



Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1

**Charakterisierung eines zyklisch
Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
aus *Mesorhizobium loti***

Kerstin Novak

**Charakterisierung eines zyklisch
Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
aus *Mesorhizobium loti***

Kerstin Novak

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4224

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1 Jül-4224

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 sind ligandengesteuerte Ionenkanäle deren Öffnungsverhalten durch cAMP bzw. cGMP reguliert wird. Zu dieser Ionenkanalfamilie zählen die CNG- und die HCN-Kanäle. Während die physiologische Funktion dieser Kanäle weitgehend untersucht ist, ist nur wenig über ihre Struktur und ihren molekularen Öffnungsmechanismus („gating“) bekannt. Homologe, bakterielle Kanäle bieten eine neue Grundlage zur Erforschung dieses „gating“-Mechanismus, da sie in großen Mengen in Bakterien exprimiert werden können. Sie eignen sich daher besonders für strukturelle 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 Expression des MICNG-Kanalproteins in *E. coli* wurde im Hinblick auf eine hohe Proteinausbeute optimiert. Anschließend wurde das Protein für funktionelle und strukturelle Untersuchungen affinitätschromatographisch gereinigt. Gegen das MICNG-Protein wurden monoklonale Antikörper hergestellt, die das Kanalprotein im Western Blot und auch in immunzytochemischen Färbungen erkennen. Desweiteren wurde ein Konstrukt kloniert, welches die Sequenz der C-terminal gelegenen zyklisch Nukleotid-Bindestelle des MICNG-Kanalproteins enthält. Die Bindestelle (MICNBD) wurde in Bakterien exprimiert und sowohl in einer cAMP-gebundenen als auch in einer cAMP-freien Form für strukturelle Untersuchungen und Ligandenbindungsstudien gereinigt. Erste NMR-Messungen wurden erfolgreich an dem MICNBD-Protein durchgeführt. Durch isothermale Titrationskalorimetrie wurden die Bindungsaffinitäten für zyklische Nukleotide sowohl für das gesamte Protein als auch für die isolierte Bindestelle bestimmt. Chemische Quervernetzungsversuche zeigten, dass sowohl das Kanalprotein als auch seine isolierte Bindestelle tetramere Komplexe ausbilden.

Abstract

Ion channels control the flow of ions across cellular membranes. They play a crucial role in many biological processes. Cyclic nucleotide-gated ion channels (CNG- and HCN-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 investigated, only little is known about their structure and molecular mechanism of opening (“gating”). Homologous bacterial ion channels offer a novel basis to investigate the “gating”-mechanism, because they can be expressed in high quantities in bacteria and, therefore, are applicable for structural studies.

In this work biochemical and biophysical studies were carried out on the cyclic nucleotide-gated ion channel (MICNG) from the bacterium *Mesorhizobium loti*. The expression of the MICNG protein in *E. coli* was optimized to obtain high yield. The protein was purified via affinity chromatography to enable functional and structural studies. In addition, monoclonal antibodies were raised against the MICNG protein. The antibodies detect the channel protein in the Western Blot as well as in immunocytochemical stainings. A construct (MICNBD) was cloned, which only contains the c-terminal cyclic nucleotide-binding domain of the MicNMP channel. The MICNBD protein was expressed in bacteria and cAMP-bound and cAMP-free forms of the protein were purified for structural and ligand binding studies. Preliminary NMR measurements to identify the structure of the MICNBD protein were performed successfully. The binding affinities of MICNG and MICNBD for cyclic nucleotides were determined by isothermal titration calorimetry. Chemical cross linking analysis shows that MICNG as well as MICNBD form tetrameric complexes.

I Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Die Bindestelle für zyklische Nukleotide	1
1.2	Ionenkanäle mit einer Bindestelle für zyklische Nukleotide	3
	Zielsetzung	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Material	7
2.2	Plasmid-DNA-Präparationen	8
2.2.1	Minipräparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)	8
2.2.2	Alkalische Maxi- und Megapräparationen	9
2.3	Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren	10
2.3.1	Phenol/Chloroformextraktion	10
2.3.2	Ethanolpräzipitation	10
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	10
2.3.3.1	Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarosegelen	10
2.3.3.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	11
2.3.4	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	11
2.3.5	DNA-Größen- und Mengenstandard	11
2.3.6	Elution von DNA aus Agarosegelen nach der Zentrifugationsmethode	12
2.4	Manipulation von Nukleinsäuren	12
2.4.1	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	12
2.4.2	Modifikation von DNA-Fragmenten	13
2.4.2.1	Glätten überhängender Einzelstrangenden	13
2.4.2.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	13
2.4.2.3	Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren	13
2.4.3	Klonierung von DNA-Fragmenten	14
2.4.3.1	Ligation	14
2.4.3.2	Transformation	14
2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
2.5.1	Synthese von Oligonukleotiden	15
2.5.2	Bedingungen für die PCR-Reaktionen	15
2.5.3	Reinigung der PCR-Produkte	16
2.6	DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer	17
2.6.1	Sequenzierreaktion mit dem Thermo Sequenase-Kit (Amersham Biosciences)	17
2.6.2	Sequenzierreaktion mit dem Sequitherm Excel II-Kit (BIOzym)	17
2.6.3	Sequenzierungs-PCR	18
2.6.4	Acrylamidgelelektrophorese zur Sequenzierung	18
2.7	<i>E. coli</i> -Zellkultur	19
2.7.1	Verwendete Bakterienstämme und Plasmidvektoren	19
2.7.2	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für <i>E. coli</i>	20
2.7.3	Anzucht von <i>E. coli</i> -Bakterienkulturen	22
2.7.3.1	Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen zur Plasmidpräparation	22
2.7.3.2	Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA	22
2.7.3.3	Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen zur Expression von Fusionsproteinen	23

2.7.3.4	Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen zur Expression von ^{15}N - bzw. ^{15}N -/ ^{13}C -markierten GST-Tag-Fusionsproteinen	23
2.7.3.5	Fermentation: Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen zur Expression von His-Tag-Fusionsproteinen in größeren Mengen	24
2.8	HEK293-Zellkultur	24
2.8.1	Kulturbedingungen für HEK293-Zellen	25
2.8.2	Transiente Expression von Proteinen in HEK293-Zellen	26
2.9	Reinigung rekombinanter Proteine	27
2.9.1	Reinigung von heterolog exprimiertem MICNG-Protein aus <i>E. coli</i>	27
2.9.2	Reinigung von heterolog exprimiertem MICNBD-Protein aus <i>E. coli</i>	28
2.9.3	Reinigung der cAMP-freien Form des heterolog exprimierten MICNBD-Proteins aus <i>E. coli</i>	29
2.9.4	Reinigung von heterolog exprimierten Membranproteinen aus HEK293-Zellen	30
2.10	Größenausschlusschromatographie	31
2.11	Optimierung der Pufferbedingungen für MICNBD	32
2.12	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	33
2.12.1	Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)	33
2.12.2	Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz	33
2.13	Bestimmung des cAMP-Gehalts von Proteinen	34
2.13.1	Photometrische Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Proteinen	34
2.13.2	Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Proteinen durch High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)	35
2.14	Modifikation von Proteinen	36
2.14.1	Deglykosylierung von Membranproteinen	36
2.14.2	Kovalentes Quervernetzen von Proteinen	36
2.15	Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	37
2.15.1	Verwendete Proteingrößenstandards	37
2.15.2	Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau	38
2.16	Nachweis spezifischer Proteine	38
2.16.1	Transfer und Immobilisierung von Proteinen („Western-Blot“)	38
2.16.2	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	39
2.16.3	Immunzytochemie	40
2.16.3.1	Fixierung und immunzytochemische Färbungen von HEK293-Zellen	40
2.16.3.2	Extrazelluläre Färbungen	41
2.16.4	Immunisierung von Ratten und Herstellung von Hybridomzellen	41
2.17	Isothermale Titrationskalorimetrie	42
2.18	NMR-Spektroskopie	44
3	Ergebnisse	46
3.1	MICNG	46
3.1.1	Klonierung von MICNG	46
3.1.2	Expression von MICNG in <i>E. coli</i> (BL21-Zellen)	47
3.1.3	Optimierung der Expression von MICNG in BL21-Zellen	48
3.1.4	Fermentation	53
3.1.5	Solubilisierung von MICNG	55
3.1.6	Reinigung von MICNG	56
3.1.8	Kovalente Quervernetzung der Untereinheiten des MICNG-Kanalproteins ...	60
3.1.9	Proteinkristallisation	61
3.1.10	Herstellung und Test monoklonaler Antikörper	62
3.1.11	Befindet sich das MICNG-Kanalprotein in der Membran von HEK293-Zellen?	66

3.1.11.1	Klonierung von pcAMlcNMP-HA/Gly	67
3.1.11.2	Nachweis im Western-Blot an HEK293-Membranen	68
3.1.12.3	Immunzytochemie an HEK293-Zellen.....	70
3.2	MICNBD	72
3.2.1	Klonierungsstrategie des Fusionsproteins GST-MICNBD	72
3.2.2	Expression und Reinigung von MICNBD	74
3.2.3	Entfernung des gebundenen cAMP von der Bindestelle	77
3.2.5	Kovalente Quervernetzung des MICNBD-Proteins	80
3.2.6	Optimierung der Pufferbedingungen im Hinblick auf die Stabilität des MICNBD-Proteins	82
3.2.7	NMR-Spektroskopie.....	86
3.3	Ligandenbindungsstudien an MICNG und MICNBD	91
4	Diskussion	94
4.1	Röntgenkristallographische Untersuchungen an bakteriellen Ionenkanälen.....	94
4.2	Zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal aus <i>Mesorhizobium loti</i> (<i>M. loti</i>).....	97
4.3	Struktur der Bindestelle für zyklische Nukleotide des MICNG-Kanalproteins	99
4.4	Untersuchung der oligomeren Struktur des MICNG-Kanalproteins und seiner isolierten Bindestelle	100
4.5	Ausblick.....	102
5	Literaturverzeichnis.....	103
6	Anhang	109
6.1	In dieser Arbeit verwendete Primer.....	109
6.2	Hybridisierungsbereiche der Primer.....	110
6.3	Auswertung der „Micro-Drop“-Analyse	112

II Abkürzungsverzeichnis

ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
5'-GMP	5'-Guanosinmonophosphat
5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
A	Ampere
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B(p)	Basen(paare)
BMBD	1,4-bismaleimidyl-2,3-dihydroxybutan
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)-suberat
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>b</i> ovine <i>s</i> erum <i>a</i> lbumine)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
CAP	<i>catabolite activating protein</i>
cDNA	revers transkribierte DNA (<i>c</i> omplementary <i>D</i> N <i>A</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>c</i> yclic <i>n</i> ucleotid- <i>g</i> ated) Ionenkanal
cNMP-Bindestelle	zyklisch Nukleotid-Bindestelle
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Peptidkette
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
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>
g	Gramm, bzw. Nomal-Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
His	Histidin
HMW	<i>high molecular weight</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
IP ₃	Inositol-1-4-5-trisphosphat
IPTG	Isopropylthio- β -D-galaktosid
K	Kelvin
l	Liter
LB	Lauria-Bertani
LMW	<i>low molekular 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

NGS	<i>normal goat serum</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OD	Extinktion bei der im Index angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
p.A.	pro analysi
PA	Paraformaldehyd
PBC	<i>phosphate binding cassette</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PKA	Proteinkinase A
Ppm	parts per million
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RNA	Ribonukleinsäure
PNGase F	Peptid/N-Glykosidase F
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
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T_m	Hybridisierungstemperatur von Primern bei der PCR
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
ü. N.	über Nacht
ÜK	über Nacht-Kultur
UV	Ultraviolett

V	Volt
Verd.	Verdünnung
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel

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 Einbuchstabenkode abgekürzt:

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

1 Einleitung

Zellen reagieren auf eine Vielzahl von Reizen aus ihrer Umwelt. Die äußeren Reize werden in vielen Fällen durch Rezeptoren aufgenommen und in ein intrazelluläres Signal umgewandelt. In vielen biologischen Signalübertragungsprozessen übernehmen intrazelluläre Botenstoffe eine Schlüsselrolle. Wichtige intrazelluläre Botenstoffe sind Inositol-1-4-5-trisphosphat (IP_3), Ca^{2+} , sowie die beiden zyklischen Nukleotide, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Zyklische Nukleotide sind in allen Organismen von Bakterien bis hin zu Säugetieren vertreten. Sie werden durch die Enzymfamilie der Zyklasen aus Adenosintriphosphat (ATP) bzw. Guanosintriphosphat (GTP) synthetisiert. Zyklische Nukleotide kontrollieren eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine. Hierzu zählen beispielsweise Proteinkinasen (Hanks et al., 1988; Goldsmith und Cobb, 1994; Morgan et al., 1994; Taylor et al., 1994; Pfeiffer et al., 1999; Taylor et al., 1999) und Phosphodiesterasen (Thompson und Appleman, 1971; Beavo, 1995; Francis et al., 2001; Jeon et al., 2005), aber auch Transkriptionsfaktoren (McKay et al., 1982; Weber und Steitz, 1987; Schultz et al., 1991; Busby und Ebright, 1999; Passner et al., 2000) und Ionenkanäle (Kaupp und Seifert, 2002; Kaupp und Seifert, 2001). Die Gemeinsamkeit zwischen diesen Zielproteinen ist, dass sie alle eine Bindestelle für zyklische Nukleotide besitzen.

1.1 Die Bindestelle für zyklische Nukleotide

Die Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD) besteht aus ca. 120 Aminosäuren (Berman et al., 2004). Die Struktur der Bindedomäne wurde erstmals an dem *catabolite activating protein* (CAP) von *Escherichia coli* durch röntgenkristallographische Untersuchungen aufgeklärt (Weber und Steitz, 1987; Passner et al., 1997; Passner et al., 2000). Die Bindedomäne enthält sowohl β -Faltblattregionen als auch α -helikale Elemente (Abb. 1.1). Der Kernbereich der Bindedomäne setzt sich aus acht aufeinanderfolgenden β -Faltblättern zusammen, die ein sogenanntes β -Fass bilden. In diesem Kernbereich befindet sich eine konservierte Region, die „Phosphate Binding Cassette“ (PBC), die direkt an der Bindung des zyklischen Nukleotids beteiligt ist. Die drei α -Helices sind mit den Enden des β -Fasses verbunden. Die A-Helix befindet sich am N-terminalen Ende des β -Fasses, während sich die B-Helix, gefolgt von der C-Helix am C-terminalen Ende des β -Fasses befindet.

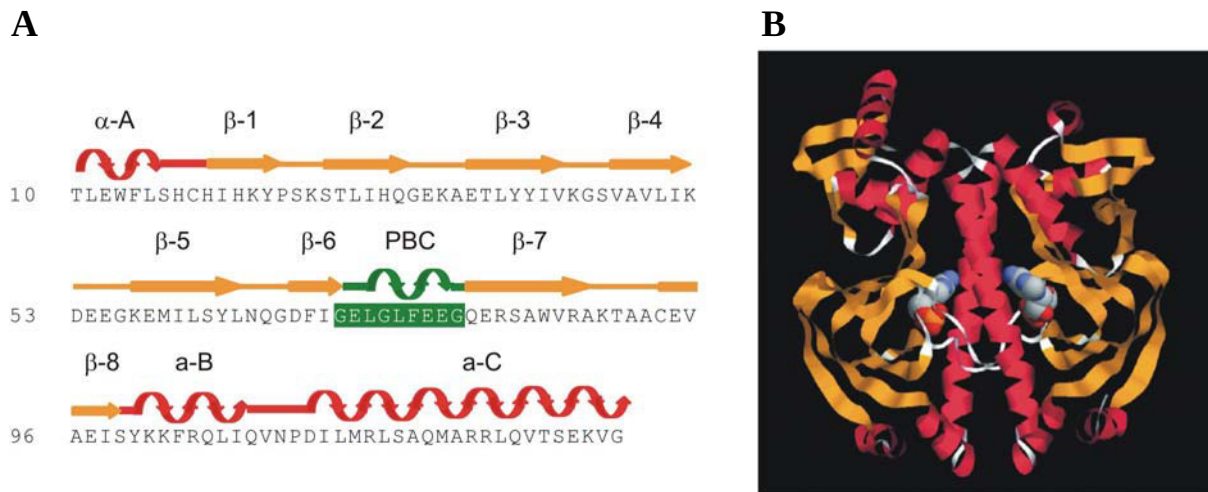


Abb. 1.1: Die cAMP-Bindestelle des CAP. (A) Aminosäuresequenz der cAMP-Bindestelle des CAP-Proteins. Die Sekundärstrukturen sind oberhalb der Sequenz angegeben. (B) Tertiärstruktur eines CAP-Dimers mit zwei gebundenen cAMP-Molekülen. Die α -Helices sind in rot, die β -Faltblätter sind in orange dargestellt (aus Kaupp und Seifert, 2002).

Inzwischen sind mehrere andere cAMP-bindende Proteine kristallisiert worden, unter ihnen die regulatorische Untereinheit der PKA (Weber et al., 1987; Su et al., 1995; Diller et al., 2001), der Guaninnukleotid austauschfaktor EPAC (Rehmann et al., 2003), sowie die Bindestelle eines hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals (HCN2; Zagotta et al., 2003). Alle diese Bindestellen weisen im Großen und Ganzen dieselbe 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 α -C-Helix relativ zu der β -Fassstruktur (Rehmann et al., 2003). Es ist allerdings noch unklar welche Auswirkungen diese Konformationsänderung auf andere Bereiche des Proteins hat.

Welche Änderungen durch die Bindung von zyklischen Nukleotiden an Ionenkanälen ausgelöst werden, ist auch noch weitgehend unklar.

1.2 Ionenkanäle mit einer Bindestelle für zyklische Nukleotide

Es werden zwei Klassen von Ionenkanälen unterschieden, die zyklische Nukleotide binden. Zum einen die zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle (CNG-Kanäle) und zum anderen die hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle (HCN-Kanäle). CNG-Kanäle sind nichtselektive Kationenkanäle, deren Öffnung direkt über die Bindung von cAMP bzw. cGMP reguliert wird (zur Übersicht: Kaupp and Seifert, 2002). HCN-Kanäle sind spannungsabhängige Kationenkanäle, deren Öffnungsverhalten durch zyklische Nukleotide moduliert wird (zur Übersicht: Kaupp und Seifert, 2001). Die Kanalproteine besitzen sechs transmembranale Segmente, die in Anlehnung an die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle mit S1-S6 bezeichnet werden (Henn et al., 1995; Abb. 1.2). Im S4-Segment gibt es ein Sequenzmotiv, das dem Spannungsfühlermotiv der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle aus der *Shaker*-Familie ähnelt (Jan und Jan, 1990). Die eigentliche Pore wird von Aminosäuren gebildet, die sich zwischen den Segmenten S5 und S6 befinden. Hier findet die Wechselwirkung mit den permeierenden Ionen statt. Außerdem wird hier die Selektivität eines Ionenkanals molekular determiniert. Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Kanäle bestehen aus einem Komplex aus vier Kanaluntereinheiten.

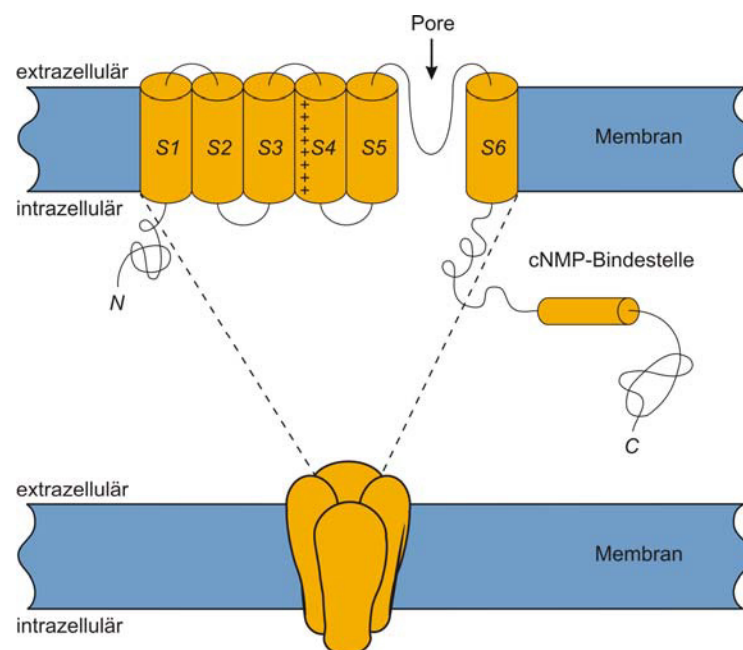
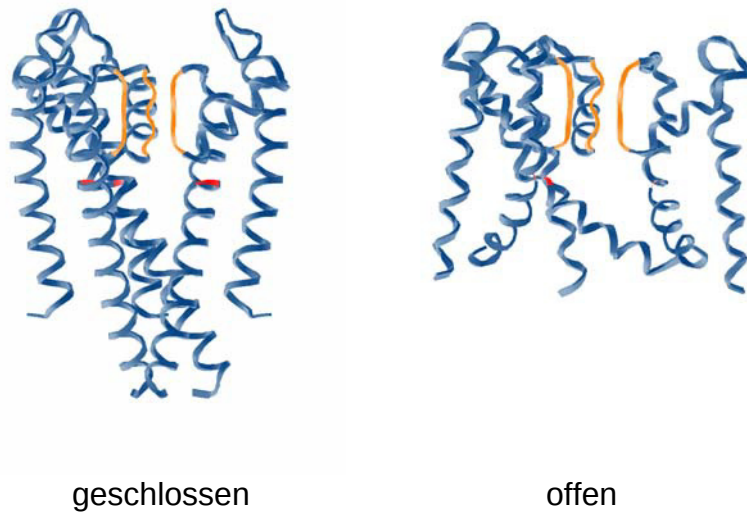


Abb. 1.2: Transmembranale Topologie und tetramere Anordnung der zyklisch Nukleotid-gesteuerten Kanäle. Der obere Teil zeigt die transmembranale Topologie einer Untereinheit. Mit S1-S6 sind die transmembranalen Segmente bezeichnet. Die Bindestelle für zyklische Nukleotide ist durch „cNMP-Bindestelle“ gekennzeichnet. Im unteren Teil ist die tetramere Struktur der Kanäle dargestellt.

Das Öffnen und Schließen der Pore ist bei den meisten Ionenkanälen genau reguliert. Dieser Vorgang wird auch als „gating“ bezeichnet. Der „gating“-Mechanismus von CNG- und HCN-Kanälen ist bislang nicht gut verstanden. Bekannt ist nur, dass die Bindung von zyklischen Nukleotiden diesen Prozess beeinflusst, indem sie den „Offen“-Zustand des Kanals begünstigt. Es stellt sich die Frage, wie die Bindung von cAMP bzw. cGMP und der „gating“-Mechanismus miteinander verbunden sind. Obwohl die Bindung und die Koordination von zyklischen Nukleotiden in der Bindestelle in CNG- und HCN-Kanälen gut untersucht sind, konnte noch nicht geklärt werden, wie eine Konformationsänderung der Bindedomäne sich auf andere Bereiche des Kanalproteins auswirkt und somit zum Öffnen der Pore beiträgt.

Der Vergleich zwischen den Kristallstrukturen des bakteriellen Ca^{2+} -gesteuerten MthK-Kanals aus *Methanobacterium thermoautotrophikum* (Jiang et al., 2002) und dem K^{+} -Kanal KcsA aus *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998) gibt erste Hinweise auf die Konformationsänderungen, die dem „gating“-Mechanismus zugrunde liegen (Abb. 1.3). Die Struktur des KcsA-Proteins zeigt den geschlossenen Zustand der Pore. Die inneren transmembranalen Helices liegen zu einem Bündel zusammen und verschließen so die Pore (Abb. 1.3, links). Die Struktur des MthK-Proteins zeigt den Zustand der offenen Pore. Hier sind die inneren Helices seitwärts nach außen gebogen und geben so die Porenöffnung frei (Abb. 1.3, rechts). Demnach wird durch eine laterale Auswärtsverschiebung des jeweiligen C-Terminus einer transmembranalen Helix die „Offen“-Konformation erreicht (Abb. 1.3 B). Vorstellbar ist dieser Mechanismus wie beim Öffnen einer Irisblende. Dabei fungiert ein konserviertes Glycin in der inneren Helix als „Drehachse“ der „gating“-Bewegung. Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus bei vielen Ionenkanälen ähnlich ist. Es stellt sich die Frage, wie nun bei zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen die Bindung von cAMP bzw. cGMP zu einer Konformationsänderung und zur Öffnung des Kanals führt. In ersten strukturellen Untersuchungen am C-terminalen Bereich des HCN2-Kanals, der die zyklisch Nukleotid-Bindestelle beinhaltet, wurde gezeigt, dass sich bei Ligandenbindung die Konformation des gesamten C-terminalen Bereichs ändert (Zagotta et al., 2003). Dabei soll der Bereich, der die Ligandenbindestelle mit den transmembranalen Helices verbindet, auch C-Linker genannt, eine wichtige Rolle spielen. Die durch die Bindung des Liganden ausgelöste Konformationsänderung könnte sich so auf die C-Linkerregion auswirken, dass diese einen Zug auf die Porenhelices ausübt und somit die Pore öffnet. Um diese Annahmen genauer zu untersuchen, bedarf es weiterer struktureller Untersuchungen an einem vollständigen ligandengesteuerten Ionenkanal.

A



B

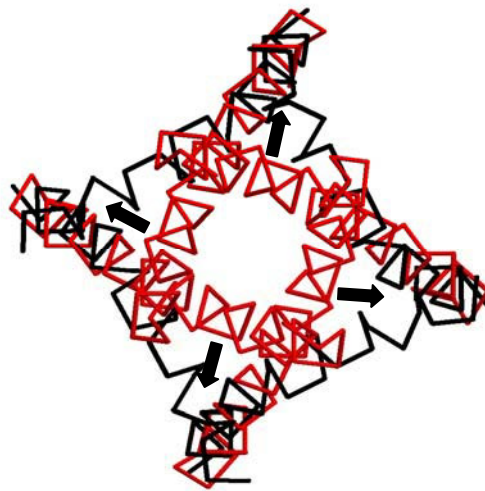


Abb. 1.3: Geschlossene und offene Konformation der Porenregion. (A) Seitenansicht: Dargestellt sind drei Untereinheiten der geschlossen Porenkonformation des KcsA-Kanals (links) und der offenen Porenkonformation des MthK-Kanals (rechts). Der Selektivitätsfilter der Porenregion ist in orange gezeigt. Die Regionen der α -Helices, an denen ihre laterale Bewegung stattfindet, sind rot dargestellt (in Anlehnung an MacKinnon, 2003). (B) Aufsicht von der Zytosolseite: Porenregion der vier Untereinheiten des KcsA-Kanals (rot) und des MthK-Kanals (schwarz) sind überlagert dargestellt. Die Pfeile markieren die Richtung der Helicesbewegung beim Übergang vom geschlossenen zum offenen Zustand der Pore (in Anlehnung an Jiang et al., 2002).

Zielsetzung

Eine wichtige Familie von Ionenkanälen ist die der zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle. Das Öffnungsverhalten dieser Ionenkanäle wird durch zyklische Nukleotide reguliert bzw. moduliert. Mitglieder dieser Kanalfamilie sind elektrophysiologisch gut charakterisiert, allerdings ist ihr „gating“-Mechanismus auf molekularer Ebene noch wenig verstanden. Um die Konformationsänderungen, die bei der Ligandenbindung stattfinden, und ihre Auswirkungen auf den „gating“-Mechanismus aufzuklären, sollen strukturelle und funktionelle Untersuchungen an einem bakteriellen zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal durchgeführt werden. Durch Datenbankanalyse und Sequenzvergleiche wurde die Sequenz eines Ionenkanals in dem Genom des N₂-fixierenden Bakteriums *Mesorhizobium loti* gefunden. Dieser Kanal hat Sequenzähnlichkeiten zu K⁺-selektiven Kanälen und besitzt eine Bindestelle für zyklische Nukleotide. Dieser bakterielle Kanal könnte ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung der ligandeninduzierten Konformationsänderung und des „gating“-Mechanismus darstellen. Der Vorteil dieses Kanalproteins im Gegensatz zu seinen eukaryotischen Verwandten ist, dass dieser Kanal in großen Mengen in *E. coli* exprimiert werden kann. Es können also ausreichende Mengen des Kanalproteins für Strukturuntersuchungen hergestellt werden.

Die Strukturaufklärung soll mit Hilfe der magnetischen Kernresonanzspektroskopie (NMR) durchgeführt werden. Eine Schwierigkeit bei diesem Ansatz ist die Größe des Kanalproteins. Mit den heutzutage zur Verfügung stehenden Geräten ist eine Strukturaufklärung bis zu einer Proteingröße von 60 kDa möglich. Der vermutlich tetramere Kanal hat als Oligomer eine Größe von ca. 154,4 kDa. Aus diesem Grund war vorgesehen, zunächst die Struktur von einzelnen Domänen zu bestimmen. Beispielsweise wäre die NMR-Struktur der Bindestelle für zyklische Nukleotide als solche schon interessant. Es wäre das erste zyklisch Nukleotid-bindende Protein, dessen Lösungsstruktur aufgeklärt würde. Darüberhinaus soll die Lösungsstruktur der Bindestelle sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Liganden bestimmt werden, um die ligandeninduzierte Konformationsänderung zu studieren. Schließlich soll die Struktur der Bindestelle im Kontext des Gesamtproteins gelöst werden.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, aus Sambrook et al. (1989) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Material

Es wurden Chemikalien in p.A. Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Amersham Biosciences (Freiburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), Pierce (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Riedel-de Haën AG (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), USB (Bad Homburg), Deutero GmbH (Kastellaun) und Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, USA) bezogen. Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von ABGene (Rochester, USA), Ambion (Austin, USA), Amersham Biosciences (Freiburg), GIBCO BRL (Eggenstein), NEB (Schwalbach) und Roche (Mannheim) geliefert. Für die Erhaltung und Vermehrung von Bakterienkulturen wurden Medien von der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet. Chemikalien und Fertiglösungen für die Zellkultur waren von GIBCO BRL (Eggenstein). Sekundärantikörper und Reagenzien für immunologische Nachweise wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), Dianova (Hamburg), Molecular Probes (Leiden, Niederlande) und Pierce (Rockford, USA) bezogen. Proteine wurden auf die PVDF-Membran Immobilon P der Firma Millipore (Eschborn) transferiert. Für die Chemilumineszenz wurden ECL Hyperfilme von Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet.

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

2.2 Plasmid-DNA-Präparationen

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

TE: 1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 7,5-8,0

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

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

Für die Präparation wurden die Bakterienzellen aus 2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜK) durch Zentrifugation (15.600 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 5-30 min zentrifugiert (17.600 g; 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Phenol extrahiert (2.3.1). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 500 µl Ethanol präzipitiert und zentrifugiert (17.600 g; 10-30 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (17.600 g; 10-30 min; 4°C). Der Überstand wurde wieder abgenommen und das DNA-Pellet in 20 µl TE aufgenommen.

War die DNA zur Sequenzierung (2.6) bestimmt, musste sie zusätzlich mittels der LiCl-Plasmidpräparation gereinigt werden, da Verunreinigungen durch RNA die Sequenzreaktionen negativ beeinflussen können. Dazu wurden die Bakterienzellen aus einer 5 ml ÜK durch zwei Zentrifugationsschritte (15.600 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 (17.600 g; 5 min; 4°C) wurde der Überstand abgenommen und mit 1,5 ml Ethanol versetzt und zentrifugiert (17.600 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 (17.600 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl eiskaltem Ethanol versetzt und zentrifugiert (17.600 g; 5 min; 4°C). Nach Überstandabnahme wurde das Pellet in 50 µl TE_{RNase} aufgenommen und 10-20 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt

und anschließend mit Phenol extrahiert (2.3.1). Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc pH 4,8 und 300 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert (17.600 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (17.600 g; 5 min; 4°C). Nach Überstandabnahme wurde das Pellet 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% SDS

Lösung III:

3 M KAc pH 4,8

2.2.2 Alkalische Maxi- und Megapräparationen

Größere DNA-Mengen wurden mit der LiCl-Plasmidpräparation isoliert. Für eine Maxipräparation wurden die Bakterienzellen aus einer 250 ml ÜK pelletiert (5.000 g; 10 min; 4°C). Nach Überstandabnahme wurde das Bakterienpellet in 20 ml Lösung I (2.2.1) resuspendiert und die Zellen mit 24 ml Lösung II (2.2.1) lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 30 ml Lösung III (2.2.1) gefällt und pelletiert (5.000 g; 10 min; RT). Der Überstand wurde in neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und zentrifugiert (5.000 g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet, welches die Nukleinsäuren enthielt, wurde in 1,45 ml H₂O und 50 µl Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl wurde die RNA gefällt und anschließend pelletiert (5.000 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltende Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 12 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (5.000 g; 15 min; 4°C) und Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl TE_{RNase} resuspendiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Phenolextraktion (2.3.1) und Ethanolpräzipitation (2.3.2) gereinigt. Das erhaltende DNA-Pellet wurde getrocknet und in 250 µl TE aufgenommen.

Megapräparationen wurden aus 500 ml Bakterienkulturen angefertigt. Die Volumina der oben angegebenen Lösungen wurden entsprechend angepasst. Die Ausbeute betrug je nach Dichte der ÜK 0,5-1 µg Plasmid-DNA/ml eingesetzter Bakterienkultur.

2.3 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.3.1 Phenol/Chloroformextraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen und Membranbestandteilen, die in organischen Lösungsmitteln löslich sind, 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 (2.3.2).

2.3.2 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 2,5-3fachen Volumen absoluten Ethanols versetzt, kurz gemischt und 5-30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (17.600 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 (30-120 min). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, und erneut zentrifugiert (17.600 g; 5 min; 4°C). Nach Überstandabnahme wurde das DNA-Pellet getrocknet und in TE aufgenommen.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.3.3.1 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarosegelen

Die Menge an DNA, die auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid (2.3.4) aufgetragen wurde, konnte durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (2.3.5) anhand der Intensität der Banden abgeschätzt werden.

2.3.3.2 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 $\mu\text{g/ml}$ im Falle von DNA oder 33 $\mu\text{g/ml}$ bei Oligonukleotiden. Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten konnten durch den Quotienten der Absorptionen bei $\lambda = 260$ und $\lambda = 280$ nm beurteilt werden. Er sollte nicht kleiner als 1,8 sein. Chromosomale DNA, RNA und Nukleotide sind bei dieser Methode nicht von Plasmid-DNA zu unterscheiden.

2.3.4 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 Agarosegele verwendet. Zur Auftrennung von kleineren DNA-Fragmenten wurden höher konzentrierte Agarosegele eingesetzt (1,5-2%).

Die Agarose wurde in 1x TAE aufgekocht, 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. Anschließend wurden sie in die Probestaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Laufpuffer bei 90-120 V bis zur ausreichenden Trennung der Nukleinsäuren durchgeführt. Diese konnten durch die Einlagerung von Ethidiumbromid unter UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) sichtbar gemacht werden.

TAE (50x)

2 M Tris/Acetat pH 7,5

50 mM EDTA

Farbmarker (10x)

10x TAE

50% Glycerin

0,25% Xylencyanol

2.3.5 DNA-Größen- und Mengenstandard

Es wurde DNA des Bakteriophagen λ verwendet, die mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Hind III geschnitten wurde (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 Konzentration betrug 67 ng/ μ l.

2.3.6 Elution von DNA aus Agarosegelen nach der Zentrifugationsmethode

Bei der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit der Zentrifugationsmethode (Heery et al., 1990) wurde der Deckel eines Eppendorfreaktionsgefäßes entfernt, der Boden mit einer Kanüle durchstoßen und mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde auf die Glaswatte gelegt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Gefäß gesetzt und zentrifugiert (7.000 g; 10 min; 4°C). Das Eluat enthielt das DNA-Fragment. Die Reinigungsausbeute betrug zwischen 30% und 50%.

2.4 Manipulation von Nukleinsäuren

2.4.1 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die Ansätze in 1x Inkubationspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. Wenn dies nicht möglich war, wurden zwischen den Inkubationen durch Zugabe der entsprechenden Salze die neuen Pufferbedingungen eingestellt, nach Ethanol-Präzipitation (2.3.2) umgepuffert oder das benötigte Restriktionsfragment aus einem präparativen Agarosegel eluiert (2.3.4, 2.3.6). Zum Schneiden wurden 3-5 U Enzym/ μ g Plasmid-DNA eingesetzt. Das Volumen eingesetzter Nukleasen sollte dabei 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da das Glyzerin im Aufbewahrungspuffer der Enzyme inhibitorische Wirkung hat. Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA, die durch alkalische Minipräparation isoliert worden war, wurden zusätzlich mit 5 μ l/ml RNase-Cocktail (Ambion) versetzt.

Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 10 μ l durchgeführt und, wenn nicht anders vermerkt, nach 2 h Inkubation vollständig auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Volumen für präparative Ansätze betrug 20-100 μ l. Nach mindestens 60 min Inkubationszeit wurde kontrolliert, ob die DNA vollständig geschnitten worden war, gegebenenfalls wurde

erneut Enzym zugegeben und wenn nötig ü. N. inkubiert. Bei vollständiger Restriktion wurde der Ansatz auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen.

2.4.2 Modifikation von DNA-Fragmenten

2.4.2.1 Glätten überhängender Einzelstrangenden

Überhängende 5'-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt (5'→3'-Polymeraseaktivität). Durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Der Reaktionsansatz (2 U Klenow-Enzym/μg DNA, in einem beliebigen Restriktionspuffer, 100 μmol dNTP) wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 5-10 min bei 68°C inaktiviert.

2.4.2.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Da PCR-Fragmente (2.5) keine endständigen 5'-Phosphatgruppen besitzen, wurden sie, bevor sie in die Vektoren ligiert wurden (2.4.3.1), phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase (Roche) in dem mitgelieferten Puffer und 1 mM ATP für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 10minütiger Hitzeinaktivierung der Kinase bei 65°C wurden die Fragmente für die Ligation eingesetzt. Im Falle einer zuvor durchgeführten Klenow-Reaktion mußten die Desoxynukleotide entweder durch Ethanol-Präzipitation (2.3.2) oder durch Agarosegelelektrophorese (2.3.4) entfernt werden.

