



Institut für Neurowissenschaften und Biophysik
Zelluläre Biophysik (INB-1)

***Bindungsstudien an einem bakteriellen zyklisch
Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal***

Bärbel Grüter

***Bindungsstudien an einem bakteriellen zyklisch
Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal***

Bärbel Grüter

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4240
ISSN 0944-2952
Institut für Neurowissenschaften und Biophysik
Zelluläre Biophysik (INB-1)
D 38 (Diss., Köln, Univ., 2006)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung

Ionenkanäle kontrollieren den Ionenfluss über Zellmembranen. Sie sind für viele biologische Prozesse von entscheidender Bedeutung. Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle) sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, deren Öffnungsverhalten durch cAMP bzw. cGMP reguliert wird. Während die physiologische Funktion dieser Kanäle weitgehend untersucht ist, ist nur wenig über ihren molekularen Öffnungsmechanismus bekannt. Homologe, bakterielle Kanäle bieten eine neue Grundlage zur Erforschung dieses Schaltmechanismus, da sie in großen Mengen in Bakterien exprimiert werden können. Sie eignen sich daher besonders gut für biochemische Untersuchungen.

In dieser Arbeit wurden biochemische und biophysikalische Untersuchungen an einem zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal (MICNG) aus dem Bakterium *Mesorhizobium loti* (*M. loti*) durchgeführt. Die Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD) dieses Kanals wurde in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und für quantitative Bindungsmessungen in einer cAMP-freien Form gereinigt. Ich konnte die Bindungsaffinitäten für cAMP, cGMP sowie für einige 8-substituierte Analoga mit der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) und alternativ, mit einem Fluoreszenzassay bestimmen. Die Bindungsaffinitäten für cAMP und cGMP liegen im submikromolaren Bereich, wobei cAMP mit einer ca. fünffach höheren Affinität an die CNBD bindet als cGMP.

Das MICNG-Protein wurde ebenfalls in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Das oligomere Laufverhalten des MICNG-Proteins wurde mit dem des KcsA-Kanals aus *Streptomyces lividans* verglichen. Die Bindungsaffinität für cAMP wurde mit der ITC, die Affinitäten für weitere zyklische Nukleotide wurden mit dem Fluoreszenzassay bestimmt. Der K_D -Wert für cAMP ist für den gesamten Ionenkanal etwa viermal höher als für die isolierte Bindestelle.

Abstract

Ion channels control the flow of ions across cellular membranes. They play a crucial role in many biological processes. CNG (*cyclic nucleotide-gated*) channels belong to the family of ligand-gated ion channels which are regulated by cAMP and cGMP. While the physiological function of these channels is well examined, only little is known about their molecular mechanism of opening (“gating”). Homologous bacterial ion channels offer a novel basis to explore the “gating”-mechanism, because they can be expressed in high quantities in bacteria and, therefore, are applicable for biochemical studies.

In this work, biochemical and biophysical studies were performed on the cyclic nucleotide-gated ion channel (MICNG) from the bacterium *Mesorhizobium loti* and its isolated cyclic nucleotide-binding domain (CNBD). The CNBD protein was expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) and purified in a cAMP-free form. I determined the binding affinities for cAMP, cGMP and some 8-substituted analogs via isothermal titration calorimetry (ITC) and, alternatively with a fluorescence assay. The binding affinities for cAMP and cGMP are in the submicromolar range. cAMP binds to the CNBD with a five fold higher affinity than cGMP.

The MICNG protein was expressed in *E. coli* as well and purified via affinity chromatography. The oligomeric running behaviour of the MICNG protein was compared with that of the KcsA channel from *Streptomyces lividans*. The binding affinity for cAMP was determined via ITC, the affinities for some other cyclic nucleotides were obtained from the fluorescence assay. The K_D value for cAMP is about four times higher for the full-length channel than for the isolated binding domain.

I Inhaltsverzeichnis

I INHALTSVERZEICHNIS	I
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Spannungsabhängige K ⁺ -, Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Kanäle	1
1.2 Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle.....	2
1.2.1 Ligandenselektivität von CNG-Kanälen	4
1.2.2 Die Verwendung von 8-substituierten zyklisch Nukleosid-Monophosphat (cNMP)-Analoge zur funktionellen Untersuchung von CNG-Kanälen	4
1.3 Der CNG-Kanal aus <i>Mesorhizobium loti</i>	5
1.4 Das Schaltverhalten von Ionenkanälen	6
1.4.1 Schaltverhalten bei CNG-Kanälen	7
1.5 Die Bindestelle für zyklische Nukleotide	7
1.6 Zielsetzung	10
2. MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1 Material.....	11
2.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Zellkultur	12
2.2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmidvektoren	12
2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für <i>E. coli</i>	13
2.2.3 Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen zur Plasmidpräparation.....	13
2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA.....	14
2.3 Präparation von Plasmid-DNA.....	14
2.3.1 Minipräparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)	14
2.4 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren	16
2.4.1 Phenol/Chloroformextraktion.....	16
2.4.2 Ethanolpräzipitation	16
2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	17
2.5.1 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarosegelen.....	17
2.5.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	17
2.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	17
2.6.1 DNA-Größen- und Mengenstandard	18
2.7 Retransformation	18
2.8 Expression rekombinanter Proteine.....	19
2.8.1 Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen zur Expression von Fusionsproteinen.....	19
2.8.2 Fermentation: Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen zur Expression von Fusionsproteinen in größeren Mengen ..	19

2.9 Reinigung rekombinanter Proteine	20
2.9.1 Reinigung der heterolog exprimierten MICNG- und KcsA-Proteine aus <i>E. coli</i>	20
2.9.2 Reinigung der cAMP-freien Form des heterolog exprimierten MICNG-Proteins aus <i>E. coli</i>	22
2.9.3 Reinigung der heterolog exprimierten CNBD aus <i>E. coli</i>	24
2.9.4 Reinigung der cAMP-freien Form der heterolog exprimierten CNBD aus <i>E. coli</i>	25
2.9.5 Größenausschlusschromatographie	26
2.10 Quantifizierung von Proteinen	27
2.10.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)	27
2.10.2 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz	27
2.11 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	28
2.11.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.11.2 Blaue native Polyacrylamidgelelektrophorese („Blue native PAGE“)	28
2.11.3 Protein-Größenstandards	29
2.11.4 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau	30
2.12 Spezifischer Nachweis von Proteinen	31
2.12.1 Transfer und Immobilisierung von Proteinen („Westernblot“)	31
2.12.2 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	31
2.13 Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Proteinen	32
2.13.1 Photometrische Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Proteinen	32
2.13.2 Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Proteinen durch High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)	34
2.14 Optimierung der Pufferbedingungen für das cAMP-freie MICNG-Protein	36
2.15 Bindungsstudien	38
2.15.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	38
2.15.2 Datenanalyse	38
2.15.3 Fluoreszenzassay zur Messung der Bindungsaffinität	40
2.15.3.1 Fluoreszenzoptische Messungen in Multiwellplatten	40
2.15.3.2 Fluoreszenzoptische Messungen an einer Stopped-Flow-Apparatur	42
2.15.3.2.1 Aufbau der Stopped-Flow Apparatur	42
2.15.3.2.2 Aufbau der Anlage für Fluoreszenzmessungen	43
2.15.3.2.3 Durchführung der Fluoreszenzmessungen	44
2.15.3.3 Datenanalyse der Fluoreszenzmessungen	46
2.15.3.3.1 Auswertung der kinetischen Daten	46
2.15.3.3.2 Auswertung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen	46
3. ERGEBNISSE	49
3.1 Biochemische Charakterisierung der Bindestelle für zyklische Nukleotide	49
3.1.1 Expression und Reinigung der Bindestelle	49
3.1.2 Bestimmung von gebundenem cAMP an der CNBD	51
3.1.2.1 Bestimmung der cAMP-Menge durch Umkehrphasen-HPLC	52
3.1.2.2 Spektroskopische Bestimmung der cAMP-Menge	53
3.1.2.3 Ergebnisse der cAMP-Bestimmung mit Hilfe der HPLC und der Spektroskopie	55
3.1.3 Entfernen des cAMP von der Bindestelle	56
3.1.3.1 Denaturierung	57
3.1.3.2 Rückfaltung	57
3.1.4 Charakterisierung der Bindungseigenschaften mit der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC)	58
3.1.4.1 Die CNBD bindet cAMP mit submikromolarer Affinität	59
3.1.4.2 CNBD bindet neben cAMP auch cGMP sowie deren Analoga	61
3.1.4.3 Verhalten der CNBD in Detergenz	64
3.1.5 Messung der Bindungsaffinitäten der CNBD mit einem Fluoreszenzassay	65
3.1.5.1 Bestimmung des K_D -Wertes von 8-NBD-cAMP	65
3.1.5.2 Bestimmung der K_D -Werte von cAMP und cGMP	68

3.2 Charakterisierung des Gesamtkanalproteins MICNG	70
3.2.1 Reinigung des MICNG-Proteins und des KcsA-Kanals aus <i>E. coli</i>	70
3.2.2 Vergleich der multimeren Eigenschaften von MICNG und KcsA	74
3.2.3 cAMP-Menge in der MICNG-Probe	76
3.2.4 Entfernen des gebundenen cAMP von der Ligandenbindestelle des MICNG-Proteins	77
3.2.4.1 Entfernen des cAMP durch extensives Waschen.....	78
3.2.4.1.1 Triton-X 100	78
3.2.4.1.2 Chaps	79
3.2.4.1.3 DM.....	81
3.2.4.2 Entfernen des gebundenen cAMP durch kompetitive Verdrängung.....	82
3.2.4.3 Stabilität des cAMP-freien MICNG-Proteins	84
3.2.5 Bindungsmessungen mit dem MICNG-Protein.....	91
3.2.5.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften des MICNG-Proteins mit der ITC	91
3.2.5.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften des MICNG-Proteins mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie.....	95
3.2.5.2.1 Stöchiometriebestimmung	95
3.2.5.2.2 Konkurrenzexperimente	96
3.2.5.2.3 Kinetik der Bindung von 8-NBD-cAMP an das MICNG-Protein.....	98
 4. DISKUSSION	103
 4.1 Funktionelle Messungen	103
4.2 Bindungsstudien	104
4.3 Thermodynamik der Bindungsreaktion.....	106
4.4 Unterschiede in den K_D -Werten von cAMP und cGMP	108
 5. LITERATURVERZEICHNIS	111
 6. ANHANG	123
6.1 Proteinsequenzen der verwendeten Proteine.....	123
6.1.1 CNBD nach Thrombinverdau.....	123
6.1.2 MICNG.....	123
6.1.3 KcsA.....	124
6.2 Molare Extinktionskoeffizienten einiger zyklischer Nukleotide und der verwendeten Proteine	124

II Abkürzungsverzeichnis

α	Anti-
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
A	Ampere
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin
Bp	Basenpaare
Br-	Bromo-
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	cirka
CaM	Calmodulin
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
CAP	<i>catabolic activator protein</i>
cGMP	Guanosin-3', 5'-zyklisches Monophosphat
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CNBD	<i>cyclic nucleotide-binding domain</i>
CNG-Kanal	zyklisch Nukleotid-gesteuerter (<i>cyclic nucleotid-gated</i>) Ionenkanal
cNMP	zyklisches <u>N</u> ukleotid <u>m</u> onophosphat
CPT-	4-Chlorophenylthio-
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Peptidkette
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DM	Decyl-Maltopyranoside
DDM	Dodecyl-Maltopyranoside
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
EPAC	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm, bzw. Nomal-Fallbeschleunigung (9,81 ms ⁻²)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCN-Kanal	Hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
His	Histidin
HMW	<i>high molecular weight</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hz	Hertz
IP ₃	Inositol-1-4-5-trisphosphat
IPTG	Isopropylthio-β-D-galaktosid
K	Kelvin
k	Kilo-
l	Liter
LB	Lauria-Bertani
LMW	<i>low molecular weight</i>
m	Meter
M	Molar
mAU	<i>milli absorbance units</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
<i>M. loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>
min	Minute(n)

mol	Mol
NaAc	Natriumacetat
NBD-	((2-((7-Nitro-4-benzofurazanyl)amino)ethyl)thio)-
NGS	<i>Normal goat serum</i>
N-Terminus	Aminoterminus einer Polypeptidkette
OD	optische Dichte
OSN	olfaktorische sensorische Neuronen
p.A.	pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PBC	<i>phosphate binding cassette</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDE	Phosphodiesterase
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
ppm	parts per million
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	<i>reversed phase high-performance-liquid-chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
S1-S6	transmembranale Segmente S1-S6 eines spannungsabhängigen K ⁺ -Kanals vom <i>Shaker</i> -Typ
s. d.	<i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE	Tris-EDTA
Thr-Schnittstelle	Thrombinschnittstelle

Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
ÜK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Verd.	Verdünnung
vs.	versus
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

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

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

Aminosäuren sind nach dem Einbuchstaben- oder Dreibuchstabenkode abgekürzt:

A	Alanin	Ala
R	Arginin	Arg
N	Asparagin	Asn
D	Aspartat	Asp
C	Cystein	Cys
E	Glutamat	Glu
Q	Glutamin	Gln
G	Glycin	Gly
H	Histidin	His
I	Isoleucin	Ile

L	Leucin	Leu
K	Lysin	Lys
M	Methionin	Met
F	Phenylalanin	Phe
P	Prolin	Pro
S	Serin	Ser
T	Threonin	Thr
W	Tryptophan	Trp
Y	Tyrosin	Tyr
V	Valin	Val

1. Einleitung

Ionenkanäle kontrollieren den Fluß von Ionen über die Zellmembran. Sie sind Membranproteine und bilden mikroskopisch kleine Poren, durch die Ionen strömen können (Hille, 2001). Der Ionenfluß ist entscheidend für die Entstehung und Weiterleitung elektrischer Signale.

Ionenkanäle können anhand ihrer Ionenselektivität unterschieden werden. Neben selektiven Na^+ -, K^+ - oder Ca^{2+} -Kanälen existieren auch Kanäle, die nur wenig zwischen verschiedenen Ionen unterscheiden können. Die Membranspannung reguliert die Öffnung spannungsabhängiger Ionenkanäle, dagegen werden ligandengesteuerte Ionenkanäle direkt durch die Bindung extra- oder intrazellulärer Botenstoffe kontrolliert. Ionenkanäle werden in verschiedene Genfamilien eingeteilt, deren Mitglieder charakteristische, z. T. ähnliche Strukturmerkmale besitzen, sich aber in ihren funktionellen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden können.

1.1 Spannungsabhängige K^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle

Viele spannungsabhängige K^+ -Kanäle werden durch Depolarisation der Membran aktiviert und leiten einen auswärtsgerichteten K^+ -Strom (auswärtsrektifizierende K^+ -Kanäle). Diese K^+ -Kanäle, die als K_v -Kanäle bezeichnet werden, setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen (MacKinnon, 1991). Eine K^+ -Kanaluntereinheit besitzt sechs transmembranale Segmente (S1-S6). Das N- und C-terminale Ende des Polypeptids liegen intrazellulär (Miller, 1991, Jan & Jan, 1992, Pongs, 1992). Die Porenregion befindet sich zwischen den Segmenten S5 und S6. Durch Mutageneseexperimente konnte gezeigt werden, dass dieser ca. 20 Aminosäuren umfassende Proteinabschnitt an der Ausbildung der wässrigen Pore beteiligt ist (Yool & Schwarz, 1991, Hartmann et al., 1991, Kirsch et al., 1992, Backx et al., 1992). Selektivitäts- und Leitfähigkeitseigenschaften der Ionenkanäle werden maßgeblich durch die Aminosäuresequenz der Porenregion bestimmt, z.B. gibt es ein hochkonserviertes Sequenzmotiv für Kaliumkanäle GYG (Heginbotham et al., 1992), das für die hohe K^+ -Selektivität der Kanäle verantwortlich ist. Auch Bereiche zwischen S4 und S5 (Lopez et al., 1994) und in S6 (Isacoff et al., 1991, Slesinger et al., 1993) beeinflussen die

Poreneigenschaften. Im transmembranalen Segment S4 befindet sich das so genannte Spannungsfühlermotiv. Es ist durch vier bis acht positiv geladene Aminosäuren an jeder dritten Position charakterisiert, die durch vorwiegend hydrophobe Aminosäuren getrennt sind. Die Beteiligung des S4-Segments an dem spannungsabhängigen Öffnungsverhalten dieser Kanäle wurde durch Mutagenesestudien gezeigt (Übersicht: Stühmer, 1991, Jan & Jan, 1992, Pongs, 1992). Spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle besitzen eine grosse porenbildende α -Untereinheit mit einer pseudotetrameren Organisation (Na^+ -Kanal: Noda et al., 1986, Ca^{2+} -Kanal: Tanabe et al., 1987). Das α -Polypeptid besitzt vier interne Sequenzwiederholungen, die sich wahrscheinlich durch zwei aufeinander folgende Genduplikationen entwickelt haben (Strong et al., 1993). Jede dieser internen Wiederholungen enthält die gleichen Strukturelemente wie eine einzelne K^+ -Kanaluntereinheit (Catterall, 1988, Numa, 1989).

1.2 Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle

Aufgrund gemeinsamer struktureller Merkmale gehören zyklisch Nukleotid-gesteuerte (CNG) Ionenkanäle zur genetischen Superfamilie der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle (Jan & Jan, 1990, Guy et al., 1991, Goulding et al., 1992, Bönigk et al., 1993). Funktionell betrachtet handelt es sich bei CNG-Kanälen jedoch um ligandengesteuerte Ionenkanäle, da ihr Öffnungszustand direkt durch die Bindung der intrazellulären Botenstoffe cGMP bzw. cAMP reguliert wird (Übersicht: Kaupp & Seifert, 2002). CNG-Kanäle spielen eine wichtige Rolle beim Sehen und Riechen. Viele CNG-Kanäle sind molekularbiologisch und elektrophysiologisch charakterisiert worden (Übersicht: Kaupp & Seifert, 2002, Eismann et al., 1993, Yau, 1994, Finn et al., 1996). Sie werden der Gruppe der nicht-selektiven Kationenkanäle zugeordnet, da sie zwischen verschiedenen monovalenten Kationen nicht gut unterscheiden können. Divalente Kationen können ebenfalls permeieren und blockieren dabei den Strom, der durch monovalente Kationen getragen wird (Kaupp & Altenhofen, 1992, Sesti et al., 1994, Frings et al., 1995).

CNG-Kanäle bilden heterooligomere Komplexe, die aus zwei verschiedenen Untereinheiten (A und B) bestehen. Die Untereinheiten der CNG-Kanäle besitzen sechs transmembranale Segmente wie spannungsabhängige K^+ -Kanäle (S1-S6, Henn et al., 1995). N- und C-Terminus liegen intrazellulär (Cook et al., 1989, Molday et al., 1991). Zwischen S5 und S6

existiert ein Bereich, der der Porenregion spannungsabhängiger Kanäle ähnelt (Guy et al., 1991, Goulding et al., 1992, Heginbotham et al., 1992, Bönigk et al., 1993). Dieser Bereich ist auch in CNG-Kanälen an der Ausbildung der Pore beteiligt (Goulding et al., 1993, Root & MacKinnon 1993, Eismann et al., 1994). Im transmembranalen Segment S4 befindet sich ein Sequenzmotiv, das an den Spannungsfühler der spannungsabhängigen Ionenkanäle erinnert. Die funktionelle Bedeutung dieses Motivs in CNG-Kanälen ist aber unklar, da diese nur schwach spannungsabhängig sind. Im C-terminalen Bereich befindet sich die Bindestelle für zyklische Nukleotide („*cyclic nucleotide binding domain*“, CNBD). Sie ähnelt den Bindestellen für zyklische Nukleotide in cAMP- bzw. cGMP-abhängigen Proteinkinasen (Takio et al., 1984, Weber et al., 1987, Kaupp et al., 1989). Die Bindung der zyklischen Nukleotide wird in Kapitel 1.5 detaillierter diskutiert. Der sogenannte C-Linker verbindet die Bindestelle für zyklische Nukleotide mit dem letzten transmembranalen Segment S6. Zahlreiche Mutagenesestudien haben gezeigt, dass der C-Linker eine wichtige Rolle beim Schalten spielt (Gordon & Zagotta, 1995a, Gordon & Zagotta, 1995b, Broillet & Firestein, 1996, Gordon et al., 1996, Gordon et al., 1997, Brown et al., 1998, Zong et al., 1998, Paoletti et al., 1999, Hua & Gordon, 2005; Kapitel 1.4).

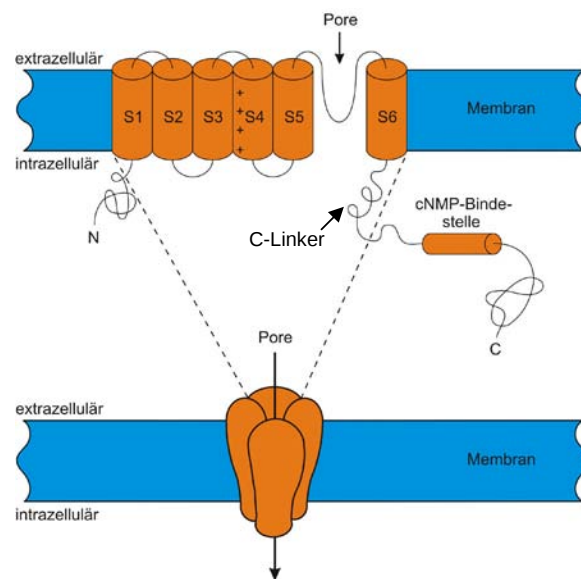


Abb. 1.1: Transmembranale Topologie und tetramere Anordnung der zyklich Nukleotid-gesteuerten Kanäle. Der obere Teil zeigt die transmembranale Topologie einer Untereinheit. Mit S1-S6 sind die transmembranalen Segmente bezeichnet. Die Bindestelle für zyklische Nukleotide ist durch „cNMP-Bindestelle“ gekennzeichnet. Der C-Linker verbindet die cNMP-Bindestelle mit dem letzten transmembranalen Segment S6. Die Pluszeichen verweisen auf das Spannungssensormotiv. Im unteren Teil ist die tetramere Struktur der Kanäle schematisch dargestellt.

1.2.1 Ligandenselektivität von CNG-Kanälen

Die Ligandenselektivität von nativen und heterolog exprimierten CNG-Kanälen wurde durch die Messung der Ströme in „excised patches“ mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen untersucht. Alle bekannten CNG-Kanäle reagieren sowohl auf cAMP als auch auf cGMP (Kaupp und Seifert, 2002). Dabei sind niedrigere cGMP- als cAMP-Konzentrationen notwendig, um die Kanäle zu öffnen. Die CNG-Kanäle in Stäbchen- und Zapfenphotorezeptorzellen unterscheiden deutlich zwischen diesen beiden Liganden, während CNG-Kanäle aus olfaktorischen sensorischen Neuronen (OSN) auf beide Liganden fast gleich gut reagieren. Dosis-Wirkungs-Messungen haben gezeigt, dass der Aktivierungsprozess durch zyklische Nukleotide kooperativ ist. CNG-Kanäle aus Stäbchen aktivieren mit einem Hill-Koeffizienten n zwischen 1,5 und 3,1, CNG-Kanäle aus Zapfen mit $n = 1,6$ bis 3,0 und CNG-Kanäle aus OSN mit $n = 1,4$ bis 2,5 (Übersicht Eismann et al., 1993). Für CNG-Kanäle aus Stäbchen wurden $K_{1/2}$ -Werte für cAMP von 1,5 mM und für cGMP von 50 μ M gemessen. Für CNG-Kanäle aus OSN liegen die $K_{1/2}$ -Werte für cAMP und cGMP bei 3 μ M bzw. 1,6 μ M (Kaupp und Seifert, 2002).

1.2.2 Die Verwendung von 8-substituierten zyklisch Nukleosid-Monophosphat (cNMP)-Analoga zur funktionellen Untersuchung von CNG-Kanälen

Zyklische Nukleotide, die an der 8-Position substituiert sind, haben sich bei zellulären Studien als nützlich herausgestellt. Diese Analoga weisen eine höhere Membranpermeabilität als cAMP und cGMP auf, z.B. sind 8-Br-cGMP und 8-Chlorophenylthio-cGMP (8-CPT-cGMP) 6- bzw. 90-fach lipophiler als cGMP (Butt et al., 1992). Dadurch erreichen sie leichter intrazelluläre Bindungsstellen. Außerdem aktivieren die meisten 8-substituierten Analoga CNG-Kanäle sehr effizient (Brown et al., 1993, Caretta et al., 1985, Koch & Kaupp, 1985, Tanaka et al., 1989, Zimmerman et al., 1985). In Stäbchenphotorezeptoren und olfaktorischen Neuronen aktivieren 8-Br-cGMP und 8-CPT-cGMP die CNG-Kanäle bei 10- bzw. 80-fach niedrigeren Konzentrationen als cGMP (Frings et al., 1992, Wei et al., 1998, Zimmerman et al., 1985). Weiterhin sind 8-substituierte Analoga resistent gegen Hydrolyse durch die meisten PDE-Isoformen (Butt et al., 1992, Barkdoll et al., 1988, Zimmerman et al., 1985). Der lipophile Charakter, der geringe $K_{1/2}$ -Wert der Aktivierung und die Resistenz gegen

Hydrolyse machen 8-substituierte Analoga zu attraktiven Werkzeugen für die Untersuchung von CNG-Kanälen.

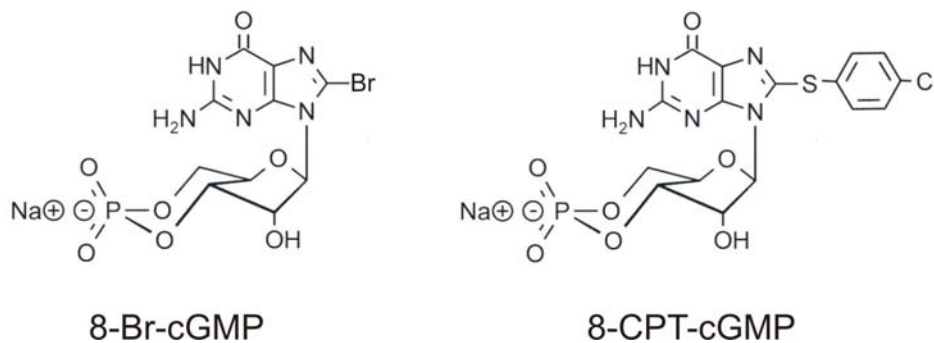


Abb. 1.2: Struktur der 8-substituierten cGMP-Analoga 8-Br-cGMP (links) und 8-CPT-cGMP (rechts).

1.3 Der CNG-Kanal aus *Mesorhizobium loti*

Im Jahre 2000 wurde das Genom des stickstofffixierenden Bakteriums *Mesorhizobium loti* (*M. loti*) entschlüsselt und veröffentlicht (Kaneko et al., 2000). Das Genprodukt M1132241 enthielt alle Elemente für einen Kalium-selektiven Ionenkanal mit einer Bindestelle für zyklische Nukleotide. Strukturell weist dieser Kanal große Ähnlichkeit zu den CNG-Kanälen auf. Vier gleiche Untereinheiten mit jeweils sechs transmembranalen Segmenten S1-S6 bilden einen funktionellen Kanal. N- und C-Terminus liegen intrazellulär, sind aber im Gegensatz zu den N- und C-Termini von CNG-Kanälen aus Säugetieren sehr kurz. Zwischen den Segmenten S5 und S6 liegt die Porenregion. Der C-Linker, der die C-terminale Bindestelle für zyklische Nukleotide mit dem letzten Transmembransegment verbindet, ist auch sehr kurz (Nimigean et al., 2004; Clayton et al., 2004). Wegen dieser kompakten Eigenschaften eignet sich der Kanal besonders gut für strukturelle und funktionelle Analysen.

Die Bindestelle für zyklische Nukleotide dieses Kanals wurde kristallisiert (Clayton et al., 2004) und die Struktur ist denen anderer cNMP-bindender Proteine sehr ähnlich. Über die Bindung von zyklischen Nukleotiden komme ich in Kapitel 1.5 zurück.

1.4 Das Schaltverhalten von Ionenkanälen

Ionenkanäle können zwischen offener und geschlossener Konformation umschalten, um Ionen den Weg durch die Pore zu ermöglichen oder zu verschließen. Das verläuft mehrstufig. Zuerst wirkt der entsprechende Stimulus, beispielsweise die elektrische Spannung oder die Bindung eines Liganden auf Teile des Kanalproteins, z.B. das Spannungsfühlermotiv oder die Ligandenbindungsstelle. Dann verändert sich die Struktur der Pore – Ionen können fließen.

Inzwischen wurden verschiedene Ionenkanäle kristallisiert, einige davon im offenen Zustand (MthK (Jiang et al., 2002a), KvAP (Jiang et al., 2003) MscS (Bass et al., 2002)), andere im geschlossenen Zustand (KcsA (Doyle et al., 1998), KirBac (Kuo et al., 2003), nAChR (Miyazawa et al., 2003), MscL (Chang et al., 1998)). Anhand dieser Strukturen haben Jiang und Kollegen (2002b) ein Schaltmodell entwickelt, welches auf dem offenen MthK-Kanal aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* und dem geschlossenen KcsA-Kanal aus *Streptomyces lividans* beruht. Ein konserviertes Glycin in S6 stellt demzufolge ein Scharnier dar, das eine auswärtsgerichtete Bewegung der Helix um ca. 30° erlaubt. Als Konsequenz dieser Bewegung wird der Permeationsweg für Ionen an seiner engsten Stelle auf 12 Å erhöht und Kalium-Ionen können passieren.

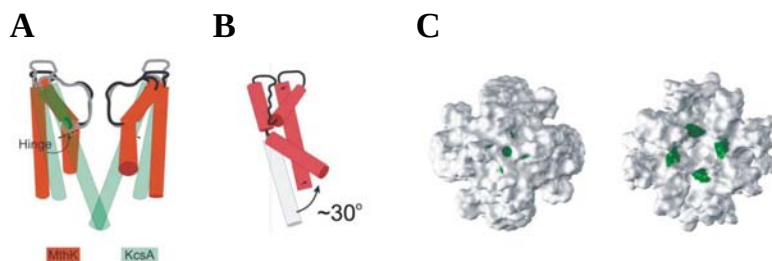


Abb. 1.3: Potenzieller Schaltmechanismus eines K⁺-Kanals durch Kombination der Strukturen von MthK (offener Zustand) und KcsA (geschlossener Zustand). **A:** Der KcsA-Kanal (grün) und der MthK-(rot) sind überlappend dargestellt. Als Bezugspunkt dient das Selektivitätsfilter. Zur besseren Übersicht sind nur zwei Untereinheiten abgebildet. **B:** Vergleich jeweils einer einzelnen Untereinheit. Eine Bewegung der letzten transmembranalen Helix um 30° öffnet die Pore. **C:** Intrazelluläre Sicht der Oberfläche, die dem wässrigen Lösungsmittel zugänglich ist für den KcsA-Kanal (links) und den MthK-Kanal (rechts). Die grünen Flächen repräsentieren die engsten Stellen der Pore. Aus: Perozo (2002).

1.4.1 Schaltverhalten bei CNG-Kanälen

Sequenzähnlichkeiten zwischen der Porenregion bzw. den letzten beiden transmembranalen Helizes des KcsA-Kanals und der CNG-Kanäle lassen vermuten, dass CNG-Kanäle strukturelle Merkmale mit dem KcsA-Kanal teilen (Becchetti et al., 1999) und möglicherweise einen ähnlichen Schaltmechanismus besitzen. Nach der aktuellen Vorstellung ist eine Rotation des C-Linkers im Uhrzeigersinn notwendig, die das helikale Bündel am unteren Ende des S6-Segments entspannt. Die Bewegung des S6-Segments initiiert eine Umordnung der Porenhelix, die schließlich die Pore öffnet. Somit wirkt der C-Linker als Hebelarm, der die Konformationsänderungen, die an der Bindungsdomäne stattfinden, auf die Pore überträgt (Übersicht: Flynn et al., 2001). Die Bewegung des C-Linkers wird allerdings noch kontrovers diskutiert. Ebenso wäre eine Drehung entgegen des Uhrzeigersinns denkbar (Giorgetti et al., 2005). Die Konformationsänderungen in der Bindungsdomäne, die zur Bewegung des C-Linkers führen, sind noch nicht gut untersucht. Es wird vermutet, dass die Bewegung der C-Helix in der Bindungsdomäne (s. Kapitel 1.5) zur Bewegung des C-Linkers beiträgt (Mazzolini et al., 2002).

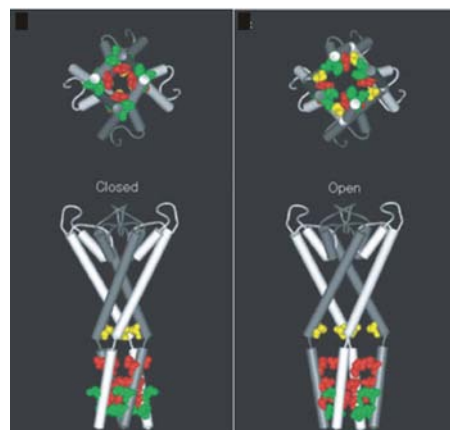


Abb. 1.4: Schaltmodell für CNG-Kanäle in der geschlossenen (links) und offenen (rechts) Konformation.
Aus: Johnson und Zagotta (2001).

1.5 Die Bindestelle für zyklische Nukleotide

Die CNBD besteht aus 80-120 Aminosäuren. Die Struktur der Bindedomäne wurde erstmals an dem cAMP-bindenden „*catabolite activator protein*“ (CAP) aus *Escherichia coli* durch röntgenkristallographische Untersuchungen aufgeklärt (McKay & Steitz, 1981, Weber &

Steitz, 1987, Passner & Steitz, 1997, Passner et al., 2000). Die Struktur besteht aus drei α -Helizes (A, B und C) und acht β -Faltblättern (β 1- β 8). Die β -Faltblätter formen ein abgeflachtes Fass, das aus zwei antiparallelen Schichten mit jeweils vier β -Faltblättern besteht. Die drei α -Helizes sind mit den Enden des Fasses verbunden. Die A-Helix befindet sich N-terminal von dem Fass, wohingegen die B-Helix, direkt gefolgt von der C-Helix, C-terminal von dem Fass liegen. Im Zentrum des Fasses befindet sich eine konservierte Region, die „*phosphate binding cassette*“ (PBC), die direkt an der Bindung des zyklischen Nukleotids beteiligt ist. Das zyklische Nukleotid wird in der Bindestelle durch ein Netzwerk von polaren und nicht-polaren Wechselwirkungen gebunden. Das Phosphat und der Ribosering des zyklischen Nukleotids interagieren mit der PBC des Proteins durch Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen, während der Purinring durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäuren in der C-Helix interagiert.

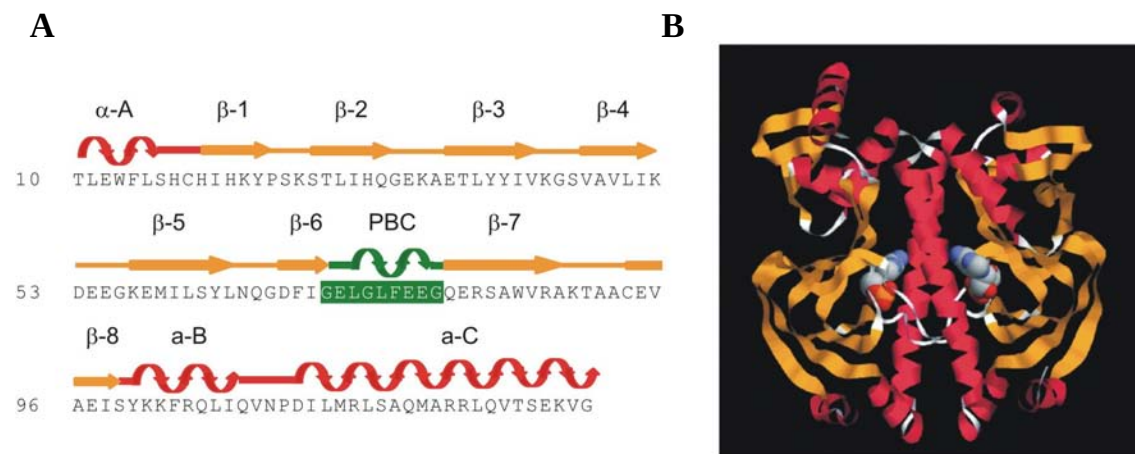


Abb. 1.5: Die cAMP-Bindestelle des CAP. **A:** Aminosäuresequenz der cAMP-Bindestelle des CAP-Proteins. Die Sekundärstrukturen sind oberhalb der Sequenz angegeben. **B:** Tertiärstruktur eines CAP-Dimers mit zwei gebundenen cAMP-Molekülen. Die α -Helices sind in rot, die β -Faltblätter sind in orange dargestellt. Aus: Kaupp und Seifert (2002).

Inzwischen wurden die Strukturen mehrerer anderer zyklisch Nukleotid-bindender Proteine aufgeklärt, darunter die regulatorische Untereinheit der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen PKA und PKG (Weber et al., 1987, Diller et al., 2001, Wu et al., 2005, Su et al., 1995, Weber et al., 1989), der Guaninnukleotidaustauschfaktor Epac (Rehmann et al., 2003, Rehmann et al., 2006), die Bindestelle eines hyperpolarisationaktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals HCN2 (Zagotta, et al., 2003) sowie die Bindestelle des Kanals aus *Mesorhizobium loti* (Clayton et al., 2004). Alle Bindestellen weisen die gleiche Grundarchitektur auf. Aus dem Vergleich der Strukturen, die den ligandengebundenen

Zustand repräsentieren (CAP, HCN2), mit denen, die die Apoform zeigen (Epac), ist ein Modell entwickelt worden, welche Konformationsänderungen stattfinden, wenn das zyklische Nukleotid bindet. Demnach führt die Bindung von cAMP zu einer Veränderung der Position der C-Helix relativ zu der β -Fasstruktur (Rehmann et al., 2003). Es ist allerdings noch unklar, welche Auswirkungen diese Konformationsänderung auf andere Bereiche des Proteins haben. Welche Änderungen durch die Bindung zyklischer Nukleotide an Ionenkanäle ausgelöst werden, ist ebenfalls noch weitgehend unklar.



Abb. 1.6: Sequenzvergleich verschiedener CNBDs von Proteinen, die zyklische Nukleotide binden. Aminosäuren, die gleich oder ähnlich zu der Aminosäuresequenz des CNG-Kanals aus *Mesorhizobium loti* (mLCNG) sind, sind schwarz bzw. grau hinterlegt. mHCN2, muriner hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch Nukleotid-gesteuerter Kanal (Ludwig et al., 1998), SpHCN, HCN-Kanal aus dem Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* (Gauss et al., 1998), CNGA1, boviner zyklisch Nukleotid-gesteuerter Kanal aus Stäbchenphotorezeptorzellen (Kaupp et al., 1989), PKA1, N-terminale cAMP-Bindungsstelle der PKA (Titani et al., 1984), Epac, Guaninnukleotid austauschfaktor (de Rooji et al., 1998), CAP, *catabolite activator protein* (Aiba et al., 1982). Pfeile markieren Aminosäuren, die wichtige Strukturmerkmale der CNBDs bestimmen oder die direkt mit dem zyklischen Nukleotid interagieren. Sternchen zeigen Aminosäuren, die wichtig die Substratspezifität von zyklisch Nukleotid-abhängigen Proteinkinasen, CAP und CNG-Kanälen sind. $\beta 1$ - $\beta 8$ und αA - αC beziehen sich auf β -Faltblätter und α -helikale Domänen in der Kristallstruktur von CAP.

1.6 Zielsetzung

CNG-Kanäle wurden elektrophysiologisch gut charakterisiert, doch alle gemessenen $K_{1/2}$ -Werte der Aktivierung beziehen sich auf den Gesamtprozess des Schaltens. Es ist noch nicht gelungen, die Bindung des zyklischen Nukleotids an die Ligandenbindestelle direkt zu untersuchen. Um die Konformationsänderungen, die bei der Ligandenbindung stattfinden, und den molekularen Schaltmechanismus besser zu verstehen, sollen funktionelle Untersuchungen an einem bakteriellen zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal durchgeführt werden.

