

FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG FLUORESZENZMARKIERTER
AGONISTEN AN ZYKLISCH-NUKLEOTID AKTIVierten IONENKANÄLEN

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl.-Pharmazeut Maik Otte
geboren am 24.04.1990 in Magdeburg

Gutachter

1. Prof. Dr. Klaus Benndorf, Jena
2. Prof. Dr. Stefan Schulz, Jena
3. Prof. Dr. Christoph Fahlke, Jülich

Tag der öffentlichen Verteidigung: 23.03.2021

Für meine Familie

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	4
II. Abkürzungsverzeichnis	7
1. Zusammenfassung/Abstract	8
1.1 Zusammenfassung.....	8
1.2 Abstract.....	10
2. Einleitung	11
2.1 Ionenkanäle.....	12
2.1.1 CNG-Kanäle.....	13
2.1.2 Aufbau und Struktur	15
2.2 Zyklische Nukleotide	18
2.2.1 Modifikationen an der Purinbase.....	20
2.2.2 Modifikationen an den Sauerstoffatomen des Phosphates und der Ribose ..	21
2.2.3 Modifikationen mit Fluorophoren	22
2.3 Protein-Ligand-Wechselwirkung.....	23
2.3.1 Ligandenbindung.....	25
2.3.2. Ionenkanalaktivierung	27
2.3.3 Modell der Aktivierung am CNGA2-Kanal	28
2.4 Farbstoffe	29
2.4.1 Molekülstruktur eines Fluorophores	30
2.4.2 Fluorophorgruppen.....	31
2.4.3 Kriterien eines geeigneten Farbstoffes.....	33
3. Zielstellung	34
4. Methodik.....	36
4.1 Lösungen	36
4.2 Zellkultur und Molekularbiologie	36
4.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	36
4.2.2 Oozytenpräparation und Injektion	37
4.3 Elektrophysiologie	37
4.3.1 <i>Patch-Clamp</i> -Technik.....	37
4.3.2 <i>Patch-Clamp</i> -Pipetten	38

4.3.3 <i>Patch-Clamp</i> -Messstand	39
4.3.4 <i>Patch-Clamp</i> -Protokolle	40
4.4 <i>Patch-Clamp</i> -Fluorometrie	41
4.4.1 Konfokale <i>Patch-Clamp</i> -Fluorometrie (cPCF)	41
4.4.2 cPCF-Pipetten	42
4.4.3 cPCF-Messstand	42
4.4.4 cPCF-Protokolle	43
4.5 Fluoreszenzspektren (Lambda-Modus)	43
4.6 Datenanalyse	44
4.6.1 Bestimmung der Gleichgewichtsaktivierung	44
4.6.2 Konzentrations-Aktivierungsbeziehung	44
4.6.3 Bestimmung der Ionenkanalkinetiken	45
4.6.4 Konzentrations-Bindungsbeziehung	45
4.7 Homologie-Modell und Docking	47
5. Ergebnisse	48
5.1 Native Liganden der olfaktorischen CNG Ionenkanäle	48
5.2 Modifikationen und Substitutionen an der Nukleobase	49
5.3 Substitution der cNMP mit Linkerkette	52
5.3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung verschiedener aliphatischer Kohlenwasserstoffketten an Position 8	53
5.3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung verschiedener aliphatischer Kohlenwasserstoffketten mit Heteroatomen an Position 8	55
5.3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung aromatischer Kohlenwasserstoffe an Position 8	57
5.3.4 Kinetische Charakterisierung von 1 _G und L5 _G	58
5.4 Substitution der cNMP mit Linker und Farbstoff	60
5.4.1 Elektrophysiologische Charakterisierung des Einflusses der Linkerlänge auf die Liganden-Rezeptor-Interaktion	62
5.4.2 Elektrophysiologische Charakterisierung weiterer Farbstoffe an Position 8	63
5.4.3 Optische Charakterisierung der fluoreszierenden Liganden (cPCF)	65
5.5 Hill-Koeffizienten	70
5.6 Dockingexperimente der Liganden	73

6. Diskussion	77
6.1 Konzentrations-Aktivierungs-/Bindungs-Beziehungen.....	77
6.2 Optimierung des Linkers	79
6.3 Optimierung und Nutzen eines neuen fluoreszierenden Liganden	81
6.3.1 Helligkeit.....	82
6.4 Vergleich mit anderen fluoreszenzmarkierten Liganden.....	84
6.5 Vergleich mit anderen CNBD-enthaltenden Proteinen	86
6.6 CN und CNBD	88
6.6.1 Affinität der Liganden	88
6.6.2 Konformation der Liganden	89
6.7 Ausblick.....	92
7. Schlussfolgerungen	93
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	95
8.1 Eigene Publikationen.....	107
8.1.1 Projektrelevante Artikel	107
8.1.2 Nicht-Projektrelevante Artikel	107
8.1.3 Poster.....	107
9. Anhang	108
9.1 Übersichtsblatt.....	108
9.2 Abbildungen	109
9.3 Tabellen	110
9.4 Abbildungsverzeichnis.....	112
9.5 Tabellenverzeichnis.....	113
9.6 Ehrenwörtliche Erklärung	114
9.7 Danksagung	115

II. Abkürzungsverzeichnis

AC	- Adenylylcyclase
AD	- Außendurchmesser
AG	- Arbeitsgruppe
Ag/AgCl	- Silber/Silberchlorid
AS	- Aminosäure
ATP	- Adenosintriphosphat
AU	- Airy unit
bzw.	- beziehungsweise
CAP	- katabolisch aktiviertes Protein (<i>catabolite activator protein</i>)
cAMP	- zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	- zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
CNBD	- zyklische Nukleotid-Bindungsdomäne
cNMP	- zyklisches 3',5'-Nukleotidmonophosphat
cPCF	- konfokale <i>Patch-clamp</i> Fluorometrie (<i>confocal patch-clamp fluorometry</i>)
Cryo-EM	- Kryoelektronenmikroskopie
Dtl.	- Deutschland
EAG-Kanäle	- <i>ether-à-go-go</i> -Kanäle
EGTA	- Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPAC	- Guaninnukleotidaustauschfaktor (<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>)
GC	- Guanylylcyclase
HEPES	- 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ID	- Innendurchmesser
IUPAC	- Internationale Union für reine und angewandte Chemie (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LSM	- Laser-Scanning-Mikroskop, Laserrastermikroskop
N.A.	- Numerische Apertur
NBD	- 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NMR	- Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
Nr.	- Nummer
ORN	- olfaktorische Rezeptorneurone
PDI	- Perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimide
PDE	- Phosphodiesterase
PKA	- Proteinkinase A
PKG	- Proteinkinase G
PTFE	- Polytetrafluorethylen („Teflon“)
RMSD	- Wurzel der mittleren Abweichungsquadrante (<i>root-mean-square deviation</i>)
SEM	- Standardfehler des arithmetischen Mittels
sog.	- sogenannte
VSLD	- Spannungssensordomäne (<i>voltage-sensor-like domain</i>)

1. Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die Nukleotide cAMP und cGMP sind intrazelluläre, sekundäre Botenstoffe und agieren unter anderem als Agonisten an zyklisch-Nukleotid aktivierten (CNG)-Ionenkanälen. Somit besitzen die kleinen Signalmoleküle eine Schlüsselstellung in der Entwicklung von Rezeptorpotentialen im visuellen und olfaktorischen System, indem diese durch Bindung an die Ionenkanäle eine Aktivierung hervorrufen. Dabei ist cAMP der native Ligand der olfaktorischen CNGA2:A4:B1b-Kanäle, jedoch besitzt cGMP eine höhere scheinbare Affinität.