2.4.2.3 Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren

Die glatten oder kompatiblen Enden geschnittener Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase (Roche) dephosphoryliert, um eine Religation der Enden zu vermeiden. Dazu wurden 5 μg geschnittene Vektor-DNA, 10 μl 10× Phosphatasepuffer und 2 U alkalische Phosphatase mit H₂O auf 100 μl aufgefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl EGTA (0,5 M) und 10 min Inkubation bei 68°C beendet. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.3.1) und anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.3.2) oder aus einem Agarosegel (2.3.6) eluiert.

10× Phosphatasepuffer:

500 mM Tris/HCl pH 8,5

1 mM EDTA

2.4.3 Klonierung von DNA-Fragmenten**2.4.3.1 Ligation**

Zur Ligation wurden ca. 50 ng geschnittener und dephosphorylierter Vektor mit einem 3-5fachen molaren Überschuss an Fragment in 1x Ligasepuffer gemischt. Anschließend wurde 0,5 µl 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl.

Ligase-Puffer (10x):

600 mM Tris/HCl pH 7,5

50 mM MgCl₂

10 mM DTE

10 mM ATP

2.4.3.2 Transformation

5 µl des Ligationsansatzes (2.4.3.1) wurden mit 5 µl 10x CM-Puffer versetzt, mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und auf Eis gekühlt. Dazu wurden 50 µl kompetente Zellen (2.7.3.2) gegeben, vorsichtig gemischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min bei 42°C („Hitzepuls“) 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 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Chloramphenicol) ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

Die sogenannte "Retransformation" eignete sich, um Plasmid-DNA erneut von Bakterien amplifizieren zu lassen. Dazu wurden 0,5-1 µl Plasmid-DNA mit 30-50 µl der kompetenten Zellen versetzt und 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von LB-Medium und 20 min Regeneration wurde der Ansatz auf LB-Agar mit Antibiotikum plattiert oder als Vorkultur zum Animpfen von 500 ml-Kulturen verwandt.

10x CM:

100 mM CaCl₂

400 mM MgCl₂

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente spezifischer Länge und Sequenz amplifiziert werden. In mehreren Zyklen wird die Matrizen-DNA durch Hitze denaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden („Primern“) hybridisiert und diese mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis et al., 1986). Das PCR-Fragment kann über Schnittstellen oder nach Klenow-Reaktion (2.4.2.1) und Phosphorylierung (2.4.2.2) in einen Vektor ligiert werden (2.4.3.1).

2.5.1 Synthese von Oligonukleotiden

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide sind im Anhang (6.1) aufgeführt.

2.5.2 Bedingungen für die PCR-Reaktionen

Die Reaktionen wurden in einem „DNA Thermal Cycler“ (Perkin Elmer) oder in einem „TRIO-Thermoblock“ (Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde jeweils für 45 sek denaturiert und hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$T_m = \left(\frac{G}{C}\right) * 4^{\circ}\text{C} + \left(\frac{A}{T}\right) * 2^{\circ}\text{C} - (\text{Basenfehlpaarungen}) * 4^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$$

Bei Primerpaaren wurde die niedrigste Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer verwendet. Zur Strangverlängerung wurde bei 72°C inkubiert. Die Zeitspanne richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und betrug dabei ca. 1 sek/10 B. Es wurden 25-40

Zyklen durchgeführt. Folgende Polymerase wurde mit dem Puffer des Herstellers verwendet: KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen).

Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25/50 µl in 500 µl Reaktionsgefäßen.

PCR-Ansatz 1:

- 50-80 ng Plasmid-DNA
- je 100-200 ng spezifischer Primer
- 2,5-5 µl KOD Hot Start DNA Polymerase 10xrxB
- 2,5-5 µl 20 mM dNTP
- 1-2 µl 25 mM MgSO₄
- 0,5-1 U KOD Hot Start DNA Polymerase

PCR-Ansatz 2: rekombinante PCR

- 10-50 ng PCR-Fragment 1
- 10-50 ng PCR-Fragment 2
- je 100-200 ng spezifischer Primer
- 5 µl KOD Hot Start DNA Polymerase 10xrxB
- 5 µl 20 mM dNTP
- 5 µl 25 mM MgSO₄
- 1 U KOD Hot Start DNA Polymerase

2.5.3 Reinigung der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden durch Phenol/Chloroformextraktion (2.3.1) und Ethanolpräzipitation (2.3.2) gereinigt. Waren Nebenprodukte vorhanden oder sollten die PCR-Produkte in Plasmidvektoren subkloniert werden, wurde die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen (2.3.4) und die Fragmente der gewünschten Größe eluiert (2.3.6).

2.6 DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer

Die Sequenzierung erfolgte im „LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200“ (MWG-Biotech, Ebersberg) nach der Didesoxykettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977). Die DNA-Markierung erfolgte durch eine PCR (2.5) mit IRD800-fluorophormarkierten Primern. Zur Sequenzauswertung wurde die Software des Geräteherstellers, sowie die Programme PCGene und PCSupp (Dr. W. Bönigk, IBI-1/Forschungszentrum Jülich) eingesetzt.

2.6.1 Sequenzierreaktion mit dem Thermo Sequenase-Kit (Amersham Biosciences)

Es wurde das „Thermo Sequenase Kit“ von Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Pro kB der zu sequenzierenden DNA wurden ca. 65 ng DNA eingesetzt, 0,8 µl IRD800-fluorophormarkierter Primer (2 pmol/µl) zugegeben und auf ein Endvolumen von 7 µl mit H₂O aufgefüllt. Je 1,5 µl des Ansatzes wurden auf vier PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit je 1 µl der vier Terminationsmixe (1:2 mit H₂O verdünnt) versetzt. Die Ansätze wurden mit 15-20 µl Chill-out 14 Liquid Wax (MJ Research) überschichtet und zur Sequenzierungs-PCR (2.6.3) eingesetzt.

2.6.2 Sequenzierreaktion mit dem Sequitherm Excel II-Kit (BIOzym)

Das Sequitherm Excel II-Kit eignet sich besonders zur Sequenzierung problematischer DNA-Abschnitte, wie z. B. G/C- bzw. A/T-reiche Regionen oder Dinukleotidwiederholungen. Der mitgelieferte Sequenzierpuffer enthält laut Hersteller DNA-relaxierende Proteine, welche die Sequenzierung über solche DNA-Bereiche erleichtern sollen. Pro kB der zu sequenzierenden DNA wurden 30-100 ng DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 3,7 µl aufgefüllt und mit 4 µl des SequiTherm EXCEL Long-Read Sequencing Puffer versetzt. Zur Markierung wurden 1,1 µl IRD800-fluorophormarkierter Primer (2 pmol/µl) und 0,55 µl SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase (5 U/µl) hinzugegeben. Je 2 µl dieses Ansatzes wurden zu je 1 µl der vier Terminationsmixe pipettiert. Die Ansätze wurden mit 15-20 µl Chill-out 14 Liquid Wax (MJ Research) überschichtet und zur Sequenzier-PCR (2.6.3) eingesetzt.

2.6.3 Sequenzierungs-PCR

Die Reaktionen wurden in einem „TRIO-Thermoblock“ (Biometra) oder in einem „DNA Thermal Cycler“ (Perkin Elmer) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde je 40 sek denaturiert und hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur betrug 50°C. Die Strangverlängerung erfolgte bei 70°C für 1 min. Es wurden 40 Zyklen durchgeführt.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 µl Stoppuffer des Sequenzierkits (2.6.1, 2.6.2) abgebrochen. Der Stoppuffer enthielt Xylencyanol in einer Endkonzentration von 0,2%. Auf ein Sequenziergel (2.6.4) wurden 1-1,8 µl der Proben aufgetragen.

2.6.4 Acrylamidgelelektrophorese zur Sequenzierung

Zwei 66 cm lange Glasplatten wurden gründlich mit H₂O und Ethanol gereinigt. Sie wurden durch 0,25 mm starke Abstandshalter getrennt und mit Schraubschienen zusammengedrückt. 41,6 ml einer 4,6% Gellösung wurden im Vakuum oder durch Sonifizierung entgast und mit 350 µl 10% APS und 50 µl TEMED versetzt. Die Gellösung wurde in eine 60 ml-Spritze gefüllt und beim luftblasenfreien Gießen durch einen Sterilfilter gedrückt. Ein "Vorformer"-Kamm wurde in das Gel gedrückt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 1 h war die Polymerisation des Acrylamids abgeschlossen. Nachdem das Gel in die Gelelektrophoresekommer eingespannt war, wurde diese mit 1x TBE gefüllt. Die Probenaschen wurden von einem „Haifischzahn“-Kamm gebildet, der leicht auf der Geloberfläche aufsaß.

Die Elektrophorese wurde bei 45 W und 45°C durchgeführt. Nach einem 30minütigen Vorlauf wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 8-10 h. Die Leseweiten betrugen zwischen 600 und 1000 Bp.

10x TBE:

1,34 M Tris Base
450 mM Borsäure
25 mM EDTA
pH 8,3-8,7 (bei 50°C)

4,6% Gellösung:

21 g Harnstoff
5 ml 10x TBE
0,5 ml DMSO
5,6 ml Rapid Gel XL (USB; Bad Homburg)
30,5 ml H₂O

2.7 *E. coli*-Zellkultur

2.7.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmidvektoren

In dieser Arbeit wurden folgende *E. coli*-Stämme verwendet:

XL1-Blue (Stratagene):

Dieser *E. coli* K-Stamm ist eine Endonukleasemangelmutter (endA), wodurch die Qualität der präparierten DNA erhöht wird. Zusätzlich ist dieser Stamm eine Rekombinationsmangelmutter (recA), wodurch die Stabilität der Insert-DNA gegeben ist. Die eingebrachte hsdR-Mutation schützt die eingebrachte DNA vor dem EcoK-Endonukleasensystem. Ein blau-weiß-Farbscreening wird durch das Gen *lacI^qΔM15* ermöglicht. Dieser Zellstamm besitzt zudem ein Tetrazyklinresistenzgen. Dieser Bakterienstamm wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA verwendet.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB, lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)]*

BL21(DE3)pLysE (Invitrogen):

Dieser *E. coli* B/r-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. Dieser Bakterienstamm wurde zur Expression der Proteine MICNG und MICNBD verwendet.

Genotyp: *F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysE (Cam^R)*

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmidvektoren verwendet:

pBluescript SK⁻:

(Short et al., 1988; Stratagene) Dieses Plasmid wurde als Vektor für die Klonierung rekombinanter DNA verwendet.

pcDNA I Amp:

(Invitrogen) Dieses Plasmid wurde für die transiente Expression von Genen in Zellen der menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie 293 (HEK293-Zellen) verwendet.

pET-11a:

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

pGEX-2T

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

2.7.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für *E. coli*LB (Luria-Bertani)-Medium:

1% Baktotrypton

0,5% Hefeextrakt

1% NaCl

Für LB-Agar-Platten wurde 1,5% Agar zugesetzt.

Das Medium wurde mit zweifach destilliertem H₂O angesetzt. Anschließend wurde das Medium aliquotiert, 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: 100 µg/ml) kurz vor dem Gießen der Platten in den höchstens noch 60°C heißen Agar gegeben. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt.

M9-Medium: Zur Markierung von Proteinen mit den Isotopen ¹⁵N und ¹³C:

Das M9-Medium wurde mit zweifach destilliertem H₂O angesetzt. Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert (Spitzenvorsatzfilter; 0,45 µm CM Membran; Merck). Das M9-Medium wurde aus folgenden Bestandteilen hergestellt:

M9-Medium:	20% (v/v)	M9-Stocklösung ⁽¹⁾
	2 mM	MgSO ₄
	0,01 mM	Fe(III)-Cl x 6 H ₂ O
	0,1 mM	CaCl ₂
	0,4 % (w/v)	D-Glukose-U- ¹³ C ₆
	0,04 % (v/v)	TS2-Stocklösung ⁽²⁾
	0,1 % (v/v)	Vitaminsstocklösung ⁽³⁾

Die Fe(III)-Cl-Lösung und die D-Glukose-U-¹³C₆-Lösung wurden erst kurz vor Gebrauch angesetzt. Die verwendeten Stocklösungen wurden mit zweifach destilliertem H₂O (M9-Stocklösung) bzw. mit 20 mM NaHPO₄-Puffer, pH 7 (TS2- und Vitaminsstocklösung) angesetzt. Die TS2- und die Vitaminsstocklösung wurden nach Herstellung aliquotiert und beim -20°C gelagert. Die Stocklösungen wurden aus folgenden Bestandteilen hergestellt:

⁽¹⁾ 5x M9-Stocklösung:	0,26 M	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,11 M	KH ₂ PO ₄
	0,04 M	NaCl
	0,09 M	NH ₄ Cl [¹⁵ N]

⁽²⁾ 5x TS2-Stocklösung:	0,33 mM	ZnSO ₄ x H ₂ O
	0,15 mM	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	4,85 mM	H ₃ BO ₃
	0,84 mM	CoCl ₂ x 2 H ₂ O
	0,05 mM	NiNH ₄ x 6 H ₂ O
	0,06 mM	CuCl ₂ x 2 H ₂ O
	3,72 mM	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
	0,12 mM	Na ₂ SeO ₃

⁽³⁾ Vitaminstocklösung:	4,1 mM	d-Biotin
	7,2 mM	Cholinchlorid
	2,3 mM	Folsäure
	8,2 mM	Nicotinamid
	4,2 mM	Na-D-panthothenat
	4,9 mM	Pyridoxalhydrochlorid
	0,27 mM	Riboflavin
	14,8 mM	Thiaminhydrochlorid

2.7.3 Anzucht von *E. coli*-Bakterienkulturen

2.7.3.1 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 (2.7.2) versetzt.

2.7.3.2 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA

Kompetente Zellen wurden mit einer modifizierten Form der CaCl₂-Methode nach Mandel und Higa (1970) hergestellt. 0,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜK) wurden in 50 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert (entspricht einer Bakterienkonzentration von 2×10^8 Zellen/ml) und 10-60 min auf Eis abgekühlt. Bei den folgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen immer auf Eis gehalten. Es wurden ausschließlich vorgekühlte Gefäße und Lösungen verwendet.

Die Zellen wurden 10 min zentrifugiert (5.000 g; 4°C) und der Überstand wurde anschließend abgenommen. Das Pellet wurde vorsichtig in 1 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und mit derselben Lösung auf 25 ml aufgefüllt. Nach 2 h Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (5.000 g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml 0,1 M CaCl₂/25% Glycerin resuspendiert und auf 5 ml aufgefüllt. Nach weiteren 2 h auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

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

2 l LB-Medium wurden mit Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (100 µg/ml) und 3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜK) versetzt. Die Bakterien der ÜK enthielten die Plasmidkonstrukte pET-MlcNMPThrHT (3.1.1) bzw. pGMICNBD-5 (3.2.1). 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 pGMICNBD-5) Inkubation bei 20°C wurde die Expression beendet. Um die Expression zu überprüfen, wurde 1 ml der Kultur pelletiert (15.600 g; 2 min; RT) und der Überstand abgenommen. Die restliche Expressionskultur wurde ebenfalls pelletiert (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 60 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Branson Sonificator B-12; Stufe 6-7; 4x 15 sek; 4°C). Lösliche und unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugation (17.600 g; 20-30 min; 4°C) getrennt. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet, das die unlöslichen Proteine enthielt, wurde in 60 µl PBS resuspendiert. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE; 2.15) analysiert.

2.7.3.4 Anzucht von *E. coli*-Zellen zur Expression von ¹⁵N- bzw. ¹⁵N-/¹³C-markierten GST-Tag-Fusionsproteinen

2 l M9-Medium wurden mit Ampicillin (100 µg/ml) und 200 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜK; in M9-Medium) versetzt. Die Bakterien der ÜK enthielten das Plasmidkonstrukt pGMICNBD-5 (3.2.1). Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5-0,6. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,6 mM) induziert. Nach weiteren ~16 h Inkubation bei 20°C wurde die Expression beendet. Um die Expression zu überprüfen, wurde 1 ml der Kultur abgenommen und wie unter 2.7.3.3 beschrieben weiterverarbeitet. Die Zellen der restlichen Expressionskultur wurden zentrifugiert (5.000 g; 15-30 min; 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet bei -20°C gelagert.

2.7.3.5 Fermentation: Anzucht von *E. coli*-Zellen zur Expression von His-Tag-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 (3.1.1). 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. Um den Verlauf der Expression zu überprüfen, wurden vor der Induktion und zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 2 h, 3 h und 17 h) nach der Induktion 1 ml der Expressionskultur abgenommen. Anschließend wurde die OD₆₀₀ der entnommenen Proben bestimmt. Die Zellen der Proben wurden zentrifugiert (15.600 g; 2 min; RT), der Überstand abgenommen und das Pellet bei -20°C gelagert. Nach ~17 h Inkubation bei 25°C wurde die Expression beendet. Die Zellen wurden zentrifugiert (5.000 g; 15-30 min; 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet bei -20°C gelagert. Die Bakterienpellets der entnommenen Proben wurden in PBS resuspendiert. Bei Proben die eine OD₆₀₀ von 28 besaßen, wurde das Bakterienpellet in 1,96 ml PBS resuspendiert. Proben mit höheren OD₆₀₀-Werten wurden dementsprechend in einem größeren Volumen PBS resuspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Branson Sonificator B-12; Stufe 6-7; 4x 15 sek; 4°C). Lösliche und unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugation (17.600 g; 20-30 min; 4°C) getrennt. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet, das die unlöslichen Proteine enthielt, wurde in dem PBS-Volumen resuspendiert in dem auch zuvor das Bakterienpellet aufgenommen wurde. Die Proben wurden durch SDS-PAGE (2.15) analysiert.

2.8 HEK293-Zellkultur

Für die heterologe Expression wurde folgende Zelllinie verwendet:

HEK293:

Diese menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293 (*human embryonic kidney-cells*; HEK293-Zellen) ist mit einem Adenovirus transfiziert worden. In dieser Arbeit wurden HEK293-Zellen mit den Plasmidkonstrukten pcA-MlcNMP (3.1.1) und pcAMlcNMP-HA/Gly (3.1.11.1) transfiziert.

2.8.1 Kulturbedingungen für HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in dem Nährmedium M10 (*minimal essential medium* (MEM), fötales Kälberserum (10%), L-Glutamin (2 mM), Antibiotika/Antimykotika (1%), nicht essentielle Aminosäuren (1%); GIBCO BRL) bei 37°C, 5% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit auf Petrischalen (Ø 9 cm) kultiviert. Das M10-Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Die Generationszeit der HEK293-Zellen betrug etwa einen Tag. Bei einer Dichte von $\sim 1 \times 10^7$ Zellen/Ø 9 cm Schale (entsprechend 90% Konfluenz) wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 3-5 ml PBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%; GIBCO BRL) bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 8-10 ml M10 resuspendiert. In einer Neubauerzählkammer wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde für die Zellerhaltung zu $\sim 1,5 \times 10^5$ Zellen (entsprechend 10-20% Konfluenz) auf Ø 9 cm Schalen mit frischem M10-Medium ausgesät. Die verbleibenden Zellen wurden für die Transfektion zu 2×10^5 Zellen auf Ø 5 cm Schalen oder zu 9×10^5 Zellen auf Ø 9 cm Schalen ausplattiert. Nach 65 Zellteilungen wurden die HEK293-Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Aussaat vorbereitet.

Für die Langzeitlagerung wurden HEK293-Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (60-70% Konfluenz) befanden, und zu $\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ml M10 (10% DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Aussäen der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt: Sie wurden schnell bei 37°C aufgetaut und vorsichtig zu 10 ml M10 (vorgewärmt) pipettiert. Die Zellen wurden dann pelletiert (200 g; 5 min; RT). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 3-5 ml M10 resuspendiert und zu $\sim 5 \times 10^5$ Zellen auf Ø 9 cm Schalen ausgesät.

PBS (pH 7,2) :

137 mM NaCl

10 mM Na₂HPO₄

2,6 mM KCl

1,9 mM KH₂PO₄

2.8.2 Transiente Expression von Proteinen in HEK293-Zellen

Zunächst wurde die DNA in den Plasmidvektor pcDNA I Amp (2.7.1) kloniert, welche die transiente Expression heterologer Proteine in HEK293-Zellen erlaubt. Die Transfektion wurde nach der CaPO₄-Methode (Chen & Okayama, 1987) durchgeführt. Für immunzytochemische bzw. elektrophysiologische Untersuchungen wurden 3x 10⁵ Zellen (Ø 5 cm Schalen) und für Zellpräparationen 9x 10⁵ Zellen (Ø 9 cm Schalen) transfiziert.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Transfektionsansätze

	Ø 5 cm Schale	Ø 9 cm Schale
DNA	2-10 µg in 124 µl H ₂ O	6-30 µg in 372 µl H ₂ O
CaCl ₂ (1M)	41 µl	123 µl
2 x BBS (pH 6,95) ⁽¹⁾	165 µl	495 µl

⁽¹⁾ 2 x BBS (pH 6,95) 50 mM N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES); 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄

Die Transfektionsansätze wurden 20 min (RT) inkubiert und anschließend auf Schalen mit logarithmisch wachsenden Zellen pipettiert. Die DNA wurde durch eine 20-22 stündige Inkubation bei 35°C, 3% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit präzipitiert und von den Zellen aufgenommen. Zellen, die für Membranpräparationen vorgesehen waren, wurden mit PBS (2.8.1) gewaschen und anschließend mit 8 ml M10-Medium 20-22 h bei 37°C, 5% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für immunzytochemische bzw. elektrophysiologische Untersuchungen wurden die transfizierten Zellen mit 3 ml PBS und mit 2 ml PBS/EDTA (0,5%, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden 300 µl Trypsin/EDTA (GIBCO BRL) zupipettiert und die Zellen solange bei 37°C inkubiert, bis sie sich von der Schale ablösen. Die Zellen wurden in 4,7 ml M10-Medium resuspendiert und auf Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtete Glasplättchen in Multiwellplatten pipettiert (100-250 µl je Plättchen). Die Plättchen waren zuvor in den Multiwellplatten mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml, >1 h) inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 250-400 µl M10-Medium überschichtet worden, so dass sich ein Endvolumen von 500 µl pro Well ergab. Die Zellen wurden 20-22 h bei 37°C, 5% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Steigerung der Expressionseffizienz wurden die Zellen nach dem Umsetzen in M10-Medium mit 5 mM Natriumbutyrat inkubiert.

2.9 Reinigung rekombinanter Proteine

2.9.1 Reinigung von heterolog exprimiertem MICNG-Protein aus *E. coli*

Für die Expression von His-Tag-Fusionsproteinen in *E. coli* wurde der Plasmidvektor pET-11a verwendet (Novagen; 2.7.1). Das "His-Tag" besteht aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten und ermöglicht die Reinigung über eine Co^{2+} -beladene Histrapsäule (Amersham Biosciences). Das Fusionsprotein enthielt C-terminal den Histidinanteil und N-terminal das klonierte Protein. Die Expression der Fusionsproteine (2.7.3.3) 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 (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 (5.000 g, 20-30 min, 4°C) wurde der Überstand, der die solubilisierten Fusionsproteine enthielt, abgenommen und filtriert (Spitzenvorsatzfilter; 0,45 μM CM Membran, Merck). Eine Histrapsäule (5 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 (2.10) wurde zur Überprüfung der Homogenität der Probe durchgeführt.

Zellaufschlusspuffer:

50 mM NaHPO_4 , pH 8

295 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM MgCl_2

Complete (Proteaseinhibitor; 1 Tablette/50 ml)

2-3 mg DNase I

Solubilisierungspuffer 1:

20 mM NaHPO₄, pH 8
 295 mM NaCl
 5 mM KCl
 20% Glyzerin (v/v)
 5 mM Imidazol

Solubilisierungspuffer 2:

20 mM NaHPO₄, pH 8
 295 mM NaCl
 5 mM KCl
 20% Glyzerin (v/v)
 5 mM Imidazol
 60 mM DM

Waschpuffer:

20 mM NaHPO₄, pH 8
 295 mM NaCl
 5 mM KCl
 20% Glyzerin (v/v)
 5 mM Imidazol
 5 mM DM

Elutionspuffer:

20 mM NaHPO₄, pH 8
 295 mM NaCl
 5 mM KCl
 20% Glyzerin (v/v)
 500 mM Imidazol
 5 mM DM

2.9.2 Reinigung von heterolog exprimiertem MICNBD-Protein aus *E. coli*

Für die Expression von GST-Tag-Fusionsproteinen in *E. coli* wurde der Plasmidvektor pGEX-2T verwendet (Amersham Biosciences; 2.7.1). 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 das klonierte Protein. Dazwischen befand sich eine Schnittstelle für die Proteinendonuklease Thrombin. Die Expression der Fusionsproteine (2.7.3.3) 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 (5.000 g; 20-30 min; 4°C) getrennt. Der Überstand, der die Fusionsproteine enthielt, wurde für die weitere Aufreinigung 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. Eine anschließende Größenausschlussschromatographie (2.10) wurde zur Überprüfung der Homogenität der Probe durchgeführt.

PBS (pH 7,4):

7 mM Na₂HPO₄

3 mM NaH₂PO₄

130 mM NaCl

2.9.3 Reinigung der cAMP-freien Form des heterolog exprimierten MICNBD-Proteins aus *E. coli*

Um das gebundene cAMP von dem gereinigten MICNBD-Protein (2.9.2) zu entfernen, wurde das Protein denaturiert. Anschließend wurde das Protein renaturiert und für Bindungsstudien bzw. NMR-Messungen weiter verwendet.

Das gereinigte Protein (2.9.2) wurde nach der Affinitätschromatographie 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 5fachen Volumen Renaturierungspuffer zurückgefaltet. Dabei wurde die Probe in zwei Schritten tropfenweise in den Renaturierungspuffer gegeben. Die Rückfaltung erfolgte bei 4 °C unter leichtem Rühren über zwei Tage. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (5.000 g, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und auf 5 ml eingeeengt (*stirred cell model* 8400; Amersham Biosciences). Nach erneuter Zentrifugation (5.000 g, 20 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und filtriert (Spitzenvorsatzfilter; 0,45 µM CM Membran, Merck). Eine anschließende Größenausschlussschromatographie (2.10) wurde zur Überprüfung der Homogenität der Probe durchgeführt.

Denaturierungspuffer:

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

6 M GdnHCl

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)

2.9.4 Reinigung von heterolog exprimierten Membranproteinen aus HEK293-Zellen

Die transfizierten Zellen von sechs Ø 9 cm Schalen wurden am zweiten Tag nach der Transfektion mit einem Gummispatel von den Schalen abgeschabt und pelletiert (200 g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 30 ml PBS/0,5% EDTA gewaschen und erneut zentrifugiert (200 g; 10 min; 4°C). Nach Überstandabnahme wurde das Pellet in 3 ml Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde zum Zellaufschluss fünfmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Zellreste und Zellkerne wurden durch Zentrifugation entfernt (200 g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut in 3 ml Puffer A resuspendiert und zentrifugiert (200 g; 10 min; 4°C). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mit dem Überstand aus der vorhergehenden Zentrifugation vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden in einer Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert (126.000 g; 15 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet (Membranfraktion) wurde zum hypertonischen Waschen in 3 ml Puffer B resuspendiert und ultrazentrifugiert (126.000 g; 15 min; 4°C). Nach erneuter Überstandabnahme wurde das Membranpellet in 450 µl Puffer C aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde durch die Amidoschwarzmethode (2.12.2) bestimmt. Die Ausbeuten betrugen 100-150 µg Protein pro Ø 9 cm Schale.

Puffer A (hypotonisch):

20 mM NaCl

1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

1 mM DTT

20 mM HEPES/NaOH pH 7,4

1:500-verd. mPIC (*mammalian protease inhibitor cocktail*, Sigma)PBS (pH 7,4):7 mM Na₂HPO₄3 mM NaH₂PO₄

130 mM NaCl

Puffer B (hypertonisch):

wie Puffer A, jedoch 500 mM NaCl

Puffer C (isotonisch):

wie Puffer A, jedoch 150 mM NaCl

2.10 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 bewegen sich hingegen nicht ungehindert durch das poröse Trennmaterial. Zusätzlich können sie in die Poren des Trennmaterials eindringen und eluieren dadurch später. Der Trenneffekt hängt hauptsächlich vom Einsatzbereich des Trennmaterials ab und nicht von den Pufferbedingungen.

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

Puffer für MICNG:20 mM NaHPO₄, pH 8

295 mM NaCl

5 mM KCl

5 mM DM

Puffer für MICNBD:10 mM KHPO₄, pH 7

100 mM KC

2.11 Optimierung der Pufferbedingungen für MICNBD

Die Optimierung der Pufferbedingungen wurde mit der „*Micro-Drop*“-Analyse durchgeführt. Die Pufferoptimierung wurde für die cAMP-freie Form (2.9.3) und die cAMP-gebundene Form (2.9.2) des Proteins MICNBD vorgenommen. Der Versuch wurde jeweils in drei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten analysiert (Tabelle 2.2). Die Puffer wurden in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Anschließend wurden 2 µl des jeweiligen Puffers mit 1 µl gereinigtem Protein (Konzentration 10 mg/ml) auf ein Deckglas gegeben. Das Deckglas wurde auf eine Vertiefung einer Multiwellplatte mit Silikon fixiert. Der so entstandene „*hanging drop*“ wurde mehrere Tage bzw. Wochen bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte alle 2-3 Tage unter einem Binokular (STEMI DV4, Zeiss, Obercochem), indem die Menge des Präzipitats in den einzelnen Tropfen verglichen wurde. Die Präzipitatsmenge wurde mit einer Werteskala von 1-3 beurteilt. Tropfen die wenig Präzipitat aufwiesen, erhielten einen Wert von 1. Eine hohe Präzipitatsmenge hingegen wurde mit einem Wert von 3 beurteilt. Die Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (Sony). Im zweiten Schritt wurden die jeweiligen Puffer weiterverwendet, die einen Präzipitatwert von 1 hatten. Die Puffer wurden mit unterschiedlichen NaCl- bzw. KCl-Konzentrationen (50 mM, 100 mM und 150 mM) erneut einer „*Micro-Drop*“-Analyse unterzogen. Am Ende dieser Versuchsreihe wurden erneut die Puffer mit den jeweiligen Salzkonzentrationen weiterverwendet, die einen Präzipitatwert von 1 erhielten. Im letzten Schritt wurde die Pufferkonzentration variiert. Für die cAMP-gebundene Form des MICNBD-Proteins wurden die jeweiligen Puffer mit den Konzentrationen 10 mM, 15 mM und 45 mM verwendet. Für die cAMP-freie Form des MICNBD-Proteins wurden die jeweiligen Puffer mit den Konzentrationen 30 mM, 60 mM und 100 mM verwendet. Nach der „*Micro-Drop*“-Analyse standen für beide Proteine jeweils vier Puffersysteme zur Auswahl. Die gereinigten Proteine wurden nun über NAP5-Säulen (Amersham Biosciences) in die jeweiligen Puffer umgepuffert. Die Proben wurden anschließend auf 10-20 mg/ml konzentriert (Microcon10; Millipore; Eschborn) und bei RT

gelagert. Zur Überprüfung der Proteinstabilität wurden nach verschiedenen Zeitpunkten (1 Tag, 4 Tage, 7 Tage und 18 Tage) Proben entnommen und durch SDS-PAGE (2.15) analysiert.

Tabelle 2.2: Verwendete Puffersysteme für die „Micro-Drop“-Analyse

NaHPO ₄ , pH 5,5	MES, pH 5,8
NaHPO ₄ , pH 6,5	MES, pH 6,2
NaHPO ₄ , pH 7,5	MES, pH 6,5
Na-Acetat, pH 4,5	HEPES, pH 7
Na-Acetat, pH 5,5	HEPES, pH 8
Na-Citrat, pH 4,7	Tris, pH 7,5
Na-Citrat, pH 5,5	Tris, pH 8
KHPO ₄ , pH 5	Tris, pH 8,5
KHPO ₄ , pH 6	Imidazol, pH 8
KHPO ₄ , pH 7	NH ₄ -Acetat, pH 7,3
KHPO ₄ , pH 7,5	

2.12 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.12.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)

Es wurde das "Protein Assay"-Farbreagenz von BioRad (München) verwendet. Die zu vermessende Proteinprobe wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagenz vermischt. Danach wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit BSA (NEB; Schwalbach) erstellt. Im linearen Bereich der Eichkurve (1-10 µg Protein) entspricht eine OD₅₉₅ von 0,06 ca. 1 µg Protein.

2.12.2 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Es wurde der Amidoschwarz 10B-Farbstoff von Merck (Darmstadt) verwendet. Die zu vermessende 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 hinzugegeben. Nach dem Mischen wurden 30 µl 104% (w/v) TCA zur Fällung der Proteine hinzugegeben und der Ansatz nochmals gemischt. Die Proben wurden 20 min bei RT

inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Membranfilter (Porendurchmesser: 45 µm; Millipore, Eschborn) aufgetragen. Die Filter wurden mit 3 ml 6% TCA gewaschen und für 5 min in Färbelösung inkubiert. 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 Bereiche ausgeschnitten. Danach wurden die Filterstücke in je 1 ml Elutionslösung für 20 min bei RT geschüttelt. Es wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630$ bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit BSA (NEB) erstellt. Im linearen Bereich der Eichkurve (1-15 µg Proteine) entspricht eine OD₆₃₀ von 0,03 ca. 1 µg Protein.

Färbelösung:

0,5% Amidoschwarz B10
45% Methanol
10% Essigsäure

Entfärbelösung:

90% Methanol
2% Essigsäure

Elutionslösung:

50% Ethanol
25mM NaOH
50µM EDTA

2.13 Bestimmung des cAMP-Gehalts von Proteinen

2.13.1 Photometrische Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Proteinen

Der cAMP-Gehalt des MICNBD-Proteins wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurde die Proteinlösung auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml eingestellt und anschließend die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ und $\lambda = 280$ nm gemessen. Zur Bestimmung des prozentualen cAMP-Gehaltes wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{(0,9 - x) * \varepsilon_{\text{Protein}_{280}}}{\left[\left(\frac{x}{7,4} - 1 \right) * \varepsilon_{\text{cAMP}_{260}} \right]} = \frac{c_{\text{cAMP}}}{c_{\text{Protein}}}$$

$x = \text{Protein}_{\text{OD}260} / \text{Protein}_{\text{OD}280}$

ε = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

Ergibt sich z.B. ein Verhältnis von $c_{\text{cAMP}}/c_{\text{Protein}}$ von 0,7, dann bedeutet dies, dass 70 % des Gesamtproteins cAMP gebunden hatte.

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

Die HPLC ist eine Säulenflüssigkeitschromatographie und wird zum Trennen von Substanzgemischen verwendet. Das Substanzgemisch (Analyt) wird in einer flüssigen mobilen Phase und unter hohem Druck über eine stationäre Phase (Füllmaterial der chromatographischen Säule) transportiert. Die Analyten können mit der spezifischen Oberfläche der stationären Phase wechselwirken. Diese Wechselwirkung bewirkt einen verzögerten Transport der einzelnen Komponenten, wodurch jede eine charakteristische Zeit (Retentionszeit) bzw. ein charakteristisches Volumen (Retentionsvolumen) benötigt, um die Trennsäule zu verlassen. Um Substanzen, die von der Säule eluieren, qualitativ oder quantitativ nachweisen zu können, wird die UV-Absorption des Eluats verfolgt. Das Ergebnis der Substanztrennung wird in Form eines Chromatogramms dargestellt.

Bei der hier verwendeten RP (*reversed phase*)-HPLC werden meist poröse Kieselgele eingesetzt, deren polare OH-Gruppen auf der Oberfläche mit Kohlenwasserstoffketten (je nach Anwendung mit einer Länge von C_2 bis C_{18}) 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, desto länger ist deren Retentionszeit auf der Säule.

Diese Methode wurde dazu verwendet um festzustellen, wie hoch der prozentuale cAMP-Anteil in einer gereinigten MICNG bzw. MICNBD-Proteinprobe war. Es wurden die Proteinlösungen mit 10% Trichloressigsäure 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 (17.600 g, 30 min, 4°C) und die Überstände anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt. Die

Überstände wurden nun durch Zugabe weniger Tropfen NaOH (10 M) neutralisiert. Für die RP-HPLC-Analyse wurden jeweils 150 µl 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.

2.14 Modifikation von Proteinen

2.14.1 Deglykosylierung von Membranproteinen

Die Deglykosylierung von Membranproteinen (2.9.4) erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden die Proteine in 0,5% SDS/1% β -Mercaptoethanol für 10 min bei 37°C denaturiert. Danach erfolgte die Deglykosylierung in PBS/1% Nonidet P-40. Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C mit 500 U der Peptid/N-Glykosidase F (PNGase F; NEB) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Reaktionsansatz ohne Enzym inkubiert.

PBS (pH 7,4):

7 mM Na₂HPO₄

3 mM NaH₂PO₄

130 mM NaCl

2.14.2 Kovalentes Quervernetzen von Proteinen

Durch kovalentes Quervernetzen („*cross-linking*“) können benachbarte Proteine miteinander vernetzt werden. Gereinigte Proteine wurden mit 1,4-Bismaleimidyl-2,3-dihydroxybutan (BMDB) oder Bis(sulfosuccinimidyl)-suberat (BS³) bei RT quervernetzt. BMDB ist ein homobifunktionelles Reagenz, das spezifisch mit Sulfhydrylgruppen reagiert und Proteine über einen 10 Å langen Arm („*Spacer*“) vernetzt. BS³ ist ebenfalls ein homobifunktionelles Reagenz, das zwei reaktive Gruppen (NHS-Ester) besitzt, die durch einen 11,4 Å langen Spacer voneinander getrennt sind. BS³ kann mit freien Aminogruppen des Proteins reagieren. Die Konzentration der Proteine betrug bei den Vernetzungsreaktionen 667 µg/ml (MICNG; 2.9.1) bzw. 1 mg/ml (MICNBD; 2.9.2). Die „Crosslinker“ wurden in Konzentrationen von 30 µM BMDB bzw. 1 mM BS³ verwendet. Die Vernetzungsreaktionen wurden nach bestimmten

Zeiten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-Cl, pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 12,5%(v/v) Glycerin; 1%(v/v) β -Mercaptoethanol; 0,01%(w/v) Bromphenolblau) gestoppt. Die vernetzten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (5-12,5%-ige bzw. 10-15%-ige Gradientengele; 2.15) und im Western-Blot (2.16.1, 2.16.2) untersucht.

