

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 MlcNMP 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.