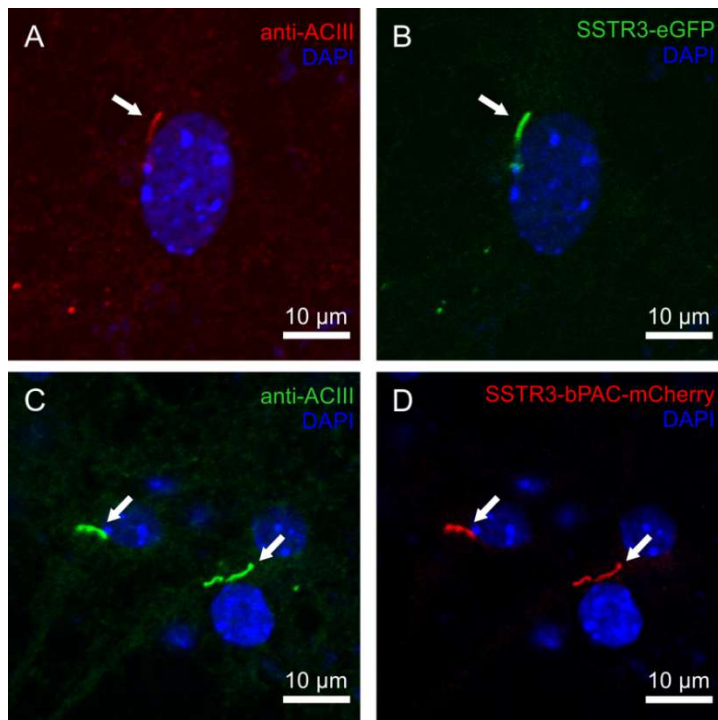


Abbildung 25: Lokalisation von SSTR3-Fusionskonstrukten in neuronalen Primärzellen. Hippocampale Primärzellen wurden mittels rAAVs transduziert, fixiert und mit einem anti-ACIII-Antikörper angefärbt (A,C). Die native Fluoreszenz der Fusionskonstrukte SSTR3-eGFP bzw. SSTR3-bPAC-mCherry ist in B bzw. D zu sehen. DAPI wurde zur Markierung des Zellkerns verwendet.

3.4 Optogenetische Manipulation von cAMP in Mausspermien

3.4.1 Generation der transgenen Mauslinie Prot1-bPAC

Um bPAC spezifisch in Mausspermien zu exprimieren, wurde ein Vektor konstruiert, in dem der Protamin-1-Promotor (Prot1) die Proteinexpression steuert (Abbildung 26A). Über diesen Promotor wird in der späten Phase der Spermatogenese Protamin-1 (PRM1) exprimiert, das zusammen mit PRM2 in der Spermatogenese die Funktion der Histonkomplexe übernimmt und eine besonders starke Kondensierung der DNA ermöglicht (Sung & Dixon, 1970; Zambrowicz et al., 1993). Die Generation der transgenen Mauslinie Prot1-bPAC erfolgte durch pronukleäre Injektion. Da hierbei das Transgen über nichthomologe Rekombination ins Genom integriert, sind die Anzahl und die Position der Genkopien unbekannt. Bei der Genotypisierung des Nachwuchses (Founder-Tiere) durch PCR wurden daher Primer gewählt, die direkt auf dem Transgen binden. Bei bPAC-positiven Tieren wurde bei der Genotypisierung ein 213 bp Fragment amplifiziert (Abbildung 26B).

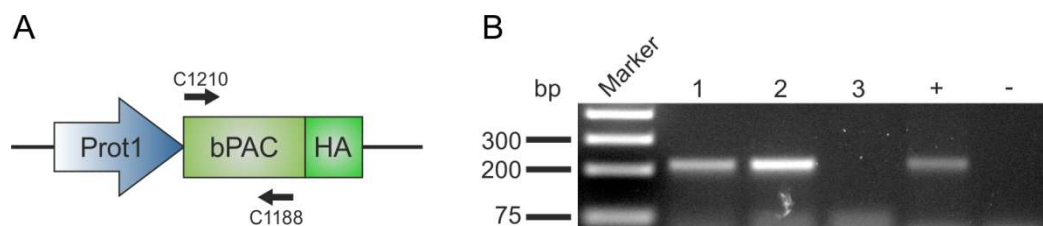


Abbildung 26: Generation und Genotypisierung der transgenen Mauslinie Prot1-bPAC. (A) Schematische Darstellung des Prot1-bPAC Vektorkonstrukts. Expression der HA-markierten bPAC wird durch den Protamin-1-Promotor (Prot1) getrieben. Pfeile zeigen die Position der für die Genotypisierung verwendeten Primer. (B) PCR zur Genotypisierung. In transgenen Tieren wird ein 213 bp Fragment amplifiziert, der in A gezeigte Vektor diente als Positivkontrolle (+).

3.4.2 Selektion von Founder-Linien und Nachweis der bPAC-Expression

Die Anzahl und Position der Kopien von bPAC-HA im Genom der individuellen Founder-Tiere ist unbekannt und in jedem Founder-Tier unterschiedlich. Diese Variation kann Unterschiede in der Proteinexpression bewirken, wenn das Transgen in einen besonders transkriptionsaktiven Locus integriert oder mehrere Genkopien vorhanden sind (Abbildung 27).

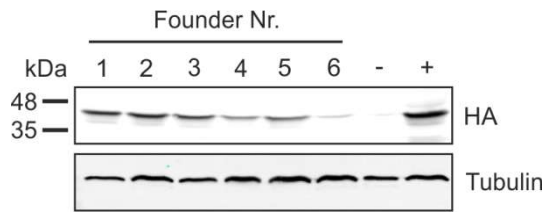


Abbildung 27: Expression von bPAC-HA in verschiedenen Founder-Linien. Hodenlysate von Nachkommen der verschiedenen Founder-Tiere wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. bPAC-HA (42 kDa) wurde mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen, für die Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin-Antikörper verwendet.

Für die weiteren Analysen wurden die beiden individuellen Founder-Linien 1 und 5 verwendet. Beide Linien wiesen robuste Expression des Transgens auf und zeigten in Bezug auf die Fertilität der Mäuse keine Unterschiede zum Wildtyp (Tabelle 10).

Tabelle 10: Vergleich von Fertilitätsparametern.

	Wildtyp	Prot1-bPAC
Gewichtsverhältnis Hoden/Körper (mg/g)	3,3 ± 0,3 (n = 10)	3,0 ± 0,4 (n = 5)
Gewichtsverhältnis Epididymis/Körper (mg/g)	0,7 ± 0,1 (n = 10)	0,8 ± 0,1 (n = 5)
Spermienzahl (pro ml)	2,7 ± 1,5 × 10 ⁷ (n = 15)	2,3 ± 0,8 × 10 ⁷ (n = 14)
Nachkommenzahl pro Wurf	5,1 ± 0,7 (n = 13)	6,7 ± 2,2 (n = 22)

Mittels Western Blot wurde die gewebespezifische Expression von bPAC-HA in transgenen Mäusen untersucht. bPAC-HA wurde in Lysaten von Hoden und Nebenhoden detektiert, in weiblichen Tieren wurde dagegen keine Expression beobachtet (Abbildung 28A). Die bPAC-HA-Expression war spezifisch für Hoden und Spermien transgener Männchen (Abbildung 28B).

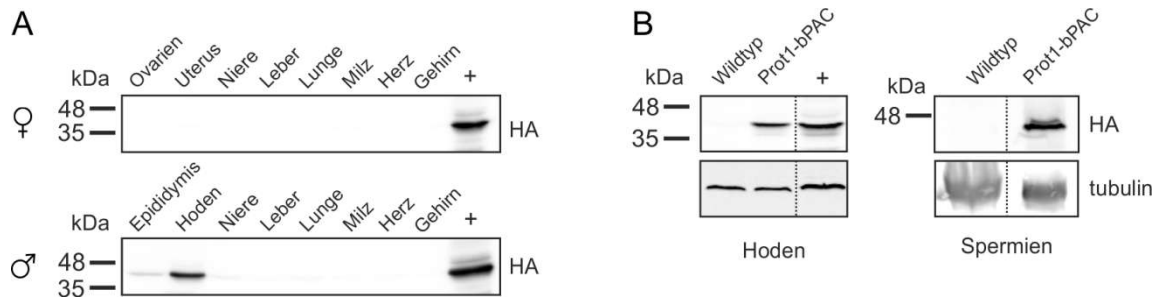


Abbildung 28: Spermispezifische Expression von bPAC-HA. (A) Lysate verschiedener Organe von weiblichen (oben) und männlichen Tieren (unten) der Prot1-bPAC Mauslinie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und bPAC-HA (42 kDa) mit einem anti-HA-Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle (+) diente in HEK-Zellen heterolog exprimiertes Protein. (B) Hodenlysate (links) bzw. Spermien (rechts) wurden analog zu A behandelt. Für die Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin Antikörper verwendet.

Zusätzlich wurde die Expression des Transgens in Gefrierschnitten von Hoden transgener Männchen immunhistochemisch untersucht. Im Verlauf der Spermatogenese durchwandern die Spermatogonien die Hodenkanälchen in Richtung des Lumens und durchlaufen dabei die verschiedenen Entwicklungsstadien bis hin zu reifen Spermien (Alberts, 2002). Erst im letzten Entwicklungsschritt, wenn in den bereits haploiden Spermatiden die Kondensation der DNA eingeleitet wird, wird der Protamin-1-Promotor aktiv. Die spezifische Färbung für bPAC-HA in Hodenschnitten war nur in der unmittelbaren Umgebung des Lumens und im Lumen selbst zu beobachten (Abbildung 29). Daraus lässt sich schließen, dass bPAC-HA sich ausschließlich in fertig entwickelten Spermien befindet.

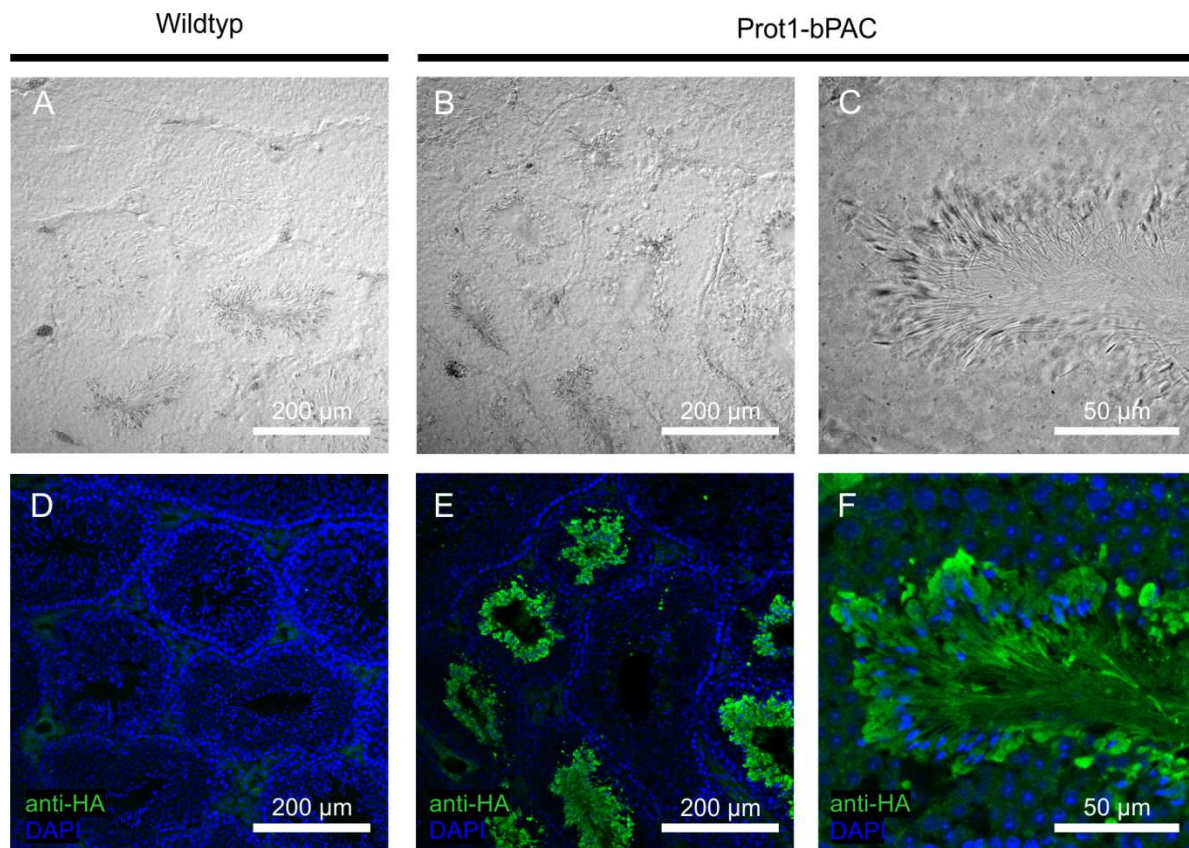


Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von bPAC-HA in Hodenschnitten. In Gefrierschnitten von fixierten Maushoden wurde bPAC-HA durch einen anti-HA-Antikörper nachgewiesen, DAPI wurde zur Markierung der Zellkerne verwendet. Durchlichtaufnahmen sind in A-C gezeigt, die dazugehörigen Fluoreszenzbilder in D-F.

3.4.3 Lichtinduzierte cAMP-Synthese in Prot1-bPAC Spermien

Um festzustellen, ob bPAC in Mausspermien funktionell ist, wurde mit Hilfe eines Immunoassays (Catchpoint Assay) der cAMP-Gehalt gemessen. Wurden Prot1-bPAC Spermien mit einer Halogenlampe für 10 min belichtet, erhöhte sich der cAMP-Gehalt um etwa das 2,5-fache; bei Wildtyp-Spermien wurde der cAMP-Gehalt durch Belichtung nicht verändert. Die Stimulation der löslichen Adenylatzyklase (SACY) durch HCO_3^- erhöhte den cAMP-Gehalt in beiden Genotypen vergleichbar (Abbildung 30A). Abbildung 30B zeigt den Zeitverlauf des cAMP-Gehalts in Prot1-bPAC-Spermien während 5-minütiger konstanter Belichtung. Nach 2-3 Minuten erreichte der cAMP-Gehalt ein Plateau (Abbildung 30B), da sich vermutlich ein Gleichgewicht zwischen der cAMP-Synthese durch bPAC und der cAMP-Hydrolyse durch PDEs einstellt. Wurden die Proben nach der Belichtung im Dunkeln weiter inkubiert, reduzierte sich der cAMP-Gehalt wieder deutlich (Abbildung 30B).