Puffer für MICNG:

20 mM NaHPO₄, pH 7,4
300 mM NaCl
20% Glycerin (v/v)
5 mM DM

Puffer für MICNBD (PBS, pH 7,4):

7 mM Na₂HPO₄
3 mM NaH₂PO₄
130 mM NaCl

2.15 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (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.

4x SDS-Probenpuffer:

8% SDS
200 mM Tris/HCl pH 6,8
50% Glycerin
4% β -Mercaptoethanol
0,04% Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris
1% SDS
1,92 M Glycin

2.15.1 Verwendete Proteingrößenstandards

Als Größenstandards bei der SDS-PAGE dienten die Proteine des "*Low Molecular Weight Calibration Kit*" (LMW-Größenstandard) und des "*High Molecular Weight Calibration Kit*" (HMW-Größenstandard) von Amersham Biosciences (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Verwendete Größenstandards bei der SDS-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		

2.15.2 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau

Das Färben von SDS-Polyacrylamidgelen wurde in Anlehnung an Meyer und Lamberts (1965) durchgeführt. Es wurde der Farbstoff Coomassie Blue R 250 von Serva (Heidelberg) verwendet. Die Gele wurden für 1-2 h in Färbelösung gelegt. Anschließend wurden die Gele bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades in Entfärbelösung gelegt. Die Gele wurden dokumentiert (Image Station 440; Kodak digital science) und zur Lagerung auf Whatmanpapier getrocknet.

Färbelösung:

0,2% SERVA Blue R

30% Ethanol (vergällt)

10% Essigsäure

Entfärbelösung:

30% Ethanol (vergällt)

10% Essigsäure

2.16 Nachweis spezifischer Proteine

2.16.1 Transfer und Immobilisierung von Proteinen („Western-Blot“)

Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (2.15) und in Anlehnung an Towbin et al. (1979) auf PVDF-Membranen („Immobilon P“; Millipore; Eschborn) transferiert. Der Transfer („Western-Blot“) 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. Ein erfolgreicher Transfer wurde durch reversible Färbung mit 0,2% Ponceau S (Sigma) in 2%

Essigsäure überprüft. Falls notwendig wurde die Blotmembran für immunologische Nachweise in Streifen geschnitten.

2.16.2 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 (Erstantikörper) inkubiert. Der spezifische Antigenantikörperkomplex wurde dann mit einem sekundären Antikörper (Zweitantikörper) nachgewiesen, der an die Meerrettichperoxidase (HRPO) gekoppelt war. Die Inkubationsschritte wurden 30-60 min bei RT durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran gewaschen (je 10 min, RT). Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter Schütteln. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen, sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der Tabelle 2.4 zusammengefasst. Die spezifischen Antigenantikörperkomplexe wurden mit dem "*ECL Westernblot Detection Kit*" (Amersham Biosciences) nachgewiesen.

Tabelle 2.4: 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

⁽²⁾ PBS; 0,05% Tween-20

⁽³⁾ Erstantikörper in PBS; 0,05% Tween-20

⁽⁴⁾ Zweitantikörper in PBS; 0,05% Tween-20; 0,1% Milchpulver

⁽⁵⁾ PBS: 130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄

2.16.3 Immunzytochemie

2.16.3.1 Fixierung und immunzytochemische Färbungen von HEK293-Zellen

Transfizierte HEK293-Zellen wurden auf Glasplättchen umgesetzt (2.8.2). Die Zellen wurden am zweiten Tag nach der Transfektion mit PBS gewaschen und 10-15 min mit 4% Paraformaldehyd (PA) in PBS auf den Glasplättchen fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in PBS/0,05% NaN₃ aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Die Färbung von transfizierten und fixierten HEK293-Zellen erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Zellen in einer Lösung aus normalem Ziegenserum (*normal goat serum*, NGS) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (Erstantikörper) inkubiert. Im dritten Schritt erfolgte der Nachweis des spezifischen Antigenantikörperkomplexes mit einem sekundären Antikörper (Zweitantikörper), der an die Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Die Inkubationsschritte wurden 30-60 min bei RT durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Zellen zweimal für je 10 min mit PBS bei RT gewaschen. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen, sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Die spezifischen Antigenantikörperkomplexe wurden über die kovalent gekoppelte Meerrettichperoxidase des Zweitantikörpers nachgewiesen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,05% Diaminobenzidin (DAB)/0,01% H₂O₂ in PBS gestartet und nach 1-15 min durch PBS gestoppt. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden durch AquaPolymount (Polyscience, Eppelheim) auf Objektträger fixiert. Die Dokumentation erfolgte mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica, Solms).

Tabelle 2.5: Immunzytochemie an HEK293-Zellen

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Vorinkubation	30 min (RT)	Vorinkubationslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS ⁽²⁾
Erstantikörper	1 h (RT)	Erstantikörperinkubationslösung ⁽³⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS ⁽²⁾
Zweitantikörper	30 min (RT)	Zweitantikörperinkubationslösung ⁽⁴⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS ⁽²⁾

⁽¹⁾ PBS; 0,5 % Triton X-100; 10 % NGS

⁽²⁾ PBS; 130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄

⁽³⁾ Erstantikörper in PBS; 0,5 % Triton X-100; 3 % NGS

⁽⁴⁾ Zweitantikörper in PBS; 0,5 % Triton X-100; 3 % NGS

2.16.3.2 Extrazelluläre Färbungen

Die Färbung der transfizierten HEK293-Zellen erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (Erstantikörper) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10-15 min mit 4% Paraformaldehyd (PA) in PBS auf den Glasplättchen fixiert. Im dritten Schritt erfolgte der Nachweis des spezifischen Antigenantikörperkomplexes mit einem sekundären Antikörper (Zweitantikörper), der an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 gekoppelt war. Die Inkubationsschritte wurden 20 min bei RT durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Zellen zweimal für je 10 min mit PBS bei RT gewaschen. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen, sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Die spezifischen Antigenantikörperkomplexe wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 des Zweitantikörpers nachgewiesen. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden durch AquaPolymount (Polyscience, Eppelheim) auf Objektträger fixiert. Der an den Zweitantikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm angeregt. Die Fluoreszenz wurde durch einen Bandpaßfilter bei $\lambda = 504-542$ nm beobachtet. Die Dokumentation erfolgte mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica, Solms).

Tabelle 2.6: Immunzytochemie an HEK293-Zellen (extrazelluläre Färbungen)

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Erstantikörper	20 min (RT)	Erstantikörperinkubationslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS ⁽²⁾
Fixierung	2-5 min (RT)	4% Paraformaldehyd ⁽³⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS ⁽²⁾
Zweitantikörper	20 min (RT)	Zweitantikörperinkubationslösung ⁽⁴⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS ⁽²⁾

⁽¹⁾ Erstantikörper in PBS

⁽²⁾ PBS: 130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄

⁽³⁾ 4% Paraformaldehyd in PBS

⁽⁴⁾ Zweitantikörper in PBS; 0,5 % Triton X-100; 5% Chemieblocker

2.16.4 Immunisierung von Ratten und Herstellung von Hybridomzellen

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer vom Institut für molekulare Immunologie (GSF München). Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde das His-Tag-Fusionsprotein (2.9.1) zur Immunisierung von

Ratten verwendet. Die Immunisierung von Ratten (Rasse: Lou/C) und die Herstellung von Hybridomen geschah nach folgendem Schema:

Tabelle 2.7: Herstellung monoklonaler Antikörper

	Grundimmunisierung mit Antigen (Adjuvans wurde in einem 1:1-Verhältnis zugesetzt)
nach 6-8 Wochen	Auffrischungsimmunisierung („boost“) mit Antigen (ohne Adjuvans)
nach 3 Tagen	Fusion von Rattenmilzzellen mit der Mausmyelomzelllinie P3X63-Ag8.653
nach 12 Tagen	Charakterisierung der Hybridome im ELISA
nach 7 Tagen	Sicherung der Hybridome
nach 14 Tagen	Gewinnung von 5 ml Primärüberstand

Die Primärüberstände wurden im Western-Blot (2.16.1) an gereinigtem Protein aus *E. coli* getestet. Die Hybridome, deren Primärüberstände sich in diesen Tests als geeignet erwiesen hatten, wurden unter Berücksichtigung der Ig-Subklasse rekloniert. Die Reklonierung erfolgte durch Einzelzellverteilung, bis alle Hybridome auf der Kulturplatte positiv mit dem Antigen reagierten. Der übriggebliebene Klon wurde expandiert und zur Gewinnung des Überstands mit dem eigentlichen monoklonalen Antikörper (Reinkultur) verwendet.

2.17 Isothermale Titrationskalorimetrie

Mit der isothermen Titrationskalorimetrie kann die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor untersucht werden (Doyle, 1997). Die Ligandenbindung kann entweder einer exothermen oder einer endothermen Reaktion folgen. Das ist abhängig davon ob bei der Bindung Wärme freigesetzt oder absorbiert wird. Das Prinzip der ITC beruht auf dem Vorhandensein einer Messzelle und einer Referenzzelle, die auf gleicher Temperatur gehalten werden. Ändert sich in der Reaktionszelle die Temperatur, so ändert das Kalorimeter die zugeführte Energiemenge so lange, bis die Temperaturdifferenz wieder ausgeglichen ist. Die zugeführte Energiemenge wird in $\mu\text{cal/sec}$ aufgezeichnet. Die Referenzzelle enthält bidestilliertes Wasser.

Nachdem die Rezeptorlösung in der Messzelle vorgelegt wurde, wurde der Ligand durch eine rotierende Mikroinjektionsspritze wiederholt in die Messzelle injiziert. Die Verdünnungswärme kann ermittelt werden, wenn man den Liganden in die Pufferlösung injiziert. Diese wird von den Messwerten abgezogen. Die Messungen erfolgten an einem isothermen Titrationskalorimeter der Firma MicroCal (Northampton, USA). Das Volumen der Messzelle betrug 1,3985 ml. Zur vollständigen luftblasenfreien Befüllung der Messzelle

wurden ca. 2 ml Lösung benötigt. Die Spritze konnte ein Volumen von 250 µl fassen. Das Injektionsvolumen variierte von 0,5 µl – 5 µl. Das Zeitintervall zwischen den Injektionen betrug 400s. 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.

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 Gibb'schen Energie 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)

Trägt man die Bindungsenthalpie (in kcal/mol) gegen das molare Verhältnis Ligand/Rezeptor auf, so kann man die Messpunkte mit einer Kurve nach Gleichung 2 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.

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

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

(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)

Die Kurve wurde nach folgender Gleichung angepasst:

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

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

2.18 NMR-Spektroskopie

Durch die NMR-Spektroskopie sollte die Struktur der cAMP-freien ($\text{MICNBD}^{-\text{cAMP}}$) und -gebundenen Form ($\text{MICNBD}^{+\text{cAMP}}$) des MICNBD-Proteins aufgeklärt werden.

Probenvorbereitung:

Es wurden 1D-NMR-Experimente mit den Proteinen $\text{MICNBD}^{-\text{cAMP}}$ und $\text{MICNBD}^{+\text{cAMP}}$ durchgeführt. Für diese Messungen wurden nichtisotopenmarkierte Proteine verwendet. Die Expression erfolgte wie unter 2.7.3.3 beschrieben. Anschließend wurden die Proteine gereinigt (2.9.2; $\text{MICNBD}^{+\text{cAMP}}$ /2.9.3; $\text{MICNBD}^{-\text{cAMP}}$). Für 2D- $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Experimente wurde ^{15}N -isotopenmarkiertes Protein ($\text{MICNBD}^{+\text{cAMP}}$) verwendet. Die Expression erfolgte in isotopenhaltigem Minimalmedium (2.7.3.4). Die Proteine wurden anschließend wie unter 2.9.2 beschrieben gereinigt. Den Proben wurde 0,02% (w/v) Natriumacid und 5% D_2O zugesetzt. Die Proteinproben wurden mit einer Konzentration von 500 μM verwendet. Die Messung der NMR-Proben (350 μl) erfolgte in einem 5 mm Probenröhrchen (BMS005V; Shigemi, Allison Park, USA).

Hard- und Software für Aufnahme und Prozessierung der Spektren:

Die beschriebenen 1D-NMR-Spektren wurden auf einem Varian^{UNITY}INOVA-Spektrometer mit einer Protonenfrequenz von 600 Mhz aufgenommen. Die Aufnahme eines 2D- $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Spektrums erfolgte ebenfalls an einem Varian^{UNITY}INOVA-Spektrometer mit einer Protonenfrequenz von 800 Mhz. Es wurde eine Varian XYZ-PFG- $^1\text{H}(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Meßsonde und eine kryogene Z-PFG- $^1\text{H}(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Meßsonde verwendet.

Zur Breitband- ^{15}N -Entkopplung während der direkten Detektionsperiode wurde das GARP-Schema (Shaka und Keeler, 1987) und zur Unterdrückung des Wassersignals die

WATERGATE-Technik (Piotto et al., 1992) verwendet. ^1H -chemische Verschiebungen wurden auf externes DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentanon-5-sulfonat, $\delta_{\text{DSS}} = 0$ ppm) und ^{15}N -chemische Verschiebungen indirekt durch die Verwendung des Frequenzverhältnisses ($^{15}\text{N}/^1\text{H} = 0,101329118$) referenziert (Wishart et al., 1995). Zur Prozessierung und Visualisierung der NMR-Spektren wurde die Software VNMRJ (Version 1.1D, Varian, Inc.) und NMRPipe (Delaglio et al., 1995) verwendet.

Alle Experimente wurden bei 298 K (25°C) durchgeführt. Aufnahme und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente sind in Tabelle 2.8 angegeben.

Tabelle 2.8: Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente an MICNBD^{+cAMP} und MLCNBD^{-cAMP}

Experiment	NMR-Probe	sw1 [ppm]	t1 [Pkt]	sw2 [ppm]	t2 [Pkt]	nt	d1 [s]	^{15}N [ppm]	w1 [Pkt]	w2 [Pkt]
1D-Protonen-Spektrum	MICNBD ^{-cAMP}	16,7	15.000	-	-	32	1,5	-	32.768	-
1D-Protonen-Spektrum	MICNBD ^{+cAMP}	16,7	15.000	-	-	32	1,5	-	32.768	-
2D-(^1H - ^{15}N)-HSQC	MICNBD ^{+cAMP}	17,5	768	30,8	150	16	1,5	119,4	2.340	1.024

sw1: aufgenommene spektrale Weite in ppm in der direkten Dimension

sw1: aufgenommene spektrale Weite in ppm in der indirekten Dimension

t1: aufgenommene komplexe Punkte in der direkten Dimension

t1: aufgenommene komplexe Punkte in der indirekten Dimension

nt: Anzahl der Wiederholungsexperimente

d1: Wartezeit in Sekunden zwischen zwei Einzelexperimenten

^{15}N : ^{15}N -Trägerfrequenz in ppm

w1-w2: Anzahl der realen Punkte in der jeweiligen Dimension nach Fourier-Transformation und Reduzierung der spektralen Weite

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde das Gen eines putativen zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals (MICNG) aus dem Bakterium *Mesorhizobium loti* (*M. loti*) kloniert. Das Kanalprotein wurde in einem eukaryotischen und in einem prokaryotischen Zellsystem exprimiert und dann gereinigt und biochemisch untersucht. Zusätzlich wurde die zyklisch Nukleotid-bindende Domäne (CNBD, *cyclic nucleotide binding domain*) des Kanals kloniert, in *E. coli* exprimiert und gereinigt.

Das Kapitel „Ergebnisse“ gliedert sich in zwei Teile. Der erste Teil beschäftigt sich mit den Untersuchungen an dem vollständigen Kanalprotein (MICNG). Der zweite Teil beschreibt die Untersuchungen an der isolierten Bindestelle (MICNBD).

3.1 MICNG

Im Jahr 2000 wurde das vollständige Genom des stickstofffixierenden Bakteriums *M. loti* entschlüsselt und veröffentlicht (Kaneko et al., 2000). Es enthält elf Gene, die Bindestellen für zyklische Nukleotide kodieren. Von diesen Genprodukten erschien das M1132241-Protein besonders interessant, weil es zusätzlich alle Schlüsselemente für einen K^+ -selektiven Ionenkanal aufwies. Es könnte sich bei diesem bakteriellen Protein möglicherweise um einen zyklisch Nukleotid-gesteuerten K^+ -Kanal handeln. Im Vergleich zu eukaryotischen Ionenkanälen können bakterielle Kanäle in viel größeren Mengen hergestellt werden. Sie bieten daher eine ideale Grundlage für die Untersuchung ihrer Struktur und Funktion. Die Untersuchung von bakteriellen Kanälen kann somit zum besseren Verständnis ihrer eukaryotischen Verwandten beitragen.

3.1.1 Klonierung von MICNG

Das MICNG-Gen wurde durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) aus genomischer DNA des Bakteriums *M. loti* amplifiziert. Es wurde zunächst ein Konstrukt (pET-MlcNMPThrHT) für die Expression in *E. coli* hergestellt. An das 3'-Ende wurde hier die kodierende Sequenz für eine Thrombinschnittstelle sowie für sechs Histidinreste (His-Tag) angefügt. Das His-Tag ermöglicht eine Reinigung über eine Co^{2+} -Histrapsäule. Durch die Thrombinschnittstelle kann im Bedarfsfall das His-Tag abgespalten werden. Zum anderen wurde ein Konstrukt (pcA-MlcNMP) für die Expression in der eukaryotischen HEK293-Zelllinie hergestellt. Die

Konstrukte wurden von Dr. W. Bönigk kloniert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Expression von MICNG in *E. coli* (BL21–Zellen)

Um das Protein biochemisch und biophysikalisch charakterisieren zu können, wurde es zunächst in einem heterologen System exprimiert und gereinigt. Bei der heterologen Expression von Proteinen werden häufig Expressionssysteme mit induzierbaren Promotoren verwendet. Eine hohe Transkriptionseffizienz wird durch den T7-Promotor erreicht, der von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Der *E. coli*-Wirtstamm BL21(DE3)LysE hat das Gen der T7-RNA-Polymerase stabil im Chromosom unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors integriert. Dieser kann durch das Laktose-Derivat IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert werden. Nach Zugabe von IPTG wird die T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Sie transkribiert dann die heterologen Gene, die unter der Kontrolle des T7-Promotors liegen.

Für die Expression des MICNG-Proteins wurde ein solches induzierbares System verwendet. Hierzu wurden zunächst BL21-Zellen mit dem Plasmidkonstrukt pET-MlcNMPThrHT transformiert (2.4.3.2). Die Expressionskultur wurde bei 37°C angezogen. Die Expression des Kanalproteins wurde bei einer OD₆₀₀ von ~0,5 mit IPTG (1 mM) induziert. Nach einer Expressionsdauer von 4 h wurden die Zellen pelletiert und durch Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Die löslichen wurden von den unlöslichen Proteinen durch Zentrifugation getrennt. Die unlöslichen Proteine, zu denen auch das MICNG-Protein gehört, wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Alternativ wurden die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert und im Western-Blot analysiert. Der immunologische Nachweis des Kanalproteins erfolgte mit einem His-Tag-Antikörper. Abb. 3.1 zeigt die Expression des MICNG-Proteins. Der His-Tag-Antikörper markiert im Western-Blot (Abb. 3.1 B) eine Bande bei ca. 32 kDa, die auch in der Coomassie-Blau-Färbung (Abb. 3.1 A) zu erkennen ist. Die Größe der Bande stimmt nicht ganz mit dem errechneten Molekulargewicht des Kanalproteins (38,6 kDa) überein. Da das Protein mit dem His-Tag-Antikörper nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass der C-terminale Bereich des Proteins vollständig ist. Um zu überprüfen, ob der N-Terminus des Proteins auch vollständig ist, wurde eine N-terminale Sequenzierung des Proteins (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Hierbei wurden die ersten sechs Aminosäuren des N-Terminus identifiziert. Das Ergebnis zeigte, dass auch der N-Terminus des Proteins vollständig ist. Das bedeutet, dass das vollständige

MICNG-Protein in *E. coli* exprimiert wird und das abweichende Molekulargewicht auf ein anomales Laufverhalten des Proteins in der SDS-PAGE zurückzuführen.

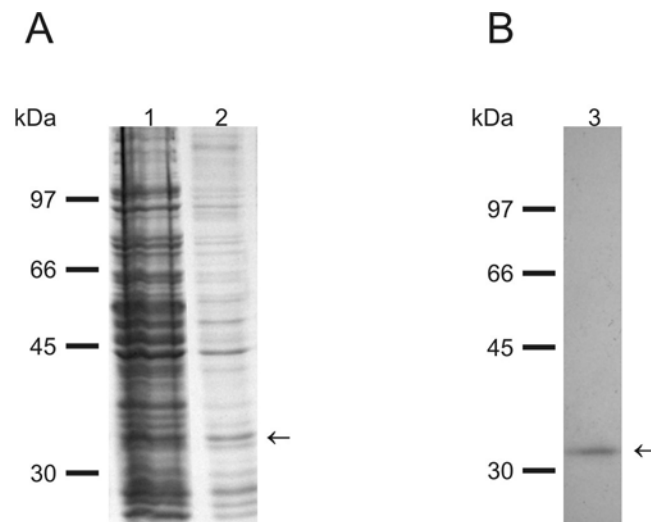


Abb. 3.1: Expression von MICNG in BL21-Zellen. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. (A) Coomassie-Blau-Färbung (B) Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit einem His-Tag-Antikörper (Verdünnung 1:1000) im Western-Blot nachgewiesen. Spur 1: Unlösliche Proteine einer nicht-induzierten Expressionskultur; Spur 2 und 3: Unlösliche Proteine einer induzierten Expressionskultur. Es wurden 15% des Gesamtvolumens aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben. Die Pfeile markieren die Banden des MICNG-Proteins.

3.1.3 Optimierung der Expression von MICNG in BL21-Zellen

Die heterologe Expression von Proteinen ist von vielen Parametern abhängig. Um eine möglichst hohe Proteinausbeute zu erhalten, müssen die Expressionsbedingungen an das jeweilige Protein angepasst werden. Zu den Bedingungen, die man leicht variieren kann, gehören die Expressionstemperatur sowie die Dauer der Expression. Bei induzierbaren Expressionssystemen kann zusätzlich der Zeitpunkt der Induktion und die Menge des Induktors variiert werden. Um die Expression des Proteins MICNG zu optimieren, wurden die Expressionsbedingungen systematisch variiert. Die Expression wurde in Schüttelkolben mit Schikane durchgeführt.

Als erstes wurde die Expression bei verschiedenen Temperaturen (37°C, 30°C, 25°C und 20°C) durchgeführt. BL21-Zellen wurden bei 37°C angezogen, bei einer OD₆₀₀ von ~0,5-0,6 mit IPTG (1 mM) induziert und anschließend auf die jeweilige Expressionstemperatur eingestellt. Nach einer Expressionsdauer von 4 h wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden lösliche und unlösliche Proteine durch Zentrifugation voneinander getrennt. Die unlöslichen Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht bzw. auf einer PVDF-Membran immobilisiert und im Western-Blot analysiert. Das Kanalprotein wurde im Western-Blot mit einem His-Tag-Antikörper nachgewiesen. Abb. 3.2 zeigt die Expression des Kanalproteins bei den verschiedenen Expressionstemperaturen. Es wurden jeweils die unlöslichen Proteine einer induzierten Kultur (Abb. 3.2 A-D, Spur 1 und 3) und die unlöslichen Proteine einer nicht-induzierten Kultur (Abb. 3.2 A-D, Spur 2) aufgetragen. In allen Spuren der induzierten Kulturen ist das Kanalprotein als Bande mit einer Größe von ca. 32 kDa erkennbar. Die Intensität der markierten Banden war bei 20°C am stärksten, d. h. bei dieser Temperatur wird die größte Menge des Proteins exprimiert. Alle weiteren Expressionen wurden daher bei 20°C durchgeführt.

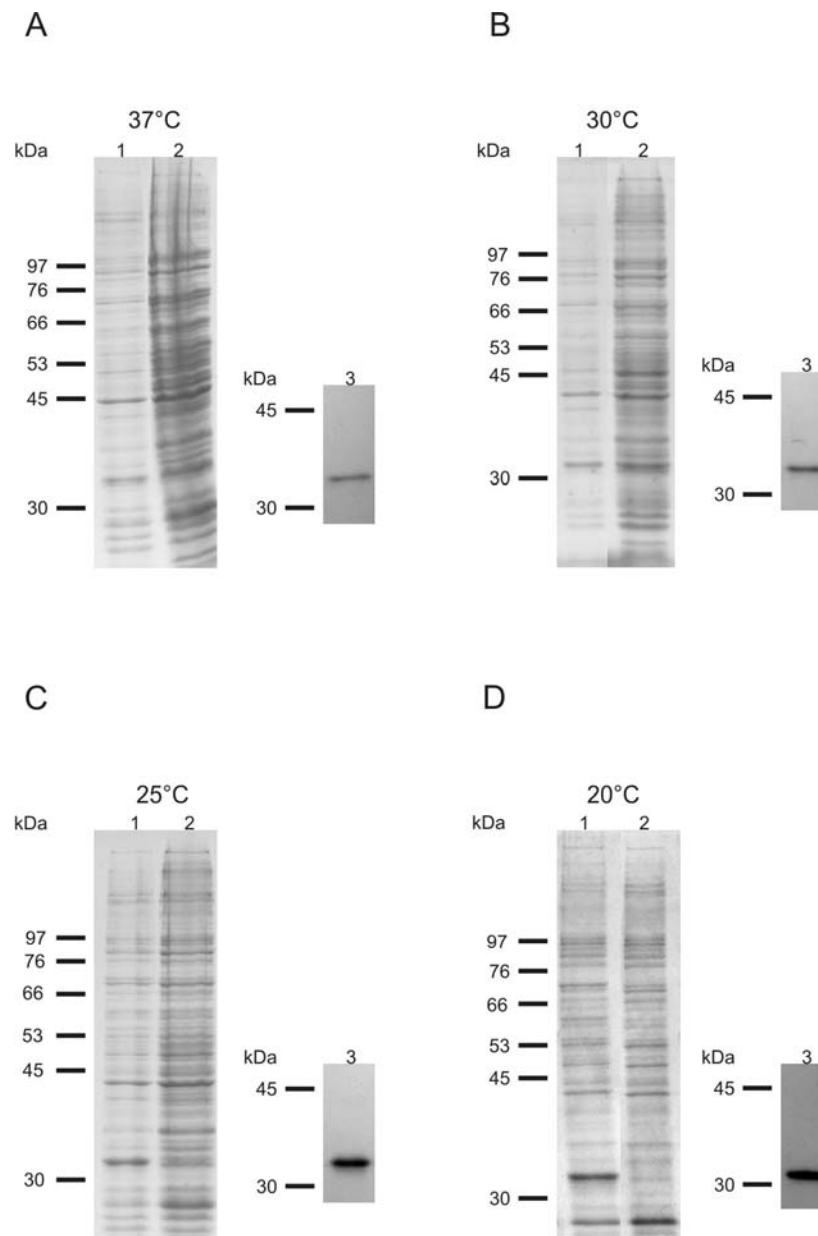


Abb. 3.2: Expression des MICNG-Proteins bei verschiedenen Temperaturen. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht (A-D, Spur 1 und 2) bzw. auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit einem His-Tag-Antikörper (Verdünnung 1:1000) im Western-Blot nachgewiesen (A-D, Spur 3). Spur 1 und 3: Unlösliche Proteine des Bakterienlysates einer induzierten Expressionskultur; Spur 2: Unlösliche Proteine des Bakterienlysates einer nicht-induzierten Expressionskultur. Es wurden 15% des Gesamtvolumens aufgetragen. Die jeweiligen Expressionstemperaturen sind über den Spuren angegeben. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

In einem weiteren Optimierungsschritt wurden Expressionskulturen bei verschiedenen Bakteriendichten mit IPTG (1 mM) induziert. Die optische Dichte (OD) der Bakterienkulturen wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm bestimmt. Nach einer Expressionsdauer von 4 h wurden die Zellen wie beschrieben aufgeschlossen und lösliche von unlöslichen Proteinen getrennt. Abb. 3.3 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse von unlöslichen Proteinen aus induzierten und nicht-induzierten Kulturen. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Die OD-Werte, bei der die Induktion jeweils erfolgte, lagen zwischen 0,15 und 1,2 (Abb. 3.3). Das Kanalprotein ist in allen induzierten Kulturen als Bande mit einer Größe von ca. 32 kDa zu erkennen. Die Intensität der Bande ist bei niedrigeren OD-Werten (0,15-0,39) schwächer als bei höheren OD-Werten (0,59-1,2). Bei höheren OD-Werten ist zu erkennen, dass neben dem Kanalprotein auch andere Proteine stärker exprimiert werden. Bei niedrigen OD-Werten ist die Menge des Kanalproteins im Vergleich zu den anderen bakteriellen Proteinen größer. Um den „bakteriellen Proteinhintergrund“ möglichst gering zu halten, aber möglichst große Mengen des Kanalproteins zu erhalten, wurden alle weiteren Expressionen bei einem OD-Wert von 0,4 induziert.

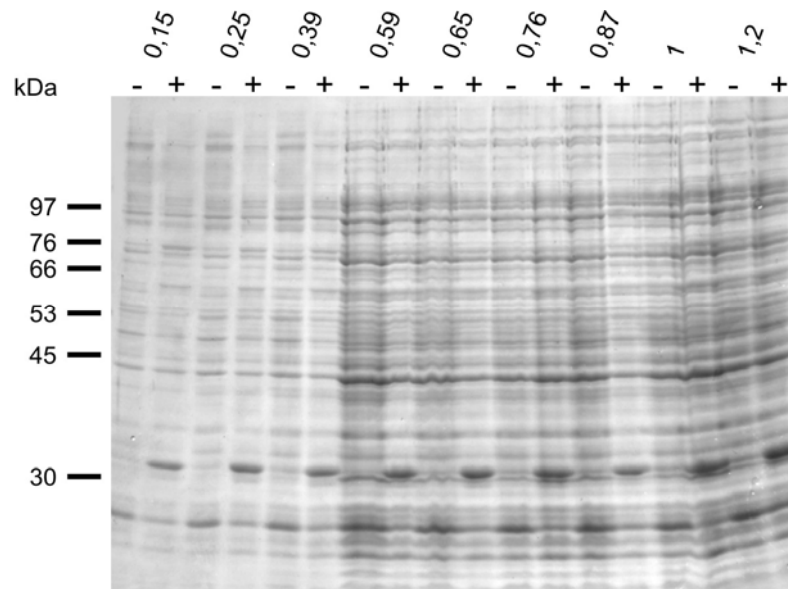


Abb. 3.3: Analyse der Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Induktion. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Die optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm, bei denen die jeweilige Kultur induziert wurde, ist über den Spuren angegeben. Es sind abwechselnd unlösliche Proteine des Bakterienlysates von nicht-induzierten Expressionskulturen (-) und von induzierten Expressionskulturen (+) aufgetragen. Es wurden 15% des Gesamtvolumens aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

Um die Expression weiter zu verbessern, wurde die optimale Expressionsdauer bestimmt. Hierzu wurden nach der Induktion mit IPTG (1 mM) zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, ü. N.) Proben entnommen und analysiert. Abb. 3.4 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse. Aufgetragen sind abwechselnd die unlöslichen Proteine einer nicht-induzierten (-) und einer induzierten Kultur (+). Der jeweilige Zeitpunkt der Probenentnahme nach Induktion ist über den Spuren angegeben. Die ersten beiden Proben (0 h) wurden vor der Induktion genommen. Nach zwei Stunden wird das Kanalprotein als Bande mit einer Größe von ca. 32 kDa sichtbar. Die höchste Expressionsrate wurde bereits nach 4 h erreicht. Die nachfolgenden Expressionen wurden deshalb vier Stunden nach der Induktion beendet.

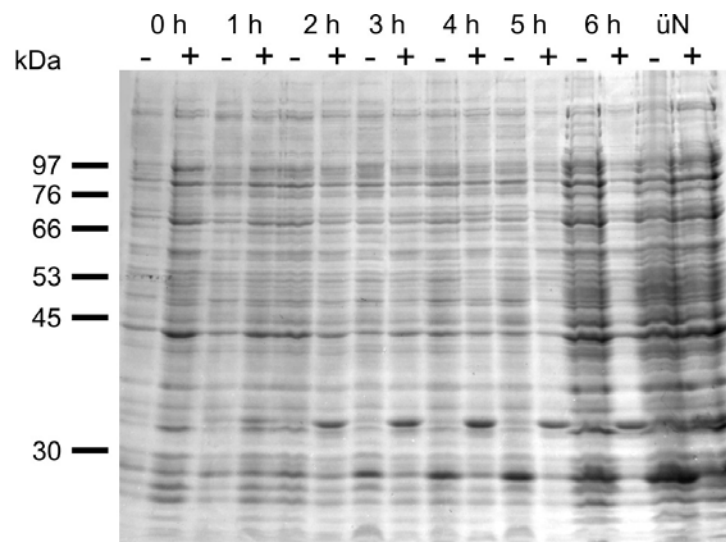


Abb. 3.4: Optimierung der Expressionsdauer. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Die Expressionsdauer ist über den Spuren angegeben. Es sind abwechselnd unlösliche Proteine des Bakterienlysates von nicht-induzierten Expressionskulturen (-) und von induzierten Expressionskulturen (+) aufgetragen. Es wurden 15% des Gesamtvolumens aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

Schließlich wurde die optimale IPTG-Konzentration zur Induktion bestimmt. Abb. 3.5 zeigt die SDS-PAGE-Analyse dieser Testreihe. Die jeweils verwendete IPTG-Konzentration zur Induktion ist über den Spuren in mM angegeben. Das Kanalprotein ist als Bande mit einer Größe von ca. 32 kDa erkennbar. Die Intensität der Bande ist in allen Spuren ähnlich. Nur in der letzten Spur ist die Intensität der Bande schwächer. Bei einer Induktion mit 0,6 mM IPTG war die Intensität der Bande am stärksten. Bei allen weiteren Expressionen wurde deshalb zur Induktion eine IPTG-Konzentration von 0,6 mM verwendet.

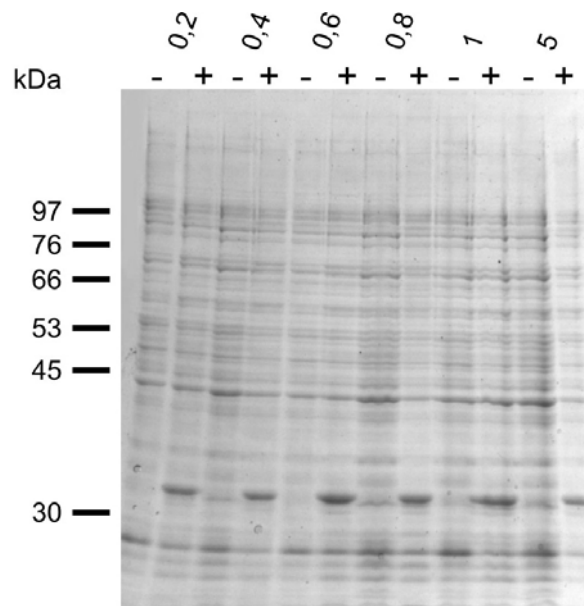


Abb. 3.5: Analyse der Expression nach Induktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Es sind abwechselnd unlösliche Proteine des Bakterienlysates von nicht-induzierten Expressionskulturen (-) und von induzierten Expressionskulturen (+) aufgetragen. Es wurden 15% des Gesamtvolumens aufgetragen. Die IPTG-Konzentration, mit der die jeweilige Kultur induziert wurde, ist in mM über den Spuren angegeben. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

3.1.4 Fermentation

Die Expression im Fermenter bietet Vorteile im Vergleich zu einer Expression im Schüttelkolben. In einem Fermenter können neben der Temperatur noch der Sauerstoffpartialdruck, der pH-Wert und die Zugabe von Nährstoffen (z. B. Glukose) im Verlauf der Expression reguliert werden. Diese Parameter wirken sich positiv auf das Bakterienwachstum aus. Aufgrund dieser Bedingungen werden im Fermenter weit höhere Bakteriendichten erzielt und somit auch höhere Proteinausbeuten.

Die Expression im Fermenter erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. M. Oldiges und H. J. Brandt (IBT, Forschungszentrum Jülich). Die Expression wurde in einem 7,5 l-Fermenter (Bioengineering) durchgeführt. Zunächst wurde die BL21-Expressionskultur bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 28,9 angezogen. Nach der Induktion mit IPTG (0,1 mM) wurde die Expressionstemperatur auf 25°C eingestellt. Nach einer Expressionsdauer von 17 h wurde die Expression beendet. Die OD_{600} der Kultur betrug zu diesem Zeitpunkt 32,8. Um die Expression zu verfolgen, wurden vor und nach der Induktion Proben entnommen. Die Zellen

wurden aufgeschlossen und lösliche von unlöslichen Proteinen getrennt. Die unlöslichen Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht bzw. auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit einem His-Tag-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. Abb. 3.6 zeigt die Analyse der Fermentation. In Spur 1 sind unlösliche Proteine vor der Induktion aufgetragen. Der Antikörper markiert hier eine schwache Bande bei ca. 32 kDa. In den Spuren 2-5 sind unlösliche Proteine nach der Induktion aufgetragen. Der zeitliche Verlauf der Expression ist gut zu erkennen. Der Antikörper markiert in allen Spuren eine Bande bei ca. 32 kDa, die an Intensität bei längerer Expressionsdauer zunimmt. In der Coomassie-Blau-Färbung hingegen lässt sich erst nach 17 h (Spur 5) eine Bande bei ca. 32 kDa erkennen.