Die Sequenz dieses bakteriellen CNG-Kanals wurde zeitgleich von R. Seifert (Forschungszentrum Jülich), Nimigean et al. (2004) und Clayton und Kollegen (2004) durch eine Datenbankanalyse und Sequenzvergleiche im Genom des stickstofffixierenden Bakteriums *Mesorhizobium loti* gefunden. Dieser bakterielle CNG-Kanal könnte ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung der ligandeninduzierten Konformationsänderung und des Schaltmechanismus darstellen. Mit dem gereinigten Kanalprotein soll die Ligandenbindung quantitativ bestimmt werden. Darüberhinaus soll die Bindestelle für zyklische Nukleotide auch losgelöst vom transmembranären Teil isoliert exprimiert und untersucht werden. Die Daten für die Bindestelle und für das Kanalprotein sollen miteinander verglichen werden: Gibt es einen Unterschied bei der Bindung zyklischer Nukleotide an das isolierte Protein im Vergleich zum Ionenkanal? Die Ergebnisse könnten dann zu einem neuen Modell für den Schaltmechanismus der CNG-Kanäle führen.

2. Material und Methoden

In dieser Arbeit beschriebene Methoden wurden – soweit nicht anders vermerkt – aus Sambrook & Russel (2001) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders notiert, in p.A. Qualität von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Clontech (Heidelberg), Merck (Darmstadt), MWGBiotech (Ebersberg), Pierce (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Renner (Darmstadt), Rohm und Haas Deutschland GmbH (TosoHaas; Frankfurt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Roche (Mannheim), Invitrogen BV (Karlsruhe), NEB (Schwalbach) und Novagen (Schwalbach) geliefert. Für die Erhaltung und Vermehrung von Bakterienkulturen wurden Medien von der Firma Sigma verwendet. Sekundäre Antikörper und Reagenzien für immunologische Nachweise wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Dianova (Hamburg) und Pierce bezogen. Für den Transfer von Proteinen wurden PVDF-Membranen (Immobilon P) der Firma Millipore (Eschborn) verwendet. Für ECL-Nachweise wurden Hyperfilme von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Zyklische Nukleotide wurden von Sigma oder Biolog (Bremen) bezogen.

Alle Lösungen wurden ausschließlich mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Soweit erforderlich wurden die Lösungen durch Autoklavieren sterilisiert (20 min; 121°C) und/oder filtriert (Sterilfilter, 0,2 µm PES, Millipore).

Für FPLC-Experimente wurde die Äkta-Anlage von Amersham Pharmacia Biotech mit verschiedenen Säulenmatrices verwendet. Nukleotidlösungen wurden mit einer HPLC-Anlage (Waters, Bedford, USA) chromatographisch aufgetrennt.

2.2 *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellkultur

2.2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmidvektoren

XLI-Blue (*E. coli* K12): *recA1 endA1 gyrA96* (Nal^r) *thi-1 hsdR17* (r_K⁻, m_K⁺) *supE44 relA1 lac* [F'*proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q *ZΔM15* Tn10 (Tet^r)] (Bullock et al., 1987; Stratagene)

Dieser *E. coli*-Stamm ist eine Endonukleasemangelmутante (*endA*), wodurch die Qualität der präparierten DNA erhöht wird. Zusätzlich ist dieser Stamm eine Rekombinationsmangelmутante (*recA*), wodurch die Stabilität der Insert-DNA gegeben ist. Die eingebrachte *hsdR*-Mutation schützt die eingebrachte DNA vor dem EcoK-Endonukleasesystem. Ein Blau-weiß Farbscreening wird durch das Gen *lacI*^q*ZΔM15* ermöglicht. Dieser Zellstamm besitzt zudem ein Tetrazyklinresistenzgen. Der Bakterienstamm wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA und zur Expression des KcsA-Kanals verwendet.

BL21(DE3) LysE (*E. coli* B): F⁻ *ompT* [Ion] *hsdSB*(r_B⁻m_B⁺) *gal*[dcm] (DE3) pLysE (CM^R); (Novagen).

Dieser *E. coli*-Stamm besitzt das λDE3 Lysogen, das die Gene für die T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors beinhaltet. Die Transkription dieser Gene kann durch Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden. Außerdem fehlen diesem Stamm die Proteasen Ion und OpmT. Zudem beinhaltet der Stamm das pLysE-Plasmid, welches die Gene für das T7 Lysozym und ein Chloramphenicolresistenzgen trägt. Der Bakterienstamm wurde zur Expression der Proteine MLCNG und CNBD verwendet.

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmidvektoren benutzt:

pET-11a:

(Novagen) Dieses Plasmid wurde für die Expression von Fusionsproteinen in den Zellen des Bakterienstammes BL21(DE3)pLysE verwendet.

pGEX-2T

(Amersham Biosciences) Dieses Plasmid wurde für die Expression von Fusionsproteinen in den Zellen des Bakterienstammes BL21(DE3)pLysE verwendet.

pQE-60

(Qiagen) Dieses Plasmid wurde für die Expression von Fusionsproteinen in den Zellen des Bakterienstammes XL1-Blue verwendet.

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

LB (Luria-Bertani)-Medium:

1 % (w/v) Baktotrypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

Für LB-Agar-Platten wurden 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Die Flüssigmedien wurden in Portionen aufgeteilt, autoklaviert (20 min; 121°C) und bei RT gelagert. Agar enthaltende Medien wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25-30 ml/Platte). Bei Bedarf wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) oder Chloramphenicol (Endkonzentration: 18 µg/ml) kurz vor dem Gießen der Platten in den höchstens noch 60°C heißen Agar gegeben. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt.

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

E. coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden mindestens 8 h in LB-Medium bei 37°C in einem Rotationsinkubator (New Brunswick; Nörtingen) oder in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel; Melsungen) inkubiert. Zur Selektion auf 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 Form der CaCl_2 -Methode nach Mandel & Higa (1970) hergestellt. 0,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜK) wurden in 50 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,4 inkubiert und 10 min bis 2 h auf Eis abgekühlt. Bei den folgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen immer auf Eis gehalten und ausschließlich vorgekühlte Gefäße und Lösungen verwendet. Die Zellen wurden 10 min zentrifugiert (Sigma 3K12, 11133-Rotor, 5.000 g; 4°C), das Pellet vorsichtig in 1 ml 0,1 M CaCl_2 resuspendiert und auf 25 ml aufgefüllt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 1 ml 0,1 M CaCl_2 /25 % Glycerin resuspendiert und auf 5 ml aufgefüllt. Nach weiteren 2 h auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen auf Eis aufgetaut.

2.3 Präparation von Plasmid-DNA

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

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

TE_{RNase} : TE mit 5 µl RNase-Cocktail (Ambion)/ml

2.3.1 Minipräparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)

Für die Präparation wurden die Bakterienzellen aus 2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜK) durch Zentrifugation (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 1 min; RT) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 120 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 150 µl Lösung III zugegeben, durch Invertieren gemischt und 30 min zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Phenol extrahiert (2.4.1). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 500 µl Ethanol präzipitiert und zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor,

18.320 g; 10-30 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 10-30 min; 4°C). Der Überstand wurde wieder abgenommen und das DNA-Pellet in 20 µl TE aufgenommen.

Um die bakterielle RNA von der Plasmid-DNA abzutrennen, wurde die Aufarbeitung nach der LiCl-Methode durchgeführt. Dazu wurden die Bakterienzellen aus einer 5 ml ÜK durch zwei Zentrifugationsschritte (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 1 min; RT) in einem 2 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 150 µl Lösung I resuspendiert, durch Zugabe von 180 µl Lösung II lysiert und Zelltrümmer und Proteine mit 225 µl Lösung III präzipitiert. Nach Zentrifugation (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 5 min; 4°C) wurde der Überstand abgenommen und mit 1,5 ml Ethanol versetzt und zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Pellet in 60 µl 30 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Zur Präzipitation der RNA wurden 100 µl 4 M LiCl zugegeben, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl eiskaltem Ethanol versetzt und zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 5 min; 4°C). Das Pellet wurde in 50 µl TE_{RNase} aufgenommen und 20 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und anschließend mit Phenol extrahiert (2.4.1). Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc pH 4,8 und 300 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 5 min; 4°C). Das Pellet wurde in 20 µl TE aufgenommen. Die Ausbeute betrug je nach Dichte der ÜK 1,5-4 µg Plasmid-DNA.

Lösung I:

50 mM Glukose

25 mM Tris/HCl pH 7,5

10 mM EDTA

Lösung II:

0,2 M NaOH

1 % (w/v) SDS

Lösung III:

3 M KAc pH 4,8

2.4 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.4.1 Phenol/Chloroformextraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen und Membranbestandteilen wurden durch Phenol/Chloroformextraktion entfernt. Die DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, die Phasen gut gemischt und zur Trennung zentrifugiert (15.600 g; 3 min; RT). Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, um Phenolreste zu entfernen. Die Phasen wurden gut gemischt und zur Trennung zentrifugiert (15.600 g; 3 min; RT). Der Überstand, der die DNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert (2.4.2).

2.4.2 Ethanolpräzipitation

Um DNA zu konzentrieren oder umzupuffern, kann sie durch Einstellung definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen präzipitiert werden. Die DNA-Lösung wurde auf eine NaAc-Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit dem 2,5-3 fachen Volumen absoluten Ethanols versetzt, kurz gemischt und 5-30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 4°C) pelletiert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach der Größe und Konzentration der DNA. Je kleiner und je geringer konzentriert die DNA war, desto länger wurde zentrifugiert (5-120 min). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, und erneut zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 5 min; 4°C). Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in TE aufgenommen.

2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.5.1 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarosegelen

Die DNA-Menge, die auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid (2.6) aufgetragen wurde, konnte durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (2.6.1) anhand der Intensität der Banden abgeschätzt werden.

2.5.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die DNA in TE verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm gegen TE gemessen. Eine OD von 1,0 bei $\lambda = 260$ nm entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA bzw. 33 $\mu\text{g/ml}$ für einzelsträngige Oligonukleotide. Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten können durch den Quotienten der Absorptionen bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm beurteilt werden. Für DNA-Lösungen sollte er $\geq 1,8$ sein.

2.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mit der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Für Trennungen im Bereich von 500-10.000 bp wurden 0,75-1 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Auftrennung von kleineren DNA-Fragmenten wurden höher konzentrierte Agarosegele eingesetzt (1,5-2 % (w/v)).

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf 60°C wurde die Gellösung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger mit einem Former für die Probestaschen gegossen. Nach dem Erkalten konnten die Agarosegele verwendet werden. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Farbmarker versetzt und anschließend in die Probestaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Laufpuffer bei 90-120 V bis zur ausreichenden Trennung der Nukleinsäuren durchgeführt.

Die Fragmente werden durch Ethidiumbromid unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht.

TAE (50x)

2 M Tris/Acetat pH 7,5

50 mM EDTA

Farbmarker (10x)

10 x TAE

50 % (v/v) Glycerin

0,25 % (w/v) Xylencyanol

2.6.1 DNA-Größen- und Mengenstandard

Es wurde DNA des Bakteriophagen λ verwendet, die mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Hind III geschnitten war (MBI Fermentas; Vilnius, Litauen). Durch die Restriktion entstehen Fragmente folgender Größen (Bp): 21.226, 5.184, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564, 125. Die Gesamtmenge der aufgetragenen Fragmente betrug 670 ng.

2.7 Retransformation

Die "Retransformation" eignet sich, um Plasmid-DNA erneut in Bakterien zu amplifizieren. Dazu wurden 0,5-1 μl Plasmid-DNA mit 30-50 μl der kompetenten Zellen versetzt und 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min bei 42°C („Hitzeschock“) folgte erneut eine Inkubation auf Eis (10-15 min). Anschließend wurden 200 μl LB-Medium zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Regenerationszeit, die der Ausprägung der Antibiotikaresistenz dient, wurden die Zellen auf LB-Agar (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin bzw. 18 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol) ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert oder als Vorkultur zum Animpfen von 500 ml-Kulturen benutzt.

2.8 Expression rekombinanter Proteine

2.8.1 Anzucht von *E. coli*-Zellen zur Expression von Fusionsproteinen

Zwei Liter LB-Medium wurden mit Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (18 µg/ml) und 3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜK) versetzt. Die Bakterien der ÜK enthielten die Plasmidkonstrukte pET-MlcNMPThrHT (Novak, 2006) zur Expression von MlcNG bzw. pG-MlcNBD-5 (Novak, 2006) zur Expression von CNBD. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,4. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,6 mM) induziert. Nach weiteren 4 h (bei pET-MlcNMPThrHT) bzw. ~16 h (bei pG-MlcNBD-5) Inkubation bei 20°C wurde die Expression beendet. Für die Expression des pQE-60-KcsA-Konstruktes wurden 2 l LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und 3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜK) versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,4. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,5 mM) induziert. Nach weiteren 2 h Inkubation bei 20°C wurde die Expression beendet.

Um die Expression zu überprüfen, wurde 1 ml der Kultur pelletiert (Sigma 2K15; 12145-Rotor; 18.320 g; 2 min; RT) und der Überstand abgenommen. Die restliche Expressionskultur wurde ebenfalls pelletiert (Sorvall Evolution RC, SLA-3000, 5.000 g; 15-30 min; 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet bei -20°C gelagert. Das Pellet der 1 ml-Kulturen wurden in 100 µl 1x Probenpuffer (2.11.1) resuspendiert. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; 2.11.1) analysiert.

2.8.2 Fermentation: Anzucht von *E. coli*-Zellen zur Expression von Fusionsproteinen in größeren Mengen

Die Expression erfolgte in einem 7,5 l-Fermenter (Bioengineering; Wald, Schweiz). 5 l LB-Medium wurden mit Ampicillin (100 µg/ml) und 500 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜK) versetzt. Die Bakterien der ÜK enthielten das Plasmidkonstrukt pET-MlcNMPThrHT (Novak, 2006). Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ~28. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,1 mM) induziert.

Nach ~17 h Inkubation bei 25°C wurde die Expression beendet. Die Zellen wurden zentrifugiert (Sorvall Evolution RC, SLA-3000, 5.000 g; 15-30 min; 4°C) und das Pellet bei -20°C gelagert.

2.9 Reinigung rekombinanter Proteine

2.9.1 Reinigung der heterolog exprimierten MICNG- und KcsA-Proteine aus *E. coli*

Für die Expression von His-Tag Fusionsproteinen in *E. coli* wurden der Plasmidvektor pET-11a (MICNG) bzw. der Plasmidvektor pQE-60 (KcsA) verwendet. Das "His-Tag" besteht aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten und ermöglicht die Reinigung über eine Co^{2+} -beladene HisTrapsäule oder HiTrapsäule (Amersham Biosciences). Die Fusionsproteine enthielten C-terminal den Histidinanteil. Die Expression der Fusionsproteine (2.8.1) und der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte nach Riggs (1994). Das Zellpellet einer 5 l-Kultur wurde in 80 ml Zellaufschlusspuffer resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Branson Sonificator B-12; Stufe 6-7; 4x 15 sek; 4°C). Die löslichen Zellbestandteile wurden von den Unlöslichen durch Ultrazentrifugation (BeckmanCoulter Optima L-80 XP Ultracentrifuge, Ti-70, 93.000 g, 20 min, 4°C) getrennt. Der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet, das die Fusionsproteine enthielt, wurde in 200 ml Solubilisierungspuffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 100 ml Solubilisierungspuffer 2 erfolgte eine Inkubation von 2 h bei 4°C. Nach anschließender Zentrifugation (Sigma 3K12, 11133-Rotor, 5.000 g, 20-30 min, 4°C) wurde der Überstand, der die solubilisierten Fusionsproteine enthielt, abgenommen und filtriert (Spritzenvorsatzfilter; 0,45 µM, CM Membran, Merck). Eine HisTrapsäule oder HiTrapsäule (5 ml bzw. 1 ml; Amersham Biosciences) wurde an ein Äkta-System (Amersham Biosciences) angeschlossen, nach Herstellerangaben mit 10 ml CoCl_2 (100 mM) beladen und mit 25 ml Waschpuffer äquilibriert. Nun wurde das filtrierte Solubilisat auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 25 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe eines Imidazolgradienten (5-500 mM). Die Elutionsfraktionen wurden aufgefangen. Eine anschließende

Größenausschlusschromatographie (2.9.5) wurde zur Überprüfung der Homogenität der Probe durchgeführt.

Für das MLCNG-Protein:

Zellaufschlusspuffer:

50 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM MgCl₂

Complete (Proteaseinhibitor (Roche); 1 Tablette/50 ml)

2-3 mg DNase I

Solubilisierungspuffer 1:

20 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

20 % Glycerin (v/v)

5 mM Imidazol

Solubilisierungspuffer 2:

20 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

20 % Glycerin (v/v)

5 mM Imidazol

60 mM Decylmaltopyranosid (DM)

Waschpuffer:

20 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

20 % Glycerin (v/v)

5 mM Imidazol

5 mM DM

Elutionspuffer:

20 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

20 % Glycerin (v/v)

500 mM Imidazol

5 mM DM

Für den KcsA-Kanal:Zellaufschlusspuffer:50 mM NaHPO₄, pH 7,0

150 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM MgCl₂

Complete (Proteaseinhibitor; 1 Tablette/50 ml)

2-3 mg DNase I

Solubilisierungspuffer 1:20 mM NaHPO₄, pH 7,0

150 mM NaCl

5 mM KCl

Complete (Proteaseinhibitor; 1 Tablette/50 ml)

Solubilisierungspuffer 2:20 mM NaHPO₄, pH 7,0

150 mM NaCl

5 mM KCl

60 mM DM

Waschpuffer:20 mM NaHPO₄, pH 7,8

150 mM NaCl

5 mM KCl

10 mM Imidazol

5 mM DM

Elutionspuffer:20 mM NaHPO₄, pH 7,0

150 mM NaCl

5 mM KCl

500 mM Imidazol

5 mM DM

2.9.2 Reinigung der cAMP-freien Form des heterolog exprimierten MICNG-Proteins aus *E. coli*

Für die Expression des His-Tag Fusionsproteins MICNG in *E. coli* wurde der Plasmidvektor pET-11a (Novagen) verwendet. Die Expression der Fusionsproteine (2.8.1) und der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgten nach Riggs (1994). Das Zellpellet einer 1 l-Kultur wurde in 20 ml Zellaufschlusspuffer resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Branson Sonificator B-12; Stufe 6-7; 4x 15 sek; 4°C). Die löslichen Zellbestandteile wurden von den Unlöslichen durch Ultrazentrifugation

(BeckmanCoulter Optima L-80 XP Ultracentrifuge, Ti-70, 93.000 g, 20 min, 4°C) getrennt. Der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet, das die Fusionsproteine enthielt, wurde in 120 ml Solubilisierungspuffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 240 ml Solubilisierungspuffer 2 erfolgte eine Inkubation von 2 h bei 4°C. Nach anschließender Zentrifugation (Sigma 3K12, 11133-Rotor, 5.000 g, 20-30 min, 4°C) wurde der Überstand, der die solubilisierten Fusionsproteine enthielt, abgenommen und für die Reinigung verwendet. Es wurde 1 ml des TALON-Säulenmaterials (BD Bioscience) in eine Poly-Prep Chromatographiesäule (Bio-RAD) gefüllt. Alle verwendeten Puffer wurden bei 4°C gehalten. Die Säule wurde mit 10 ml Waschpuffer äquilibriert. Der Überstand mit den solubilisierten Proteinen wurde auf die TALON-Säule gegeben. Nach dem Auftrag der Probe wurde die Säule mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden für 2x 30 Minuten und 1x ü. N. mit 1 mM 8-CPT-cGMP, das in Waschpuffer gelöst war, inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Säule jeweils mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Säule mit 200 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem Elutionspuffer, der 400 mM Imidazol enthielt.

Zellaufschlusspuffer:

50 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM MgCl₂

Complete (Proteaseinhibitor; 1 Tablette/50 ml)

2-3 mg DNase I

Solubilisierungspuffer 1:

20 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

10 mM Imidazol

Solubilisierungspuffer 2:

20 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

10 mM Imidazol

60 mM DM

Waschpuffer:20 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

10 mM Imidazol

5 mM DM

Elutionspuffer:20 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

400 mM Imidazol

5 mM DM

2.9.3 Reinigung der heterolog exprimierten CNBD aus *E. coli*

Für die Expression von GST-Tag Fusionsproteinen in *E. coli* wurde der Plasmidvektor pGEX-2T verwendet (Amersham Biosciences). Das "GST-Tag" besteht aus dem Enzym Glutathion-S-Transferase und ermöglicht die Reinigung von GST-Tag Fusionsproteinen über eine GST-Sepharose-4B-Säule (Amersham Biosciences). Das Fusionsprotein enthielt N-terminal den GST-Anteil und C-terminal die Bindestelle für zyklische Nukleotide des MLCNG-Kanals (CNBD). Zwischen den Proteinanteilen befindet sich eine Schnittstelle für die Protease Thrombin. Die Expression der Fusionsproteine (2.8.1) und der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgten nach Riggs (1994). Das Zellpellet einer 500 ml-Kultur wurde in 20 ml PBS resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Branson Sonificator B-12; Stufe 6-7; 4x 15 sek; 4°C). Die löslichen Zellbestandteile wurden von den Unlöslichen durch Zentrifugation (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g; 20-30 min; 4°C) getrennt. Der Überstand, der die Fusionsproteine enthielt, wurde für die weitere Reinigung verwendet. Es wurden 2 ml des GST-Sepharose 4B-Säulenmaterials in eine Poly-Prep Chromatographiesäule (Bio-RAD) gefüllt. Die Säule wurde mit 20 ml PBS äquilibriert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde auf die GST-Sepharose-4B-Säule gegeben. Nach dem Auftrag der Probe wurde die Säule mit 20 ml PBS gewaschen. Zur Elution wurden 40 U Thrombin (Sigma) in 2 ml PBS aufgenommen und auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule verschlossen und ü. N. bei RT inkubiert. Danach wurden die Proteine, die spezifisch an die Säule gebunden hatten, mit 4 ml PBS eluiert.

PBS (pH 7,4):7 mM Na₂HPO₄3 mM NaH₂PO₄

130 mM NaCl

2.9.4 Reinigung der cAMP-freien Form der heterolog exprimierten CNBD aus *E. coli*

Um das gebundene cAMP von der gereinigten CNBD (2.9.3) zu entfernen, wurde das Protein denaturiert. Anschließend wurde das Protein renaturiert und für Bindungsstudien verwendet. Das gereinigte Protein (2.9.3) wurde über PD10-Säulen (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben in Denaturierungspuffer umgepuffert. Dies wurde solange wiederholt, bis die Probe cAMP-frei war. Die Menge an cAMP in der Probe wurde nach jedem PD10-Durchlauf überprüft (2.13.1). Das Protein wurde in dem 10-fachen Volumen Renaturierungspuffer zurückgefaltet. Dabei wurde zunächst die Hälfte der Probe tropfenweise in den Renaturierungspuffer gegeben. Nach 24 h wurde die zweite Hälfte tropfenweise zugegeben. Die Rückfaltung erfolgte bei 4°C unter leichtem Rühren über zwei Tage. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (Sigma 3K12, 11133-Rotor, 5.000 g, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und auf 5 ml eingengt (*stirred cell model* 8400; Amersham Biosciences, 10 kDa Cutoff-Ultrafiltrationsmembran, Millipore). Nach erneuter Zentrifugation (Sigma 3K12, 11133-Rotor, 5.000 g, 20 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und filtriert (Spritzenvorsatzfilter; 0,45 µm, CM Membran, Merck). Eine anschließende Größenausschlusschromatographie (2.9.5) wurde zur Überprüfung der Homogenität der Probe durchgeführt.

Denaturierungspuffer:

PBS (7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 130 mM NaCl; pH 7,4)

6 M Guanidiniumhydrochlorid

Renaturierungspuffer:

20 mM NaHPO₄, pH 7,4

150 mM NaCl

10 mM EDTA

0,5 M L-Arginin

5 mM Glutathion (reduzierte Form)

0,5 mM Glutathion (oxidierte Form)

2.9.5 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe. Die Trennung kommt durch die unterschiedliche Permeation der Moleküle in einem porösen Trägermaterial mit kontrollierter Größe zustande. Für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle verantwortlich. Moleküle einer bestimmten Größe können nicht in die Poren des Trenngels eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen V_0 . Kleinere Moleküle können in die Poren des Trennmaterials eindringen und eluieren dadurch später. Der Trenneffekt hängt hauptsächlich von den Eigenschaften des Trennmaterials ab und nicht von den Pufferbedingungen.

In dieser Arbeit wurden Gelfiltrationssäulen mit einem Dextran-Agarose-Trennmateriale verwendet. Für das MICNG-Protein wurde die Säule „Superdex 200 prep grade, High Load 16/60“ (Amersham Biosciences) oder für analytische Zwecke die Säule „Superdex 200 HR 10/30“ verwendet. Der Trennbereich der Superdex 200-Säule liegt zwischen 1×10^4 und 6×10^5 Da. Für die CNBD wurde die Säule „Superdex 75 prep grade, High Load 16/60“ (Amersham Biosciences) verwendet. Der Trennbereich der Superdex 75-Säule liegt zwischen 3×10^3 und 7×10^4 Da. Die Gelfiltrationssäulen wurden an ein Äkta-System (Amersham Biosciences) angeschlossen und mit 2-fachem Säulenvolumen an Puffer (prep grade: 248 ml, analytische Säule: 50 ml) äquilibriert. Anschließend wurden 2-5 ml bzw. 0,1-0,5 ml der Proteinprobe aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 bzw. 0,5 ml/min. Die Elution der Proteine wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm verfolgt und in 1-2 ml-Fractionen gesammelt.

Puffer für MICNG (Standardpuffer):

20 mM NaHPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

5 mM DM

Puffer für die CNBD:

10 mM KHPO₄, pH 7,0

100 mM KCl

2.10 Quantifizierung von Proteinen

2.10.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)

Es wurde das Protein Assay-Farbreagenz von Bio-RAD (München) verwendet. Die Proteinprobe wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagenz vermischt. Danach wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Eine Kalibrierkurve wurde mit BSA erstellt. Im linearen Bereich der Kalibrierkurve (2-15 µg Protein) entspricht eine OD₅₉₅ von 0,07 ca. 1 µg Protein.

2.10.2 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Die Methode nach Bradford ist ungeeignet, um die Konzentration von Proteinlösungen, die Detergenzien oder Lipide enthalten, zu bestimmen. Die Protein-Konzentration solcher Proben wurde mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. Dabei wurde der Amidoschwarz 10B-Farbstoff von Merck (Darmstadt) verwendet. Die Probe wurde mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl 10 % SDS vermischt, um Proteine zu solubilisieren. Danach wurden 15 µl 1 % SDS/1 M Tris/HCl pH 7,5 zugegeben. Nach dem Mischen wurden 30 µl 104 % (w/v) TCA zur Fällung der Proteine zugegeben und der Ansatz nochmals gemischt. Die Proben wurden 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Membranfilter (Porendurchmesser: 0,45 µm; Typ HA, Millipore, Eschborn) aufgetragen. Die Filter wurden mit 3 ml 6 % TCA gewaschen und für 5 min mit Färbelösung gefärbt. Danach wurden die Filter kurz mit H₂O gespült und mehrmals in Entfärbelösung gelegt, bis der Hintergrund auf dem Filter wieder weiß war. Aus den getrockneten Filtern wurden die gefärbten Filterbereiche ausgeschnitten. Danach wurden die Filterstücke in je 1 ml Elutionslösung für 20 min bei RT geschüttelt. Es wurde die OD₆₃₀ bestimmt. Eine Kalibrierkurve wurde mit BSA erstellt. Im linearen Bereich der Kalibrierkurve (1-15 µg Proteine) entspricht eine OD₆₃₀ von 0,03 ca. 1 µg Protein.

<u>Färbelösung:</u>	<u>Entfärbelösung:</u>	<u>Elutionslösung:</u>
0,5 % (w/v) Amidoschwarz B10	90 % (v/v) Methanol	50 % (v/v) Ethanol
45 % (v/v) Methanol	2 % (v/v) Essigsäure	25 mM NaOH
10 % (v/v) Essigsäure		50 µM EDTA

2.11 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

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

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Modifikation nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde in einer "Minigel Twin"-Kammer (Biometra; Gelmaße: 0,1 x 8 x 10 cm) durchgeführt. Es wurden 7,5-15 %ige Trenngele und 5 %ige Sammelgele verwendet. Die Proben wurden mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel und dauerte ca. 90 min.

<u>4x SDS-Probenpuffer:</u>	<u>10x SDS-Laufpuffer:</u>
8 % (w/v) SDS	250 mM Tris
200 mM Tris/HCl pH 6,8	1 % (w/v) SDS
50 % (v/v) Glyzerin	1,92 M Glycin
4 % (v/v) β -Mercaptoethanol	
0,04 % (w/v) Bromphenolblau	

2.11.2 Blaue native Polyacrylamidgelelektrophorese („Blue native PAGE“)

Die native PAGE wurde nach Schamel & Schamel (2001) in einer "Minigel Twin"-Kammer (Biometra; Gelmaße: 0,1 x 8 x 10 cm) durchgeführt. Sie dient der Auftrennung von nativen Proteinkomplexen. Es wurden 5-16 %ige Polyacrylamid-Gradientengele und 4 %ige Sammelgele verwendet, die in Gelpuffer ohne SDS angesetzt wurden. Die Proben wurden in 1x Probenpuffer aufgenommen und bei 6 mA und 4°C aufgetrennt. Die untere

Reservoirkammer enthielt Anodenpuffer, die obere blauen Kathodenpuffer. Der blaue Kathodenpuffer enthält Coomassie-Blau G250, das in die Proben einwandert und an die Proteine bindet. Nach ca. zwei Dritteln der Laufstrecke wurde der Kathodenpuffer durch hellblauen Kathodenpuffer ausgetauscht, um eine Entfärbung des Gellaufs zu erreichen. Falls notwendig, wurde das Gel mit Coomassie-Blau nachgefärbt (2.11.4).

3x Gelpuffer

150 mM BisTris, pH 7,0

200 mM ϵ -AminocaprinsäureAnodenpuffer

50 mM BisTris, pH 7,0

blauer Kathodenpuffer

15 mM BisTris, pH 7,0

50 mM Tricine

0,02 % (w/v) Coomassie Blue G250

hellblauer Kathodenpuffer

15 mM BisTris, pH 7,0

50 mM Tricine

0,002 % (w/v) Coomassie Blue G250

2x Probenpuffer

40 mM BisTris, pH 7,0

1 M ϵ -Aminocaprinsäure

20 % (v/v) Glycerin

5 mM DM

0,0015 % (w/v) Coomassie Blue G250

2.11.3 Protein-Größenstandards

Als Größenstandards bei der SDS-PAGE (2.11.1) dienten die Proteine des "Low Molecular Weight Calibration Kit" (LMW-Größenstandard) und des "High Molecular Weight Calibration Kit" (HMW-Größenstandard) von Amersham Pharmacia Biotech. Bei der Blue Native PAGE (2.11.2) dienten die Proteine des „High Molecular Weight Native Marker Kit" (nativer HMW Größenstandard) von Amersham Pharmacia Biotech als Größenstandard.

Tabelle 2.1: Größenstandards bei der PAGE.

LMW-Größenstandard		HMW-Größenstandard	
Molekulargewicht (kDa)	Protein	Molekulargewicht (kDa)	Protein
97	Phosphorylase b	220	Myosin
66	Albumin	170	α_2 -Makroglobulin
45	Ovalbumin	116	β -Galaktosidase
30	Carboanhydrase	76	Transferrin
20,1	Trypsininhibitor	53	Glutamatdehydrogenase
14,4	α -Lactalbumin		

Nativer HMW-Größenstandard	
Molekulargewicht (kDa)	Protein
669	Thyroglobulin
440	Ferritin
232	Catalase
140	Laktatdehydrogenase
66	Albumin

2.11.4 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau

Das Färben von SDS-Polyacrylamidgelen wurde in Anlehnung an Meyer & Lamberts (1965) durchgeführt. Es wurde der Farbstoff Coomassie Blue R 250 von Serva (Heidelberg) verwendet. Die Gele wurden für 1-2 h oder ü. N. in Färbelösung gelegt. Anschließend wurden die Gele bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades in Entfärbelösung gelegt und auf Whatman-Papier unter Vakuum bei 80°C getrocknet.

Färbelösung:

0,2 % (w/v) SERVA Blue R
 30 % (v/v) Ethanol (vergällt)
 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

30 % (v/v) Ethanol (vergällt)
 10 % (v/v) Essigsäure

2.12 Spezifischer Nachweis von Proteinen

2.12.1 Transfer und Immobilisierung von Proteinen („Westernblot“)

Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und in Anlehnung an Towbin et al. (1979) auf PVDF-Membranen ("Immobilon P"; Millipore; Eschborn) transferiert. Der Transfer ("Westernblot") wurde in einem "Milliblot-Graphit Elektroblot"-System (Millipore; Eschborn) im Halbtrockenverfahren nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transferzeit betrug 30 min bei 250 mA/800 cm² Gelfläche. Der Transfer wurde durch reversible Proteinfärbung mit 0,2 % (w/v) Ponceau S (Sigma) in 2 % (v/v) Essigsäure überprüft. Gegebenenfalls wurde die Blotmembran in Streifen geschnitten.

2.12.2 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von immobilisierten Proteinen erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (1. Antikörper) inkubiert. Der spezifische Antigen-Antikörperkomplex wurde dann mit einem sekundären Antikörper (2. Antikörper) nachgewiesen, an den Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Die Inkubationsschritte wurden entweder 30-60 min bei RT oder ü. N. bei 4°C durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran gewaschen (Tab. 2.2). Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter Schütteln. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen, sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle 2.2 zusammengefasst. Die spezifischen Antigen-1. Antikörper-2. Antikörper-Komplexe wurden mit dem "ECL Westernblot Detection Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) bzw. mit "SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate" (Pierce) nach Herstellerangaben detektiert.

Tabelle 2.2: Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	30 min (RT) oder ü. N. (4°C)	Blockierungslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
Erstantikörperinkubation	30-60 min (RT)	Erstantikörperinkubationslösung ⁽³⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
Zweitantikörperinkubation	30 min (RT)	Zweitantikörperinkubationslösung ⁽⁴⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung II ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ PBS; 0,05% Tween-20; 0,5% Magermilchpulver⁽³⁾ Erstantikörper in PBS; 0,05% Tween-20⁽²⁾ PBS; 0,05% Tween-20⁽⁴⁾ Zweitantikörper in PBS; 0,05% Tween-20⁽⁵⁾ PBS: 130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄

2.13 Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Proteinen

2.13.1 Photometrische Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Proteinen

Der cAMP-Gehalt der MLCNG- und CNBD-Proteine wurde photometrisch bestimmt. Die Absorption der Proteinlösung wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ und $\lambda = 280$ nm gemessen. Die Formel zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes leitet sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ab:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

A = Absorption

ε = Molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke der Küvette

Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280 nm, für cAMP bei 260 nm. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm für ein Protein, das cAMP gebunden hat, ist demnach:

$$\frac{A_{260}}{A_{280}}(\text{Probe}) = \frac{A_{260}(\text{cAMP}) + A_{260}(\text{Protein})}{A_{280}(\text{cAMP}) + A_{280}(\text{Protein})} \quad (2)$$

(Probe = mit cAMP besetztes Protein; Protein = cAMP-freies Protein)

Durch Substitution mit Formel (1) und Umstellung ergibt sich Formel (3), aus der sich der cAMP-Gehalt der Probe bestimmen lässt:

$$\frac{c(\text{cAMP})}{c(\text{Protein})} = \frac{\left(\frac{A_{260}}{A_{280}}(\text{Protein}) - \frac{A_{260}}{A_{280}}(\text{Probe}) \right) * \varepsilon(\text{Protein}(280\text{nm}))}{\left(\frac{A_{260}/A_{280}(\text{Probe})}{A_{260}/A_{280}(\text{cAMP})} - 1 \right) * \varepsilon(\text{cAMP}(260\text{nm}))} \quad (3)$$

Für die cAMP-freie CNBD beträgt das errechnete A_{260}/A_{280} -Verhältnis 0,89 (3.1.2.2). Für das cAMP-freie MICNG-Protein wurde ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 0,6 verwendet. Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis für cAMP wurde experimentell bestimmt (3.1.2.2). Die molaren Extinktionskoeffizienten der Proteine und des cAMPs sind im Anhang angegeben (Tabellen 6.1 und 6.2).

Der Zusammenhang von A_{260}/A_{280} und des Konzentrationsverhältnisses $c(\text{cAMP})/c(\text{MICNG})$ ist in Abb. 2.1 dargestellt.

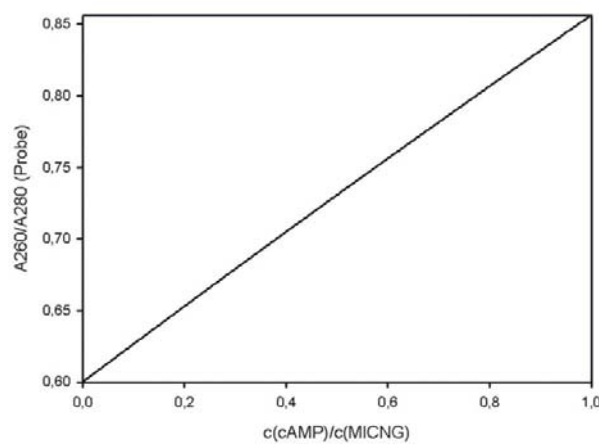


Abb. 2.1: Zusammenhang von A_{260}/A_{280} und $c(\text{cAMP})/c(\text{MICNG})$. Aufgetragen ist das Verhältnis der Konzentration von cAMP und des MICNG-Proteins gegen das A_{260}/A_{280} -Verhältnis der unbekannten Probe.

2.13.2 Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Proteinen durch High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Chromatographische Methoden verfolgen alle ein Ziel: die Trennung einzelner Komponenten aus einem Substanzgemisch. Die HPLC (*high-performance-liquid-chromatography*) ist eine Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem ein Substanzgemisch (Analyt) mittels einer flüssigen mobilen Phase unter hohem Druck über eine stationäre Phase (Füllmaterial der chromatographischen Säule) transportiert wird (Abb 2.2). Die mobile Phase vermittelt die Wechselwirkung des Analyten mit der spezifischen Oberfläche der stationären Phase. Diese Wechselwirkung bewirkt einen verzögerten Transport der einzelnen Komponenten, wodurch jede eine charakteristische Zeit (Retentionszeit) oder Volumen (Retentionsvolumen) benötigt, um die Trennsäule zu verlassen. Wird im Verlauf der Elution die Zusammensetzung der mobilen Phase verändert, handelt es sich um eine Gradiententrennung. Man unterscheidet dabei sog. Stufengradienten und lineare Gradienten. Bei einer Trennung mittels linearem Gradienten wird die Zusammensetzung der mobilen Phase durch kontinuierliches Mischen von z.B. zwei Lösungsmitteln (A und B, siehe Abb. 2.2) verändert. Lösungsmittel A und B können sich im pH-Wert, im Salzgehalt oder im Anteil an organischem Lösungsmittel unterscheiden. Die Probe wird auf die Säule aufgetragen, indem sie zunächst drucklos in eine Probenschleife (Injektor Abb. 2.2) injiziert wird. Der Elutionsstrom wird dann durch die Probenschleife geführt, wodurch die Probe auf die Säule gelangt. Um Substanzen, die von der Säule eluieren, qualitativ oder quantitativ nachweisen zu können, wird bei Peptid- oder Proteingemischen die UV-Absorption des Eluats verfolgt. Man detektiert entweder die UV-Absorption der Peptidbindung (bei 206-220 nm) oder der aromatischen Seitenketten (Trp absorbiert z.B. bei 280 nm). Das Ergebnis der Substanztrennung wird in Form eines Chromatogramms dargestellt (Übersicht: Lottspeich & Zorbas, Bioanalytik, 1998).

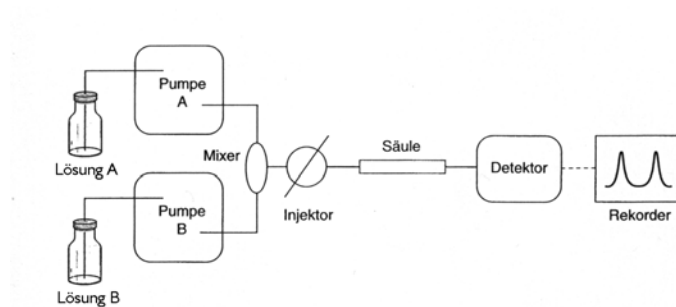


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage. Eine HPLC-Anlage besteht aus 4 Hauptteilen: Pumpen; Injektor; Trennsäule, Detektor. Aus: Bioanalytik, F.Lottspeich, H. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1998

Bei der in dieser Arbeit verwendeten RP- (*reversed phase*) oder Umkehrphasen-HPLC werden meist poröse Kieselgele eingesetzt, deren polare OH-Gruppen auf der Oberfläche mit Kohlenwasserstoffketten (je nach Anwendung mit einer Länge von C₂ bis C₁₈) verethert sind. Hierdurch kann der Analyt mit der unpolaren stationären Phase wechselwirken. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von organischem Lösungsmittel (Methanol). Im Verlauf der Chromatographie wird durch Zumischen des organischen Lösungsmittels zur wässrigen Phase die Polarität der mobilen Phase verringert und so die Elutionskraft erhöht. Das organische Lösungsmittel konkurriert mit den adsorbierten Molekülen des Analyten um die Bindungsstellen an der stationären Phase. Die einzelnen Komponenten des Analyten werden somit anhand ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Je größer die Hydrophobizität einer Komponente im Analyten ist, desto länger ist die Retentionszeit auf der Säule.