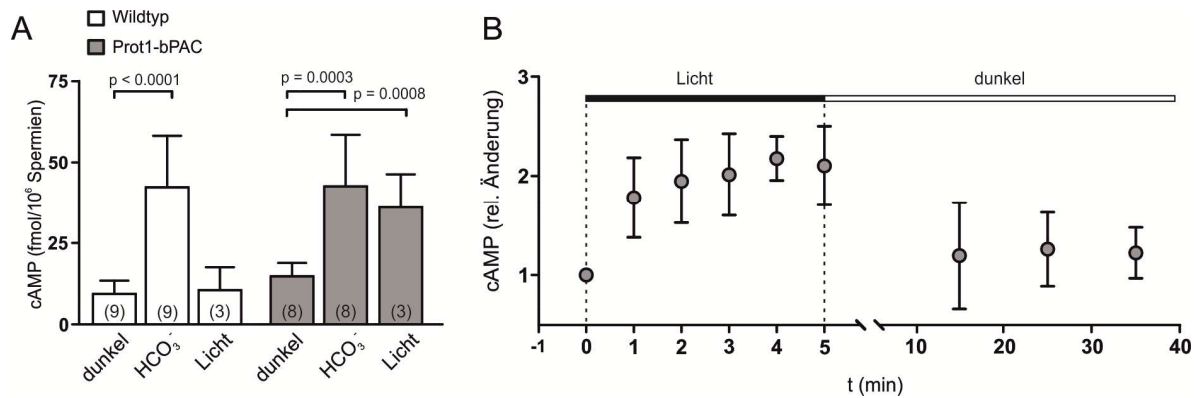


Abbildung 30: Bestimmung der lichtaktivierten cAMP-Synthese. (A) Mausspermien wurden nach der Präparation für 10 min mit einer Halogenlampe belichtet bzw. im Dunkeln inkubiert; der totale cAMP-Gehalt wurde bestimmt. Dargestellt ist die Änderung des cAMP-Gehalts relativ zu Kontrollmessungen unmittelbar nach der Spermienpräparation (Mittelwert \pm Standardabweichung, (n) = Anzahl Experimente). (B) Prot1-bPAC-Spermien wurden über 5 min konstant belichtet und anschließend im Dunkeln weiter inkubiert. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt und der totale cAMP-Gehalt bestimmt. Dargestellt ist die Änderung des cAMP-Gehalts relativ zu Kontrollmessungen vor Beginn der Belichtung (Mittelwert \pm Standardabweichung, mindestens 3 Experimente pro Zeitpunkt).

bPAC ist also in Prot1-bPAC-Spermien enzymatisch aktiv und ermöglicht die lichtgesteuerte Synthese von cAMP.

3.4.4 Manipulation der flagellaren Schlagfrequenz durch Licht

Die Motilität von Säugetierspermien wird durch cAMP-abhängige Signalwege gesteuert. Die Stimulation von SACY mit HCO₃⁻ erhöht die cAMP-Konzentration und beschleunigt so den Flagellenschlag von Mausspermien (Wennemuth et al., 2003). Diese cAMP-abhängige Regulation wird durch PKA vermittelt, die Zielproteine im Axonem phosphoryliert (Nolan et al., 2004). Der Flagellenschlag ist ein geeigneter Parameter, um die lichtinduzierte cAMP-Synthese in Prot1-bPAC Spermien nachzuweisen. Der Flagellenschlag einzelner Spermien wurde im Dunkelfeld unter Rotlicht aufgezeichnet und bPAC durch einen Lichtblitz einer UV-LED stimuliert. Ein UV-Lichtblitz war ausreichend, um in Prot1-bPAC Spermien den Flagellenschlag drastisch zu beschleunigen (Abbildung 31A, B; Videos 1, 2 im Anhang). Diese Beschleunigung war reversibel: Ohne Stimulation kehrte die Schlagfrequenz innerhalb von 15-20 s wieder zur Basalfrequenz zurück (Abbildung 31A) Wie bereits in HEK-Zellen gezeigt, ist die cAMP-Synthese durch bPAC abhängig von der Lichtdosis. Auch die Änderung der Schlagfrequenz zeigte diese Dosisabhängigkeit: Je länger die Belichtungszeit mit UV-Licht, desto größer die Änderung der Schlagfrequenz (Abbildung 31B,C). Die Motilität von Prot1-bPAC-Spermien kann also mit Licht dosisabhängig manipuliert werden.

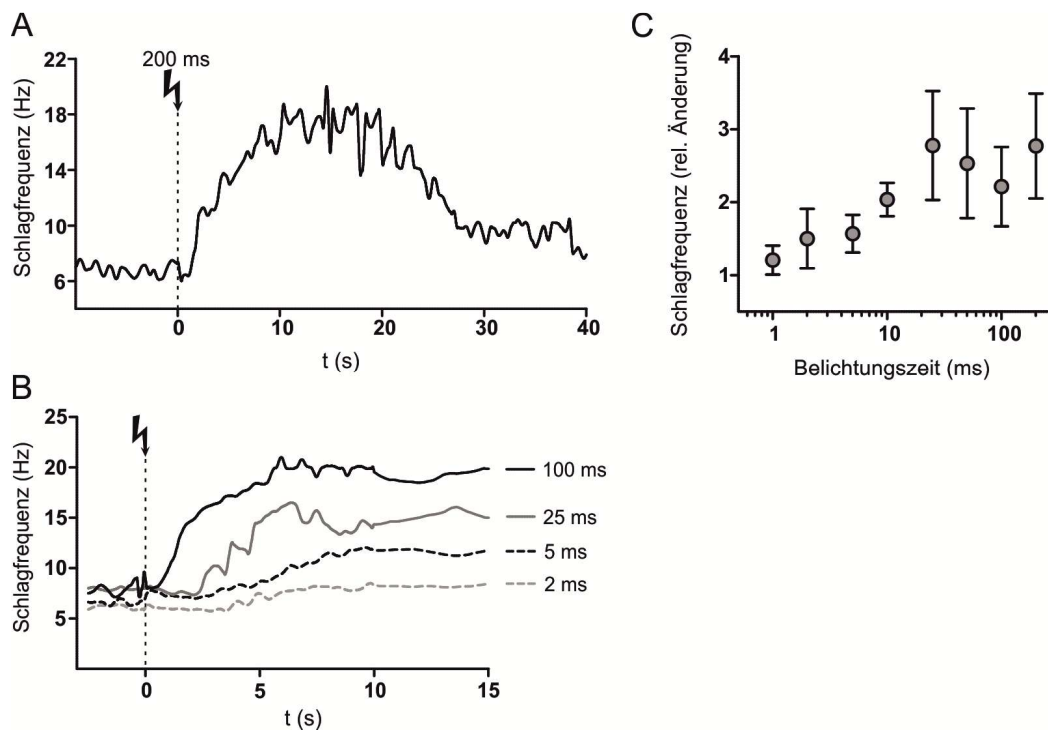


Abbildung 31: Änderung der flagellaren Schlagfrequenz durch Belichtung. (A, B) Prot1-bPAC-Spermien wurden mit einem einzelnen Lichtblitz belichtet ($t = 0$) und die Schlagfrequenz des Flagellums wurde aufgezeichnet (Bildfrequenz: 200 Hz). Dargestellt ist der Verlauf der Schlagfrequenz eines einzelnen Spermiums über die Zeit, die Kurven wurden um den Faktor 20 geglättet. (C) Aus Einzelmessungen wie in (A) wurde die relative Frequenzänderung nach Belichtung bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens 5 Experimenten pro Belichtungszeit.

3.4.5 Einfluss der bPAC-Basalaktivität auf Prot1-bPAC Spermien

Alle PACs weisen im Dunkeln eine gewisse Basalaktivität auf (Schröder-Lang et al., 2007; Stierl et al., 2011). Daher habe ich untersucht, ob diese Basalaktivität auch in Prot1-bPAC Spermien nachzuweisen ist. Dabei habe ich festgestellt, dass ohne Belichtung der basale cAMP-Gehalt von Prot1-bPAC-Spermien im Vergleich zum Wildtyp um etwa 50 % erhöht war (Abbildung 32A). Außerdem war der Flagellenschlag von Prot1-bPAC-Spermien etwas langsamer als der von Wildtyp-Spermien (Abbildung 32B).

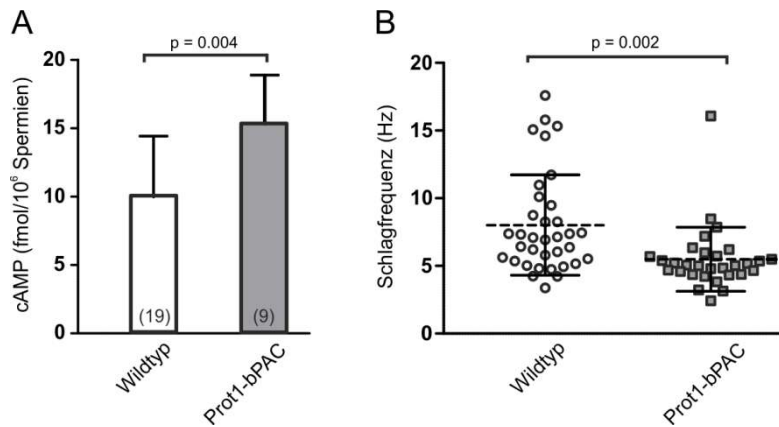


Abbildung 32: Basaler cAMP-Gehalt und basale Schlagfrequenz von Prot1-bPAC Spermien. (A) Unter Rotlicht präparierte Spermien wurden lysiert und der basale cAMP-Gehalt mit Hilfe eines Catchpoint-Assays bestimmt. (Mittelwert \pm Standardabweichung, (n) = Anzahl der Experimente), die Signifikanz wurde mit Hilfe des Zweistichproben-t-Tests überprüft. (B) Spermien wurde im Dunkelfeld aufgenommen und die basale flagellare Schlagfrequenz bestimmt. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Zweistichproben-t-Tests überprüft.

Dies überrascht auf den ersten Blick: Bei einem erhöhtem cAMP-Gehalt würde man eine erhöhte Schlagfrequenz erwarten, da der Flagellenschlag durch cAMP stimuliert wird (Wennemuth et al., 2003). Wie kann man diesen verlangsamten Flagellenschlag erklären? In Prot1-bPAC Spermien wird kontinuierlich cAMP synthetisiert, da in Spermien keine Feedback-Inhibition des bakteriellen Enzyms bPAC existiert. Wahrscheinlich wird der Flagellenschlag durch den erhöhten cAMP-Gehalt über einen cAMP-abhängigen Feedback-Mechanismus negativ reguliert.

Daher habe ich analysiert, ob die Basalaktivität von bPAC die Spermienfunktion beeinträchtigt oder zu Veränderungen in der cAMP-Signalantwort führt. Dazu habe ich zunächst die Expression der beiden wichtigsten Komponenten des cAMP-Signalwegs in Spermien untersucht: SACY und PKA. Beide Proteine wurden in Prot1-bPAC-Spermien und Wildtyp-Spermien ähnlich stark exprimiert (Abbildung 33A). Ich habe weiterhin die HCO_3^- -induzierte Aktivität von SACY untersucht. Die absolute Menge an cAMP, die durch HCO_3^- -Stimulation in Prot1-bPAC-Spermien synthetisiert wurde, war im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abbildung 33B). Der Anstieg des basalen cAMP-Gehalts durch bPAC führt also nicht zu einer verringerten Aktivität von SACY durch negatives Feedback.

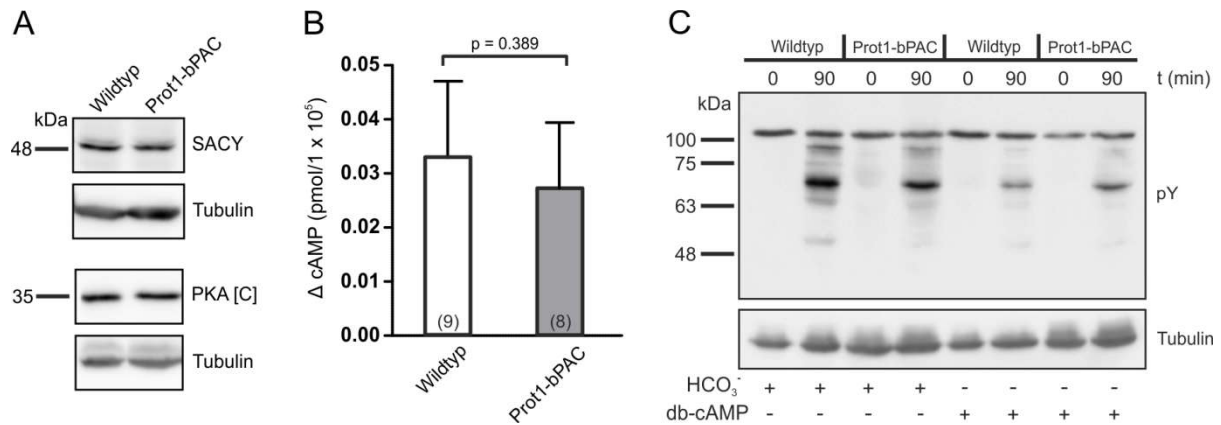


Abbildung 33: Vergleich von cAMP-abhängigen Signalwegen in Wildtyp- und Prot1-bPAC-Spermien. (A) Spermien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expression von SACY (~50 kDa) und der katalytischen Untereinheit von PKA (C α 2, ~39 kDa) wurde mit entsprechenden Antikörpern detektiert, für die Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin-Antikörper verwendet. (B) Spermien wurden in TYH-Puffer mit 25 mM NaHCO₃ resuspendiert und für 1 min inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurde der cAMP-Gehalt bestimmt und mit unstimulierten Proben verglichen. Dargestellt ist die absolute Änderung des cAMP-Gehalts (Mittelwert \pm Standardabweichung, (n) = Anzahl der Experimente), die Signifikanz wurde mit Hilfe des Zweistichproben-t-Tests überprüft. (C) Spermien wurden in Puffer mit 25 mM NaHCO₃ bzw. 1 mM db-cAMP resuspendiert und direkt bzw. nach 90 min Inkubation in SDS-Puffer aufgekocht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und phosphorylierte Tyrosinreste (pY) nachgewiesen. Zum Nachweis der Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin-Antikörper verwendet.

Schließlich habe ich noch die cAMP-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung in Spermien untersucht. Die Tyrosin-Phosphorylierung einer Reihe von Proteinen wird als ein Kennzeichen der Kapazitierung betrachtet und kann durch die Stimulation mit HCO₃⁻ oder membrangängigen cAMP-Analoga ausgelöst werden (Visconti et al., 1995a). In unbelichteten Prot1-bPAC-Spermien war die Tyrosin-Phosphorylierung nicht erhöht. Außerdem konnte durch Inkubation mit HCO₃⁻ oder dem cAMP-Analog db-cAMP die Tyrosin-Phosphorylierung in gleichem Maße wie im Wildtyp induziert werden (Abbildung 33C). Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass - bis auf die leicht verringerte Schlagfrequenz - der basal erhöhte cAMP-Gehalt keine physiologischen Konsequenzen hat.

3.4.6 Unspezifische Nebeneffekte membrangängiger cAMP-Analoga

Die Erforschung cAMP-abhängiger Mechanismen in Säugerspermien wird durch Nebeneffekte pharmakologischer Methoden erschwert. Beispielsweise erzeugen membranpermeable cAMP-Analoga in menschlichen Spermien Ca²⁺-Signale durch die unspezifische Aktivierung des CatSper-Ionenkanals (Brenker et al., 2012). Die gleiche Wirkung zeigen diese Analoga auch in Mausspermien: Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) und 8-

Bromo-cAMP (8-Br-cAMP) lösten sowohl in Wildtyp- als auch in Prot1-bPAC-Mausspermien ein Ca^{2+} -Signal aus (Abbildung 34).