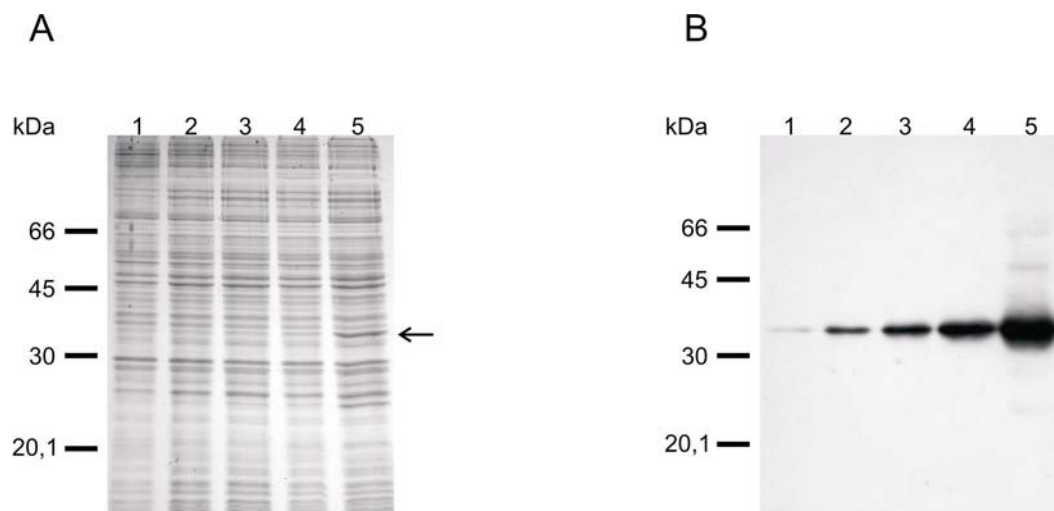


Abb. 3.6: Fermentation von MICNG. Die Proteine wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht (**A**) bzw. auf einer PVDF-Membran immobilisiert (**B**). Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem His-Tag-Antikörper (Verdünnung 1:1000) im Western-Blot. Spur 1: Unlösliche Proteine vor der Induktion (0,4% des Gesamtvolumens); Spur 2-5: Unlösliche Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten (Spur 2: 1 h, 0,5%; Spur 3: 2 h, 0,5%; Spur 4: 3 h, 0,5%; Spur 5: 17 h, 0,4%) nach der Induktion. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

3.1.5 Solubilisierung von MICNG

Um Membranproteine aus Zellmembranen herauszulösen, werden Detergenzien verwendet. Detergenzien sind amphiphile Moleküle, die einen hydrophilen und einen hydrophoben Molekülanteil besitzen. Sie können Mizellen ausbilden, bei denen die hydrophilen Gruppen nach außen und die hydrophoben Gruppen nach innen gerichtet sind. Membranproteine werden als hydrophobe Moleküle in diese Mizellen eingebaut und können so aus einer biologischen Membran gelöst werden.

In Abb. 3.7 wurden drei verschiedene Detergenzien getestet: zwei nichtionische Detergenzien (Decyl-Maltopyranoside, DM; Dodecyl-Maltopyranoside, DDM) und ein zwitterionisches Detergenz (Chaps). Nach der Expression wurden die Zellen aufgeschlossen und lösliche von unlöslichen Proteinen getrennt. Die unlösliche Fraktion wurde mit Detergenzlösungen unterschiedlicher Konzentration inkubiert. Anschließend wurden die solubilisierten und die nicht-solubilisierten Proteine durch Zentrifugation voneinander getrennt und mit SDS-PAGE analysiert. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Abb. 3.7 zeigt die Ergebnisse der Solubilisierung. Aufgetragen sind jeweils nebeneinander die nicht-solubilisierten Proteine (P; Pellet) und die solubilisierten Proteine (S; Solubilisat). Die jeweils eingesetzte Detergenzkonzentration ist über den Spuren in mM angegeben. Die Solubilisierung mit dem Detergenz DM ist in Abb. 3.7 A gezeigt. Das Kanalprotein ist als Bande von ca. 30-32 kDa zu sehen. Mit steigender Detergenzkonzentration nimmt auch die Menge an solubiliertem Protein zu. Die beste Solubilisierung des Proteins wird bei DM-Konzentrationen über 20 mM erreicht. Abb. 3.7 B zeigt die Solubilisierung mit verschiedenen Chaps-Konzentrationen. Selbst bei höheren Detergenzkonzentrationen wird nur wenig Protein aus der Membran gelöst. Die Solubilisierung mit DDM (Abb. 3.7 C) zeigt ein ähnliches Ergebnis wie die Solubilisierung mit DM. Auch hier wird das Kanalprotein bei Detergenzkonzentrationen über 20 mM am besten aus der Membran gelöst. Da die Solubilisierung mit DM geringfügig besser war als mit DDM, wurde dieses Detergenz für die folgenden Versuche verwendet.

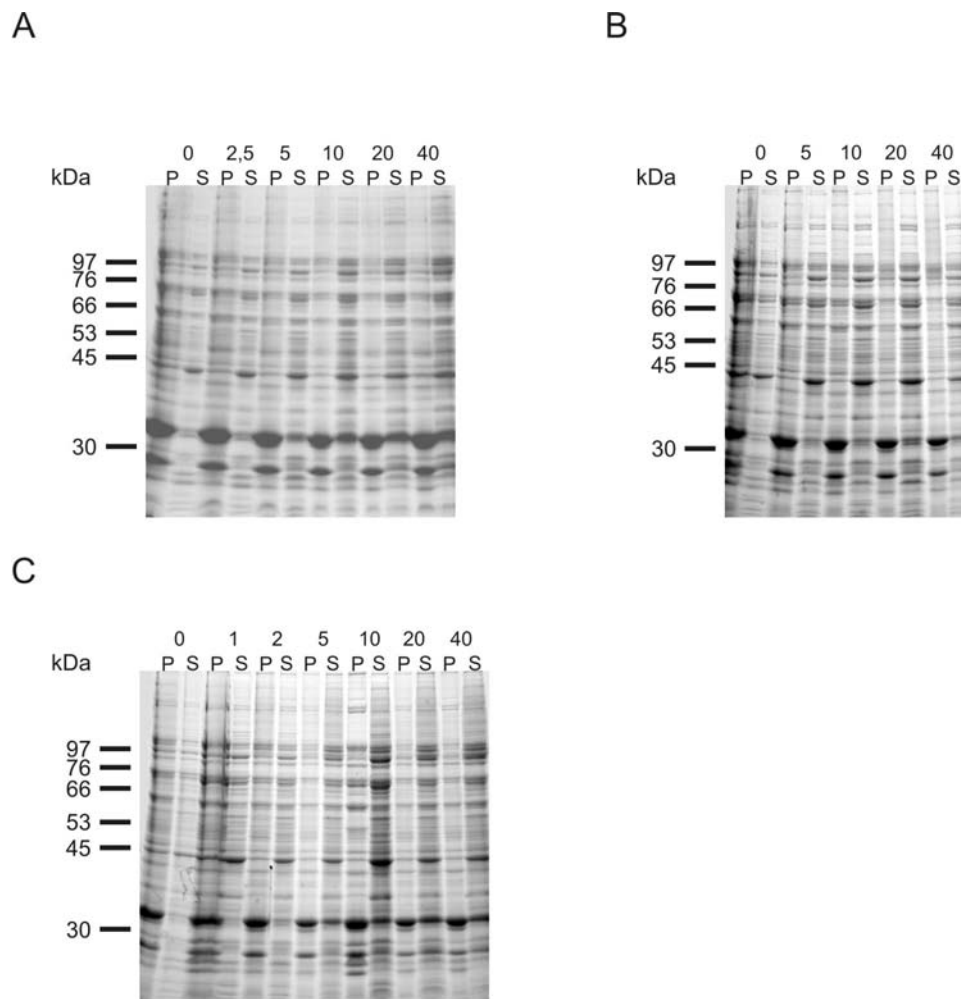


Abb. 3.7: Solubilisierung von MICNG. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Die Bakterienmembranen wurden in verschiedenen Konzentrationen von DM (A), Chaps (B) und DDM (C) solubilisiert. Die verwendete Detergenzkonzentration ist jeweils über den Spuren in mM angegeben. Aufgetragen sind nicht-solubilisierete Proteine (P) und solubilisierete Proteine (S). Es wurden 7,5% des Gesamtvolumens aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

3.1.6 Reinigung von MICNG

Durch die Verwendung des pET 11a-Vektors wurden an den C-Terminus des Kanalproteins sechs Histidinreste (His-Tag) angefügt. Das His-Tag ermöglicht eine affinitätschromatographische Reinigung des Proteins über eine Co^{2+} -beladene Histrapsäule.

Die Proteine wurden wie unter 2.7.3.3 beschrieben in BL21-Zellen exprimiert und über eine Histrapsäule gereinigt. Die Homogenität der Probe wurde anschließend durch Gelfiltration

überprüft. Um die Reinigung zu dokumentieren wurden nach jedem Reinigungsschritt Proben entnommen.

Die Histrapreinigung erfolgte an einem automatisierten Pumpensystem (Äkta; Amersham Biosciences). Die Elution der Proteine, wurde mit einem Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ aufgezeichnet. Abb. 3.8 A zeigt das Chromatogramm der Reinigung. Auf der Ordinate ist die Proteinabsorption in mAU (*milli absorbance units*) aufgetragen. Auf der Abszisse ist das Durchflussvolumen in ml angegeben. Der erste breite Peak (0-30 ml) zeigt den Durchfluss. Hier findet man Proteine, die nicht an die Säule binden. Im nachfolgenden Schritt wurde solange Waschpuffer über die Säule gegeben, bis alle Proteine, die nicht spezifisch an die Säule gebunden hatten, von der Säule gewaschen wurden (Abb. 3.8 A, oben „Waschschritt“). Mit einem Imidazolgradienten (5-500 mM) wurden die Proteine von der Säule gelöst, die spezifisch an die Säule gebunden hatten. Das Chromatogramm zeigt zwei Elutionspeaks. Die Proteine des ersten Peaks eluierten bei ca. 130 mM Imidazol, die Proteine des zweiten Peaks bei ca. 265 mM Imidazol. Während der gesamten Elution wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt.

Um die eluierten Proteine zu identifizieren, wurden sie durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Alternativ wurden sie auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis von MICNG erfolgte mit einem His-Tag-Antikörper im Western-Blot. Abb. 3.8 B zeigt die Elution des Kanalproteins als Coomassie-Blau-Färbung. Abb. 3.8 C zeigt den entsprechenden Nachweis mit einem His-Tag-Antikörper. In Spur 1 sind alle Proteine des Bakterienlysats vor der Reinigung aufgetragen. Die Coomassie-Blau-Färbung lässt keine deutliche Bande des Kanalproteins erkennen, während der His-Tag-Antikörper eine Bande bei ca. 32 kDa markiert. In Spur 2 ist der Durchlauf aufgetragen. Hier sind die Proteine zu sehen, die nicht an die Histrapsäule gebunden haben. Der Waschschritt ist in den Spuren 3, 4 und 5 aufgetragen. In den Spuren 6-14 sind die Elutionsfraktionen aufgetragen. Die Spuren 6-8 entsprechen dem ersten Elutionspeak, die Spuren 9-14 dem zweiten Elutionspeak (siehe Abb. 3.8 A). Sowohl die Coomassie-Blau-Färbung als auch der Antikörpernachweis zeigen, dass sich das Kanalprotein MICNG hauptsächlich in dem zweiten Elutionspeak befindet. Zusätzlich beobachtete ich in den Fraktionen 8-14 einige Proteine mit größeren apparenten Molekulargewichten.

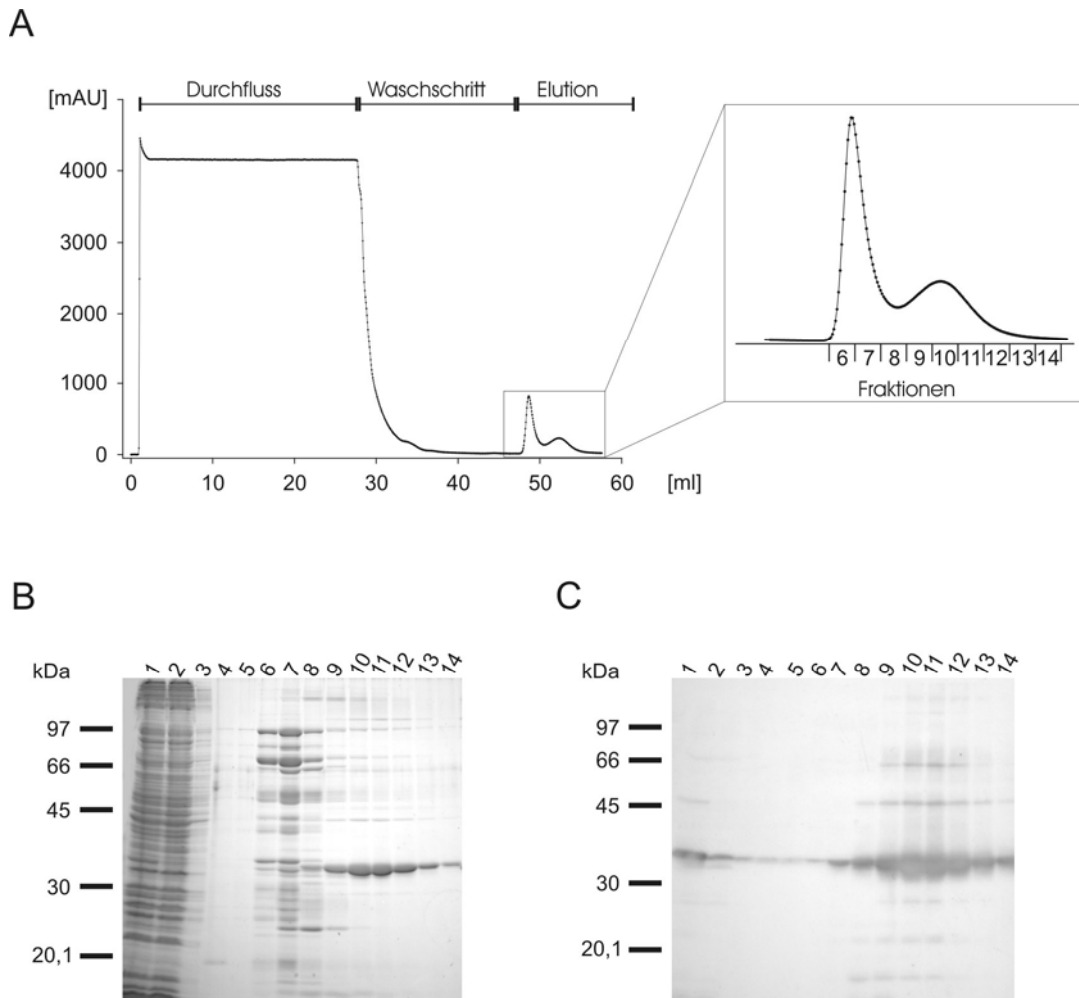


Abb. 3.8: Reinigung des MICNG-Proteins. (A) Reinigungschromatogramm: Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU; Abszisse: Durchlaufvolumen in ml. **(B)/(C)** Die Proteine wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. **(B)** Coomassie-Blau-Färbung **(C)** Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit einem His-Tag-Antikörper (Verdünnung 1:1000) im Western-Blot nachgewiesen. Spur 1: Solubilisat vor der Reinigung (0,03% des Gesamtvolumens); Spur 2: Säulendurchfluss (0,03%); Spur 3-5: Waschschriffe (0,05%); Spur 6-18: Eluat (0,9%). Für den Western-Blot wurde nur die Hälfte des Probenvolumens aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

Die Fraktionen des zweiten Elutionspeaks wurden vereint und über eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200 prep grade, High Load 16/60) gegeben. In Abb. 3.9 A ist das Elutionsdiagramm der Gelfiltration gezeigt. Auf der Ordinate ist die Proteinabsorption bei $\lambda = 280$ nm in mAU dargestellt. Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen in ml angegeben. Der erste Peak (48,3 ml) entspricht dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule. Hier eluieren Proteine, die aufgrund ihrer Größe das Trennvermögen der Gelfiltrationssäule überschreiten, unter anderem auch Proteinaggregate. Die Proteine des Hauptpeaks eluieren

bei 63,3 ml. Bei 81,5 ml wurde ein dritter Proteinpeak beobachtet. Die Proteine des Hauptpeaks sind wahrscheinlich tetramere Komplexe des Kanalproteins, die des dritten Peaks dimere Komplexe. Um die Proteine der einzelnen Peaks zu identifizieren, wurden während der Gelfiltration Proben genommen. Die Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht (Abb. 3.9 B). In Spur 1 ist der Säulenauftrag zu sehen. In den Spuren 2 und 3 sind Proteine des ersten Peaks, in den Spuren 4-11 Proteine des zweiten Peaks und in den Spuren 12-15 Proteine des dritten Peaks aufgetragen. In den Proben des ersten und des zweiten Peaks wird eine Bande bei ca. 32 kDa angefärbt. Die Fraktionen des zweiten Peaks wurden vereint und für weiterfolgende Experimente verwendet. Die Ausbeute betrug 2-3 mg an gereinigtem MICNG-Protein pro Liter Bakterienkultur.

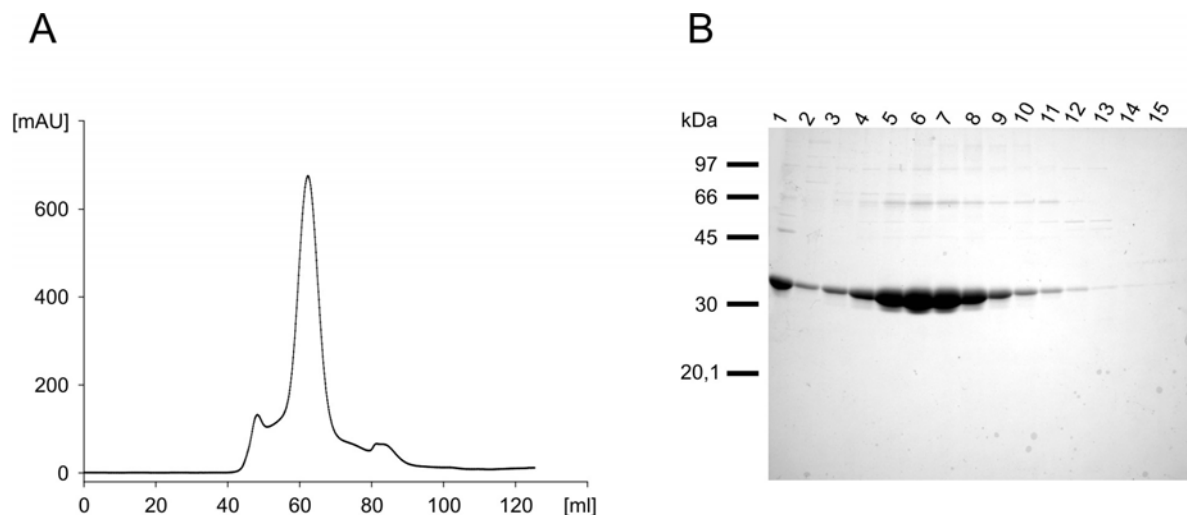


Abb. 3.9: Größenausschlusschromatographie. (A) Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 200 prep grade, High Load 16/60). Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU. Abszisse: Elutionsvolumen in ml. **(B)** Die Proteine wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Spur 1: Säulenauftrag; Spur 2 und 3: Fraktionen des ersten Peaks; Spur 4-11: Fraktionen des zweiten Peaks; Spur 12-15: Fraktionen des dritten Peaks. Es wurden 0,5% des Gesamtvolumens aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

3.1.8 Kovalente Quervernetzung der Untereinheiten des MICNG-Kanalproteins

Die oligomere Struktur des gereinigten Kanalproteins wurde durch chemische Quervernetzung („*cross-linking*“) seiner Untereinheiten (2.14.2) und anschließende Western-Blot-Analyse bestimmt. Für die Vernetzung des gereinigten Kanalkomplexes wurde das homobifunktionelle Reagenz Bis(sulfosuccinimidyl)-suberat (BS³) verwendet, das mit freien Aminogruppen eines Polypeptids reagiert. Dabei werden nur direkt benachbarte Polypeptidketten eines Proteinkomplexes kovalent miteinander verknüpft. Der Verlauf der Vernetzungsreaktion wurde verfolgt, indem die Reaktionen zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und die entstandenen Vernetzungsprodukte untersucht wurden. Die Vernetzungsprodukte wurden durch SDS-PAGE in einem 5-12,5%igen Polyacrylamidgradientengel aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit einem His-Tag-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. Um das Molekulargewicht der Vernetzungsprodukte quantitativ auswerten zu können, wurden in der SDS-PAGE zusätzlich verschiedene Markerproteine bekannter Größe verwendet. Die graphische Auftragung des Molekulargewichtes der Markerproteine gegen ihre relative Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel zeigte eine logarithmische Abhängigkeit. Damit stand für die Molekulargewichtsbestimmung der Vernetzungsprodukte ein Bereich von 30-220 kDa zur Verfügung. Abb. 3.10 zeigt die Western-Blot-Analyse mit dem His-Tag-Antikörper. Neben dem nichtvernetzten Monomer (32 kDa) markierte der Antikörper weitere Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von 65 kDa, 105 kDa und 144 kDa (Abb. 3.11, Pfeile). Die Tatsache, dass drei zusätzliche Proteinbanden zeitabhängig entstehen, lässt vermuten, dass das MICNG-Protein ein Tetramer ist. Zusätzlich kann man die apparenten Molekulargewichte dieser Proteinbanden mit den Vielfachen des Molekulargewichtes des Monomers vergleichen. Die erwarteten Molekulargewichte von Dimer, Trimer und Tetramer sind 77,2 kDa, 115,8 kDa und 154,4 kDa. Die Unterschiede zwischen den apparenten und den erwarteten Molekulargewichten sind nicht groß. Sie können zum einen durch ein anomales Laufverhalten in der Gelelektrophorese zustande kommen, wie es schon beim Monomer beobachtet wurde. Zum anderen können intramolekulare Quervernetzungen das Laufverhalten eines Proteins verändern. Ich schließe aus diesem Versuch, dass der MICNG-Kanal aus vier Untereinheiten besteht.

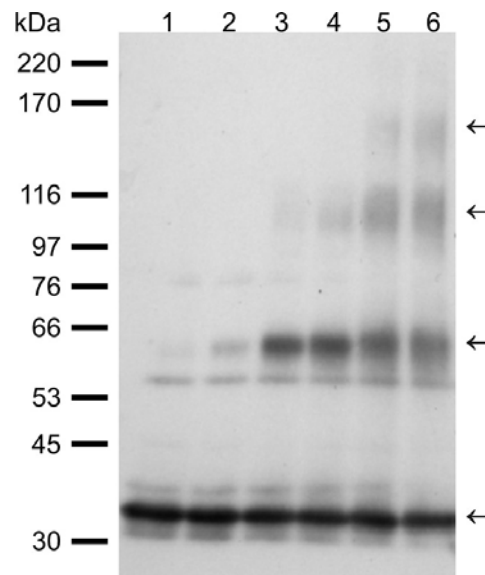


Abb. 3.10: Western-Blot-Analyse mit vernetzten und nichtvernetzten MICNG-Kanaluntereinheiten. Die Vernetzungsreaktion erfolgte mit 1 mM des amingruppenvernetzenden Reagenz BS³. Das vernetzte Kanalprotein wurde über ein 5-12,5%iges SDS-Polyacrylamidgradientengel elektrophoretisch getrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem His-Tag-Antikörper (Spuren 1-6; Verdünnung 1:1000). Es sind Proben (666 ng Protein) der Vernetzungsreaktion zur Zeit 0 min (Spur 1; Kontrolle ohne BS³), 1 min (Spur 2), 5 min (Spur 3), 10 min (Spur 4), 30 min (Spur 5) und 60 min (Spur 6) aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

3.1.9 Proteinkristallisation

Die biochemischen Untersuchungen an dem MICNG-Kanalprotein wurden erfolgreich abgeschlossen. Es konnten die optimalen Bedingungen für die Expression des Proteins in *E. coli* gefunden werden. Die Proteinausbeuten betrugen im Schüttelkolben 2-3 mg/l Bakterienkultur. In der Fermentation konnten weitaus höhere Proteinausbeuten (78 mg/l Bakterienkultur) erzielt werden. Durch affinitätschromatographische Reinigung und anschließende Größenausschlusschromatographie konnte eine homogene Proteinprobe für die Kristallisation erhalten werden. Erste Kristallisationsansätze mit gereinigtem MICNG-Protein wurden von Abhishek Cukkemane durchgeführt. Für die Ansätze wurden sowohl die „*hanging drop*“- als auch die „*sitting drop*“-Methode verwendet.

3.1.10 Herstellung und Test monoklonaler Antikörper

Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer vom Institut für molekulare Immunologie (GSF München). Als Antigen wurde das Kanalprotein MICNG (3.1.6) verwendet. Die Immunisierung der Ratten und die Herstellung der Hybridome erfolgte wie unter 2.16.4 beschrieben. Die Kulturüberstände der daraus resultierenden primären Hybridome (im weiteren als Primärkulturüberstände bezeichnet) enthalten Antikörper, die im Western-Blot auf ihre Spezifität getestet wurden. Die Tests erfolgten mit gereinigtem MICNG-Protein aus BL21-Zellen. Abb. 3.11 zeigt beispielhaft einen Spezifitätstest von Primärkulturüberständen gegen MICNG. Es wurden die Überstände NMP-6H5 (Spur 1), NMP-7F5 (Spur 2), NMP-8C12 (Spur 3) und NMP-5E2 (Spur 4) verwendet. Die Antikörper markieren eine Hauptbande bei ca. 32 kDa, die dem gereinigten Kanalprotein entspricht. Desweiteren werden Proteinbanden mit einem höheren apparenten Molekulargewicht markiert. Diese könnten Oligomere des Kanalproteins darstellen. Zusätzlich markieren die Antikörper auch kleinere Proteine. Möglicherweise handelt es sich um Abbauprodukte des MICNG-Monomers. Die vier getesteten Primärkulturüberstände erkennen ein ähnliches Bandenmuster, das allerdings in der Intensität der Banden variiert.

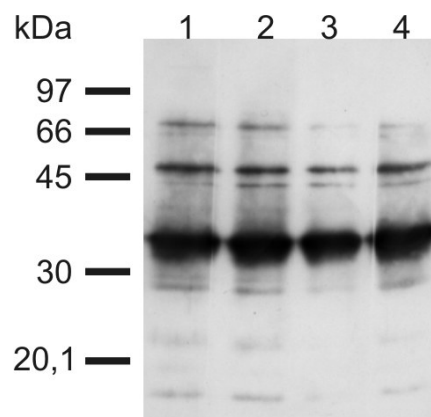


Abb. 3.11: Test von Primärkulturüberständen gegen MICNG. Die Proteine wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit den Primärkulturüberständen NMP-6H5 (Spur 1), NMP-7F5 (Spur 2), NMP-8C12 (Spur 3) und NMP-5E2 (Spur 4). Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Es wurden 0,84 µg des gereinigten MICNG-Proteins aus BL21-Zellen aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

Ich habe also vier Hybridome identifiziert, deren Primärkulturüberstände spezifische Antikörper gegen das MICNG-Kanalprotein enthalten. Durch Reklonierung dieser Hybridome (2.16.4) wurden die Einzelklone gewonnen, deren Überstände die eigentlichen monoklonalen Antikörper enthalten. Zur Vereinfachung werden die Überstände dieser Reinkulturen im weiteren Verlauf als monoklonale Antikörper bezeichnet. Insgesamt wurden vier monoklonale Antikörper gegen das Kanalprotein MICNG hergestellt. Die weitere Charakterisierung der Antikörper erfolgte im Western-Blot an gereinigtem Protein aus BL21-Zellen sowie an HEK293-Membranpräparationen. Weiterhin wurden immunzytochemische Untersuchungen an HEK293-Zellen durchgeführt.

Zunächst wurde die Sensitivität der vier monoklonalen Antikörper getestet. Es wurden verschiedene Mengen (100 pg-1 µg) Protein meiner Reinigung aus BL21-Zellen durch SDS-PAGE getrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die monoklonalen Antikörper wurden im Western-Blot getestet. Abb. 3.12 zeigt die Western-Blot-Analyse mit den monoklonalen Antikörpern 8C12-1-1 (A), 5E2-11 (B), 7F5-1-1 (C) und 6H5-1-1 (D). Alle vier Antikörper markieren die gleichen Proteinbanden. Desweiteren weisen sie eine ähnliche Sensitivität auf. Alle Antikörper erkennen die 100 pg-Probe.

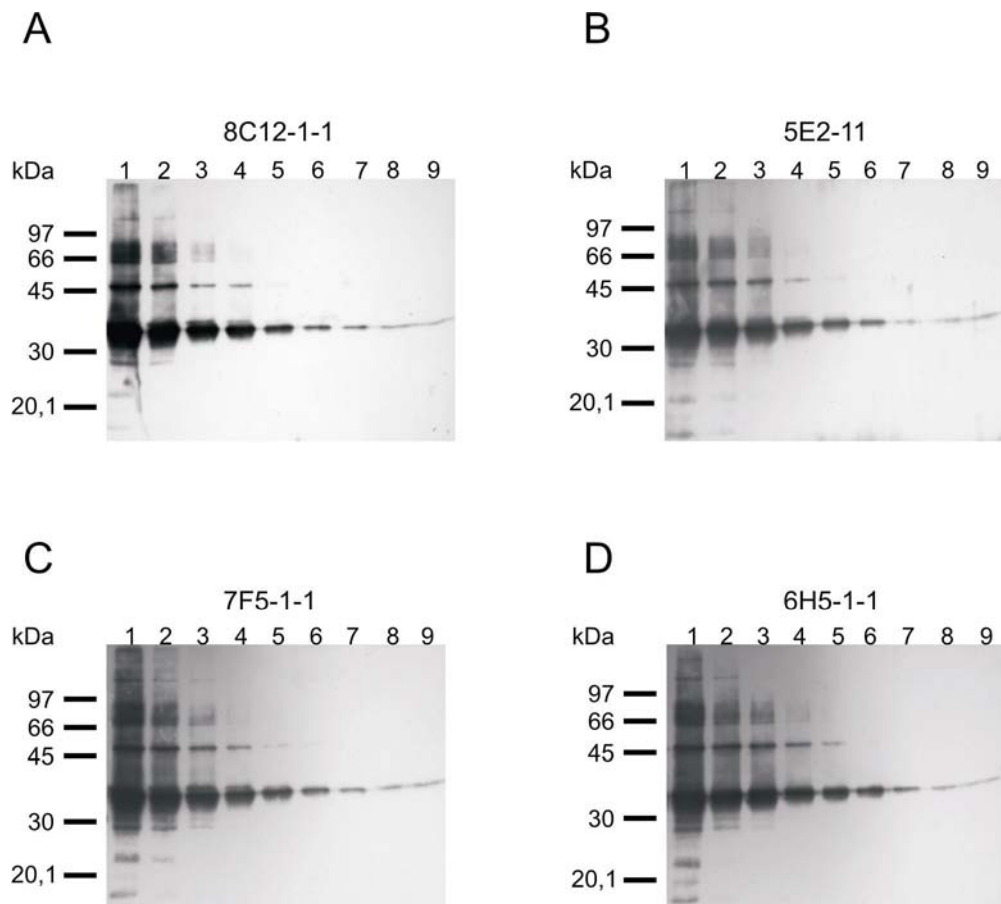


Abb. 3.12: Sensitivität der monoklonalen Antikörper gegen MICNG. Die Proteine wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern 8C12-1-1 (**A**), 5E2-11 (**B**), 7F5-1-1 (**C**) und 6H5-1-1 (**D**). Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. In den Spuren 1-9 wurden verschiedene Mengen des gereinigten MICNG-Proteins aus BL21-Zellen aufgetragen: 1 µg (Spur 1), 300 ng (Spur 2), 100 ng (Spur 3), 30 ng (Spur 4), 10 ng (Spur 5), 3 ng (Spur 6), 1 ng (Spur 7), 300 pg (Spur 8) und 100 pg (Spur 9). Der Größenstandard ist jeweils links in kDa angegeben.

Als nächstes wurden die monoklonalen Antikörper an Membranpräparationen von HEK293-Zellen getestet. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit dem Klon pcA-MlcNMP (3.1.1) transfiziert (2.8.2). Die Membranproteine wurden präpariert (2.9.4), durch SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Der immunologische Nachweis der Membranproteine erfolgte wie unter 2.14.2 beschrieben. Abb. 3.13 zeigt die Western-Blots mit den Antikörpern 8C12-1-1 (**A**), 5E2-11 (**B**), 7F5-1-1 (**C**) und 6H5-1-1 (**D**). In Mock-transfizierten Zellen wurden keine Banden markiert (Spur 1). In HEK293-Zellen, die mit pcA-MlcNMP transfiziert wurden (Spur 2), erkennen die Antikörper eine Bande bei ca. 32

kDa, die dem Kanalprotein entspricht. Zusätzlich werden kleinere Proteine markiert, die Abbauprodukte des Kanalproteins sein könnten.

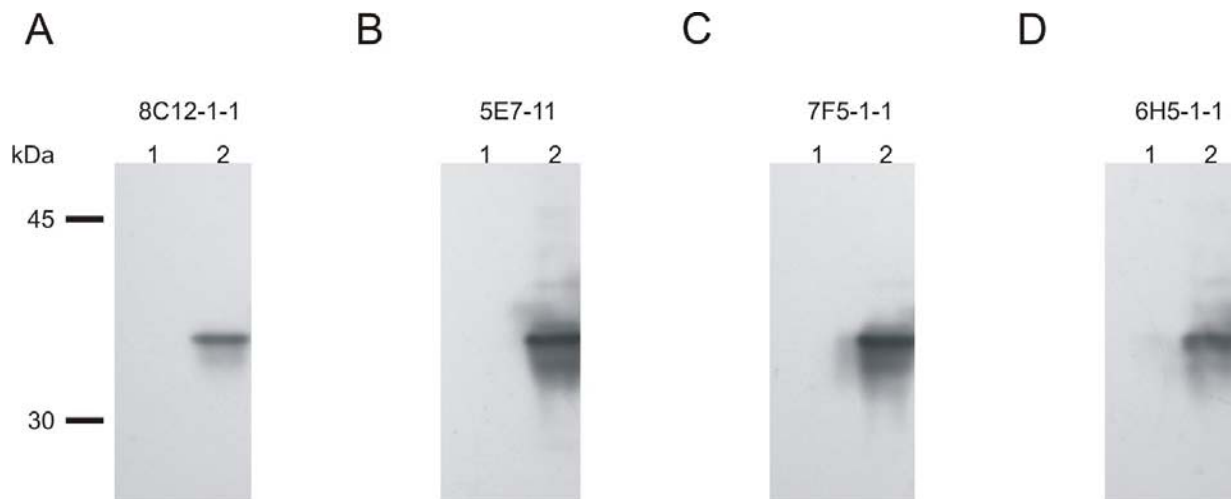


Abb. 3.13: Charakterisierung der monoklonalen Antikörper auf HEK293-Membranpräparationen. Die Membranproteine wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern 8C12-1-1 (A), 5E7-11 (B), 7F5-1-1 (C) und 6H5-1-1 (D). Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Spur 1: Mock-transfizierte Zellen; Spur 2: pcA-MlcNMP-transfizierte Zellen. Es wurden jeweils 3 µg Membranprotein aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

Außerdem wurden immunzytochemische Färbungen an transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. HEK293-Zellen wurden mit dem Klon pcA-MlcNMP transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die heterolog exprimierten Membranproteine immunologisch nachgewiesen (2.16.3.1). Abb. 3.14 zeigt die Färbung mit den monoklonalen Antikörpern 8C12-1-1 (A), 5E2-11 (B), 7F5-1-1 (C) und 6H5-1-1 (D). Mock-transfizierte Zellen (Abb. 3.14 A-D; linkes Bild) weisen keine Färbung auf, während ca. 30% der mit pcA-MlcNMP transfizierten Zellen (Abb. 3.14 A-D; rechtes Bild) stark angefärbt werden.

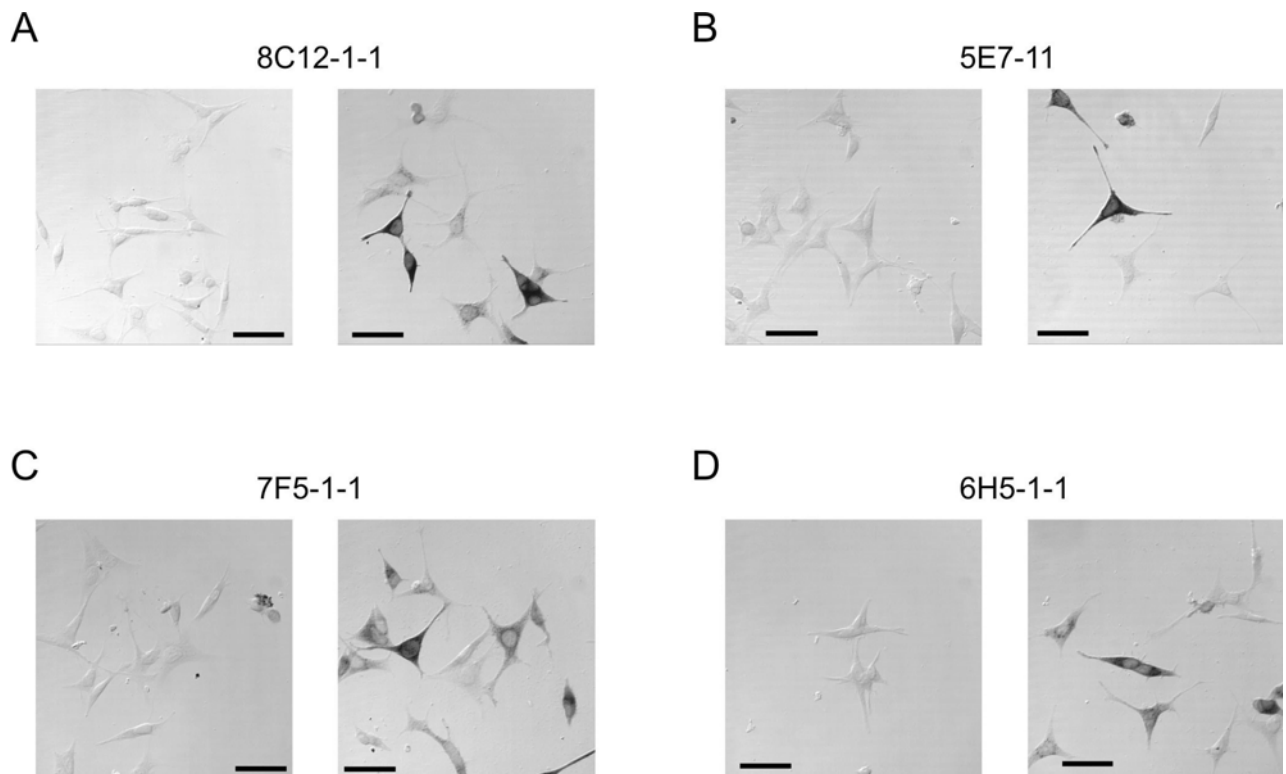


Abb. 3.14: Immunzytochemische Färbungen von HEK293-Zellen: HEK293-Zellen wurden ohne DNA (Mock-Kontrolle; A-D, linkes Bild) bzw. mit pcA-MLcNMP (A-D, rechtes Bild) transfiziert. Die Antikörper 8C12-1-1 (A), 5E7-11 (B), 7F5-1-1 (C) und 6H5-1-1 (D) wurden in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Die Balken entsprechen jeweils 50 μm .