Diese Methode wurde dazu verwendet, um festzustellen, wie hoch der prozentuale cAMP-Anteil in einer gereinigten MICNG- bzw. CNBD-Proteinprobe war. Es wurden die Proteinlösungen mit 5 % Perchlorsäure versetzt. Dadurch wurden die Proteine gefällt und das gebundene cAMP in den Überstand freigesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 200 µl. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (Sigma 2K15, 12145-Rotor, 18.320 g, 30 min, 4°C) und die Überstände anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Überstände wurden durch Zugabe weniger Tropfen 10 M NaOH neutralisiert. Für die RP-HPLC-Analyse wurden jeweils 150 µl Probe eingesetzt. Der Nachweis von cAMP während der Elution erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 258$ nm. Um die enthaltene cAMP-Menge der Proben zu bestimmen, wurden die Flächen der Elutionspeaks mit den Flächen einer cAMP-Kalibrierungsreihe verglichen.

Verwendeter Gradient zur cAMP-Bestimmung:

Zeit (min)	Fließgeschwindigkeit (ml/min)	Lösung A (%) 5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 5,0	Lösung B (%) Methanol
0,00	1,2	100	0
4,00	1,2	85	15
9,00	1,2	30	70
10,00	1,2	100	0
14,00 (Äquilibration)	1,2	100	0

2.14 Optimierung der Pufferbedingungen für das cAMP-freie MICNG-Protein

Die Optimierung hat das Ziel, das zu untersuchende Protein möglichst lange in Lösung zu halten. Das ist wichtig, um funktionelle Assays, wie z. B. Bindungsstudien, auch bei Proteinen, die sonst unter bestimmten Bedingungen präzipitieren würden, durchführen zu können. Die Pufferbedingungen wurden anhand der „*Micro-Drop*“-Analyse optimiert. Die Pufferoptimierung wurde für die cAMP-freie Form (2.9.2) des MICNG-Proteins vorgenommen. Alle verwendeten Puffer enthielten zusätzlich 5 mM Decylmaltopyranosid. Der Versuch wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten getestet (Tabelle 2.3). Die Puffer wurden in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Es wurden 2 µl des jeweiligen Puffers mit 1 µl gereinigtem Protein (Konzentration ≥ 6 mg/ml) auf ein Deckglas gegeben. Das Deckglas wurde über einer Vertiefung einer Multiwellplatte mit Silikon fixiert. Der so entstandene „*hanging drop*“ (Abb. 2.3) wurde bei RT bzw. bei 4°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach einem Tag unter einem Binokular (STEMI DV4, Zeiss, Obercochem), indem die Menge des Präzipitats in den einzelnen Tropfen verglichen wurde.



Abb. 2.3: Schematischer Aufbau der „Micro-Drop“-Analyse. 2 µl des jeweiligen Puffers mit 1 µl gereinigtem Protein (6 mg/ml) wurden auf ein Deckglas gegeben. Das Deckglas wurde über einer Vertiefung einer Multiwellplatte mit Silikon fixiert. So entsteht ein „*hanging drop*“. Im unteren Reservoir befindet sich der zu testende Puffer.

Die Präzipitatmenge wurde mit einer Werteskala von 0-3 beurteilt. Tropfen, die wenig Präzipitat aufwiesen, erhielten einen Wert von 1. Eine hohe Präzipitatmenge hingegen wurde mit einem Wert von 3 beurteilt. Einen Wert von 0 erhielten Proben, bei denen der Tropfen eingetrocknet war und nicht bewertet werden konnte. Die Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (Sony). Im zweiten Schritt wurden einige der Puffer weiterverwendet, die einen Präzipitatzwert von 1 hatten. Die Puffer wurden mit verschiedenen Salzkonzentrationen (NaCl: 100 mM; KCl: 5 mM, 50 mM und 100 mM) versetzt und das Protein wurde erneut einer „Micro-Drop“-Analyse unterzogen. Zudem wurde ein Puffer getestet, in dem einige funktionelle Bindungsmessungen mit dem nicht-cAMP-freien MICNG-Protein durchgeführt wurden („Standardpuffer“: 20 mM NaPO₄, pH 8,0; 296 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM DM).

Tabelle 2.3: Verwendete Puffersysteme für die „Micro-Drop“-Analyse.

NaHPO ₄ , pH 5,5	KHPO ₄ , pH 7,5
NaHPO ₄ , pH 6,5	MES, pH 5,8
NaHPO ₄ , pH 7,5	MES, pH 6,2
Na-Acetat, pH 4,5	MES, pH 6,5
Na-Acetat, pH 5,5	HEPES, pH 7
Na-Citrat, pH 4,7	HEPES, pH 8
Na-Citrat, pH 5,5	Tris, pH 7,5
KHPO ₄ , pH 5	Tris, pH 8
KHPO ₄ , pH 6	Tris, pH 8,5
KHPO ₄ , pH 7	Imidazol, pH 8

2.15 Bindungsstudien

2.15.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isothermale Titrationskalorimetrie kann zur Charakterisierung von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen genutzt werden (Doyle, 1997). Bindet der Ligand an den Rezeptor, so wird entweder Wärme freigesetzt oder absorbiert, je nachdem ob es sich um eine exotherme oder endotherme Reaktion handelt. Das isothermale Titrationskalorimeter besitzt eine Reaktionszelle und eine Referenzzelle, die auf gleicher Temperatur gehalten werden. Ändert sich in der Reaktionszelle die Temperatur, so führt das Kalorimeter so lange Energie zu oder ab, bis die Temperaturdifferenz wieder ausgeglichen ist. Die Energiemenge wird in $\mu\text{cal/sec}$ aufgezeichnet. Die Referenzzelle enthält bidestilliertes Wasser.

Der Rezeptor wird in der Reaktionszelle vorgelegt. Der Ligand wird mit Hilfe einer rotierenden Mikroinjektionsspritze wiederholt in die Reaktionszelle injiziert. Die Mischungswärme kann ermittelt werden, wenn man den Liganden in die Pufferlösung injiziert. Diese wird von den Messwerten abgezogen.

Das isothermale Titrationskalorimeter der Firma MicroCal (Northhampton, USA) wurde mir freundlicherweise von Prof. Bott (IBT-1, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt. Das Volumen der Reaktionszelle betrug 1,3985 ml. Zur vollständigen luftblasenfreien Befüllung der Reaktionszelle wurden ca. 2 ml Lösung benötigt. Die Spritze fasst ein Volumen von 250 μl . Das Injektionsvolumen variierte von 0,5 μl – 5 μl . Das Zeitintervall zwischen den Injektionen betrug 400 s. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Bevor die Liganden- und Rezeptorlösungen in die Apparatur eingefüllt wurden, wurden sie unter Rühren entgast. Dazu wurde das Vakuum-Gerät ThermoVac von MicroCal verwendet.

2.15.2 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm Microcal Origin Version 5.0. Das Programm berechnet die Bindungsenthalpie ΔH , die Bindungsaffinität K_B sowie die Bindungsstöchiometrie N , die die Anzahl der Bindungsstellen pro Molekül angibt. Daraus

kann man die Änderung der freien Gibbsenergie ΔG und die Änderung der Entropie ΔS mit Hilfe der thermodynamischen Grundgleichung berechnen:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_B$$

(mit R = Gaskonstante = $8,314 \cdot 10^{-3}$ kJ/mol/K; T = Temperatur in Kelvin)

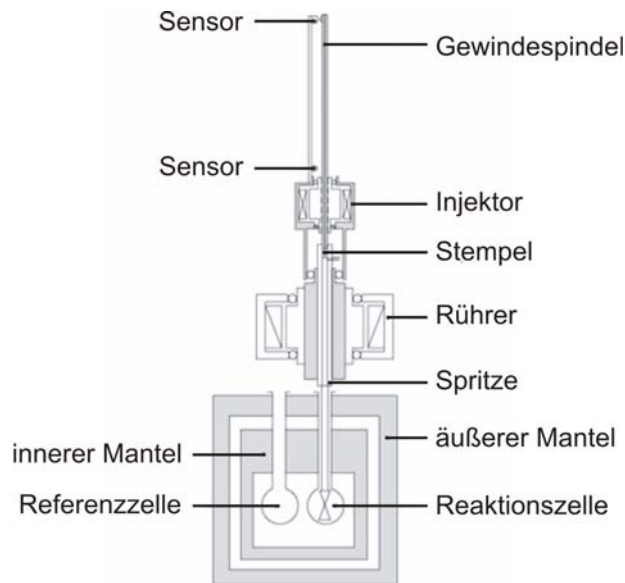


Abb.2.4: Schematischer Aufbau eines isothermalen Titrationskalorimeters. Die Abbildung stammt aus dem „ITC user manual“ von MicroCal (modifiziert).

Die Volumenänderung pro Injektion ging über folgende Gleichung mit in die Berechnung der Ligandenkonzentration ein:

$$X_t = X_t^0 \left(1 - \frac{\Delta V}{2V_0} \right) \quad (4)$$

(mit X_t = Gesamtkonzentration an Ligand; X_t^0 = hypothetische Gesamtkonzentration an Ligand; ΔV = Volumenänderung in der Reaktionszelle durch Injektion von Ligand; V_0 = Volumen der Reaktionszelle)

Trägt man die Bindungsenthalpie (in kcal/mol) gegen das molare Verhältnis Ligand/Rezeptor auf, so kann man die Messpunkte mit einer Kurve nach Gleichung 5 anpassen (MicroCal Origin Manual, Wiseman et al., 1989; Fisher and Singh, 1995). Es wurden automatisch Annahmen für die Werte von ΔH , K_B und n gemacht und diese nach dem Marquardt Algorithmus angepasst, bis sich keine signifikante Verbesserung mehr ergab.

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_B M_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_B M_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (5)$$

(mit Q = Wärmemenge; M_t = Gesamtkonzentration an Protein in der Reaktionszelle; ΔH = Bindungsenthalpie; n = Anzahl der Bindungsstellen; K_B = Bindungskonstante)

2.15.3 Fluoreszenzassay zur Messung der Bindungsaffinität

Als Sensor für die Bindung wurde ein fluoreszierendes cAMP-Derivat, 8-NBD-cAMP, verwendet. Diese Substanz fluoresziert stark in hydrophober und weniger stark in hydrophiler Umgebung. Befindet sich das 8-NBD-cAMP beispielsweise in einer hydrophoben Bindungstasche, so wird die Bindung durch eine Erhöhung der Fluoreszenz angezeigt.

2.15.3.1 Fluoreszenzoptische Messungen in Multiwellplatten

Fluoreszenzoptische Messungen in Multiwellplatten wurden mit der FlexStationII₃₈₄ der Firma MolecularDevices durchgeführt. Dieses System ermöglicht die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität in den Vertiefungen (*Wells*) von 96er bzw. 384er Multiwellplatten. Die Messung kann dabei in einem einzelnen Well oder in bis zu 384 Wells gleichzeitig erfolgen (*KinetikMode*). Die Platte wird dafür Well für Well an einem optischen Messkopf vorbeigeführt. Die maximale Zeitauflösung für Messungen an einem einzelnen Well beträgt 50 ms. Werden 384 Wells simultan gemessen, so kann für jedes Well maximal alle 29 Sekunden ein Datenpunkt aufgenommen werden. Die Fluoreszenz kann entweder von oben (*top read*) oder von unten (*bottom read*) angeregt und detektiert werden. Abbildung 2.6 verdeutlicht das Messprinzip für beide Konfigurationen. Alle Messungen mit der FlexStation wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

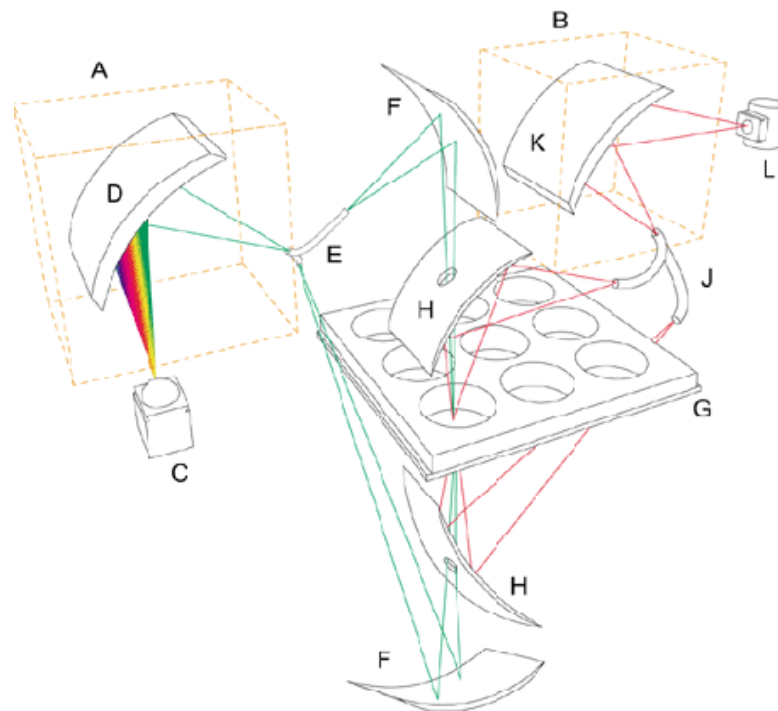


Abb 2.6: Prinzip der Anregung (grüne Linien) und Detektion (rote Linien) von Fluoreszenz in Multiwellplatten mit der FlexStationII₃₈₄. Die Fluoreszenz kann entweder von oben (*top read*) oder von unten (*bottom read*) angeregt und detektiert werden. Das System verfügt über einen Anregungsmonochromator (A) und einen Emissionsmonochromator (B). Als Lichtquelle dient eine Xenon Blitzlampe (C). Über das bewegliche Ablenkgritter (D) kann Licht einer bestimmten Wellenlänge (grüne Linie) aus dem Spektrum der Xenonlampe ausgewählt werden. Dieses Licht wird über Lichtleiter (E) und Spiegel (F) entweder von oben oder von unten in das Well der Mikrowellplatte (G) fokussiert. Aus dem Well emittiertes Fluoreszenzlicht gelangt über fokussierende Spiegel (H) und Lichtleiter (J) zum beweglichen Emissions-Ablenkgritter (K). Hiermit wird die gewünschte Wellenlänge aus dem Spektrum des emittierten Lichtes ausgewählt. Ein Photomultiplier (L) detektiert die Intensität des emittierten Lichtes. (Abbildung: www.moleculardevices.com)

Für die Messungen wurden jeweils 20 µl Proteinlösung bzw. für die Kontrollmessungen Puffer in die Wells vorgelegt. 20 µl des 8-NBD-cAMP wurden hinzugefügt und gemischt. Die Messung erfolgte im *Kinetik Mode*. Die Anregung für 8-NBD-cAMP erfolgte bei 471 nm. Die Detektion erfolgte bei 530 nm. Für 8-NBD-cGMP wurde bei 475 nm angeregt. Die Detektion erfolgte bei 525 nm. Die Messungen mit dem MICNG-Protein wurden in Standardpuffer, die mit der CNBD in PBS durchgeführt.

PBS (pH 7,4):

7 mM Na₂HPO₄

3 mM NaH₂PO₄

130 mM NaCl

Standardpuffer

20 mM NaPO₄, pH 8,0

295 mM NaCl

5 mM KCl

5 mM DM

2.15.3.2 Fluoreszenzoptische Messungen an einer Stopped-Flow-Apparatur

2.15.3.2.1 Aufbau der Stopped-Flow Apparatur

Es wurde eine *Stopped-Flow* Apparatur der Firma BioLogic (SFM-4, BioLogic, Grenoble, Frankreich) benutzt. Abb. 2.7 zeigt eine schematische Darstellung der Anlage.

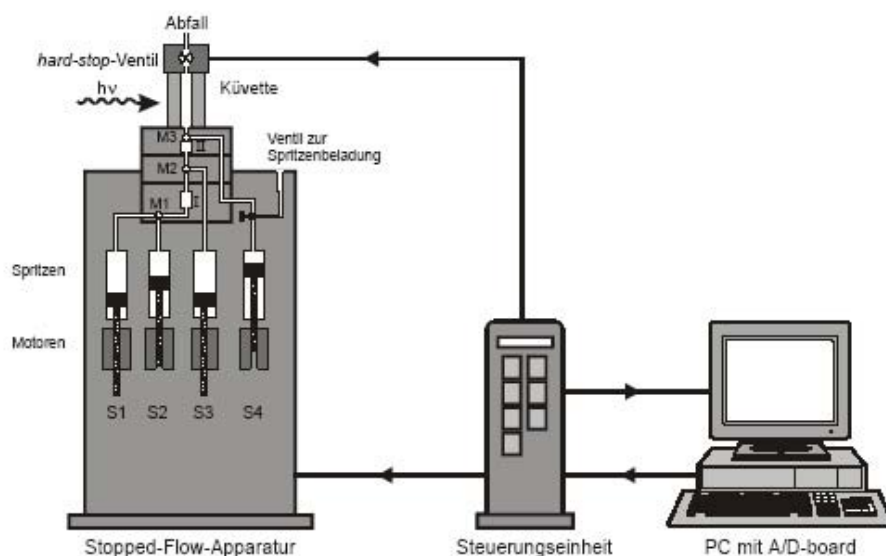


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der *Stopped-Flow* Apparatur.

Das Kernstück der *Stopped-Flow* Apparatur ist das SFM-4 Modul, das vier 20 ml Spritzen (S1, S2, S3 und S4) enthält. Die Spritzen können jeweils über ein Ventil durch externe Eingänge mit den zu mischenden Flüssigkeiten gefüllt werden (nur für S4 gezeigt). Die Stempel der Spritzen werden durch Schrittmotoren gesteuert. Das Ausstoßvolumen der Spritzen beträgt 4,54 μ l pro Schritt. Die Flussgeschwindigkeiten liegen bei den 20 ml Spritzen zwischen 0,05 und 8,00 ml/s. Die Schrittmotoren werden durch einen Computer über eine Steuerungseinheit (MPS-52, BioLogic) angesteuert. Als Steuerungssoftware dient die MPS-Software (V.3.30, BioLogic). Die Flüssigkeiten können in 3 Mischkammern (M1-M3) miteinander gemischt werden. Die Mischkammern sind in Abbildung 2.7 als Kreise dargestellt. Zwischen den Mischkammern können bei Bedarf zwei Reaktionskammern (I, II) mit unterschiedlichen Reaktionsvolumina installiert werden. Die Reaktionskammern sind in Edelstahl- oder Kunststoffblöcke gebohrt, die man in unterschiedlichen Kombinationen

einbauen kann. (Diese Blöcke sind in Abb. 2.7 als graue Rechtecke, die Reaktionskammern I und II als weiße Rechtecke dargestellt.) Ohne die Reaktionskammern I und II beträgt das Volumen der Röhren zwischen M1 und M2 17 μl bzw. zwischen M2 und M3 22 μl . Als Beobachtungskammer für den Zeitverlauf der Reaktion dient eine Quarzküvette (FC-15) mit 31 μl Reaktionsvolumen, die hinter M3 eingebaut ist. Um Schwankungen der Flüssigkeitssäule in der Küvette und dadurch Schwankungen des Messsignals zu verhindern, kann ein *hard-stop*-Ventil hinter der Küvette direkt nach der Injektion einer Flüssigkeit in die Messküvette geschlossen werden. Das Ventil wird über die Steuerungssoftware der *Stopped-Flow* Apparatur reguliert. Die *Stopped-Flow* Apparatur wurde mit einem Messsystem erweitert, dass es erlaubt, Fluoreszenz in der Küvette zu detektieren (siehe weiter unten).

2.15.3.2.2 Aufbau der Anlage für Fluoreszenzmessungen

Um Fluoreszenzänderungen in der Küvette der *Stopped-Flow* Apparatur zu messen, wurde die Apparatur erweitert. Die Kombination aus *Stopped-Flow* Apparatur und fluorimetrischem Messsystem ist in Abbildung 2.8 in einer Aufsicht dargestellt.

Als Quelle für das Anregungslicht des 8-NBD-cAMPs diente eine 150 Watt Xe/Hg-Lichtbogenlampe (Hamamatsu, Japan). Das Anregungslicht wurde über eine Linse in einen Lichtleiter (Schott, Maßanfertigung) eingekoppelt und auf die Messküvette gestrahlt. Um die Anregungswellenlänge einzustellen, wurden zwei FITCA-40 Interferenzfilter (2 mm; Schott; Abbildung 2.8, Filter: 1c, d) verwendet. Vor die Interferenzfilter wurden ein Wärmeschutzfilter (3 mm; KG1, Schott; Abbildung 2.8, Filter 1 a) und ein 435 nm Langpassfilter (3 mm; GG435, Schott; Abbildung 2.8, Filter 1 b) eingebaut. Diese Filter schützen die Interferenzfilter vor einer Beschädigung durch Wärme bzw. vor der Solarisation durch UV-Licht. Die Fluoreszenz wurde mit einem Photomultiplier (HTV-R376, Hamamatsu, Japan) detektiert, der im rechten Winkel zum Strahlengang des Anregungslichts installiert wurde. Zwischen der Küvette und dem Photomultiplier wurden zwei 495 nm Langpassfilter (3 mm; GG435, Schott; Abbildung 2.8, Filter 2 a, b) eingebaut. Des Weiteren wurden zwei FITCE-45 Interferenzfilter (2 mm; Schott, Abbildung 2.8, Filter 2 c, d) verwendet. Diese verhindern, dass Anregungslicht, das langwelliger als das Fluoreszenzlicht von 8-NBD-cAMP ist, vom Photomultiplier detektiert wird. Für die Messungen wurde eine Spannung von 500 V an den Photomultiplier angelegt.

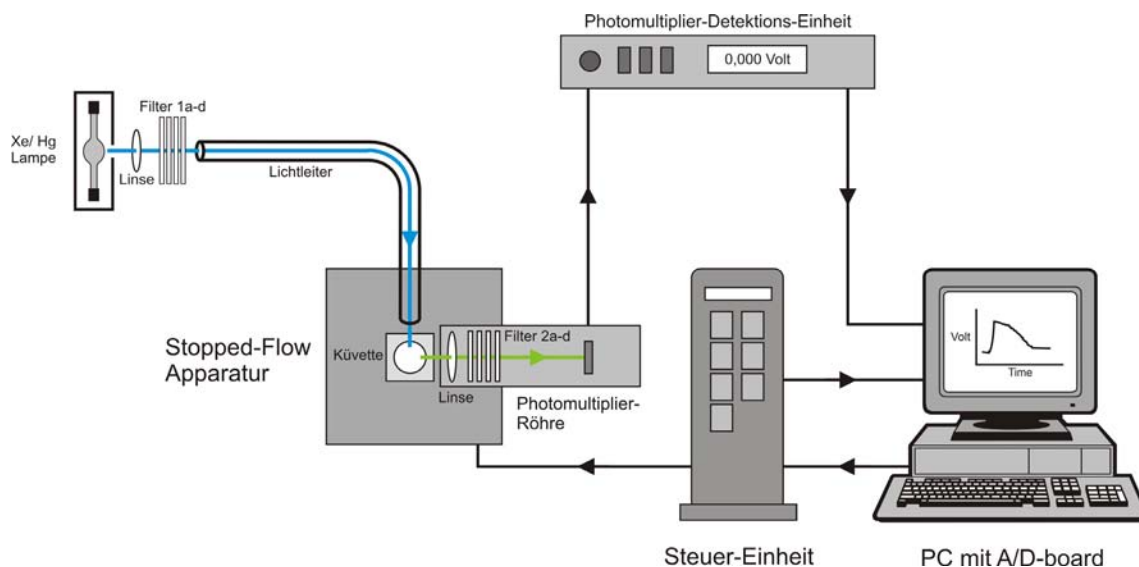


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Kombination aus *Stopped-Flow* Apparatur und fluorimetrischem Messsystem.

2.15.3.2.3 Durchführung der Fluoreszenzmessungen

In der *Stopped-Flow* Apparatur können vier verschiedene Lösungen gemischt werden. Die Lösungen werden von den Spritzen S1 – S4 in die verschiedenen Mischkammern (M1 – M3) gepresst. Von der Mischkammer M3 fließt das Reaktionsgemisch in die Küvette. Die Zeitspanne, die zwischen dem Mischen der Reaktionspartner und dem Beobachtungsbeginn vergeht, wird als „Totzeit“ bezeichnet. Die Totzeit hängt von zwei Faktoren ab: 1. Von der Geschwindigkeit, mit der das Reaktionsgemisch aus der Mischkammer in die Küvette fließt, und 2. von dem Volumen, durch welches das Reaktionsgemisch fließen muss. Um eine möglichst geringe Totzeit zu erreichen, wurden die beiden Reaktionspartner erst in Mischkammer M3 gemischt. Aus Spritze 3 bzw. 4 wurden die Proteinlösung bzw. das 8-NBD-cAMP in die Mischkammer injiziert und dort in weniger als 1 ms gemischt. Spritze S1 wurde mit Standardpuffer befüllt, der zum Spülen der Mischkammern und der Küvette diente. Die Flussgeschwindigkeit, mit der das Reaktionsgemisch von der Mischkammer in die Küvette floss, wurde durch das „Spritzenprogramm“ bestimmt. Dieses Spritzenprogramm wurde im MPS-Programm erstellt. Ein Experiment wurde dabei in einzelne Phasen unterteilt. Die Dauer der einzelnen Phasen wurde im MPS-Programm festgelegt. Zusätzlich wurde festgelegt, welches Volumen aus welcher Spritze in die jeweilige Mischkammer ausgestoßen wird. Aus dem gesamten Ausstoßvolumen einer Phase und der Phasendauer ergab sich die Flussgeschwindigkeit. Indem man den Parameter *Synchro 1* auf *on* stellte, bestimmte man den

Zeitpunkt, an dem der Photomultiplier mit der Aufzeichnung der Signale begann. Die Dauer sowie andere Parameter der Aufnahme wurden mit Hilfe der BioKine-Software bestimmt, die unabhängig von der Programmierung der MPS-Software war.

Tabelle 2.4: Beispiel des für die *Stopped-Flow* Messung verwendeten Spritzenprogramms.

Phase	1	2	3	4	5	6
Phasendauer (ms)	50	200	300	200	1300	10
Spritze 1 (µl) (Standardpuffer)		800				
Spritze 2 (µl)						
Spritze 3 (µl) (Proteinlösung)				100		
Spritze 4 (µl) (8-NBD-cAMP)				100		
Synchro 1	On	Off	Off	Off	Off	On
Synchro 2	Off	Off	Off	Off	Off	Off

In Tab. 2.4 ist exemplarisch ein Spritzenprogramm einer Messung dargestellt. Phase 1 dauerte 50 ms und diente dazu die Schrittmotoren der Spritzen zu synchronisieren und die Aufzeichnung des Messsignals mit dem Photomultiplier zu starten. In Phase 2 werden über eine Dauer von 200 ms 500 µl Standardpuffer aus der Spritze S1 mit einer Flussgeschwindigkeit von 2,5 ml/s in das Röhrensystem gepresst, um Reste von Reaktanden der vorherigen Messung zu entfernen. Die Flüssigkeit verblieb für 300 ms im Röhrensystem (Phase 3). In Phase 4 wurden jeweils 100 µl aus Spritze 3 und 4 miteinander gemischt. Bei einer Phasendauer von 200 ms ergab sich eine Flussgeschwindigkeit von 1,0 ml/s. Die Totzeit betrug 31 ms.

2.15.3.3 Datenanalyse der Fluoreszenzmessungen

2.15.3.3.1 Auswertung der kinetischen Daten

Die Datenpunkte der kinetischen Messungen aus den Stopped-Flow-Messungen wurden mit einfach oder doppelt exponentiellen Gleichungen angepasst:

Einfach exponentielle Anpassung:

$$\Delta F = A \cdot (1 - e^{-\kappa \cdot t}) \quad (6)$$

(mit ΔF = Fluoreszenzänderung; A = Amplitude; κ = Ratenkonstante; t = Zeit; Zeitkonstante $\tau = 1/\kappa$)

Doppelt exponentielle Anpassung:

$$\Delta F = A_1 \cdot (1 - e^{-\kappa_1 \cdot t}) + A_2 \cdot (1 - e^{-\kappa_2 \cdot t}) \quad (7)$$

(mit ΔF = Fluoreszenzänderung; A_1 = Amplitude der ersten Komponente; κ_1 = Ratenkonstante der ersten Komponente; A_2 = Amplitude der zweiten Komponente; κ_2 = Ratenkonstante der zweiten Komponente; t = Zeit; Zeitkonstanten: $\tau_1 = 1/\kappa_1$; $\tau_2 = 1/\kappa_2$)

2.15.3.3.2 Auswertung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Titration mit einem Liganden

Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 8.0. Ich habe die Bindungsdaten mit einem einfachen Bindungsschema analysiert:



Die Dissoziationskonstante wird durch das Massenwirkungsgesetz gegeben:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{R * L}{RL} = \frac{(R_t - RL) * (L_t - RL)}{RL} \quad (9)$$

dabei sind R, L und RL die freien Konzentrationen des Rezeptors, des Liganden oder des Rezeptor-Liganden-Komplexes. R_t und L_t bezeichnen die Gesamtkonzentration an Rezeptor und Ligand. Umstellung nach RL ergibt eine quadratische Gleichung, dessen Lösung nur ein gültiges Resultat ergibt:

$$RL = \frac{1}{2} (R + L + K_D) - \sqrt{\frac{1}{4} (R + L + K_D)^2 - R * L} \quad (10)$$

Da ich die Konzentration des RL-Komplexes als Fluoreszenzänderung messe, habe ich einen Normalisierungsfaktor x eingeführt, der die Konzentration von gebundenem 8-NBD-cAMP zu der Fluoreszenzänderung ΔF korreliert:

$$\Delta F = \left(\frac{1}{2} (R + L + K_D) - \sqrt{\frac{1}{4} (R + L + K_D)^2 - R * L} \right) * x \quad (11)$$

Kompetitionsexperimente

Bei den Kompetitionsexperimenten wurde die Bindung von 8-NBD-cAMP oder 8-NBD-cGMP an das Protein in Anwesenheit von cAMP- bzw. cGMP gemessen.

Gleichung (12a) beschreibt die Bindung des fluoreszierenden Liganden in Anwesenheit eines nicht-fluoreszierenden Liganden wie cAMP oder cGMP:

$$K_{Df} = \frac{(R_t - RL_f - RL_n) * (L_{tf} - RL_f)}{RL_f} \quad (12a)$$

Gleichung (12b) beschreibt die Bindung des nicht-fluoreszierenden Liganden in Anwesenheit des fluoreszierenden Liganden.

$$K_{Dn} = \frac{(R_t - RL_f - RL_n) * (L_{tn} - RL_n)}{RL_n} \quad (12b)$$

Dabei bezeichnen:

K_{Df} und K_{Dn} den K_D -Wert des fluoreszierenden bzw. des nicht-fluoreszierenden Liganden; $RL_{f \max}$ und RL_f die Konzentrationen des Protein-fluoreszierender Ligand-Komplex in Abwesenheit und Anwesenheit des nicht-markierten Liganden; RL_n die Konzentration des Protein-nicht-fluoreszierender Ligand-Komplex; L_{tf} und L_{tn} die Gesamtkonzentration des fluoreszierenden bzw. nicht-fluoreszierenden Liganden.

Setzt man die Gleichungen (12a) und (12b) ins Verhältnis und stellt um, ergibt sich Gleichung (13a):

$$\left(1 - \frac{K_{Dn}}{K_{Df}}\right) * RL_f^3 + \left(K_{Dn} - K_{Df} - R_t + R_r * \frac{K_{Dn}}{K_{Df}} - L_{tf} + L_{tn} + 2 * L_{tf} * \frac{K_{Dn}}{K_{Df}}\right) * RL_f^2 + \left(R_t * L_{tf} - \frac{R_t * L_{tf} * K_{Dn}}{K_{Df}} - L_{tf}^2 * \frac{K_{Dn}}{K_{Df}} - L_{tn} * L_{tf} - K_{Dn} * L_{tf} - \frac{R_t * L_{tf} * K_{Dn}}{K_{Df}}\right) * RL_f + \frac{R_t * L_{tf}^2 * K_{Dn}}{K_{Df}} = 0 \quad (13a)$$

Die Lösungen für RL_f wurden mit Hilfe der Cardanischen Formel und dem Satz nach Moivre bestimmt. Man erhält drei verschiedene Lösungen für RL_f , wobei nur zwei Lösungen gültige Resultate ergeben. Je nachdem, ob $K_{Dn} > K_{Df}$ oder $K_{Df} > K_{Dn}$ ist, gilt die eine oder die andere Lösung. Da ich die Konzentration des RL_f -Komplexes als Fluoreszenzänderung messe, habe ich einen Normalisierungsfaktor t eingeführt, der die Konzentration von gebundenem 8-NBD-cAMP zu der Fluoreszenzänderung ΔF korreliert:

$$\Delta F = RL_f * t \quad (13b)$$

3. Ergebnisse

Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle) sind elektrophysiologisch gut untersucht. Alle bekannten CNG-Kanäle werden durch cAMP und cGMP aktiviert. Es fehlen jedoch direkte Messungen der Ligandenbindung. Könnte man Bindungsdaten mit elektrophysiologischen Daten vergleichen, wäre es möglich, einen Einblick in den Schaltmechanismus der CNG-Kanäle zu bekommen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein bakterieller zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (MlCNG) biochemisch untersucht. Die Bindungseigenschaften des Ionenkanals für zyklische Nukleotide wurden eingehend charakterisiert.

Das Kapitel „Ergebnisse“ ist in zwei Teile gegliedert. Der erste Teil beschäftigt sich mit Untersuchungen der isolierten Bindestelle für zyklische Nukleotide. Der zweite Teil umfasst biochemische Untersuchungen am ganzen Kanalprotein.

3.1 Biochemische Charakterisierung der Bindestelle für zyklische Nukleotide

3.1.1 Expression und Reinigung der Bindestelle

Das Plasmid zur Expression der Bindestelle pG-GST-CNBD wurde von Kerstin Novak kloniert (Novak, 2006). Das Genprodukt enthält die Aminosäuren 215-355 des MlCNG-Proteins. Dies entspricht der C-terminalen Domäne nach S6, die den C-Linker und die Bindestelle für zyklische Nukleotide enthält. Dieses Konstrukt werde ich im Folgenden als CNBD („*cyclic nucleotide binding domain*“) bezeichnen. Am 5'-Ende der kodierenden Sequenz für die CNBD wurde das Gen der Glutathion-S-Transferase (GST) angefügt; d. h. die Bindestelle wurde als Fusionsprotein exprimiert. Abbildung 3.1 zeigt schematisch den Aufbau des Fusionsproteins. Zwischen dem GST- und dem CNBD-Bereich des Fusionsproteins befindet sich eine Schnittstelle für die Protease Thrombin. Nach der Bindung des Fusionsproteins an eine GST-Sepharose-4B-Säule lässt sich die CNBD durch Inkubation mit Thrombin abspalten.

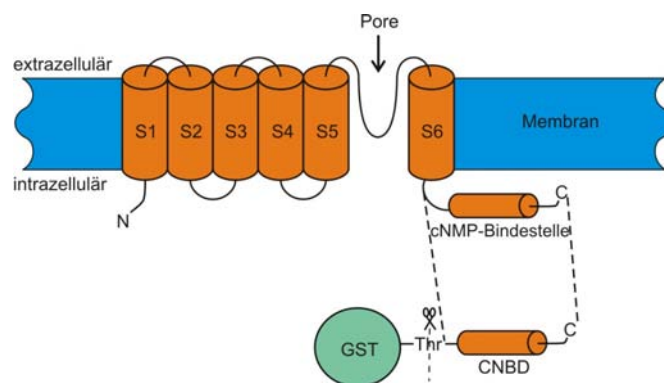


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau einer Untereinheit des MICNG-Proteins und der Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD) als Fusionsprotein mit der GST. Die Thrombin-Schnittstelle (Thr) ermöglicht eine Abspaltung des GST-Bereichs.

Das Protein wurde in BL21-Zellen exprimiert (2.8.1). Um die Expression zu überprüfen, wurden Proben von nicht induzierten und von induzierten Kulturen durch SDS-PAGE (2.11.1) aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. (Abb. 3.2 A). Spur 1 zeigt die Proteine der nicht induzierten Kultur, Spur 2 die Proteine der induzierten Kultur. Das Fusionsprotein erscheint als Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 41 kDa (Pfeil). Das berechnete Molekulargewicht des Fusionsproteins beträgt 40,8 kDa. Es setzt sich aus dem Molekulargewicht der GST (26 kDa) und der CNBD (14,8 kDa) zusammen.

Die Reinigung erfolgte nach dem Aufschluss der Zellen über eine GST-Sepharose-4B-Affinitätschromatographiesäule. Um den Verlauf der Reinigung zu dokumentieren, wurde nach jedem Reinigungsschritt eine Probe entnommen und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde anschließend mit Coomassie-Blau angefärbt (Abb. 3.2 B). Spur 1 enthält alle löslichen Proteine des Bakterienlysats. Man erkennt die Bande des Fusionsproteins bei ca. 41 kDa (oberer Pfeil). In Spur 2 sind die Proteine aufgetragen, die nicht an die Säule gebunden haben. Hier ist die 41 kDa-Bande deutlich schwächer zu erkennen. Der Waschschrift ist in Spur 3 aufgetragen. Die CNBD wurde anschließend durch eine Thrombininkubation von dem an die Säule gebundenen GST-Teil abgespalten und eluiert (Spuren 4 und 5). Die Elutionsfraktionen enthalten eine Bande bei 15 kDa. Das stimmt mit dem errechneten Molekulargewicht der CNBD überein.

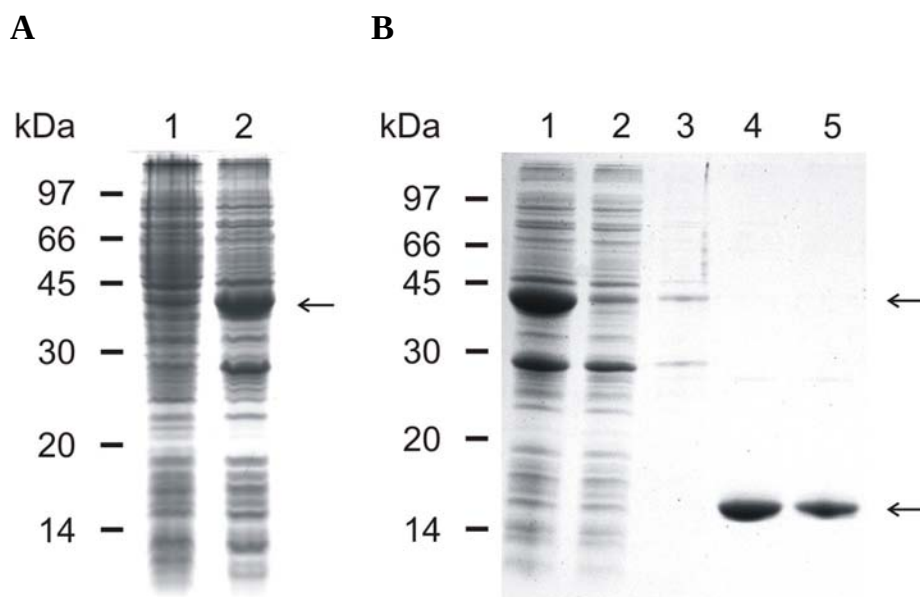


Abb. 3.2: Expression von GST-CNBD (A) und Reinigung der CNBD (B). Coomassie-Blaufärbung von 15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen. Der Größenstandard ist links neben den Teilabbildungen in kDa angegeben. **A:** Expression in BL21-Zellen. Spur 1: nicht-induzierte Kultur (5 % des Gesamtvolumens); Spur 2: mit IPTG induzierte Expressionskultur (5 % des Gesamtvolumens). Der Pfeil markiert das GST-CNBD-Fusionsprotein. **B:** Affinitätschromatographische Reinigung. Spur 1: Säulenauftrag der löslichen Proteine (0,02 % des Gesamtvolumens); Spur 2: Säulendurchfluss (0,02 %); Spur 3: Waschfraktion (0,025 %); Spuren 4 und 5: Elution der CNBD nach Thrombininkubation (je 0,25 %). Der obere Pfeil markiert das GST-CNBD-Fusionsprotein, der untere Pfeil die eluierte CNBD.