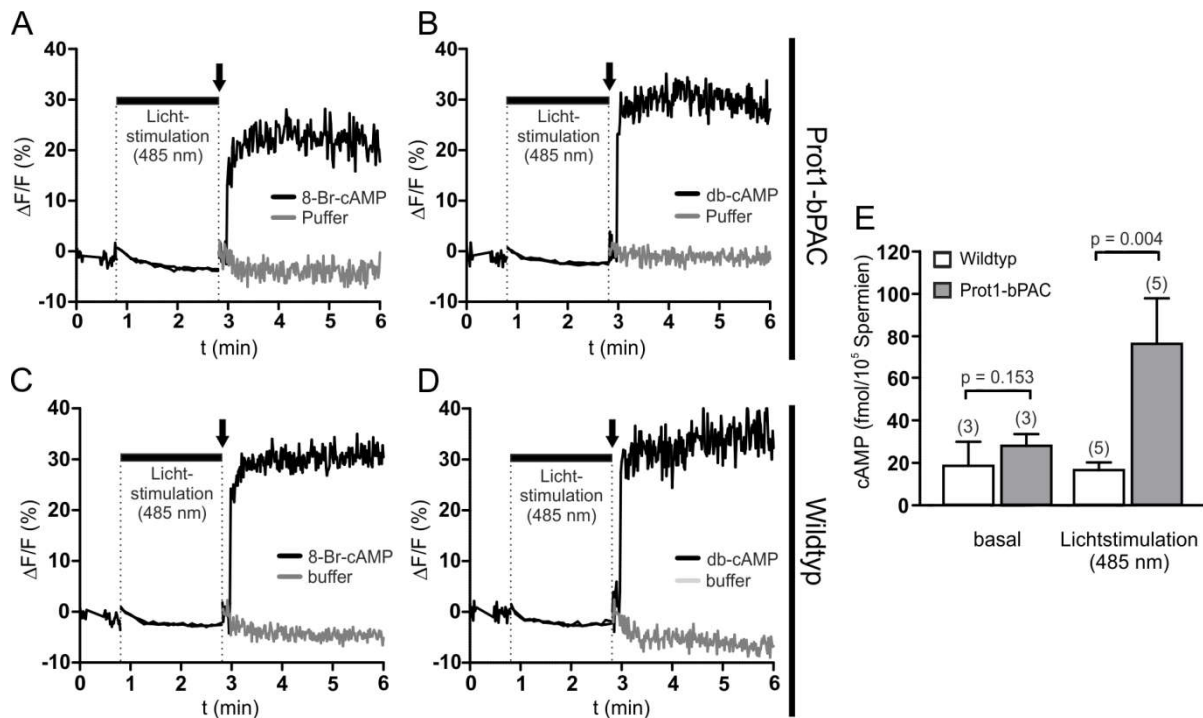


Abbildung 34: Durch cAMP-Analoga induzierte Ca^{2+} -Signale in Mausspermien. Prot1-bPAC- (A, B) bzw. Wildtyp-Spermien (C, D) wurden mit dem Ca^{2+} -Indikator FluoForte beladen und am FLUOstar Platereader gemessen. Im ersten Teil der Messung wurde nur die Fluoreszenz von FluoForte bei 520 nm angeregt. Im zweiten Messabschnitt (s. Balken), wurden die Proben zusätzlich mit blauem Licht (485 nm) stimuliert. Im dritten Teil der Messung wurden verschiedene cAMP-Analoga dazugegeben (jeweils 10 mM, s. Pfeil) und die Fluoreszenz von FluoForte wieder bei 520 nm angeregt. (E) Spermien wurden vor und nach Stimulation mit blauem Licht (wie in A-D beschrieben) abgestoppt, anschließend wurde der cAMP-Gehalt bestimmt. Dargestellt ist der absolute cAMP-Gehalt (Mittelwert \pm Standardabweichung, (n) = Anzahl der Experimente), die Signifikanz wurde mit Hilfe des Zweistichproben-t-Tests überprüft.

Dagegen führt eine cAMP-Erhöhung durch Belichtung von Prot1-bPAC-Spermien nicht zu einem Ca^{2+} -Signal (Abbildung 34A-D). Durch eine Bestimmung des cAMP-Gehalts vor und nach Belichtung wurde die bPAC-Aktivität kontrolliert (Abbildung 34E). Das Ca^{2+} -Signal wird wahrscheinlich durch einen Ca^{2+} -Einstrom durch CatSper erzeugt, da die Analoga in CatSper-*knockout*-Spermien kein Ca^{2+} -Signal auslösten (Abbildung 35, durchgeführt von Melanie Balbach). Mit dem Prot1-bPAC-Mausmodell können also cAMP-abhängige Signalwege in Spermien ohne pharmakologische Nebeneffekte untersucht werden.

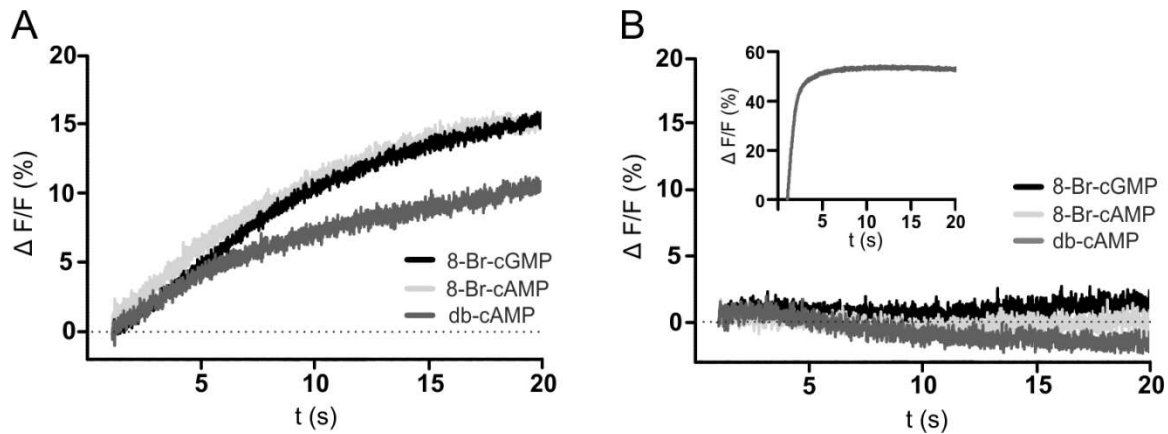


Abbildung 35: cNMP-Analoga induzieren keine Ca^{2+} -Signale in CatSper-*knockout*-Mauspermien. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde in Wildtyp- (A) bzw. CatSper-KO-Spermien (B) mit hoher zeitlicher Auflösung in einer stopped-flow Apparatur gemessen. Spermien wurden mit dem Ca^{2+} -Indikator Cal520 beladen und mit verschiedenen cNMP-Analoga stimuliert (jeweils 10 mM). Die verkleinerte Abbildung in (B) zeigt die Positivkontrolle mit Ionomycin (3 μ M).

3.6.7 Ersatz der SACY-Funktion durch bPAC

Die cAMP-Synthese durch SACY in Spermien wird durch HCO_3^- aktiviert (Xie et al., 2006). Inwiefern HCO_3^- den intrazellulären pH-Wert ändert, ist umstritten (Demarco et al., 2003; Carlson et al., 2007; Xu et al., 2007; Buck & Levin, 2011). Zwei mögliche Eintrittswege für HCO_3^- in Spermien sind denkbar: 1. Der Transport des HCO_3^- -Anions durch Anionenkanäle bzw. -austauscher wie den CFTR-Ionenkanal (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) oder den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter (Demarco et al., 2003; Xu et al., 2007) oder 2. die Diffusion von CO_2 über die Membran und die anschließende Reaktion mit H_2O zu $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$. Diese Reaktion wird durch das Enzym Carboanhydrase katalysiert (Ekstedt et al., 2004), und säuert durch Freisetzung von H^+ das Zellinnere an. Gelangt dagegen HCO_3^- als Anion in die Zelle, katalysiert Carboanhydrase die umgekehrte Reaktion von HCO_3^- und H^+ zu CO_2 und H_2O ; dies hat eine intrazelluläre Alkalisierung zur Folge. Wahrscheinlich beeinflusst also die Inkubation mit HCO_3^- sowohl den pH-Wert als auch die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Die optogenetische Manipulation von Spermien im Prot1-bPAC-Mausmodell bietet den Vorteil, dass ausschließlich die cAMP-Konzentration manipuliert wird.

Ich habe daher untersucht, ob bPAC das SACY-Enzym ersetzen kann. Da SACY durch Ca^{2+} reguliert wird, wird in nominell Ca^{2+} -freiem Medium die SACY-Aktivität nicht durch HCO_3^- stimuliert (Carlson et al., 2007). Dementsprechend führt die Inkubation mit HCO_3^- in Ca^{2+} -

freiem Medium sowohl in Wildtyp- als auch in Prot1-bPAC-Spermien weder zu einem cAMP-Anstieg (Abbildung 36A), noch zur Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung (Abbildung 36B). Unter diesen Bedingungen kann ich also den Einfluss von bPAC auf cAMP-abhängige Mechanismen unabhängig von SACY-Aktivität untersuchen.

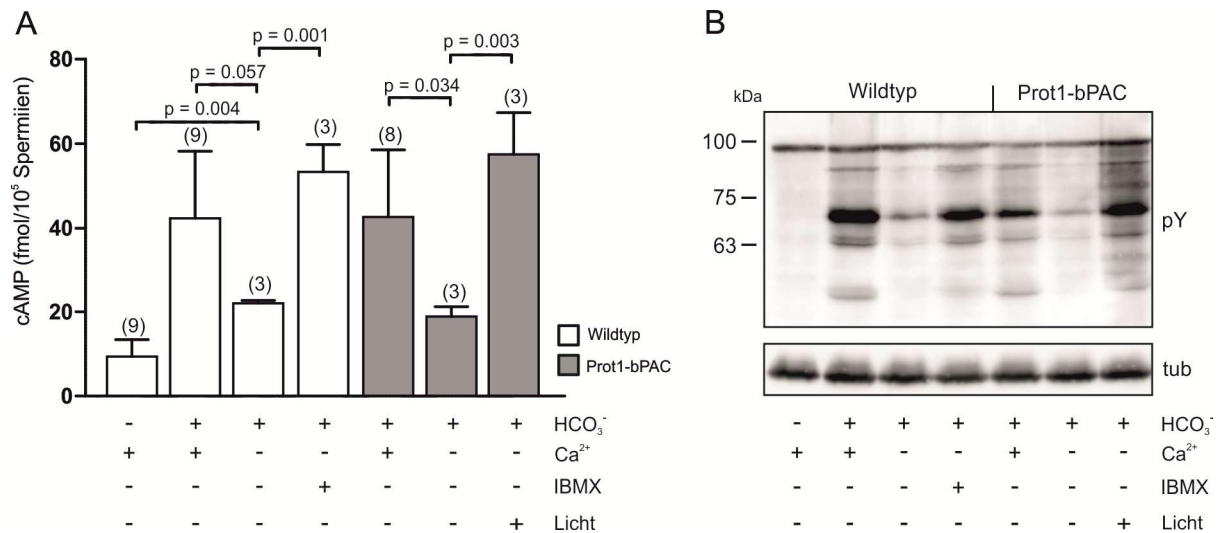


Abbildung 36: Aktivierung von bPAC ersetzt SACY in der Spermienfunktion. (A) Spermien wurden in TYH-Puffer mit verschiedenen Substanzen wie in der Abbildung angegeben resuspendiert und für 1 min inkubiert (25 mM NaHCO₃, 2 mM Ca²⁺, 100 μM IBMX) bzw. unter einer Halogenlampe belichtet. Nach Abstoppen der Reaktion wurde der cAMP-Gehalt bestimmt. Dargestellt ist die absolute Änderung der cAMP-Menge, die Signifikanz wurde mit Hilfe des Zweistichproben-t-Tests überprüft. (B) Spermien wurden in TYH-Puffer wie in (A) resuspendiert und nach 90 min Inkubation in SDS-Puffer aufgekocht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und phosphorylierte Tyrosinreste (pY) nachgewiesen. Zum Nachweis der Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin-Antikörper verwendet.

Wurden Prot1-bPAC-Spermien in Ca²⁺-freiem Medium in Anwesenheit von HCO₃⁻ belichtet, stieg durch die bPAC-Aktivität die cAMP-Konzentration wieder an (Abbildung 36A). Auch die Tyrosin-Phosphorylierung wurde unter diesen Bedingungen wiederhergestellt (Abbildung 36B). Die Aktivierung von bPAC kann also die cAMP-Synthese und die physiologische Funktion von SACY ersetzen.

3.4.8 Generation der doppelt-transgenen Mauslinie sNHE-KO/bPAC

Der spermien-spezifische Na⁺/H⁺-Austauscher sNHE (= Slc9c1) gehört zur SLC9-Proteinfamilie (*solute carrier*) innerhalb der CPA-Superfamilie (*cation proton antiporter*). Bei einem *knockout* von sNHE sind die Spermien vollkommen unbeweglich, was die Infertilität der sNHE-KO-Männchen zur Folge hat (Wang et al., 2003). Mit sNHE geht gleichzeitig auch die HCO₃⁻-stimulierte Isoform von SACY verloren, was eine Assoziation

der beiden Proteine zu einem funktionalen Komplex nahelegt (Wang et al., 2007). Die Mobilität der Spermien lässt sich durch Beladung mit membrangängigen cAMP-Analoga retten; dies ist auch bei SACY-KO Spermien möglich (Esposito et al., 2004) und zeigt, dass der sNHE/SACY Komplex für die Regulation der cAMP-vermittelten Motilität essentiell ist. Da wie oben erwähnt die Verwendung von cAMP-Analoga unspezifische Nebenwirkungen auslöst, habe ich versucht die Defekte des cAMP-Signalwegs in sNHE-KO-Spermien mit Hilfe von Licht zu beheben. Dazu wurden Mäuse der Linie Slc9c1-KO mit Prot1-bPAC-Mäusen verpaart um die doppelt-transgene Mauslinie Prot1-bPAC/Slc9c1-KO herzustellen (im Folgenden als sNHE-KO/bPAC bezeichnet). Das bPAC-Transgen und der *Slc9c1-knockout* wurden analog zur Prot1-bPAC-Mauslinie über PCR-Genotypisierung nachgewiesen (Abbildung 37).