3.1.11 Befindet sich das MLCNG-Kanalprotein in der Membran von HEK293-Zellen?

Die Funktion des Ionenkanals sollte durch elektrophysiologische Untersuchungen überprüft werden. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit dem Konstrukt pcA-MLcNMP transfiziert. Leider ergaben die elektrophysiologischen Messungen keine Hinweise auf eine funktionelle Expression. Deshalb überprüfte ich, ob sich das Kanalprotein überhaupt in der Plasmamembran befindet. Hierzu wurde ein Konstrukt kloniert, bei dem eine Glykosylierungsstelle eingefügt wurde. Die Glykosylierungsstelle befindet sich in dem extrazellulären Bereich vor der Kanalpore. Durch die Glykosylierung soll der Einbau des Kanalproteins in die Membran begünstigt werden. Zusätzlich wurde ein Epitop des *Influenza hemagglutinin*-Proteins (HA-Tag) vor der Glykosylierungsstelle eingefügt. Da dieser Bereich des Kanalproteins extrazellulär liegt, kann man untersuchen, ob sich das Kanalprotein in der Plasmamembran befindet oder nicht.

3.1.11.1 Klonierung von pcAMlcNMP-HA/Gly

Es wurde ein Konstrukt kloniert, bei dem ein HA-Tag und eine Glykosylierungsstelle vor der Kanalpore eingefügt wurden. Die Herstellung des Konstruktes ist in Abb. 3.15 dargestellt.

Über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Genbereich, der für das Kanalprotein kodiert, in drei Schritten kloniert. Hierbei diente der Klon pcA-MlcNMP als Matrize, der das komplette Gen für das MICNG-Kanalprotein enthält. Dieser Klon wurde mir von Dr. W. Bönigk zur Verfügung gestellt. Der 5'-Bereich des Gens wurde mit den Primern # 3658 und # 3324 (siehe Anhang) amplifiziert. Der 3'-Bereich des Gens wurde mit den Primern # 3659 und # 3323 (siehe Anhang) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch isoliert und als Matrize für eine rekombinante PCR verwendet. Die rekombinante PCR wurde mit den Primern # 3324 und # 3323 durchgeführt. Der 5'-Primer # 3324 fügt eine BamHI-Restriktionsschnittstelle und der 3'-Primer # 3323 eine XbaI-Restriktionsschnittstelle ein. Die in der PCR verwendeten Primer wurden so gewählt, dass das MICNG-Gen über die eingefügten Restriktionsschnittstellen in den entsprechenden Vektor kloniert werden konnte. Das PCR-Fragment der erwarteten Größe (~1130 Bp) wurde gelelektrophoretisch isoliert und anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geschnitten. Das geschnittene MICNG-Fragment wurde in den BamHI/XbaI-geschnittenen Vektor pcDNA I Amp ligiert. Die Insertion in den Vektor wurde mit Kontrollrestriktionen überprüft. Um mögliche PCR-bedingte Mutationen auszuschließen, wurde das Konstrukt pcAMlcNMP-HA/Gly zur Kontrolle mit den Primern # 9002 und # 9006 (siehe Anhang) sequenziert.

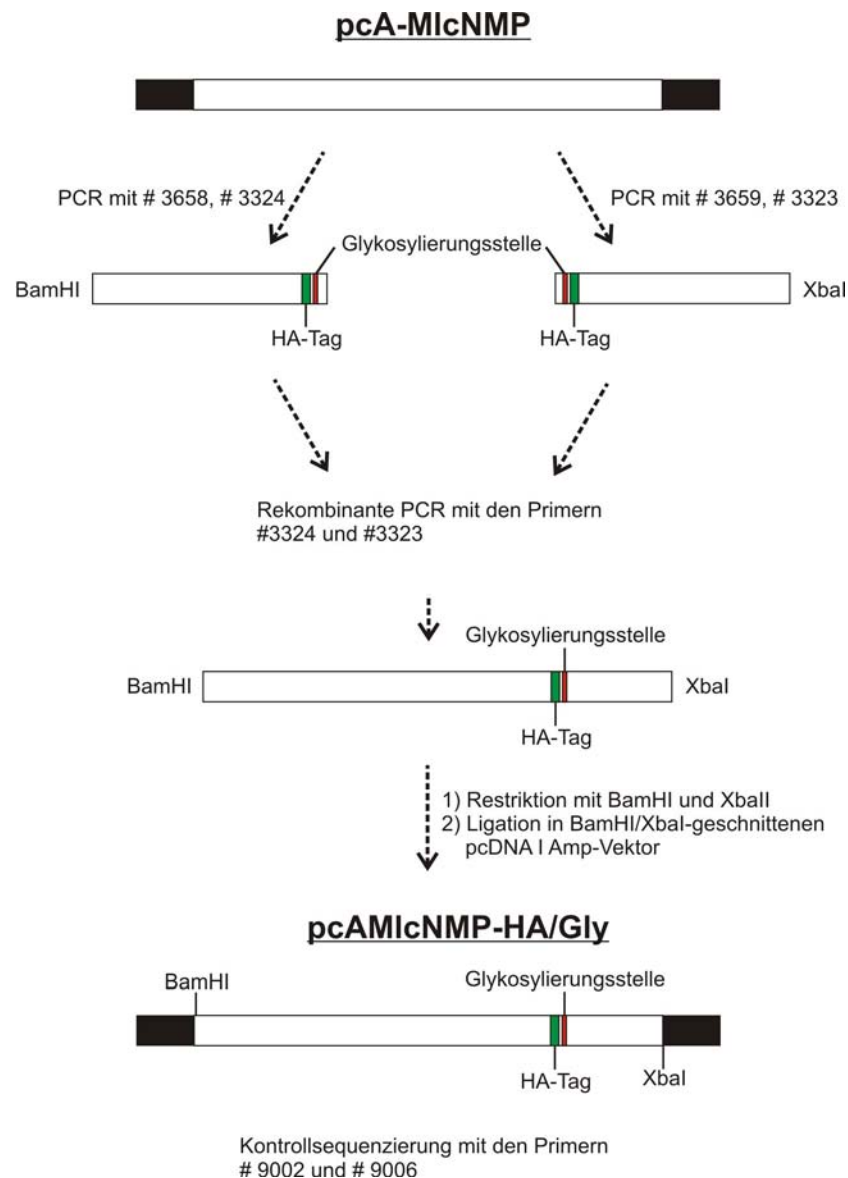


Abb. 3.15: Herstellung des Konstruktes pcAMlcNMP-HA/Gly. Gensequenzen sind als weiße Rechtecke, Plasmidabschnitte als schwarze Rechtecke dargestellt. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind eingetragen. Einzelheiten zur Klonierung sind dem Text zu entnehmen.

3.1.11.2 Nachweis im Western-Blot an HEK293-Membranen

Die Expression des MlcNMP-HA/Gly-Proteins wurde an Membranpräparationen von HEK293-Zellen im Western-Blot untersucht. HEK293-Zellen wurden mit dem Klon pcAMlcNMP-HA/Gly transfiziert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit dem Konstrukt pcA-MlcNMP transfiziert. Die Membranproteine wurden präpariert, durch SDS-PAGE getrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis

erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 8C12-1-1. Abb. 3.16 A zeigt den Western-Blot. In Mock-transfizierten Zellen wurde keine Bande markiert (Spur 1). Bei HEK293-Zellen, die mit dem Konstrukt pcA-MlcNMP transfiziert wurden, markiert der Antikörper eine Bande bei ca. 32 kDa (Spur 2). In Spur 3 wurden Zellen aufgetragen, die mit dem Konstrukt pcAMlcNMP-HA/Gly transfiziert wurden. Der Antikörper markiert hier eine Bande bei ca. 39 kDa. Der Größenunterschied zwischen dieser Bande und der Bande der Positivkontrolle (Spur 2) deutet auf eine Glykosylierung hin. Um zu überprüfen, ob das markierte Protein in Spur 3 tatsächlich glykosyliert ist, wurden die Proben vor der SDS-PAGE mit PNGase F behandelt. Als Kontrolle wurden Membranpräparationen ohne Enzym inkubiert. Abb. 3.16 B zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Bei der deglykosylierten Probe (Spur 1) erkennt der Antikörper eine Bande bei ca. 32 kDa. Bei der Kontrolle (ohne PNGase F) wird eine Bande bei ca. 39 kDa markiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Kanalprotein mit der eingefügten Glykosylierungsstelle tatsächlich glykosyliert wird.

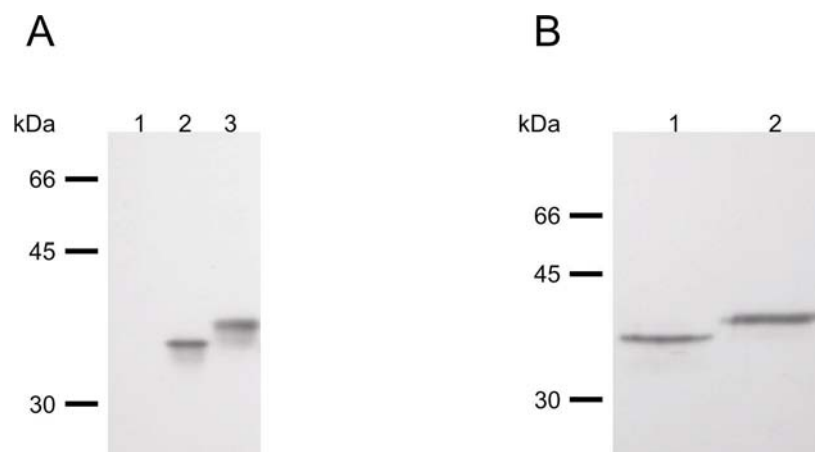


Abb. 3.16: Western-Blot an HEK293-Membranpräparationen. Die Membranproteine wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 8C12-1-1 (Verdünnung 1:10). **(A)** Spur 1: Mock-transfizierte Zellen; Spur 2: pcA-MlcNMP-transfizierte Zellen; Spur 3: pcAMlcNMP-HA/Gly-transfizierte Zellen. **(B)** Deglykosylierung von pcAMlcNMP-HA/Gly-transfizierten Zellen. Spur 1: deglykosylierte Probe; Spur 2: Kontrolle ohne PNGase F. Es wurden jeweils 3 µg Membranprotein aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

3.1.12.3 Immunzytochemie an HEK293-Zellen

Um zu überprüfen, ob sich das glykosylierte MICNG-Kanalprotein auch in der Membran von HEK293-Zellen befindet, wurden immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. HEK293-Zellen wurden mit dem Klon pcAMlcNMP-HA/Gly transfiziert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Erstantikörper gegen das HA-Tag und anschließend mit dem Zweitantikörper *goat-anti-rat-Alexa488*. Der an den Zweitantikörper gekoppelte Alexa488-Farbstoff diente zum Nachweis. Der Farbstoff wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm angeregt. Die Fluoreszenz wurde durch einen Bandpaßfilter bei $\lambda = 504-542$ nm beobachtet. Abb. 3.17 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Um nur die Proteine zu markieren, die sich in der Plasmamembran befinden, wurde die Markierung mit dem Erstantikörper durchgeführt bevor die Zellen fixiert wurden. Antikörper sind nur schlecht membrangängig, daher sollten nur die extrazellulär gelegenen HA-Epitope vom Antikörper erkannt werden. Nach der Erstantikörperinkubation wurden die Zellen dann permeabilisiert und fixiert. Dann folgte die Markierung mit dem Zweitantikörper. Abb. 3.17 A zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Keine der so behandelten Zellen zeigten eine Färbung, die über dem Hintergrund lag. Um nachzuweisen, dass das Epitop auch vom Antikörper erkannt wird, wurden die Zellen in einem weiteren Versuch vor der Erstantikörperinkubation permeabilisiert. Nun kann der Erstantikörper in die Zelle eindringen und intrazellulär gelegene Kanalproteine markieren. Abb. 3.17 B zeigt dieses Ergebnis. Ca. 30% der Zellen zeigten eine deutliche Färbung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich das Kanalprotein im Zellinneren und nicht in der Membran befindet.

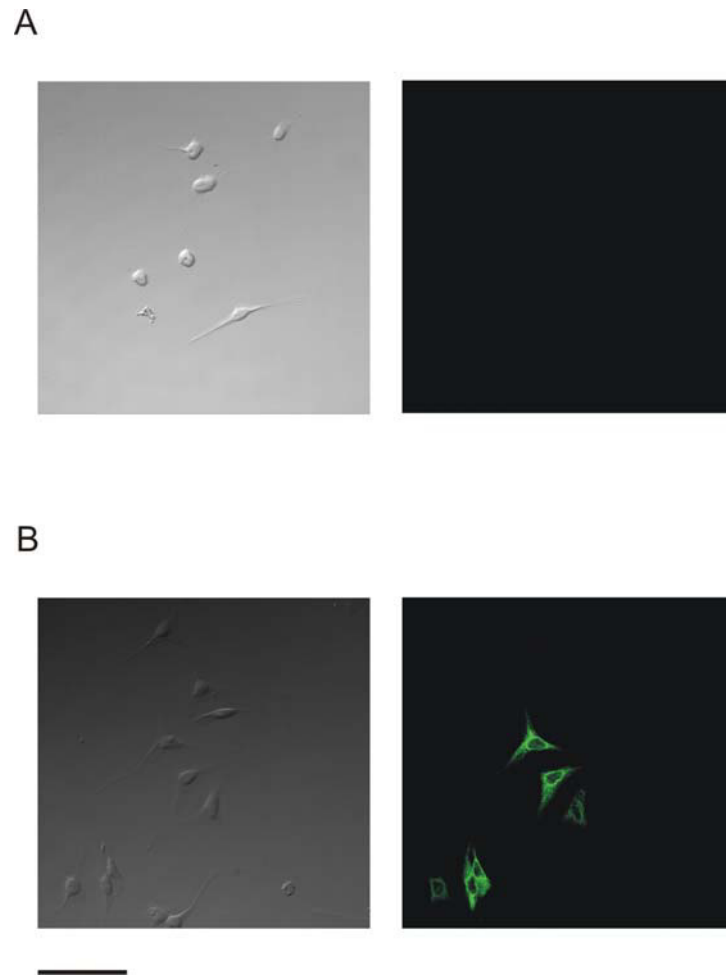


Abb. 3.17: Immunzytochemischer Nachweis von MICNG-HA/Gly in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit pcAMlcNMP-HA/Gly transfiziert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern α -HA (Verdünnung 1:100) und *goat-anti-rat-Alexa488* (Verdünnung 1:500). **(A)** Erstantikörperinkubation an nichtpermeabilisierten Zellen; links: Durchlichtaufnahme; rechts: Fluoreszenzaufnahme. **(B)** Erstantikörperinkubation an permeabilisierten Zellen; links: Durchlichtaufnahme; rechts: Fluoreszenzaufnahme. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda = 488$ nm angeregt und bei $\lambda = 504$ - 542 nm registriert. Der Balken entspricht 50 μm .

3.2 MICNBD

Die Bindestelle für zyklische Nukleotide ist vermutlich ein Schlüsselement für die Funktion des MICNG-Proteins. Durch röntgenkristallographische Untersuchungen ist die dreidimensionale Struktur dieses Proteinabschnitts aufgeklärt worden. Interessanterweise hatte diese Bindestelle immer cAMP gebunden. So ist auch die 3D-Struktur des ligandengebundenen Zustands. Wir wollten die Eigenschaften der zyklisch Nukleotid-Bindestelle in Abwesenheit des transmembranalen Anteils von MICNG untersuchen.

3.2.1 Klonierungsstrategie des Fusionsproteins GST-MICNBD

Ich habe ein Konstrukt kloniert, dem die gesamte kodierende Sequenz für den N-Terminus sowie für den Transmembrananteil fehlt. Das Genprodukt enthält die Aminosäuren 215-355 des MICNG-Proteins, das ist der C-Terminus, der auch die Bindestelle für zyklische Nukleotide umfasst. Ich werde dieses Konstrukt im folgenden auch als CNBD (*cyclic nucleotide-binding domain*) bezeichnen. Die Bindestelle wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert, d. h. am 5'-Ende der DNA wurde die Sequenz für die Glutathion-S-Transferase angefügt. Durch die Verwendung des Expressionsvektors pGEX-2T befindet sich zwischen dem GST-Tag und der Bindestelle eine Schnittstelle für die Proteinendonuklease Thrombin. Die Herstellung des Konstruktes ist in Abb. 3.18 dargestellt.

Zunächst wurde über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) der Genbereich kloniert, der für die Bindestelle kodiert. Hierbei diente der Klon pcA-MICNG als Matrize, der das komplette Gen für das MICNG-Kanalprotein enthält. Dieser Klon wurde mir von Dr. W. Bönigk zur Verfügung gestellt. Die PCR wurde mit den Primern # 3989 und # 3990 (siehe Anhang) durchgeführt. Der 5'-Primer # 3989 fügt eine BamHI-Restriktionsschnittstelle und der 3'-Primer # 3990 eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle ein. Die in der PCR verwendeten Primer wurden so gewählt, dass das MICNBD-Gen über die eingefügten Restriktionsschnittstellen in den entsprechenden Vektor kloniert werden konnte. Das PCR-Fragment der erwarteten Größe (~429 Bp) wurde gelelektrophoretisch isoliert und anschließend mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnitten. Das geschnittene MICNBD-Fragment wurde in den EcoRI/BamHI-geschnittenen Vektor pBluescript SK⁻ (pBMICNBD) ligiert und zur Kontrolle mit den Primern # 9001 und # 9002 (siehe Anhang) sequenziert, um mögliche PCR-bedingte Mutationen auszuschließen. Mit dem mutationsfreien Klon pBMICNBD-7 wurde weitergearbeitet. Das CNBD-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und

BamHI aus pBMICNBD-7 herausgeschnitten, über ein präparatives Agarosegel isoliert und anschließend in den EcoRI/BamHI-geschnittenen Vektor pGEX-2T kloniert. Die Insertion in den Vektor wurde anhand von Kontrollrestriktionen überprüft.

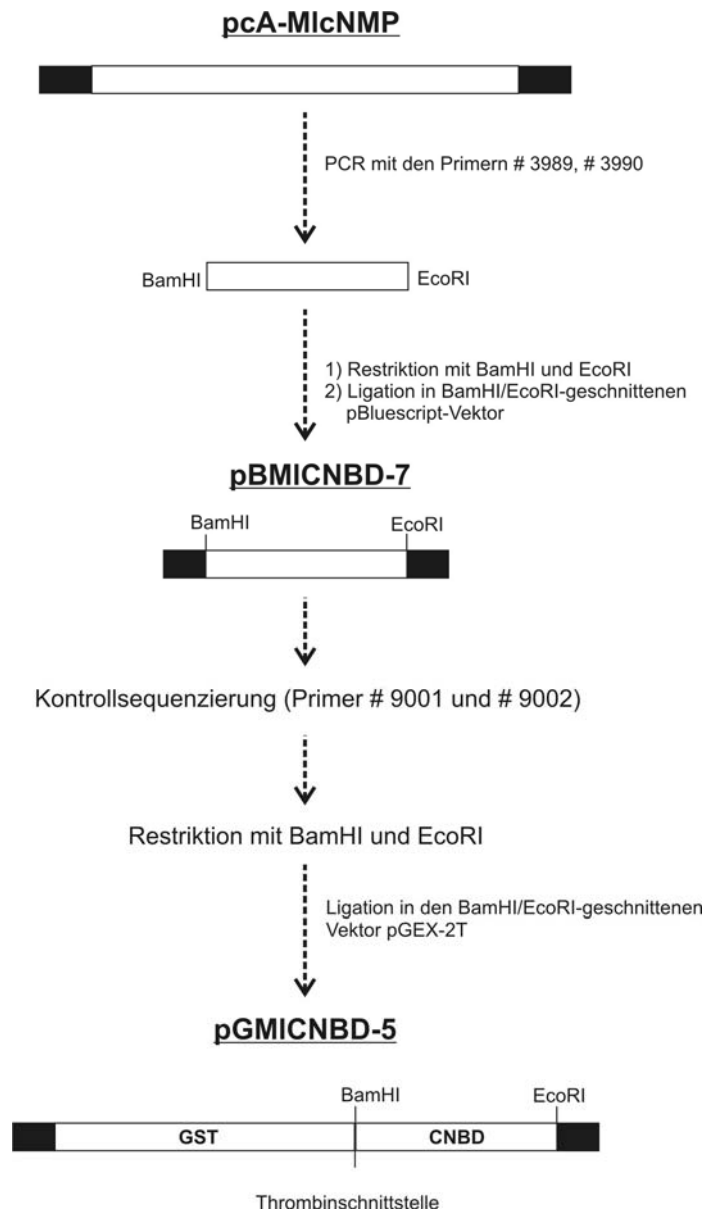


Abb. 3.18: Herstellung des Konstruktes pGMICNBD-5. Gensequenzen sind als weiße Rechtecke, Plasmidabschnitte als schwarze Rechtecke dargestellt. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind eingetragen. Einzelheiten zur Klonierung sind dem Text zu entnehmen.

3.2.2 Expression und Reinigung von MICNBD

Durch die Verwendung des pGEX-2T-Vektors wurde an den N-Terminus des Proteins die Glutathion-S-Transferase (GST-Tag) angefügt. Das GST-Tag ermöglicht die Reinigung der Proteine über eine GST-Sepharose 4B-Säule (2.9.2).

Das Protein wurde wie unter 2.7.3.3 beschrieben in BL21-Zellen exprimiert. Um die Expression zu überprüfen wurden die Zellen einer induzierten und einer nicht-induzierten Kultur aufgeschlossen. Lösliche und unlösliche Proteine wurden getrennt und durch SDS-PAGE analysiert. Die Proteine wurden anschließend mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht (Abb. 3.19 A) bzw. auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem GST-Antikörper im Western-Blot (Abb. 3.19 B). Spur 1 zeigt die unlöslichen Proteine und Spur 2 die löslichen Proteine der nicht-induzierten Expressionskultur. In Spur 3 befinden sich die unlöslichen und in Spur 4 und 5 die löslichen Proteine der induzierten Kultur. Das überexprimierte Fusionsprotein ist in Spur 4 deutlich als Bande mit einer Größe von ca. 41 kDa zu erkennen. Die Größe der Bande stimmt mit dem errechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins gut überein, das sich aus dem Molekulargewicht des Proteins (14,8 kDa) und dem des angefügten GST-Tags (26 kDa) zusammensetzt. Ein geringer Anteil des Fusionsproteins befindet sich auch in der unlöslichen Fraktion (Spur 3). Dies kann daran liegen, dass die Zellen nicht vollständig aufgeschlossen wurden oder sich ein Teil des Proteins in sogenannten „*inclusion bodies*“ befand. Der GST-Antikörper markiert eine Bande bei ca. 41 kDa (Spur 5), die dem Fusionsprotein entspricht. Desweiteren werden Proteinbanden mit kleineren apparenten Molekulargewichten erkannt. Hierbei könnte es sich um die Glutathion-S-Transferase oder um Abbauprodukte handeln.

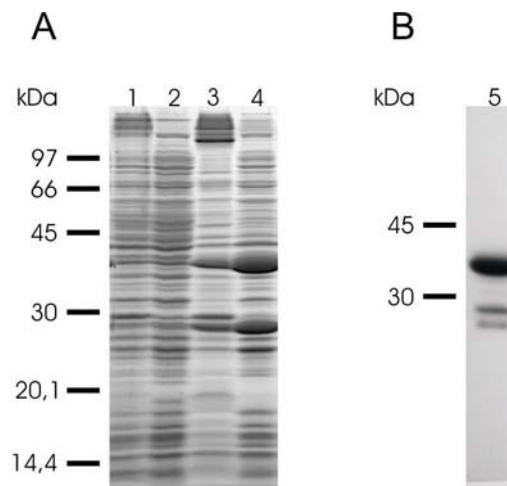


Abb. 3.19: Expression von GST-MICNBD in BL21-Zellen. Die Proteine wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. (A) Coomassie-Blau-Färbung. Spur 1: Unlösliche Proteine einer nicht-induzierten Expressionskultur; Spur 2: Lösliche Proteine einer nicht-induzierten Expressionskultur; Spur 3: Unlösliche Proteine einer induzierten Expressionskultur; Spur 4: Lösliche Proteine einer induzierten Expressionskultur. (B) Western-Blot. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem GST-Antikörper (Verdünnung 1:10). Spur 5: Lösliche Proteine einer induzierten Expressionskultur. Es wurden 3% des Gesamtvolumens aufgetragen. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

Die Reinigung erfolgte anschließend über eine GST-Sepharose 4B-Säule. Um den Verlauf der Reinigung zu dokumentieren, wurde nach jedem Reinigungsschritt eine Probe entnommen. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Der Verlauf der Reinigung des Proteins ist in Abb. 3.20 A dargestellt. In Spur 1 sind alle zytosolischen Proteine des Bakterienlysates vor der Reinigung aufgetragen. Man erkennt unter anderem eine Bande bei ca. 41 kDa, die im Durchfluss an Intensität abnimmt. In Spur 2 ist der Durchfluss aufgetragen. Hier sind die Proteine zu sehen, die nicht an die Säule gebunden haben. Der Waschschritt ist in Spur 3 aufgetragen. Das gebundene Protein wurde anschließend durch eine Thrombininkubation von dem Säulenmaterial gelöst. Das Eluat ist in Spur 4 aufgetragen. In dieser Spur ist eine Bande bei ca. 15 kDa zu erkennen. Das apparente Molekulargewicht stimmt mit dem errechneten Molekulargewicht des Proteins überein.

Die Homogenität der Probe wurde durch Gelfiltration bestimmt. In Abb. 3.20 B ist das Elutionsdiagramm der Gelfiltration gezeigt. Auf der Ordinate ist die Proteinabsorption bei $\lambda = 280$ nm in mAU dargestellt. Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen in ml angegeben. Es ist ein Hauptpeak bei 76,7 ml zu erkennen. Die Gelfiltrationssäule (Superdex 75 prep grade, High Load 16/60) wurde zuvor mit Markerproteinen bekannter Größe kalibriert, so dass das Elutionsvolumen mit dem Molekulargewicht in Verbindung gebracht werden konnte.

Das Elutionsvolumen von 76,7 ml entspricht einem Molekulargewicht von 18,6 kDa. Dieses Molekulargewicht weicht nur geringfügig von dem errechneten Molekulargewicht der Bindestelle (15 kDa) ab. Die Proteine des Hauptpeaks wurden in 1 ml-Fractionen aufgefangen und durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht (Abb. 3.20 C). In Spur 1 ist der Säulenauftrag zu sehen. In den Spuren 2-7 wurden die Fractionen des Hauptpeaks aufgetragen. In allen Spuren ist eine Bande mit einer Größe von ca. 15 kDa zu sehen.

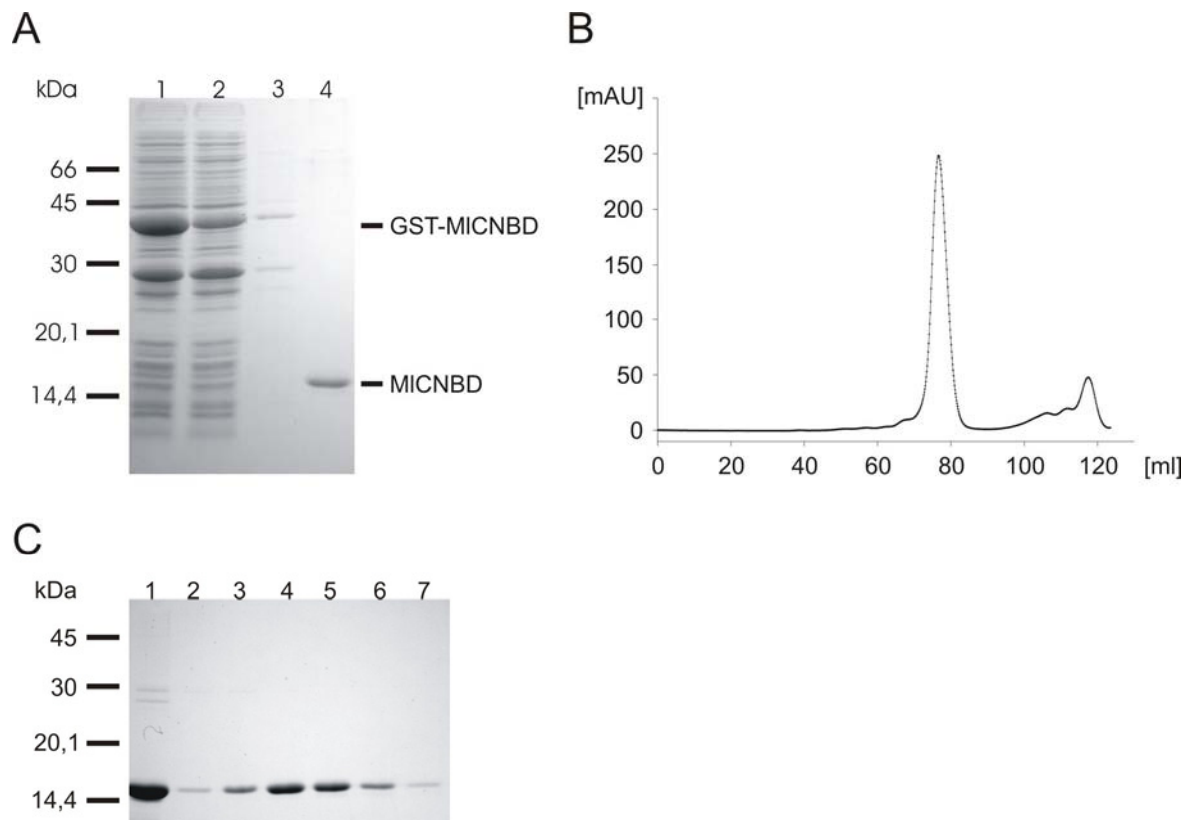


Abb. 3.20: Reinigung des Proteins MICNBD. Die Proteine wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. **(A)** Reinigung über eine GST-Sepharose 4B-Säule: Spur 1: Lösliche Proteine des Bakterienlysats (0,05% des Gesamtvolumens); Spur 2: Säulendurchfluss (0,05%); Spur 3: Waschfraktion (0,04%); Spur 4: Eluat (0,05%). **(B)** Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 75 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. **(C)** SDS-PAGE-Analyse der Gelfiltrationsproben. Coomassie-Blau-Färbung: Spur 1: Säulenauftrag (0,25%); Spur 2-7: Eluate des Hauptpeaks (70-80 ml; 0,25%). Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

3.2.3 Entfernung des gebundenen cAMP von der Bindestelle

Es wurde festgestellt, dass das gereinigte MICNBD-Protein (3.2.2) noch cAMP gebunden hatte. Um das gebundene cAMP von dem Protein zu entfernen, bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Zum einen kann dies durch extensives Waschen während der Reinigung erfolgen. Dabei wird die Säule, die das Protein gebunden hat, mit einem großen Puffervolumen gewaschen. Zum anderen könnte das gebundene cAMP von dem Protein kompetitiv entfernt werden. Für die Konkurrenz muss ein weniger affiner Ligand im Überschuss verwendet werden, der anschließend durch einen Waschschrift wieder entfernt werden kann. Eine dritte Möglichkeit wäre die Verwendung des Enzyms Phosphodiesterase (PDE). Dieses Enzym spaltet cAMP zu AMP. Schließlich kann durch denaturierende Bedingungen die Struktur des MICNBD-Proteins aufgebrochen werden. Dabei wird das gebundene cAMP freigesetzt. Es kann anschließend durch einen einfachen Pufferaustausch entfernt werden. Danach kann das cAMP-freie Protein wieder zurückgefaltet werden.

cAMP-Entfernung durch extensives Waschen

Bei diesem Versuch wurde das MICNBD-Protein wie beschrieben (3.2.2) an eine GST-Sephrose 4B-Säule gebunden. Anschließend wurde die Säule extensiv mit Puffer gewaschen (2 l). Das MICNBD-Protein wurde durch eine Thrombininkubation von der Säule eluiert. Der cAMP-Gehalt der Probe wurde photometrisch bestimmt (2.13.1). Tabelle 3.1 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Ca. 25% des gereinigten Proteins hatten noch cAMP gebunden (persönliche Mitteilung Bärbel Grüter).

Tabelle 3.1: Prozentualer cAMP-Gehalt des gereinigten MICNBD-Proteins nach extensivem Waschen.

Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀	cAMP [%]
1,4	25

cAMP-Entfernung durch kompetitive Verdrängung

Nachdem das Protein an eine GST-Sephrose 4B-Säule gebunden war (3.2.2), wurde die Säule zunächst mit Puffer gewaschen. Als kompetitiver Ligand wurde 8-pCPT-cGMP verwendet. 8-pCPT-cGMP ist ein cGMP-Analogon. Bindungsstudien haben gezeigt, dass dieser Ligand im Vergleich zu cAMP weniger stark an das MICNBD-Protein bindet (persönliche Mitteilung Bärbel Grüter). Durch Zugabe eines molaren Überschusses dieses Liganden sollte das gebundene cAMP verdrängt werden. Die Säule mit dem gebundenen Protein wurde mit 8-pCPT-cGMP inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säule mit Puffer

gewaschen. Es folgten zwei weitere Inkubationen mit einer 8-pCPT-cGMP-Lösung, wobei die Säule zwischen den Inkubationen mit Puffer gewaschen wurde, um das verdrängte cAMP zu entfernen. Nach der dritten Inkubation wurde mit einer größeren Menge Puffer gewaschen um sowohl das verdrängte cAMP als auch das gebundene 8-pCPT-cGMP zu entfernen. Das MICNBD-Protein wurde anschließend von der Säule eluiert. Durch HPLC-Messungen (2.13.2) wurde der cAMP- und 8-pCPT-cGMP-Gehalt der Probe bestimmt. Für die HPLC-Messung wurde 4,65 nmol Protein eingesetzt. Der cAMP- und 8-pCPT-cGMP-Gehalt wurde durch Vergleiche mit einer cAMP- bzw. einer 8-pCPT-cGMP-Kalibrierungsreihe ermittelt. Tabelle 3.2 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Das gereinigte Protein hatte noch ~0,04% cAMP und ~1,7% 8-pCPT-cGMP gebunden.

Tabelle 3.2: Prozentualer cAMP- und 8-pCPT-cGMP-Gehalt des gereinigten MICNBD-Proteins nach Kompetition.

cAMP	2 pmol	~0,04%
8-pCPT-cGMP	77 pmol	~1,7%

cAMP-Entfernung durch die Phosphodiesterase (PDE)

Das MICNBD-Protein wurde über eine GST-Sepharose 4B-Säule gereinigt (3.2.2). Anschließend wurde das gereinigte Protein mit einer PDE-Lösung (Endkonzentration 5 nmol) inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 10 min, 1 h, 3 h und ü. N.) wurde eine Probe entnommen. Zu den Proben wurde HCl zugegeben, um die PDE-Reaktion abzustoppen. Nach Neutralisierung mit NaOH wurde der cAMP-Gehalt der Proben durch HPLC-Messungen (2.13.2) bestimmt. Für die HPLC-Messungen wurden 3,53 nmol Protein eingesetzt. Tabelle 3.3 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Es ist zu erkennen, dass nach einer längeren Inkubationszeit mit PDE der cAMP-Gehalt der Proteinprobe abnimmt.

Tabelle 3.3: Prozentualer cAMP-Gehalt des gereinigten MICNBD-Proteins nach PDE-Behandlung.

Zeitpunkte der Probenentnahme	cAMP [nmol]	cAMP [%]
0 min (vor PDE-Zugabe)	3,44	97
10 min	1,47	41,7
1 h	1,37	38,8
3 h	1,22	34,1
ü. N.	0,46	13

cAMP-Entfernung durch Denaturierung des MICNBD-Proteins

Dieser Versuch wurde mit gereinigtem MICNBD-Protein (3.2.2) durchgeführt. Nach der Affinitätschromatographie wurde ein cAMP-Gehalt der Proteinprobe von 64% photometrisch bestimmt (2.13.1). Die Proteinprobe wurde durch 6 M Guanidinhydrochlorid denaturiert. Dies geschah durch einen Pufferaustausch über eine PD10-Säule (Amersham Biosciences). Die Struktur des Proteins wurde so aufgebrochen und das gebundene cAMP freigesetzt. Das freigesetzte cAMP wurde durch einen mehrfachen Pufferaustausch, ebenfalls über PD10-Säulen, entfernt. Nach jedem PD10-Durchlauf wurde der cAMP-Gehalt der Probe photometrisch bestimmt. Tabelle 3.4 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Nach drei PD10-Durchläufen war die Probe cAMP frei.