Durch die ebenfalls hohe Affinität an den homotetrameren CNGA2-Kanälen wurde in vorherigen Studien ein fluoreszierender Ligand (fcGMP) entwickelt, welcher einen Farbstoff enthält, der mithilfe eines Aminoethylthio-Linkers an Position 8 des Nukleotides verbunden ist. Bei der konfokalen *Patch-clamp* Fluorometrie (cPCF) wird die Aktivierung synchron zur Bindung gemessen (Biskup et al. 2007).

Hierbei wurde eine große Anzahl an neuen Liganden synthetisiert und mittels elektrophysiologischer Methoden die Wirkung auf CNG-Kanäle, welche in *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimiert wurden, charakterisiert. Dabei wurden sowohl die scheinbare Affinität als auch die kinetischen Eigenschaften in der *inside-out* Konfiguration ermittelt. Für die Bestimmung weiterer Kennwerte, wie Bindung, Helligkeit und Fluoreszenzspektren diente die cPCF.

Um die publizierten cPCF Experimente (Biskup et al. 2007) auf Einzelmoleküllevel zu beobachten, benötigt es neue Liganden mit verbesserter Affinität und photo-physikalischen Eigenschaften. Um die Affinität und die molekulare Helligkeit eines fluoreszierenden Liganden zu optimieren, wurden drei Möglichkeiten verfolgt. (1) Zum einen wurde das zyklische Nukleotid durch eine Deaza-Purinbase ersetzt und die scheinbare Affinität um das 25-fache verbessert. (2) Zum anderen wurde die Länge sowie die Polarität der Linker variiert wodurch gezeigt wurde, dass ausgedehnte aliphatische Kohlenwasserstoffketten zwischen Nukleotid und Farbstoff einen positiven Effekt auf die scheinbare Affinität haben. Beispielsweise konnte die mittlere effektive Konzentration (EC_{50} -Wert), die beim homotetrameren CNGA2-Kanal für cAMP (**1_A**) 54,8 μ M beträgt, mit 8-Aminodecylthio-cAMP (**L6_A**) auf 0,63 μ M gesenkt werden. (3) Durch einen Wechsel des Farbstoffes konnte zusätzlich zur erhöhten Affinität auch die Helligkeit verbessert werden. Dabei traten besonders die Farbstoffe DY557 und Cy3B hervor.

Somit wurde eine Optimierung des fluoreszierenden Liganden durch die angeführten Möglichkeiten beobachtet. Die Ergebnisse eröffnen neue Wege, um die Aktivierungsmechanismen von Ionenkanälen sowie Proteine mit ähnlichen Bindungsdomänen besser nachzuvollziehen und zukünftige Experimente auf Einzelmolekülniveau zu ermöglichen.

1.2 Abstract

Both second messenger cAMP and cGMP are agonists of cyclic nucleotide-gated (CNG) channels which belong to the superfamily of tetrameric voltage-gated channels. CNG channels are activated solely by the binding of cyclic nucleotides. Therefore they have a key position in the development of the receptor potential in vision and olfaction. The cAMP is the endogenous ligand of the olfactory CNGA2:A4:B1b channels but cGMP hold a higher apparent affinity.

There is also a higher affinity for cGMP on homotetrameric CNGA2 channels and we used in recent studies the cyanine dye DY547 coupled via an aminoethylthio linker to the 8-position of cGMP (fcGMP), to analyze ligand binding and activation gating in parallel by confocal patch-clamp fluorometry (cPCF).

Using inside-out patches from *Xenopus laevis* oocytes we characterized the apparent affinity and kinetics of the novel ligands. Further parameters like binding affinity, brightness and photo-physical properties were measured by cPCF.

For planned single-channel experiments, ligands with enhanced affinity and optimized fluorescence properties are desirable. To achieve the best fluorescent ligand there are three possibilities to modulate the compound: (1) Replacement of cyclic nucleotides for instance 7-Deaza-purine bases, shows a higher affinity up to twenty-fivefold. (2) The elongation of linker length shifts the EC_{50} value to lower concentrations (homotetrameric CNGA2 channels: cAMP - $1_A = 54.8 \mu\text{M}$; 8-Aminodecylthio-cAMP - $L6_A = 0.63 \mu\text{M}$). As well the lipophilic linkers are more potent than hydrophilic substitutions. (3) The variation of fluorophors is required to find a compound with optimal molecular brightness. In particular DY557 and Cy3B distinguish themselves. Additionally, most of the new fluorescent ligands increase the apparent affinity to the channels.

In conclusion, our results show considerable potential to optimize both the affinity and the brightness of fluorescent cyclic nucleotides presently used. The best of our new derivatives allows the systematic analyze of the activation mechanism in cyclic nucleotide-gated channels as well as proteins containing nucleotide binding domains, at both the level of ensemble and single-molecule analyses.

2. Einleitung

Die Aktivierung von zyklisch-Nukleotid aktivierten Ionenkanälen erfolgt durch die Botenstoffe cAMP und cGMP. Diese kleinen endogenen Moleküle werden oft nach Stimulus bestimmter Rezeptoren einer Zelle von außen durch Transduktion im Zellinneren gebildet. Die Informationen über die Funktionsmechanismen der Nukleotide sind von großer Bedeutung bei der Aufklärung der zellulären physiologischen Prozesse und bedürfen einer intensiven Forschung. Diese Wichtigkeit spiegelt sich in zahlreichen Nobelpreisen (1971, 1992, 1994, 1998, 2000) für die Entdeckungen sowie signifikanten Erkenntnissen von Prozessen, bei denen Nukleotide eine Schlüsselrolle einnehmen, wider (Beavo et Brunton 2002).

Jedoch unterliegen diese potenten Verbindungen bei der Detektion der Limitierung von optischen und zeitlichen Grenzen. Kleine Liganden und Proteine sind mit herkömmlichen Methoden als einzelnes Individuum häufig ohne weitere Markierungen oder Modifikationen kaum auflösbar und ihre Strukturen und Wechselwirkungen bewegen sich unterhalb der beugungsbegrenzten optischen Auflösung (< 200 nm), sodass ihre Eigenschaften aus einer sehr großen Anzahl von Molekülen (Ergodenhypothese) heraus, als Mittelwert für ein einzelnes Molekül gleichgesetzt werden. Um individuelle Wechselwirkungen und Informationen über statische und zeitliche Verteilungen von Individuen zu detektieren, müssen daher Einzelmolekülexperimente durchgeführt werden.