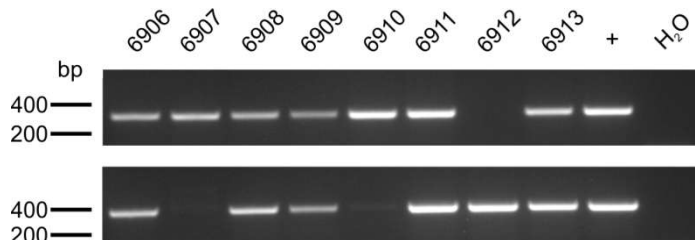


Abbildung 37: Genotypisierung der doppelt-transgenen Mauslinie sNHE-KO/bPAC. Genotypisierung der doppelt-transgenen Mauslinie Prot1-bPAC/Slc9c1-KO (Tier Nr. 6909 bis 6913). Die obere Reihe zeigt die PCR auf das Wildtyp-Allel (298 bp), die untere Reihe die PCR auf das rekombinante Allel (353 bp).

3.4.9 Wiederherstellung von Motilität und Fertilität in sNHE-KO/bPAC-Spermien

Der Verlust der Motilität in sNHE-KO-Spermien lässt sich nicht durch die bloße Einkreuzung von bPAC wiederherstellen: sNHE-KO/bPAC-Spermien waren bei Dunkelfeldmikroskopie unter Rotlicht weiterhin nicht motil und zeigten keinerlei Vorwärtsbewegung. Wurden die Spermien allerdings mit einer UV-LED stimuliert, zeigten die Flagellen eine zunehmende Bewegung; bei einigen Spermien erholte sich der Flagellenschlags sogar wieder so weit, dass ein normales Schlagmuster erkennbar wurde und die Vorwärtsbewegung wiederhergestellt wurde (Abbildung 38A, Video 3 im Anhang).

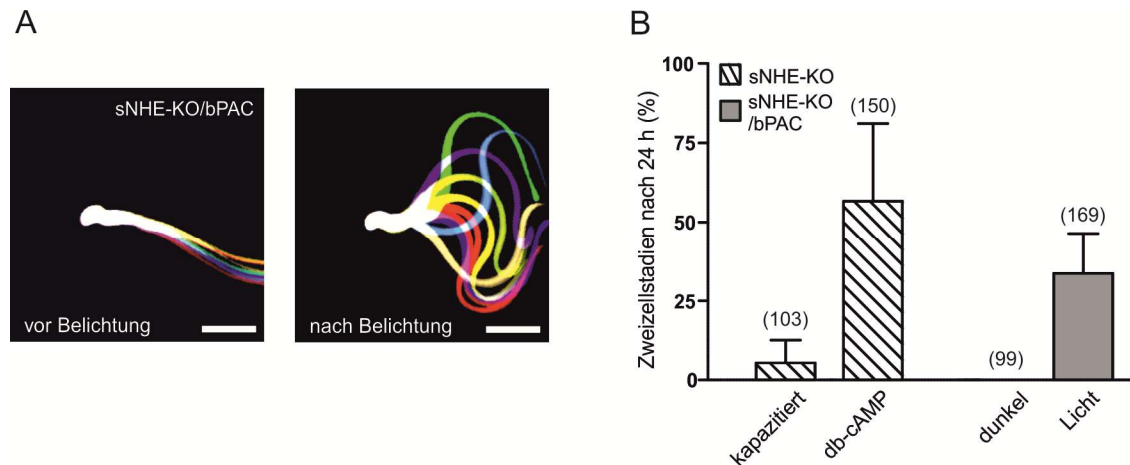


Abbildung 38: Lichtabhängige Wiederherstellung der Motilität und Fertilität von sNHE-KO/bPAC-Spermien.

(A) Flagellenschlag von sNHE-KO/bPAC Mäusen vor und nach Belichtung. Dargestellt ist eine Überlagerung von Einzelbildern eines kompletten Schlagzyklus. Maßstabsleiste: 30 μm . (B) Anzahl der Zweizellstadien nach In-Vitro-Fertilisation von Eizellen mit sNHE-KO bzw. sNHE-KO/bPAC-Spermien. Als Kontrolle wurden sNHE-KO-Spermien in Medium mit 25 mM NaHCO_3 bzw. 1 mM db-cAMP über 90 min kapazitiert. sNHE-KO/bPAC-Spermien wurden über 90 min im Dunkeln oder unter Blaulicht inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung, (n) = Gesamtanzahl der analysierten Eizellen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden auf die Anzahl der Zweizellstadien mit kapazitierten Wildtyp-Spermien normalisiert.

Durch Licht ließ sich auch die Fertilität der sNHE-KO/bPAC Spermien wiederherstellen. Bei im dunkel-inkubierten Spermien waren keine befruchteten Eizellen zu beobachten (Abbildung 38B). Wurden die Spermien jedoch belichtet, traten 24 h nach Inkubation wieder Zweizellstadien auf (Abbildung 38B), was zeigt, dass die Infertilität im sNHE-KO primär auf den Defekt der cAMP-Synthese zurückzuführen ist.

4. Diskussion

4.1 Manipulation zellulärer Funktionen mit Hilfe von bPAC

Die Zielsetzung meiner Arbeit war, die photoaktivierte Adenylatzyklase bPAC *in vitro* und *in vivo* zur Charakterisierung von cAMP-abhängigen Signalwegen einzusetzen.

In der stabilen Linie HEK-TM-bPAC konnte ich bPAC-Aktivität über einen lichtinduzierten Ca^{2+} -Einstrom durch CNGA2 nachweisen. Dabei konnte ich zeigen, dass der Ca^{2+} -Einstrom von der Lichtdosis abhängt; diese Dosisabhängigkeit wurde auch *in vitro* gezeigt (Stierl et al., 2011). Diese Dosisabhängigkeit erlaubt es, die Amplitude des lichtinduzierten cAMP-Signals und damit die ausgelösten zellulären Antworten genau zu kontrollieren, so wie in Prot1-bPAC-Spermien die Änderung der Schlagfrequenz mit Hilfe der Lichtdosis kontrolliert werden konnte.

Ein Nachteil der bPAC ist ihre Basalaktivität, die in Experimenten mit dem PDE-Inhibitor IBMX in der Zelllinie HEK-TM-bPAC erkennbar war: Auch ohne Belichtung wird cAMP synthetisiert, wodurch Signalwege schon im Ruhezustand aktiviert werden. Dies ist besonders bei *in vivo*-Anwendungen problematisch, da cAMP für einige Entwicklungsprozesse essentiell ist (Lepage et al., 1995; Epstein et al., 1996): Transgene Fliegen, die egPAC exprimieren, sterben bereits während der Embryonalentwicklung (Schröder-Lang et al., 2007). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die egPAC, die eine noch höhere Dunkelaktivität als bPAC besitzt, in den transgenen Fliegen mit einem starken Tubulin-Promotor exprimiert wurde. Die Expression von egPAC in cholinergen Neuronen von *C. elegans* ändert bereits ohne Belichtung das Bewegungsverhalten der Tiere: Die Schwimmbewegungen sind im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verringert (Weissenberger et al., 2011). In cholinergen Neuronen verstärkt cAMP die Ausschüttung von Acetylcholin an der motorischen Endplatte und damit die Muskelaktivität (Richmond & Jorgensen, 1999). Aufgrund der egPAC-Basalaktivität erwartet man daher erhöhte Muskelaktivität, aber das Gegenteil ist der Fall. Eine dauerhaft erhöhte cAMP-Konzentration in den cholinergen Neuronen transgener Tiere scheint durch eine Feedback-Inhibition des Signalwegs zu einer geringeren Muskelaktivität zu führen (Weissenberger et al., 2011). Eine solche Feedback-Inhibition konnte ich auch im Prot1-bPAC Mausmodell beobachten: In transgenen Spermien war die basale cAMP-Konzentration ohne Belichtung erhöht und resultierte in einer reduzierten Schlagfrequenz. Der molekulare Mechanismus dieser Regulation ist unklar. Die

Expression und Aktivität von SACY war in transgenen Spermien unverändert; ebenso die cAMP-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung. Prot1-bPAC-Männchen sind außerdem fertil. Die Spermienfunktion ist durch die Feedback-Inhibition des cAMP-Signalwegs also nicht beeinträchtigt.

Eine dauerhafte Aktivierung von Signalwegen durch die bPAC-Basalaktivität kann mit Hilfe eines induzierbaren Expressionssystems vermieden werden. In einem konditionalen transgenen Stamm des Parasiten *Toxoplasma gondii* wurde bPAC mit einer Destabilisierungsdomäne fusioniert (Hartmann et al., 2013). Diese fördert den schnellen Abbau von bPAC; gibt man aber den Liganden Shield-1 dazu, bindet dieser an die Domäne und verhindert den Proteinabbau (Banaszynski et al., 2006). Ohne Shield-1 war die cAMP-Konzentration in transgenen Toxoplasmen im Dunkeln ähnlich zum Wildtyp. Wurde der bPAC-Abbau durch Shield-1 gehemmt, stieg die basale cAMP-Konzentration wieder an (Hartmann et al., 2013). Der Vorteil dieses induzierbaren Systems besteht darin, dass der Zeitpunkt der Expression gewählt werden kann und so Störungen der Embryonalentwicklung vermieden werden können.

Erstaunlicherweise konnte in transgenen Toxoplasmen ohne Shield-1-Stimulation eine Erhöhung des cAMP-Gehalts durch Licht ausgelöst werden (Hartmann et al., 2013). Daraus lässt sich schließen, dass eine geringe bPAC-Expression in Anwesenheit der Destabilisierungsdomäne ausreicht, um die cAMP-Konzentration mit Licht zu erhöhen (ohne Shield-1: 4,2-fach, mit Shield-1: 47-fach, Hartmann et al., 2013). Die Proteinexpression ist jedoch zu niedrig, um den basalen cAMP-Gehalt zu beeinflussen. In anderen Expressionssystemen könnte man die bPAC-Expression durch Wahl eines geeigneten Promotors so anpassen, dass die basale cAMP-Konzentration unverändert ist, aber durch Lichtstimulation dennoch erhöht werden kann.

Eine weitere Möglichkeit wäre, die Basalaktivität von bPAC durch Mutagenese zu verändern. Diese Methode wird häufig bei fluoreszierenden Proteinen angewendet: Basierend auf GFP aus *Aequorea victoria* und DsRed aus *Discosoma* wurde mittlerweile eine Vielfalt von Fluoreszenzproteinen mit den unterschiedlichsten Eigenschaften in Bezug auf Spektrum, Photostabilität, Extinktionskoeffizient oder Quantenausbeute erzeugt (Shaner et al., 2005). Im Vergleich dazu steht die Optimierung von optogenetischen Werkzeugen noch am Anfang. Für Channelrhodopsin sind bereits einige Mutanten bekannt, die eine höhere Lichtsensitivität, veränderte Ionenselektivität oder eine schnellere Wiederherstellung des Ruhezustands aufweisen (Gunaydin et al., 2010; Kleinlogel et al., 2011; Wietek et al., 2014). Diese Optimierung ist möglich, da die Struktur des Kanals bereits gut beschrieben ist (Kato et al.,

2012; Lórenz-Fonfria & Heberle, 2014); für die photoaktivierten Adenylatzyklen fehlen jedoch detaillierte Daten zur Struktur und Funktionsweise, die eine gezielte Manipulation ermöglichen. Eher zufällig wurde kürzlich die Mutante bPAC-S27A gefunden, deren Dunkelaktivität um 40 % reduziert ist (Stierl et al., 2014). In künftigen Anwendungen können die Nachteile der Dunkelaktivität durch den Einsatz von bPAC-S27A vermieden werden.

Ein weiterer Nachteil von bPAC ist das breite Absorptionsspektrum, was die parallele Verwendung anderer optischer Methoden, wie z.B. die Messung intrazellulärer Botenstoffe mit fluoreszierenden Sensoren, einschränkt. Bei der parallelen Messung von $[Ca^{2+}]_i$ habe ich daher einen rotverschobenen Ca^{2+} -Indikator verwendet. Ein Ziel ist es jedoch, die cAMP-Konzentration in der Zelle durch Licht zu erhöhen und diese Änderung gleichzeitig zu verfolgen, beispielsweise durch FRET-Biosensoren. Die meisten FRET-Biosensoren zur Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration basieren auf der Donor/Akzeptor-Kombination CFP/YFP (Nikolaev et al., 2004; Shaner et al., 2005). Die Absorptionsspektren der bPAC und dieses FRET-Paars überlappen jedoch stark, wodurch eine Kombination dieser beiden Werkzeuge unmöglich ist. Daher habe ich einen FRET-Biosensor mit den Fluorophoren mOrange2 und mCherry konstruiert, deren Absorptionsspektren deutlich von dem der bPAC getrennt sind. Leider sind die cAMP-induzierten Änderungen des FRET-Signals in diesem Sensor nur minimal und er ist daher für eine Anwendung in Einzelzellen nicht geeignet. Eine Verschiebung des bPAC-Absorptionsspektrums zu höheren Wellenlängen wäre ideal. Bei der Analyse verschiedener Mutanten mit verändertem Photozyklus identifizierten Stierl und Kollegen bPAC-Varianten mit einer Rotverschiebung des Absorptionsspektrums um 12 nm (Stierl et al., 2014). Größere Änderungen des Spektrums sind aber kaum möglich, denn im Gegensatz zu Fluoreszenzproteinen ist der bPAC-Chromophor kein Protein, das durch Mutagenese verändert werden kann, sondern der Kofaktor FAD (Stierl et al., 2011).

Als Weiterentwicklung einer nativen lichtaktivierten Adenylatzyklase wäre auch ein modulares System denkbar: Photorezeptordomänen mit geeigneten spektralen Eigenschaften können mit verschiedenen enzymatischen Domänen kombiniert werden, so wie es für die chimären OptoXRs gezeigt wurde (Airan et al., 2009). Durch ein solches Baukastensystem kann man optogenetische Werkzeuge auf jede Anwendung passend zuschneiden. Auf diese Weise wurde die humane Phosphodiesterase 2A mit dem bakteriellen Phytochrom von *Deinococcus radiodurans* (DrBPhy) zu einer lichtaktivierten Phosphodiesterase kombiniert (Gasser et al., 2014). Durch konsequente Weiterentwicklung wird die Optogenetik es in Zukunft ermöglichen, die verschiedensten zellulären Funktionen mit hoher Präzision zu

manipulieren und so einen wichtigen Beitrag zur Entschlüsselung intrazellulärer Signalwege leisten.

4.2 Funktionale Charakterisierung von bPAC in neuronalen Primärzellen

Eine Mischkultur neuronaler Zelltypen wurde aus dem embryonalen Hippocampus isoliert und die bPAC mit verschiedenen Promotoren zelltypspezifisch exprimiert. Der ubiquitäre CMV-Promotor erwies sich dabei als ungeeignet, da bPAC mit diesem Promotor in nicht-neuronalen Zelltypen, vor allem Astrozyten, exprimiert wurde. Der Synapsin1-Promotor dagegen ermöglichte die neuronenspezifische Expression. Mein Ziel war es, die bPAC, wie zuvor in HEK-Zellen, über den lichtabhängiger Ca^{2+} -Einstrom durch CNGA2-TM zu charakterisieren. Jedoch konnte ich in einer Positivkontrolle, in der die tmACs mit NKH477 stimuliert wurden, keinen cAMP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom durch CNGA2 beobachten.