Tabelle 3.4: Prozentualer cAMP-Gehalt des gereinigten MICNBD-Proteins nach Denaturierung und Renaturierung.

	Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀	cAMP [%]
1. PD10-Durchlauf	1,265	17,9
2. PD10-Durchlauf	1,07	8
3. PD10-Durchlauf	0,81	0

Anschließend wurde das cAMP-freie MICNBD-Protein mit Hilfe der „*rapid dilution*“-Methode zurückgefaltet. Dabei wird das denaturierende Reagenz Guanidinhydrochlorid verdünnt. Durch die Verdünnung kann sich das Protein zurückfalten. Die Rückfaltung erfolgte, indem die denaturierte Proteinlösung tropfenweise in ein 5faches Puffervolumen gegeben wurde. Nach der Renaturierung wurde die Probe eingengt. Zur Überprüfung der Homogenität des Proteins wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (2.10). Abb. 3.21 zeigt das Elutionsdiagramm. Das cAMP-freie Protein eluiert in einem Peak bei 75 ml. Im Vergleich zu der cAMP-gebundenen Form des MICNBD-Protein ist der Peak leicht verschoben. Möglicherweise hat das cAMP-freie Protein ein verändertes Laufverhalten in der Gelfiltration.

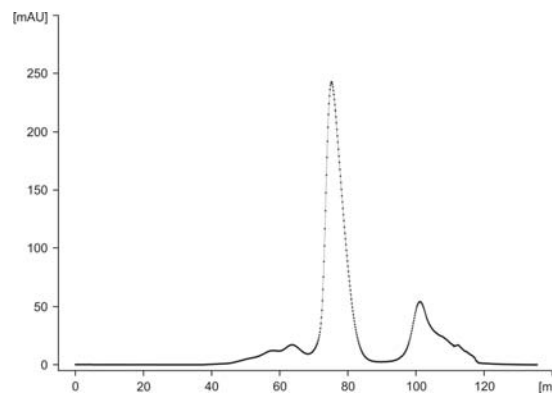


Abb. 3.21: Größenausschlusschromatographie des cAMP-freien MICNBD-Proteins. Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 75 prep grade, High Load 16/60). Der Nachweis der Proteine erfolgte bei $\lambda = 280$ nm. Ordinate: Absorption der Proteine in mAU. Abszisse: Elutionsvolumen in ml.

Diese verschiedenen Versuchsansätze zeigen, dass cAMP nur durch die Denaturierung des Proteins und die anschließende Rückfaltung vollständig von dem MICNBD-Protein entfernt werden konnte. Diese Methode wurde deshalb weiter verwendet um cAMP-freies MICNBD-Protein zu erhalten.

3.2.5 Kovalente Quervernetzung des MICNBD-Proteins

Um zu überprüfen, ob die Bindestelle Oligomere bilden kann, wurde eine chemische Quervernetzung („*cross-linking*“) durchgeführt (2.19). Anschließend wurden die Proteine im Western-Blot untersucht. Für die Vernetzung der gereinigten Bindestelle wurde zum einen das homobifunktionelle Reagenz Bis(sulfosuccinimidyl)-suberat (BS^3) verwendet, das mit freien Aminogruppen eines Polypeptids reagiert. Zum anderen wurde das homobifunktionelle Reagenz 1,4-Bismaleimidyl-2,3-dihydroxybutan (BMDB) verwendet, das mit freien Sulfhydrylgruppen eines Polypeptids reagiert. Beide Reagenzien verknüpfen nur direkt benachbarte Polypeptidketten eines Proteinkomplexes kovalent miteinander. Der Verlauf der Vernetzungsreaktionen wurde verfolgt, indem die Reaktionen zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und die entstandenen Vernetzungsprodukte untersucht wurden. Die Vernetzungsprodukte wurden in einem 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgradientengel elektrophoretisch getrennt, auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit dem monoklonalen Antikörper 8C12-1-1 im Western-Blot nachgewiesen. Um das Molekulargewicht der Vernetzungsprodukte quantitativ auswerten zu können, wurden in der SDS-PAGE zusätzlich verschiedene Markerproteine bekannter Größe verwendet. Die

graphische Auftragung des Molekulargewichtes der Markerproteine gegen ihre relative Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel zeigte eine logarithmische Abhängigkeit. Für die Molekulargewichtsbestimmung der Vernetzungsprodukte stand ein Bereich von 14,4-97 kDa zur Verfügung. Abb. 3.22 zeigt den Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper 8C12-1-1. Die Quervernetzung mit BS³ (Abb. 3.22, links) und mit BMDB (Abb. 3.22, rechts) ergab ein ähnliches Bandenmuster. Neben dem nichtvernetzten Monomer (ca. 16 kDa) markierte der Antikörper weitere Proteinbanden. Diese besaßen ein apparentes Molekulargewicht von ca. 32 kDa, 52 kDa und 69 kDa. Die erwarteten Molekulargewichte von Dimer, Trimer und Tetramer sind 30 kDa, 45 kDa und 60 kDa. Unterschiede zwischen dem apparenten und dem errechneten Molekulargewicht können auf intramolekulare Quervernetzungen zurückzuführen sein. Diese können das elektrophoretische Laufverhalten eines Proteins verändern. Die beobachteten Doppelbanden der Quervernetzungsprodukte kommen durch verschiedene intramolekulare Vernetzungen zustande. Der zeitliche Verlauf der Vernetzungsreaktion zeigt, dass sehr schnell Dimere entstehen. Trimer und Tetramer wurden erst später gebildet. Ich schließe aus diesen Ergebnissen, dass das MICNBD-Protein tetramere Komplexe ausbilden kann.

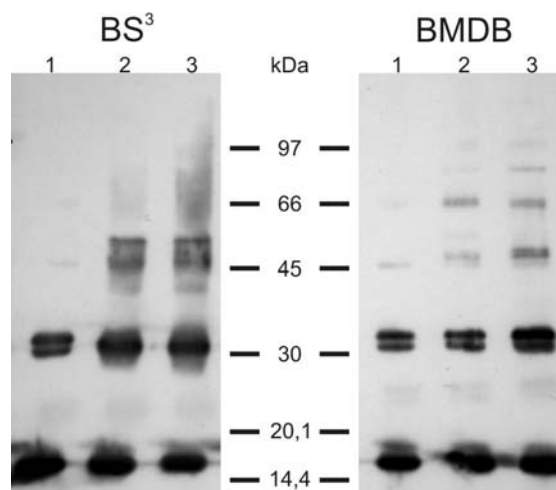


Abb. 3.22: Western-Blot mit vernetztem und nichtvernetztem MICNBD-Protein. Die Vernetzungsreaktion erfolgte mit 1 mM des aminogruppenvernetzenden Reagenz BS³ (links) und mit 30 μ M dem sulfhydrylgruppenvernetzenden Reagenz BMDB (rechts). Die vernetzten Proteine wurden über ein 10-15%iges SDS-Polyacrylamidgradientengel elektrophoretisch getrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 8C12-1-1 (Verdünnung 1:10). Es sind jeweils 1,5 μ g Protein zur Zeit 0 (Spur 1), 1 h (Spur 2) und 4 h (Spur 3) aufgetragen. Der Größenstandard ist in der Mitte in kDa angegeben.

3.2.6 Optimierung der Pufferbedingungen im Hinblick auf die Stabilität des MICNBD-Proteins

Für biochemische und biophysikalische Charakterisierungen des Proteins ist es wichtig, dass das Protein nach der Reinigung stabil in Lösung gehalten werden kann. Es müssen geeignete Pufferbedingungen gefunden werden, die den Abbau oder die Präzipitation des Proteins verhindern. Aus diesem Grund wurde eine sogenannte „*Micro-Drop*“-Analyse (2.11) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Analysemethode können mit sehr geringen Proteinmengen viele verschiedene Pufferbedingungen in kurzer Zeit getestet werden. Die Auswertung erfolgte, indem die einzelnen Proteintropfen mikroskopisch untersucht wurden. Die Präzipitate der einzelnen Testreihen wurden mit einer Skala von 1-3 bewertet. Ein Wert von 1 entspricht keinem bis wenig Präzipitat, während ein Wert von 3 einem Präzipitat entspricht, das den ganzen Tropfen bedeckt. Die Pufferoptimierung wurde sowohl für die cAMP-gebundene Form (3.2.2) als auch für die cAMP-freie Form (3.2.3) des MICNBD-Proteins durchgeführt. Die Optimierungsreihe gliedert sich in vier Schritte. Im ersten Schritt wurden verschiedene Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Abb. 3.23 zeigt die verwendeten Puffer sowie die Auswertung der Versuche für die cAMP-freie Form des MICNBD-Proteins. Die Auswertung für die cAMP-gebundene Form des MICNBD-Proteins findet man im Anhang.

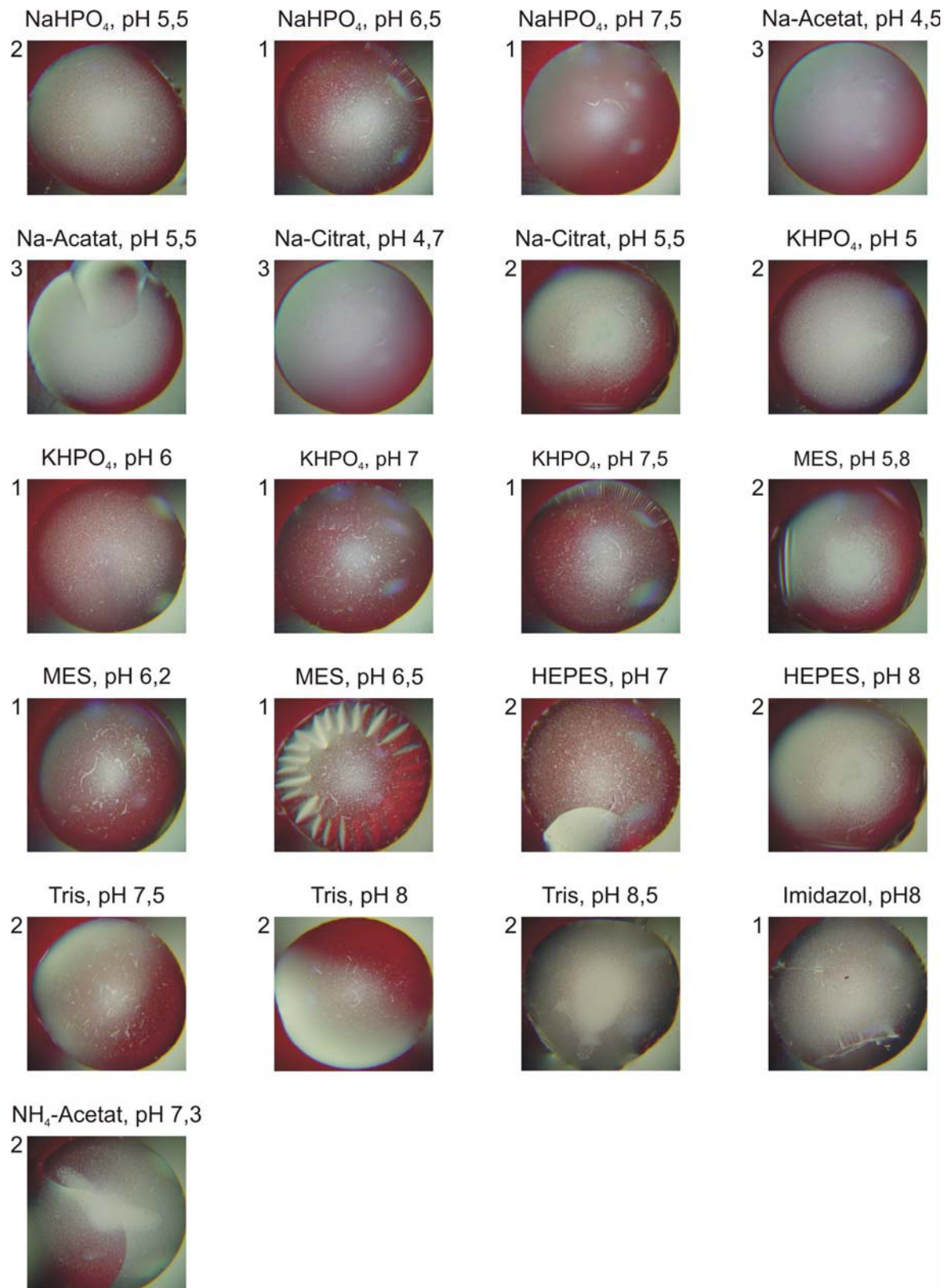


Abb. 3.23: Optimierung der Pufferbedingungen für das cAMP-freie MICNBD-Protein mit der „Micro-Drop“-Analyse. Die verwendeten Puffer sind über den Bildern angegeben. Die Präzipitatbewertung ist jeweils links neben dem Bild angegeben.

Im zweiten Schritt wurden die Puffersysteme, die einen Präzipitatwert von 1 besaßen, weiterverwendet (Tabelle 3.5). Den jeweiligen Puffern wurden verschiedene NaCl- bzw. KCl-Konzentrationen (je 50 mM, 100 mM und 150 mM) zugesetzt. Die Auswertung der „*Micro-Drop*“-Analyse erfolgte wie bereits beschrieben (siehe Anhang).

Tabelle 3.5: Verwendete Puffer für die „*Micro-Drop*“-Analyse mit Salzzusätzen

MICNBD (mit cAMP)	MICNBD (ohne cAMP)
NaHPO ₄ , pH 5,5	NaHPO ₄ , pH 6,5
NaHPO ₄ , pH 6,5	NaHPO ₄ , pH 7,5
NaHPO ₄ , pH 7,5	KHPO ₄ , pH 6
Na-Acetat, pH 5,5	KHPO ₄ , pH 7
KHPO ₄ , pH 6	KHPO ₄ , pH 7,5
KHPO ₄ , pH 7	MES, pH 6,2
KHPO ₄ , pH 7,5	MES, pH 6,5
MES, pH 5,8	Imidazol, pH 8
MES, pH 6,2	NaHPO ₄ , pH 6,5
Tris, pH 8	NaHPO ₄ , pH 7,5

Die Puffer, die in diesem Versuch einen Präzipitatwert von 1 besaßen, wurden für den dritten Schritt weiterverwendet (Tabelle 3.6). Im dritten Schritt der Pufferoptimierung wurde nun die Konzentration der Puffersysteme variiert. Für die cAMP-gebundene Form des MICNBD-Proteins wurden die Puffer in den Konzentrationen von 10 mM, 15 mM und 45 mM eingesetzt. Für die cAMP-freie Form des MICNBD-Proteins wurden die Puffer in den Konzentrationen von 30 mM, 60 mM und 100 mM eingesetzt. Die Bewertung der „*Micro-Drop*“-Analyse erfolgte wie beschrieben (siehe Anhang).

Tabelle 3.6: verwendete Puffer für die „Micro-Drop“-Analyse

MICNBD (mit cAMP)	MICNBD (ohne cAMP)
NaHPO ₄ , pH 7,5, 100 mM NaCl	NaHPO ₄ , pH 6,5, 100 mM NaCl
NaHPO ₄ , pH 7,5, 150 mM NaCl	NaHPO ₄ , pH 6,5, 150 mM NaCl
Na-Acetat, pH 5,5, 100 mM NaCl	KHPO ₄ , pH 7, 50 mM NaCl
Na-Acetat, pH 5,5, 150 mM NaCl	KHPO ₄ , pH 7, 150 mM NaCl
KHPO ₄ , pH 6, 50 mM KCl	KHPO ₄ , pH 7, 100 mM KCl
KHPO ₄ , pH 6, 100 mM KCl	MES, pH 6,5, 50 mM NaCl
KHPO ₄ , pH 7, 100 mM NaCl	MES, pH 6,5, 150 mM NaCl
KHPO ₄ , pH 7, 150 mM NaCl	
KHPO ₄ , pH 7, 100 mM KCl	
KHPO ₄ , pH 7, 150 mM KCl	
MES, pH 6,2, 50 mM NaCl	
MES, pH 6,2, 100 mM NaCl	
MES, pH 6,2, 150 mM KCl	
Tris, pH 8, 150 mM KCl	

Am Ende dieser Testreihe standen jeweils vier Puffer für die cAMP-gebundene und die cAMP-freie Form des Proteins zur Verfügung (Tabelle 3.7), die einen Präzipitatwert von 1 erhielten.

Tabelle 3.7: verwendete Puffer für die SDS-Page-Analyse

MICNBD (mit cAMP)	MICNBD (ohne cAMP)
Na-Acetat, pH 5,5, 67 mM NaCl	67 mM NaHPO ₄ , pH 6,5, 67 mM NaCl
Na-Acetat, pH 5,5, 100 mM NaCl	40 mM KHPO ₄ , pH 7, 67 mM KCl
10 mM KHPO ₄ , pH 7, 100 mM KCl	67 mM MES, pH 6,5, 33 mM NaCl
30 mM Tris, pH 8, 100 mM KCl	67 mM MES, pH 6,5, 100 mM NaCl

Das gereinigte Protein wurde nun in die vier ausgewählten Lösungen umgepuffert und anschließend bei RT inkubiert. Die Stabilität des Proteins in dem jeweiligen Puffer wurde verfolgt, indem Proben zu verschiedenen Zeitpunkten (1 Tag, 4 Tage, 7 Tage und 18 Tage) entnommen wurden. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Abb. 3.24 zeigt die Stabilitätsanalyse der cAMP-gebundenen Form des MICNBD-Proteins. Nach einem Tag (Abb. 3.24 A) ist das Protein in allen vier Puffern stabil und wird als Bande von ca. 15 kDa angefärbt. Ein leichter Abbau des Proteins ist nach 4 (Abb. 3.24 B) bzw. 7 Tagen (Abb. 3.24 C) in Spur 1 und 3 zu beobachten. Nach 18 Tagen ist nur in Spur 4 das Protein noch als 15 kDa-Bande zu erkennen. In den Spuren 1-3 hingegen findet man Proteinbanden mit geringeren Molekulargewichten. Diese Ergebnisse

deuten auf einen Abbau des Proteins hin. Die Testreihe zeigt, dass das Protein am stabilsten ist in einem KHPO_4 -Puffer, pH 7 mit 100 mM KCl.

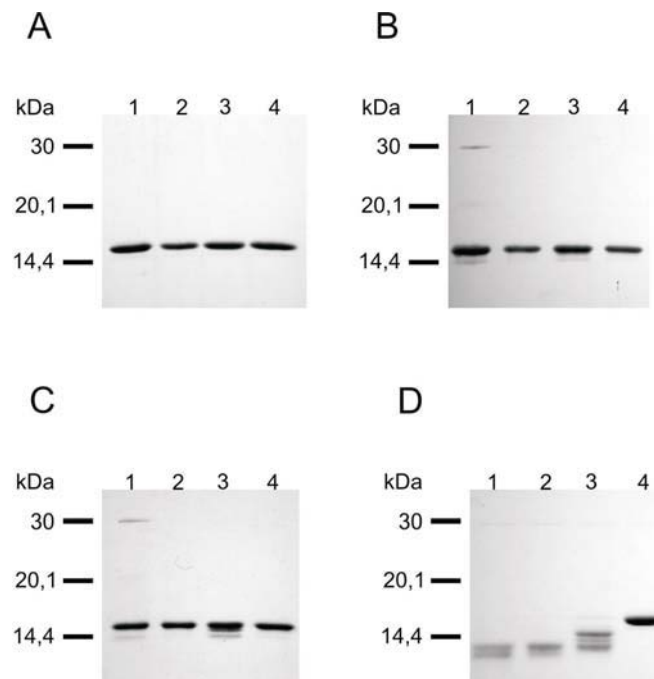


Abb. 3.24: Puffertest. SDS-PAGE-Analyse. Die Proteine wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Die Stabilität der cAMP-gebundenen Form des Proteins MICNBD wurde zu verschiedenen Zeitpunkten in den Puffern 1-4 bei RT untersucht. Spur 1: Na-Acetat, pH 5,5, 67 mM NaCl; Spur 2: Na-Acetat, pH 5,5, 100 mM NaCl; Spur 3: 30 mM Tris, pH 8, 100 mM KCl; Spur 4: 10 mM KHPO_4 , pH 7, 100 mM KCl. Nach folgenden Inkubationszeiten wurden Proben entnommen: 1 Tag (**A**), 4 Tage (**B**), 7 Tage (**C**) und 18 Tage (**D**). Aufgetragen wurde jeweils 1 μg Protein. Der Größenstandard ist links in kDa angegeben.

3.2.7 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist neben der Röntgenstrukturanalyse eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung von Proteinstrukturen. Die NMR-Strukturbestimmung beruht auf der Übertragung von Magnetisierung zwischen Atomkernen. Die Kernmagnetisierung kann nur dann gemessen werden, wenn die Anzahl der Protonen und Neutronen nicht zugleich gerade ist. Für Strukturaufklärungen an Proteinen mit der NMR-Spektroskopie spielen Wasserstoff-, Stickstoff- und Kohlenstoffatomkerne eine wichtige Rolle. Die in der Natur vorkommenden ^{12}C - und ^{14}N -Atome sind für NMR-Messungen ungeeignet. Die Häufigkeit ihrer natürlich

vorkommenden ^{13}C - und ^{15}N -Isotope ist allerdings zu gering, so dass mit isotopenmarkierten Proteinen gearbeitet werden muss. Durch die Expression in einem isotopenhaltigen Minimalmedium kann ^{13}C - und ^{15}N -markiertes Protein hergestellt werden. Die in dieser Arbeit gezeigten NMR-Messungen wurden von Sven Schünke (IBI-2; Forschungszentrum Jülich) durchgeführt.

Bestimmung des Faltungszustandes mit 1D-Protonen-NMR

Um den Faltungszustand eines Proteins zu beurteilen, wird eine 1D-Protonen-NMR durchgeführt. Die chemische Verschiebung eines Kernspins ist abhängig von der Kernumgebung. Lokale Elektronenverteilungen, wie z. B. Hybridisierungszustände von Bindungen, Nachbarschaft zu polaren Gruppen, aromatischen Ringsystemen und magnetischen Anisotropien verändern die chemische Verschiebung. In einem unstrukturierten Bereich des Proteins fällt die chemische Verschiebung der Amidprotonen des Proteinerückgrats in einen Bereich von 8 ppm. Amidprotonenresonanzen in helikalen Bereichen erhalten eine Verschiebung zu niedrigeren ppm-Werten. In β -Faltblattbereichen wird die Amidprotonenresonanz zu höheren ppm-Werten verschoben. Der Grund für die Änderung der chemischen Verschiebung von Amidprotonen liegt zum großen Teil an deren Beteiligung an Wasserstoffbrückenbindungen (Wishart et al., 1991). Bei der Beurteilung des Faltungszustandes eines Proteins spielen die chemischen Verschiebungen der Methylseitengruppen eine weitere wichtige Rolle. In einem unstrukturierten Proteinbereich liegen diese in einem Bereich von 1 ppm. Befinden sich Methylprotonen z. B. in der Nähe von Aromaten, so werden die Signale in Bereiche von 0 ppm bis -2 ppm verschoben. Eine solche Verschiebung zeigen Proteine, die eine Tertiärstruktur aufweisen. Bei einem gefalteten Protein ist eine deutliche Signaldispersion der Amidprotonen des Proteinerückgrats sowie einige Methylprotonensignale in dem Bereich von 0 ppm bis -2 ppm zu beobachten.

Zunächst wurden 1D-Protonen-Spektren von der cAMP-gebundenen und der cAMP-freien Form des MICNBD-Proteins aufgenommen. Nach der Reinigung (2.9.2) wurde die Proteinprobe mit 5% (v/v) D_2O versetzt. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 500 μM eingesetzt. Die Messungen erfolgten bei einer Resonanzfrequenz für Protonen von 600 Mhz. Abb. 3.25 zeigt das Ergebnis dieser Messungen. Die Protonenresonanzen liegen für die cAMP-gebundene Form des Proteins in einem Bereich von 10,5 ppm bis -0,5 ppm. Für das cAMP-freie Protein liegen die Signale in einem Bereich von 10,5 ppm bis -0,1 ppm. Bei beiden Proteinen sind deutlich Methylsignale erkennbar. Die Signaldispersionen deuten in beiden Fällen auf ein gefaltetes Protein hin.

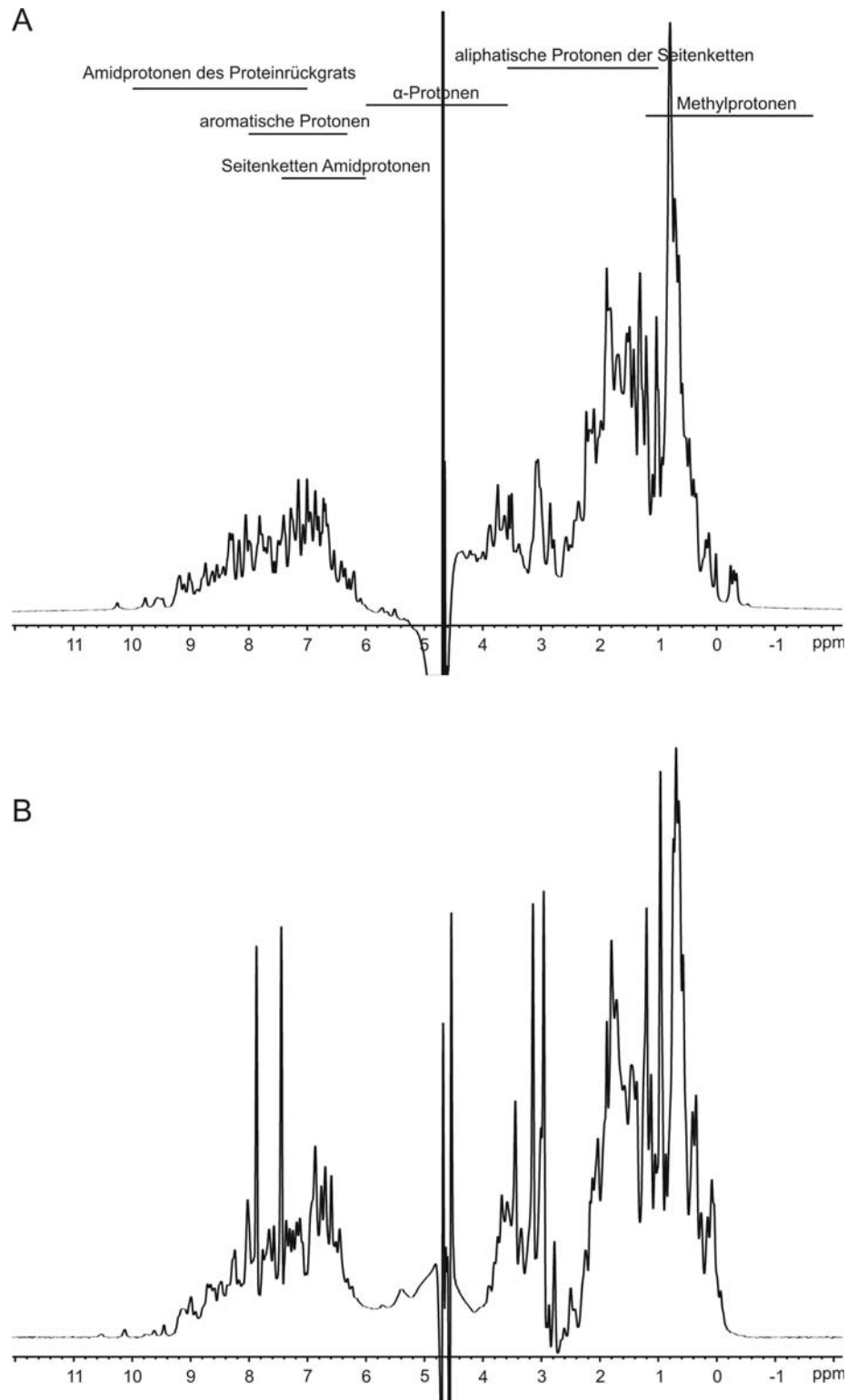


Abb. 3.25: Eindimensionales NMR-Spektrum von nichtisotopenmarkiertem MICNBD-Protein. Die Spektren wurden bei 298 K an einem Varian ^{unity}INOVA-Spektrometer bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz aufgenommen. Verwendeter Puffer: 10 mM KHPO₄, pH 7, 100 mM KCl, 0,02% Natriumazid, 5% D₂O. **(A)** Protonenspektrum der cAMP-gebundenen Form des MICNBD-Proteins (500 μ M). **(B)** Protonenspektrum der cAMP-freien Form des MICNBD-Proteins (500 μ M). Die schwarzen Balken geben den ungefähren Bereich der angegebenen Protonensignale an.

2D-HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)-Experiment

Das HSQC-Experiment ist für strukturbiochemische Untersuchungen von entscheidender Bedeutung. Dafür werden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -isotopenmarkiertem Protein aufgenommen. Jedes in dem Spektrum auftretende Signal steht für ein Proton, welches an ein ^{15}N -Atom gebunden ist. Somit besteht das Spektrum aus Resonanzsignalen der Amidprotonen des Proteinrückgrats und den Seitenkettenamidprotonen der Aminosäuren Asparagin und Glutamin.

In diesem Versuch wurde ein HSQC-Spektrum der cAMP-gebundenen Form des MICNBD-Proteins aufgenommen. Nach der Expression in isotopenhaltigem Minimalmedium (2.7.2) wurde das ^{15}N -markierte Protein gereinigt (2.9.2). Anschließend wurde die Proteinprobe (500 μM) mit 5% (v/v) D_2O versetzt. Die Messung erfolgte bei einer Resonanzfrequenz für Protonen von 800 Mhz. Abb. 3.26 zeigt das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum. Das Spektrum zeigt eine gute spektrale Dispersion, so dass die gemessenen Resonanzen mit Hilfe von weiteren NMR-Messungen zugeordnet werden können. In dem Bereich um 8 ppm der Protonendimension (Abb. 3.26, gelb) sind überlappende Signale zu erkennen. Amidsignale dieses Bereichs befinden sich wahrscheinlich in einem unstrukturierten Proteinbereich, wie z. B. in Schleifen oder freibeweglichen C- oder N-terminalen Enden. Ausgehend von der Aminosäuresequenz des MICNBD-Proteins sind 144 Signale im Spektrum zu erwarten. Diese setzen sich aus 142 Aminosäureresten von MICNBD, 12 Resonanzen für die Seitenkettenamidgruppen der Asparagin- und Glutamin-Aminosäurereste abzüglich des N-terminalen Aminosäurerestes und der 9 Prolinreste zusammen. Im HSQC-Spektrum wurden ca. 135 Signale beobachtet (Abb. 3.26).

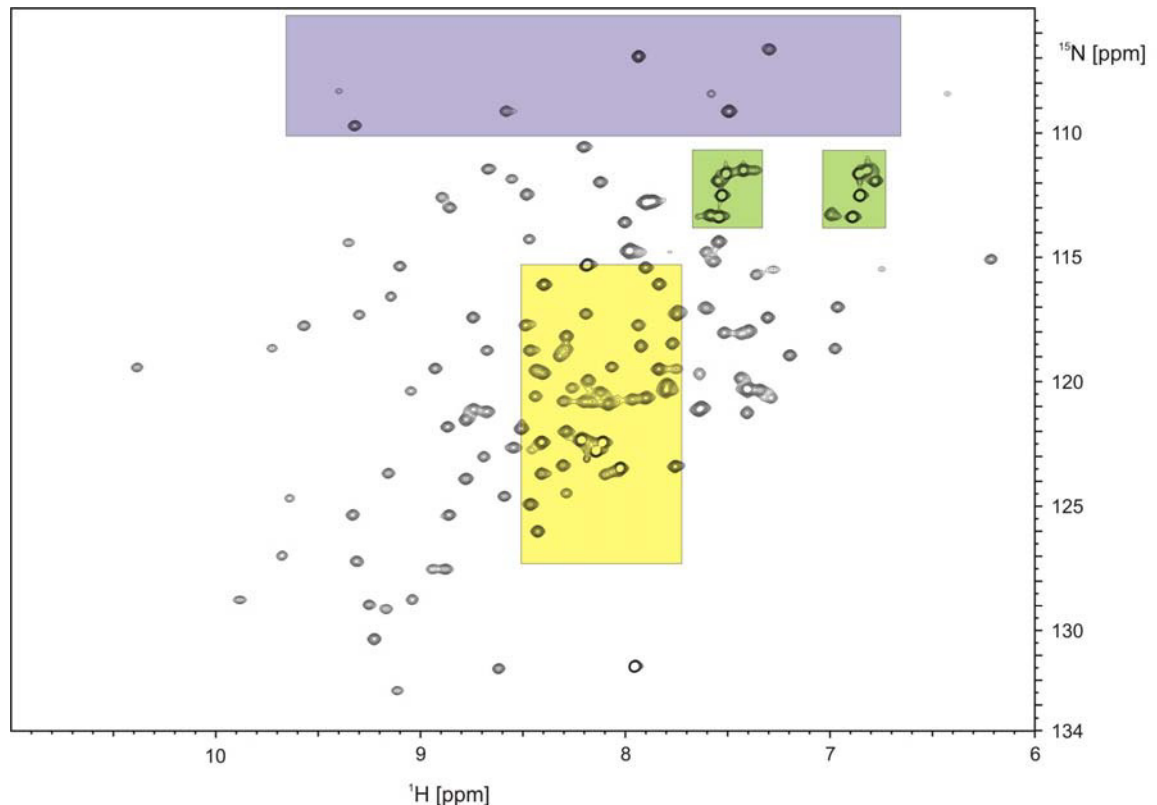


Abb. 3.26: 2D-HCQC-Spektrum der cAMP-gebundenen MICNBD-Form. Das Spektrum wurde bei 298 K an einem Varian ^{unity}INOVA-Spektrometer bei einer Resonanzfrequenz für Protonen von 800 Mhz aufgenommen. Ordinate: chemische Verschiebung der Amidstickstoffresonanzen in ppm. Abszisse: chemische Verschiebung der Amidprotonen in ppm. Verwendeter Puffer: 10 mM KHPO₄, pH 7, 100 mM KCl, 0,02% Natriumazid, 5% D₂O. Die grünen Bereiche markieren exemplarisch einige Resonanzfrequenzen der Seitenkettenamide von Asparagin und Glutamin. Die blaue Fläche markiert den Bereich, in dem die meisten Amidprotonenresonanzen der Glycine zu finden sind. Die gelbe Fläche beinhaltet zum großen Teil die Signale von Amididen in unstrukturierten Proteinbereichen.

Basierend auf 2D-HSQC-Experimenten können durch verschiedene 3D-Experimente die erhaltenen Resonanzsignale den Aminosäuren des Proteins zugeordnet werden. Für 3D-Experimente wurde das MICNG-Protein mit ¹⁵N- und ¹³C-Atomen isotopenmarkiert. Die 3D-Experimente wurden bereits für die cAMP-freie Form des MICNBD-Proteins durchgeführt. Zurzeit werden die Resonanzsignale zugeordnet, so dass in wenigen Monaten eine Struktur dieses Proteins zu erwarten ist.

3.3 Ligandenbindungsstudien an MICNG und MICNBD

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC; 2.17) bietet die Möglichkeit, Interaktionen zwischen einem Liganden und einem Rezeptor quantitativ zu untersuchen. Das Kalorimeter besitzt eine Messzelle, in der die Bindungsreaktion stattfinden kann, und eine Referenzzelle. In die Messzelle wird üblicherweise einer der Interaktionspartner (Rezeptor) vorgelegt. Die Referenzzelle wird mit Wasser gefüllt. Beide Zellen werden auf der gleichen Temperatur gehalten. Injiziert man nun den zweiten Interaktionspartner (Ligand) in die Messzelle, so kann die Bindungsreaktion stattfinden. Im Falle einer exothermen Reaktion wird nun Wärme freigesetzt, bei einer endothermen Reaktion wird Wärme aufgenommen. Das Kalorimeter gleicht diese Wärmeänderung aus, indem es seinerseits solange Wärme ab- oder zuführt, bis die Temperatur von Mess- und Referenzzelle wieder übereinstimmt. Praktisch führt man solche Versuche durch, indem man wiederholt kleine Mengen des Liganden injiziert, bis zuletzt alle Bindestellen besetzt sind. Auch dann beobachtet man bei jeder Injektion noch Wärmeänderungen. Diese sogenannte Verdünnungswärme muss bei der Datenanalyse berücksichtigt werden. Aus den gemessenen Wärmeänderungen pro Injektion und den Konzentrationen an Ligand und Rezeptor lassen sich die Bindungsenthalpie ΔH , die Bindungskonstante K_A und die Bindungsstöchiometrie N errechnen. Über den Zusammenhang

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = - R T \ln K_A$$

lassen sich die freie Bindungsenergie ΔG und die Bindungsentropie ΔS errechnen (R = Gaskonstante; T = Temperatur in Kelvin). Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich als reziproker Wert aus K_A .

Die in dieser Arbeit gezeigten ITC-Messungen wurden von Bärbel Grüter durchgeführt. Sie hat die Bindung von cAMP an die Proteine MICNG und MICNBD gemessen. Die Messungen wurden an gereinigtem MICNG (3.1.6) und MICNBD (3.2.3) durchgeführt. Es wurde eine MICNG- (27 μM) beziehungsweise eine MICNBD-Lösung (56,7 μM) in die Messzelle vorgelegt. Bei MICNG erfolgten 25 Injektionen à 2 μl einer cAMP-Lösung (300 μM). Bei MICNBD wurden 62 Injektionen à 4 μl einer cAMP-Lösung (600 μM) durchgeführt. Bei MICNG betrug die Verdünnungswärme -82 cal/mol cAMP, bei MICNBD -34 cal/mol cAMP. Diese Werte wurden von den Messwerten abgezogen. Abb. 3.27 A zeigt die Ergebnisse der ITC-Messung des MICNG-Proteins. Abb. 3.27 B zeigt die Ergebnisse der ITC-Messung des MICNBD-Proteins. Die Rohdaten der Messung sind jeweils in dem oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Datenauswertung und Kurvenanpassung erfolgte wie unter 2.17 beschrieben und ist jeweils in dem unteren Teil der Abbildung gezeigt. Die cAMP-Bindung

stellt eine exotherme Reaktion dar, da Wärme abgeführt werden muss, um den Temperatursausgleich zu erzielen.

