

## Zusammenfassung

Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle spielen eine entscheidende Rolle in kardialer und neuronaler Erregbarkeit sowie in der Signaltransduktion primärer Sinneszellen. Die direkte Bindung zyklischer Nukleotide aktiviert die Kanäle und führt zu einer erhöhten Membranleitfähigkeit der Zelle. Obwohl viel über die Funktion dieser Ionenkanäle bekannt ist, sind die molekularen Ereignisse, die von der Ligandenbindung zur Kanalöffnung führen, weitgehend unbekannt.

Ich habe mich in meiner Arbeit mit der Ligandenbindung prokaryotischer zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle beschäftigt. Einer dieser Ionenkanäle, der zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanal des stickstofffixierenden Bakteriums *Mesorhizobium loti* (mICNG), eignete sich besonders gut für biophysikalische Untersuchungen. Eine der Hauptfragestellungen, an denen ich arbeitete, war, in welcher Weise sich das Schaltverhalten des Ionenkanals auf die Ligandenbindung auswirkt. Ich habe Bindungsstudien sowohl an dem tetrameren mICNG-Kanal als auch an der isolierten ligandenbindenden Domäne (CNBD) durchgeführt. Die Affinität der zyklischen Nukleotide zum mICNG-Kanal sowie zur CNBD wurde mit spektroskopischen Methoden bestimmt. Beide Proteine, der tetramere Ionenkanal und die isolierte CNBD binden cAMP nicht-kooperativ mit sehr ähnlicher Affinität. Diese Ergebnisse deuten an, dass entweder nur ein sehr geringer Teil der Bindungsenergie für die Aktivierung benötigt wird, oder aber, dass die Konformationsänderungen, die innerhalb der CNBD stattfinden, schon den eigentlichen Aktivierungsschritt des Ionenkanals darstellen.

Ich habe Kristallographieansätze für den mICNG-Kanal durchgeführt. Ich konnte zweidimensionale Proteinkristalle züchten, die in einem quadratischen Gitter angeordnet waren. Die Proteine zeigten eine tetramere Symmetrie und waren antiparallel angeordnet. Der Kristall beugte zu etwa 15 Å. Dies ist eine gute Ausgangsposition für weitere Arbeiten, um schließlich die Struktur des Ionenkanals in atomarer Auflösung zu erhalten.

## Abstract

Ion channels gated by cyclic nucleotides have crucial roles in cardiac and neuronal excitability and in signal transduction of sensory neurons. On binding cyclic nucleotides these channels are activated, which results in an increase in membrane conductance. Although a lot of information is available on the function of these channel proteins, the molecular events that relay ligand binding to channel activation is not well understood.

Here, I studied ligand binding of prokaryotic cyclic nucleotide-activated  $K^+$  channels. One of them, the mCNG channel from the nitrogen-fixing bacterium *Mesorhizobium loti* was suitable for biophysical characterization. One of the key questions that I worked on was how gating of the channel affects its ligand binding properties? I performed ligand binding studies on the tetrameric mCNG protein and its isolated cyclic nucleotide-binding domain (CNBD). Affinity of cyclic nucleotides to the full-length mCNG protein and to the CNBD was determined using spectroscopic methods. Both, the mCNG channel and the CNBD bind cAMP in a non-cooperative manner with similar binding affinity. These results indicate that either no appreciable binding energy is required for activation, or the conformational change in the CNBD is the activation step itself.

Crystallography experiments were performed on the mCNG channel. Two-dimensional crystals were obtained in which the channel proteins were ordered in a square lattice. The channel proteins were assembled as tetramers and were arranged in a head-to tail fashion. The crystal diffracts to 15 Å. This is an excellent starting condition for future work to eventually obtain a structure at atomic resolution.