3.1.2 Bestimmung von gebundenem cAMP an der CNBD

Das Ziel ist, die Bindung von zyklischen Nukleotiden an die CNBD und das ganze Kanalprotein quantitativ und kinetisch zu charakterisieren. Dies setzt voraus, dass die entsprechenden Proteine frei von gebundenem cAMP sind. Es ist jedoch möglich, dass die Bindeaffinität für cAMP sehr hoch ist und deshalb ein Teil der gereinigten CNBD bzw. des Kanalproteins noch cAMP gebunden hat (Clayton et al., 2004). Für die geplanten Bindungsstudien ist es jedoch wichtig, das Protein ligandenfrei vorliegen zu haben. Daher habe ich zunächst den cAMP-Gehalt der Proben quantitativ mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt.

3.1.2.1 Bestimmung der cAMP-Menge durch Umkehrphasen-HPLC

Bei einer Umkehrphasen-HPLC werden Substanzen nach ihrer Hydrophobizität getrennt. Es findet eine hydrophobe Wechselwirkung des Analyten mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wässrigen Lösungsmittel (hier: KPO_4 -Puffer) statt. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines unpolaren organischen Lösungsmittels (hier: Methanol), das mit dem adsorbierten Analyten um die Bindungsstelle konkurriert. Diese Methode hat sich bei der quantitativen Analyse von Nukleotiden bewährt. Eine LiChrospher RP-18-HPLC-Säule ($5\ \mu\text{m}$ Partikeldurchmesser) wurde mit verschiedenen cAMP-Mengen kalibriert. Der cAMP-Nachweis erfolgte durch Absorptionsmessungen bei 258 nm. Es wurden 60 pmol bis 10 nmol cAMP aufgetragen. Mit dem eingestellten Methanol-Gradienten (2.13.2) eluierte das cAMP nach ca. 8,7 Minuten. Abb. 3.3 zeigt das Elutionsprofil verschiedener cAMP-Mengen, die für die Kalibrierung verwendet wurden.

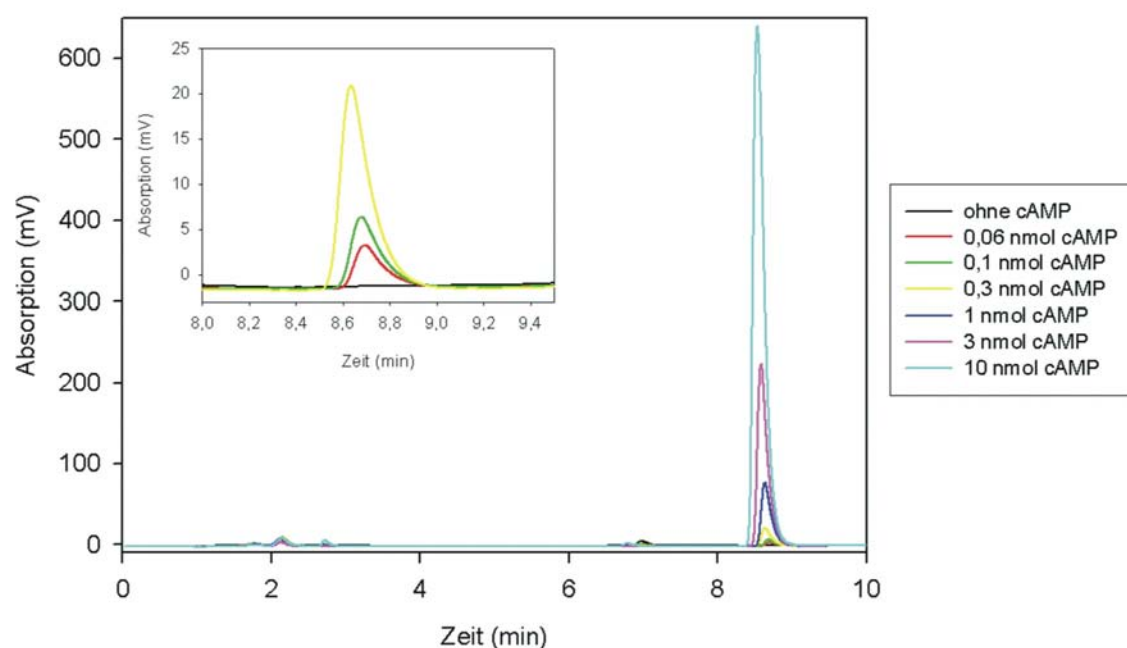


Abb. 3.3: Kalibrierung der LiChrospher RP-18-HPLC-Säule mit cAMP. Dargestellt ist das Elutionsprofil verschiedener cAMP-Mengen (0-10 nmol), die über einen Methanol-Gradienten aufgetrennt wurden. cAMP eluiert nach 8,7 Minuten. Das kleine Fenster zeigt die Elutionsprofile für kleine cAMP-Mengen (0-0,3 nmol).

Die Fläche der Peaks steigt linear mit der cAMP-Menge an. Von den Peakflächen wurden aus Dreifachbestimmungen Mittelwerte gebildet und gegen die jeweilige cAMP-Menge aufgetragen (Abb. 3.4). Die Werte wurden mit einer Geraden angepasst. Steigung und

Achsenabschnitt der Geraden wurden verwendet, um die cAMP-Menge unbekannter Proben zu bestimmen.

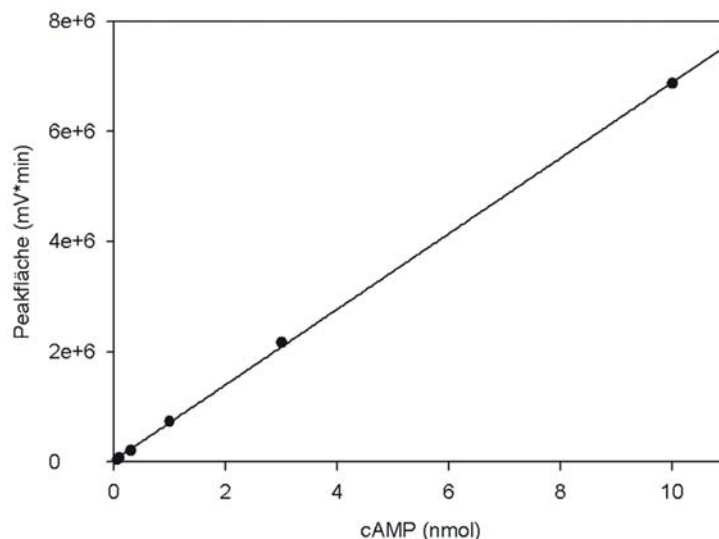


Abb. 3.4: Kalibrierung der cAMP-Mengen mit Hilfe der HPLC. Die jeweilige Peakfläche wurde gegen die cAMP-Menge aufgetragen. Die Punkte wurden mit einer Geraden angepasst. Die Steigung der Geraden beträgt $686.996 \text{ mV} \cdot \text{min} \cdot \text{nmol}^{-1}$, der Achsenabschnitt beträgt $30.578 \text{ mV} \cdot \text{min}$.

3.1.2.2 Spektroskopische Bestimmung der cAMP-Menge

Alternativ zur HPLC habe ich einen spektroskopischen Assay für die Bestimmung der cAMP-Menge verwendet. Hierbei nutzt man die spektroskopischen Unterschiede von cAMP im Vergleich zur CNBD aus. Aus der in 2.13.1 abgeleiteten Formel geht hervor, dass man über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm die cAMP-Menge einer Probe bestimmen kann. Eine wichtige Voraussetzung ist die Kenntnis von A_{260}/A_{280} für cAMP sowie für die CNBD ohne cAMP.

Das Verhältnis A_{260}/A_{280} für cAMP wurde für verschiedene cAMP-Konzentrationen bestimmt, indem die Absorption bei 260 und bei 280 nm gemessen wurde. Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis wurde für alle Konzentrationen berechnet (Tabelle 3.1). Der Mittelwert für das A_{260}/A_{280} -Verhältnis für cAMP betrug 7,4.

Tabelle 3.1: Absorption von freiem cAMP bei 260 und bei 280 nm.

cAMP (μM)	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
3	0,038	0,005	7,6
10	0,126	0,016	7,8
30	0,388	0,057	6,8
100	1,290	0,174	7,4
Mittelwert			7,4

Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis der cAMP-freien CNBD wurde aus den molaren Extinktionskoeffizienten für Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bei 260 nm und 280 nm berechnet. Abb. 3.5 A zeigt die Absorptionsspektren dieser drei Aminosäuren im UV-Bereich. Bei 260 nm absorbiert Tryptophan (Trp) am stärksten; der molare Extinktionskoeffizient ist $3765 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, gefolgt von Tyrosin (Tyr) mit $612 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und Phenylalanin (Phe) mit $144 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Auch bei 280 nm bleibt diese Absorptionsreihenfolge bestehen. Die molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm sind für Trp $5502 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, für Tyr $1209 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und für Phe $2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Quelle: <http://omlc.org.edu/spectra/PhotochemCAD/html/index.html>).

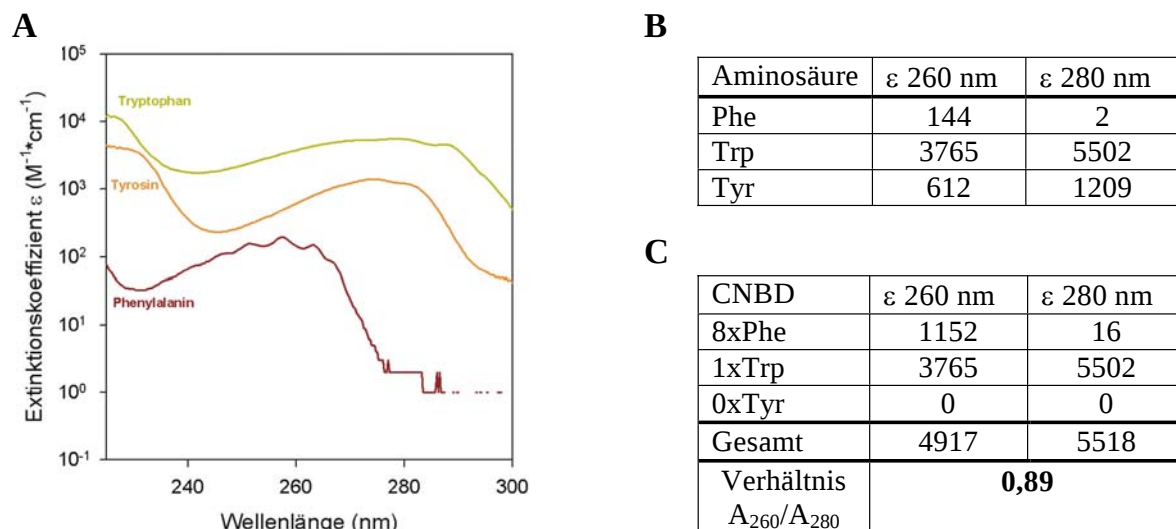


Abb. 3.5: Absorptionseigenschaften **A:** Absorptionsspektren der Aminosäuren Phe (braun), Tyr (orange) und Trp (grün). **B:** Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Phe, Tyr und Trp bei 260 und 280 nm. **C:** Berechnete Extinktionskoeffizienten für das CNBD-Protein bei 260 und 280 nm.

Für die CNBD ergibt sich ein theoretisches A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 0,89. Abb. 3.6 zeigt den Zusammenhang zwischen dem A_{260}/A_{280} -Verhältnis und dem jeweiligen Konzentrationsverhältnis $c(\text{cAMP})/c(\text{CNBD})$.

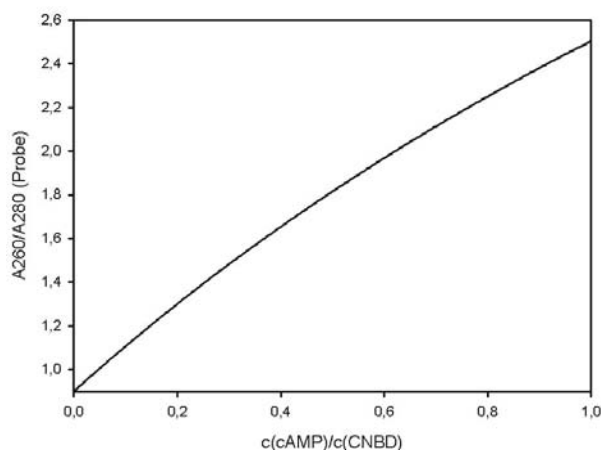


Abb. 3.6: Zusammenhang zwischen A_{260}/A_{280} und $c(\text{cAMP})/c(\text{CNBD})$. Aufgetragen ist das A_{260}/A_{280} -Verhältnis gegen das Verhältnis der Konzentrationen von cAMP und der CNBD.

3.1.2.3 Ergebnisse der cAMP-Bestimmung mit Hilfe der HPLC und der Spektroskopie

Von verschiedenen Präparationen der CNBD wurden mehrere HPLC-Versuche durchgeführt. Vor jedem HPLC-Lauf habe ich das Protein mit Perchlorsäure gefällt (2.13.2), so dass das gebundene cAMP freigesetzt und über die Säule aufgetrennt wurde.

Der prozentuale molare cAMP-Gehalt der Probe schwankte zwischen 63 % und 109 % bezogen auf die eingesetzte Proteinkonzentration. Es wurde ein durchschnittlicher cAMP-Gehalt von $84,2 \% \pm 12,4 \%$ erhalten (25 Messungen, 9 Präparationen). Abb. 3.7 zeigt einen typischen HPLC-Lauf für 2 nmol der CNBD. Das cAMP eluiert nach 8,8 Minuten. Die Fläche des Peaks betrug 1.006.761 mV*min, was einer cAMP-Menge von 1,42 nmol entspricht.

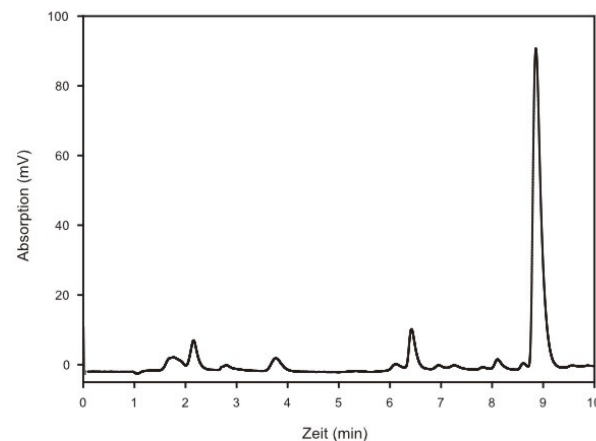


Abb. 3.7: cAMP-Bestimmung durch Umkehrphasen-HPLC. 2 nmol CNBD wurden gefällt; der Überstand wurde aufgetragen. Die cAMP-Menge betrug 1,42 nmol (Peak bei 8,8 Minuten), was einer Belegung von 71 % entspricht.

Bei einer cAMP-Bestimmung der gleichen Präparation über die Absorption wurde ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 2,05 erhalten. Das entspricht einem molaren Verhältnis von cAMP zu Protein von 0,67; d. h. 67 % der Bindestellen sind mit cAMP besetzt. Die Werte, die durch die beiden unterschiedlichen Methoden (Absorption und HPLC) erhalten wurden, sind für diese Messung ähnlich (67 % versus 71 %). Aus den Absorptionsmessungen wurde für die CNBD ein durchschnittlicher cAMP-Gehalt von $61,3 \% \pm 6,6 \%$ erhalten (15 Messungen, 10 Präparationen). Der durchschnittliche cAMP-Gehalt aus den HPLC-Messungen liegt etwas höher (84,2 %). Beide Methoden zeigen, dass ein großer Anteil des Proteins mit cAMP besetzt ist. Das deutet auf eine hohe Affinität für cAMP hin.

3.1.3 Entfernen des cAMP von der Bindestelle

Da es für Bindungsmessungen wichtig ist, dass die Bindestelle unbesetzt ist, musste das cAMP entfernt werden. Die Denaturierung und Rückfaltung des Proteins hat sich hier als Methode der Wahl herausgestellt (Novak, 2006). Dabei wird die CNBD durch chaotrope Salzbedingungen entfaltet, wodurch das gebundene cAMP freigesetzt wird. Anschließend kann das cAMP durch einen einfachen Pufferaustausch entfernt werden. Danach wird das cAMP-freie Protein wieder zurückgefaltet.

3.1.3.1 Denaturierung

Große Mengen (20-100 mg) der CNBD wurden über eine GST-Sepharose-4B-Säule gereinigt (2.9.3). Nach der Affinitätschromatographie wurde der molare cAMP-Gehalt der Proteinprobe durch eine Absorptionsmessung bestimmt. Dieser lag zwischen 44,6 % und 75,9 % (A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,72 bis 2,19). Das Protein wurde mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid über einen Pufferaustausch auf einer PD-10-Säule denaturiert. Dadurch wurde das Protein entfaltet. Das freigewordene cAMP blieb auf der Säule zurück. Dieser Pufferaustausch wurde so oft wiederholt, bis das Eluat kein cAMP mehr enthielt. Dafür waren zwei Durchgänge notwendig. Tabelle 3.2 zeigt den Verlauf der Denaturierung für einen Versuch.

Tabelle 3.2: Prozentualer cAMP-Gehalt des gereinigten CNBD-Proteins vor und nach der Denaturierung.

	A_{260}/A_{280} -Verhältnis	% cAMP
Vor Denaturierung	1,97	60,7
Nach 1. PD-10 Durchlauf	0,95	2,6
Nach 2. PD-10 Durchlauf	0,86	0

3.1.3.2 Rückfaltung

Das denaturierte Protein wurde mit Hilfe der „*rapid dilution*“ Methode (Sondermann & Jacob, 1999; Zhang et al., 2002) zurückgefaltet. Durch tropfenweise Verdünnung des Proteins in ein 10-faches Volumen des Renaturierungspuffers wird das chaotrope Guanidiniumhydrochlorid so weit verdünnt, dass es nicht mehr denaturierend wirkt. Der Renaturierungspuffer enthielt L-Arginin, das die Rückfaltung begünstigt. Nach der Renaturierung wurde die Probe eingeengt. Um die Homogenität der Probe zu überprüfen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (2.9.5). Abb. 3.8 zeigt das Elutionsdiagramm einer renaturierten CNBD-Probe im Vergleich zu einer nicht denaturierten Probe. Das cAMP-freie Protein eluiert nach ca. 75 ml. Im Vergleich zu der cAMP-gebundenen Form, das bei 77 ml eluiert, ist der Peak leicht verschoben. Die Verschiebung ist möglicherweise auf ein verändertes Laufverhalten der cAMP-freien Form zurückzuführen. Es

könnte aber auch sein, dass die Konformation des Proteins nach der Rückfaltung nicht identisch mit der nativen Struktur ist.

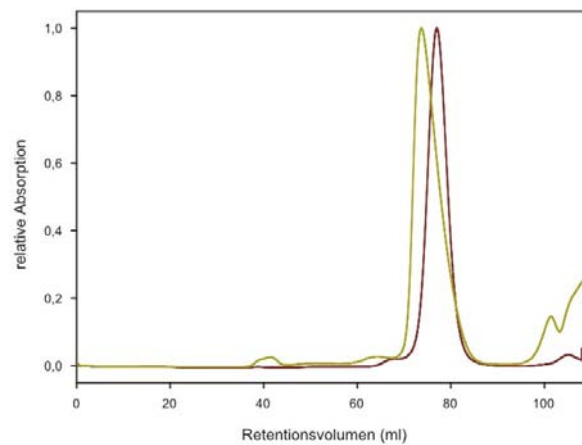


Abb. 3.8: Vergleich der Größenausschlusschromatographie von cAMP-freiem und cAMP-gebundenem CNBD-Protein. Gezeigt ist das Laufverhalten auf einer Superdex-75 pg-Säule vor der Denaturierung (braune Linie) und nach der Rückfaltung (grüne Linie).

3.1.4 Charakterisierung der Bindungseigenschaften mit der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Bindungseigenschaften der cAMP-freien CNBD wurden mit der isothermalen Titrationskalorimetrie (2.15.1) untersucht. Diese Methode erlaubt eine vollständige thermodynamische Charakterisierung von Bindungsreaktionen. Hierbei wird die Bindungsenthalpie ΔH gemessen, die bei der Titration eines Liganden zu einem Rezeptor freigesetzt oder verbraucht wird. Bei einer exothermen Reaktion entstehen positive und bei einer endothermen Reaktion negative Wärmeänderungen. Eine definierte Menge an Ligand wird wiederholt in die Messzelle injiziert und die Wärmeänderung pro Injektion ermittelt. Aus der Änderung der Wärme und den Konzentrationen an Ligand und Rezeptor lassen sich die Bindungsenthalpie ΔH , die Bindungskonstante K_B und die Bindungsstöchiometrie N ermitteln. Über den Zusammenhang $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_B$ lassen sich die freie Bindungsenergie ΔG und die Entropie ΔS errechnen (R = Gaskonstante; T = Temperatur in Kelvin). Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich aus dem reziproken Wert von K_B .

Ein Vorteil der Methode ist, dass die Reaktion in freier Lösung im gewünschten Puffer ablaufen kann. Der Bindungspartner muss weder immobilisiert noch markiert sein. Ein

Nachteil ist, dass Ligand und Rezeptor für ein auswertbares Signal in mikromolaren Konzentrationen benötigt werden. Bindungsaffinitäten im subnanomolaren Bereich können nicht nachgewiesen werden (Doyle, 1997).

3.1.4.1 Die CNBD bindet cAMP mit submikromolarer Affinität

Die Reaktionszelle wurde jeweils mit einer Lösung der cAMP-freien CNBD befüllt. Die Zugabe von 4-5 μ l des Liganden cAMP erfolgte mit einer computergesteuerten 250 μ l-Spritze. Die cAMP-Konzentration lag 10,6-15,5-mal höher als die Proteinkonzentration. Um eine korrekte Auswertung zu garantieren, sollte die Proteinkonzentration 1- bis 1000-mal höher liegen als der K_D -Wert. Das Verhältnis der eingesetzten Proteinkonzentration zum K_D -Wert nennt man c-Wert. Er wird in Tabelle 3.3 angegeben.

Die Experimente wurden in PBS bei 25°C durchgeführt. Um das Protein mit dem Puffer zu äquilibrieren, wurde das Protein über eine PD-10-Säule in PBS umgepuffert. In diesem Puffer wurde auch das cAMP angesetzt. So werden artifizielle Wärmeänderungen vermieden, die durch Unterschiede in den Puffern für Ligand und Rezeptor entstehen können.

Um die Rohdaten exakt auszuwerten, sollten auch die Wärmeänderungen berücksichtigt werden, die bei der Titration des Liganden in Puffer sowie bei der Titration von Puffer in Proteinlösung entstehen. Diese Wärmeänderungen sind unabhängig von der eigentlichen Bindungsreaktion. Sie werden auch als Verdünnungswärme bezeichnet. Ich habe jeweils die Verdünnungswärme des Liganden bestimmt. Auf die Titration von Puffer in Proteinlösung habe ich verzichtet, da die Verdünnungswärme des Liganden größer ist als die des Proteins (Pierce et al., 1999). Von den Wärmeänderungen des Kontrollperiments wurde ein Mittelwert gebildet, der von den Wärmeänderungen des eigentlichen Experiments abgezogen wurde.

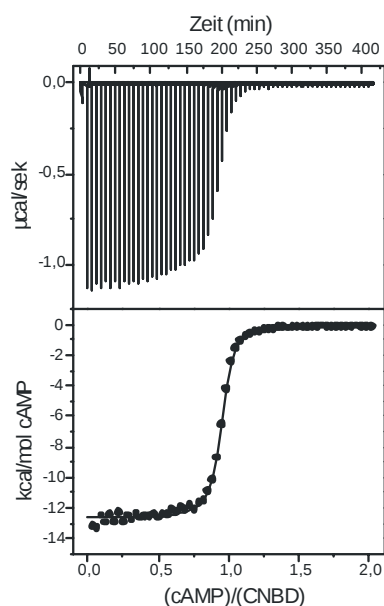


Abb. 3.9: Isothermale Titrationskalometrie der Bindungsreaktion der CNBD mit cAMP. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Wärmeänderungen, die bei der Injektion von 4 µl cAMP (600 µM Stocklösung) zu 56,7 µM der CNBD auftreten. Die Peaks wurden integriert, auf die cAMP-Konzentration normiert und gegen das cAMP/CNBD-Verhältnis aufgetragen (unterer Teil). Die durchgezogene Linie repräsentiert eine Kurvenanpassung in Anlehnung an ein einfaches Bindungsmodell. Der K_D -Wert betrug 107 nM, die Bindungsstöchiometrie N war 0,94.

Der obere Teil von Abb. 3.9 zeigt eine Messung, in der jeweils 4 µl einer 600 µM cAMP-Lösung zu einer 56,7 µM CNBD-Lösung titriert wurden. Für den ersten Messpunkt wurde eine Injektion von nur 0,5 µl cAMP vorgenommen, die in die Auswertung nicht einbezogen wurde, da eventuell noch Luftblasen im Spritzensystem vorhanden sein könnten. Die Flächen unter den anderen Peaks wurden durch Integration bestimmt. Die Verdünnungswärme des Liganden betrug 142 J/mol. Im unteren Teil der Abbildung wurden die Bindungswärmen auf die cAMP-Konzentration normiert und als Funktion der Ligandenkonzentration dargestellt.

Aus vier unabhängigen Messungen wurde durchschnittlich eine Dissoziationskonstante K_D von 107 nM und eine Bindungsstöchiometrie von $N = 0,98$ erhalten. Dies zeigt, dass die Bindungsdomäne eine recht hohe Affinität für cAMP besitzt. Außerdem zeigt die Bindungsstöchiometrie von etwa 1, dass jedes CNBD-Molekül ein Molekül cAMP bindet und somit alle CNBD-Moleküle in renaturiertem Zustand vorliegen und korrekt gefaltet sind. Tabelle 3.3 zeigt eine Zusammenfassung der vier Messungen.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der ITC-Daten für die cAMP-Titration mit der CNBD.

Nr.	CNBD (μM)	cAMP (μM)	Injektion (μl)	N	$K_B (M^{-1})$	$K_D (nM)$	c-Wert
1	84,7	1000	5	1,00	$8,35 \cdot 10^6$	120	706
2	36,0	400	4	1,13	$1,07 \cdot 10^7$	93	387
3	56,7	600	4	0,94	$9,31 \cdot 10^6$	107	530
4	77,6	1200	4	0,85	$9,29 \cdot 10^6$	108	719
Ø ¹				$0,98 \pm 0,12$	$9,41 \cdot 10^6 \pm 0,97 \cdot 10^6$	107 ± 11	

¹Mittelwerte ± s.d.

Die thermodynamischen Parameter der vier Messungen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Thermodynamische Parameter der Bindungsreaktion von cAMP mit der CNBD.

Nr.	$\Delta H (kJ/mol)$	$\Delta S (J/(mol \cdot K))$	$\Delta G (kJ/mol)$
1	-55,6	-54,0	-39,5
2	-54,8	-49,4	-40,0
3	-52,8	-43,6	-39,8
4	-53,2	-45,0	-39,8
Ø ¹	$-54,1 \pm 1,3$	$-48,0 \pm 4,7$	$-39,8 \pm 0,2$

¹Mittelwerte ± s.d.

3.1.4.2 CNBD bindet neben cAMP auch cGMP sowie deren Analoga

Neben cAMP wurden weitere Liganden getestet. Auch diese Messungen wurden in PBS bei 25°C durchgeführt. Die Ligandenkonzentrationen wurden so gewählt, dass sie 10 bis 20-fach über der Proteinkonzentration lagen. Für jeden Liganden wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Proteinkonzentration variierte in den Messungen von 20 μM bis 85 μM. Die Injektionen lagen zwischen 4 und 6 μl. Abb. 3.10 zeigt repräsentative ITC-Messungen der getesteten Liganden.

Der K_D -Wert für cGMP lag bei 499 ± 69 nM. Die CNBD bindet cGMP also mit einer fünf Mal niedrigeren Affinität als cAMP. 8-Br-cAMP bindet mit einer ähnlichen Affinität wie cAMP mit einem K_D -Wert von 127 ± 11 nM, der K_D -Wert für 8-Br-cGMP beträgt 236 ± 23 nM. Die höchste Affinität der getesteten Liganden besaßen 8-NBD-cAMP und

8-CPT-cAMP mit K_D -Werten von $24 \pm 1,5$ nM bzw. 34 ± 25 nM. 8-CPT-cGMP hat die niedrigste Affinität mit einem K_D -Wert von ca. $2,8 \pm 0,07$ μ M. Tabelle 3.5 fasst die Daten aller getesteten Liganden zusammen.

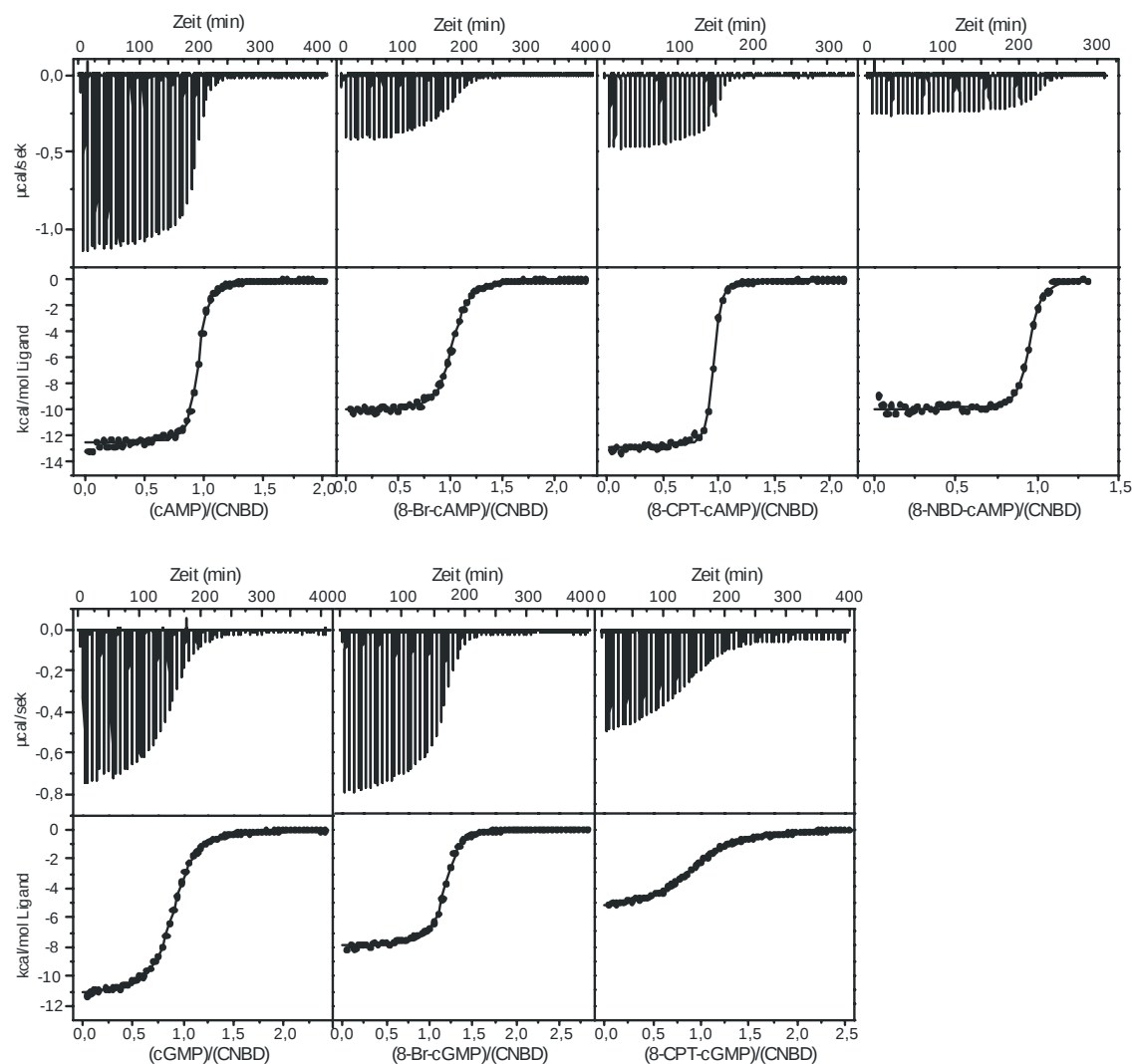


Abb. 3.10: Bindung verschiedener cAMP- und cGMP-Analoga an das CNBD-Protein. Im oberen Teilabschnitt sind repräsentative ITC-Messungen der CNBD mit cAMP und drei verschiedenen cAMP-Analoga (8-Br-cAMP; 8-CPT-cAMP; 8-NBD-cAMP) gezeigt. Im unteren Teil sind ITC-Messungen mit cGMP und zwei weiteren Analoga (8-Br-cGMP; 8-CPT-cGMP) gezeigt. Weitere Erklärungen siehe Legende aus Abb. 3.9.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der ITC-Daten der getesteten Liganden.

Ligand ²	N ¹	K _B (M ⁻¹) ¹	K _D (nM) ¹	c-Wert
cAMP (4)	0,98 ± 0,12	9,41*10 ⁶ ± 0,97*10 ⁶	107 ± 11	387-719
8-Br-cAMP (3)	0,95 ± 0,06	7,91*10 ⁶ ± 0,65*10 ⁶	127 ± 11	175-279
8-CPT-cAMP (3)	0,91 ± 0,08	3,89*10 ⁷ ± 2,02*10 ⁷	34 ± 25	630-947
8-NBD-cAMP (3)	0,84 ± 0,10	4,26*10 ⁷ ± 0,33*10 ⁷	24 ± 1,5	750-828
cGMP (3)	0,97 ± 0,08	2,03*10 ⁶ ± 0,28*10 ⁶	499 ± 69	48-149
8-Br-cGMP (3)	1,10 ± 0,06	4,28*10 ⁶ ± 0,41*10 ⁶	236 ± 23	130-184
8-CPT-cGMP (3)	0,88 ± 0,10	3,66*10 ⁵ ± 0,13*10 ⁵	2770 ± 70	13-19

¹Mittelwerte ± s.d.; ²(Anzahl der Versuche)

Das ergibt eine Affinitätsreihenfolge von:

8-NBD-cAMP>8-CPT-cAMP>cAMP>8-Br-cAMP>8-Br-cGMP>cGMP>8-CPT-cGMP

Die thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Anhand der freien Energie ΔG kann man den Umfang der exothermen Reaktion erkennen. Es zeigt sich, dass die freie Energie ΔG für 8-NBD-cAMP bzw. für 8-CPT-cAMP am größten und für 8-CPT-cGMP am niedrigsten ist. Für die anderen Liganden sind die Werte für ΔG sehr ähnlich. Da ΔG und K_B äquivalente Größen sind, die die Affinität beschreiben, ist die freie Energie bei der Bindung einer hochaffinen Substanz negativer als bei der Bindung einer niedrig affinen Substanz.

Tabelle 3.6: Thermodynamische Parameter der Bindungsreaktion der getesteten Liganden mit der CNBD.

Ligand	ΔH (kJ/mol) ¹	ΔS (J/(mol*K)) ¹	ΔG (kJ/mol) ¹
cAMP	-54,1 ± 1,3	-48,0 ± 4,7	-39,8 ± 0,2
8-Br-cAMP	-42,6 ± 0,4	-9,8 ± 0,7	-39,4 ± 0,2
8-CPT-cAMP	-55,7 ± 2,3	-42,3 ± 13,2	-43,1 ± 1,7
8-NBD-cAMP	-46,0 ± 3,8	-8,2 ± 11,8	-43,5 ± 0,2
cGMP	-46,2 ± 1,3	-34,1 ± 3,5	-36,0 ± 0,4
8-Br-cGMP	-33,0 ± 0,2	16,5 ± 0,9	-38,5 ± 0,9
8-CPT-cGMP	-22,8 ± 0,3	30,0 ± 0,7	-31,8 ± 0,1

¹Mittelwerte ± s.d.; Anzahl der Versuche wie in Tab. 3.5.

Die Bindungsenthalpie ΔH ist in allen Fällen negativ, die Entropie ΔS ist für die Liganden 8-Br-cGMP und 8-CPT-cGMP positiv, für alle anderen Liganden negativ. Bei der Bindung

von 8-Br-cGMP und 8-CPT-cGMP an die CNBD ist die Reaktion also hauptsächlich enthalpiegetrieben und z. T. entropiegetrieben, bei den anderen Liganden ist die Reaktion rein enthalpiegetrieben. Die thermodynamischen Daten sind in Abb. 3.11 zusammenfassend graphisch dargestellt.

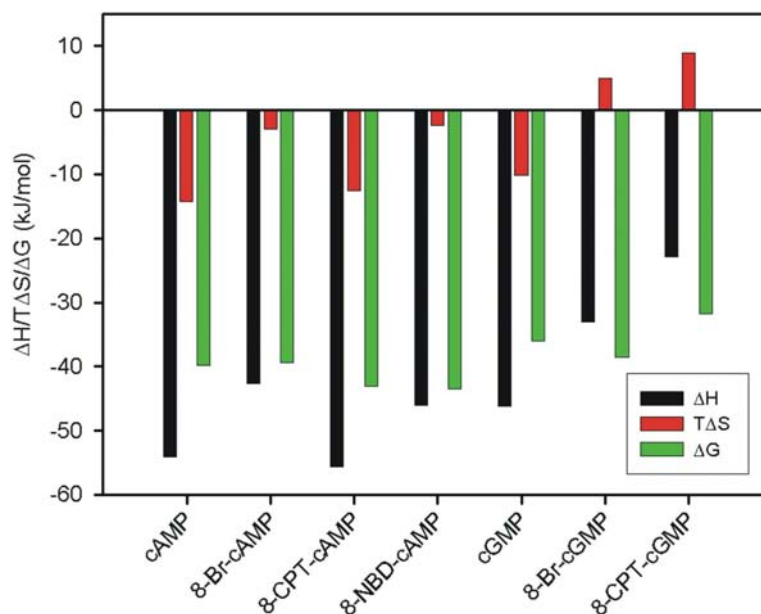


Abb. 3.11: Graphische Darstellung der thermodynamischen Daten der Bindung verschiedener Liganden an die CNBD. Dargestellt sind die Bindungsenthalpie ΔH (schwarze Balken), die Bindungsentropie ΔS multipliziert mit der Temperatur T (298 K; rote Balken) und die freie Bindungsenergie ΔG (grüne Balken).

3.1.4.3 Verhalten der CNBD in Detergenz

Die CNBD liegt überwiegend als Monomer vor, während der gesamte Kanal als Tetramer vorliegt. Ein Ziel meiner Arbeit war herauszufinden, ob die Ligandenaffinität des Monomers anders ist als die des Gesamtkanals. Da die Messung der Bindungsaffinität für den Gesamtkanal in Detergenzlösung erfolgte, wurde die cAMP-Bindung an die CNBD ebenfalls in Anwesenheit von 5 mM Decylmaltopyranosid (DM) mit der ITC bestimmt. Außerdem wurde getestet, ob die Ionenstärke und der pH-Wert einen Einfluß auf die Bindungsaffinität haben. In PBS (10 mM NaP; 130 mM NaCl; pH 7,4), welches 5 mM DM enthielt, erhält man einen durchschnittlichen K_D -Wert von 177 nM (2 Messungen). In Standardpuffer (20 mM NaP; 295 mM NaCl; 5 mM KCl; 5mM DM; pH 8,0) erhält man einen durchschnittlichen K_D -Wert von 183 nM (2 Messungen). Die Bindungsaffinität scheint also innerhalb eines

pH-Bereichs von 7,4-8,0 und eines Salzkonzentrationsbereichs von 130-300 mM unabhängig von pH-Wert und Ionenstärke zu sein. Die Werte für ΔG liegen für die Messungen mit Detergenz etwas höher (-38 kJ/mol) als für die Messungen ohne Detergenz (-40 kJ/mol). Gegenüber den Messungen ohne Detergenz erhält man einen um den Faktor 1,7 erhöhten K_D -Wert. Möglicherweise ist die Bindungsdomäne in Detergenzlösung für cAMP schlechter zugänglich. Deshalb kann die gemessene Affinität des Gesamtkanalproteins um diesen Faktor höher liegen als der tatsächliche K_D -Wert.

