

Zusammenfassung

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

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

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

Abstract

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

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

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