Durch die *Patch-Clamp*-Technik, welche das Messen der Ionenströme durch Ionenkanäle ermöglicht, können viele Eigenschaften, wie Leitfähigkeit oder Offenwahrscheinlichkeit von einzelnen Ionenkanälen ermittelt werden. Ganzheitliche Strukturen von Ionenkanälen lassen sich aber bisher nur mittels Röntgenkristallographie oder Elektronenmikroskopie (EM) erfassen, welche jedoch stark dynamisch ablaufende biologische Prozesse nicht auflösen können.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie können durch Markierungen der Moleküle schnelle kinetische Vorgänge (Lokalisation und Dynamik) detektiert werden. Dabei lassen sich fluoreszierende Objekte als frei diffundierende oder immobilisierte Moleküle im Mikrosekunden- bis Stundenbereich beobachten. Beispielsweise konnte durch die konfokale *Patch-Clamp*-Fluorometrie (cPCF) die Aktivierung von Ionenkanälen parallel zur Bindung der Liganden gemessen werden und somit Modelle für ligandengesteuerte Ionenkanäle erstellt werden (Biskup et al. 2007, Kusch et al. 2010). Einer der für diese Studien verwendeten fluoreszierenden Liganden ist in Abbildung 1

dargestellt. Die Grenzen der Methode sind die Vielzahl von benötigten Ionenkanälen, sodass für die Beobachtung der Ligand-Protein-Bindungseigenschaften auf Einzelkanalniveau andere Techniken benötigt werden. Eine wichtige Technik hierbei ist die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), die Untersuchungen von Molekülen im Femtoliterbereich und das Detektieren von einzelnen Photonen ermöglicht. Die Einzelmolekülspektroskopie kann somit wichtige Informationen über biologische Individuen (fluoreszierende Moleküle) erbringen und Rückschlüsse auf die physiologischen Prozesse zeigen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen grundlegende Kenntnisse über Ionenkanäle, Nukleotide und Farbstoffe ermittelt sowie der Bezug zu den Ergebnissen verdeutlicht werden.

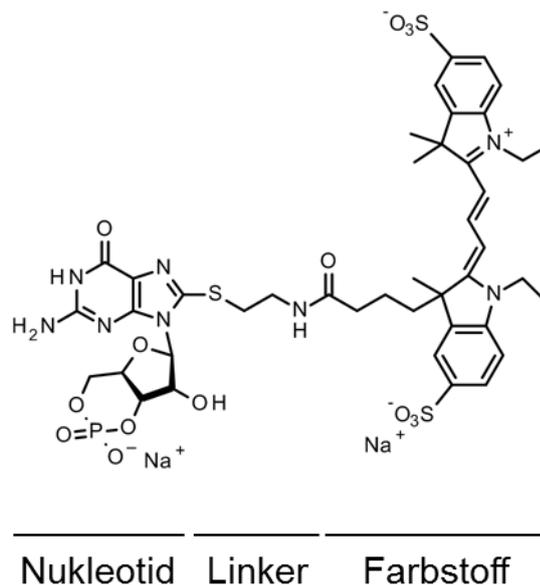


Abbildung 1. Schematische Darstellung der chemischen Struktur von fcGMP (modifiziert nach Biskup et al., 2007). Das Molekül besteht aus dem zyklischen Nukleotid cGMP und dem Farbstoff aus der Cyanin-Gruppe DY547. Beide sind über einen Aminoethylthio-Linker miteinander verbunden.

2.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle setzen sich aus unterschiedlich vielen Untereinheiten zu Poren in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran zusammen, um die Ionenpermeation zu erleichtern. Häufig werden sie nach den Ionen benannt, für die sie spezifisch permeabel sind (Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} -, Cl^- - Kanäle). Zudem kann man die Kanalproteine ebenfalls nach Öffnungs- (*Gating*-) mechanismus einteilen, wie spannungs- oder ligandengesteuert (Hille 2001).

Die im Folgenden erläuterten Ionenkanäle sind unspezifische Kationenkanäle. Der für diese Arbeit wichtigste Ansatzpunkt ist jedoch die ligandenabhängige Modulation.

2.1.1 CNG-Kanäle

Zyklisch-Nukleotid aktivierte (CNG)-Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des olfaktorischen und visuellen Systems in Wirbeltieren. Sie gehören zur Superfamilie der spannungsgesteuerten Kationenkanäle (Pifferi et al. 2006). Aus den sechs Genen, auf denen die CNG-Familie kodiert ist, werden die Untereinheiten CNGA1-4, B1 und B3, welche sich in unterschiedlichen Kombinationen (Abb. 2) in zelltypspezifischen Komplexen zu Tetrameren zusammenlagern, exprimiert (Bradley et al. 2005, Biel et Michalakis 2007). Dabei bilden die A-Untereinheiten homotetramere Ionenkanäle, sodass man die Eigenschaften dieser Untereinheiten klarer definieren kann. Die B-Untereinheiten sind notwendig, um in den Sinneszellen die richtige Assemblierung und Lokalisierung durchzuführen, bilden aber keine homotetrameren Kanäle. Zudem sorgen diese Untereinheiten für die spezifischen biophysikalischen Eigenschaften, wie schnelle Gatingkinetiken, Einzelkanalflickern, veränderte Affinitäten für cNMP, individuelle Permeationseigenschaften und die Regulierung durch Calcium-Ionen (Kaupp et Seifert 2002).

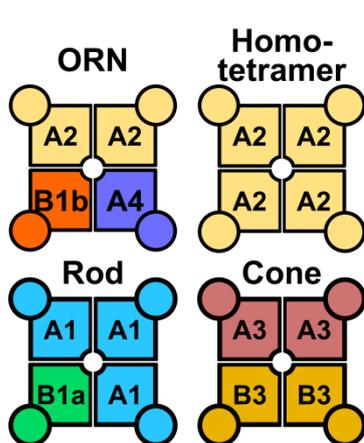


Abbildung 2. Schematische Darstellung der CNG-Ionenkanalisoformen mit den verschiedenen stöchiometrischen Verteilungen der jeweiligen Untereinheiten. Die CNG-Kanäle der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) sind im Geruchssystem implementiert. Die Rod (Stäbchen) und Cone (Zapfen) CNG-Kanäle kommen besonders häufig in den Photorezeptoren des Auges vor. Die CNG-Kanäle bestehen aus vier Untereinheiten die in der Mitte eine Pore (innerer Kreis) zur Ionenpermeation bilden und die jeweils eine eigene Bindestelle für Nukleotide aufweisen (äußerer Kreis); A1 = CNGA1; A2 = CNGA2; A3 = CNGA3; A4 = CNGA4; B1a = CNGB1a; B1b = CNGB1b; B3 = CNGB3. Zusätzlich ist der homotetramere CNGA2-Kanal abgebildet, welcher mit den Kanälen der ORN in dieser Arbeit verglichen wurde. Modifiziert nach Bradley et al., 2005.

2.1.1.1 Vorkommen der CNG-Kanäle

Die verschiedenen Isoformen der Ionenkanäle werden sowohl in Stäbchen (*rod*) oder Zapfen (*cone*) der Photorezeptoren als auch in olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) exprimiert (Kaupp et Seifert 2002). Dabei können sie durch intrazellulär gebildetes cAMP und cGMP aktiviert werden und durch einen Kationeneinstrom zu einer Depolarisation der Zelle führen (siehe Abb. 3). Diese Transduktion von Sinnesreizen in elektrische Signale hilft dabei unterschiedliche Sinneseindrücke zu kodieren und an das Gehirn weiter zu leiten. Es ist nicht auszuschließen, dass die CNG-Kanäle

auch in anderen Regionen des Körpers, wie zum Beispiel im ZNS (Podda et Grassi 2014) sowie in Gefäßen vorkommen (Cheng et al. 2003).