3.1.5 Messung der Bindungsaffinitäten der CNBD mit einem Fluoreszenzassay

Ich habe die Bindungsaffinität auch mit einem Fluoreszenzassay bestimmt, bei dem ich kleinere Mengen Protein (2 nmol) verwenden kann als bei der ITC (25-250 nmol). Als Bindungsindikator wurde das fluoreszierende cAMP-Analog 8-NBD-cAMP verwendet. Die NBD-Gruppe ist ein umgebungssensitiver Farbstoff, der in hydrophober Umgebung stark und in wässriger Lösung schwach fluoresziert. Bindet 8-NBD-cAMP, so ändert sich die dielektrische Umgebung und das Molekül ändert seine Fluoreszenz. Der Farbstoff wurde bei 471 nm angeregt. Die Emission des Farbstoffs wurde bei 530 nm gemessen. Bei allen Experimenten wurde die Hintergrundfluoreszenz von 8-NBD-cAMP von den Messwerten abgezogen.

3.1.5.1 Bestimmung des K_D -Wertes von 8-NBD-cAMP

Um die Konzentrationsabhängigkeit der 8-NBD-cAMP-Bindung zu bestimmen, wurde das Protein mit verschiedenen Konzentrationen 8-NBD-cAMP gemischt. Die Fluoreszenz des 8-NBD-cAMP wurde solange gemessen, bis 10 Datenpunkte nach der Einstellung des Bindegleichgewichtes aufgezeichnet waren. Diese wurden gemittelt. Jede Konzentration wurde viermal bestimmt. Die Fluoreszenzwerte wurden gegen die 8-NBD-cAMP-Konzentration aufgetragen (Abb. 3.12 C). An die Datenpunkte wurde ein einfaches Bindungsmodell angepasst (Gleichung (11)). Für die Anpassung ist es wichtig, die Proteinkonzentration, die für die Bindungsreaktion zur Verfügung steht (also ohne aggregiertes oder denaturiertes Protein) genau zu kennen. Dabei wird vorausgesetzt, dass ein

CNBD-Molekül ein 8-NBD-cAMP-Molekül bindet. Um die Proteinkonzentration exakt zu bestimmen, bin ich folgendermaßen vorgegangen: Ich habe zunächst die Zunahme der Fluoreszenz einer geringen 8-NBD-cAMP-Konzentration ($0,1 \mu\text{M}$) mit steigenden CNBD-Konzentrationen untersucht (Abb. 3.12 A). Das Fluoreszenzsignal steigt mit der CNBD-Konzentration an und sättigt schließlich bei ca. $2 \mu\text{M}$. Ich schließe daraus, dass bei Konzentrationen $\geq 2 \mu\text{M}$ das 8-NBD-cAMP quantitativ an die CNBD gebunden vorliegt. Ich kann hieraus die Fluoreszenzänderung ΔF pro μM gebundenem 8-NBD-cAMP bestimmen. In diesem Fall liegt der Wert bei $25.000 \mu\text{M}^{-1}$. Titriert man nun eine gegebene CNBD-Menge mit 8-NBD-cAMP, so lässt sich aus dem maximalen Fluoreszenzsignal durch die Kalibrierung die Konzentration des Proteins bestimmen, das an der Bindungsreaktion teilnimmt.

Abb. 3.12 B zeigt eine solche Kalibrierung für die Titration in Teilabbildung C. An die Fluoreszenzwerte für die drei niedrigsten 8-NBD-cAMP-Konzentrationen wurde eine Regressionsgerade angepasst. Die Steigung der Geraden gibt die Fluoreszenzänderung ΔF pro μM 8-NBD-cAMP wieder. Sie betrug hier $14.019 \mu\text{M}^{-1}$. Der Sättigungswert der Titration lag bei 36.700. Daraus berechnet man eine Proteinkonzentration von $2,6 \mu\text{M}$. Mit diesem Wert lässt sich nun ein einfaches Bindungsmodell nach Gleichung (11) an die Messwerte in Abb. 3.12 C anpassen.

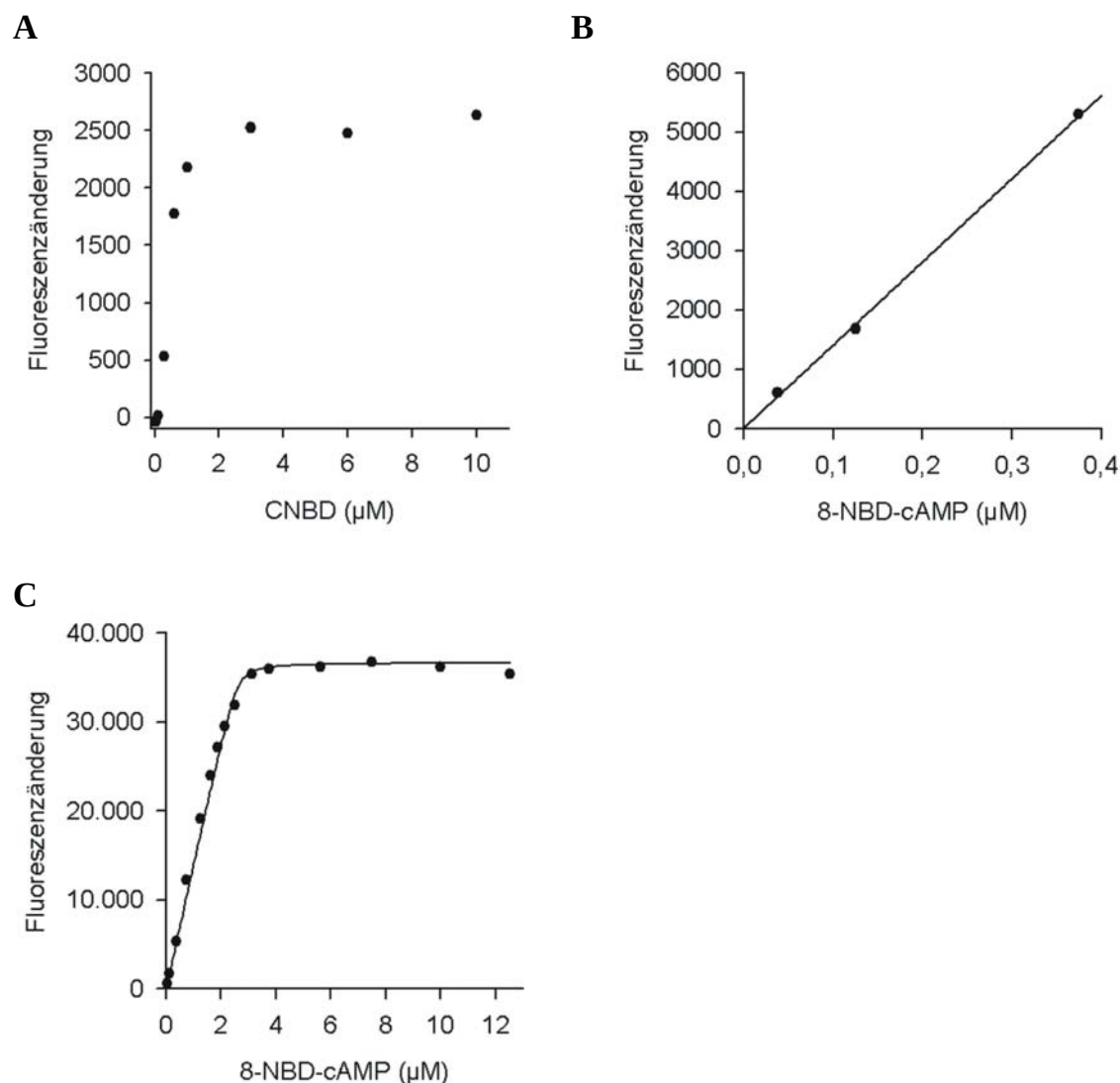


Abb. 3.12: Bindung von 8-NBD-cAMP an die CNBD. **A:** Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von $0,1 \mu\text{M}$ 8-NBD-cAMP an die CNBD. **B:** Linearer Anstieg der Fluoreszenz bei kleinen 8-NBD-cAMP-Konzentrationen. Die durchgezogene Linie repräsentiert eine lineare Regression. Aus der Steigung wurde eine Fluoreszenzänderung ΔF von $14.019 \mu\text{M}^{-1}$ 8-NBD-cAMP bestimmt. **C:** Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von 8-NBD-cAMP an $2,6 \mu\text{M}$ CNBD. Die durchgezogene Linie repräsentiert eine Anpassung in Anlehnung an ein einfaches Bindungsmodell. Der K_D -Wert für 8-NBD-cAMP betrug $17,5 \text{ nM}$.

Aus der Anpassung erhalte ich einen K_D -Wert von $17,5 \text{ nM}$. Dieser Wert ist gut vergleichbar mit dem K_D -Wert für 8-NBD-cAMP aus der ITC-Messung (24 nM). Für die Auswertung der folgenden Konkurrenzexperimente wurde dieser Wert von $17,5 \text{ nM}$ verwendet.

3.1.5.2 Bestimmung der K_D -Werte von cAMP und cGMP

Die Dissoziationskonstante K_D der CNBD für cAMP und cGMP wurde durch Konkurrenzexperimente mit 8-NBD-cAMP bestimmt. Das ist auf zwei Arten möglich. Entweder wird die Proteinprobe mit einer 8-NBD-cAMP-Konzentration gemischt und mit dem nicht-fluoreszierenden Liganden titriert oder umgekehrt, die Proteinprobe wird mit dem nicht-fluoreszierenden Liganden gemischt und mit 8-NBD-cAMP titriert. Mit der ersten Art dieses Experimentes habe ich eine Messung für cAMP und cGMP durchgeführt (Abb. 3.13 A), mit der zweiten Art habe ich 14 Datensätze für cAMP gemessen (Abb. 3.13 B).

Die CNBD (2 μ M) wurde mit verschiedenen cAMP- oder cGMP-Konzentrationen vorinkubiert. Anschließend wurden alle Proben mit 0,5 μ M 8-NBD-cAMP gemischt. Abb. 3.13 A zeigt, dass sowohl cAMP als auch cGMP die Fluoreszenzsignale des 8-NBD-cAMP dosisabhängig reduzieren. Passt man ein kompetitives Bindungsmodell (Gleichung (13b)) an die Datensätze an, so erhält man die K_D -Werte für cAMP und cGMP. Der K_D -Wert für cAMP betrug in diesem Versuch 56,5 nM, der für cGMP 346 nM.

Abb. 3.13. B zeigt den dosisabhängigen Fluoreszenzanstieg von 8-NBD-cAMP in Gegenwart von 5 verschiedenen cAMP-Konzentrationen in der Probe. An jeden einzelnen Datensatz wurde mit Gleichung (13b) das kompetitive Bindungsmodell angepasst. Der mittlere K_D -Wert für cAMP betrug $63,2 \pm 13,4$ nM (14 Datensätze). Mit beiden Arten des Konkurrenzexperimentes wurden ähnliche K_D -Werte für cAMP erhalten.

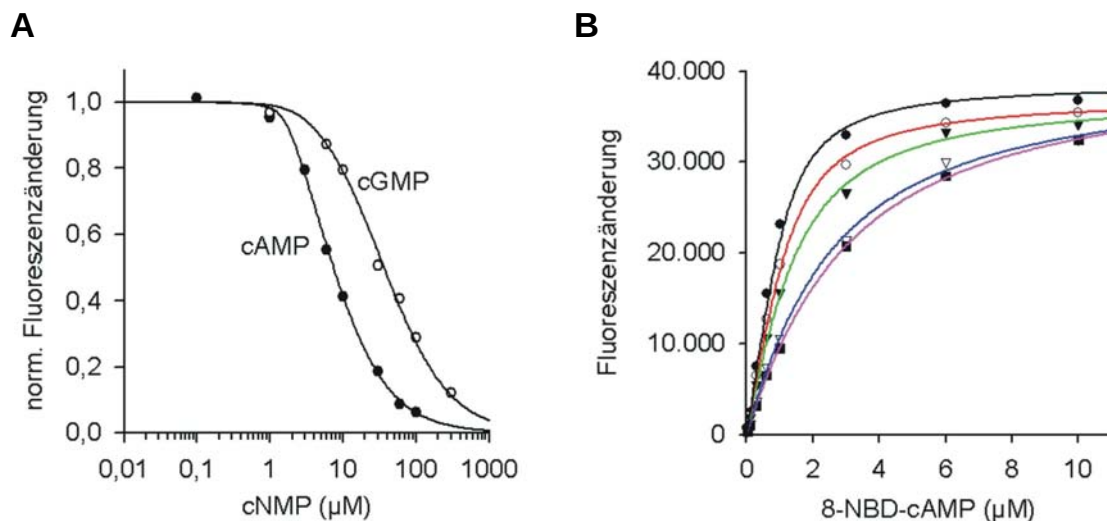


Abb. 3.13: **A:** Konkurrenz zwischen cAMP bzw. cGMP und 0,5 μM 8-NBD-cAMP bei Bindung an 2,0 μM der CNBD. Gezeigt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Inhibition der Bindung von 8-NBD-cAMP durch cAMP (geschlossene Kreise) und cGMP (offene Kreise). Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen nach Gleichung (13b; 2.15.3.3.2). Der K_D -Wert für cAMP betrug 56,5 nM, der für cGMP 346 nM. **B:** Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von 8-NBD-cAMP an 1,6 μM CNBD in Gegenwart von 5 verschiedenen cAMP-Konzentrationen (geschlossene Kreise: 1 μM cAMP; offene Kreise 2 μM ; geschlossene Dreiecke: 3 μM ; offene Dreiecke 6 μM ; geschlossene Quadrate: 10 μM). Die Daten wurden nach Gleichung 13b) angepasst (durchgezogene Linien: schwarz 1 μM cAMP, $K_D = 64,0$ nM; rot 2 μM , $K_D = 88,4$ nM; grün 3 μM , $K_D = 70,4$ nM; blau 6 μM , $K_D = 53,9$ nM; lila 10 μM , $K_D = 76,5$ nM).

Die K_D -Werte für cAMP und cGMP sind etwas kleiner als die mit der ITC gemessenen K_D -Werte (107 nM für cAMP, 499 nM für cGMP). Die Werte unterschieden sich hier nur um den Faktor 2. Diese Methode eignet sich deshalb gut für die Messung der Bindungsaffinität.

3.2 Charakterisierung des Gesamtkanalproteins MICNG

In diesem Kapitel wird die biochemische Charakterisierung des Kanalproteins MICNG beschrieben. Zunächst wurde das oligomere Verhalten untersucht. Dafür wurde das Laufverhalten des gereinigten Kanalproteins in der Größenausschlusschromatographie sowie in der blauen nativen Gelelektrophorese mit dem Laufverhalten des KcsA-Kanals verglichen. Bei dem KcsA-Kanal handelt es sich um einen bakteriellen K^+ -Kanal, der strukturell und funktionell eingehend untersucht worden ist (Doyle et al., 1998; Zhou et al., 2001; Schrempf et al., 1995; Heginbotham et al., 1997; Heginbotham et al., 1998; LeMasurier et al., 2001). Eine Kanaluntereinheit besteht aus zwei transmembranalen Segmenten M1 und M2, zwischen denen die Porenregion liegt. Vier gleiche Untereinheiten bilden einen funktionellen Kanal.

In den darauf folgenden Kapiteln wird beschrieben, wie viel cAMP der gereinigte MICNG-Kanal enthält und welche Methoden verwendet wurden, um das gebundene cAMP zu entfernen. Danach wurde die Stabilität des cAMP-freien MICNG-Proteins untersucht. Im letzten Kapitel werden die Bindungsmessungen mit dem MICNG-Protein beschrieben.

3.2.1 Reinigung des MICNG-Proteins und des KcsA-Kanals aus *E. coli*

Das MICNG-Protein wurde in das pET-11a-Plasmid kloniert (Novak, 2006). Am C-Terminus des Kanals wurden sechs Histidinreste (His-Tag) angefügt. Für den KcsA-Kanal wurde das pQE-60-Plasmid verwendet, so dass auch hier am C-Terminus ein His-Tag angefügt war. Das KcsA-Plasmid wurde mir freundlicherweise von Roderick MacKinnon (Rockefeller University, New York, USA) zur Verfügung gestellt. Die Struktur der Proteine ist schematisch in Abb. 3.14 dargestellt.

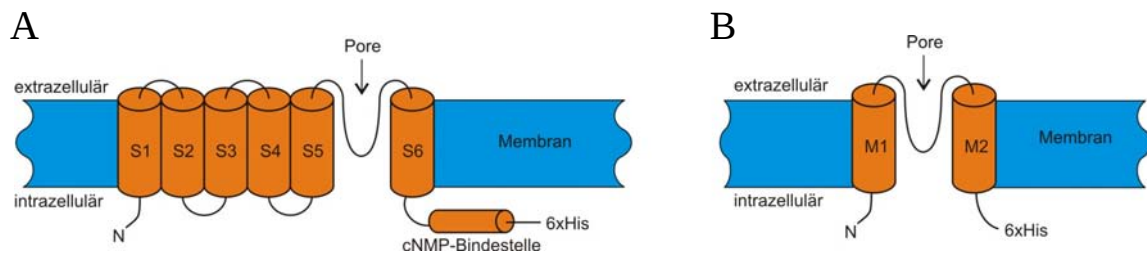


Abb. 3.14: Schematischer Aufbau der verwendeten Ionenkanalkonstrukte. **A:** Dargestellt ist eine Kanaluntereinheit des MICNG-Proteins. Eine Untereinheit besteht aus sechs transmembranalen Segmenten und einer Bindestelle für zyklische Nukleotide am C-Terminus. C-terminal der Bindestelle wurden 6 Histidinreste (His-Tag) angefügt. **B:** Hier ist eine Untereinheit des KcsA-Kanals dargestellt. Eine Untereinheit besteht aus zwei transmembranalen Segmenten M1 und M2. Am C-Terminus ist ein His-Tag angefügt.

Das His-Tag ermöglicht eine affinitätschromatographische Reinigung über eine mit Co^{2+} oder Ni^{2+} beladene Sepharose-Säule. Optimale Expressionsbedingungen für den MICNG-Kanal (2.8.1) wurden von Kerstin Novak bestimmt (Novak, 2006). Die Expressionsbedingungen für den KcsA-Kanal sind in Kapitel 2.8.1 beschrieben.

Das MICNG-Protein wurde aus der Bakterienmembran solubilisiert und über eine mit Co^{2+} beladene HisTrapsäule (Amersham) gereinigt (2.9.1). Die Affinitätschromatographie erfolgte mit einem automatisierten Pumpensystem (Äkta FPLC, Amersham). Der Verlauf der Reinigung wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet. Abb. 3.15 A und B zeigen das Chromatogramm einer MICNG-Reinigung. Die Ordinate bezeichnet die Proteinabsorption in mAU (milli absorbance units), die Abszisse das Durchflussvolumen in ml. Man erkennt die Fraktion der Proteine, die nicht an die Säule binden (Durchfluss) im ersten Teil des Chromatogramms. Als nächstes erfolgte ein Waschschrift, um alle Proteine, die nicht spezifisch an die Säule binden, zu entfernen. Die Elution der Proteine, die spezifisch an die Säule gebunden haben, erfolgte mit einem Imidazolgradienten von 5-500 mM. Imidazol konkurriert mit dem His-Tag um die Bindestellen an der Säule. Man erkennt zwei Peaks, wobei der erste bei einer Imidazolkonzentration von ca. 91 mM und der zweite bei einer Konzentration von ca. 500 mM beobachtet wurde. Während der Elutionsphase wurden Fraktionen gesammelt, die ein Volumen zwischen 0,75 und 1,5 ml hatten.

Das Probenmuster in den Fraktionen wurde mit Hilfe der SDS-PAGE (2.11.1) analysiert. Alternativ wurden die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert (2.12.1) und immunologisch mit einem anti-His-Tag-Antikörper im Westernblot nachgewiesen (2.12.2). Abb. 3.14 C zeigt die Coomassie-Blaufärbung und Abb. 3.15 D den Nachweis mit dem anti-His-Tag-Antikörper. In Spur 1 sind die Proteine des Bakterien-solubilisats aufgetragen. In der Coomassie-Blaufärbung erkennt man die Bande des MICNG-Proteins bei ca. 32 kDa (Pfeil in Abb. 3.15 C). Das MICNG-Protein, das eine berechnete Größe von 39 kDa hat, zeigt ein

anomalies Laufverhalten (Novak, 2006). In Spur 2 ist der Durchlauf aufgetragen. Hier sind die Proteine zu sehen, die nicht an die Säule gebunden haben. Spur 3 zeigt den Waschschrift. Die nächsten Spuren zeigen die Elutionsfraktionen, wobei die Spuren 4-7 dem ersten Elutionspeak und die Spuren 8-19 dem zweiten Elutionspeak entsprechen. Sowohl die Coomassie-Blaufärbung als auch der Antikörperrnachweis zeigen, dass das MICNG-Protein hauptsächlich im zweiten Peak eluiert. Geringe Mengen des MICNG-Proteins findet man aber auch im ersten Peak der Elution. In den Fraktionen 8-19 sind zusätzlich Proteine unter- und oberhalb der erwarteten Bande zu erkennen (s. Pfeile in Abb. 3.15 D). Hierbei handelt es sich einerseits um oligomere Formen des MICNG-Proteins (Novak, 2006). Andererseits sind aber auch Abbauprodukte des Kanalproteins vorhanden (A. Cukkemane, pers. Mitteilung). Die Fraktionen des zweiten Elutionspeaks wurden vereinigt.

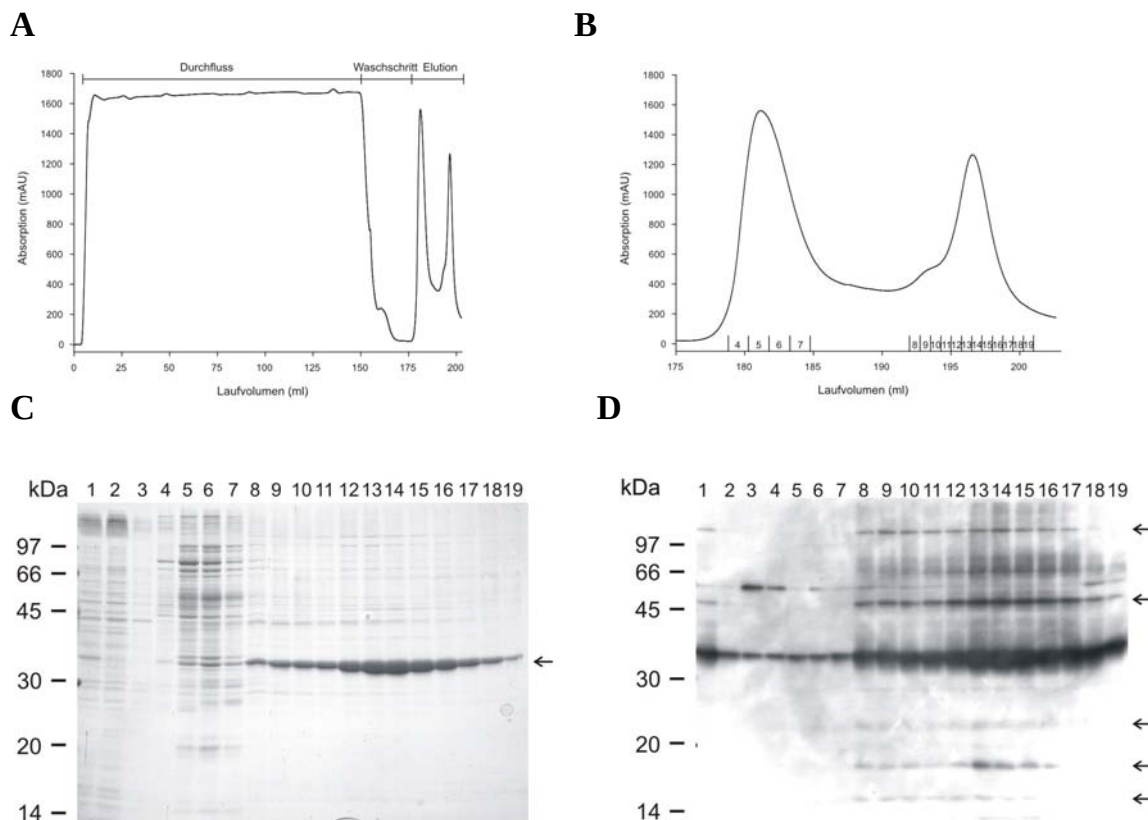


Abb. 3.15: MICNG-Reinigung. A/B: Chromatogramm: Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU; Abszisse: Durchlaufvolumen in ml. In B sind die Elutionspeaks vergrößert dargestellt. C/D: Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. C: Coomassie-Blaufärbung. Der Pfeil markiert das MICNG-Protein. D: Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit einem anti-His-Tag-Antikörper (Verdünnung 1:1000) im Western-Blot nachgewiesen. Spur 1: Solubilisat vor der Reinigung (0,003 % des Gesamtvolumens); Spur 2: Säulendurchfluss (0,003 %); Spur 3: Waschschritt (0,02 %); Spuren 4-7: Eluat des ersten Peaks (0,13 %); Spuren 8-19: Eluat des zweiten Peaks (0,27 %). Die oberen zwei Pfeile markieren oligomere Formen des MICNG-Proteins, die drei unteren Pfeile Abbauprodukte des Kanalproteins. Der Größenstandard ist links neben den Teilabbildungen in kDa angegeben.

Der KcsA-Kanal wurde nach einem ähnlichen Protokoll gereinigt wie das MICNG-Protein (2.9.1). Während der Reinigung wurden Proben genommen, die über SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Sowohl in der Coomassie-Blaufärbung als auch im Antikörpernachweis enthält die Spur 1 alle solubilisierten Proteine, Spur 2 die nicht gebundenen Proteine, Spur 3 die Waschfraktion und die Spuren 4-19 das Eluat. Das Chromatogramm (A und B) und die Analyse der Reinigung (C und D) sind in Abb. 3.16 dargestellt. Eine Teilelution findet bereits bei ca. 84 mM Imidazol statt, während der Hauptpeak bei ca. 500 mM Imidazol beobachtet wird. Dieser Peak enthält hauptsächlich ein Protein mit einer Größe von ca. 60 kDa (Abb. 3.16 C). Im Antikörpernachweis erkennt man neben dieser Bande eine zusätzliche Bande bei 20 kDa (Abb. 3.16 D). Die 20 kDa-Bande entspricht dem KcsA-Monomer. Heginbotham et al. (1997) beschreiben die größere Bande als ein stabiles KcsA-Tetramer, das im SDS-Gel

etwas unterhalb des erwarteten Molekulargewichtes von 80 kDa läuft. Erhitzt man die Proteinprobe vor der SDS-PAGE, so beobachtet man nur noch die 20 kDa-Bande (Heginbotham et al. 1997). Beide Banden sind somit dem KcsA-Kanal zuzuordnen. Die Peakfraktionen 14-19 wurden vereinigt.

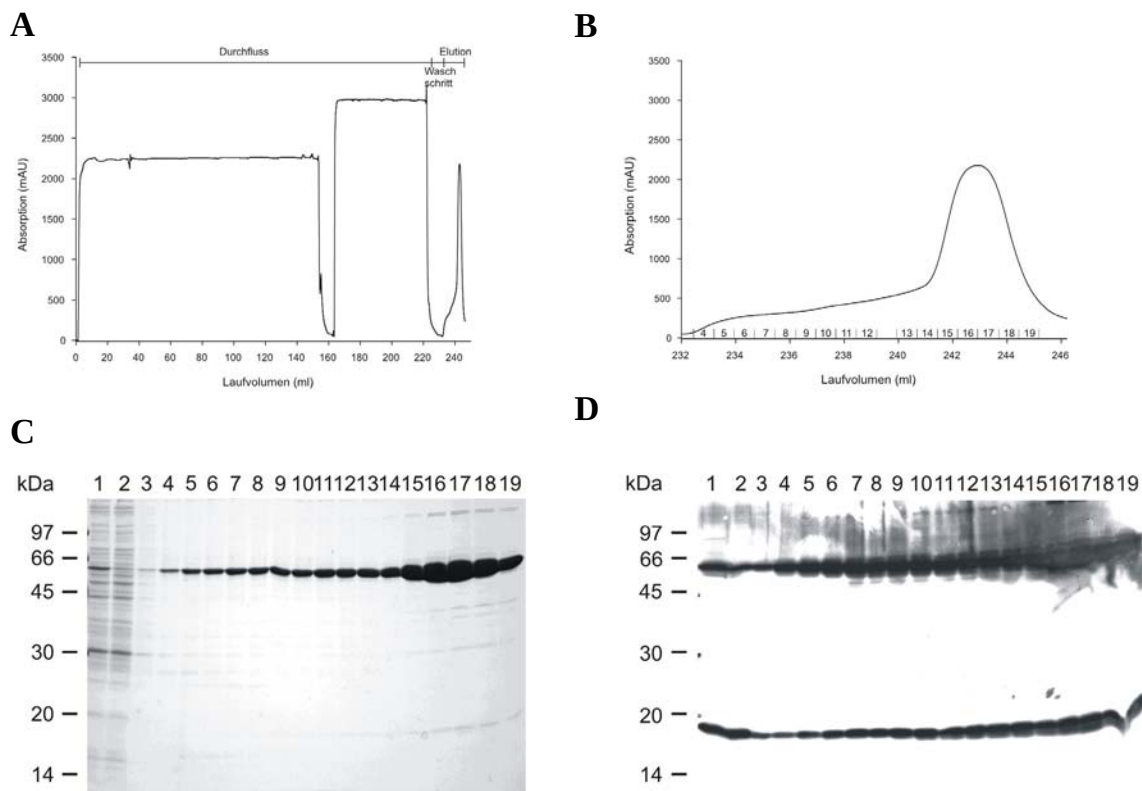


Abb. 3.16: Reinigung des KcsA. A/B: Chromatogramm: Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU; Abszisse: Durchlaufvolumen in ml. In B sind die Elutionspeaks vergrößert dargestellt. C/D: Die Proteine wurden in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. C: Coomassie-Blaufärbung D: Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit einem anti-His-Tag-Antikörper (Verdünnung 1:1000) im Western-Blot nachgewiesen. Spur 1: Solubilisat vor der Reinigung (0,002 % des Gesamtvolumens); Spur 2: Säulendurchfluss (0,002 %); Spur 3: Waschschritt (0,05 %); Spuren 4-19: Eluat (0,67 %). Der Größenstandard ist links neben den Teilabbildungen in kDa angegeben.

3.2.2 Vergleich der multimeren Eigenschaften von MICNG und KcsA

Um die Homogenität der gereinigten Kanalproteine und deren Laufverhalten zu vergleichen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (2.9.5). Dafür wurde eine analytische Superdex 200-Säule HR 10/30 verwendet. In Abb. 3.17 sind die Elutionsprofile der Gelfiltration gezeigt. Auf der Ordinate ist die Proteinabsorption bei einer Wellenlänge von 280 nm in mAU dargestellt. Auf der Abszisse ist das Laufvolumen in ml angegeben.

Der erste Peak des MICNG-Proteins (grün, 7 ml) entspricht dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule. Hier eluieren Proteine, die aufgrund ihrer Größe das Trennvermögen der Gelfiltrationssäule überschreiten, unter anderem auch Proteinaggregate. Der Hauptpeak eluiert bei 10,6 ml, ein dritter kleiner Peak bei 13 ml. Die Proteine des Hauptpeaks sind wahrscheinlich tetramere Komplexe des MICNG-Proteins. Das KcsA-Kanalprotein (braun) eluiert in einem einzigen Peak bei 11,6 ml, was auf eine homogene Proteinpopulation schließen lässt.

Für den KcsA-Kanal ist bereits in der Literatur beschrieben, dass es sich um einen tetrameren Kanal handelt (Heginbotham et al., 1997). Der KcsA-Kanal eluiert aufgrund des niedrigeren Molekulargewichtes (berechnetes Molekulargewicht für ein Tetramer: 80 kDa) etwas später als das MICNG-Protein (berechnetes Molekulargewicht für ein Tetramer: 156 kDa).

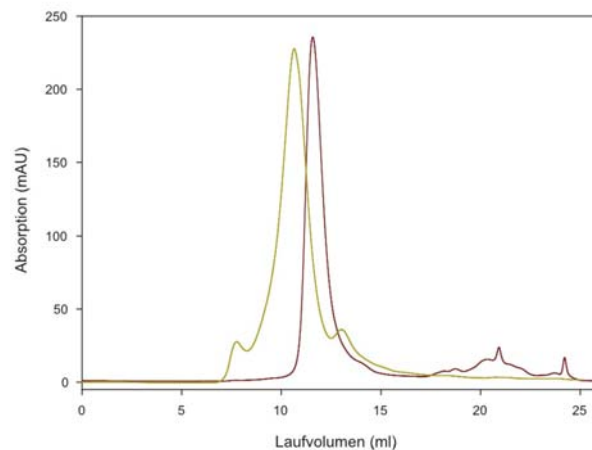


Abb. 3.17: Größenausschlusschromatographie: Vergleich des Laufverhaltens von MICNG und KcsA. Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 200 HR 10/30). Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU. Abszisse: Elutionsvolumen in ml. Das MICNG-Protein ist in grün, der KcsA-Kanal in braun dargestellt.

Um die multimeren Eigenschaften des MICNG-Proteins weiter zu untersuchen, wurde eine blaue native Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt (2.11.2). Das mit nicht ionischen Detergenzien solubilisierter Membranprotein wird auf ein natives (ohne SDS) Elektrophoresegel aufgegeben. Einer der Puffer enthält das anionische Coomassie-Blau, das während des Laufs in das Gel einwandert und kontinuierlich das Detergenz ersetzt. Die Proteine werden so negativ geladen und wandern zur Anode. Der Vorteil der nativen PAGE ist, dass die Proteine nicht denaturiert werden und oligomere Komplexe erhalten bleiben.

Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Blau gefärbt (Abb. 3.18). Der KcsA-Kanal ist in Spur 1 aufgetragen, das MICNG-Protein in Spur 2. Der tetramere KcsA-Kanal läuft bei ca. 180 kDa (berechnete Größe 80 kDa), das MICNG-Protein bei ca. 230 kDa (berechnete Größe

für ein Tetramer: 156 kDa). Die geringe Beweglichkeit der beiden Kanäle könnte auf ein höheres apparentes Molekulargewicht der Kanalproteine im Vergleich zu den löslichen Markerproteinen während der blauen nativen Gelelektrophorese zurückzuführen sein (Schägger et al., 1994; Nicke et al., 1998; Griffon et al., 1999). Es müsste ein weiterer Gellauf durchgeführt werden, bei dem das mit SDS denaturierte Monomer aufgetragen und das Laufverhalten im Vergleich zu den Markerproteinen analysiert wird.

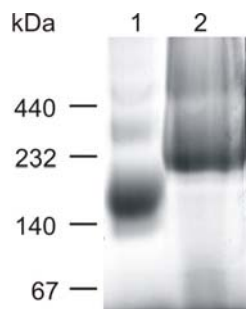


Abb. 3.18: Native Gelelektrophorese: Vergleich des Laufverhaltens des KcsA-Kanals (Spur 1) und dem MICNG-Protein (Spur 2). Aufgetragen sind 10 µg (KcsA) und 40 µg (MICNG) Protein.

Sowohl die Größenausschlusschromatographie als auch die native Gelelektrophorese zeigen, dass das oligomere MICNG-Protein ein größeres Molekulargewicht besitzt als der KcsA-Kanal. Die oligomere Struktur des gereinigten MICNG-Proteins wurde außerdem durch chemische Quervernetzung seiner Untereinheiten untersucht (Novak, 2006). Dabei wurde gezeigt, dass der MICNG-Kanal in seiner tetrameren Anordnung vorliegt. Ich schliesse daraus, dass ich den MICNG-Kanal für weitere biochemische Untersuchungen verwenden kann.

3.2.3 cAMP-Menge in der MICNG-Probe

Nachdem in der CNBD-Probe relativ viel cAMP enthalten war (3.1.2.3), habe ich den cAMP-Gehalt der gereinigten MICNG-Probe bestimmt. Dazu wurde eine Umkehrphasen-HPLC-Analyse durchgeführt (2.13.2). Das MICNG-Protein wurde durch Säure denaturiert und präzipitiert, um das cAMP freizusetzen. Der Überstand, der das freigewordene cAMP enthält, wurde auf eine LiChrosphere RP-18-Säule aufgetragen (Abb. 3.19).

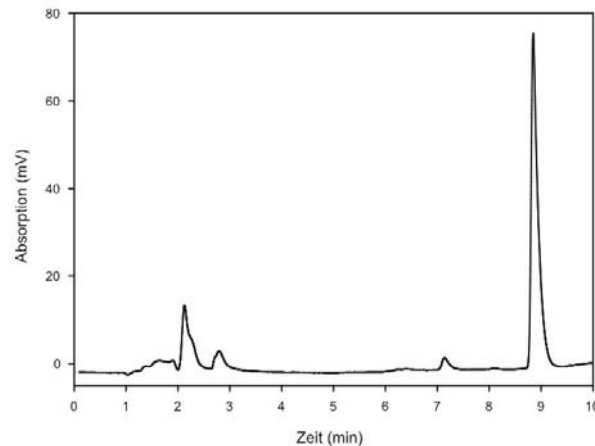


Abb. 3.19: cAMP-Bestimmung durch Umkehrphasen-HPLC. Aufgetragen ist der nach der Präzipitation von 2 nmol MICNG-Protein verbleibende Überstand. Die Analyse ergab eine cAMP-Menge von 1,0 nmol, was einer cAMP-Belegung von 50,0 % entspricht.

In Abb. 3.19 beobachtet man einen Peak bei 8,9 Minuten. Dieser Peak entspricht dem cAMP. Wird die Fläche des Peaks in die Formel aus Kapitel 3.1.2.1 eingesetzt, so erhält man eine cAMP-Menge von 1,0 nmol. Für die Säurepräzipitation wurden 2 nmol an MICNG-Protein eingesetzt, so dass dies eine Belegung von 50 % ergibt. Durchschnittlich wurde ein molarer cAMP-Gehalt des MICNG-Proteins (bezogen auf eine Untereinheit) von $53,3 \% \pm 14,1 \%$ erhalten (15 Messungen, 5 Präparationen). An dem MICNG-Protein war durchschnittlich weniger cAMP gebunden als an der CNBD (84,2 %, Kapitel 3.1.2.3).

Für quantitative Bindungsmessungen muss das MICNG-Protein cAMP-frei vorliegen. Es liegt nahe, das cAMP durch einen Denaturierungs-Renaturierungszyklus wie bei der CNBD zu entfernen. Die Rückfaltung von Membranproteinen wird jedoch in Anwesenheit von Lipiden durchgeführt (Übersicht: Booth et al., 2001). Das Kanalprotein läge dann in Vesikeln vor, so dass die Bindungsmessungen unter anderen Versuchsbedingungen durchgeführt werden müssten als mit der renaturierten CNBD. Deshalb wurde nach anderen Methoden gesucht, um das cAMP zu entfernen. Das beschreibe ich in den folgenden Kapiteln.

3.2.4 Entfernen des gebundenen cAMP von der Ligandenbindestelle des MICNG-Proteins

Um das gebundene cAMP von der Bindestelle des MICNG-Proteins zu entfernen, bieten sich verschiedene Möglichkeiten an. Zum Einen kann dies durch extensives Waschen während der

Reinigung erfolgen. Eine Alternative wäre, das gebundene cAMP in Konkurrenz mit einem anderen Liganden zu stellen, der wenig affin ist und in großem Überschuss dazugegeben wird. Durch einen darauf folgenden Waschschriff kann dieser Ligand dann einfach entfernt werden.

3.2.4.1 Entfernen des cAMP durch extensives Waschen

Da durch extensives Waschen große Mengen an Detergenzien verbraucht werden, wurden zunächst aus Kostengründen zwei weitere preiswertere Detergenzien getestet. Dabei handelt es sich um Triton-X 100 und Chaps.

3.2.4.1.1 Triton-X 100

Das MICNG-Protein wurde wie beschrieben solubilisiert (2.9.1) und auf eine mit Co^{2+} -beladene Hitrap-Säule über das Äkta-FPLC-System aufgetragen. Die Proteinabsorption wurde bei 280 nm bestimmt. Nachdem das Protein auf die Säule aufgetragen worden war, wurde mit 1000 ml Waschpuffer gewaschen, der 0,2 % (v/v) Triton-X 100 als Detergenz enthält. Dabei handelt es sich um ein nicht-ionisches Detergenz. Die Elution des Proteins erfolgte mit einem Puffer mit DM. Im abgebildeten Chromatogramm (Abb. 3.20 A, B) beobachtete ich einen großen Absorptionswert während des Waschschriffes, weil Triton-X 100 bei 280 nm absorbiert. Der Elutionspeak ist im Vergleich zu dem Elutionspeak einer normalen Reinigung (Abb. 3.15 B, zweiter Peak) klein und breit (Abb. 3.20 B). Um die Reinigung zu dokumentieren, wurden Proben genommen. Die Proteine wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt (Abb. 3.20 C). Aufgetragen sind in Spur 1 die solubilisierten Proteine, in Spur 2 der Säulendurchfluss, in den Spuren 3-7 verschiedene Waschfraktionen und in den Spuren 8-17 die Elutionsfraktionen. Auf dem Gel erkennt man, dass das Protein schon während des Waschens teilweise von der Säule eluiert (Spuren 3-7, Bande bei ca. 32 kDa). Das MICNG-Protein ist hauptsächlich in den Elutionsfraktionen (Spuren 8-17). Die Fraktionen 8-17 wurden vereinigt.

