

# Zusammenfassung

Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat (cAMP) ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der die Aktivität vieler Proteine reguliert. Eine Gruppe dieser Proteine besitzt eine konservierte Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD). Ionenkanäle (HCN/CNG), Nukleotidaustauschfaktoren (EPACs), Proteinkinasen (PKA/PKG) und Transkriptionsfaktoren (CAP) werden durch diese CNBD reguliert. Ich habe die Dynamik der CNBD, am Beispiel der isolierten CNBD des zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals (mlCNG-Kanals) aus dem Bakterium *Mezorhizobium loti*, untersucht.

Zunächst habe ich die Kinetik der Ligandenbindung mit der „stopped flow“-Technik bzw. der Blitzlichtphotolyse des neuen *caged compound* BCMACM-8-NBD-cAMP gemessen. Es zeigte sich, dass die Assoziationsraten nicht diffusionslimitiert sind und für die beiden Liganden cAMP und 8-NBD-cAMP bei circa  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  liegen. Die R348A-Mutante der CNBD besitzt eine ungefähr 350-fach niedrigere Affinität für 8-NBD-cAMP, was interessanterweise ausschließlich auf die Dissoziationsrate zurückzuführen ist; die Assoziationsrate bleibt durch den Aminosäureaustausch unverändert. Gemeinsam mit neusten Erkenntnissen aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen der CNBD deutet das an, dass die ligandeninduzierte Strukturänderung einem „induced fit“-Mechanismus folgt, d. h. die Strukturänderung eine Folge der Ligandenbindung ist.

Die Dynamik der CNBD, insbesondere der Sekundärstrukturelemente, wollte ich durch zeitaufgelöste Abstandsänderungen messen. Intramolekulare Abstände ungepaarter Elektronen können mit Hilfe der „double electron-electron resonance“-Methode bestimmt werden. Um möglichst viele strukturelle Zwischenstufen auf dem Weg von der ligandenfreien zur -gebundenen CNBD untersuchen zu können, sollte die CNBD zu verschiedenen Zeitpunkten nachdem sie mit Ligand gemischt wurde, eingefroren werden. Dafür habe ich eine „microsecond freeze-hyper quenching“-Anlage mit einem dynamischen Bereich von 80  $\mu\text{s}$  bis etwa 20 ms gebaut. Ungepaarte Elektronen sollten durch *site-directed spin labeling* in das Protein eingebaut werden. Das habe ich sowohl mit Hilfe der unnatürlichen Aminosäure p-Acetylphenylalanin als auch über Cysteine versucht. Mit keiner der beiden Strategien konnte eine ausreichende Menge markierten Proteins präpariert werden. Durch eine Verbesserung des Markierungsprotokolls sollte es jedoch möglich sein, ausreichende Mengen markierten Proteins herzustellen und die Dynamik der CNBD zu messen.