Im Jahre 1985 wurde als erstes Mitglied dieser Kanalfamilie der *rod* CNG-Kanal entdeckt (Fesenko et al. 1985, Yau et Nakatani 1985), woraufhin in kurzer Zeit folgend die *cone* (Cobbs et al. 1985, Haynes et Yau 1985) sowie die olfaktorischen CNG-Kanäle (Nakamura et Gold 1987) in den entsprechenden sensorischen Zellen entdeckt wurden. Erst später konnte die erste Untereinheit CNGA1 aus den Stäbchen von Rindern kloniert (Kaupp et al. 1989) und die genaue Zusammensetzung der einzelnen CNG-Kanäle determiniert werden (Hofmann et al. 2005). Abbildung 2 zeigt die Variation der Untereinheiten. Der olfaktorische CNG-Kanal wird in der vorliegenden Arbeit gesondert behandelt, da er nativ als Heterotetramer generiert wird und zur genaueren Analyse der Untereinheit A2 zusätzlich als Homotetramer vermessen wurde. Die Leitfähigkeit des homotetrameren CNGA2-Kanals beträgt annähernd 50 pS (Bönigk et al. 1999, Li et Lester 1999) und ist nur gering beeinflusst von der Membranspannung. Die beiden zyklischen Nukleotide besitzen am heterotetrameren olfaktorischen Ionenkanal ähnliche Leitfähigkeiten. Geringe Unterschiede liegen aber in der Affinität vor, wobei cGMP etwas affiner ist als der endogene Ligand cAMP (Kaupp et Seifert 2002). Durch die EC_{50} -Werte im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich sind die Ionenkanäle und Nukleotide für bestimmte Methoden (siehe KAPITEL 4.4 PATCH-CLAMP-FLUOROMETRIE) geeignet.

2.1.1.2 Physiologie des Riechens

Mit der Atemluft gelangt ein Geruchsmolekül in die Nase und diffundiert durch den Mukus zur Zilienmembran, in der sich der olfaktorische Riechrezeptor befindet (Abb. 3). Die Bindung dieses Moleküls an den GPCR führt zu dessen Aktivierung (Buck et Axel 1991) und zur Dissoziation des heterotrimeren G_{olf} -Proteins. Danach aktiviert die α -UE des G_{olf} die membranständige Adenylylcyclase III (AC) und die Synthese von ATP zu cAMP wird erhöht. Der sekundäre Botenstoff cAMP führt zur Öffnung des CNG-Kanals. Der darauffolgende Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen führt zu einer schwachen Depolarisation. Die Hauptaufgabe ist jedoch der starke Anstieg der Ca^{2+} -Ionen, die zur Aktivierung von Calcium-abhängigen Chloridkanälen benötigt werden (Frings et al. 2000).

Durch den Cl^- -Efflux wird die Depolarisierung verstärkt und somit das chemische Signal (Duftstoff) in einen elektrischen Reiz umgewandelt. Zudem besitzt der Kationeneinstrom sogar eine inhibitorische Wirkung auf die Signaltransduktion. Ein

Ca²⁺-Calmodulin-Komplex führt zu einem negativen *Feedback* auf den CNG-Kanal und zum anderen aktiviert es die PDE1C2, welche das cAMP hydrolysiert (Pifferi et al. 2006).

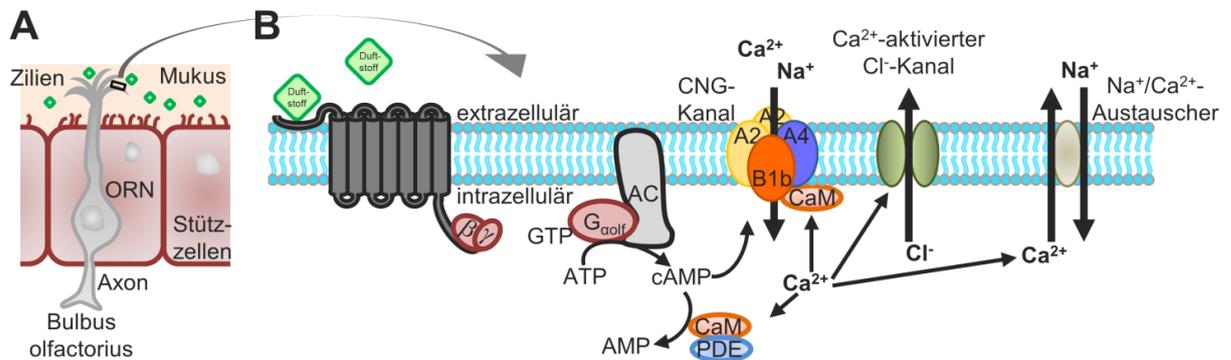


Abbildung 3. Schematische olfaktorische Transduktionskaskade

A) ORN mit Ausschnitt der Zilienmembran (B). Bindet ein Geruchsmolekül an einem olfaktorischen Geruchsrezeptor (OR), dissoziiert das G-Protein und die α -UE aktiviert die Adenylatcyclase (AC). Dadurch steigt die cAMP-Konzentration und der olfaktorische CNG-Kanal wird geöffnet. Es kommt zum Kationeneinstrom, welcher besonders durch Bindung der Calciumionen an das Calmodulin (CaM) verringert wird. Zudem werden Calcium-abhängige Chloridkanäle aktiviert. Modifiziert nach Pifferi et al., 2006.

2.1.2 Aufbau und Struktur

Der Aufbau der CNG-Kanäle ähnelt strukturell stark dem der HCN-Ionenkanäle (siehe Abb. 4). HCN-Kanäle sind Hyperpolarisation-aktivierte und durch zyklische Nukleotide modulierte Ionenkanäle und gehören zusammen mit den CNG- und den EAG-Kanälen zur Untergruppe der zyklisch-Nukleotid regulierten Kationenkanäle, die wiederum der Superfamilie der Porenschleifenkanäle mit sechs Transmembrandomänen angehören (Yu et al. 2005).

Vier Untereinheiten ordnen sich zu einer zentralen Pore zusammen, wobei eine Untereinheit aus sechs α -helikalen Segmenten (S1-S6) mit zytosolischen N- und C-Terminus besteht. Die einwärtsgerichtete Porenschleife (P) liegt zwischen S5 und S6, wobei die S6-Untereinheiten die Pore bilden. Die Helices A'-D' des C-Linkers bilden den sogenannten *Gating*-Ring (Zhou et al. 2004). Zyklische Nukleotide binden an der zyklisch-Nukleotid-Bindedomäne (CNBD) im C-Terminus, welche über den C-Linker mit dem *Gating*-Ring und der S6 verbunden ist (siehe KAPITEL 2.3.1 LIGANDENBINDUNG) (Kaupp et al. 1989, Zagotta et al. 2003).

Typisch für spannungsabhängige Ionenkanäle, wie einige Ca²⁺-Kanälen, ist das Öffnen und Schließen durch Membranpotentialänderungen durch Bewegung der S4-Einheit (Spannungssensor) über S4-S5-Linker zur S6-Helix (Long et al. 2005, Long et al. 2007). Obwohl CNG-Kanäle nur gering und HCN-Kanäle stark spannungsabhängig

sind, weisen diese Ionenkanäle besondere Charakteristika in der S4-Domäne auf (siehe unten).

Ein weiteres Charakteristikum stellt der Selektivitätsfilter dar. Das typische Aminosäuresequenzmotiv aus T/S-V/I/L/T-G-Y/F-G (Yu et al. 2005) sorgt für die hohe Selektivität der K⁺-Ionenpermeation bei Kaliumkanälen (Permeabilität 1:10000) (Doyle et al. 1998). Der Austausch bestimmter Aminosäuren wie bei den Sequenzen des CNG-Kanals TIG-E (Contreras et al. 2008) und des HCN-Kanals CIGYG (Macri et al. 2012) sowie verschiedene Orientierungen der Aminosäuren im Raum und damit verbunden größere Porenradien sind ursächlich für die unselektiven Kationen-einströme der beiden Ionenkanaltypen (Lee et MacKinnon 2017, Li et al. 2017).