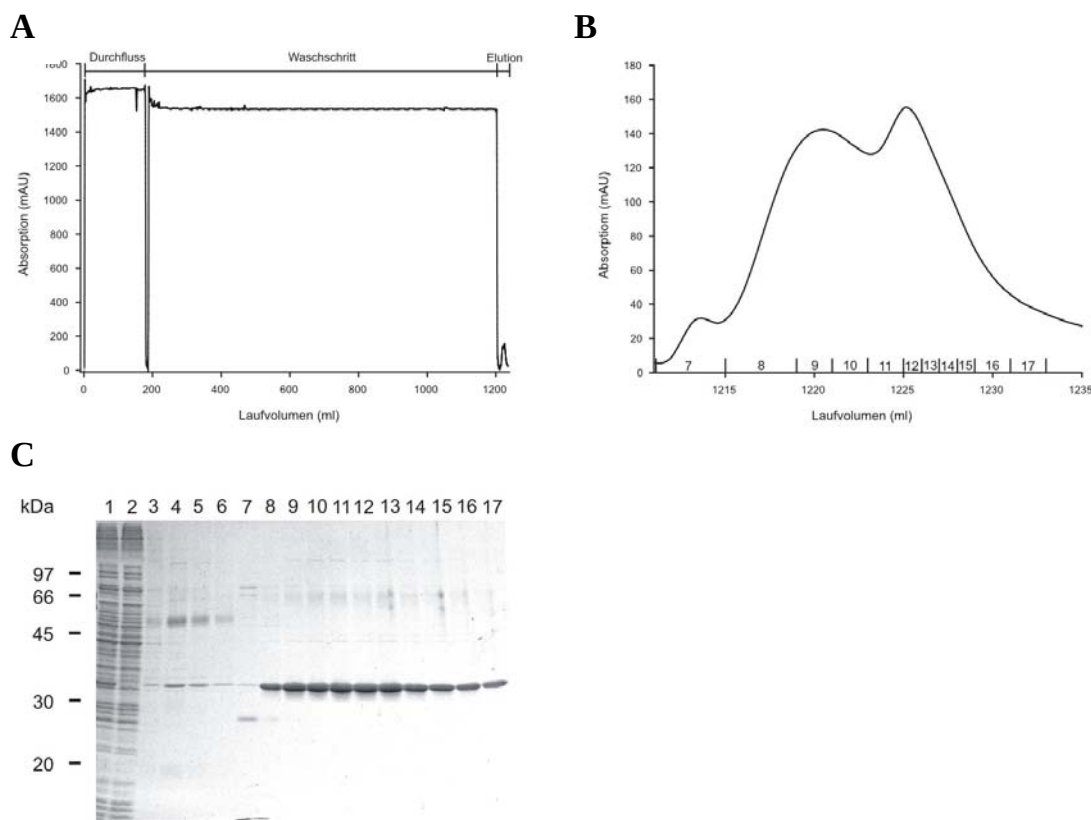


Abb. 3.20: Reinigung und extensives Waschen mit Triton-X-100 im Waschpuffer. A und B: Chromatogramm: Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU; Abszisse: Durchlaufvolumen in ml. In B ist der Elutionspeak vergrößert dargestellt. **C:** Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Spur 1: Solubilisat vor der Reinigung (0,006 % des Gesamtvolumens); Spur 2: Säulendurchfluss (0,006 %); Spur 3-6: Waschschritte (0,001 %); Spur 7-17: Eluat (0,25-1 %). Der Größenstandard ist links neben der Teilabbildung in kDa angegeben.

Von den vereinigten Elutionsfraktionen wurde ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 0,66 gemessen, was einer cAMP-Belegung von ca. 22 % entspricht. Aus der HPLC-Analyse wurde ein molarer cAMP-Gehalt von 18,5 % erhalten, was gut mit dem Ergebnis der Absorptionsmessung übereinstimmt. Allerdings ist der cAMP-Anteil noch relativ hoch und die Ausbeute an MICNG-Protein gering (0,9 mg vs. 3 mg bei der Reinigung mit DM).

3.2.4.1.2 Chaps

Als weiteres Detergenz wurde Chaps verwendet. Dieses zwitterionische Detergenz wurde beispielsweise bei der Reinigung des CNG-Kanals aus Rindersehtäbchen verwendet (Cook & Kaupp, 1986; Cook et al., 1986). Das MICNG-Protein wurde wie beschrieben solubilisiert (2.9.1) und auf eine Hitrap-Säule aufgetragen. Der Waschpuffer enthielt 12 mM Chaps als

Detergenz. Die Elution erfolgte wiederum mit einem Puffer, der DM enthielt. Das zugehörige Chromatogramm ist in Abb. 3.21 A und B gezeigt. Während der Reinigung wurden Proben genommen, die mit der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt wurden (Abb. 3.21 C).

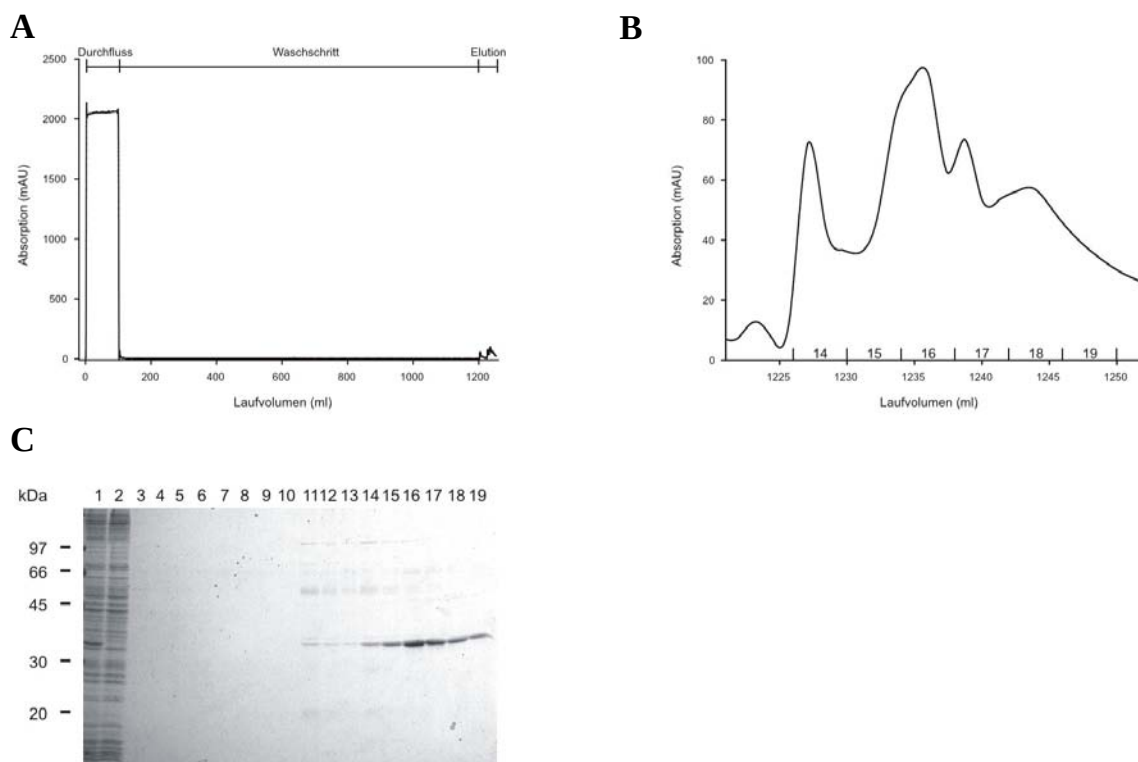


Abb. 3.21: Reinigung und extensives Waschen mit Chaps im Waschpuffer. A und B: Chromatogramm: Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU; Abszisse: Durchlaufvolumen in ml. In B ist der Elutionspeak vergrößert dargestellt. **C:** Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Spur 1: Solubilisat vor der Reinigung (0,01 % des Gesamtvolumens); Spur 2: Säulendurchfluss (0,01 %); Spur 3-13: Waschschrte (0,0009 %); Spur 14-19: Eluat (0,25 %). Der Größenstandard ist links neben der Teilabbildung in kDa angegeben.

Aus dem Chromatogramm (Abb. 3.21 B) ist erkennbar, dass der Elutionspeak klein und inhomogen im Vergleich zu dem Elutionspeak einer normalen Reinigung (Abb. 3.15 B) ist. In der Coomassie-Blaufärbung ist in den Elutionsfraktionen (Spuren 14-19) nur wenig Protein zu sehen. Auf eine weitere Analyse bezüglich des cAMP-Gehaltes wurde aufgrund der Inhomogenität und der geringen Ausbeute verzichtet. Ich schließe daraus, dass Chaps als Detergenz nicht geeignet ist.

3.2.4.1.3 DM

Wegen der unbefriedigenden Ergebnisse mit den Detergenzien Triton-X 100 und Chaps wurde – trotz der Kosten – eine Reinigung mit DM in 1000 ml Waschpuffer durchgeführt. Auch hier wurde das MICNG-Protein wie beschrieben solubilisiert und auf eine Hitrap-Säule aufgetragen. Es wurde mit einem Puffer gewaschen, der als Detergenz 5 mM DM enthielt. Das zugehörige Chromatogramm ist in Abb. 3.22 A und B dargestellt und zeigt ein ähnliches Profil wie die Reinigung ohne extensives Waschen (Abb. 3.15). Während der Reinigung wurden Proben genommen, die mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt wurden (Abb. 3.22 C). Man beobachtet drei Peaks, wobei der dritte bei 500 mM Imidazol das MICNG-Protein enthält (Spuren 12-19, Abb. 3.22 C).

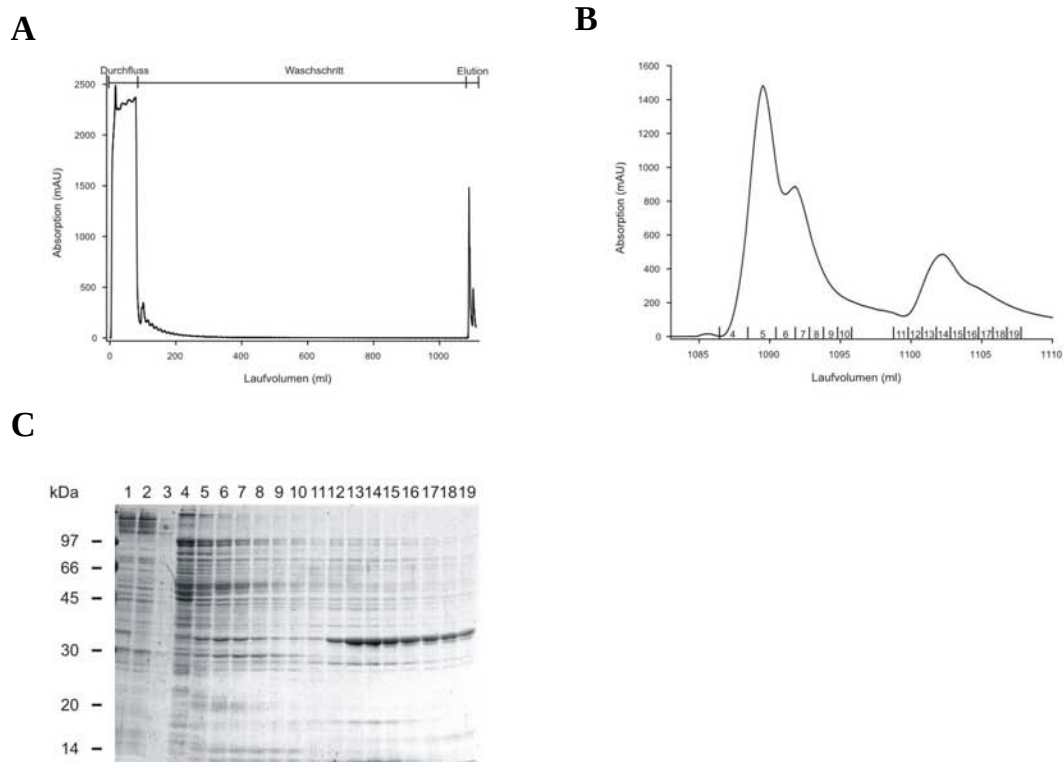


Abb. 3.22: Reinigung und extensives Waschen mit DM im Waschpuffer. A und B: Chromatogramm: Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU; Abszisse: Durchlaufvolumen in ml. In B sind die Elutionspeaks vergrößert dargestellt. **C:** Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Spur 1: Solubilisat vor der Reinigung (0,005 % des Gesamtvolumens); Spur 2: Säulendurchfluss (0,005 %); Spuren 3-7: Waschschritte (0,0004 %); Spuren 8-17: Eluat (0,25-0,5 %). Der Größenstandard ist links neben der Teilabbildung in kDa angegeben.

Die Elutionsfraktionen (Spuren 12-19) wurden vereinigt. Die cAMP-Analyse mit der HPLC ergab einen molaren cAMP-Gehalt von 12,5 %. Die cAMP-Besetzung ist im Vergleich zur

Reinigung ohne Waschen zwar deutlich geringer, aber immer noch deutlich meßbar. Deshalb wurde nach weiteren Methoden gesucht, um das cAMP zu entfernen.

3.2.4.2 Entfernen des gebundenen cAMP durch kompetitive Verdrängung

Als kompetitiver Ligand wurde 8-CPT-cGMP gewählt, der in den Bindungsmessungen mit der CNBD die niedrigste Affinität aufwies (3.1.4.2). Diese Methode wurde mit dem GST-CNBD-Fusionsprotein an GST-Sepharose-Säulen bereits etabliert (Novak, 2006). Dabei stellte sich heraus, dass für eine 1 ml-Säule, an die ca. 100 μ M Protein gebunden sind, eine 8-CPT-cGMP-Konzentration von 1 mM ausreicht, um das cAMP zu entfernen. Die Inkubation der CNBD mit 8-CPT-cGMP erfolgte dreimal hintereinander mit anschließendem Waschschrift auf der Säule. Durch einen letzten Waschschrift konnte auch das 8-CPT-cGMP vollständig entfernt werden (Novak, 2006). Dieses Protokoll wurde für die MICNG-Reinigung über eine 1 ml-Talon-Säule übernommen. Die Elution des MICNG-Proteins erfolgte mit 400 mM Imidazol. Während der Reinigung wurden Proben zur Analyse entnommen, die über SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Abb. 3.23 zeigt die Coomassie-Blaufärbung einer solchen Reinigung.

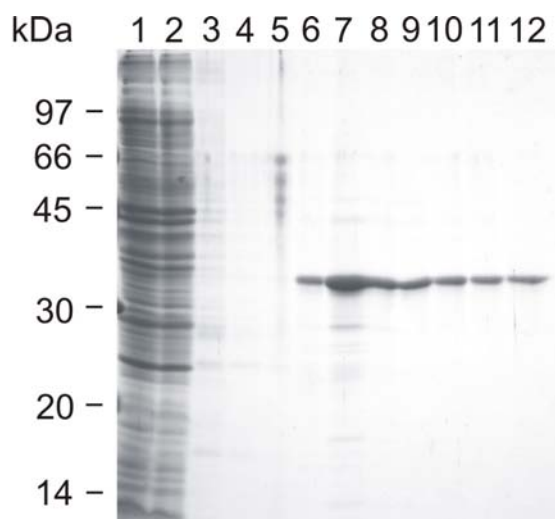


Abb. 3.23: Reinigung und Kompetition der cAMP-Bindung mit 8-CPT-cGMP. Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Spur 1: Solubilisat vor der Reinigung (0,002 % des Gesamtvolumens); Spur 2: Säulendurchfluss (0,002 %); Spuren 3-6: Waschschriffe (0,005 %); Spuren 7-12: Eluat (1,0 %). Der Größenstandard ist links neben der Abbildung in kDa angegeben.

In Spur 1 sind die solubilisierten Proteine, in Spur 2 ist der Säulendurchfluss aufgetragen. Die Spuren 3-5 zeigen Waschfraktionen, die an verschiedenen Stellen der Reinigung entnommen wurden. Die Elutionsfraktionen des MICNG-Proteins sind in den Spuren 6-12 gezeigt. Von den vereinigten Elutionsfraktionen wurde der cAMP-Gehalt über die Absorption bestimmt. Es war kein cAMP mehr in der Probe vorhanden ($A_{260}/A_{280} = 0,56$). Die Homogenität der Probe wurde durch eine Größenausschlusschromatographie bestimmt (Abb. 3.24 A).

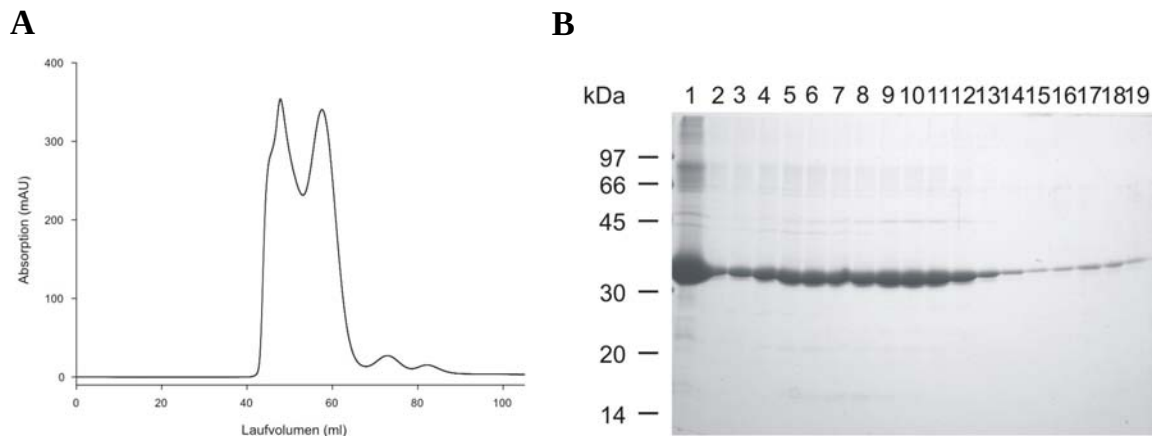


Abb. 3.24: Größenausschlusschromatographie des cAMP-freien MICNG-Proteins. **A:** Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 200 prep grade, High Load 16/60). Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU. Abszisse: Elutionsvolumen in ml. **B:** Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Spur 1: Säulenauftrag (0,1 % des Gesamtvolumens); Spuren 2-7: Fraktionen des ersten Peaks (0,5 %); Spuren 8-13: Fraktionen des zweiten Peaks (0,5 %); Spur 14-19: Fraktionen des dritten Peaks (0,5 %). Der Größenstandard ist links neben der Teilabbildung in kDa angegeben.

Das Chromatogramm in Abb. 3.24 A zeigt, dass mehr als die Hälfte des aufgetragenen Proteins bei 47,9 ml als aggregiertes Material läuft (1. Peak). Der zweite Peak bei 57,5 ml entspricht dem Hauptpeak einer Größenausschlusschromatographie mit cAMP-besetztem Protein. Dies deutet darauf hin, dass das cAMP-freie Protein stärker aggregiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. In allen Spuren ist ausschließlich das MICNG-Protein zu erkennen (Abb. 3.24 B). Die Fraktionen des zweiten Peaks wurden vereinigt und auf einer analytischen Superdex 200-Säule HR 10/30 rechromatographiert, um zu prüfen, ob ein Gleichgewicht zwischen dem aggregierten und dem nicht aggregierten Material vorliegt. Das Chromatogramm ist in Abb. 3.25 gezeigt. Im Großen und Ganzen erhält man einen Peak bei 10,5 ml, der dem Laufverhalten des Hauptpeaks einer normalen Reinigung entspricht.

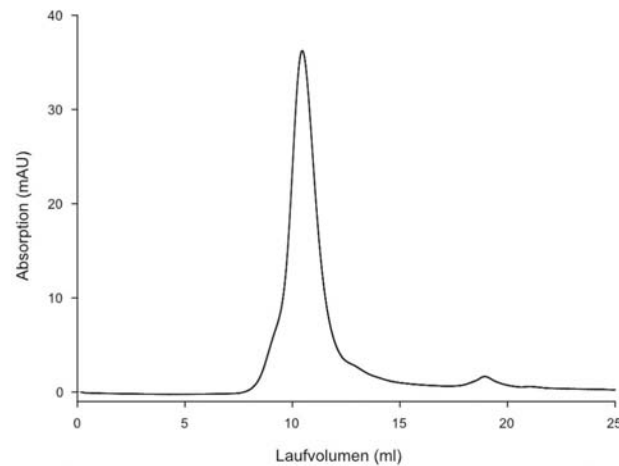


Abb. 3.25: Rechromatographie des rechten Peaks aus Abb. 3.23 (Fraktionen 8-13). Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 200 HR 10/30). Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU. Abszisse: Elutionsvolumen in ml.

Das Protein wurde eingeeengt und mit Standardpuffer (2.15.3.1) äquilibriert. Eine Lösung mit $15,75 \mu\text{M}$ des Proteins (bezogen auf das Monomer) wurde für eine ITC-Messung bei 25°C mit cAMP verwendet. Die Messung konnte jedoch nicht ausgewertet werden, da keine bindungsabhängigen Wärmeänderungen aufgezeichnet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Eine Rechromatographie des Proteins über eine Superdex 200-Säule HR 10/30 nach der ITC zeigte, dass das gesamte Protein im Ausschlussvolumen lief und wahrscheinlich während der Konzentrierung oder der Messung aggregiert ist (Daten nicht gezeigt). Somit war es wichtig, die Pufferbedingungen für das cAMP-freie MICNG-Protein zu optimieren.

3.2.4.3 Stabilität des cAMP-freien MICNG-Proteins

Für die biochemische und biophysikalische Charakterisierung muss das MICNG-Protein stabil in Lösung gehalten werden. Es müssen Pufferbedingungen gefunden werden, die Abbau, Präzipitation und Aggregation des cAMP-freien MICNG-Proteins verhindern. Aus diesem Grund wurde eine „Micro-Drop“-Analyse durchgeführt (2.14), mit der man viele verschiedene Pufferbedingungen in kurzer Zeit testen kann. Zur Auswertung wurde die Präzipitatbildung des Proteins in unterschiedlichen Puffern mikroskopisch untersucht. Die Präzipitate der einzelnen Testreihen wurden von einer Skala von 1-3 bewertet, wobei ein Wert von 1 keinem bis wenig, ein Wert von 3 einem starken Präzipitat entspricht. Ist ein Wert von 0 zugeordnet, so konnte dieser Ansatz nicht ausgewertet werden, weil der Tropfen

ausgetrocknet war. Alle Puffer enthielten 5 mM DM als Detergenz. Die Optimierung wurde bei 4°C und 25°C (bisherige ITC-Bedingungen) durchgeführt und nach einem Tag ausgewertet. Die Optimierung erfolgte in zwei Stufen. Zunächst wurden verschiedene Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Im zweiten Teil wurden verschiedene Salzbedingungen getestet. Abb. 3.26 zeigt die verwendeten Puffer sowie die Auswertung der Versuche für das cAMP-freie MICNG-Protein bei 4°C.

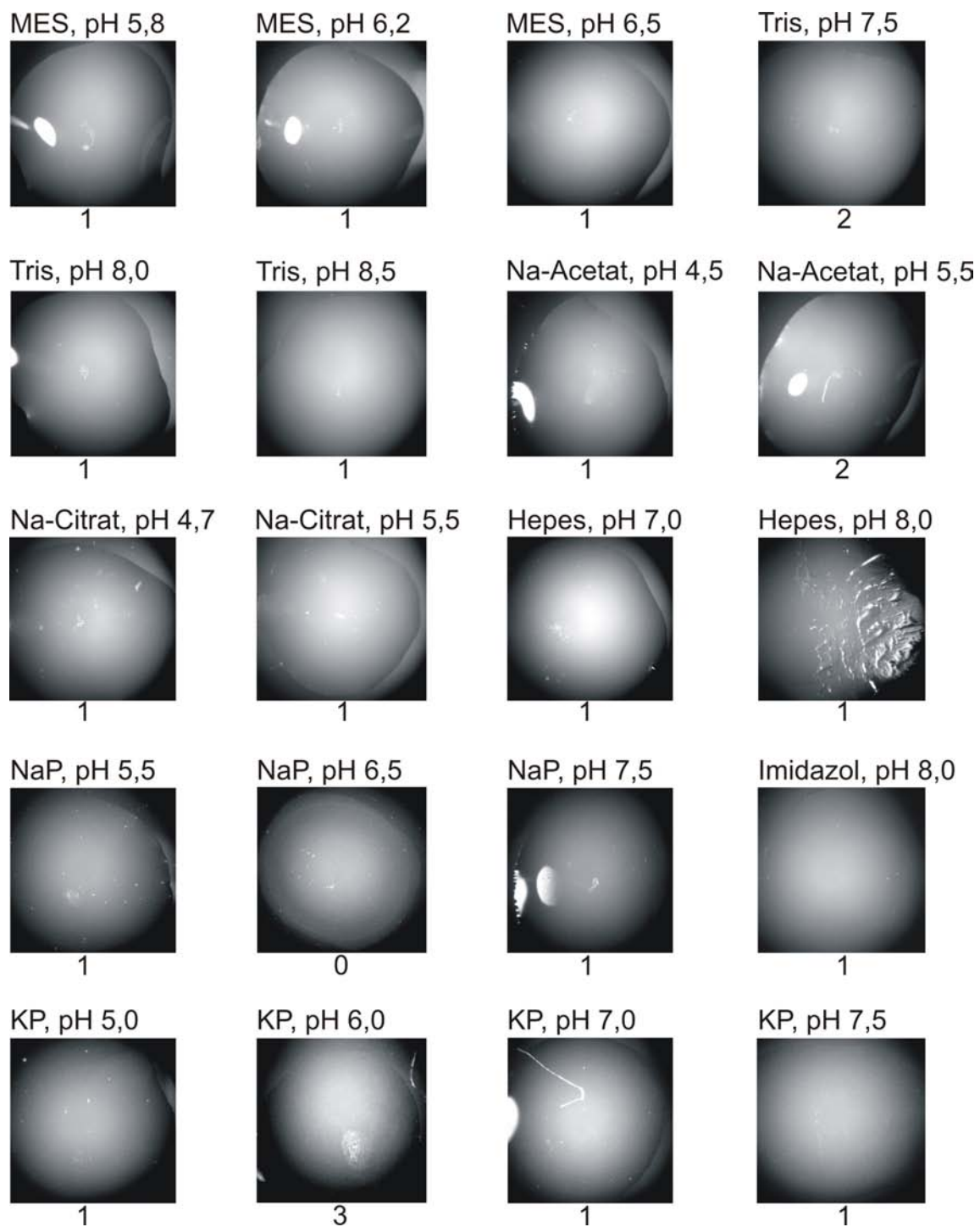


Abb. 3.26: Optimierung der Pufferbedingungen für das cAMP-freie MICNG-Protein mit der „Micro-Drop“-Analyse bei 4°C. Die verwendeten Puffer sind über den Bildern angegeben. Die Präzipitatbewertung ist jeweils unter dem Bild angegeben.

Die Optimierung bei 25°C ist in Abb. 3.27 dargestellt.

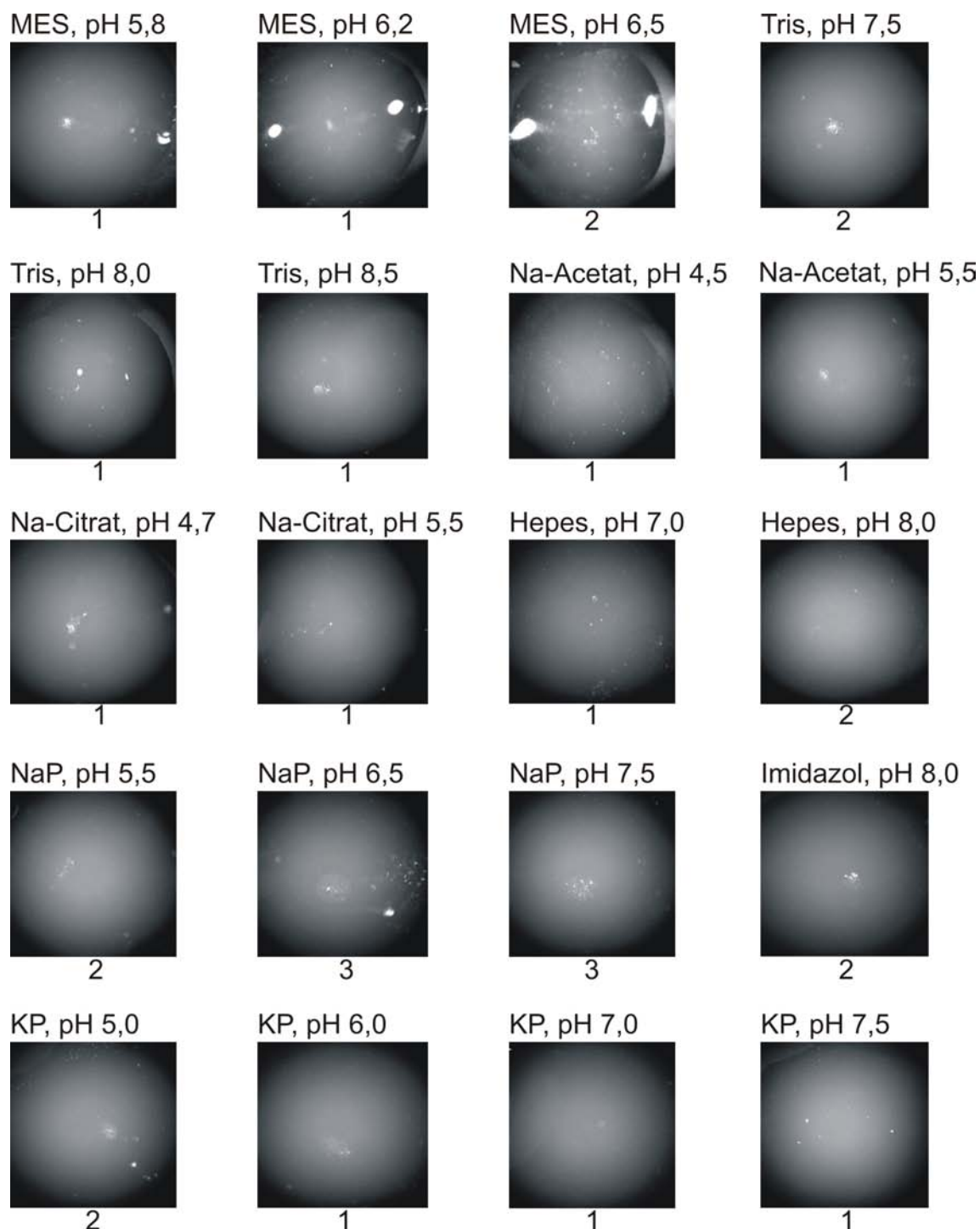


Abb. 3.27: Optimierung der Pufferbedingungen für das cAMP-freie MICNG-Protein mit der „Micro-Drop“-Analyse bei 25°C. Die verwendeten Puffer sind über den Bildern angegeben. Die Präzipitatbewertung ist jeweils unter dem Bild angegeben.

Bei 25°C tritt eine stärkere Präzipitatbildung auf als bei 4°C. Für den zweiten Teil des Versuches wurden vier Puffer ausgewählt, die sowohl bei 4°C als auch bei 25°C eine Bewertung von 1 erhalten haben. Den jeweiligen Puffern wurden verschiedene NaCl- bzw. KCl-Konzentrationen zugesetzt. Als weiterer Puffer wurde der Standardpuffer (20 mM NaP,

pH 8,0, 295 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM DM) getestet, der für die meisten Bindungsmessungen verwendet wurde. Die Analyse fand auch hier nach einem Tag bei 4°C und 25°C statt. Die Auswertung der „*Micro-Drop*“-Analyse erfolgte wie bereits beschrieben. Abb. 3.28 zeigt die Ergebnisse der Analyse für 4°C, Abb. 3.29 die Ergebnisse für 25°C. Die jeweiligen Puffer sind rechts, die Salzbedingungen über den Fotos angegeben.

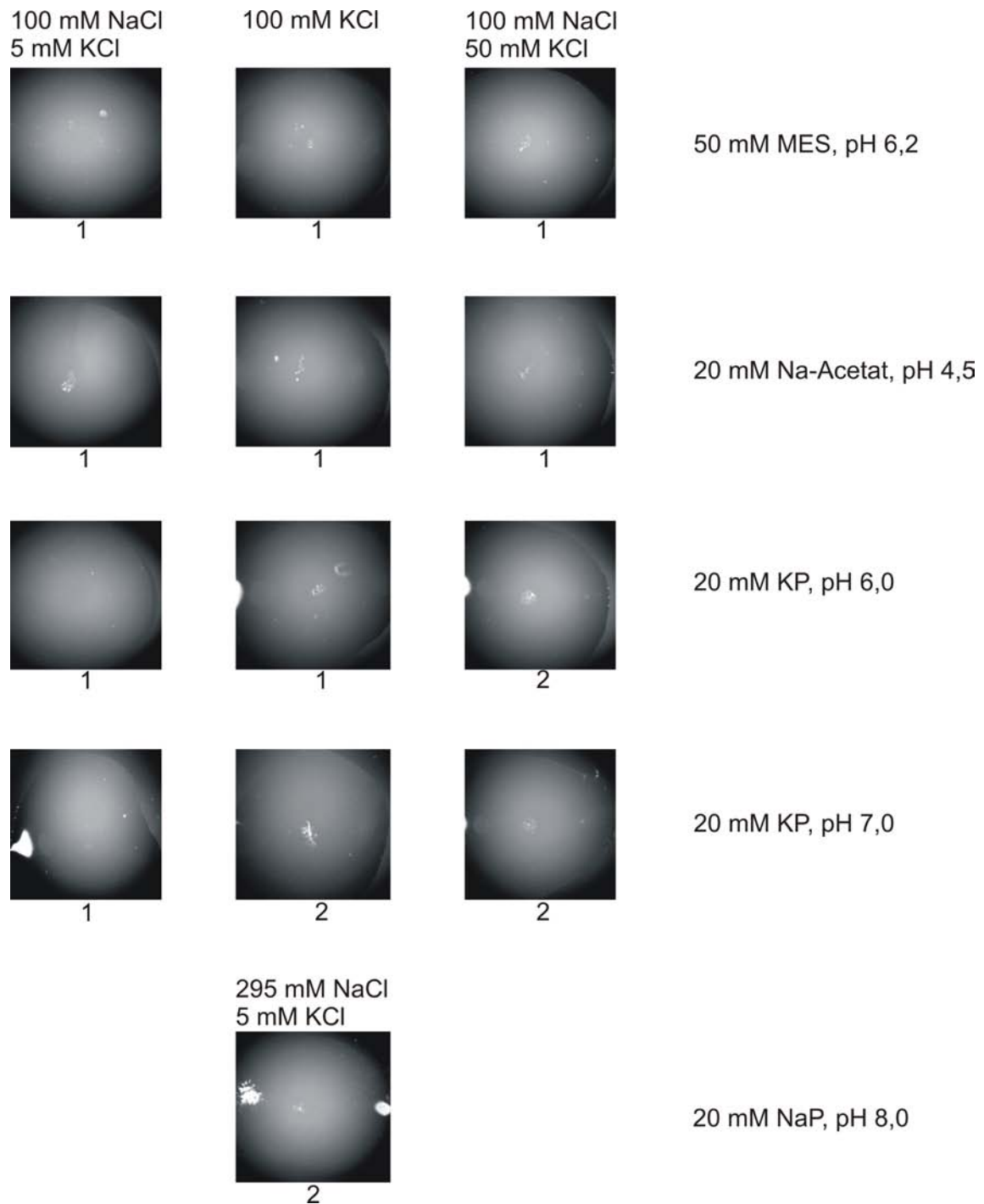


Abb. 3.28: Optimierung der Salzbedingungen für das cAMP-freie MICNG-Protein mit der „Micro-Drop“-Analyse bei 4°C. Die verwendeten Salzkonzentrationen sind über den Bildern, die verwendeten Puffersysteme neben den Bildern angegeben. Die Präzipitatbewertung ist jeweils unter dem Bild angegeben.

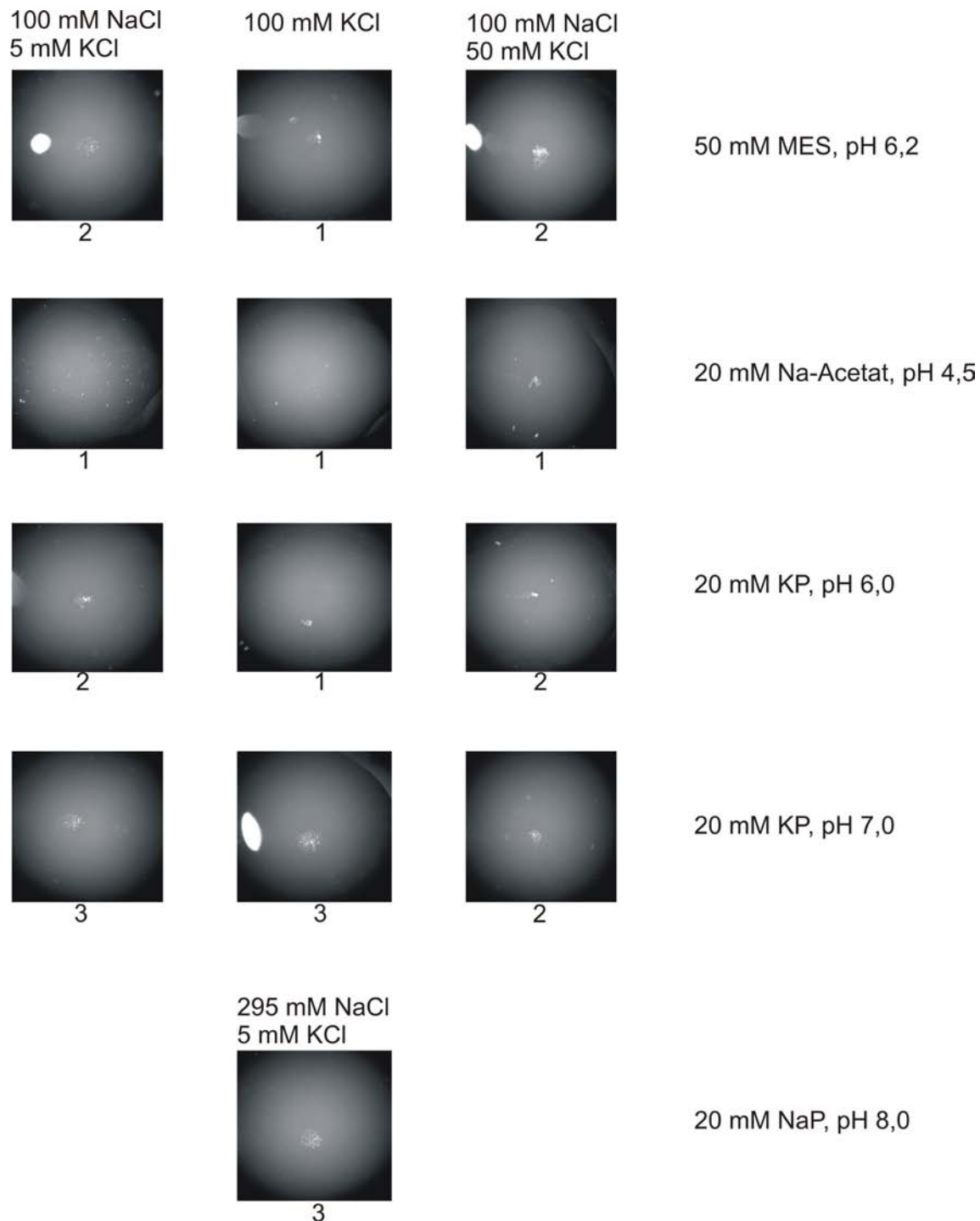


Abb. 3.29: Optimierung der Salzbedingungen für das cAMP-freie MICNG-Protein mit der „Micro-Drop“-Analyse bei 25°C. Die verwendeten Salzkonzentrationen sind über den Bildern, die verwendeten Puffersysteme neben den Bildern angegeben. Die Präzipitatbewertung ist jeweils unter dem Bild angegeben.