Ein ähnliches Experiment wurde jedoch bereits erfolgreich durchgeführt (Stierl et al., 2011), allerdings wurden hier 1. die Ionenströme elektrophysiologisch nachgewiesen und 2. eine andere Variante des CNGA2-Kanals verwendet (C460W/E583M; Rich et al., 2001). Diese Messungen wurden bei jeweils 4 mM extrazellulärem Mg^{2+} und Ca^{2+} durchgeführt (Schoenenberger et al., 2009; Stierl et al., 2011). CNG-Kanäle werden jedoch durch divalente Kationen blockiert; bei 1 mM extrazellulärem Ca^{2+} beträgt der Strom durch CNGA2 nur noch 10 % des Maximalstroms (Kaupp & Seifert, 2002). Wird CNGA2-TM in HEK-Zellen heterolog exprimiert, ist bei 1,8 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} kein Strom mehr nachweisbar (Fechner, 2012). Aufgrund dieser Argumente sollten die elektrophysiologischen Messungen aus Stierl et al., 2011 nochmals überprüft werden und helfen nicht bei der Interpretation meiner Daten.

Warum kann ich mit NKH477 keinen cAMP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom durch CNGA2-TM beobachten? Agonisten wie NKH477 bzw. Forskolin können einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in hippocampalen Neuronen bewirken (Morinobu et al., 1999; Chern, 2000). Die Expression von CNGA2-TM in neuronalen Zellen habe ich zwar über eine Immunfärbung nachgewiesen, möglicherweise wird der Ionenkanal jedoch nicht korrekt zur Plasmamembran transportiert bzw. dort eingebaut. Transmembranproteine werden in eukaryotischen Zellen am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und über sekretorische Vesikel an ihren Zielort transportiert (Alberts, 2002). Heterolog exprimierte Proteine werden im Golgi-Apparat teilweise nicht korrekt erkannt, wodurch diese Proteine in Vesikeln oder im Golgi verbleiben. In den Immunfärbungen von CNGA2-TM konnte ich jedoch keine Anreicherung des Proteins erkennen. Ob der Kanal tatsächlich in die

Zellmembran inseriert wird, kann aus den Experimenten nicht eindeutig geschlossen werden. In weiterführenden Experimenten könnte man die Insertion von CNGA2-TM mit einer Färbung von Membransheets nachweisen. Bei dieser Methode werden alle intrazellulären Organellen abgetrennt und es bleiben nur die Teile der Plasmamembran zurück, die direkten Kontakt mit der Kulturschale haben. Mit einer anschließenden Antikörperfärbung dieser Membransheets kann die Insertion eines Proteins in die Membran bestätigt werden.

Neben Experimenten mit bPAC in Zellkultur und im explantierten Hirnschnitt sind auch Untersuchungen *in vivo* im Mausmodell denkbar. *In vivo*-Stimulation von Channelrhodopsin mit Hilfe von implantierten Lichtleitern wurde bereits vielfach in sich frei bewegenden Mäusen demonstriert; dies ermöglicht die Kombination von Optogenetik und Verhaltensanalyse (Adamantidis et al., 2007; Sohal et al., 2009; Tsai et al., 2009; Cardin et al., 2010). Mit sogenannten Optroden, die Lichtleiter mit Messelektroden kombinieren, kann man sogar gleichzeitig optogenetisch stimulieren und die elektrische Aktivität messen (Gradinaru et al., 2007; Kravitz et al., 2010). Mit bPAC kann man cAMP *in vivo* kontrollieren und dabei so lokale cAMP-abhängige Mechanismen untersuchen. Die präzise Fokussierung der Lichtquelle ausschließlich auf ein subzelluläres Kompartiment, wie z.B. die Prä- oder Postsynapse, ist allerdings technisch schwierig (Hegemann & Sigrist, 2013). Eine lokale Expression der bPAC wäre daher wünschenswert. Dabei bietet sich die Fusion von bPAC mit geeigneten Signalsequenzen oder synaptischen Proteinen an. Eine solche *targeting*-Strategie habe ich für den Import von bPAC in primäre Zilien entwickelt.

4.3 Manipulation der lokalen cAMP-Konzentration in primären Zilien

Proteine gelangen über die *transition zone*, eine spezialisierte Region an der Zilienbasis, ins primäre Zilium. Hier befinden sich die *transition fibers* und *Y-links*, die den Basalkörper und das Axonem mit der Plasmamembran verbinden (Czarnecki & Shah, 2012). Diese Strukturen regulieren vermutlich den Import ziliärer Proteine und schränken die freie Diffusion löslicher Moleküle ein (Kee et al., 2012). Die Mobilität von Transmembranproteinen zwischen der ziliären Membran und der restlichen Plasmamembran wird durch Septine und einige mit Ziliopathien assoziierte Proteine reguliert (Craigie et al., 2010; Hu et al., 2010). Der Import von löslichen und Membranproteinen ins Zilium wird vermutlich über verschiedene Mechanismen reguliert, was daher auch verschiedene Signalsequenzen erfordert. Diese Signalsequenzen sind oft spezifisch für bestimmte Proteine oder sie funktionieren nur in einem bestimmten Zelltyp (Nachury et al., 2010). Einige Signalsequenzen wurden identifiziert, weil ihre Mutation den Proteinimport ins Zilium verhinderte; wurden diese

Sequenzen aber in andere, nicht-ziliäre Proteine übertragen, wurde diese Proteine nicht zwangsläufig ins Zilium importiert (Jenkins et al., 2006; Berbari et al., 2008). Solche Sequenzen sind also notwendig aber nicht ausreichend für den gezielten Transport. Dies könnte erklären, warum SSTR3-eGFP in Zilien von IMCD-3-Zellen, nicht aber von MDCK-Zellen transportiert wurde.

Eine Fusion mit dem GPCR SSTR3 ermöglichte den Transport von eGFP und bPAC-mCherry in Zilien von IMCD-3-Zellen und hippocampalen Neuronen. Problematisch könnte sein, dass SSTR3 als vollständiges Protein vermutlich funktionell vorliegt. Die Rezeptoren der SSTR-Familie werden durch das Peptidhormon Somatostatin aktiviert, koppeln an G_i und inhibieren Adenylatzyklasen (Hoyer et al., 1994; Patel et al., 1994). Eine Fusion von bPAC mit einem Protein, das selbst cAMP-Signalwege reguliert, kann nicht zur Untersuchung lokaler cAMP-Signale eingesetzt werden. Daher habe ich versucht, eine nicht-funktionelle SSTR3-Mutante zu generieren. Das konservierte Tripeptid E/D-R-Y zwischen dem dritten Transmembransegment und der zweiten intrazellulären Schleife spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion von GPCRs mit G-Proteinen (Rovati et al., 2007). Die Substitution von D136 oder R137 durch Alanin im humanen SSTR5 unterbindet die Signaltransduktion (Peverelli et al., 2009). Analog dazu habe ich deshalb das DRY-Motiv in SSTR3 substituiert, allerdings ist es mir nicht gelungen, den Rezeptor zu exprimieren und zu untersuchen.

Erst kürzlich wurde bekannt, dass die Funktion von bPAC durch N-terminale Fusion stark beeinträchtigt wird (P. Hegemann, pers. Mitteilung); möglicherweise ist die SSTR3-bPAC-Fusion nicht funktionell. Eine C-terminale Fusion von bPAC an SSTR3 ist jedoch nicht möglich, da der N-Terminus von SSTR3, wie bei allen GPCRs, extrazellulär vorliegt. In weiterführenden Arbeiten werde ich mich daher zunächst auf Arl13b als Importprotein für bPAC konzentrieren, das - zumindest für C-terminale Fusionen - bereits erfolgreich als *targeting*-Protein in IMCD-3-Zellen verwendet wurde (G. Pazour, pers. Mitteilung). Arl13b gehört zur Arf-Familie der GTPasen, die am N-Terminus myristoyliert und dadurch in der Zellmembran verankert werden (Donaldson & Jackson, 2011). Möglicherweise ist diese Myristoylierung notwendig für den ziliären Import, deshalb muss zunächst sichergestellt werden, dass eine Fusion den ziliären Import von Arl13b nicht beeinträchtigt.

Ein weiteres Ziel ist es, neben bPAC auch z.B. fluoreszierende Biosensoren für Botenstoffe ins Zilium zu transportieren, wie es bereits am Beispiel von GCaMP3 gezeigt wurde (Delling et al., 2013). Mit einem FRET-Biosensor können lokale Veränderungen der cAMP-Konzentration im primären Zilium lebender Zellen verfolgt werden. Durch Kombination

unterschiedlicher FRET-Paare ist sogar die parallele Messung somatischer und ziliärer Konzentrationsänderungen möglich.

Verschiedene Komponenten des cAMP Signalwegs - GPCRs und ACIII - sind in primären Zilien lokalisiert, was darauf hinweist, dass cAMP hier eine Rolle spielt (Händel et al., 1999; Brailov et al., 2000; Bishop et al., 2007; Berbari et al., 2008). An welchen zellulären Vorgängen cAMP in Zilien beteiligt ist, ist aber weitgehend unklar. Möglicherweise spielt es bei der Embryonalentwicklung eine Rolle, die stark durch Signalvorgänge in primären Zilien beeinflusst wird (Goetz & Anderson, 2010). Dabei ist vor allem die Bedeutung des Shh (*sonic hedgehog*)-Signalwegs gut untersucht. Viele Proteine des Shh-Signalwegs befinden sich in primären Zilien oder werden nach Aktivierung des Signalwegs dorthin transportiert (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007).

Welche Rolle aber spielt cAMP in diesem Signalweg? Der G_s-gekoppelte, konstitutiv aktive GPCR Gpr161 und PKA inhibieren den Shh-Signalweg, d.h. sie verhindern die Expression von Shh-Zielgenen (Barzi et al., 2010; Tuson et al., 2011; Mukhopadhyay et al., 2013).

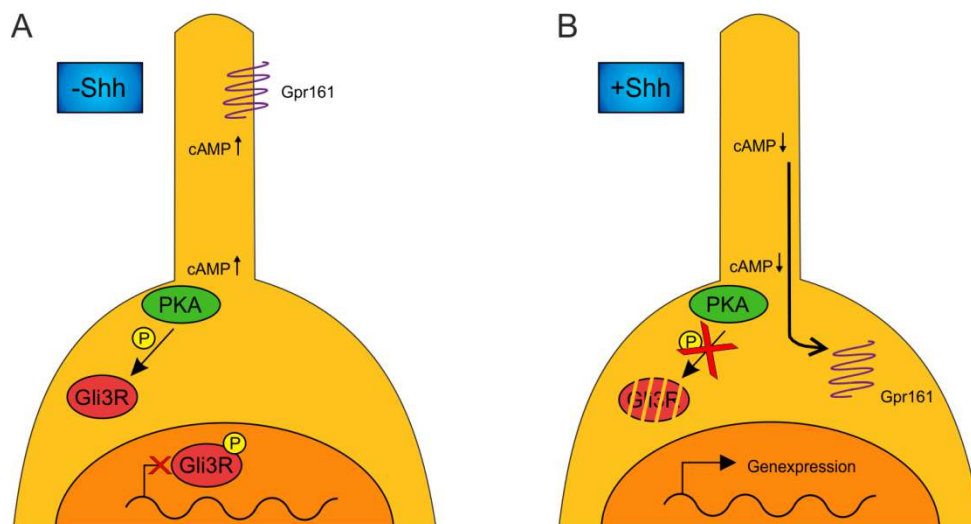


Abbildung 39: cAMP-abhängige Regulation des Shh-Signalwegs. (A) Gpr161 stimuliert die cAMP-Synthese im Zilium. cAMP diffundiert zu Zilienbasis und aktiviert PKA, die wiederum den Repressor Gli3R durch Phosphorylierung aktiviert. Gli3R reprimiert im Zellkern die Expression von Shh-Zielgenen. (B) Durch Aktivierung des Shh-Signalwegs wird Gpr161 aus dem Zilium entfernt. Die cAMP-Konzentration sinkt und PKA ist damit inaktiv: Gli3R wird nicht mehr phosphoryliert und abgebaut. Shh-Zielgene können exprimiert werden. Weitere Details im Text.

Man vermutet, dass Gpr161 in Abwesenheit des Liganden Shh die cAMP-Synthese im Zilium aktiviert (Abbildung 39A). Durch Diffusion gelangt cAMP zur Zilienbasis, wo PKA aktiviert wird und durch Phosphorylierung des Repressors Gli3R die Expression von Shh-Zielgenen unterdrückt (Goetz & Anderson, 2010; Niewiadomski et al., 2014). Bei Aktivierung des Shh-Signalwegs wird Gpr161 aus dem Zilium entfernt und es findet keine cAMP-Synthese mehr

statt (Abbildung 39B). PKA ist nicht mehr aktiv, wodurch der Repressor Gli3R dephosphoryliert und Shh-Zielgene angeschaltet werden (Mukhopadhyay et al., 2013; Pal & Mukhopadhyay, 2014).

Dieses Modell ist bisher das einzige, das einen cAMP-abhängigen Signalweg in primären Zilien beschreibt. Es bleiben jedoch noch viele Fragen offen. Es ist z.B. nicht bekannt, über welche G-Proteine und Adenylatzyklen Gpr161 die cAMP-Synthese induziert. Auch dass sich die cAMP-Konzentration im Zilium in Abhängigkeit von Shh verändert, ist bisher nicht experimentell bestätigt. Durch die zilienspezifische Expression von bPAC oder einer photoaktivierten PDE (Gasser et al., 2014) kann die cAMP-Konzentration im Zilium manipuliert und deren Bedeutung für den Shh-Signalwegs untersucht werden.

4.4 Optogenetische Kontrolle der Spermienfunktion

Viele cAMP-abhängige Mechanismen in Spermien, wie die Kapazitierung, die Akrosomreaktion oder der Flagellenschlag, wurden und werden immer noch mit Hilfe membrangängiger cAMP-Analoga untersucht (De Jonge et al., 1991; Visconti et al., 1995b; Kobori et al., 2000; Wertheimer et al., 2013). Durch cAMP-Analoga induzierte Ca^{2+} -Signale in Mausspermien wurden bisher so interpretiert, dass eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration einen Ca^{2+} -Einstrom bewirkt (Aoki et al., 1999; Kobori et al., 2000; Ren et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde bei einer Erhöhung von cAMP durch HCO_3^- und SACY kein Ca^{2+} -Signal beobachtet (Wennemuth et al., 2003; Carlson et al., 2007). Mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen an humanen Spermien konnte in unserem Institut schließlich gezeigt werden, dass diese Analoga unspezifisch den CatSper-Kanal von der extrazellulären Seite aktivieren (Brenker et al., 2012); es handelt sich bei den beobachteten Ca^{2+} -Signalen also um ein Laborartefakt. Durch Messungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte ich zeigen, dass die membrangängigen cAMP-Analoga 8-Br-cAMP und db-cAMP auch in Mausspermien den CatSper-Kanal unspezifisch aktivieren. Daher müssen die mit Analoga durchgeführten Experimente im Hinblick auf diese pharmakologischen Nebenwirkungen neu interpretiert werden. Das Prot1-bPAC Mausmodell bietet eine alternative Methode zur Manipulation der intrazellulären cAMP-Konzentration in Spermien ohne die Nebeneffekte pharmakologischer Intervention.