Bisher sind noch keine Strukturen eines Säugetier-CNG Kanals bekannt, aber kürzlich wurde ein nahe verwandter TAX4-Kanal (60% Sequenzidentität zum CNGA1-Kanal) des *C. elegans* mit 3,5 Å im Cryo-EM aufgelöst (Li et al. 2017). Einzigartig ist die Spannungssensor-ähnliche Domäne (VSLD) im S4-Segment. Denn dieser Bereich mit vielen positiv geladenen Aminosäuren schließt spannungsabhängige Bewegungen innerhalb der Membran aus, was ein Grund für die schwache Modulation durch Potentialänderungen an der Membran ist. Die zwei ursächlichen Unterschiede zu spannungsabhängigen Kanälen sind zum einen, dass die S4-Helix beim CNG-Kanal nicht durchgängig, sondern in drei Teile separiert und durch Interaktionen mit S2 die Beweglichkeit begrenzt ist. Zum anderen besitzt der S4-S5-Linker nur 5 Aminosäuren (regulär 10-12 Aminosäuren), damit fehlen wichtige Wechselwirkungen zur S6-Porendomänen. Eher gibt es ein Helix-Turn-Helix-Motiv aus S4, S5 und S4-S5-Linker. Dieses Motiv interagiert mit dem C-Linker, was einen Verdacht auf die Einbeziehung in das ligandengesteuerte *Gating* der CNG-Kanal zeigt.

Für die Erklärung des konträren Verhaltens des HCN-Kanals bei Depolarisation war die Auflösung der Struktur des humanen HCN-Kanals essentiell (Lee et MacKinnon 2017). Dabei zeigt das S4-Segment eine außergewöhnliche Länge, wodurch es weiter ins Zytoplasma hineinragt. Bei Depolarisation übt das S4-Segment durch seine Länge eine Kraft auf den S4-S5-Linker aus, welcher in Kontakt mit dem C-Linker einer benachbarten Untereinheit ist und bildet mit der S6-Helix ein geschlossenes Poren-*Gate*. Außerdem ist für die HCN-Kanäle eine α -helikale HCN-Domäne am N-Terminus sehr spezifisch (in Abb. 4 nicht dargestellt).

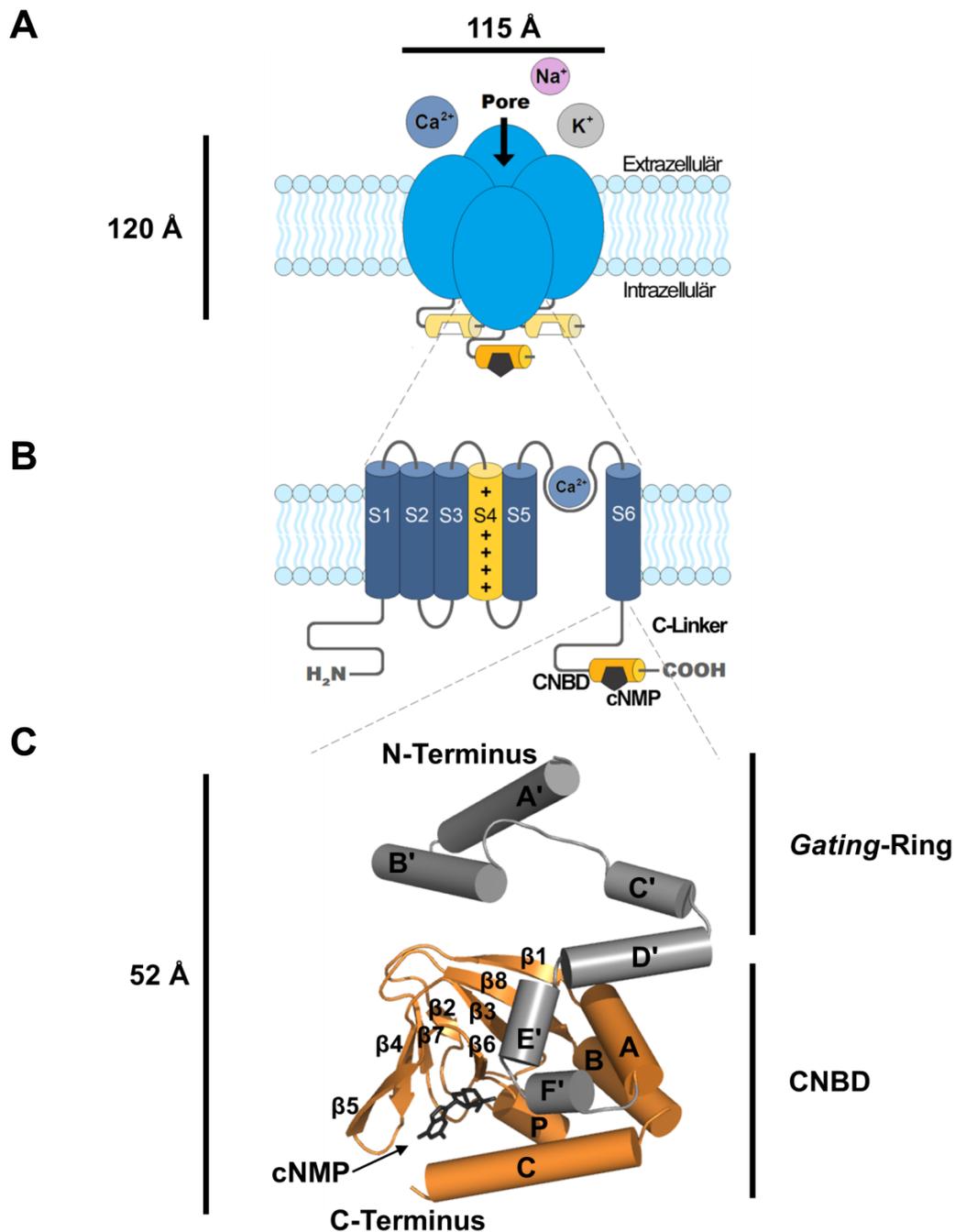


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Struktur des CNG-Kanals.

A) Vier Untereinheiten (dunkelblau) sind verankert in der Zellmembran. Die Untereinheiten assemblieren zu einer Pore, die die Ionenpermeation von Kationen ermöglicht. Im Intrazellulärraum befinden sich die Bindestellen (orange) mit Ligand (dunkelgrau). Die Maße eines Ionenkanals betragen circa 115 Å in der Breite und 120 Å in der Höhe (Li et al., 2017). B) Eine Untereinheit der Ionenkanäle besteht aus sechs Transmembrandomänen und ist durch kurze Schleifen verbunden. Der N- und C-Terminus liegt intrazellulär. Wichtige Elemente sind gesondert gekennzeichnet: 1. Spannungssensor S4 (gelb) mit den charakteristischen positiven Aminosäuren, 2. Pore mit Porenschleife zwischen S5 und S6, 3. C-Linker und CNBD im C-Terminus. An letzteres bindet der Ligand (cNMP) und moduliert so das Öffnungsverhalten des Ionenkanals. C) Schematische Darstellung des C-Linkers (hellgrau) und der CNBD (orange) in der Sekundärstruktur. Zylinder stellen die α -Helices und Pfeile die β -Faltblätter dar. Die Helices A'-D' bilden den *Gating-Ring* und sind Teil des C-Linkers. Die CNBD besteht aus den Helices A, P, B, C und den acht β -Faltblättern. Die Größe des C-Linkers und der CNBD betragen circa 52 Å in der Höhe (Modifiziert nach Zagotta et al., 2003).