Auch hier ist die Präzipitatbildung bei 25°C stärker als bei 4°C. Betrachtet man die Analyse bei 25°C, so fällt auf, dass bei Puffern mit niedrigerem pH-Wert die Präzipitatbildung weniger stark ist als bei Puffern mit höherem pH-Wert. Bei 4°C ist die Präzipitatbildung insgesamt geringer, bei Puffern mit höherem pH-Wert aber deutlich stärker. Eine Bewertung

von 1 wurde für drei Puffer sowohl bei 4°C als auch bei 25°C erhalten: Für den Puffer mit 50 mM MES und 100 mM KCl, den KP-Puffer, pH 6,0 mit 100 mM KCl und den Na-Acetat-Puffer pH 4,5 (alle getesteten Salzbedingungen). Für zukünftige Bindungsexperimente wird der Na-Acetat-Puffer nicht in Betracht gezogen, da durch den niedrigen pH-Wert eine stärkere Protonierung des cAMP oder des Proteins auftreten kann, die möglicherweise die Bindungseigenschaften verändert.

3.2.5 Bindungsmessungen mit dem MICNG-Protein

Dieses Kapitel befasst sich mit Bindungsmessungen, die chronologisch nicht an das vorherige Kapitel anschließen. Viele dieser Messungen wurden durchgeführt, als noch unklar war, dass die MICNG-Probe nach der Reinigung noch cAMP gebunden hat. Auch das Aggregationsverhalten des MICNG-Proteins war in seinem Ausmaß nicht bekannt.

Das Kapitel beschreibt zunächst Bindungsmessungen mit der ITC (2.15.1). Der nächste Abschnitt zeigt Fluoreszenzmessungen, die mit dem Fluoreszenzanalogue 8-NBD-cAMP (2.15.3) in einer Stopped-Flow-Apparatur (2.15.3.2) oder in einem Fluoreszenzplattenlesegerät (2.15.3.1) durchgeführt wurden.

3.2.5.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften des MICNG-Proteins mit der ITC

Die Bindung von cAMP an das MICNG-Protein wurden mit der ITC untersucht. Die jeweilige cAMP-Konzentration lag 9,5-11,1-mal höher als die eingesetzte Proteinkonzentration. Das Volumen der Injektionen betrug 2-3,5 µl. Abb. 3.30 zeigt vier unabhängige Experimente für die Bindung von cAMP an das MICNG-Protein.

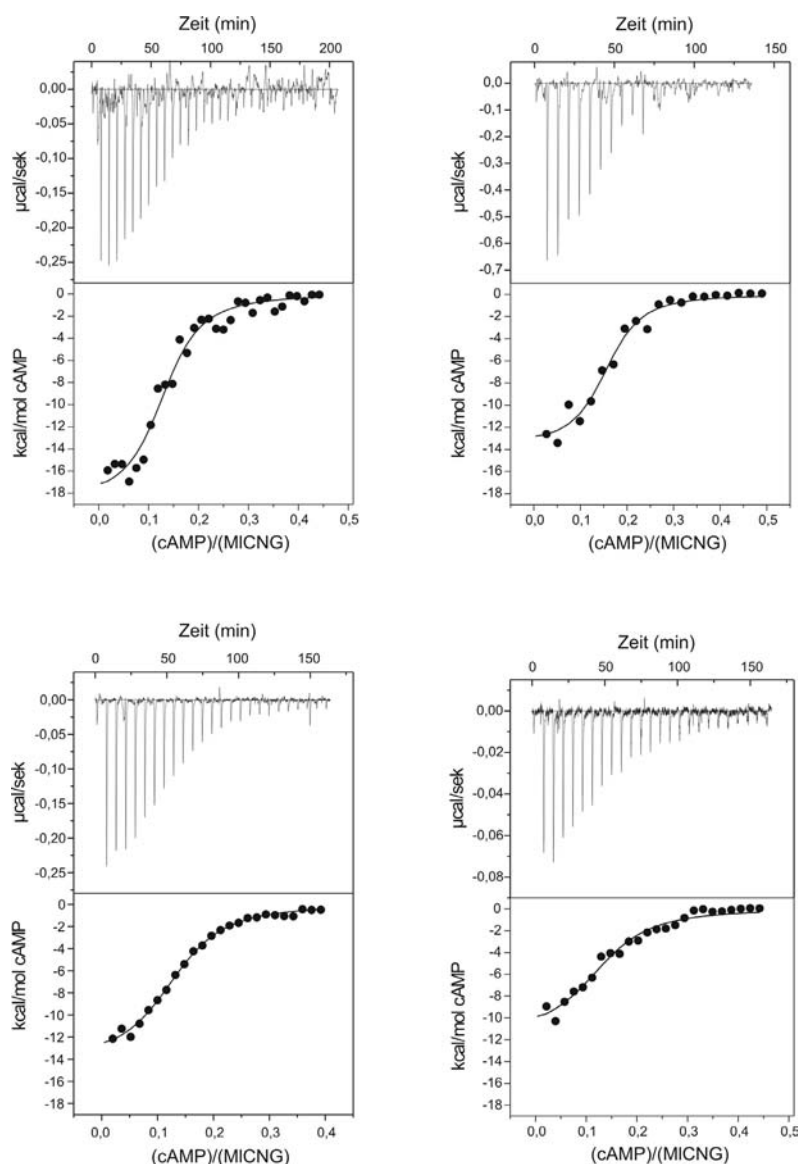


Abb. 3.30: Isothermale Titrationskalometrie der Bindungsreaktion des MICNG-Proteins mit cAMP. Die jeweiligen oberen Teilabbildungen zeigen die Wärmeänderungen, die bei der wiederholten Injektion von cAMP zu dem MICNG-Protein auftreten. Die Peaks wurden integriert, auf die jeweilige cAMP-Konzentration normiert und gegen das cAMP/MICNG-Verhältnis aufgetragen (jeweils unterer Teil). Die durchgezogenen Linien repräsentieren Kurvenanpassungen in Anlehnung an ein einfaches Bindungsmodell. Die Ordinatenskalen der oberen Teilabbildungen sind individuell, die der unteren Teilabbildungen gleich gewählt. Die Parameter der einzelnen Messungen sind in den Tabellen 3.7 und 3.8 angegeben.

Der obere Abschnitt jeder Teilabbildung zeigt die Messungen, in denen cAMP in die Reaktionszelle injiziert wurde. Für den ersten Messpunkt wurde eine Injektion von nur 0,5 μl cAMP vorgenommen, die nicht in die Auswertung einbezogen wurde. Die Flächen unter den Peaks wurden durch Integration bestimmt. Die Verdünnungswärme des Liganden wurde jeweils von den Wärmeänderungen abgezogen. Im unteren Abschnitt der Teilabbildungen wurden die Bindungswärmen auf die cAMP-Konzentration normiert und als Funktion der

Ligandenkonzentration dargestellt. Tabelle 3.7 zeigt eine Zusammenfassung der vier Messungen.

Tabelle 3.7: Zusammenfassung der ITC-Daten für die cAMP-Titration mit dem MICNG-Protein.

Nr.	MICNG (μM)	cAMP (μM)	Injektion (μl)	N	$K_B (M^{-1})$	$K_D (nM)$	c-Wert
1	30	300	2	0,13	$2,70 \cdot 10^6$	371	10,5
2	47,5	450	3,5	0,15	$2,11 \cdot 10^6$	473	15,1
3	27,0	300	2	0,13	$2,00 \cdot 10^6$	500	7,0
4	10,0	100	2,5	0,13	$4,14 \cdot 10^6$	242	5,4
Ø ¹				$0,14 \pm 0,01$	$2,74 \cdot 10^6 \pm 9,81 \cdot 10^5$	397 ± 117	

¹Mittelwerte ± s.d.

Der Parameter N beschreibt die Bindungsstöchiometrie. Der Mittelwert für N beträgt $0,14 \pm 0,01$, somit stehen nur 14 % des Proteins für die Bindungsreaktion zur Verfügung. Aus der HPLC-Analyse ist bekannt, dass ca. 50 % des Proteins nach der Reinigung in der cAMP-gebundenen Form vorliegt (3.2.3). Diese Fraktion steht also für die Bindungsreaktion in der ITC nicht zur Verfügung. Trotzdem ist die Stöchiometrie geringer als erwartet. Die Gründe hierfür sind unklar. Ein Teil des Proteins könnte aggregiert sein. Ich kann aber auch nicht ausschließen, dass das tetramere MICNG-Protein weniger als vier Liganden bindet oder die Proteinbestimmung ungenau ist.

Wenn ich davon ausgehe, dass nur 14 % des Proteins an der Bindungsreaktion teilnehmen, reduziert sich der c-Wert für die vier Messungen auf 5-15 (Tabelle 3.7). Für Werte von 1-1000 ist die quantitative Auswertung der Kalorimetrie möglich.

Passe ich die Daten mit einem einfachen Bindungsmodell an, so erhalte ich einen durchschnittlichen K_D -Wert für die Bindung von cAMP an das MICNG-Protein von 397 ± 117 nM. Dieser Wert liegt höher als der für die CNBD erhaltene Wert von 107 nM (3.1.4.1). Die thermodynamischen Parameter der vier Messungen sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Tabelle 3.8: Thermodynamische Parameter der Bindungsreaktion von cAMP mit dem MICNG-Protein.

Nr.	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/(mol*K))	ΔG (kJ/mol)
1	-78,5	-140,0	-36,8
2	-57,2	-70,6	-36,2
3	-59,7	-79,3	-36,0
4	-48,9	-37,3	-37,8
$\bar{\Delta}^1$	$-61,1 \pm 12,5$	$-81,8 \pm 42,8$	$-36,7 \pm 0,8$

¹Mittelwerte $\pm$ s.d.

In allen Messungen waren ΔH und ΔS negativ. Das bedeutet, dass es sich um eine enthalpiegetriebene Reaktion handelt. Die thermodynamischen Daten sind in Abb. 3.31 zusammenfassend graphisch dargestellt.

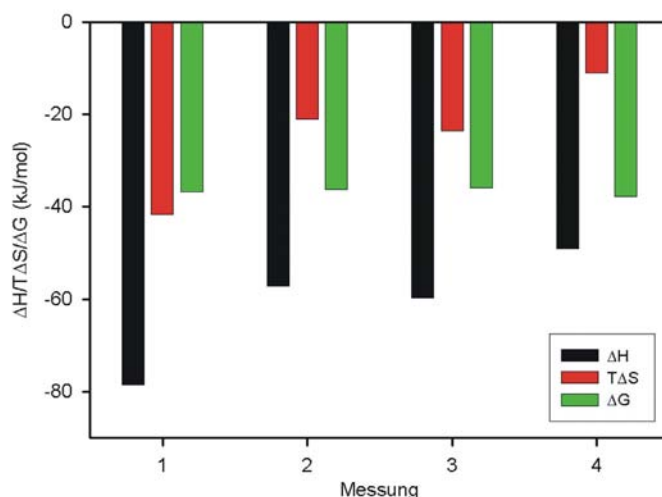


Abb. 3.31: Graphische Darstellung der thermodynamischen Daten der Bindung von cAMP an das MICNG-Protein. Dargestellt sind die Bindungsenthalpie ΔH (schwarze Balken), die Bindungsentropie ΔS multipliziert mit der Temperatur T (298 K; rote Balken) und die freie Bindungsenergie ΔG (grüne Balken).

Auch wenn hier interessante Unterschiede der Bindung des MICNG-Proteins im Vergleich zur isolierten Bindestelle auftreten, muss man mit der Interpretation der Daten vorsichtig sein. Die Versuchsbedingungen waren keineswegs optimal. Beispielsweise wurde die Konzentration des Liganden so gewählt, dass sie etwa 10-fach größer war als die des Proteins. Da aber nur ein Bruchteil des eingesetzten Proteins den Liganden bindet, war rückblickend die Konzentration des cAMP etwas zu hoch gewählt. Das Problem erkennt man gut am Verlauf der Wärmeänderungen und an der abgeleiteten Titrationskurve. Nach den ersten Injektionen nahmen die Wärmeänderungen stark ab, weil der größte Teil der funktionellen

Bindestellen schon besetzt wird. Daher ist der Beginn der Titrationskurve nicht gut definiert. Leider war es wegen Zeitmangels nicht mehr möglich, die ITC unter besseren Versuchsbedingungen durchzuführen.

3.2.5.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften des MICNG-Proteins mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie

3.2.5.2.1 Stöchiometriebestimmung

Die Bindungsstöchiometrie wurde, wie schon für die CNBD beschrieben, bestimmt. Ich habe eine niedrige Konzentration von 8-NBD-cAMP ($0,1 \mu\text{M}$) gegen verschiedene Konzentrationen des MICNG-Proteins titriert (Abb. 3.32 A). Bei Konzentrationen $\geq 2 \mu\text{M}$ des MICNG-Proteins sättigt das Fluoreszenzsignal. Die Fluoreszenzänderung ΔF pro μM gebundenem 8-NBD-cAMP betrug in diesem Fall $30.000 \mu\text{M}^{-1}$. Bestimme ich nun bei einer gegebenen Proteinkonzentration die Fluoreszenzänderung bei einer sättigenden Konzentration 8-NBD-cAMP ($30 \mu\text{M}$), so erhalte ich aus der Kalibrierung die maximale Konzentration des Rezeptor-Ligandenkomplexes (RL_{max}). Abb. 3.30 B zeigt das Verhältnis von RL_{max} zur Gesamtkonzentration an Protein (R_t) für verschiedene Proteinkonzentrationen ($0,5 \mu\text{M}$ bis $4 \mu\text{M}$). Der durchschnittliche Wert für das Verhältnis von RL_{max}/R_t betrug $0,6 \pm 0,1$ ($n = 8$). Falls jede Untereinheit einen Liganden bindet, würde man ein RL_{max}/R_t -Verhältnis von 1 erwarten (gestrichelte Linie, Abb. 3.30 B). Die Gründe für die geringe Stöchiometrie sind unklar. Ein Teil des Proteins könnte aggregiert oder denaturiert sein. Ich kann aber auch nicht ausschließen, dass das tetramere MICNG-Protein weniger als vier Liganden bindet oder die Proteinbestimmung ungenau ist.

Für jede weitere Messung wurde bestimmt, wie viel Protein jeweils für die Bindungsreaktion zugänglich war. Dies wurde bei der Datenauswertung berücksichtigt.

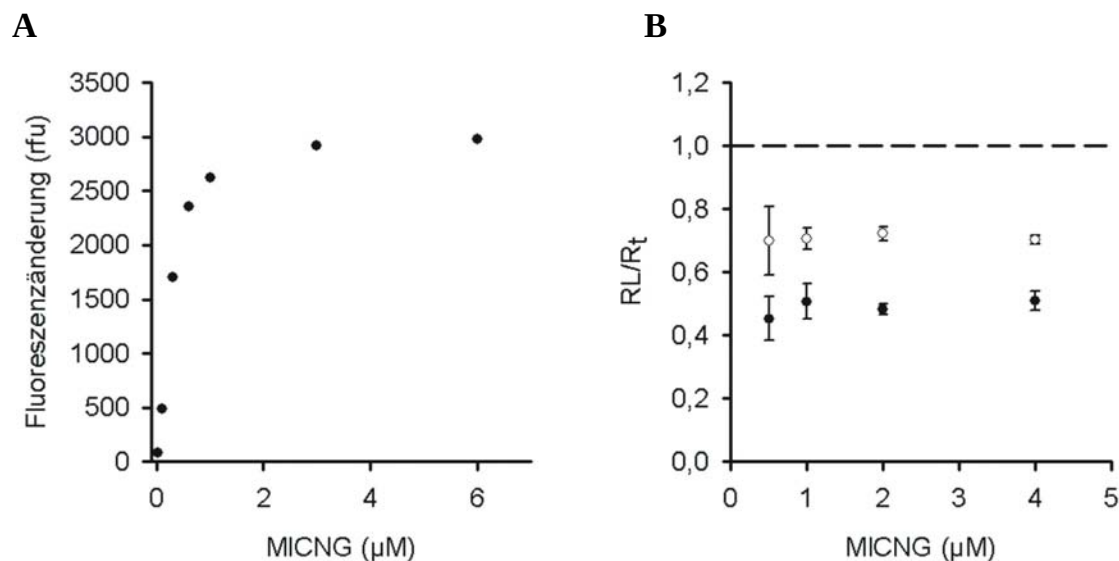


Abb. 3.32: Bestimmung der Anzahl der gebundenen Liganden pro Kanaluntereinheit. A: Fluoreszenzänderung von 8-NBD-cAMP (0,1 µM) in Gegenwart von steigenden Konzentrationen des MICNG-Proteins. Die maximale Fluoreszenzänderung bei sättigenden Proteinkonzentrationen ist äquivalent zu 0,1 µM des MICNG-8-NBD-cAMP-Komplexes. **B:** Verhältnis der maximalen Konzentration des Rezeptor-Ligandenkomplexes (RL_{max}) zu der Gesamtkonzentration an Rezeptor (R_t). Die Mittelwerte für jede Proteinkonzentration wurden aus 4 Experimenten bestimmt. Die Symbole weisen auf Daten aus zwei unterschiedlichen Proteinpräparationen hin.

3.2.5.2.2 Konkurrenzexperimente

Der K_D -Wert für 8-NBD-cAMP wurde aus Konkurrenzexperimenten bestimmt. Ich habe den dosisabhängigen Fluoreszenzanstieg von 8-NBD-cAMP in Gegenwart von 5 verschiedenen cAMP-Konzentrationen gemessen. Der cAMP-Gehalt der Probe war in diesem Fall bekannt und ist in die Berechnungen mit eingegangen. Um die Daten auszuwerten, wurde der in Kapitel 3.2.5.1 bestimmte K_D -Wert für cAMP von 0,397 µM mit in die Anpassung einbezogen. An jeden einzelnen Datensatz wurde unter diesen Voraussetzungen nach Gleichung (13b) ein kompetitives Bindungsmodell (2.15.3.3.2) angepasst (Abb. 3.33 A). Der mittlere K_D -Wert für 8-NBD-cAMP aus 5 Datensätzen betrug $93,8 \pm 9,8$ nM.

Abb. 3.33 B zeigt die kompetitive Inhibition der Bindung von 0,6 µM 8-NBD-cAMP an das MICNG-Protein durch cAMP bzw. cGMP. Eine MICNG-Probe von 1,7 µM wurde mit verschiedenen Konzentrationen von cAMP oder cGMP vorinkubiert. Die Fluoreszenzänderungen wurden gemessen. Der K_D -Wert für 8-NBD-cAMP (93,8 nM) wurde in die Anpassung an ein kompetitives Bindungsmodell mit einbezogen. Der mittlere K_D -Wert für cAMP betrug 325 nM ($n = 2$), der für cGMP 1,65 µM ($n = 2$). Dies ist nur eine

Abschätzung, da bei diesen Messungen noch cAMP in der Probe enthalten war. Dennoch liegt der K_D -Wert für cAMP in der gleichen Größenordnung wie der durch die ITC bestimmte Wert (397 nM). Der K_D -Wert für cGMP ist deshalb vermutlich ebenfalls eine gute Abschätzung.

Um den K_D -Wert für 8-NBD-cGMP zu bestimmen, wurde der dosisabhängige Fluoreszenzanstieg von 8-NBD-cGMP gemessen (Abb. 3.33 C). Der K_D -Wert für cAMP (0,397 nM) wurde in die Anpassung an ein kompetitives Bindungsmodell mit einbezogen. Für die Anpassung habe ich angenommen, dass 50 % der Proteinprobe mit cAMP besetzt war. Der mittlere K_D -Wert für 8-NBD-cGMP betrug 1,24 μ M ($n = 2$).

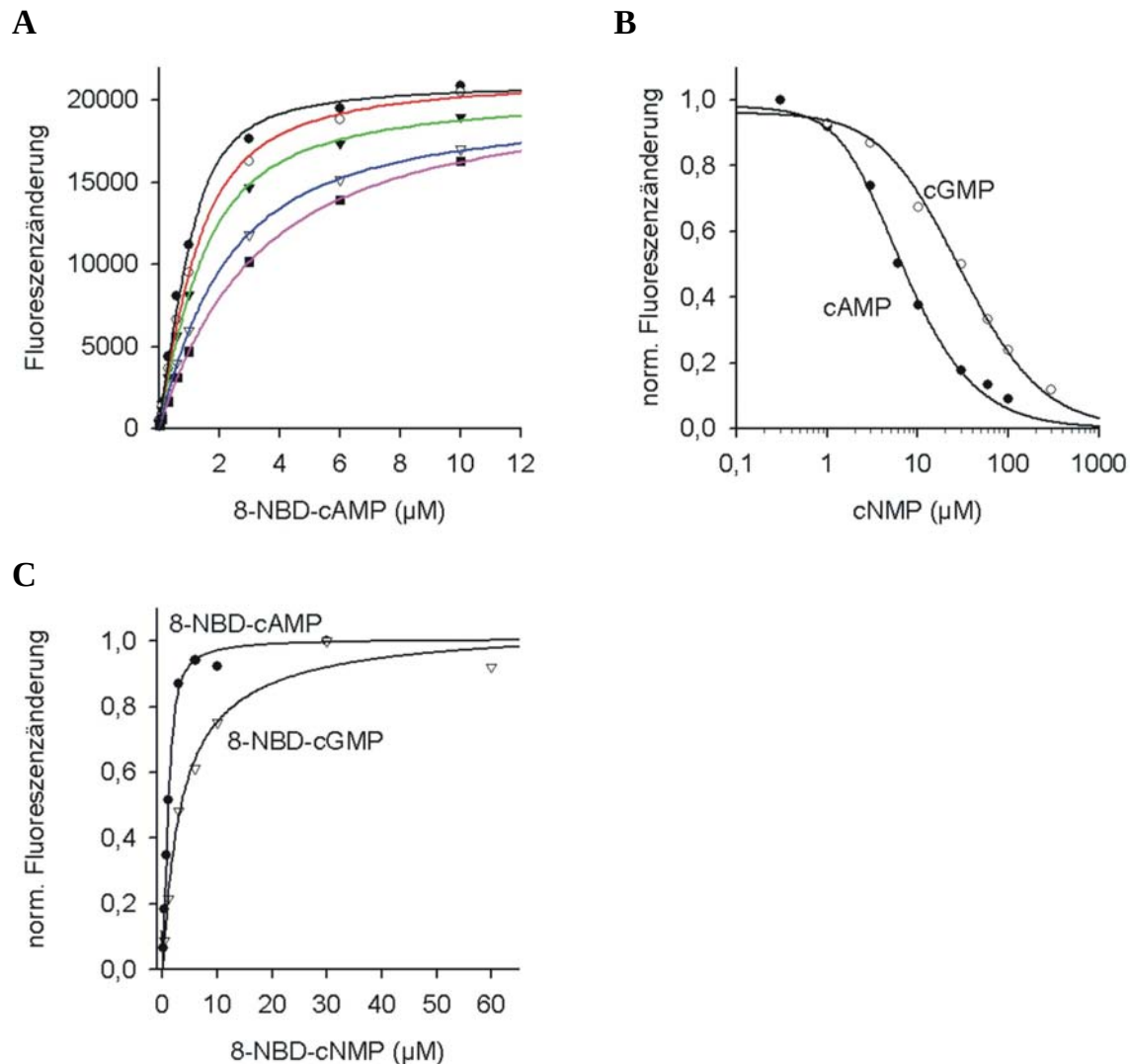


Abb. 3.33: Konkurrenzexperimente mit dem MICNG-Protein. **A:** Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von 8-NBD-cAMP an $1,5 \mu\text{M}$ MICNG-Protein in Gegenwart von 5 verschiedenen cAMP-Konzentrationen (geschlossene Kreise: $1,1 \mu\text{M}$ cAMP; offene Kreise $2 \mu\text{M}$; geschlossene Dreiecke: $3 \mu\text{M}$; offene Dreiecke $6 \mu\text{M}$; geschlossene Quadrate: $10 \mu\text{M}$). Die Daten wurden nach Gleichung (13b) (2.15.3.3.2) angepasst (durchgezogene Linien: schwarz $1,1 \mu\text{M}$ cAMP, $K_D = 78 \text{ nM}$; rot $2 \mu\text{M}$, $K_D = 105 \text{ nM}$; grün $3 \mu\text{M}$, $K_D = 94 \text{ nM}$; blau $6 \mu\text{M}$, $K_D = 95 \text{ nM}$; lila $10 \mu\text{M}$, $K_D = 97 \text{ nM}$). **B:** Konkurrenz zwischen cAMP bzw. cGMP und 8-NBD-cAMP bei Bindung an $1,7 \mu\text{M}$ des MICNG-Proteins. Gezeigt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Inhibition der Bindung von 8-NBD-cAMP durch cAMP (geschlossene Kreise) und cGMP (offene Kreise). Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen nach Gleichung (13b). Der K_D -Wert für cAMP betrug 327 nM , der für cGMP $1,7 \mu\text{M}$. **C:** Dosis-Wirkungs-Beziehung der Bindung von 8-NBD-cGMP (offene Dreiecke) im Vergleich zu 8-NBD-cAMP (geschlossener Kreis) an das MICNG-Protein. Der K_D -Wert für 8-NBD-cGMP aus der Anpassung nach Gleichung (13b) betrug $1,35 \mu\text{M}$.

3.2.5.2.3 Kinetik der Bindung von 8-NBD-cAMP an das MICNG-Protein

Die Kinetik der Bindung von 8-NBD-cAMP an das MICNG-Protein wurde näher analysiert. Dafür wurden der Ligand und das Protein mit der Stopped-Flow Methode (2.15.3.2)

untersucht. Die Stopped-Flow erlaubt ein schnelles Mischen der Lösungen. Dadurch kann die Bindungsreaktion zeitaufgelöst im Millisekundenbereich verfolgt werden.

Abb. 3.34 zeigt den Zeitverlauf der Bindungsreaktion für verschiedene 8-NBD-cAMP-Konzentrationen. Aus den Kinetiken habe ich die Zeitkonstanten bestimmt. Dafür wurden die Spuren aus Abb. 3.34 mit exponentiellen Gleichungen ((6) und (7), 2.15.3.3.1) angepasst. Bei kleinen 8-NBD-cAMP-Konzentrationen ($0,03\ \mu\text{M}$ bis $0,3\ \mu\text{M}$) konnten die Spuren mit einfach exponentiellen Gleichungen angepasst werden, bei größeren Konzentrationen ($0,45\ \mu\text{M}$ bis $10\ \mu\text{M}$) konnten die Spuren besser mit doppelt exponentiellen Gleichungen angepasst werden. Einfach exponentielle Anpassungen sind in blau, doppelt exponentielle Anpassungen in rot dargestellt.

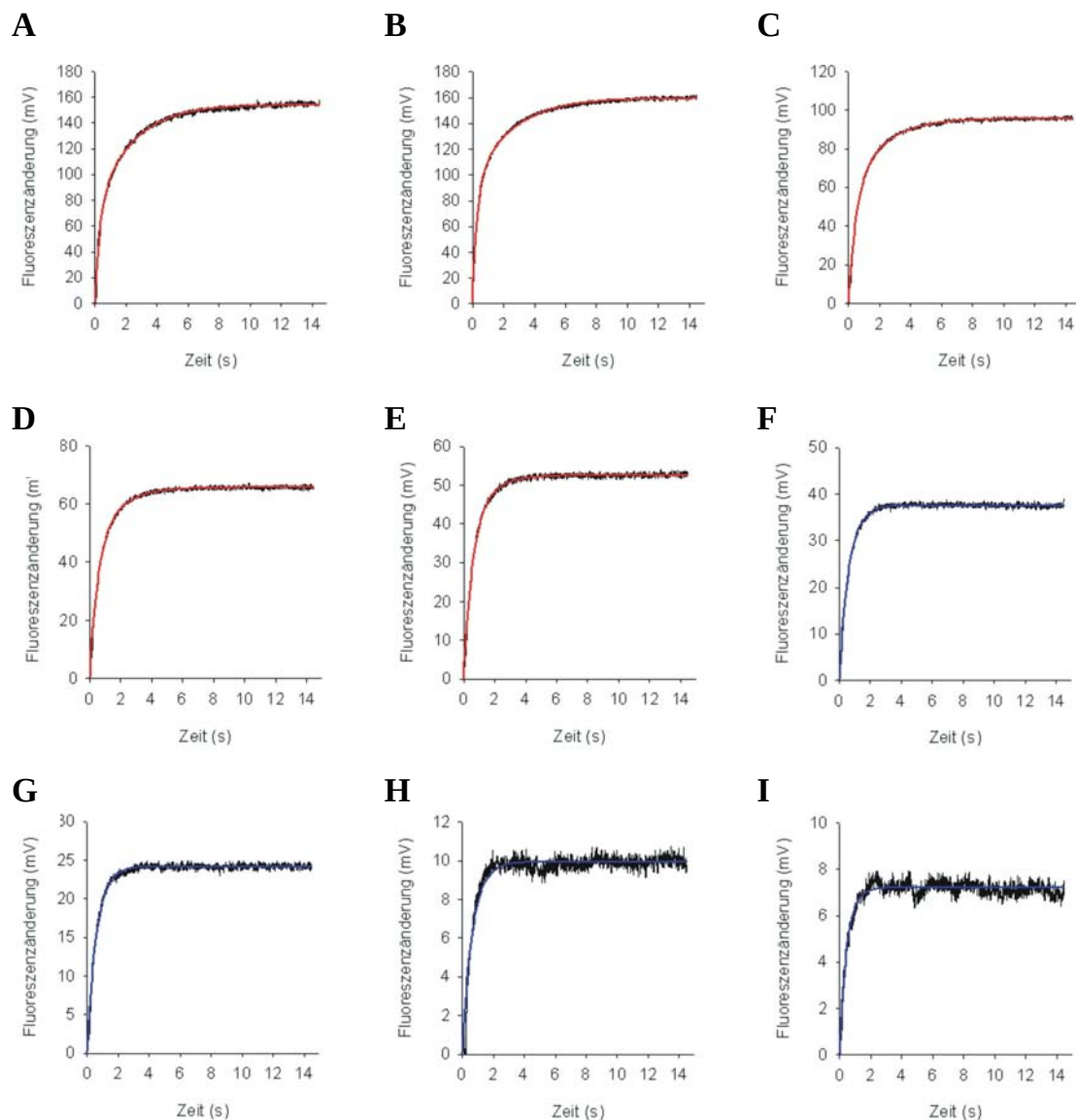


Abb. 3.34: Exponentielle Anpassungen der kinetischen Daten für die Reaktion von 8-NBD-cAMP mit dem MICNG-Protein. Die einzelnen Spuren entsprechen denen aus Abb. 3.X1. **A:** 10 μM 8-NBD-cAMP; **B:** 3 μM 8-NBD-cAMP; **C:** 1 μM 8-NBD-cAMP; **D:** 0,6 μM 8-NBD-cAMP; **E:** 0,45 μM 8-NBD-cAMP; **F:** 0,3 μM 8-NBD-cAMP; **G:** 0,2 μM 8-NBD-cAMP; **H:** 0,1 μM 8-NBD-cAMP; **I:** 0,03 μM 8-NBD-cAMP. Einfach exponentielle Anpassungen sind in blau, doppelt exponentielle Anpassungen in rot dargestellt.

Die Amplituden A , A_1 und A_2 und die Ratenkonstanten κ , κ_1 und κ_2 sind in Tab. 3.9, die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 sowie die prozentuale Aufteilung der Amplituden A_1 und A_2 in Tab. 3.10 angegeben.

Tabelle 3.9: Parameter der exponentiellen Kurvenanpassung für die Bindung von 8-NBD-cAMP an das MICNG-Protein.

8-NBD-cAMP (μM)	Einfach exponentielle Anpassung		Doppelt exponentielle Anpassung			
	A (mV)	κ (s^{-1})	A_1 (mV)	κ_1 (s^{-1})	A_2 (mV)	κ_2 (s^{-1})
10			69,9	3,18	84,3	0,44
3			90,1	3,38	69,4	0,42
1			57,8	1,99	38,0	0,48
0,6			46,7	1,71	19,1	0,60
0,45			43,9	1,62	8,8	0,60
0,3	37,6	1,58				
0,2	24,2	1,65				
0,1	9,9	1,51				
0,03	7,2	2,17				

Tabelle 3.10: Zeitkonstanten und prozentualer Anteil der Amplituden der Bindung von 8-NBD-cAMP an das MICNG-Protein.

8-NBD-cAMP (μM)	1. Komponente		2. Komponente	
	A_1	τ_1 (s)	A_2	τ_2 (s)
10	45,3 %	0,31	54,7 %	2,27
3	56,5 %	0,30	43,5 %	2,38
1	60,3 %	0,50	39,7 %	2,08
0,6	71,0 %	0,58	29,0 %	1,67
0,45	83,4 %	0,62	16,6 %	1,67
0,3	100 %	0,63		
0,2	100 %	0,61		
0,1	100 %	0,66		
0,03	100 %	0,46		

Bei höheren 8-NBD-cAMP-Konzentrationen gibt es zwei Zeitkonstanten. Unter den vorliegenden Voraussetzungen (cAMP ist am MICNG-Protein gebunden) wäre es möglich, dass die erste Zeitkonstante die Bindung von 8-NBD-cAMP an die freien Bindungsstellen des MICNG-Proteins beschreibt. Die zweite Zeitkonstante würde dann die Bindung des 8-NBD-cAMPs an die Bindestellen beschreiben, von denen das cAMP erst abdissoziieren

musste. Die Zeitkonstanten der primären Bindungsreaktion sind sehr langsam. Der Grund hierfür ist unklar. Bei einer diffusionslimitierten Bindungsreaktion würde ich Zeitkonstanten erwarten, die ca. 2 Größenordnungen niedriger liegen.

Für hohe 8-NBD-cAMP-Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) ist das MLCNG-Protein wahrscheinlich quantitativ mit 8-NBD-cAMP gesättigt und man kann anhand der Amplitude der zweiten Komponente abschätzen, wie viel cAMP an dem MLCNG-Protein gebunden war. Das wären in diesem Fall ca. 55 %. Das stimmt gut mit den über die HPLC bestimmten cAMP-Mengen überein (3.2.3).

4. Diskussion

Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle) spielen beim Sehen und Riechen eine wichtige Rolle und sind physiologisch gut untersucht. Über den molekularen Schaltmechanismus ist aber nur wenig bekannt. Bisher wurde vor allem die Aktivierung von CNG-Kanälen in Abhängigkeit der zyklisch Nukleotid-Konzentrationen gemessen. Das Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung eines bakteriellen K^+ -selektiven CNG-Kanals (MICNG) aus *Mesorhizobium loti*.

4.1 Funktionelle Messungen

In meiner Arbeit wollte ich das Schaltverhalten des MICNG-Kanals untersuchen. Um funktionelle Messungen durchführen zu können, habe ich den gereinigten MICNG-Kanal in Liposomen rekonstituiert und habe einen K^+ -Konzentrationsgradienten über die Liposomenmembran aufgebaut. Wenn die Kanäle öffnen, fließen K^+ -Ionen über die Membran und das Membranpotential ändert sich. Diese Änderungen können mit Hilfe von spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffen verfolgt werden. Leider konnte ich keine funktionellen MICNG-Kanäle nachweisen. Zwei andere Gruppen (Nimigean et al., 2004, Clayton et al., 2004) haben den MICNG-Kanal in Liposomen rekonstituiert und den $^{86}Rb^+$ -Fluss über die Membran gemessen. Der zyklisch Nukleotid-abhängige $^{86}Rb^+$ -Fluss dauerte allerdings über mehr als 2 h an und war damit viel langsamer als bei einem Ionenkanal vermutet werden kann. Die $^{86}Rb^+$ -Flussraten, die für einen geöffneten Ionenkanal angenommen werden, liegen ca. 100-fach höher. Möglicherweise haben diese beiden Gruppen Artefakte gemessen. Das zeigt die Schwierigkeiten der funktionellen Rekonstitution dieses Kanals auf. Deshalb habe ich mich auf Bindungsmessungen mit dem MICNG-Kanal konzentriert. Dabei war das Ziel, die Bindungsaffinitäten und die Kinetik von cAMP und einiger Analoga an das Kanalprotein zu messen. Die Bindung des Liganden an den Ionenkanal ist Teil der Kanalaktivierung.

Den Aktivierungsmechanismus eines ligandengesteuerten Ionenkanals möchte ich anhand des linearen Schaltmodells beschreiben (Abb. 4.1; del Castillo & Katz, 1957). An den geschlossenen Kanal (C) binden n Liganden (L). Das führt dazu, dass der Kanal vom

geschlossenen in den offenen Zustand übergeht (O). Der Gesamteffekt eines Liganden wird durch zwei Größen beschrieben: die Dissoziationskonstante (K) beschreibt die Bindungsreaktion; die Schaltkonstante (S) beschreibt die Fähigkeit des Liganden, den Kanal zu öffnen. Die Aktivierung hängt damit sowohl von der Bindungsreaktion als auch von den Konformationsänderungen ab, die zur Kanalöffnung führen.



Abb. 4.1: Lineares Schaltmodell für ligandengesteuerte Ionenkanäle (del Castillo & Katz, 1957).

C = geschlossener Kanal, O = offener Kanal, L = Ligand; K = Dissoziationskonstante des Liganden, S = Gleichgewichtskonstante des Schaltens, n = Anzahl der Bindungsereignisse.

Nun stellt sich allerdings die Frage, ob die Bindung eines Liganden an den Ionenkanal unabhängig vom Schalten untersucht werden kann. Da der Kanal während der Bindungsreaktion schalten kann, werden Konformationsänderungen ausgelöst, die die Bindungsreaktion beeinflussen können. In meiner Arbeit habe ich deshalb die Bindungsaffinitäten zyklischer Nukleotide nicht nur an den MLCNG-Kanal, sondern auch an dessen isolierter Bindestelle (CNBD) bestimmt.

Warum ist ein Vergleich der Bindungsaffinitäten des MLCNG-Kanals mit der CNBD noch interessant? Eine Eigenschaft der CNG-Kanäle aus Säugetieren ist deren hohe Kooperativität bei der Aktivierung durch zyklische Nukleotide (Übersicht Eismann et al., 1993). Es ist dagegen völlig unbekannt, ob die Bindung an die Kanäle kooperativ ist. Der MLCNG-Kanal liegt als Tetramer vor, während die CNBD als Monomer vorliegt. Bei einem Monomer erwartet man bei der Bindung keine Kooperativität. Bei dem tetrameren Kanal wäre jedoch eine kooperative Bindung vorstellbar. Die Bindung eines Liganden an eine Bindestelle könnte die Bindung eines weiteren Liganden entweder begünstigen (positive Kooperativität) oder benachteiligen (negative Kooperativität).

4.2 Bindungsstudien

In dieser Arbeit habe ich die Kinetik der Bindung von 8-NBD-cAMP an den MLCNG-Kanal analysiert, sowie die Affinitäten für die Bindung von cAMP und verschiedenen Analoga an den MLCNG-Kanal und an die CNBD bestimmt. Die Bindungsaffinitäten wurden mit zwei

unabhängigen Methoden bestimmt (Fluoreszenzassay und ITC). Mit beiden Methoden habe ich ähnliche Ergebnisse erzielt. Beide Methoden können also unabhängig voneinander angewendet werden.

Der K_D -Wert für die Bindung von cAMP an den MICNG-Kanal betrug ca. 400 nM (3.2.5.1), der an die CNBD ca. 100 nM (3.1.4.1; 3.1.5.2). Die CNBD zeigt in der ITC eine um den Faktor 1,7 reduzierte Affinität für cAMP in Detergenzlösung im Vergleich zu einer Messung ohne Detergenz (3.1.4.3). Der K_D -Wert für den MICNG-Kanal könnte deshalb noch um diesen Faktor niedriger liegen. Die Bindestellen des Kanals könnten durch das Detergenz schlechter für das zyklische Nukleotid zugänglich sein.

Beide Proteine haben etwa eine fünffach höhere Affinität für cGMP und eine ca. fünffach niedrigere Affinität für 8-NBD-cAMP als für cAMP. Das Affinitätsverhältnis bleibt bestehen. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Bindung an den MICNG-Kanal ähnlich wie bei der CNBD stattfindet und das Schalten wenig oder keinen Einfluss auf die Bindungsreaktion nimmt.