Meine Experimente zeigen, dass bPAC die durch SACY gesteuerte Signaltransduktion imitieren kann: Die Aktivierung von bPAC und die Stimulation mit HCO_3^- induzieren die gleiche Änderung der cAMP-Menge in Spermien. Die lichtinduzierte Erhöhung der flagellaren Schlagfrequenz ähnelte ebenfalls der HCO_3^- -induzierten Änderung (Wennemuth et

al., 2003) und auch die cAMP-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung konnte durch bPAC aktiviert werden. In Spermien, in denen SACY entweder funktionell (in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+}) oder genetisch inaktiviert war, konnte bPAC die Funktion von SACY bei der Kapazitierung und bei der Befruchtung übernehmen.

Da die Befruchtung von sNHE-KO/bPAC-Spermien durch bPAC-Aktivierung wiederhergestellt wurde, ist der Fertilitätsdefekt offensichtlich auf den Verlust der cAMP-Synthese und weniger auf den Verlust des Na^+/H^+ -Austauscher sNHE zurückzuführen. Zu diesem Schluss kommen auch Wang und Kollegen: Sie konnten mit dem Analog Sp-cAMP die Befruchtung durch sNHE-KO-Spermien *in vitro* wiederherstellen (Wang et al., 2003). Allerdings mussten die Eizellen dazu von der Zona pellucida befreit werden (Wang et al., 2003). Zu dieser Beobachtung passt, dass sNHE-KO-Spermien nach Behandlung mit cAMP-Analoga nicht hyperaktiv zu sein scheinen, was für die Überwindung der Zona pellucida notwendig ist (Quill et al., 2006). Auch SACY-KO-Spermien sind nach Behandlung mit cAMP-Analoga nicht hyperaktiv und befruchten nur Eizellen ohne Zona pellucida (Hess et al., 2005; Xie et al., 2006). Daraus wurde geschlossen, dass der sNHE/SACY-Komplex neben der cAMP-Synthese noch andere Aufgaben während der Fertilisierung oder Kapazitierung erfüllt, möglicherweise reguliert er den intrazellulären pH-Wert (Quill et al., 2006; Ho et al., 2002). Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass die Motilität und Fertilität von sNHE-KO-Spermien durch Ammoniumchlorid partiell wiederhergestellt wird; die Zahl motiler und fertiler Spermien ist allerdings deutlich geringer als bei der Verwendung von cAMP-Analoga (Wang et al., 2003). sNHE-KO/bPAC-Spermien konnten dagegen nach Lichtstimulation Eizellen mit intakter Zona pellucida befruchten. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine weitere Funktion des sNHE/SACY-Komplexes außer der cAMP-Synthese. Es ist allerdings möglich, dass die Regulation des pH-Werts durch sNHE die Befruchtung positiv beeinflusst. Es ist unumstritten, dass cAMP eine Schlüsselrolle bei der Spermienfunktion einnimmt. Einige Aspekte der Signaltransduktion sind allerdings unklar. Umstritten ist beispielweise die Art und Lokalisation der Adenylatzyklasen in Säugetierspermien. Eine Reihe von Studien identifizierte G-Protein-aktivierte tmACs in Spermien (Leclerc und Kopf, 1999; Spehr et al., 2004; Livera et al., 2005), andere Untersuchungen schließen aber genau das aus (Hildebrandt et al., 1985; Rojas et al., 1992; Rojas et al., 1993; Strünker et al., 2011). Viele Studien, die die Existenz G-Protein-gekoppelter Signalwege in Säugerspermien vorschlagen, wurden jedoch durch das vermehrte Auftreten pharmakologischer Artefakte in Frage gestellt (Brenker et al., 2012). Neuere Studien schlagen die Existenz räumlich getrennter cAMP-Signalkaskaden vor: Im Flagellum reguliert SACY/cAMP die Motilität und Kapazitierung, während im

Spermienkopf durch G-Proteine und tmACs die Akrosomreaktion reguliert wird (Wertheimer et al., 2013). Das Prot1-bPAC-Mausmodell bietet eine Möglichkeit, solche lokal begrenzten cAMP-Signale und ihre physiologische Bedeutung zu untersuchen.

Die zeitliche Abfolge der cAMP-abhängigen Mechanismen bei der Kapazitierung ist bisher ebenfalls unbekannt. HCO_3^- -Stimulation aktiviert die cAMP-Synthese durch SACY und die cAMP-abhängige Beschleunigung des Flagellenschlags innerhalb von Sekunden (Nolan et al., 2004; Strünker et al., 2011). Die cAMP-induzierte Phosphorylierung von PKA-Zielproteinen bewegt sich ebenfalls in diesem Zeitrahmen (Harrison, 2004). Die PKA-abhängige Aktivierung der Tyrosin-Phosphorylierung ist dagegen erst nach über einer Stunde nachweisbar (Visconti et al., 1995; Xie et al., 2006). Welche Mechanismen sind für diese zeitliche Diskrepanz verantwortlich? Diese Frage lässt sich mit dem Prot1-bPAC Mausmodell beantworten, denn mit Belichtung können zeitlich viel komplexere cAMP-Signalmuster erzeugt werden als mit anderen Methoden zur Erhöhung der cAMP-Konzentration. Hier bietet sich zusätzlich die Kombination von bPAC mit der bereits beschriebenen photoaktivierten PDE an (Gasser et al., 2014); diese hat ein rotverschobenes Absorptionsspektrum und kann unabhängig von bPAC aktiviert werden.

Zusammenfassend stellt die Verwendung optogenetischer Werkzeuge eine vielversprechende Methode dar, um die komplexen cAMP-abhängigen Signalmechanismen in Säugerspermien zu untersuchen.

5. Anhang

5.1 Primersequenzen

Primer	5' - 3' Sequenz
C1038	CTCAAGCTTCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
C1039	GGACTTCTTGGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
C1040	CTGTACAAGGGATCCCAAGAAGTCCGTCGCGG
C1041	TATCTCGAGAGCGCTCGCCGACGCGCCGCG
C1042	ATACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG
C1043	ATATATATATGCGGCCGCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
C1044	ATTTCGTCCGCAATTGGCAATTGG
C1045	TCCGGGCTGCTGCTGCACAAC
C1046	ACAGGATCCGAAGAGAAGAAGGAGTGTGATGAAG
C1047	CTACATTCACGGAACCTTTCAGAATGATG
C1048	CATCATTCTGAAAGGTTCCGTGAATGTAG
C1049	TGTCTCGAGCTCAACGTCCTCAGAATCCGATTG
C1050	AGGACACCATGCTGCTGCTCTC
C1051	TTCCTTGTCGACTCTTAGGAAGTG
C1052	ATCGGATCCACCATGATGAAGCGGCTGGTGTACATC
C1053	TAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAGGCAGGCCACTTGGCTG
C1077	GCTGGTTTAAGAAAAGCAAAACCAGAAAAATAAAACCAGAAGACAAGCG GCTGGTGTACATCAGC
C1078	CGCGGATCCACCATGCTGAGCTGTCTCGTTTGCTGCTGGTTTAAGAAAAG CAAAACCA
C1079	CGCTCGAGTACTTGTACAGCTCGTCCATG
C1080	GGGAATTCCTGAGCTGTCTCGTTTGCTG
C1081	GGGAATTCCTACTGGATGGTTTCTGGTGG
C1326	ATAGAATTCATGATGAAGCGGCTGGTGTAC
C1327	GCGAAGCTTCTAGGCGTAGTCGGGCACG
C1328	GCTGTGTCATCTTCGTGGCCATCCTTCAG
C1329	CCACCAATCCCTGAAGGATGGCCACGAAG
C1330	GTGGTCTAGACCACCATGGAGTTCGGCAG

Primer	5' - 3' Sequenz
C1331	CCGCGAATTCGTAGTCCCGGACAGGGGGC
C1332	GACGCGGCCGCCCGGG
C1333	TAAGCCTGAGGCAGGGGAG
C1352	TTCATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAATGGTGAGCAAGGGC
C1353	GCCCTTGCTCACCATTTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGAA
C1354	ACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATATGGTGAGCAAGGG
C1355	TGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATATACCACTCGTTCCC
C1356	TCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATCCACCATGGTGAGCAAGGGC
C1357	AGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATAGGTGGTACCACTCGTTCCCCG
C1454	CGCGAATTCCACCATGGCCACTGTTACC
C1455	GCGTCTAGACAGATGGCTCAGTGTGCTGG
C1456	CGCTCTAGAATGATGAAGCGGCTGGTGTAC
C1597	CGTCATGAGTGTGGCCCGCTATCTGGCTG
C1598	CAGCCAGATAGCGGGCCCACTCATGACG
C1599	CGTCATGAGTGTGGACGCCTATCTGGCTGTGGTG
C1600	CACCACAGCCAGATAGGCGTCCCACTCATGACG
C1601	CGCGCTAGCCACCATGGCCACTGTTACCTATCCTTCATC
C1602	GCGAAGCTTTGGCGACCGGTGGATCCCCG
C1603	CTATCTGCTCAACATCGTCAATGTG
C1628	CAGGTTAGCCTTTAAGCCTGCCC
C1629	CGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAAATCC
C1630	GCCTCTCCTGAAAAGGGTATAAACG
C1631	ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGC
C1720	GGAACACATCCGCTGGCGCCAGCCTGACAGGC
C1721	GGCTGGCGCCAGCGGATGTGTTCCCCAGGG
C1749	CGCTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
C1750	GCGCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
C1751	CGGATCGGCAAGGTGGCCATCAAGAACAACC
C1752	GGTTGTTCTTGATGGCCACCTTGCCGATCCG
C2027	CGCTCTAGACCACCATGAGCAGGGACCCCCTGCCC
C2028	GCGGCGCGCCGCTCAGCATCAAGGCTGCAGCAG
C2504	CGCTCGAGTTAAAGCTTTGAGATCGTGTCTGAGCATCAC
C2505	CGGGCGCGCCAATGTTTCAGTCTGATGGCCAACCTGC

Primer	5' - 3' Sequenz
C2506	CGGCGCGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
C2507	CGCAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
C2508	GCGCTAGCGGATCCACCATGGTGAGCAAGGGCGA
C2509	GCGCTCGAGCCACCATGTTTCAGTCTGATGGCCAAGTGC

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung optogenetischer Werkzeuge.	16
Abbildung 2: Mechanismus der Photoaktivierung in BLUF-Domänen.....	17
Abbildung 3: Sensorische Funktionen primärer Zilien.	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines FRET-Biosensors für cAMP.....	53
Abbildung 5: Nachweis lichtinduzierter cAMP-Synthese über den CNGA2-TM-Ionenkanal.	58
Abbildung 6: Lichtinduzierte Ca ²⁺ -Signale verschiedener Klone der Zelllinie HEK-TM-bPAC.	59
Abbildung 7: Western Blot-Analyse der stabilen Zelllinie HEK-TM-bPAC.	59
Abbildung 8: Ca ²⁺ -Signale in HEK-TM und HEK-TM-bPAC-Zellen bei Stimulation mit NKH477.	60
Abbildung 9: Lichtinduzierte Ca ²⁺ -Signale in der Zelllinie HEK-TM-bPAC.	61
Abbildung 10: Dosisabhängigkeit und Basalaktivität der bPAC.	62
Abbildung 11: Messungen von [Ca ²⁺] _i am cell [^] R-Imagingsystem.	63
Abbildung 12: Messungen zur Dosisabhängigkeit von bPAC auf Einzelzellebene.	63
Abbildung 13: Expression von bPAC-mCherry in neuronalen Primärzellen über den CMV-Promotor.	64
Abbildung 14: Expression von bPAC-mCherry in neuronalen Primärzellen über den Syn-Promotor.	65
Abbildung 15: Kolokalisation von bPAC mit neuronalen Markern.	66
Abbildung 16: Koexpression von CNGA2-TM und bPAC in neuronalen Primärzellen.	67
Abbildung 17: Kontrollmessungen zur Funktion von CNGA2-TM in HEK-Zellen und hippocampalen Neuronen.....	67
Abbildung 18: Fluoreszenzspektren von mOrange2, mCherry und mCNBD-FRETred.	69
Abbildung 19: Klonierung des mCNBD-FRETred-Biosensors.....	70
Abbildung 20: Analyse der intrazellulären cAMP-Konzentration mit mCNBD-FRETred....	71
Abbildung 21: Induktion primärer Zilien in MDCK-Zellen.	72

Abbildung 22: Vergleich verschiedener Fusionskonstrukte in MDCK-Zellen.....	73
Abbildung 23: Lokalisation von SSTR3-Fusionskonstrukten in IMCD-3 Zellen.	74
Abbildung 24: ACIII als ziliärer Marker in neuronalen Primärzellen.	75
Abbildung 25: Lokalisation von SSTR3-Fusionskonstrukten in neuronalen Primärzellen.	75
Abbildung 26: Generation und Genotypisierung der transgenen Mauslinie Prot1-bPAC.....	76
Abbildung 27: Expression von bPAC-HA in verschiedenen Founder-Linien.....	77
Abbildung 28: Spermispezifische Expression von bPAC-HA.....	78
Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von bPAC-HA in Hodenschnitten.	79
Abbildung 30: Bestimmung der lichtaktivierten cAMP-Synthese.....	80
Abbildung 31: Änderung der flagellaren Schlagfrequenz durch Belichtung.....	81
Abbildung 32: Basaler cAMP-Gehalt und basale Schlagfrequenz von Prot1-bPAC Spermien.	82
Abbildung 33: Vergleich von cAMP-abhängigen Signalwegen in Wildtyp- und Prot1-bPAC-Spermien.....	83
Abbildung 34: Durch cAMP-Analoga induzierte Ca ²⁺ -Signale in Mausspermien.	84
Abbildung 35: cNMP-Analoga induzieren keine Ca ²⁺ -Signale in CatSper- <i>knockout</i> -Mausspermien.	85
Abbildung 36: Aktivierung von bPAC ersetzt SACY in der Spermienfunktion.	86
Abbildung 37: Genotypisierung der doppelt-transgenen Mauslinie sNHE-KO/bPAC.	87
Abbildung 38: Lichtabhängige Wiederherstellung der Motilität und Fertilität von sNHE-KO/bPAC-Spermien.....	88
Abbildung 39: cAMP-abhängige Regulation des Shh-Signalwegs.....	95

6. Literaturverzeichnis

Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* **450**: 420-424

Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K (2009) Temporally precise *in vivo* control of intracellular signalling. *Nature* **458**: 1025-1029

Alberts B (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th edn. New York: Garland Science.