2.2 Zyklische Nukleotide

Die Vorstufe eines endogenen Nukleotides ist das Nukleosid (siehe Abb. 5). Dieses besteht aus einer stickstoffhaltigen Nukleobase (z. B. Purine wie Adenin und Guanin), welche β -glykosidisch an Position 9 mit einem Zucker (z. B. D-Ribose) verbunden ist (Roy et al. 2016). Binden nun ein, zwei oder drei Phosphatgruppen an die C5'-Position des Zuckers spricht man von einem Nukleotid. Die Nukleotide können verschiedene Konformationen einnehmen. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal liegt dabei im Glycosyltorsionswinkel χ . Durch Drehung der Achse zwischen N9 und C1' liegt das Nukleotid in *syn*- oder *anti*-Konfiguration vor. Beide Konformationen sind in der Natur existent und liegen im dynamischen Gleichgewicht. Die bevorzugte Form ist die *anti*-Konfiguration, bei der sich das N3 des Purinringes nicht über dem Sauerstoff des Zuckers befindet (Blackburn et al. 2006). Sind sich jedoch Purinring und Zucker auf derselben Seite zugewandt, spricht man von einer *syn*-Konfiguration. Im physiologischen pH-Bereich liegen beide Purine in ihrem Keto- bzw. Amino-Tautomer (Abb. 5C bzw. 5B) vor und zu einem Anteil von unter 0,01% als Enol- bzw. Imino-Form (Blackburn et al. 2006). Zudem gibt das zyklische Phosphat im wässrigen Milieu ein Proton ab ($\text{pH} > 1$) und besitzt eine negative Nettoladung, da die Nukleobase ungeladen ist. Eine weitere Ladung entsteht durch die Ribose, die oberhalb von pH 12 sauer wirkt. Dies liegt aber außerhalb eines physiologischen Milieus. Die Ladungen und die Heteroatome als Wasserstoffbrückenakzeptoren oder -donoren führen zu einer verbesserten Löslichkeit, sind aber nachteilig für den Durchtritt durch Biomembranen. Jedoch ist die Ladung an der Phosphatgruppe von hoher Bedeutsamkeit bei Interaktionen mit Zielproteinen, sodass stabile Salzbrücken entstehen. Ein Vorteil von Purinen gegenüber den Pyrimidin-Nukleotiden ist deren Größe. Die Purinbasen bilden mehr Wasserstoffbrücken mit den Zielproteinen, was wiederum zu einer erhöhten Affinität führt.

Das zyklische 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) und das zyklische 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) (siehe Abb. 5) entstehen aus ihren jeweiligen Triphosphaten (Adenosin-5'-triphosphat und Guanosin-5'-triphosphat) durch die entsprechenden Enzyme Adenylylcyclase (AC) und Guanylylcyclase (GC). Das Besondere dabei ist die intramolekulare Zyklisierung der zwei Hydroxylgruppen, an der 3'- mit der 5'-Position desselben Zuckers über eine Phosphodiesterbrücke (Abb. 5B + C). Für den Abbau sind gewebs- und nukleotidspezifische Phosphodiesterasen (PDE) im Einsatz. Beide

Nukleotide besitzen eine Schlüsselrolle in der Physiologie der Signaltransduktion in Zellen und für zahlreiche biologische Funktionen.

Als zelluläre Antwort auf die extrazelluläre Bindung eines ersten Botenstoffes (*first messenger*) an ihre Membranrezeptoren (z.B. metabotrope Rezeptoren wie die GPCR) werden die sogenannten sekundären Botenstoffe (*second messenger*), wie zum Beispiel cAMP und cGMP im Zellinneren gebildet. *First messenger* dienen dabei als interzelluläre Signale, wie zum Beispiel Hormone (Glukagon, Adrenalin), Neurotransmitter (Noradrenalin, Dopamin, Histamin, Serotonin) oder Entzündungsmediatoren und können zumeist nicht direkt die Zellmembran durchdringen. Somit wird die Wirkung eines externen Stimulus auf die Zellfunktion übertragen. Durch die Erhöhung der intrazellulären Konzentration der *second messenger* werden die Proteinkinasen A (PKA) (Walsh et al. 1968) oder PKG (Francis et Corbin 1999) sowie zyklisch Nukleotid-modulierte Ionenkanälen und der Guaninnukleotidaustauschfaktor (EPAC) (de Rooij et al. 1998) je nach Gewebetyp aktiviert und gezielt verschiedene Zellbereiche stimuliert. Allen gemeinsam ist die hochkonservierte zyklische Nukleotid-Bindungsdomäne (CNBD), welche cAMP und cGMP bindet und die Aktivität der oben genannten Proteine reguliert (Berman et al. 2005). Nach einer adäquaten Zellantwort werden die *second messenger* durch geeignete Enzyme, den PDEn, abgebaut und die Transduktion beendet.

Um ein ganzheitliches molekulares Verständnis über die Bindung der Liganden an ihre Zielproteine zu erhalten, nutzt man heutzutage Röntgenstrukturaufnahmen oder die Kryoelektronenmikroskopie (Cryo-EM). Als erstes cNMP-bindendes Protein wurde die Kristallstruktur ohne Kenntnis der Primärstruktur eines bakteriellen katabolisch aktivierten Proteins (CAP) aufgelöst (McKay et Steitz 1981), welches nach Bindung von cAMP als Transkriptionsfaktor dient (Emmer et al. 1970). Weitere Kristallstrukturen folgten mit der PKA (Su et al. 1995), EPAC (Rehmann et al. 2003) und später auch die Bindestellen von Ionenkanälen (Zagotta et al. 2003, Clayton et al. 2004). Neuere Studien konnten sogar die Ionenkanäle zu einem großen Teil in ihrer Gesamtlänge auflösen, was durch ihre Größe erschwert ist und nun nicht mehr durch Kristalle sondern durch Kryo-EM oder NMR-Aufnahmen gelang (Lee et MacKinnon 2017, Li et al. 2017).