Für die Bindung von zyklischen Nukleotiden an die CNBD erwarte ich keine Kooperativität. An die Daten konnten nicht-kooperative Bindungsmodelle angepasst werden. Für den MICNG-Kanal wurden an die Daten ebenfalls nicht-kooperative Bindungsmodelle angepasst. Eine Interpretation im Hinblick auf die Kooperativität ist jedoch schwierig. Wenn 50 % der Bindestellen mit cAMP besetzt sind und ich davon ausgehe, dass jede der vier Untereinheiten ein cAMP-Molekül bindet, dann liegen ca. 6 % der Kanäle ohne gebundenes cAMP, 25 % mit einem, 37,5 % mit zwei, 25 % mit drei und ca. 6 % mit vier gebundenem cAMP-Molekülen vor. Ein Großteil der Kanäle hat deshalb mindestens ein cAMP-Molekül gebunden. Schon die Bindung des ersten cAMP-Moleküls an den Kanal könnte die Bindung des zweiten cAMP-Moleküls beeinflussen. Unter meinen Versuchsbedingungen ist deshalb eine Aussage über die Kooperativität nicht möglich. Man könnte die Kooperativität untersuchen, indem man mit dem cAMP-freien MICNG-Kanal Bindungsmessungen durchführt. Der cAMP-freie Kanal aggregiert allerdings innerhalb eines Tages stark in dem für die Bindungsmessungen verwendeten Puffer (3.2.4.3) und Bindungsmessungen sind bis jetzt nicht gelungen. Die Stabilität dieses Proteins müsste weiter erhöht werden und Versuchsbedingungen gefunden werden, unter denen der cAMP-freie Kanal nicht oder wenig aggregiert. Erste Optimierungen wurden mit der „*Micro-Drop*“-Analyse durchgeführt (3.2.4.3). Das Protein scheint in Puffern mit pH-Werten von 6,2 und niedriger stabiler zu sein als in einem neutralen oder leicht alkalischen pH-Bereich. Die Stabilität in diesen Puffern könnte zeitaufgelöst verfolgt werden. Jedoch darf der pH-Wert für die Bindungsmessungen nicht zu niedrig sein, da durch einen zu

geringen pH-Wert eine stärkere Protonierung des cAMP oder des Proteins auftritt und so die Bindungseigenschaften verändert werden können.

Die K_D -Werte für den MICNG-Kanal müssen vorsichtig interpretiert werden. Der MICNG-Kanal war zu ca. 50 % mit cAMP besetzt. Bei den ITC-Messungen, mit denen der K_D -Wert für cAMP bestimmt wurde, führte das zu einer geringen Stöchiometrie (3.2.5.1). Die für die Injektion verwendete cAMP-Konzentration war so gewählt, dass sie etwa 10-fach größer war als die des Proteins. Da aber wegen der hohen cAMP-Besetzung nur ein Bruchteil des eingesetzten Proteins den Liganden bindet, war rückblickend die Konzentration des cAMP etwas zu hoch gewählt. Das Problem erkennt man gut am Verlauf der Wärmeänderungen und an der abgeleiteten Titrationskurve. Nach den ersten Injektionen nahmen die Wärmeänderungen stark ab, weil der größte Teil der funktionellen Bindestellen schon besetzt wird. Daher ist der Beginn der Titrationskurve nicht gut definiert. Der K_D -Wert könnte deshalb unter besseren Versuchsbedingungen anders sein. Dafür müsste man ITC-Messungen durchführen, bei denen geringere cAMP-Konzentrationen zum MICNG-Protein injiziert werden. Werden dann genügend sättigende Wärmesignale aufgezeichnet, kann man den K_D -Wert zuverlässig bestimmen.

4.3 Thermodynamik der Bindungsreaktion

Die Kristallstruktur der CNBD des MICNG-Proteins wurde von Clayton und Kollegen (2004) in der cAMP-gebundenen Form gelöst. Abb. 4.2 zeigt die möglichen Interaktionen (gestrichelte grüne Linien) zwischen der CNBD und cAMP. Dabei wird vermutet, dass zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Ribosering ausgebildet werden, sowie drei mit den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppe. Eine ionische Wechselwirkung findet wahrscheinlich zwischen R307 und dem negativ geladenen Sauerstoffatom der Phosphatgruppe statt. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung könnte mit dem Carbonylsauerstoffatom von R348 und dem N6-Amin des Purinrings stattfinden.

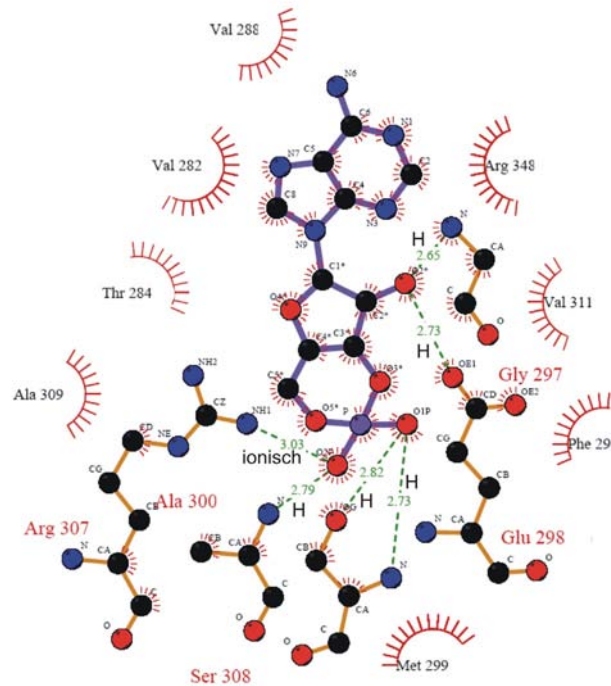


Abb. 4.2: Struktur der Bindungstasche der CNBD mit gebundenem cAMP. Die grünen gestrichelten Linien kennzeichnen Wechselwirkungen bestimmter Aminosäuren der CNBD mit cAMP; die ionische Wechselwirkung ist als ionisch, Wasserstoffbrückenbindungen sind als H gekennzeichnet; Stickstoff- und Phosphatome sind in blau, Sauerstoffatome in rot dargestellt. (Clayton et al., 2004, modifiziert: PDB-Datenbankeintrag 1VP6).

In wie weit stimmt die von mir gemessene Bindungsenergie für cAMP aus der ITC (3.1.4.1) mit der Energie, die aus den Interaktionen in der Kristallstruktur hervorgeht, überein?

Die freie Gibbsenergie ΔG ist ein Maß für die Bindungsaffinität. Sie spiegelt zwei gegenteilige Effekte auf molekularer Ebene wieder ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$): Die Tendenz, ein energetisch günstigeres Energielevel auszubilden, (z. B. durch die Bildung einer Bindung; negatives ΔH) und die Tendenz, Strukturen durch thermische Bewegung zu stören, die zum Brechen einer Bindung führen können (positives ΔS). ΔH reflektiert die Stärke von nicht-kovalenten Interaktionen wie ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Wechselwirkungen. ΔS spiegelt zwei Beiträge für die Ordnung eines Systems wider: die Änderung der Lösungsentropie und die Änderung der Konformationsentropie. Wenn ein Ligand an ein Protein bindet, werden Wassermoleküle aus der Bindestelle freigesetzt. Daraus resultiert ein Gewinn an Lösungsentropie. Gleichzeitig verlieren der Ligand und das Protein an Konformationsfreiheit. Das führt zu einem Verlust an Konformationsentropie.

Typische Abstände für Wasserstoffbrückenbindungen sind 2,5–3,2 Å und Bindungswinkel zwischen 130–180° (Jeffrey & Saenger, 1991). Die größte Energie wird bei einer linearen

Bindung mit einem Winkel von 180° erreicht. Weil Abstände und Bindungswinkel von Bindung zu Bindung abweichen können, ist es schwierig, eine generelle Aussage über die Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen zu machen. Schätzungen für die Stärke einer einzelnen Wasserstoffbrückenbindung liegen zwischen -10 und -40 kJ/mol. Allerdings sind die Beiträge zu thermodynamischen Bindungsreaktionen oft kleiner. Schätzungen für den Beitrag einer Wasserstoffbrückenbindung zur Gibbsenergie in einer Bindungsreaktion liegen zwischen -2,5 und -7,5 kJ/mol (Böhm & Klebe, 1996). Wasserstoffbrückenbindungen, die durch eine Ladung unterstützt werden, können dabei leicht höhere Werte annehmen.

Die in Abb. 4.2 gezeigten Wasserstoffbrückenbindungen im CNBD-Kristall haben Abstände zwischen 2,65-2,82 Å, liegen also in dem oben definierten Bereich. Die Winkel der Bindungen sind dagegen unbekannt. Die in Abb. 4.2 nicht gezeigte mögliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen R348 und dem Purinring hat eine Länge von 3,62 Å, ist also etwas länger und dadurch wahrscheinlich schwächer als die anderen Wasserstoffbrückenbindungen. Die Stärke der ionischen Wechselwirkung zwischen der Phosphatgruppe und R307 habe ich mit -5,7 kJ/mol abgeschätzt ($V = q_1 \cdot q_2 / (4 \cdot \pi \cdot \epsilon \cdot r)$ mit V = Energie der ionischen Wechselwirkung, q = Ladungsenergie; ϵ = Dielektrizitätskonstante von Wasser, r = Abstand der Interaktion). Die dargestellten Wechselwirkungen aus der Kristallstruktur könnten also Energien zwischen -20,7 und -50,7 kJ/mol annehmen. Die von mir gemessene Gibbsenergie für die CNBD betrug -40 kJ/mol (3.1.4.1). Die Energie liegt somit in dem möglichen Bereich. Daraus schließe ich, dass die Wechselwirkungen in der Kristallstruktur mit denen in Lösung ähnlich oder identisch sind.

4.4 Unterschiede in den K_D -Werten von cAMP und cGMP

Ich habe Unterschiede in den Affinitäten für die Bindung verschiedener Analoga an den MICNG-Kanal und die CNBD gemessen. Die Affinität für die Bindung von cAMP sowohl an die CNBD als auch an den MICNG-Kanal ist etwa fünffach größer als für cGMP. Wodurch kommen diese Unterschiede in der Bindungsaffinität zustande? Es wird vermutet, dass die Wechselwirkungen der Bindetasche mit der Ribose- und der Phosphatgruppe eines zyklischen Nukleotids für alle Analoga gleich sind und dass Unterschiede durch Wechselwirkungen mit dem Purinring zustande kommen.

In der Kristallstruktur der CNBD (Clayton et al., 2004) bindet cAMP in der anti-Konformation. Abb. 4.3 zeigt die beiden unterschiedlichen Konformationen, die cAMP ausbilden kann. Die Wechselwirkung der CNBD mit dem Purinring kommt durch hydrophobe Wechselwirkungen und Interaktion mit R348 zustande (Clayton et al., 2004), das vermutlich eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N6-Amin ausbildet (Kap. 4.2). cGMP, das sich an den Positionen 1,2 und 6 des Purinrings zu cAMP unterscheidet, kann diese Interaktion nicht eingehen. Es wäre möglich, dass cGMP in der syn-Konformation bindet und eine Wasserstoffbrücke zu S308 ausbildet. Um weitere Einblicke in den von cAMP und cGMP zu bekommen, könnte man Aminosäuren, die wichtig für die Substratspezifität sind, austauschen und Bindungsmessungen durchführen. Man könnte beispielsweise S308 gegen T oder A oder R348 gegen eine neutrale Aminosäure austauschen. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Kristallstruktur der CNBD mit gebundenem cGMP zu lösen.

Für die Aktivierung des HCN2-Kanals mit cGMP sind 10-fach höhere Konzentrationen nötig als für die Aktivierung mit cAMP (Zagotta et al., 2003). Um die Unterschiede des Mechanismus zu studieren, wurde die Kristallstruktur der HCN2-Bindestelle mit gebundenem cAMP und gebundenem cGMP gelöst (Zagotta et al., 2003). In der Kristallstruktur bindet cAMP in der anti- und cGMP in der syn-Konformation. cAMP kann dadurch mit dem N6-Amin des Purinrings eine Wasserstoffbrückenbindung zu R632 (äquivalente Position zu R348 in CNBD) ausbilden, während die syn-Konformation des cGMP dazu führt, dass eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem N2-Atom des Purinrings mit T592 (äquivalente Position zu S308 in CNBD) ausgebildet wird.

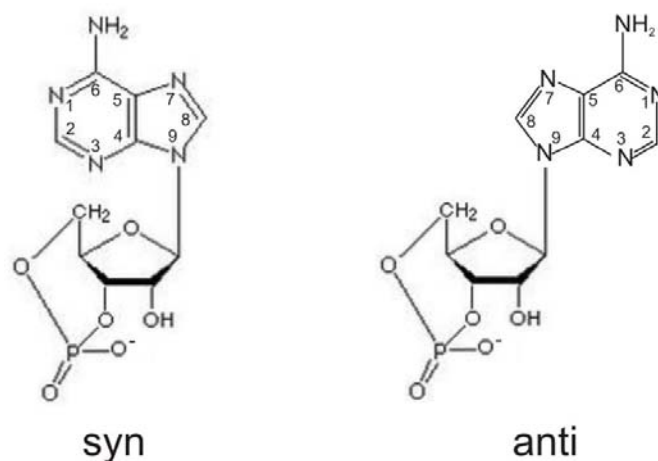


Abb. 4.3: Syn- und anti-Konformationen von cAMP. Die Zahlen geben die Numerierung der Atome im Purinring an.

Im Gegensatz zum MLCNG-Kanal werden alle bekannten CNG-Kanäle aus Säugetieren besser durch cGMP als durch cAMP aktiviert. Für die Bindung von cGMP an den CNG A1-Kanal werden Wechselwirkungen, die mit dem Purinring ausgebildet werden, mit vier Aminosäureresten der Bindetasche vermutet (Übersicht: Kaupp & Seifert, 2002): T560 könnte eine Wasserstoffbrücke mit dem N2-Amin durch ein interkaliertes Wassermolekül bilden (Scott et al., 1996), F533 und K596 könnten hydrophobe Wechselwirkung eingehen und D604 kann entweder eine Wasserstoffbrückenbindung mit N1 (Scott et al., 1996) oder zwei mit N1 und dem N2-Amin (Varnum et al., 1995) bilden. Es wird vermutet, dass die unterschiedliche Wirkung von cAMP und cGMP z.T. durch Wechselwirkungen von D604 mit der Bindedomäne zustande kommen (Varnum et al., 1995). Jedoch lassen sich dadurch nicht die Unterschiede in der Aktivierung bei verschiedenen CNG-Kanalsubtypen durch cGMP oder cAMP erklären. Viele CNG-Kanalsubtypen können unterschiedliche Aminosäurereste und Mechanismen anwenden, um die Ligandenselektivität zu erreichen. Beispielsweise wurde herausgefunden, dass die Interaktionen, die durch F533, K596, D604 und T560 des CNG A1-Kanals mit dem Purinring nicht unabhängig voneinander sind (Scott & Tanaka, 1998, Varnum et al., 1995). Dadurch ist es schwierig, die Ligandenselektivität an einer dieser Aminosäurereste festzusetzen. Es wird daher noch kontrovers diskutiert, ob cGMP in der anti- oder in der syn-Konformation bindet (Scott & Tanaka, 1998).

5. Literaturverzeichnis

- Aiba, H., Fujimoto, S. & Ozaki, N. (1982). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res.* **10**, 1345-1361.
- Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bonigk, W. & Kaupp, U.B. (1991). Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 9868-9872.
- Backx, P.H., Yue, D.T., Lawrence, J.H., Marban, E. & Tomaselli, G.F. (1992). Molecular localization of an ion-binding site within the pore of mammalian sodium channels. *Science* **257**, 248-251.
- Barkdoll, A.E. 3rd, Pugh, E.N. Jr. & Sitaramayya, A. (1988). Kinetics of the hydrolysis of 8-bromo-cyclic GMP by the light-activated phosphodiesterase of toad rods. *J. Neurochem.* **50**, 839-846.
- Bass, R.B., Strop, P., Barclay, M. & Rees, D.C. (2002). Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* **298**, 1582-1587.
- Becchetti, A. & Gamel, K. (1999). The properties of cysteine mutants in the pore region of cyclic-nucleotide-gated channels. *Pflugers Arch.* **438**, 587-596.
- Becchetti, A. & Roncaglia, P. (2000). Cyclic nucleotide-gated channels: intra- and extracellular accessibility to Cd²⁺ of substituted cysteine residues within the P-loop. *Pflugers Arch.* **440**, 556-565.
- Becchetti, A., Gamel, K. & Torre, V. (1999). Cyclic nucleotide-gated channels. Pore topology studied through the accessibility of reporter cysteines. *J Gen. Physiol.* **114**, 377-392.
- Beckstein, O., Biggin, P.C., Bond, P., Bright, J.N., Domene, C., Grottesi, A., Holyoake, J. & Sansom, M.S. (2003). Ion channel gating: insights via molecular simulations. *FEBS Lett.* **555**, 85-90.
- Birnboim, H.C. & Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Böhm, H.-J. & Klebe, G. (1996). What can we learn from molecular recognition in protein-ligand complexes for the design of new drugs? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 2588-2614.
- Bönigk, W., Altenhofen, W., Müller, F., Dose, A., Illing, M., Molday, R.S. & Kaupp, U.B. (1993). Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. *Neuron* **10**, 865-877.
- Booth, P.J., Templer, R.H., Meijberg, W., Allen, S.J., Curran, A.R. & Lorch, M. (2001). In vitro studies of membrane protein folding. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **36**; 501-603.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Broillet, M.C. & Firestein, S. (1996). Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. *Neuron* **16**, 377-385.
- Brown, R.L., Bert, R.J., Evans, F.E. & Karpen J.W. (1993). Activation of retinal rod cGMP-gated channels: what makes for an effective 8-substituted derivative of cGMP? *Biochemistry* **32**, 10089-10095.
- Brown, R.L., Snow, S.D. & Haley, T.L. (1998). Movement of gating machinery during the activation of rod cyclic nucleotide-gated channels. *Biophys. J.* **75**, 825-833.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987). XL1-Blue: A High efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Butt, E., Nolte, C., Schulz, S., Beltman, J., Beavo, J.A., Jastorff, B. & Walter, U. (1992). Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2591-2600.
- Caretta, A., Cavaggioni, A. & Sorbi, R.T. (1985). Binding stoichiometry of a fluorescent cGMP analogue to membranes of retinal rod outer segments. *Eur. J. Biochem.* **153**, 49-53.
- Catterall, W.A. (1988). Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **242**, 50-61.
- Chang, G., Spencer, R.H., Lee, A.T., Barclay, M.T. & Rees, D.C. (1998). Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* **282**, 2220-2226.
- Chang, Y., Weiss, D.S. (1999). Channel opening locks agonist onto the GABAC receptor. *Nat. Neurosci.* **2**, 219-225.
- Clayton, G.M., Silverman, W.R., Heginbotham, L. & Morais-Cabral, J.H. (2004). Structural basis of ligand activation in a cyclic nucleotide regulated potassium channel. *Cell* **119**, 615-627.
- Cook, N.J. & Kaupp, U.B. (1986). The cGMP-dependent cation channel from vertebrate photoreceptors: purification and functional reconstitution. *Photobiochemistry and Photobiophysics* **13**, 331-343.
- Cook, N. J., Molday, L.L., Reid, D., Kaupp, U.B. & Molday R.S. (1989). The cGMP-gated channel of bovine rod photoreceptors is localized exclusively in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **264**, 6996-6999.

- Cook, N.J., Zeilinger, C., Koch, K.W. & Kaupp, U.B. (1986). Solubilization and functional reconstitution of the cGMP-dependent cation channel from bovine rod outer segments. *J. Biol. Chem.* **261**, 17033-17039.
- Craven, K.B. & Zagotta, W.N. (2004). Salt bridges and gating in the COOH-terminal region of HCN2 and CNGA1 channels. *J Gen Physiol.* **124**, 663-677.
- Del Castillo, J. & Katz, B. (1957). Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **146**, 369-81.
- Delgado, R., Hidalgo, P., Diaz, F., Latorre, R. & Labarca, P. (1991). A cyclic AMP-activated K⁺ channel in *Drosophila* larval muscle is persistently activated in dunce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 557-560.
- Del Pilar Gomez, M. & Nasi, E. (1995). Activation of light-dependent K⁺ channels in ciliary invertebrate photoreceptors involve cGMP but not the IP₃/Ca²⁺ cascade. *Neuron* **15**, 607-618.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.
- Diller, T.C., Madhusudan, M., Xuong, N.-H. and Taylor, S.S. (2001). Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: Crystal structure of the type II β regulatory subunit. *Structure* **9**, 73-82.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Doyle, M.L. (1997). Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 31-35.
- Eismann, E., Bönigk, W. & Kaupp, U.B. (1993). Structural features of cyclic nucleotide-gated channels. *Cell. Physiol. Biochem.* **3**, 332-351.
- Eismann, E., Müller, F., Heinemann, S.H. & Kaupp, U.B. (1994). A single negative charge within the pore region of a cGMP-gated channel controls rectification, Ca²⁺ blockage and ionic selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1109-1113.
- Finn, J.T., Grunwald, M.E. & Yau, K.-W. (1996). Cyclic-nucleotide-gated ion channels: An extended family with diverse function. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 395-426.
- Fisher, H.F. & Singh, N. (1995). Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol.* **259**, 194-221.
- Flynn, G.E. & Zagotta, W.N. (2001). Conformational changes in S6 coupled to the opening of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **30**, 689-98.

- Flynn, G.E. & Zagotta, W.N. (2003). A cysteine scan of the inner vestibule of cyclic nucleotide-gated channels reveals architecture and rearrangement of the pore. *J Gen Physiol.* **121**, 563-582.
- Flynn, G.E., Johnson, J.P. Jr. & Zagotta, W.N. (2001). Cyclic nucleotide-gated channels: shedding light on the opening of a channel pore. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 643-651.
- Frings, S., Lynch, J.W. & Lindemann, B. (1992). Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity, and blockage. *J. Gen. Physiol.* **100**, 45-67.
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M. & Kaupp, U.B. (1995). Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **15**, 169-179.
- Gauss, R., Seifert R. & Kaupp, U.B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**, 583-587.
- Giorgetti A, Nair AV, Codega P, Torre V, Carloni P. (2005). Structural basis of gating of CNG channels. *FEBS Lett.* **579**, 1968-1972.
- Gordon, S.E. & Zagotta, W.N. (1995a). A histidine residue associated with the gate of the cyclic nucleotide-activated channels in rod photoreceptors. *Neuron* **14**, 177-183.
- Gordon, S.E. & Zagotta, W.N. (1995b). Localization of regions affecting an allosteric transition in cyclic nucleotide-activated channels. *Neuron* **14**, 857-864.
- Gordon, S.E., Oakley, J.C., Varnum, M.D. & Zagotta, W.N. (1996). Altered ligand specificity by protonation in the ligand binding domain of cyclic nucleotide-gated channels. *Biochemistry* **35**, 3994-4001.
- Gordon, S.E., Varnum, M.D. & Zagotta, W.N. (1997). Direct interaction between amino- and carboxyl-terminal domains of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **19**, 431-441.
- Gotow, T., Nishi, T. & Kijima, H. (1994). Single K⁺ channels closed by light and opened by cyclic GMP in molluscan extra-ocular photoreceptor cells. *Brain Res.* **662**, 268-272.
- Goulding, E.H., Ngai, J., Kramer, R.H., Colicos, S., Axel, R., Siegelbaum, S.A. & Chess, A. (1992). Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron* **8**, 45-58.
- Goulding, E.H., Tibbs, G.R., Liu, D. & Siegelbaum S.A. (1993). Role of H5 domain in determining pore diameter and ion permeation through cyclic nucleotide-gated channels. *Nature* **364**, 61-64.
- Griffon, N., Buttner, C., Nicke, A., Kuhse, J., Schmalzing, G. & Betz, H. (1999). Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *EMBO J.* **18**, 4711-4721.
- Guy, H.R., Durell, S.R., Warmke, J., Drysdale, R. & Ganetzky, B. (1991). Similarities in amino acid sequences of *Drosophila* eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **254**, 730.

- Hartmann, H.A., Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Taglialatela, M., Joho, R.H. & Brown, A.M. (1991). Exchange of conduction pathway between two related K⁺ channels. *Science* **251**, 942-944.
- Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**, 1152-1155.
- Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L. & Miller, C. (1998). Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **111**, 741-749.
- Heginbotham, L., Odessey, E. & Miller, C. (1997). Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K⁺ channel. *Biochemistry* **36**, 10335-10342.
- Henn, D.K., Baumann, A. & Kaupp, U.B. (1995). Probing the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7425-7429.
- Hille, B (2001) Ionic channels of excitable membranes. 3. Aufl., Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts (USA)
- Hua, L. & Gordon, S.E. (2005). Functional interactions between A' helices in the C-linker of open CNG channels. *J. Gen. Physiol.* **125**, 335-344.
- Isacoff, E.Y., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1991). Putative receptor for the cytoplasmatic inactivation gate in the Shaker K⁺ channel. *Nature* **353**, 86-90.
- Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (1990). A superfamily of ion channels. *Nature* **345**, 672.
- Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (1992). Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 537-555.
- Jeffrey, G.A. & Saenger, W. (1991). Hydrogen bonding in biological structures. Springer Verlag, Berlin.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (2002a). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**, 515-522.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (2002b). The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**, 523-526.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 33-41.
- Johnson, J.P. Jr. & Zagotta, W.N. (2001). Rotational movement during cyclic nucleotide-gated channel opening. *Nature* **412**, 917-921.

- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpō, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**, 331-338.
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. & Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**, 762-766.
- Kaupp, U.B. & Altenhofen, W. (1992). Cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptor cells and olfactory epithelium. In *Sensory Transduction, Rockefeller Univ. Press*, pp. 133-150.
- Kaupp, U.B. & Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* **82**, 769-824.
- Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Hartmann, H.A., Tagliatela, M., de Biasi, M., Brown, A.M. & Joho, R.H. (1992). *Neuron* **8**, 499-505.
- Koch, K.W. & Kaupp, U.B. (1985). Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membranes of bovine rods by a cooperative mechanism. *J. Biol. Chem.* **260**, 6788-6800.
- Kramer, R.H. & Tibbs, G.R. (1996). Antagonists of cyclic nucleotide-gated channels and molecular mapping of their site of action. *J. Neurosci.* **16**, 1285-1293.
- Kumar, V.D. & Weber, I.T. (1992). Molecular model of the cyclic GMP-binding domain of the cyclic GMP-gated ion channel. *Biochemistry* **31**, 4643-4649.
- Kuo, A., Gulbis, J.M., Antcliff, J.F., Rahman, T., Lowe, E.D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F.M., Ezaki, T. & Doyle, D.A. (2003). Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* **300**, 1922-1926.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L. & Miller, C. (2001). KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **118**, 303-314.
- Liu, D.T., Tibbs, G.R., Paoletti, P. & Siegelbaum, S.A. (1998). Constraining ligand-binding site stoichiometry suggests that a cyclic nucleotide-gated channel is composed of two functional dimers. *Neuron* **21**, 235-248.
- Liu, J. & Siegelbaum, S.A. (2000). Change of pore helix conformational state upon opening of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **28**, 899-909.
- Lopez, G.A., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1994). Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K⁺ channel comprises part of the pore. *Nature* **367**, 179-182.

- Lottspeich, Zorbas. (1998). Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. & Biel, M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**, 587-591.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235.
- MacKinnon, R. (2003). Potassium channels. *FEBS Letters* **555**, 62-65.
- MacKinnon, R. & Yellen, G. (1990). Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science* **250**, 276-279.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Matulef, K., Flynn, G.E. & Zagotta, W.N. (1999). Molecular rearrangements in the ligand-binding domain of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **24**, 443-452.
- Matulef, K. & Zagotta, W. (2002). Multimerization of the ligand binding domains of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **36**, 93-103.
- Mazzolini, M., Punta, M. & Torre, V. (2002). Movement of the C-helix during the gating of cyclic nucleotide-gated channels. *Biophys. J.* **83**, 3283-3295.
- McKay, D.B. & Steitz, T.A. (1981). Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* **290**, 744-749.
- Melishchuk, A., Loboda, A. & Armstrong, C.M. (1998). Loss of Shaker K channel conductance in 0 K⁺ solutions: Role of the voltage sensor. *Biophys. J.* **75**, 1828-1835.
- Meyer, T.S. & Lamberts, B.L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 144-145.
- Miller, C. (1991). 1990: Annus mirabilis of potassium channels. *Science* **252**, 1092-1096.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. & Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955.
- Molday, R.S., Molday, L.L., Dosé, A., Clark-Lewis, I., Illing, M., Cook, N.J., Eismann, E. & Kaupp, U.B. (1991). The cGMP-gated channel of the rod photoreceptor cell. Characterization and orientation of the amino terminus. *J. Biol. Chem.* **266**, 21917-21922.
- Monod, J., Wyman, J. & Changeaux, J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J Mol Biol.* **12**, 88-118.

- Nicke, A., Baumert, H.G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. & Schmalzing, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* **17**, 3016-3028.
- Nimigean, C.M., Shane, T. & Miller, C. (2004). A cyclic nucleotide modulated prokaryotic K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **124**, 203-210.
- Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H. & Numa, S. (1986). Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* **320**, 188-192.
- Novak, K. (2006). Charakterisierung eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals aus *Mesorhizobium loti*.
- Numa, S. (1989). A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. In The Harvey Lectures (Kaback, H.R., Kirschner, M.W., Numa, S., et al., eds), A. Liss Incorporation, New York, pp. 121-165.
- Passner, J.M. and Steitz, T.A. (1997) The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2843-2847.
- Passner, J.M., Schultz, S.C. and Steitz, T.A. (2000) Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the structure of CAP-cAMP at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **304**, 847-859.
- Paoletti, P., Young, E.C. & Siegelbaum, S.A. (1999). C-Linker of cyclic nucleotide-gated channels controls coupling of ligand binding to channel gating. *J. Gen. Physiol.* **113**, 17-34.
- Perozo, E. (2002). New structural perspectives on K⁺ channel gating. *Structure* **10**, 1027-1029.
- Pierce, M.M., Raman, C.S. & Nall, B.T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **19**, 213-221.
- Pongs, O. (1992). Structural basis of voltage-gated K⁺ channel pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 359-365.
- Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., De Rooij, J., Bos, J.L. & Wittinghofer, A. (2003). Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 26-32.
- Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A. & Bos, J.L.. (2006). Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* **439**, 625-658.
- Riggs, P. (1994) Expression and purification of maltose-binding protein fusions. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., et al., eds.), Greene Publishing Ass. and Wiley Int., pp. 16.6.1-16.6.14.

- Root, M.J. & MacKinnon, R. (1993). Identification of an external divalent cation-binding site in the pore of a cGMP-activated channel. *Neuron* **11**, 459-466.
- Roosild, T.P., Miller, S., Booth, I.R. & Choe, S. (2002). A mechanism of regulating transmembrane potassium flux through a ligand-mediated conformational switch. *Cell* **109**, 781-791.
- Ruiz, M.L. & Karpen, J.W. (1997). Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states. *Nature* **389**, 389-392.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001): Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Schägger, H., Cramer, W.A. & von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem.* **217**, 220-230.
- Schamel, W.W.A. & Schamel, K.R. (2001). Die blaue native Gelelektrophorese zur Untersuchung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen. *Immunologie Aktuell* **2**, 33-39
- Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T. & Wagner, R. (1995). A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* **14**, 5170-5178.
- Scott, S.P., Harrison, R.W., Weber, I.T. & Tanaka, J.C. (1996). Predicted ligand interactions of 3'5'-cyclic nucleotide-gated channel binding sites: comparison of retina and olfactory binding site models. *Protein Eng.* **9**, 333-344.
- Scott, S.P. & Tanaka, J.C. (1998). Three residues predicted by molecular modeling to interact with the purine moiety alter ligand binding and channel gating in cyclic nucleotide-gated channels. *Biochemistry* **37**, 17239-17252.
- Sesti, F., Straforini, M., Lamb, T.D. & Torre, V. (1994). Gating, selectivity and blockage of single channels activated by cyclic GMP in retinal rods of the tiger salamander. *J. Physiol.* **474**, 203-222.
- Slesinger, P.A., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1993). The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channels. *Neuron* **11**, 739-749.
- Sondermann, P. & Jacob, U. (1999). Human Fcγ receptor IIb expressed in *Escherichia coli* reveals IgG binding capability. *Biol. Chem.* **380**, 717-721.
- Strong, M., Chandy, K.G., & Gutman G.A. (1993). Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: On the origins of electrical excitability. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 221-242.
- Stühmer, W. (1991). Structure-function studies of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 65-78.

- Su, Y., Dostmann, W.R.G., Herberg, F.W., Durick, K., Xuong, N.-H., Ten Eyck, L., Taylor, S.S. and Varughese, K.I. (1995) Regulatory subunit of protein kinase A: Structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science* **269**, 807-813.
- Sun, Z.P., Akabas, M.H., Goulding, E.H., Karlin, A. & Siegelbaum, S.A. (1996) Exposure of residues in the cyclic nucleotide-gated channel pore: P region structure and function in gating. *Neuron* **16**, 141-149.
- Takio, K., Wade, R.D., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. & Titani K. (1984). Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families. *Biochemistry* **23**, 4207-4218.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**, 313-318.
- Tanaka, J.C., Eccleston, J.F. & Furman, R.E. (1989). Photoreceptor channel activation by nucleotide derivatives. *Biochemistry* **28**, 2776-2784.
- Tibbs, G.R., Goulding, E.H. & Siegelbaum, S.A. (1997). Allosteric activation and tuning of ligand efficacy in cyclic-nucleotide-gated channels. *Nature* **386**, 612-615.
- Tibbs, G.R., Liu, D.T., Leybold, B.G. & Siegelbaum, S.A. (1998). A state-independent interaction between ligand and a conserved arginine residue in cyclic nucleotide-gated channels reveals a functional polarity of the cyclic nucleotide binding site. *J. Biol. Chem.* **273**, 4497-4505.
- Titani, K., Sasagawa, T., Ericsson, L.H., Kumar, S., Smith, S.B., Krebs, E.G. & Walsh, K.A.(1984). Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* **23**, 4193-4199.
- 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.
- Trudeau, M.C. & Zagotta, W.N. (2002). Mechanism of calcium/calmodulin inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 8424-8429.
- Varnum, M.D. & Zagotta, W.N. (1997). Interdomain interactions underlying activation of cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **278**, 110-113.
- Varnum, M.D., Black, K.D. & Zagotta W.N. (1995). Molecular mechanism for ligand discrimination of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **15**, 619-625.
- Wang, J., Chen, S., Nolan, M.F. & Siegelbaum, S.A. (2002). Activity-dependent regulation of HCN pacemaker channels by cyclic AMP: signaling through dynamic allosteric coupling. *Neuron* **36**, 451-461.
- Weber, I.T. & Steitz, T.A. (1987). Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 311-326.

- Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. & Taylor, S.S. (1987). Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **26**, 343-351.
- Weber, I.T., Shabb, J.B. & Corbin, J.D. (1989). Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: a key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites. *Biochemistry* **28**, 6122-6127.
- Wei, J.Y., Cohen, E.D., Genieser, H.G. & Barnstable, C.J. (1998). Substituted cGMP analogs can act as selective agonists of the rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J. Mol. Neurosci.* **10**, 53-64.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts J.F. & Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131-137.
- Wu, J., Yang, J., Kannan, N., Madhusudan, Xuong, N.-H., Ten Eyck, L.F. & Taylor, S.S. (2005). Crystal structure of the E230Q mutant of cAMP-dependent protein kinase reveals an unexpected apoenzyme conformation and an extended N-terminal A helix. *Protein Science* **14**, 2871-2879.
- Yau, K.-W. (1994). Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 9-32.
- Yool, A.J. & Schwarz, T.L. (1991). Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* **349**, 700-704.
- Zagotta, W.N. & Siegelbaum, S.A. (1996). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci* **19**, 235-263.
- Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R. & Gouaux, E. (2003). Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* **425**, 200-205.
- Zhang, X., Schwartz, J.C., Almo, S.C. & Nathenson, S.G. (2002). Expression, refolding, purification, molecular characterization, crystallization, and preliminary X-ray analysis of the receptor binding domain of human B7-2. *Protein Expr. Purif.* **25**, 105-13.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A. & MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**, 43-48.
- Zimmerman, A.L., Yamanaka, G., Eckstein, F., Baylor, D.A. & Stryer, L. (1985). Interaction of hydrolysis-resistant analogs of cyclic GMP with the phosphodiesterase and light-sensitive channel of retinal rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**, 8813-8817.

-
- Zong, X., Zucker, H., Hofmann, F. & Biel M. (1998). Three amino acids in the C-linker are major determinants of gating in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* **17**, 353-362.

6. Anhang

6.1 Proteinsequenzen der verwendeten Proteine

6.1.1 CNBD nach Thrombinverdau

```

GSQEVRRGDF VRNWQLVAAP PLFQKLGP AV LVEIVRALRA RTVPAGAVIC 50
RIGEPGDRMF FVVEGSVSVA TPNPVELGPG AFFGEMALIS GEPRSATVSA 100
ATTVSLLSLH SAD FQMLCSS SPEIAEIFRK TALERRGAAA SA 142

```

6.1.2 MICNG

```

MSVLPFLRIY APLNAVLAAP GLLAVAALTI PDMSGRSRLA LAALLAVIWG 50
AYLLQLAATL LKRRAGVVRD RTPKIAIDVL AVLVPAAFL LDGSPDW SLY 100
CAVWLLKPLR DSTFFPVLGR V LANEARNLI GVTTLFGVVL FAVALAAYVI 150
ERDIQPEKFG SIPQAMWWAV VTLSTTG YGD TIPQSFAGRV LAGAVMMSGI 200
GIFGLWAGIL ATGFYQEVRR GDFVRNWQLV AAVPLFQKLG PAVLVEIVRA 250
LRARTVPAGA VICRIGEPGD RMFFVVEGSV SVATPNPVEL GPGAFFGEMA 300
LISGEPRSAT VSAATTVSLL SLHSADFQML CSSSPEIAEI FRKTALERRG 350
AAASA 355

```

gelb – S1

grün – S2

cyan – S3

pink – S4

blau – S5

rot – S6

dunkelgrün – Pore

grau – CNBD

6.1.3 KcsA

MPPMLSGLLA RLVKLLLGRH GSALHWRAAG AATVLLVIVL LAGSYLAVLA 50
 ERGAPGAQLI TYPRALWWSV ETATTVGYG D LYPVTLWGRL VAVVVMVAGI 100
 TSFGLVTAAL ATWFGVGREQE RRGHFVRHSE KAAEEAYTRT TRALHERFDR 150
 LERMLDDNRR 160

6.2 Molare Extinktionskoeffizienten einiger zyklischer Nukleotide und der verwendeten Proteine

Tabelle 6.1: Molare Extinktionskoeffizienten einiger zyklischer Nukleotide.

Zyklisches Nukleotid	Wellenlänge (nm)	Lösungsmittel	Molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1}cm^{-1}$)
cAMP	258	20 mM NaP, pH 7,0	14650
	260		13800
cGMP	254	20 mM NaP, pH 7,0	12950
8-Br-cAMP	264	20 mM NaP, pH 7,0	15700
8-CPT-cAMP	282	20 mM NaP, pH 7,0	16000
8-NBD-cAMP	467	Methanol	23000
8-Br-cGMP	260	20 mM NaP, pH 7,0	15000
8-CPT-cGMP	276	20 mM NaP, pH 7,0	21500
8-NBD-cGMP	467	Methanol	23000

Tabelle 6.2: Molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine.

Protein	Wellenlänge (nm)	Molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1}cm^{-1}$)
MICNG	280	47630
CNBD	280	5690

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-1) des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Ich danke **allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern** für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

- Herrn Prof. Dr. U. B. Kaupp für die Überlassung des Themas und seine stetige Diskussionsbereitschaft,
- Herrn Dr. R. Seifert für die wissenschaftliche Betreuung, seine hilfreichen Diskussionen und Ratschläge, sowie für seine Unterstützung bei der Niederschrift der Arbeit,
- Herrn Prof. Dr. M. Bott für die Überlassung des ITC-Instruments,
- Herrn Dr. W. Bönigk und Herrn A. Franzen für ihre Hilfsbereitschaft und die Abwechslung im Laboralltag,
- Herrn Joachim Schmitz für seine tatkräftige Unterstützung während meiner Doktorarbeit,
- Kerstin Novak für die Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit,
- Herrn Timo Strücker und Dagmar Harzheim für das gute Büroklima,
- Doris, Sabine, Dagmar und Anja für die seelische Unterstützung,
- Herrn D. Grammig für seine Unterstützung bei allen computertechnischen Fragen,
- Frau A. Eckert für ihr offenes Ohr und die freundliche Hilfe bei allen verwaltungstechnischen und organisatorischen Problemen,
- Herrn R. Esser für die Hilfe bei organisatorischen Problemen, für die Versorgung mit Joghurt und Plätzchen sowie für die Späße aller Art,
- Herrn D. Portz für die Hilfe bei allen technischen Problemen,
- Herrn Dr. M. Oldiges und Herrn H. J. Brandt für die Durchführung der Fermentation,
- Sabine, Anja und Nadine für die lustigen Minuten beim Essen,
- Herrn H. G. Körschen für die fahrtechnische Unterstützung im Falle eines Handicaps.

Herrn Prof. Dr. P. Kloppenburg möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann Joachim, meiner Familie und meinen Freunden, die mich bei allem unterstützt und immer wieder aufgebaut haben.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4240
Januar 2007
ISSN 0944-2952