Anderson S, Dragnea V, Masuda S, Ybe J, Moffat K, Bauer C (2005) Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **44**: 7998-8005

Aoki F, Sakai S, Kohmoto K (1999) Regulation of flagellar bending by cAMP and Ca²⁺ in hamster sperm. *Mol Reprod Dev* **53**: 77-83

Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng G (2007) *In vivo* light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* **54**: 205-218

Austin CR (1952) The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* **170**: 326

Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, Tsien RY (1993) Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* **260**: 222-226

Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006) The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 125-148

Bamberg E, Hegemann P, Oesterhelt D (1984) Reconstitution of halorhodopsin in black lipid membranes. *Prog Clin Biol Res* **164**: 73-79

Banaszynski LA, Chen LC, Maynard-Smith LA, Ooi AG, Wandless TJ (2006) A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell* **126**: 995-1004

Banke TG, Bowie D, Lee H, Huganir RL, Schousboe A, Traynelis SF (2000) Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* **20**: 89-102

Barzi M, Berenguer J, Menendez A, Alvarez-Rodriguez R, Pons S (2010) Sonic-hedgehog-mediated proliferation requires the localization of PKA to the cilium base. *J Cell Sci* **123**: 62-69

Berberi NF, Johnson AD, Lewis JS, Askwith CC, Mykytyn K (2008) Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell* **19**: 1540-1547

- Berthold P, Tsunoda SP, Ernst OP, Mages W, Gradmann D, Hegemann P (2008) Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in chlamydomonas by immediate light-induced depolarization. *Plant Cell* **20**: 1665-1677
- Biel M, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle G, Fauser S, Zrenner E, Hofmann F (1999) Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7553-7557
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Bishop GA, Berbari NF, Lewis J, Mykytyn K (2007) Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *J Comp Neurol* **505**: 562-571
- Bloodgood RA (2009) Chapter 1 - From Central to Rudimentary to Primary: The History of an Underappreciated Organelle Whose Time Has Come. The Primary Cilium. In *Methods in Cell Biology*, Roger DS (ed), Vol. Volume 94, pp 2-52. Academic Press
- Bonetti C, Stierl M, Mathes T, van Stokkum IH, Mullen KM, Cohen-Stuart TA, van Grondelle R, Hegemann P, Kennis JT (2009) The role of key amino acids in the photoactivation pathway of the Synechocystis Slr1694 BLUF domain. *Biochemistry* **48**: 11458-11469
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* **8**: 1263-1268
- Brailov I, Bancila M, Brisorgueil MJ, Miquel MC, Hamon M, Verge D (2000) Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res* **872**: 271-275
- Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krähling M, Müller A, Kaupp UB, Strücker T (2012) The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *The EMBO Journal* **31**: 1654-1665
- Brunelli M, Castellucci V, Kandel ER (1976) Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science* **194**: 1178-1181
- Brunet LJ, Gold GH, Ngai J (1996) General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* **17**: 681-693
- Bucher D, Buchner E (2009) Stimulating PACalpha increases miniature excitatory junction potential frequency at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurogenet* **23**: 220-224
- Buck J, Levin LR (2011) Physiological sensing of carbon dioxide/bicarbonate/pH via cyclic nucleotide signaling. *Sensors (Basel)* **11**: 2112-2128
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 79-84

- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987) XL1-Blue - a High-Efficiency Plasmid Transforming recA *Escherichia coli* strain with Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* **5**: 376-&
- Buxton IL, Brunton LL (1983) Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem* **258**: 10233-10239
- Cardin JA, Carlen M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI (2010) Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons in vivo using cell-type-specific expression of Channelrhodopsin-2. *Nat Protoc* **5**: 247-254
- Carlson AE, Hille B, Babcock DF (2007) External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Developmental biology* **312**: 183-192
- Cedar H, Kandel ER, Schwartz JH (1972) Cyclic adenosine monophosphate in the nervous system of *Aplysia californica*. I. Increased synthesis in response to synaptic stimulation. *J Gen Physiol* **60**: 558-569
- Cedar H, Schwartz JH (1972) Cyclic adenosine monophosphate in the nervous system of *Aplysia californica*. II. Effect of serotonin and dopamine. *J Gen Physiol* **60**: 570-587
- Cevik S, Hori Y, Kaplan OI, Kida K, Toivenon T, Foley-Fisher C, Cottell D, Katada T, Kontani K, Blacque OE (2010) Joubert syndrome Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes protein transport in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **188**: 953-969
- Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**: 697-698
- Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J (2000) Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **289**: 625-628
- Chern Y (2000) Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system. *Cell Signal* **12**: 195-204
- Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF (1994) Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11728-11732
- Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF (2005) Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**: 1018-1021
- Craige B, Tsao CC, Diener DR, Hou Y, Lehtreck KF, Rosenbaum JL, Witman GB (2010) CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *J Cell Biol* **190**: 927-940
- Crosson S, Rajagopal S, Moffat K (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**: 2-10
- Crump FT, Dillman KS, Craig AM (2001) cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *J Neurosci* **21**: 5079-5088

- Cukkemane A, Nand D, Gradmann S, Weingarth M, Kaupp UB, Baldus M (2012) Solid-state NMR [¹³C,¹⁵N] resonance assignments of the nucleotide-binding domain of a bacterial cyclic nucleotide-gated channel. *Biomol NMR Assign* **6**: 225-229
- Czarnecki PG, Shah JV (2012) The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. *Trends Cell Biol* **22**: 201-210
- Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F (2003) Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* **61**: 7-17
- Dash PK, Hochner B, Kandel ER (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* **345**: 718-721
- De Jonge CJ, Han HL, Lawrie H, Mack SR, Zaneveld LJ (1991) Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J Exp Zool* **258**: 113-125
- de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM (2003) Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* **68**: 2122-2134
- DeCaen PG, Delling M, Vien TN, Clapham DE (2013) Direct recording and molecular identification of the calcium channel of primary cilia. *Nature* **504**: 315-318
- Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nat Methods* **8**: 26-29
- Delling M, DeCaen PG, Doerner JF, Febvay S, Clapham DE (2013) Primary cilia are specialized calcium signalling organelles. *Nature* **504**: 311-314
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE (2003) Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* **278**: 7001-7009
- Demarsy E, Fankhauser C (2009) Higher plants use LOV to perceive blue light. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 69-74
- Dishinger JF, Kee HL, Jenkins PM, Fan S, Hurd TW, Hammond JW, Truong YN, Margolis B, Martens JR, Verhey KJ (2010) Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-β₂ and RanGTP. *Nat Cell Biol* **12**: 703-710
- Domire JS, Green JA, Lee KG, Johnson AD, Askwith CC, Mykytyn K (2011) Dopamine receptor 1 localizes to neuronal cilia in a dynamic process that requires the Bardet-Biedl syndrome proteins. *Cell Mol Life Sci* **68**: 2951-2960
- Domratcheva T, Grigorenko BL, Schlichting I, Nemukhin AV (2008) Molecular models predict light-induced glutamine tautomerization in BLUF photoreceptors. *Biophys J* **94**: 3872-3879
- Donaldson JG, Jackson CL (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 362-375

- Duldulao NA, Lee S, Sun Z (2009) Cilia localization is essential for *in vivo* functions of the Joubert syndrome protein Arl13b/Scorpion. *Development* **136**: 4033-4042
- Efetova M, Petereit L, Rosiewicz K, Overend G, Haussig F, Hovemann BT, Cabrero P, Dow JA, Schwarzel M (2013) Separate roles of PKA and EPAC in renal function unraveled by the optogenetic control of cAMP levels in vivo. *J Cell Sci* **126**: 778-788
- Einstein EB, Patterson CA, Hon BJ, Regan KA, Reddi J, Melnikoff DE, Mateer MJ, Schulz S, Johnson BN, Tallent MK (2010) Somatostatin signaling in neuronal cilia is critical for object recognition memory. *J Neurosci* **30**: 4306-4314
- Ekstedt E, Holm L, Ridderstrale Y (2004) Carbonic anhydrase in mouse testis and epididymis; transfer of isozyme IV to spermatozoa during passage. *J Mol Histol* **35**: 167-173
- Epstein DJ, Marti E, Scott MP, McMahan AP (1996) Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway. *Development* **122**: 2885-2894
- Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M, Gossen JA (2004) Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2993-2998
- Fechner S (2012) Charakterisierung K⁺-selektiver zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle aus *Danio rerio* und *Branchiostoma floridae*. Dr. rer. nat. Thesis, Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Forschungszentrum Caesar, Abt. Molekulare Neurosensorik
- Feng L, Subbaraya I, Yamamoto N, Baehr W, Kraus-Friedmann N (1996) Expression of photoreceptor cyclic nucleotide-gated cation channel alpha subunit (CNGCalpha) in the liver and skeletal muscle. *FEBS Lett* **395**: 77-81
- Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**: 475-483
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA (2008) Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol* **52**: 503-510
- Follit JA, Li L, Vucica Y, Pazour GJ (2010) The cytoplasmic tail of fibrocystin contains a ciliary targeting sequence. *J Cell Biol* **188**: 21-28
- Gadella BM, Harrison RA (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* **127**: 2407-2420
- Gasser C, Taiber S, Yeh CM, Wittig CH, Hegemann P, Ryu S, Wunder F, Moglich A (2014) Engineering of a red-light-activated human cAMP/cGMP-specific phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 8803-8808

- Gauden M, van Stokkum IH, Key JM, Luhrs D, van Grondelle R, Hegemann P, Kennis JT (2006) Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10895-10900
- Gauden M, Yeremenko S, Laan W, van Stokkum IH, Ihalainen JA, van Grondelle R, Hellingwerf KJ, Kennis JT (2005) Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry* **44**: 3653-3662
- Goedhart J, Vermeer JE, Adjobo-Hermans MJ, van Weeren L, Gadella TW, Jr. (2007) Sensitive detection of p65 homodimers using red-shifted and fluorescent protein-based FRET couples. *PLoS One* **2**: e1011
- Goetz SC, Anderson KV (2010) The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* **11**: 331-344
- Gomelsky M, Klug G (2002) BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci* **27**: 497-500
- Gradinaru V, Thompson KR, Zhang F, Mogri M, Kay K, Schneider MB, Deisseroth K (2007) Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J Neurosci* **27**: 14231-14238
- Gunaydin LA, Yizhar O, Berndt A, Sohal VS, Deisseroth K, Hegemann P (2010) Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci* **13**: 387-392
- Händel M, Schulz S, Stanarius A, Schreff M, Erdtmann-Vourliotis M, Schmidt H, Wolf G, Hollt V (1999) Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience* **89**: 909-926
- Harrison RA (2004) Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev* **67**: 337-352
- Hartmann A, Arroyo-Olarte RD, Inkeller K, Hegemann P, Lucius R, Gupta N (2013) Optogenetic modulation of an adenylate cyclase in *Toxoplasma gondii* demonstrates a requirement of the parasite cAMP for host-cell invasion and stage differentiation. *J Biol Chem* **288**: 13705-13717
- Hasegawa K, Masuda S, Ono TA (2004) Structural intermediate in the photocycle of a BLUF (sensor of blue light using FAD) protein Slr1694 in a *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochemistry* **43**: 14979-14986
- Hayes JS, Bowling N, King KL, Boder GB (1982) Evidence for selective regulation of the phosphorylation of myocyte proteins by isoproterenol and prostaglandin E1. *Biochim Biophys Acta* **714**: 136-142
- Hegemann P, Sigrist S (2013) *Optogenetics*: de Gruyter.
- Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S (2006) Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* **125**: 33-45

- Hoyer D, Lubbert H, Bruns C (1994) Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **350**: 441-453
- Hu Q, Milenkovic L, Jin H, Scott MP, Nachury MV, Spiliotis ET, Nelson WJ (2010) A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* **329**: 436-439
- Insinna C, Besharse JC (2008) Intraflagellar transport and the sensory outer segment of vertebrate photoreceptors. *Dev Dyn* **237**: 1982-1992
- Iseki M, Matsunaga S, Murakami A, Ohno K, Shiga K, Yoshida K, Sugai M, Takahashi T, Hori T, Watanabe M (2002) A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* **415**: 1047-1051
- Ittner LM, Götz J (2007) Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nat Protoc* **2**: 1206-1215
- Iyengar R, Birnbaumer L (1990) *G proteins*, San Diego: Academic Press.
- Jaiswal BS, Conti M (2003) Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10676-10681
- Jenkins PM, Hurd TW, Zhang L, McEwen DP, Brown RL, Margolis B, Verhey KJ, Martens JR (2006) Ciliary targeting of olfactory CNG channels requires the CNGB1b subunit and the kinesin-2 motor protein, KIF17. *Curr Biol* **16**: 1211-1216
- Jenkins PM, McEwen DP, Martens JR (2009) Olfactory cilia: linking sensory cilia function and human disease. *Chem Senses* **34**: 451-464
- Johnson JL, Leroux MR (2010) cAMP and cGMP signaling: sensory systems with prokaryotic roots adopted by eukaryotic cilia. *Trends Cell Biol* **20**: 435-444
- Jones C, Roper VC, Foucher I, Qian D, Banizs B, Petit C, Yoder BK, Chen P (2008) Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat Genet* **40**: 69-77
- Jurevicius J, Fischmeister R (1996) cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca²⁺ channels by β -adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 295-299
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**: 499-509
- Kamp TJ, Hell JW (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* **87**: 1095-1102
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**: 1030-1038
- Kaneko M, Takahashi T (2004) Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *J Neurosci* **24**: 5202-5208

- Karasawa S, Araki T, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A (2004) Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem J* **381**: 307-312
- Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, Hegemann P, Maturana AD, Ishitani R, Deisseroth K, Nureki O (2012) Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* **482**: 369-374
- Kaupp UB, Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* **82**: 769-824
- Kee HL, Dishinger JF, Blasius TL, Liu CJ, Margolis B, Verhey KJ (2012) A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia. *Nat Cell Biol* **14**: 431-437
- Khrenova MG, Domratcheva T, Schlichting I, Grigorenko BL, Nemukhin AV (2011) Computational characterization of reaction intermediates in the photocycle of the sensory domain of the AppA blue light photoreceptor. *Photochem Photobiol* **87**: 564-573
- Kianianmomeni A, Stehfest K, Nematollahi G, Hegemann P, Hallmann A (2009) Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer. *Plant Physiol* **151**: 347-366
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE (2006) Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature* **439**: 737-740
- Klein M, Kandel ER (1980) Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 6912-6916
- Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempski RE, Fotis H, Wood PG, Bamann C, Bamberg E (2011) Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca^{2+} -permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci* **14**: 513-518
- Kobori H, Miyazaki S, Kuwabara Y (2000) Characterization of intracellular Ca^{2+} increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* **63**: 113-120
- Kozak M (1984) Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acids Res* **12**: 3873-3893
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* **466**: 622-626
- Kusch J, Biskup C, Thon S, Schulz E, Nache V, Zimmer T, Schwede F, Benndorf K (2010) Interdependence of receptor activation and ligand binding in HCN2 pacemaker channels. *Neuron* **67**: 75-85