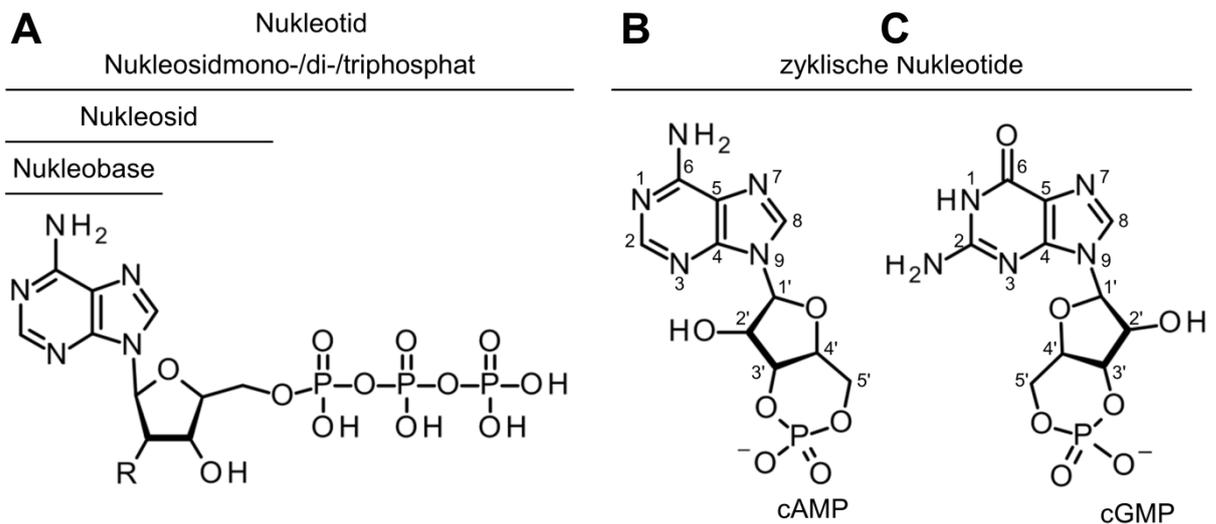


Abbildung 5. Aufbau eines Nukleotids. A) Ein Nucleosid besteht aus einer Nucleobase, die über eine β -glykosidische Bindung (Position 9) an ein Zuckermolekül (C1') gekoppelt ist. Die Zuckereinheit ist entweder eine Ribose (R: -OH) oder eine Desoxyribose (R: -H). Sind am C5'-Atom Phosphatgruppe(n) verestert, spricht man von einem Nucleotid. Das beispielhaft abgebildete Nucleotid ist ein Adenosintriphosphat (ATP). Ist eine weitere Gruppe mit einer Hydroxylgruppe (C3') mit dem Phosphat verestert, bildet sich ein weiterer Ring und man spricht von zyklischen Nucleotiden. Beispielhaft sind cAMP (B) und cGMP (C) mit Nummerierung der Kohlenstoff- und Stickstoff-Atome nach IUPAC in der *anti*- (B) bzw. *syn*- (C) Konformation dargestellt.

2.2.1 Modifikationen an der Purinbase

Anhand der Nummerierung in Abbildung 5 können die nachfolgenden Modifikationen an den zyklischen Nucleotiden besser nachvollzogen werden. Mögliche Veränderungen ziehen häufig starke Verschlechterungen in der Affinität nach sich, da Ligand und Bindetasche aufeinander abgestimmt sind (siehe KAPITEL 2.3 BINDUNG UND AKTIVIERUNG). Zudem ist nicht jede Substitution an beiden zyklischen Nucleotiden möglich, da aufgrund der chemischen Struktur und der Verteilung der Heteroatome, verschiedene Reaktivitäten einen synthetischen Zugang ermöglichen oder ausschließen bzw. keine Synthesestrategien bekannt sind. Der offensichtlichste Unterschied liegt in der Position 6, die beim cAMP eine Aminogruppe, beim cGMP einen Ketosauerstoff trägt. Die Aminogruppe kann durch verschiedene Gruppen substituiert werden, sodass hier mehrere Derivate kommerziell erhältlich sind (Firma Biolog, Bremen, Dtl.), ein Derivat in Position 6 vom cGMP ist nicht bekannt. Auch das Fehlen der funktionellen Gruppe oder der Ersatz durch ein Schwefelatom wird durch die CNG-Kanäle toleriert, verändert aber die Eigenschaften des Nucleotides (Tanaka et al. 1989).

Negative Auswirkungen auf die Affinität scheint eine Art Nitrogruppe am Stickstoff an Position 1 bei cAMP oder auch eine Methyl- bzw. Aminogruppe bei cGMP zu sein

(Scott et al. 2007, Moller et al. 2014). Ebenfalls negative Auswirkungen haben Veränderungen an Position 2. Dabei ist es unabhängig ob der Ring direkt (cAMP) oder ob die Aminogruppe des cGMPs modifiziert wird (Moller et al. 2014). Jedoch zeigten Studien vielversprechende Substitutionen in Position 7 und 8. Schon früh zeigten Brown und Kollegen (1993), dass eine mögliche Variation in Position 8 keinen negativen Einfluss auf die Potenz der zyklischen Nukleotide an den CNG-Kanälen bewirkt. Die bisher potenteste Veränderung beider Nukleotide am CNG-Kanal ist die Erweiterung an Position 8 mit einer Thiolgruppe, gefolgt von einem Phenylring, welcher in *para*-Stellung mit einem Chlor substituiert ist (siehe Abb. 17 – 4G) (Strassmaier et Karpen 2007). Trotz alledem wird nicht jeder Austausch an dieser Position toleriert. Eine Hydroxylgruppe am cAMP zeigt hier eine Verschlechterung in der Bindung an den HCN-Kanälen (Scott et al. 2007).

Eine Substitution an Position 7, welche aus einem Stickstoffatom besteht, zeigt ebenfalls verbesserte agonistische Eigenschaften am CNG-Kanal (Strassmaier et Karpen 2007). Zudem führt ein Austausch des Stickstoffes (N7) durch ein Kohlenstoffatom, die sogenannten Deaza-Verbindungen, ebenfalls zu einer höheren Affinität (Moller et al. 2014).

Eine Substitution mit einem Halogen an jeglicher Position zeigt in den überwiegenden Fällen eine Verbesserung der Affinität (Brown et al. 1993, Scott et al. 2007, Moller et al. 2014, Ng et al. 2016).

2.2.2 Modifikationen an den Sauerstoffatomen des Phosphates und der Ribose

Die funktionellen Gruppen der Ribose und des zyklischen Phosphates stellen wichtige Erkennungsmerkmale für das Protein dar. Veränderungen innerhalb des Proteins (siehe KAPITEL 2.1.3 + 2.3) sowie am Molekül führen zu starken Affinitätsverlusten. Ein Austausch des Sauerstoffs am Phosphat mit einem Schwefelatom führt zu einem der schlechtesten Agonisten an HCN-Kanälen (Bois et al. 1997, Moller et al. 2014) sowie zu einem partialagonistischen und antagonistischen Verhalten an den CNG-Kanälen (Kramer et Tibbs 1996, Wei et al. 1998). Die Ursache dafür liegt in der festen Salzbrückenbindung zwischen Ligand (Phosphatgruppe) und Protein (positive Seitenkette des Arginins).

Weitere wichtige Wasserstoffbrückenbindungen bilden Ligand und Protein über die Hydroxylgruppe des Zuckers (Zhou et Siegelbaum 2007). Die Bedeutung dieser Stelle

zeigen Modifikationen, die es ermöglichen, die Proteinkinasen nicht zu aktivieren, aber als selektiver EPAC-Aktivator zu fungieren (Enserink et al. 2002, Christensen et al. 2003, Dao et al. 2006, Poppe et al. 2008). Auch am CNG- und HCN-Kanal führen Substitutionen zu Affinitätsverlust (Strassmaier et Karpen 2007, Zhou et Siegelbaum 2007, Moller et al. 2014).