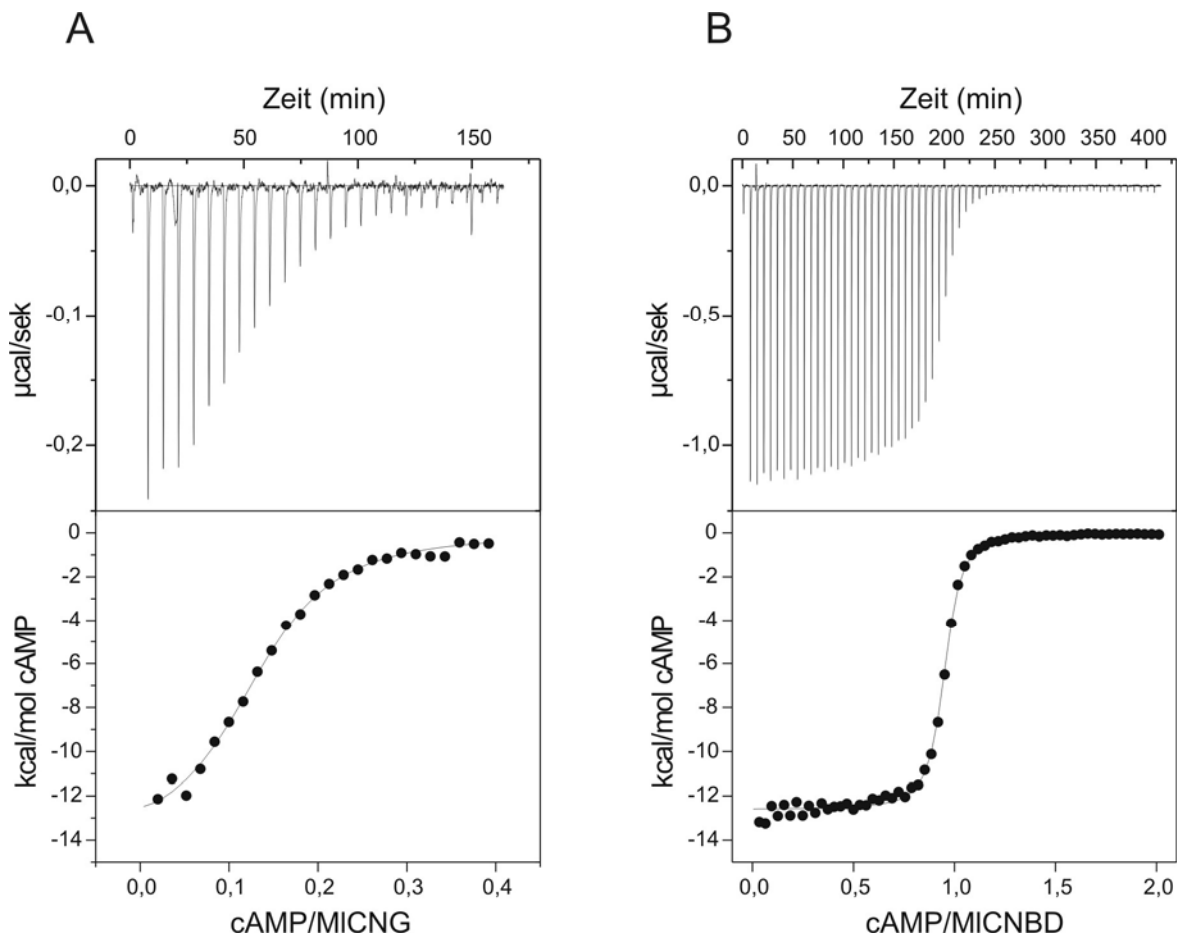


Abb. 3.27: ITC-Messungen: Bindung von cAMP an MICNG und MICNBD. (A) cAMP-Bindung an MICNG. Es wurden 25 Injektionen à 2 μl einer cAMP-Lösung (300 μM) in eine 27 μM -Proteinlösung durchgeführt. (B) cAMP-Bindung an MICNBD. Es wurden 62 Injektionen à 4 μl einer cAMP-Lösung (600 μM) in eine 56,7 μM -Proteinlösung durchgeführt. Der obere Teil der Abbildung zeigt jeweils die Rohdaten der Messung. Der untere Teil zeigt die Datenauswertung mit dem Ergebnis der Kurvenanpassung. Die erste Injektion (0,5 μl) wurde nicht in die Auswertung einbezogen (2.17).

In Tabelle 3.8 ist die Auswertungen der Messung für MICNG und MICNBD aufgeführt.

Tabelle 3.8: Ergebnisse der ITC-Messungen mit cAMP und MICNG bzw. MICNBD.

Protein	K_A [M^{-1}]	K_D [nM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol/K]	ΔG [kJ/mol]	N
MICNG	$2,0 \cdot 10^6$	500	- 59,66	- 78,34	- 35,97	0,134
MICNBD	$9,3 \cdot 10^6$	107	- 52,8	- 43,56	- 39,78	0,938

K_A = Assoziationskonstante, K_D = Dissoziationskonstante, ΔH = Bindungsenthalpie, ΔS = Bindungsentropie, ΔG = freie Bindungsenergie und N = Bindungsstöchiometrie.

Die Stöchiometrie der cAMP-Bindung an das MICNG-Protein betrug 0,134. Erwartet hatten wir eine Stöchiometrie von 1, da prinzipiell jedes MICNG-Molekül eine Bindestelle für cAMP aufweist. Bei einem Bindungsexperiment mit fluoreszenzmarkiertem cAMP konnte gezeigt werden, dass im Prinzip jede Bindestelle funktionell ist, d. h. cAMP bindet (persönliche Mitteilung Bärbel Grüter). Die schlechte Stöchiometrie in der ITC ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das gereinigte MICNG-Protein noch cAMP gebunden hatte. Aus diesem Grund ist der K_D -Wert (500 μM) nur eine obere Abschätzung der tatsächlichen Affinität. Bei MICNBD betrug die Bindungsstöchiometrie 0,938 und der K_D -Wert 107 nM. Diese Messung wurde an cAMP-freiem Protein durchgeführt. Der K_D zeigt, dass das Protein cAMP hochaffin bindet.

4 Diskussion

Eine wichtige Familie von Ionenkanälen ist die der zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle. Während ihre physiologischen Funktionen gut untersucht sind, ist der molekulare Mechanismus ihres Öffnungsverhaltens noch ungenügend verstanden. Bakterielle zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle stellen ein gutes Modellsystem dar, um den „gating“-Mechanismus zu untersuchen. Diese Kanäle können im Gegensatz zu ihren eukaryotischen Verwandten in großen Mengen in Bakterien exprimiert und gereinigt werden und eignen sich daher besonders für strukturelle Untersuchungen.

4.1 Röntgenkristallographische Untersuchungen an bakteriellen Ionenkanälen

Die Röntgenkristallographie hat einen großen Beitrag geleistet, um auf molekularer Ebene einen Einblick in die Ionenselektivität und den „gating“-Mechanismus verschiedener K^+ -Kanäle zu erhalten. Insbesondere prokaryotische Ionenkanäle haben in den letzten Jahren enorm zum Verständnis von Ionenkanälen beigetragen. An bakteriellen K^+ -Kanälen wurde die Selektivität und Leitfähigkeit auf molekularer Ebene untersucht. K^+ -Kanäle zeichnen sich durch eine hohe Leitfähigkeit (10^7 - 10^8 Ionen/sek) aus und haben dennoch eine exquisite Selektivität für K^+ -Ionen (selektieren K^+ - gegenüber Na^+ -Ionen mit einem Faktor über 1000). Zhou et al. (2001) konnten durch Röntgenstrukturanalysen an dem bakteriellen KcsA K^+ -Kanal einen Einblick darüber erhalten, wie die hohe Ionenselektivität mit den ebenso hohen Flussraten erreicht wird. Die Porenregion des KcsA-Kanals wird aus vier symmetrisch angeordneten Untereinheiten gebildet (Doyle et al., 1998; Zhou et al., 2001). Jede Untereinheit des KcsA-Kanalproteins besitzt zwei transmembranale α -Helices (innere und äußere Helix) und eine Porenhelix (Abb. 4.1 A), welche die Membran nur halb durchspannt. Die Porenhelix besitzt C-terminal eine negative Partialladung, die auf das Zentrum der Pore gerichtet ist. In der Pore befindet sich eine zentrale, wassergefüllte Höhle. Die Kristallstrukturen zeigen, dass sich dort ein hydratisiertes K^+ -Ion befindet (Zhou et al., 2001). Es wird vermutet, dass das hydratisierte K^+ -Ionen durch die C-terminale negative Partialladung der Porenhelix in diesem zentralen Bereich der Membran stabilisiert werden. Für die K^+ -Selektivität ist ein hochkonserviertes Sequenzmotiv (TVGYG) der Porenhelix verantwortlich (Heginbotham et al., 1994). Dieses Sequenzmotiv ist bei allen K^+ -Kanälen zu finden und wird auch als Selektivitätsfilter bezeichnet (Abb. 4.1 B).

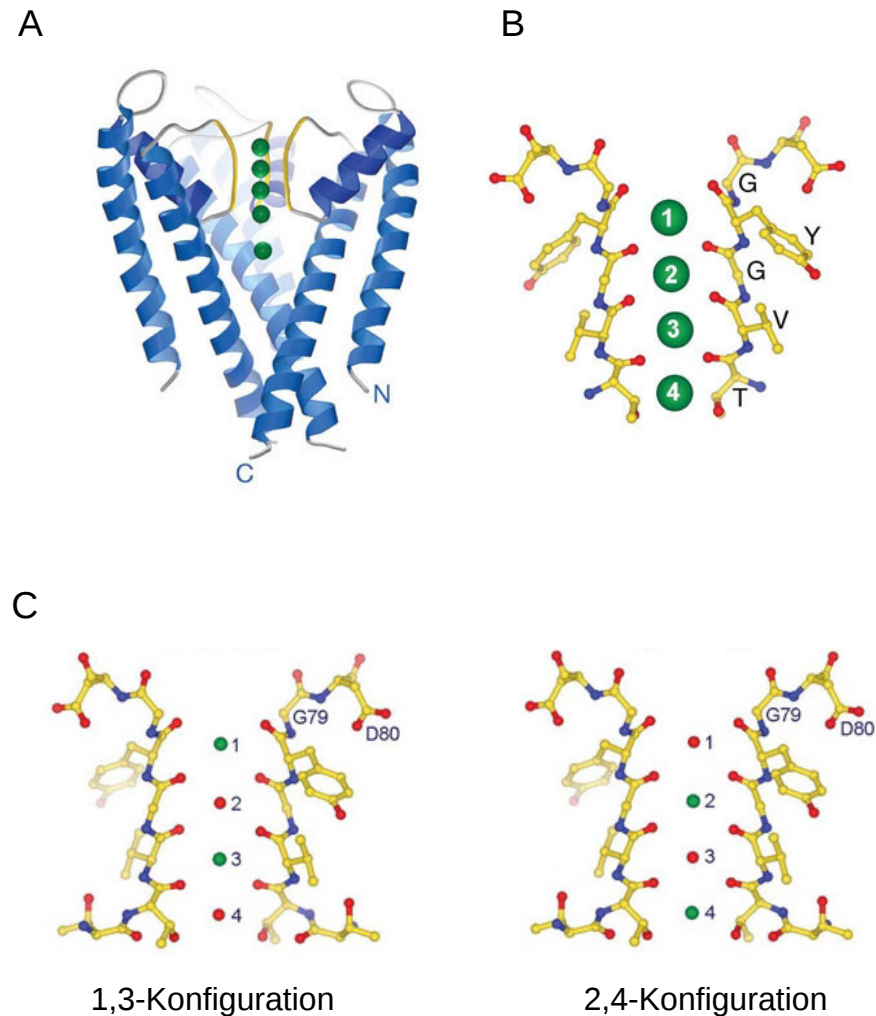


Abb. 4.1: Porenregion von K⁺-Kanälen. (A) Zwei von vier Untereinheiten der KcsA-Pore. Jede Untereinheit beinhaltet eine innere, eine äußere und eine Porenhelix. Der Selektivitätsfilter ist in gelb dargestellt. (B) K⁺-Selektivitätsfilter (zwei Untereinheiten). In grün dargestellt sind die vier Koordinationsstellen (1-4) für K⁺-Ionen. Sauerstoffatome, die an der K⁺-Koordination beteiligt sind, sind rot dargestellt. (C) Konfigurationen der K⁺-Ionen (grün) und Wassermoleküle (rot) im Selektivitätsfilter. (aus MacKinnon, 2003)

Basierend auf diesen Strukturaufklärungen wurde ein Modell über die K⁺-Koordination und -Leitfähigkeit in dem Porenbereich entwickelt (Morais-Cabral et al., 2001; Zhou et al., 2001). Die Aminosäuren des Selektivitätsfilters bilden vier Bindestellen für K⁺-Ionen. Die K⁺-Ionen werden durch Carbonylsauerstoffatome des Proteinrückgrats und durch Hydroxylsauerstoffatome des Threonins im Sequenzmotiv koordiniert. Durch die perfekte Koordination der K⁺-Ionen im Selektivitätsfilter wird die Energie der Dehydratisierung kompensiert. Obwohl die Kristallstrukturen in jeder der K⁺-Bindestellen Ionen zeigen, vermuteten die Autoren, dass in der Pore immer nur zwei K⁺-Ionen, getrennt durch ein Wassermolekül, koordiniert sind. Wahrscheinlich existieren zwei Konfigurationen im

Selektivitätsfilter (Abb. 4.1 C). Entweder befindet sich ein K^+ -Ion in den Positionen 1 und 3, oder aber in den Positionen 2 und 4. Die anderen Bindestellen sind dann mit Wassermolekülen besetzt.

Wie wird nun trotz der starken Bindung der K^+ -Ionen an den Koordinationsstellen des Selektivitätsfilters eine hohe Leitfähigkeit erreicht? Zum einen sind im Bereich des Selektivitätsfilters mehrere K^+ -Ionen in der Pore koordiniert, so dass die elektrostatische Abstoßung untereinander hilft, die Bindung der K^+ -Ionen an den Koordinationsstellen zu lösen. Zum anderen wurde beobachtet, dass bei niedrigen K^+ -Konzentrationen nur ein K^+ -Ion den Filter besetzt und dadurch die Pore in einen kollabierten Zustand versetzt. Der Eintritt eines zweiten K^+ -Ions in den Selektivitätsfilter führt dort zu einer Konformationsänderung. Für diese Konformationsänderung wird ein Teil der Bindungsenergie verwendet, wodurch die Bindung der Ionen an die Koordinationsstellen abgeschwächt wird. Diese Abschwächung der Ionenbindung an den Selektivitätsfilter könnte für die hohe Leitfähigkeit wichtig sein.

Neben der Ionenselektivität stellt der „gating“-Mechanismus einen weiteren wichtigen Aspekt von Ionenkanälen dar. Ebenfalls durch röntgenkristallographische Untersuchungen an bakteriellen K^+ -Kanälen konnten erste Einblicke in diesen Mechanismus erhalten werden. Jiang et al. (2002) erstellten ein Modell, indem die Konformationsänderungen die dem „gating“-Mechanismus unterliegen könnten, gezeigt werden. Das Modell basiert auf Röntgenstrukturen der offenen Porenkonformation des Ca^{2+} -gesteuerten K^+ -Kanals MthK (Jiang et al., 2002a) und der geschlossenen Porenkonformation des KcsA K^+ -Kanals (Doyle et al., 1998; Heginbotham et al., 1999; Zhou et al., 2001). Durch Vergleiche dieser beiden Porenkonformationen wird vermutet, dass das Öffnen und Schließen der Pore durch eine Konformationsänderung der inneren Helices zustande kommt. Ein konserviertes Glycin in der Mitte der inneren Helices soll als „Drehachse“ dienen. Die Konformationsänderung wird vermutlich durch einen Zug auf die inneren Helices ausgelöst. Diesen mechanischen Zug sollen „Gating“-Domänen, wie das S4-Spannungsfühlermotiv oder Ligandenbindestellen, ausüben und so zum Öffnen der Pore führen. Bei spannungsgesteuerten Ionenkanälen, wird das „gating“ durch Spannungsänderungen ausgelöst. Die Spannungsänderungen werden durch das S4-Segment, in dem sich wichtige konservierte Arginine befinden, vermittelt. Jiang et al. (2003) konnten durch röntgenkristallographische Untersuchungen zeigen, dass eine Änderung der Spannung im S4-Segment eine Konformationsänderung auslöst. Dabei wurde beobachtet, dass sich positiv geladene Argininreste des S4-Segmentes durch die Membran entlang der Protein-Lipid-Grenze bewegen und so die Pore öffnen. Bei ligandengesteuerten Kanälen soll durch Ligandenbindung eine Konformationsänderung der Bindestelle auslösen. Diese

Konformationsänderung soll sich auf andere Bereiche des Proteins auswirken, was dann schließlich zum Öffnen der Pore führt (Jiang et al., 2002; Clayton et al., 2004). Von Strukturaufklärungen an bakteriellen, ligandengesteuerten Ionenkanälen erhofft man sich neue Einblicke in die Mechanismen dieser Kanalfamilie. Der Vergleich der Kristallstrukturen von der ligandenfreien und -gebundenen Form soll die Konformationsänderung bei Ligandenbindung aufdecken und den Öffnungsmechanismus aufzuklären helfen. In meiner Arbeit wurden biochemische und biophysikalische Untersuchungen an einem zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal aus *Mesorhizobium loti* durchgeführt.

4.2 Zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal aus *Mesorhizobium loti* (*M. loti*)

Das MICNG-Kanalprotein erfüllt alle Kriterien eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals, wie sie auch bei seinen eukaryotischen Verwandten zu finden sind. Er besitzt sechs transmembranale Segmente (S1-S6), eine Porenregion zwischen dem S5- und S6-Segment und eine C-terminal gelegene Bindestelle für zyklische Nukleotide. Zudem ist in der Porenregion ein Sequenzmotiv zu finden, welches typisch für K^+ -selektive Kanäle ist. Somit wäre der MICNG-Kanal ein K^+ -selektiver zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal.

In meiner Arbeit konnte sowohl der vollständige Ionenkanal aus *M. loti* sowie seine isolierte Bindestelle für zyklische Nukleotide in großen Mengen in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Somit war die Grundlage für strukturelle Untersuchungen gegeben. Im Laufe meiner Arbeit haben Nimigean et al. (2004) das Kanalprotein aus *M. loti* mit Hilfe eines $^{86}\text{Rb}^+$ -Flussassays als zyklisch Nukleotid-gesteuerten K^+ -Kanal identifiziert. In dieser Arbeit wurde gereinigtes Kanalprotein in Liposomen rekonstituiert. Es wurde gezeigt, dass cAMP den Kanal öffnet und so $^{86}\text{Rb}^+$ in die Liposomen gelangen kann. Der zyklisch Nukleotid-abhängige $^{86}\text{Rb}^+$ -Fluss war allerdings viel langsamer als es bei einem Ionenkanal vermutet werden könnte. Die $^{86}\text{Rb}^+$ -Flussraten, die für einen geöffneten Ionenkanal angenommen werden, liegen 10-100fach höher. Die langsamen Flussraten lassen sich vielleicht damit erklären, dass der $^{86}\text{Rb}^+$ -Flussassay nur dann funktioniert, wenn auf der einen Seite der Membran eine sehr geringe Konzentration an Alkalikationen vorliegt (LeMasurier et al., 2001). Das bedeutet, dass auch das Kanalprotein auf einer Seite einer sehr geringen Konzentration der Kationen ausgesetzt ist. Für den KcsA-Kanal konnte gezeigt werden, dass sich die Konformation der Pore ändert, wenn die K^+ -Konzentration zu niedrig ist (MacKinnon, 2003). Auch für andere K^+ -Kanäle konnte gezeigt werden, dass die K^+ -Ionen einen wesentlichen Beitrag für die Stabilität der Pore leisten. In Abwesenheit von K^+ kollabiert die Pore von K^+ -Kanälen und die Kanäle gehen in einen nichtleitenden Zustand

über (Melishchuk et al., 1998). Für andere K^+ -Kanäle wurde gezeigt, dass sie bei niedriger K^+ -Konzentration auch Na^+ -Ionen leiten, d. h. sie verlieren ihre exquisite Selektivität. Für den hier vorliegenden Fall könnte das spezifische Versuchsdesign des $^{86}Rb^+$ -Flussassays der Grund dafür sein, dass der Kanal ungenügend funktioniert. Möglicherweise ist ein Großteil der Kanalproteine kollabiert und leitet somit keine $^{86}Rb^+$ -Ionen mehr. Alternativ könnte es aber auch sein, dass das Kanalprotein schnell inaktiviert. Ein solches Verhalten ist für viele andere Ionenkanäle bekannt (Hille, 2001). Das MICNG-Protein ist für den $^{86}Rb^+$ -Flussassay schon während der gesamten Rekonstitution mit cAMP inkubiert (Nimegean et al., 2004; Clayton et al., 2004). Falls tatsächlich ein Inaktivierungsmechanismus vorliegt, ist dieser unter den angegebenen Versuchsbedingungen sicherlich abgeschlossen.

Elektrophysiologische Studien eignen sich im Allgemeinen besser, um ein Protein als Ionenkanal zu identifizieren. In meiner Arbeit sollte durch elektrophysiologische Untersuchungen gezeigt werden, dass es sich bei dem MICNG-Kanalprotein um einen zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal handelt. Die elektrophysiologische Charakterisierung des heterolog exprimierten Kanalproteins in HEK293-Zellen war bisher nicht erfolgreich. Der Grund dafür ist, dass sich offenbar kein Kanalprotein in der Zellmembran befindet. Das heterolog exprimierte Protein konnte durch immunzytochemische Färbungen nur im Zytosol nachgewiesen werden. Offenbar wird das Protein von den Golgivesikeln, wo die Zielsteuerung der Proteine stattfindet, nicht weiter zur Zellmembran transportiert. Da es sich um ein bakterielles Protein handelt, welches aber in einer eukaryotischen Zelllinie exprimiert wurde, kann der fehlende Transport zur Membran an dem falschen oder nicht vorhandenen Signalpeptid liegen, welches Membranproteine zur Zellmembran sendet. Eine Möglichkeit diese Fehlsteuerung zu beheben, wäre es, eine Signalsequenz an den N-Terminus des MICNG-Kanalproteins anzufügen. Bisher sind verschiedene Signalsequenzen von K^+ -Kanälen bekannt, die für den Transport des Kanalproteins zur Zellmembran verantwortlich sind (Übersicht: Griffith, 2001; Ma et al., 2001; Li et al., 2000). In verschiedenen anderen Studien wurden fehlgesteuerte heterolog exprimierte Membranproteine durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur (Denning et al., 1992; Loo und Clarke, 1994; Zhou et al., 1999) oder durch Zugabe von „chemischen Chaperonen“ wie DMSO oder Glyzerin (Brown et al., 1996; Sato et al., 1996; Tamarappoo und Verkman, 1998) wieder richtig in die Zellmembran integriert. Desweiteren könnten andere Expressionssysteme (Insektenzellen oder Hefezellen) verwendet werden. Sesti et al. (2003) konnten beispielsweise einen bakteriellen K^+ -Kanal aus *Methanococcus jannaschii* in Hefe funktionell exprimieren. Die Rekonstitution des MICNG-Proteins in Lipidbilayer-

Membranen stellt eine weitere Möglichkeit dar, um das Kanalprotein funktionell zu charakterisieren. Durch Verwendung bestimmter Lipide kann das Kanalprotein in eine planare Lipiddoppelschicht eingefügt werden, um so elektrophysiologische Untersuchungen zu ermöglichen. Zeilinger et al. (1994) konnten durch diese Methode beispielsweise einen K^+ -Kanal aus *Vicia faba* funktionell untersuchen.

4.3 Struktur der Bindestelle für zyklische Nukleotide des MICNG-Kanalproteins

Bindestellen für zyklische Nukleotide haben schon seit geraumer Zeit das Interesse in der Forschung geweckt. Es gibt zahlreiche Proteine wie Proteinkinasen (Hunter, 1987; Manning, 2002), Guaninaustauschfaktoren (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998), Transkriptionsfaktoren (McKay et al., 1982; Weber und Steitz, 1987; Passner et al., 2000) und Ionenkanäle (Übersicht: Kaupp und Seifert, 2001; Kaupp und Seifert, 2002), die eine solche Bindestelle besitzen. Um den Mechanismus der Ligandenbindung auf molekularer Ebene zu untersuchen, sind Aufklärungen der Struktur nötig. Einige Strukturen der ligandengebundenen Form (Passner et al., 1997; Zagotta et al., 2003; Weber et al., 1987; Su et al., 1995; Diller et al., 2001) bzw. der -freien Form (Rehman et al., 2003) sind bereits veröffentlicht. In meiner Arbeit wurden die Grundsteine für eine strukturelle Aufklärung sowohl der freien als auch der gebundenen Form der zyklisch Nukleotid-Bindestelle des MICNG-Kanalproteins mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gelegt. Die ersten Messungen sind sehr vielversprechend und lassen erkennen, dass die ligandengebundene und auch die -freie Form der Bindestelle des MICNG-Kanalproteins für eine NMR-Strukturaufklärung gut geeignet sind.

Während meiner Doktorarbeit wurden Röntgenstrukturen der zyklisch Nukleotid-Bindestelle des MICNG-Kanalproteins von Clayton et al. (2004) veröffentlicht. Die Kristallstrukturen zeigen die cAMP-gebundene und cAMP-freie Form der Bindestelle. Die Strukturen gleichen den Kristallstrukturen des CAP, der HCN2-Domäne und EPAC und zeigen die typischen Strukturanordnungen eines cAMP-bindenden Proteins. Acht β -Faltblätter sind zu einer β -Fassstruktur zusammengelagert. N-terminal wird das β -Fass von einer α -Helix (A-Helix) und C-terminal von zwei α -Helices (B- und C-Helix) begrenzt. Anders als in meiner Arbeit konnte nur durch eine Mutation in Form eines Aminosäureaustausches eine cAMP-freie Form der Bindestelle erhalten werden. Der Austausch von Arginin zu Alanin an der Position 348, führte dazu, dass kein cAMP mehr gebunden wird.

Ausgehend von diesen beiden Strukturen und den bekannten Kristallstrukturen der Porenregion von MthK (Jiang et al., 2002) und KscA (Doyle et al., 1998) haben Clayton et al.

ein „gating“-Modell für den Ionenkanal aus *M. loti* entwickelt. In ihrem Modell kommt es durch die Interaktion des cAMP mit der PBC und dem Arg348 zu einer Konformationsänderung der C-Helix. Eine solche Konformationsänderung wird auch bei EPAC vermutet (Rehmann et al., 2003). Außerdem kommt es zu einem Shift in der B-Helix. Dadurch wird eine Konformationsänderung des Loops zwischen der A'- und der A-Helix ausgelöst. Es findet eine Bewegung von 7 Å relativ zu der Position des N-Terminus der Bindestelle statt. Es wird vermutet, dass durch diese Konformationsänderung die Pore geöffnet wird. Dieses Modell gibt erste Einblicke in den gating-Mechanismus eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals. Allerdings stellt sich die Frage, ob die Mutation an Position 348 die Struktur der Bindestelle verändert und so das Modell verfälscht. Um den „gating“-Mechanismus endgültig verstehen zu können, muss die Struktur des vollständigen zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals aufgeklärt werden. Erst dann können die Konformationsänderungen, die durch die cAMP-Bindung an der Bindestelle induziert werden, richtig interpretiert und zugeordnet werden. Zusammen mit Abishek Cukkemane wurden bereits erste Kristallisationssätze mit dem gereinigtem MICNG-Protein durchgeführt.

4.4 Untersuchung der oligomeren Struktur des MICNG-Kanalproteins und seiner isolierten Bindestelle

In meiner Arbeit konnte durch chemische Quervernetzungsversuche gezeigt werden, dass das Kanalprotein MICNG tetramere Komplexe aus vier Untereinheiten bildet. Auch eukaryotische CNG- und HCN-Kanäle bestehen aus vier Untereinheiten (Übersicht: Kaupp und Seifert, 2001; Kaupp und Seifert, 2002). Interessanterweise konnte ich zeigen, dass auch die isolierte zyklisch Nukleotid-Bindestelle tetramere Komplexe ausbildet. In Gelfiltrationsexperimenten hingegen waren keine tetrameren Komplexe erkennbar. In den Elutionsdiagrammen waren hauptsächlich ein Monomerpeak und ein kleiner Dimerpeak zu sehen. Diese Diskrepanz lässt sich durch die Sensitivität der beiden Methoden erklären. Während die Quervernetzungsprodukte im Western-Blot mit Antikörpern nachgewiesen wurden, die eine Sensitivität bis in den pmol-Bereich haben, konnten in Gelfiltrationen die geringen Mengen an tetrameren Komplexen nicht nachgewiesen werden.

Zhou et al. (2004) zeigten, dass die tetramere Struktur der zyklisch Nukleotid-Bindestelle auch in CNG- und HCN-Kanälen gefunden wird. In Abwesenheit von cAMP sollen die vier Bindestellen eines Kanals als zwei Dimere vorliegen. Die cAMP-Bindung soll dann hier zu einer Tetramerisierung der Bindestellen führen. Ob dies auch auf die Bindestelle des MICNG-Ionenkanals zutrifft, ist bisher unklar, da bei der Quervernetzung keine cAMP-Abhängigkeit

untersucht wurde. Bei CNG- und HCN-Kanälen konnte gezeigt werden, dass ein konserviertes Tripeptid am N-terminalen Bereich des C-Linkers, dem Bereich zwischen der Bindestelle und dem S6-Segment, eine wichtige Rolle bei der Tetramerisierung der Bindestellen spielt. Bei dem MICNG-Kanalprotein hingegen ist der C-Linker nur wenige Aminosäuren lang und das konservierte Tripeptid ist nicht vorhanden. Daraus lässt sich folgern, dass die Oligomerisierung der Bindestellen des MICNG-Kanalproteins an anderer Stelle erfolgen muss. Es gibt mehrere Möglichkeiten um die Bereiche der Bindestelle zu identifizieren, die für die Oligomerisierung verantwortlich sind. Zum einen können Mutagenesestudien durchgeführt werden und zum anderen könnten Strukturaufklärungen die Fragestellung beantworten.

4.5 Ausblick

Um den „gating“-Mechanismus von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen endgültig zu verstehen, sind weitere strukturelle Untersuchungen unumgänglich. Bisher waren röntgenkristallographische Strukturaufklärungen weit verbreitet. Die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR) stellt eine gute Alternative für Strukturaufklärungen dar. Mit den heutigen NMR-Geräten können allerdings nur Strukturen kleinerer Proteine bis zu einer Größe von 60 kDa gut gelöst werden. Das gesamte tetramere MICNG-Kanalprotein ist aufgrund seiner Größe von 154,4 kDa für NMR-Strukturaufklärungen ungeeignet und muss deshalb mit der herkömmlichen Röntgenkristallographie untersucht werden.

Neue biochemische Methoden ermöglichen bestimmte Proteindomänen im Kontext zum Gesamtprotein mit der NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Dazu werden einzelne Domänen eines Proteins getrennt exprimiert und gereinigt. Die Domäne, die mit der NMR-Spektroskopie betrachtet werden soll, wird isotope markiert. Die einzelnen Proteindomänen können durch eingefügte, selbstspaltende Inteinsequenzen zu dem Gesamtprotein zusammengefügt werden. Bei NMR-Messungen wird nun nur die Struktur der isotope markierten Domäne bestimmt. Diese Methode soll dazu verwendet werden, die Struktur der zyklisch Nukleotid-Bindestelle im Kontext des vollständigen MICNG-Kanalproteins zu betrachten. Dies wäre ein alternativer Ansatz um die cAMP-induzierte Konformationsänderung der Bindestelle die zum Öffnen des Kanalproteins führt, aufzuklären. Alle Strukturaufklärungen müssen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von cAMP aufgeklärt werden.

Desweiteren soll das MICNG-Kanalprotein funktionell genauer charakterisiert werden. Um elektrophysiologische Untersuchungen an dem Kanalprotein zu ermöglichen, sollen Modifikationen seines N-Terminus durchgeführt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Beavo, J.A. (1995) Cyclic nukleotide phosphodiesterases: funktional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* **75** (4), 725-748.
- Berman, H.M., Eyck, L.F.T., Goodsell, D.S., Haste, N.M., Kornev, A. And Taylor, S.S. (2004) The cAMP binding domain: An ancient signaling module. *PNAS* **102**, 45-50.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., Biwersi, J., Verkman, A.S. and Welch, W.J. (1996) Chemical chaperones correct the human phenotype of the dF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* **1**, 117-125.
- Busby, S. and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**, 199–213.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molec. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
- Clayton, G.M., Silverman, W.R., Heginbotham, L., and Morais-Cabral, J.H. (2004) Structural basis of ligand activation in a cyclic nucleotide regulated potassium channel. *Cell* **119**, 615-627.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J. and Bax, A. (1995) NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6** (3), 277-293.
- Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E., and Welsh, M.J. (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761-764.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. and 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. and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Doyle, M. (1997) Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 31-35.

- Fisher, T. and Singh, N. (1995) Calometric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Meth. Enzymol.* **259**, 194-221.
- Francis, S.H., Turko, I.V. and Corbin, J.D. (2001) Cyclic nukleotide phosphodiesterases: related structure and function. *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* **65**, 1-52.
- Goldsmith, E.J. and Cobb, M.H. (1994) Protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4** (6), 833-840.
- Griffith, L.C. (2001) Potassium channels: The importance of transport signals. *Curr. Biol.* **11**, 226-228.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241** (4861), 42-52.
- Heery, D.M., Gannon, F. and Powell, R. (1990) A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Gen.* **6**, 173.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* **66**, 1061-1067.
- Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L. and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **111**, 741-749.
- Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L. and Miller, C. (1999) Single *Streptomyces lividans* K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **114**, 551-559.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L. and Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel. *J Gen Physiol.* **118** (3), 303-314.
- Henn, D.K., Baumann, A. and Kaupp, U.B. (1995) Probing the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7425-7429.
- Hille, B (2001) Ionic channels of excitable membranes. 3. Aufl., Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts (USA)
- Hunter, T. (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell* **50** (6), 823-829.
- Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1990) A superfamily of ion channels. *Nature* **345**, 672.
- Jeon, Y.H., Heo, Y.S., Kim, C.M., Hyun, Y.L., Lee, T.G., Ro, S. and Cho, J.M. (2005) Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell Mol. Life Sci.* **62** (11), 1198-1220.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (2002a) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**(6888),515-22.

- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. and 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. and MacKinnon, R. (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. and MacKinnon, R. (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 42-48.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanebe, 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., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., and Tabata, S. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7** (6), 381-406.
- Kaupp, U.B. and Seifert, R. (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 235-257.
- Kaupp, U.B. and Seifert, R. (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* **82**, 769-824.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. and Graybiel, A.M. (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275 –2279.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 105-132.
- Li, D., Takimoto, K. And Levitan, E.S. (2000) Surface expression of Kv1 channels is governed by a C-terminal motif. *J. Biol. Chem.* **275**, 11597- 11602.
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. (1994) Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 28683-28689.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y.-F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (2001) Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**, 316-319.
- MacKinnon, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Letters* **555**, 62-65.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**(5600),1912-1934.
- Marty, A. (1981) Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* **291**, 497-500.

- McKay, D.B., Weber, I.T. and Steitz, T.A. (1982) Structure of catabolite gene activator protein at 2.9-Å resolution. Incorporation of amino acid sequence and interactions with cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* **259** (16), 9518-9524.
- Melishchuk, A., Loboda, A. and 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. and Lamberts, B.L. (1965) Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochem. Biophys. Acta.* **107**, 144-145.
- Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* **414**, 37-42.
- Morgan, D.O. and De Bondt, H.L. (1994) Protein kinase regulation: insights from crystal structure analysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6** (2), 239-246.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51**, 263-273.
- Nimigean, C.M., Shane, T. and Miller, C. (2004) A cyclic nucleotide modulated prokaryotic K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **124**, 203-210.
- 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** (5), 847-859.
- Pfeiffer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M. and Hofmann, F. (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**, 105-149.
- Rehmann, H., Schwede, F., Døskeland, S.O., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (2003) Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J. Biol. Chem.* **278**, 38548-38556.
- 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.
- Sambrook, J., Frisch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. Second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger, F., Nickeln, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

- Sato, S., Ward, C.L., Krouse, M.E., Wine, J.J. and Kopito, R.R. (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.* **271**, 635-639.
- Schultz, S.C., Shields, G.C. and Steitz, T.A. (1991) Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science* **253** (5023), 1001-1007.
- Sesti, F., Rajan, S., Gonzalez-Colaso, R., Nikolaeva, N. and Goldstein, S.A. (2003) Hyperpolarization moves S4 sensors inward to open MVP, a methanococcal voltage-gated potassium channel. *Nature Neurosci.* **6** (4), 353-361.
- Shaka, K.J. and Keeler, J. (1987) Broadband spin decoupling in isotropic liquids. *Progress in NMR Spectroscopy* **19**, 47-129.
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. and Huse, W.D. (1988) λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7583-7600.
- 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.
- Tamarappoo, B.K. and Verkman, A.S. (1998) Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *J. Clin. Invest.* **101**, 2257-2267.
- Taylor, S.S. and Radzio-Andzelm, E. (1994) Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* **2** (5), 345-355.
- Taylor, S.S., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, Cheng, X., Ten Eyck, L. and Narayana, N. (1999) Catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase: structure and dynamics of the active site cleft. *Pharmacol. Ther.* **82** (2-3), 133-141.
- Thompson, W.J. and Appleman, M.M. (2005) Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry.* **10** (2), 311-316.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. and 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.
- Wickman, K. and Clapham, D.E. (1995) Ion channel regulation by G proteins. *Physiol. Rev.* **75**, 865-885.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. and Lin, L.-N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131-137.

- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L. and Sykes, B.D. (1995) ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **6** (2), 135-140.
- Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R. and Gouaux, E. (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* **425**, 200-205.
- Zeilinger, C. (1994) Isolation of a potassium-selective ion channel from the plasma membrane of the broad bean *Vicia faba* L. *FEBS Lett.* **348** (3), 278-282.
- Zhou, L., Olivier, N.B., Yao, H., Young, E.C. and Siegelbaum, S.A. (2004) A conserved tripeptide in CNG and HCN channels regulates ligand gating by controlling C-terminal oligomerization. *Neuron* **44**, 823-834.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A. and 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.
- Zhou, Y. and MacKinnon, R. (2003) The occupancy of ions in the K^+ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* **333**, 965-975.
- Zhou, Z., Gong, Q. and January, C.T. (1999) Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. *J Biol Chem.* **274** (44), 31123-6.

6 Anhang

6.1 In dieser Arbeit verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
# 3323	ATTTCTAGACTCATAGATCGTGAGAAGCG	3'-Primer für die Amplifikation von pcAMlcNMP-HA/Gly (Fragment 1)
# 3324	AAAGGATCCACCATGTCGGTACTGCCTTTCTTAAG	5'-Primer für die Amplifikation von pcAMlcNMP-HA/Gly (Fragment 1)
# 3658	GCATAATCCGGCACATCATACGGATAGAACTTTTCCGGTTGGATATGCG	3'-Primer für die Amplifikation von pcAMlcNMP-HA/Gly (Fragment 2)
# 3659	CCGTATGATGTGCCGGATTAtGCGAACGGCAGCATTCCCCAGGCAATG	5'-Primer für die Amplifikation von pcAMlcNMP-HA/Gly (Fragment 2)
# 3989	CGGGATCCCAAGAAGTCCGTCGCGG	5'-Primer für die Amplifikation von pGMICNBD
# 3990	CGGAATTCAGAGCGCTCGCCGCAGCG	3'-Primer für die Amplifikation von pGMICNBD
# 9001	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Polylinker pBluescript SK ⁻ (Sequenzier-Primer)
# 9002	TAATACGACTCACTATAGGG	Polylinker pBluescript SK ⁻ (Sequenzier-Primer)
# 9006	AGCATTTAGGTGACACTATAG	Polylinker pcDNA I Amp (Sequenzier-Primer)

6.2 Hybridisierungsbereiche der Primer

Herstellung des Konstruktes pcAMlcnMP-Ha/Gly

```

aaaGGATCCACCATGTCGGTACTGCCTTTCTTAAG-3' (3324)
1  GGATCCACCATGTCGGTACTGCCTTTCTTAAGAATTTACGCGCCGCTCAACGCGGTGCTGGCTGCGCCTGGGTTGCTGGC
   CCTAGTGGTACAGCCATGACGGAAGAATTTCTTAATGCGCGCGAGTTGCGCCACGACCGACGCGGACCCAACGACCG

81  GGTGGCTGCGCTACGATACCGGACATGTCCGGACGAAGCAGACTGGCTCTGGCTGCCCTGCTCGTGTCTATCTGGGGCG
   CCACCGACGCGAGTGCTATGGCCTGTACAGGCCTGCTTCGTCTGACCGAGACCGACGCGGACGAGCGACAGTAGACCCCGC

161 CCTATCTCCTGCAACTGGCCGCGACGCTGCTCAAGCGCCGGGCGGGAGTCGTACGGGACAGGACGCCAAAATCGCCATC
   GGATAGAGGACGTTGACCGGCGCTGCGACGAGTTTCGCGGCCCGCCCTCAGCATGCCCTGTCTGCGGGTTTTAGCGGTAG

241 GATGTGCTCGCAGTCTTGGTTCCACTCGCCGCATTTCTGCTCGACGGCTCGCCTGACTGGAGCCTCTACTGTGCTGTCTG
   CTACACGAGCGTCAGAACCAAGGTGAGCGGCGTAAAGACGAGCTGCCGAGCGGACTGACCTCGGAGATGACACGACAGAC

321 GCTGTGAAACCGCTGCGCGACTCGACTTTCTCCCGGTCTGGGCAGGGTCTGCGCAACGAAGCAGCAATCTGATCG
   CGACGACTTTGGCGACGCGCTGAGCTGAAAGAAGGGCCAGGACCCGTCAGGACCGGTTGCTTCGTGCGTTAGACTAGC

                                                                 5' - ccGtatGATgTgCggattAt
401 GCGTCAACACGCTCTTCGGCGTCTGTTCTGTTGCGAGTGGCGCTCGCAGCCTATGTCATCGAGCGCGATATCCAACCGGAA
   CGCAGTGGTGCGAGAAGCCGAGCAAGACAAGCGTCACCGCGAGCGTCGGATACAGTAGCTCGCGCTATAGGTTGGCCTT
                                                                 3' - CGCTATAGTTGGCCTT

gcGaaCGGCAGCATTCCCCAGGCAATG-3' (3659)
481 AAGTTCCGGCAGCATTCCCCAGGCAATGTGGTGGGCGGTGGTCACGCTGTCCACCACCGGCTATGGGGACACTATCCCGCA
   TTCAAGCCGTCGTAAGGGGTCCGTTACACCACCCGCCACCAAGTGCGACAGGTGGTGGCCGATACCCCTGTGATAGGGCGT
   TTCAAGatagcatActacaCgGcctaAtacg-5' (3658)

561 AAGCTTCGCCGGCCGCGTCTTGCCGGGGCGGTGATGAGTGGCATCGGCATCTTCGGACTCTGGGCCGGCATTCTTG
   TTCGAAGCGGCCGGCGCAGGAACGGCCCCGCCAGTACTACTACCGTAGCCGTAGAAGCCTGAGACCCGGCCGTAAGAAC

641 CCACAGGCTTCTATCAAGAAGTCCGTGCGGGGATTTCGTCCGCAATTGGCAATTGGTCGCCGCCGTGCCGTTGTTTCAG
   GGTGTCCGAAGATAGTTCTTCAGGCAGCGCCCTAAAGCAGGCGTTAACCGTTAACAGCGGCGGCACGGCAACAAAGTC

721 AAGCTCGGCCCGGCCGTGCTGGTCGAGATCGTGCAGCCTTAAGAGCCCGCACGGTGCCGGCGGGCGCGGTGATCGCCG
   TTCGAGCCGGGCCGGCACGACCAGCTCTAGCACGCGCGGAATTCTCGGGCGTGCCACGGCCGCCCGCGGCACTAGACGGC

801 CATTGGCGAGCCCGCGATCGGATGTTCTTCGTCTGGAGGGAGCGTCAGCGTCGCGACGCCGAATCCGGTGGAGCTTG
   GTAACCGCTCGGGCCGCTAGCCTACAAGAAGCAGCACTCCCTCGCAGTCGACGCGCTGCGGCTTAGGCCACCTCGAAC

881 GCCCTGGCGCCTTCTTCGGCGAGATGGCGCTGATCAGCGGCGAACCAGCTTCGGCGACCGTCAGCGCCGCAACGACGGTC
   CGGGACCGCGGAAGAAGCCGCTCTACCGCGACTAGTCGCGCTTGGCGCAAGCCGCTGGCAGTCGCGGCGTTGCTGCCAG

961 TCACTCTGTCTGCTGCAATTCGGCGGATTTCCAGATGTTGTGACGAGCAGAGCCCGGAGATCGCGGAAATCTTCGCAAGAC
   AGTGAGGACAGCGACGTAAGCCGCTAAAGGTCTACAACACGTCGTCGTCGGGCTCTAGCGCCTTTAGAAGGCGTTCTG

1041 CGCGCTCGAGCGTCGCGGCGCTGCGGCGAGCGCTTGACCGTTTCTCGGCGATCAGCCGAAATGCTGAAGGCGAAATGT
   GCGCGAGCTCGCAGCGCCGCGACGCCGCTCGCGAACTGGCAAAGGAGCCGCTAGTCGGGCTTTACGACTTCCGCTTTACA

1121 TATTCCCTGCAGGCGGAAATGCTTCTCTGGCGCACCGGCTACCGTGCCGATCCGCTGAAGTTCGATGGCTCGATCAAGTC
   ATAAGGAGCGTCCGCCCTTTACGAAGAGACCGGTGGCCGATGGCACGGCTAGGCGACTTCAAGCTACCGAGCTAGTTCAAG
                                                                 3' - G

1201 GCTTCTCACGATCTATGAGTCTAGA
     CGAAGAGTGCTAGATACTCAGATCT
     CGAAGAGTGCTAGATACTCAGATCTtat-5' (3323)

```

Herstellung des Konstruktes pGMICNBD-5

```

1  GGATCCACCATGTCGGTACTGCCTTTCTTAAGAATTTACGCGCCGCTCAACGCGGTGCTGGCTGCGCCTGGGTTGCTGGC
   CCTAGGTGGTACAGCCATGACGGAAAGAATTCTTAAATGCGCGGCGAGTTGCGCCACGACCGACGCGGACCCAACGACCG

81  GGTGGCTGCGCTCACGATACCGGACATGTCCGGACGAAGCAGACTGGCTCTGGCTGCCCTGCTCGCTGTCATCTGGGGCG
   CCACCGACGCGAGTGCTATGGCCTGTACAGGCTGCTTCGTCTGACCGAGACCGACGGGACGAGCGACAGTAGACCCCGC

161 CCTATCTCTGCAACTGGCCGCGACGCTGCTCAAGCGCCGGGCGGGAGTCGTACGGGACAGGACGCCAAAATCGCCATC
   GGATAGAGGACGTTGACCGGCGCTGCGACGAGTTGCGGGCCGCCCCACGATGCCCTGTCTGCGGGTTTTAGCGGTAG

241 GATGTGCTCGCAGTCTTGTTTCCACTCGCCGCAATTTCTGCTCGACGGCTCGCCTGACTGGAGCCTCTACTGTGCTGTCTG
   CTACACGAGCGTCAGAACCAAGGTGAGCGGCGTAAAGACGAGCTGCCGAGCGGACTGACCTCGGAGATGACACGACAGAC

321 GCTGCTGAAACCGCTGCGCGACTCGACTTTCTTCCCGGTCTGGGACAGGGTCTGGCCAACGAAGCACGAATCTGATCG
   CGACGACTTTGGCGACGCGCTGAGCTGAAAGAAGGGCCAGGACCCGTCCAGGACCGGTTGCTTGTGCGTTAGACTAGC

401 GCGTACACACGCTCTTCGGCGTCGTTCTGTTCGACGTGGCGCTCGCAGCCTATGTCATCGAGCGCGATATCCAACCGGAA
   CGCAGTGGTGCGAGAAGCCGACGACGAAGACAAGCGTACCGCGAGCGTCGGATACAGTAGCTCGCGCTATAGGTTGGCCTT

481 AAGTTCGGCAGCATTCCCCAGGCAATGTGGTGGGCGGTGGTCACGCTGTCCACCACCGGCTATGGGGACACTATCCCGCA
   TTCAAGCCGTCGTAAGGGTCCGTTACACCACCCGCCACCACTGCGACAGGTGGTGGCCGATACCCCTGTGATAGGGCGT

561 AAGTTTCGCCGGCGCGCTCTTGCCGGGCGGTCATGATGAGTGGCATCGGCATCTTCGGACTCTGGGCCGGCATTCTTG
   TTCGAAGCGGCGGCGCAGGAACGGCCCCGCGAGTACTACTACCGTAGCCGTAGAAGCCTGAGACCCGGCCGTAAGAAC

      5' - cggaTccCAAGAAGTCCGTCGCGG - 3' (3989)
641 CCACAGGCTTCTATCAAGAAGTCCGTCGCGGGGATTTCTGTCGCAATTGGCAATTGGTCGCCGCCGTGCCGTTGTTTCAG
   GGTGTCCGAAGATAGTTCTTCAGGCAGCGCCCTAAAGCAGGCGTTAACCGTTAACAGCGGCGCACGGCAACAAAGTC

721 AAGCTCGGCCCGGCGCTGCTGGTCGAGATCGTGCAGCCTTAAGAGCCGCGACGGTGCCGGCGGGCGCCGTGATCTGCCG
   TTCGAGCCGGGCGGCGACGACCACTCTAGCACGCGCGAATTCTCGGGCGTGCCACGGCGCCGCGGCGACTAGACGGC

801 CATTGGCGAGCCCGGCGATCGGATGTTCTTCGTCGTGGAGGGGAGCGTCAGCGTCGCGACGCCGAATCCGGTGGAGCTTG
   GTAACCGCTCGGGCCGCTAGCCTACAAGAAGCAGCACTCCCTCGCAGTCGACGCGCTGCGGCTTAGGCCACCTCGAAC

881 GCCCTGGCGCTTCTTCGGCGAGATGGCGCTGATCAGCGGCGAACCAGGTTTGGCGACCGTCAGCGCGCAACGACGGTC
   CGGGACCGGGAAGAAGCCGCTCTACCGCGACTAGTCGCGCTTGGCGCAAGCCGCTGGCAGTCGCGGCGTTGCTGCCAG

961 TCACTCCTGTCGCTGCATTGGCGGATTTCCAGATGTTGTGCGAGCAGAGCCCGGAGATCGCGGAAATCTTCGCAAGAC
   AGTGAGGACAGCGACGTAAGCGCCTAAAGGTCTACAACACGTCGTCGTCGGGCTCTAGCGCCTTTAGAAGGCGTTCTG

1041 CGCGCTCGAGCGTCGCGGCGCTGCGGCGAGCGCTTGACCGTTTCTCGGCGATCAGCCGAAATGCTGAAAGGCGAAATGT
   GCGCGAGCTCGCAGCGCCGCGACGCCGCTCGCGAAGTGGCAAAGGAGCCGCTAGTCGGGCTTTACGACTTCCGCTTTACA
      3' - GCGACGCCGCTCGCGAgacttaAggc - 5' (3990)

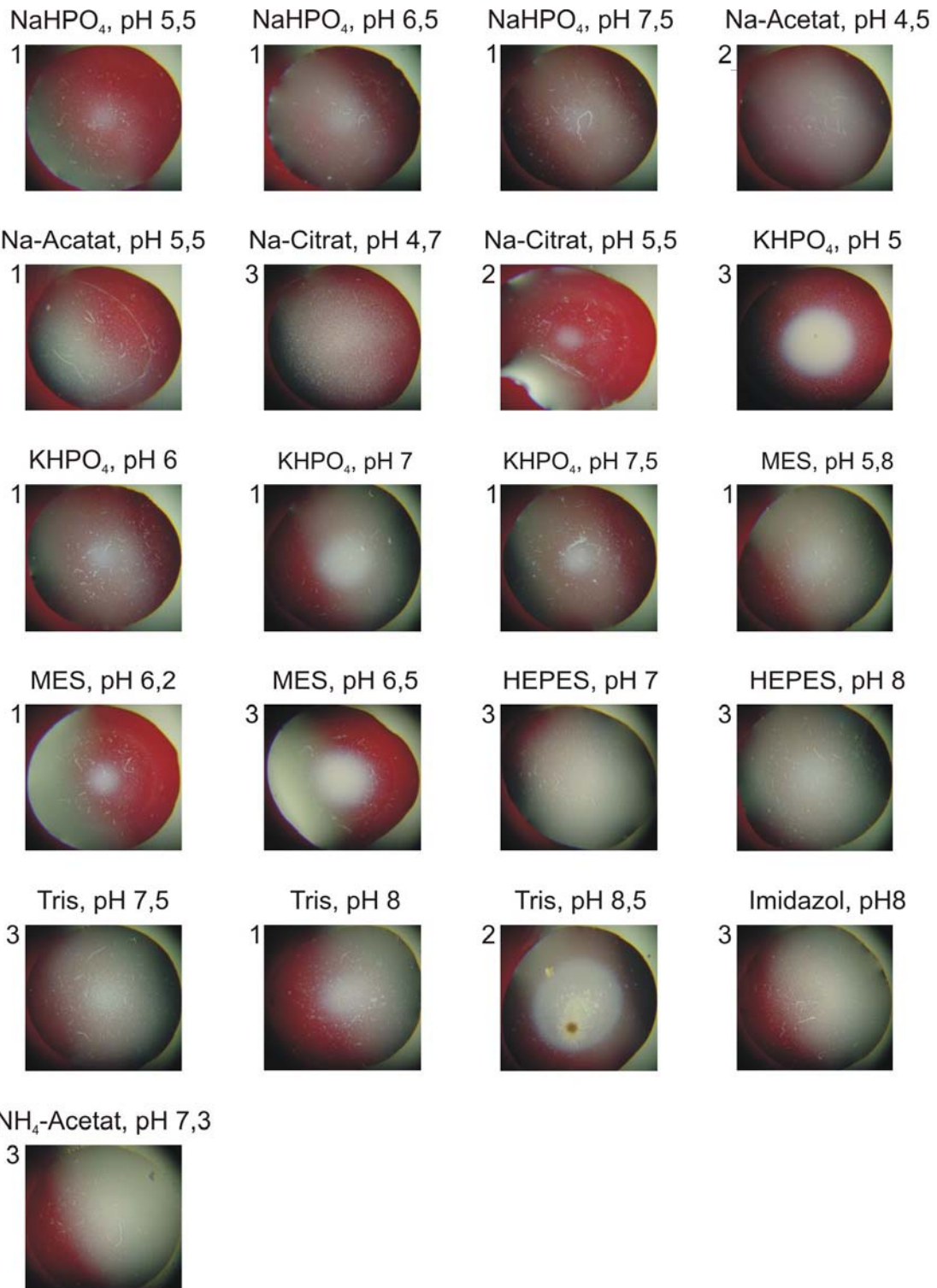
1121 TATTCCTGACGGCGGAAATGCTTCTCTGCGCACCGGCTACCGTGCCGATCCGCTGAAGTTCGATGGCTCGATCAAGTC
   ATAAGGGACGTCGCCCTTTACGAAGAGACCGCGTGCCGATGGCACGGCTAGGCGACTTCAAGCTACCGAGCTAGTTCAG

1201 GCTTCTCACGATCTATGAGTCTAGA
      CGAAGAGTGCTAGATACTCAGATCT

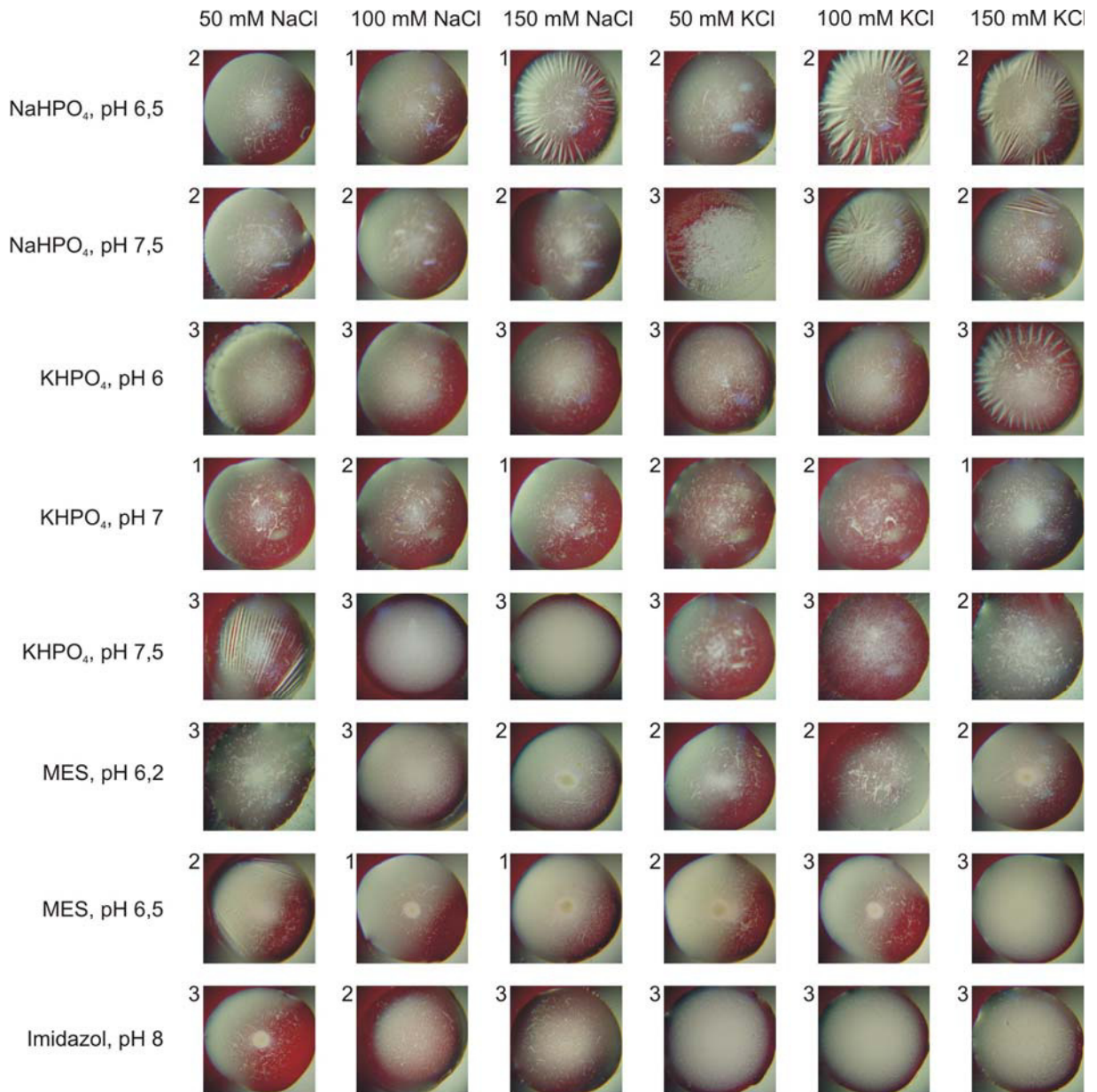
```

6.3 Auswertung der „Micro-Drop“-Analyse

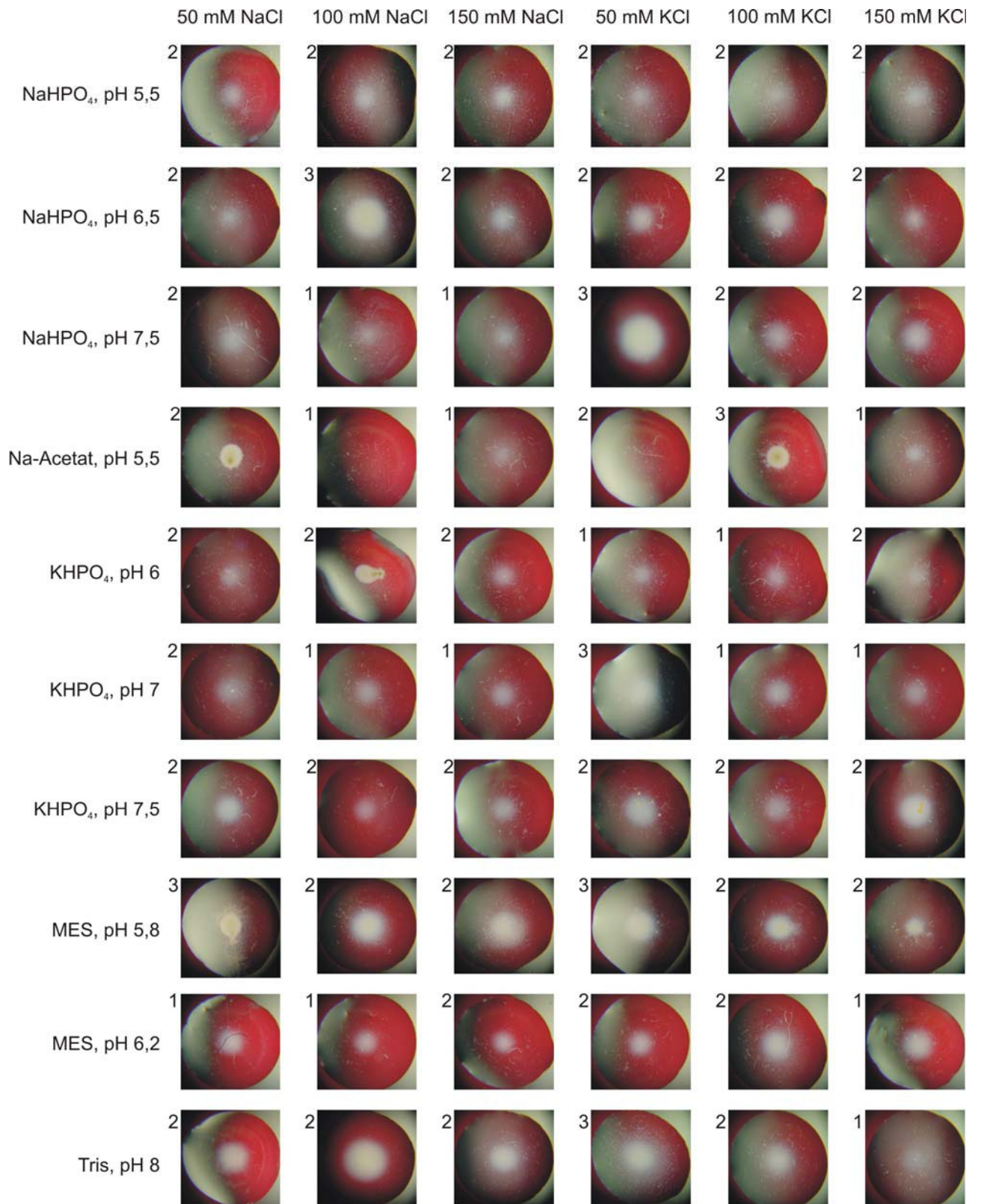
cAMP-gebundene Form des MICNBD-Proteins: Gezeigt ist eine „Micro-Drop“-Analyse mit verschiedenen Puffersystemen.



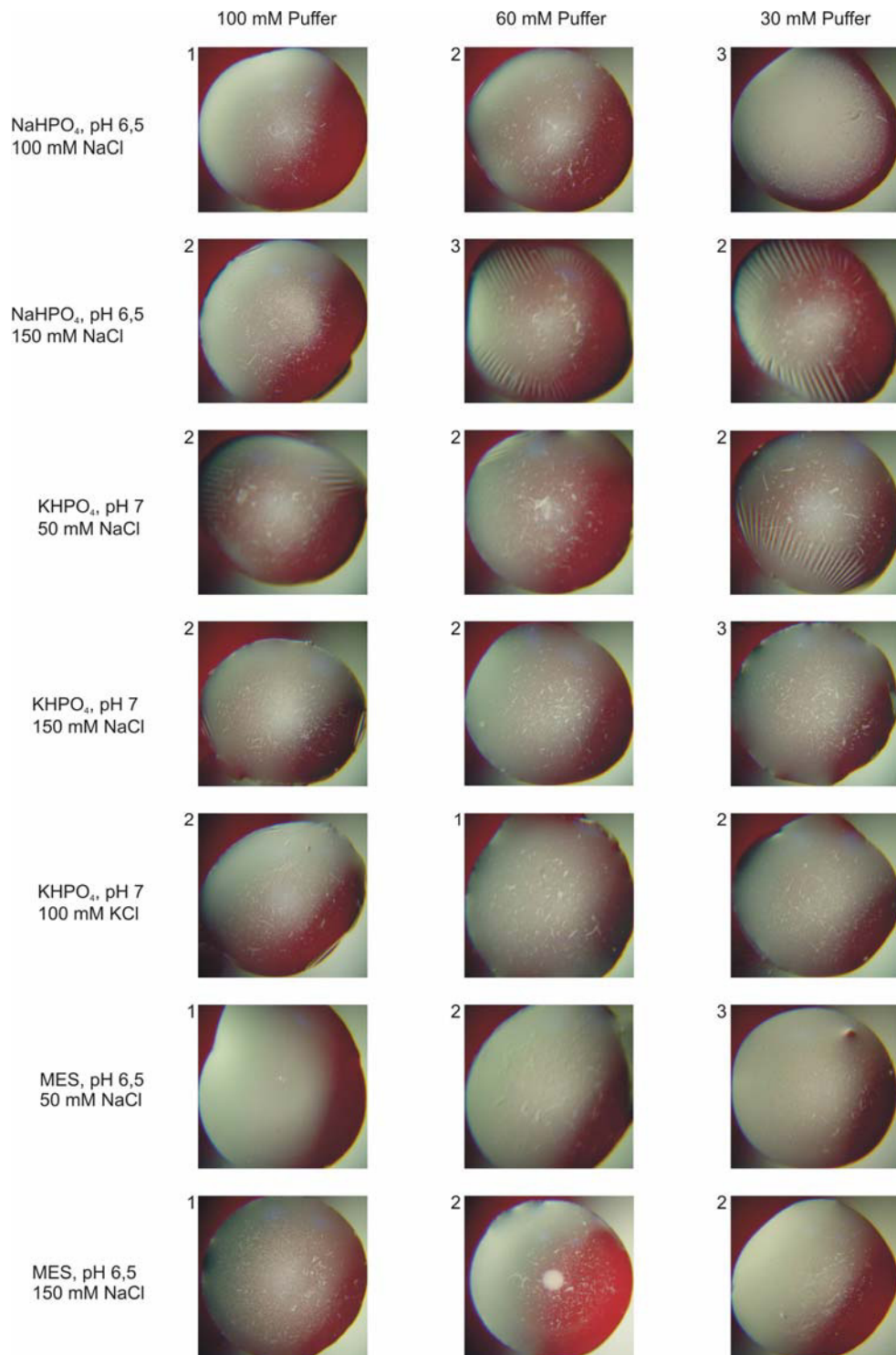
cAMP-freie Form des MICNBD-Proteins: Gezeigt ist eine „Micro-Drop“-Analyse mit verschiedenen Puffersystemen und Zusatz von unterschiedlichen NaCl- und KCl-Konzentrationen.



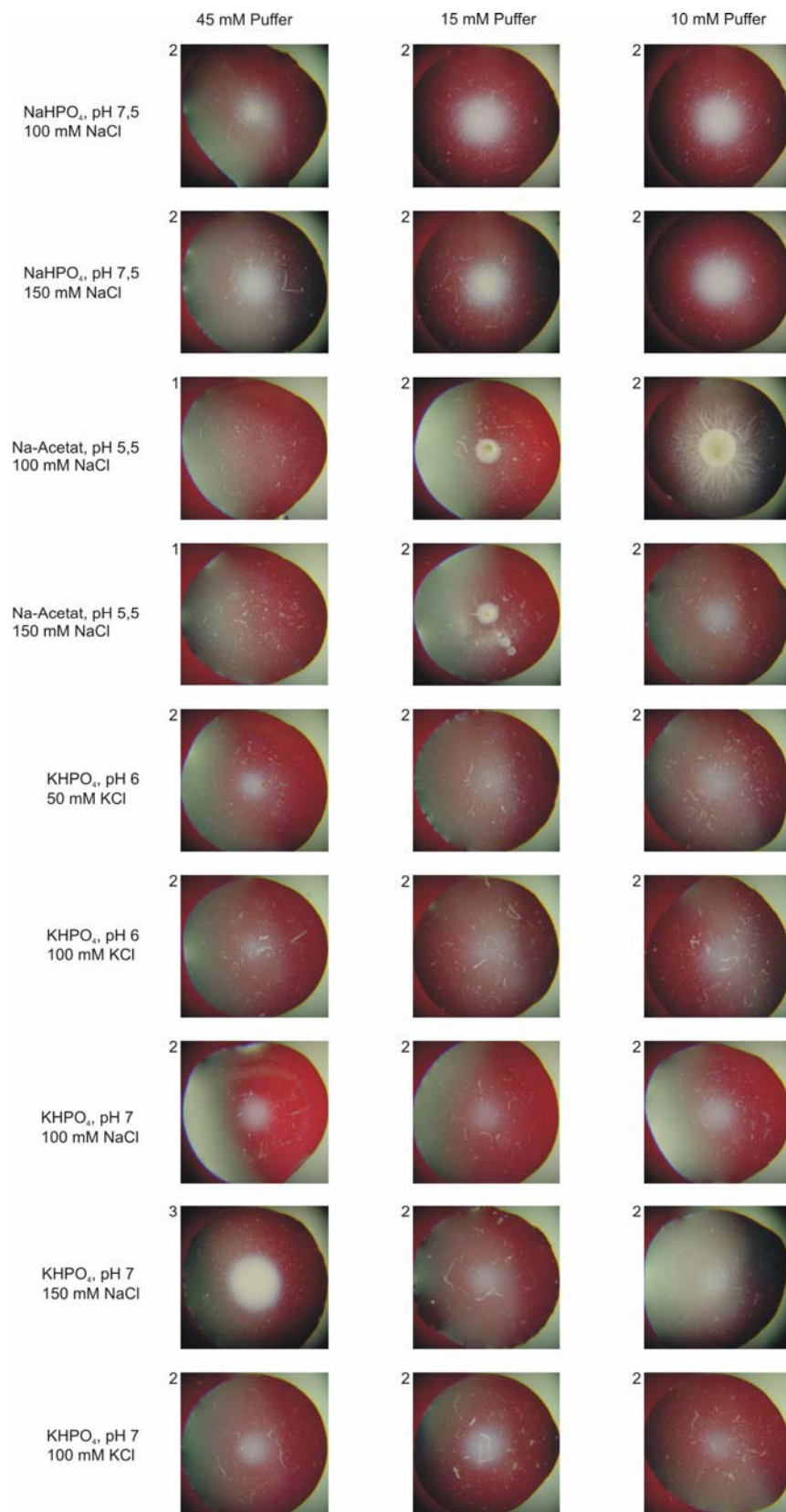
cAMP-gebundene Form des MlCNBD-Proteins: Gezeigt ist eine „Micro-Drop“-Analyse mit verschiedenen Puffersystemen und Zusatz von unterschiedlichen NaCl- und KCl-Konzentrationen.

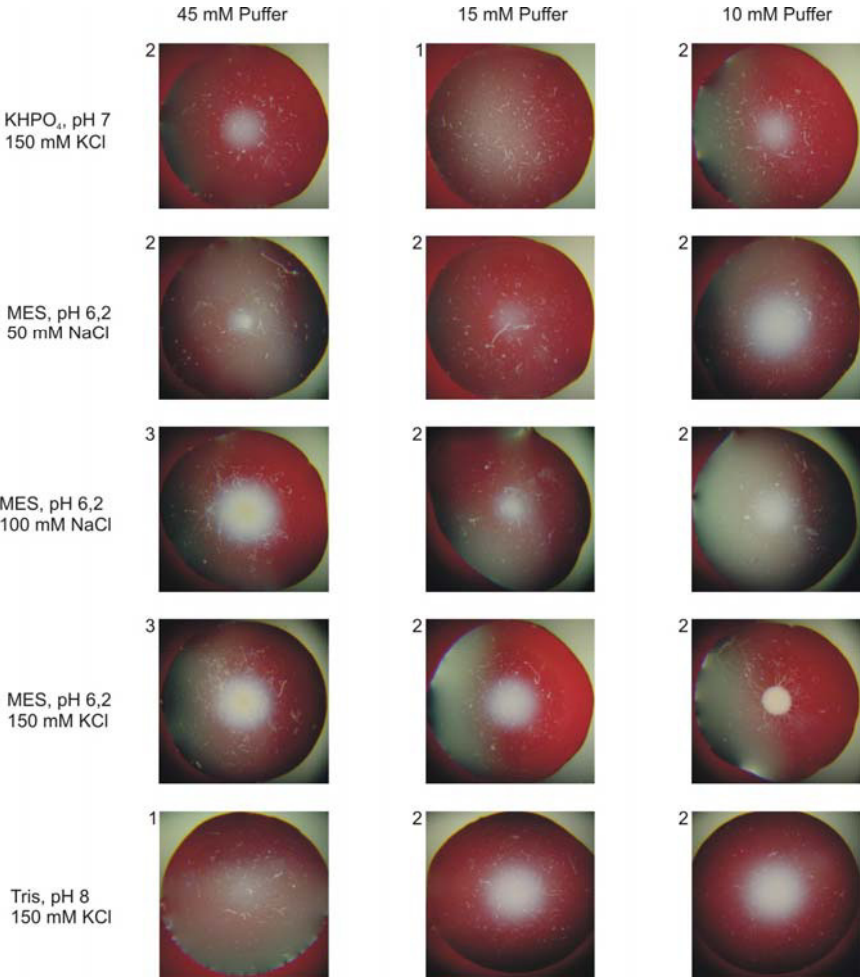


cAMP-freie Form des MICNBD-Proteins: Gezeigt ist eine „Micro-Drop“-Analyse mit verschiedenen Puffersystemen und Salzzusätzen. Die Konzentrationen der Puffer wurden variiert.



cAMP-gebundene Form des MlCNBD-Proteins: Gezeigt ist eine „Micro-Drop“-Analyse mit verschiedenen Puffersystemen und Salzzusätzen. Die Konzentrationen der Puffer wurden variiert.





Danke

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

- Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas, die Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft.
 - Dr. R. Seifert für seine hilfreiche Unterstützung und Betreuung während meiner Arbeit.
 - Dr. W. Bönigk für seine stete Hilfsbereitschaft in allen Dingen der Molekularbiologie und für die Abwechslung und den Ausgleich während meiner Zeit im Forschungszentrum.
 - Dr. Q. Van für die Durchsicht meiner Arbeit und die aufbauenden Worte während des Zusammenschreibens.
 - J. Schmitz für seine tatkräftige Unterstützung während meiner Doktorarbeit.
 - S. Schünke für die Durchführung der NMR-Messungen.
 - B. Grüter für die Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit.
 - Frau M. Bruns für die unentbehrliche Hilfe in der Zellkultur.
 - Frau A. Eckert für die verwaltungstechnische Betreuung.
 - R. Esser für seine freundliche Hilfe bei technischen und organisatorischen Problemen.
 - D. Portz für die Hilfe bei allen technischen Problemen.
 - Dr. M. Oldiges und H. J. Brandt für die Durchführung der Fermentation.
- Prof. Dr. P. Kloppenburg möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, die mich immer unterstützt hat und mir in jeder Lebenslage Sicherheit und Rückhalt gibt.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4224
August 2006
ISSN 0944-2952