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Larkins CE, Aviles GD, East MP, Kahn RA, Caspary T (2011) Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins. *Mol Biol Cell* **22**: 4694-4703
- Lepage T, Cohen SM, Diaz-Benjumea FJ, Parkhurst SM (1995) Signal transduction by cAMP-dependent protein kinase A in Drosophila limb patterning. *Nature* **373**: 711-715
- Liao D, Scannevin RH, Huganir R (2001) Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors. *J Neurosci* **21**: 6008-6017
- Lin YC, Niewiadomski P, Lin B, Nakamura H, Phua SC, Jiao J, Levchenko A, Inoue T, Rohatgi R, Inoue T (2013) Chemically inducible diffusion trap at cilia reveals molecular sieve-like barrier. *Nat Chem Biol* **9**: 437-443
- Lórenz-Fonfria VA, Heberle J (2014) Channelrhodopsin unchained: structure and mechanism of a light-gated cation channel. *Biochim Biophys Acta* **1837**: 626-642
- Ma L, Zablow L, Kandel ER, Siegelbaum SA (1999) Cyclic AMP induces functional presynaptic boutons in hippocampal CA3-CA1 neuronal cultures. *Nat Neurosci* **2**: 24-30
- Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162
- Masuda S, Hasegawa K, Ishii A, Ono TA (2004) Light-induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of synechocystis sp. PCC6803. *Biochemistry* **43**: 5304-5313
- Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman GJ, Iwaki Y, Colosi P (1998) Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* **5**: 938-945
- McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M (2003) Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* **114**: 61-73
- Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK (1990) Characteristics of the cAMP response unit. *Metabolism* **39**: 6-12
- Morinobu S, Fujimaki K, Okuyama N, Takahashi M, Duman RS (1999) Stimulation of adenylyl cyclase and induction of brain-derived neurotrophic factor and TrkB mRNA by NKH477, a novel and potent forskolin derivative. *J Neurochem* **72**: 2198-2205
- Mukhopadhyay S, Wen X, Ratti N, Loktev A, Rangell L, Scales SJ, Jackson PK (2013) The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell* **152**: 210-223
- Müller V, Oren A (2003) Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles* **7**: 261-266

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273
- Nachury MV, Seeley ES, Jin H (2010) Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 59-87
- Nagahama T, Suzuki T, Yoshikawa S, Iseki M (2007) Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into *Aplysia* sensory neurons. *Neurosci Res* **59**: 81-88
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**: 2395-2398
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13940-13945
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **19**: 137-141
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J (2003) Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* **33**: 129-137
- Nguyen PV, Woo NH (2003) Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol* **71**: 401-437
- Niewiadomski P, Kong JH, Ahrends R, Ma Y, Humke EW, Khan S, Teruel MN, Novitsch BG, Rohatgi R (2014) Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell Rep* **6**: 168-181
- Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**: 37215-37218
- Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S (2006) Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching β 1-adrenergic but locally confined β 2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* **99**: 1084-1091
- Nolan MA, Babcock DF, Wennemuth G, Brown W, Burton KA, McKnight GS (2004) Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit C α 2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13483-13488
- Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**: 829-837
- Ntefidou M, Iseki M, Watanabe M, Lebert M, Hader DP (2003) Photoactivated adenylyl cyclase controls phototaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. *Plant Physiol* **133**: 1517-1521
- Oesterhelt D, Stoeckenius W (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol* **233**: 149-152

- Oesterhelt D, Stoeckenius W (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 2853-2857
- Oh EC, Katsanis N (2012) Cilia in vertebrate development and disease. *Development* **139**: 443-448
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* **273**: 5419-5422
- Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y (1985) Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* **260**: 9699-9705
- Ostrom RS, Gregorian C, Drenan RM, Xiang Y, Regan JW, Insel PA (2001) Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **276**: 42063-42069
- Ouyang M, Huang H, Shaner NC, Remacle AG, Shiryaev SA, Strongin AY, Tsien RY, Wang Y (2010) Simultaneous visualization of protumorigenic Src and MT1-MMP activities with fluorescence resonance energy transfer. *Cancer Res* **70**: 2204-2212
- Pal K, Mukhopadhyay S (2014) Primary cilium and sonic hedgehog signaling during neural tube patterning: Role of GPCRs and second messengers. *Dev Neurobiol*
- Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB (1994) All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **198**: 605-612
- Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL, Witman GB (2002) Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol* **12**: R378-380
- Peverelli E, Lania AG, Mantovani G, Beck-Peccoz P, Spada A (2009) Characterization of intracellular signaling mediated by human somatostatin receptor 5: role of the DRY motif and the third intracellular loop. *Endocrinology* **150**: 3169-3176
- Plotnikova OV, Golemis EA, Pugacheva EN (2008) Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Res* **68**: 2058-2061
- Praetorius HA, Spring KR (2001) Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* **184**: 71-79
- Praetorius HA, Spring KR (2003) The renal cell primary cilium functions as a flow sensor. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**: 517-520
- Purves D (2008) *Neuroscience*, 4th edn. Sunderland, Mass.: Sinauer.

- Raffelberg S, Wang L, Gao S, Losi A, Gartner W, Nagel G (2013) A LOV-domain-mediated blue-light-activated adenylate (adenylyl) cyclase from the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420. *Biochem J* **455**: 359-365
- Rauchman MI, Nigam SK, Delpire E, Gullans SR (1993) An osmotically tolerant inner medullary collecting duct cell line from an SV40 transgenic mouse. *Am J Physiol* **265**: F416-424
- Ren DJ, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu SF, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**: 603-609
- Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW (2000) Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol* **116**: 147-161
- Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J, Karpen JW (2001) In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* **118**: 63-78
- Richmond JE, Jorgensen EM (1999) One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci* **2**: 791-797
- Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**: 372-376
- Rosenmund C, Carr DW, Bergeson SE, Nilaver G, Scott JD, Westbrook GL (1994) Anchoring of protein kinase A is required for modulation of AMPA/kainate receptors on hippocampal neurons. *Nature* **368**: 853-856
- Rovati GE, Capra V, Neubig RR (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* **71**: 959-964
- Ryu MH, Moskvina OV, Siltberg-Liberles J, Gomelsky M (2010) Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications. *J Biol Chem* **285**: 41501-41508
- Satir P, Christensen ST (2007) Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* **69**: 377-400
- Schobert B, Lanyi JK (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J Biol Chem* **257**: 10306-10313
- Schoenenberger P, Gerosa D, Oertner TG (2009) Temporal control of immediate early gene induction by light. *PLoS One* **4**: e8185
- Schröder-Lang S, Schwärzel M, Seifert R, Strünker T, Kateriya S, Looser J, Watanabe M, Kaupp UB, Hegemann P, Nagel G (2007) Fast manipulation of cellular cAMP level by light *in vivo*. *Nat Methods* **4**: 39-42

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**: 1567-1572

Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* **5**: 545-551

Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**: 905-909

Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, Flask CA, Novick AC, Goldfarb DA, Kramer-Zucker A, Walz G, Piontek KB, Germino GG, Weimbs T (2006) The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5466-5471

Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD (1988) Lambda-Zap - a Bacteriophage Lambda-Expression Vector with *in vivo* Excision Properties. *Nucleic Acids Res* **16**: 7583-7600

Singla V, Reiter JF (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* **313**: 629-633

Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* **459**: 698-702

Stevens RC, Cherezov V, Katritch V, Abagyan R, Kuhn P, Rosen H, Wuthrich K (2013) The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 25-34

Stierl M, Penzkofer A, Kennis JT, Hegemann P, Mathes T (2014) Key Residues for the Light Regulation of the Blue Light-Activated Adenylyl Cyclase from *Beggiatoa* sp. *Biochemistry* **53**: 5121-5130

Stierl M, Stumpf P, Udvari D, Gueta R, Hagedorn R, Losi A, Gartner W, Petereit L, Efetova M, Schwarzel M, Oertner TG, Nagel G, Hegemann P (2011) Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. *J Biol Chem* **286**: 1181-1188

Suarez SS (2008) Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* **14**: 647-657

Sung MT, Dixon GH (1970) Modification of histones during spermiogenesis in trout: a molecular mechanism for altering histone binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**: 1616-1623

Theurkauf WE, Vallee RB (1982) Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *J Biol Chem* **257**: 3284-3290

Tobin JL, Beales PL (2009) The nonmotile ciliopathies. *Genet Med* **11**: 386-402

- Toh KC, van Stokkum IH, Hendriks J, Alexandre MT, Arents JC, Perez MA, van Grondelle R, Hellingwerf KJ, Kennis JT (2008) On the signaling mechanism and the absence of photoreversibility in the AppA BLUF domain. *Biophys J* **95**: 312-321
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354
- Toyoda Y, Chang MC (1974) Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs *in vitro*. *J Reprod Fertil* **36**: 125-134
- Trudeau LE, Fang Y, Haydon PG (1998) Modulation of an early step in the secretory machinery in hippocampal nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7163-7168
- Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de Lecea L, Deisseroth K (2009) Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* **324**: 1080-1084
- Tucker RW, Pardee AB, Fujiwara K (1979) Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* **17**: 527-535
- Tuson M, He M, Anderson KV (2011) Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development* **138**: 4921-4930
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**: 1129-1137
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**: 1139-1150
- Wang D, Hu J, Bobulescu IA, Quill Ta, McLeroy P, Moe OW, Garbers DL (2007) A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and *in vivo* bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9325-9330
- Wang D, King SM, Quill Ta, Doolittle LK, Garbers DL (2003) A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* **5**: 1117-1122
- Wang Z, Phan T, Storm DR (2011) The type 3 adenylyl cyclase is required for novel object learning and extinction of contextual memory: role of cAMP signaling in primary cilia. *J Neurosci* **31**: 5557-5561
- Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashtiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE, Harris PC (2003) Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* **12**: 2703-2710

- Weissenberger S, Schultheis C, Liewald JF, Erbguth K, Nagel G, Gottschalk A (2011) PAC α - an optogenetic tool for *in vivo* manipulation of cellular cAMP levels, neurotransmitter release, and behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* **116**: 616-625
- Weitzman MD, Linden RM (2011) Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol* **807**: 1-23
- Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF (2003) Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation. *Development* **130**: 1317-1326
- Wertheimer E, Krapf D, de la Vega-Beltran JL, Sanchez-Cardenas C, Navarrete F, Haddad D, Escoffier J, Salicioni AM, Levin LR, Buck J, Mager J, Darszon A, Visconti PE (2013) Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J Biol Chem* **288**: 35307-35320
- Weyand I, Godde M, Frings S, Weiner J, Muller F, Altenhofen W, Hatt H, Kaupp UB (1994) Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**: 859-863
- Wheatley DN, Wang AM, Strugnell GE (1996) Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol Int* **20**: 73-81
- Wietek J, Wiegert JS, Adeishvili N, Schneider F, Watanabe H, Tsunoda SP, Vogt A, Elstner M, Oertner TG, Hegemann P (2014) Conversion of channelrhodopsin into a light-gated chloride channel. *Science* **344**: 409-412
- Willoughby D, Cooper DM (2007) Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* **87**: 965-1010
- Wong W, Scott JD (2004) AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 959-970
- Wu Z, Yang H, Colosi P (2010) Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther* **18**: 80-86
- Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, Gossen JA, Esposito G, van Duin M, Conti M (2006) Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol* **296**: 353-362
- Xu WM, Shi QX, Chen WY, Zhou CX, Ni Y, Rowlands DK, Yi Liu G, Zhu H, Ma ZG, Wang XF, Chen ZH, Zhou SC, Dong HS, Zhang XH, Chung YW, Yuan YY, Yang WX, Chan HC (2007) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9816-9821
- Yao L, Sakaba T (2010) cAMP modulates intracellular Ca²⁺ sensitivity of fast-releasing synaptic vesicles at the calyx of Held synapse. *J Neurophysiol* **104**: 3250-3260
- Yasukawa H, Sato A, Kita A, Kodaira K, Iseki M, Takahashi T, Shibusawa M, Watanabe M, Yagita K (2013) Identification of photoactivated adenylyl cyclases in *Naegleria australiensis* and BLUF-containing protein in *Naegleria fowleri*. *J Gen Appl Microbiol* **59**: 361-369

Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T (1994) Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* **79**: 49-58

Zaccolo M, Pozzan T (2002) Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* **295**: 1711-1715

Zambrowicz BP, Harendza CJ, Zimmermann JW, Brinster RL, Palmiter RD (1993) Analysis of the mouse protamine 1 promoter in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5071-5075

Zemelman BV, Lee GA, Ng M, Miesenbock G (2002) Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* **33**: 15-22

Zimmermann KW (1898) Beiträge zur Kenntniss einiger Drüsen und Epithelien. *Arch Mikrosk Entwickl Mech* **52**: 552-706

Zirak P, Penzkofer A, Schiereis T, Hegemann P, Jung A, Schlichting I (2006) Photodynamics of the small BLUF protein BlrB from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Photochem Photobiol B* **83**: 180-194

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**: 355-405

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Molekulare Neurosensorik am Forschungszentrum casear in Bonn angefertigt. Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

- Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas und seine stetige Diskussionsbereitschaft,
- Dr. Dagmar Wachten für die Initiative zur Entwicklung des Mausmodells, für ihre Geduld und für die Unterstützung bei allen Fragen nicht nur wissenschaftlicher Art,
- Dr. Reinhard Seifert für die wissenschaftliche Betreuung, seine hilfreichen Diskussionen und Ratschläge, sowie für seine Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit,
- Prof. Dr. Waldemar Kolanus für die Übernahme des Zweitgutachtens,
- Prof. Dr. Frank Bradke und Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck für ihre Beteiligung an der Prüfungskommission,
- Prof. Dr. Heinz Beck für seine unterstützenden Ratschläge im Doktorandenkommittee,
- Dr. Luis Alvarez für seine Unterstützung mit dem Imaging und seine Unermüdlichkeit bei der Verbesserung der Analysesoftware,
- Dr. Wolfgang Bönigk für seine Hilfe bei molekularbiologischen Arbeiten,
- allen technischen Assistenten und Auszubildenden, insbesondere Heike Angele, Jens-Henning Krause, Jessica Hierer und Stefanie Sonnenburg für ihre Hilfe bei der Zellkultur und Laborarbeiten. Besonders danken möchte ich Isabel Lux und Dana Herborn für ihre hervorragende technische Assistenz und ihre Geduld und Zuverlässigkeit bei der Organisation der Tierhaltung.
- Heike Krause für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Dingen, ihre herzliche Art und für ihre Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen,
- meinen Bürokollegen Dr. Sylvia Fechner und Dr. Christoph Brenker: Danke, dass ihr mich so nett aufgenommen habt und danke für die tolle Zeit!
- allen anderen Doktoranden und Kollegen für den Zusammenhalt. Besonderer Dank gilt David (fitz!) und Meggie - ohne euch hätte ich es nicht geschafft! Vielen Dank auch an

meine Freunde und Kollegen Rebecca, Diana, Astrid, Annukka, Florian, Shatanik, Fabio, Monika, Jan, Holger und Sebastian, mit euch hat die Zeit bei caesar viel Spaß gemacht!

- Daniela Szente für ihre wertvolle und aufrichtige Freundschaft. Danke, dass du immer für mich da bist. *„Friendship isn't about whom you have known the longest. It's about who came, and never left your side.“*

Ich danke auch meiner Familie, die mich bei allem unterstützt und immer wieder aufgebaut hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Hannes. Ich bin sehr froh, dich an meiner Seite zu haben.
Danke für deinen Rückhalt.