2.2.3 Modifikationen mit Fluorophoren

Unter Zuhilfenahme von Fluorophoren werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide ein immer wichtigeres Hilfsmittel für die Forschung (Cremo 2003), um die zahlreichen Aufgaben der zyklischen Nukleotide zu beobachten. Jedoch gibt es bisher nur wenige Studien mit derart markierten Nukleotiden. Zu Beginn der Forschungen mit zyklischen Nukleotiden waren die Purin-Ringe noch in die Farbstoffe implementiert. Beispiele dafür sind das 1-*N*⁶-etheno-cAMP (Builder et al. 1980), 1-*N*⁶-etheno-2-aza-cAMP (Tsou et al. 1974) oder das zyklische Phosphat des 2-aminopurin-Ribosids (Scott et Tanaka 1995). Jedoch haben diese Ligandenmodulationen Nachteile in der Bindungsaffinität und würden die Aktivierung der Zielproteine wesentlich beeinflussen. Zudem sind weitere Eigenschaften wie die Membranpermeabilität und die Stabilität gegenüber dem Einfluss von PDEn verringert. Damit einhergehend haben diese modifizierten Farbstoffe ebenfalls schlechte spektrale Eigenschaften, sodass die Anregung bereits durch UV-Strahlung erfolgen muss und die daraus resultierenden kurzen Emissionswellenlängen durch Autofluoreszenz von Zellbestandteilen beeinflusst werden oder durch die hohe Energie selbst destruktiv auf die intakten Zellen wirken. Daraufhin wurden weitere Modifikationen außerhalb des Purinringes angestrebt. Anthraniloyl- (Alfonso et al. 1995) oder Methyl-anthraniloyl-markierte cAMP (MANT-cAMP) (Hiratsuka 1982) dienen als fluoreszierende Sonden an dem Ribose-Ring und werden aktiviert durch Spaltung mittels PDE. Aufgrund fehlender PKA-Aktivierung wurden Veränderungen an der Adenosinbase in Position 6 (Moll et al. 2006) und Position 8 (Kraemer et al. 2001) vorgenommen (Membrangängigkeit und PDE-Stabilität erhöht). Jedoch auch hier sind die Spektraleigenschaften noch nachteilig und für die Anwendung in der Zelle ungeeignet. Ähnliches gilt bei der Verwendung von NBD als Farbstoff (8- [2- [(7- Nitro- 4- benzofurazanyl)amino]ethyl]thio) adenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate; 8-NBD-cAMP) (Hiratsuka 1982, Kraemer et al. 2001, Wu et al. 2011, Chen et al. 2012). Zur Beobachtung des Nukleotides an diesen Zielproteinen wurden weitere Veränderungen vorangetrieben und mit den Eigenschaften von

modernere Farbstoffen versehen, welche über eine Verbindungskette (Linker) mit dem Nukleotid verbunden sind. Beispielsweise sind zu nennen Fluorescein und Rhodamine an Position 8 (Caretta et al. 1985, Tanaka et al. 1989, Mucignat-Caretta et al. 1997, Schwede et al. 2000, Lolicato et al. 2011) sowie Pharos-575 (Moll et al. 2008). Daraufhin wurden mit DY547 gekoppelte fluoreszierende Liganden (siehe Abb. 1) für Ionenkanäle genutzt (Biskup et al. 2007, Kusch et al. 2010, Nache et al. 2013, Nache et al. 2016), welche ein ähnliches Verhalten wie die nativen Nukleotide aufzeigen.

Eine andere Entwicklung waren sogenannte „*caged nucleotides*“. Dabei wurden Nukleotide mit zum Beispiel DEACM oder den Esterverbindungen von [6,7-bis(carboxymethoxy) coumarin-4-yl]methyl (BCMCMcGMP) oder [7-bis(carboxymethylamino)coumarin-4-yl]methyl (BCMACMcGMP) substituiert und durch gezielte Belichtung von dieser Gruppe befreit, sodass das Nukleotid anhand seiner nativen Eigenschaften ohne Modifikation wirken kann (Hagen et al. 2001, Hagen et al. 2005, Nache et al. 2005). Damit konnte ein sehr schneller Konzentrationsprung des cNMP am Ionenkanal erreicht werden und die Aktivierungskinetik bestimmt werden.

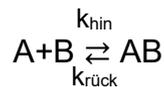
2.3 Protein-Ligand-Wechselwirkung

Paul Ehrlich (1913) schrieb in seiner Publikation im Lancet: „*Corpora non agunt nisi fixata*“, (Körper/Liganden können nicht wirken, wenn sie nicht gebunden sind), was als erste Bedingung einer erfolgreichen Aktivierung eines Proteins steht. Dazu kommt die Beobachtung Emil Fischers (1894), dass Rezeptor und Ligand „wie Schloss und Schlüssel“ große sterische Komplementarität aufweisen müssen (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Weitere Beobachtungen von Koshland (1958) an Enzymen führten zur „*induced fit*“-Theorie. Bei dieser Theorie sind beide Interaktionspartner kein starres Gerüst, sondern passen sich in ihrer Konformation einander an. Angewandt auf den CNG-Kanal veröffentlichten Peuker und Kollegen (2013) erste Daten.

Übertragen auf liganden-gesteuerte Ionenkanäle; damit ein Ligand an der Bindestelle bindet, muss dieser ähnliche hydrophile/hydrophobe Oberflächeneigenschaften, wie in der Bindestelle vorherrschen, aufweisen. Die freigesetzte Energie führt danach zur Konformationsänderung der Bindetasche. Diese Übertragung der Information muss dann innerhalb des Ionenkanals zur Pore weitergeleitet werden. Die genauen Mechanismen sind je nach Kanaltyp unterschiedlich stark aufgeklärt. Jedoch sind

Ligandenbindung und *Gating* (Öffnen und Schließen des Kanals) eng voneinander abhängig und beeinflussen sich gegenseitig (Colquhoun 1998, Colquhoun 2006).

Vereinfacht angenommen setzt sich eine Protein-Ligandenbindung aus einem Komplex zweier Partner zusammen. Anhand dieser Arbeit, bezogen auf das Beispiel eines Proteins (Ionenkanal – A) und eines kleinen Liganden (zyklisches Nukleotid – B), befinden sich die beiden Edukte mit dem relativ stabilen Komplex (AB) in einer Gleichgewichtslage:



Eine Erweiterung mit einer Aktivierung dieses Komplexes ($[AB]^*$) stellt der del Castillo-Katz Mechanismus (Castillo and Katz 1957) dar:



Bei diesem Zwei-Zustandsmodell kann die Bindung, welche sowohl von Agonist als auch Antagonist vollzogen werden kann, durch Konformationsänderung innerhalb des Proteins mit besetzter Bindestelle in einen aktivierten Zustand $[AB]^*$ überführt werden (Colquhoun 1998). Solch eine Aktivierung erfolgt jedoch nur durch einen (Partial-) Agonisten, nicht durch Antagonisten.

Die Dissoziationskonstante (K_D) abgeleitet für die scheinbare Affinität:

$$K_D = \frac{k_{\text{rück}}}{k_{\text{hin}}} = \frac{[A]^*[B]}{[AB]} \quad (\text{M; mol/L}) \quad \text{Massenwirkungsgesetz}$$

Somit lässt sich die Dissoziationskonstante aus dem Massenwirkungsgesetz der Reaktion herleiten und ist ein Maß für die Stärke der Interaktion von Ligand und Protein oder gleichsam als Kehrwert der Affinität zu betrachten. Je kleinere Werte K_D annimmt, desto stärker ist die Bindung und somit die Affinität des Liganden zum Protein. Daraus lässt sich mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung die freie Bindungsenthalpie/Gibbs Energie (ΔG) ableiten.

$$\Delta G = RT \ln K_D \quad (\text{Gibbs-Helmholtz-Gleichung})$$

R – Gaskonstante

T – Temperatur [K]

2.3.1 Ligandenbindung

Im Jahre 2003 konnten durch Röntgenkristallstrukturen der isolierten Bindungsstelle des HCN2-Kanals der Maus erste Erkenntnisse über solche Bindungen von zyklischen Nukleotiden an Ionenkanäle gewonnen werden (Zagotta et al. 2003). Die Strukturen enthielten einen Teil des C-Terminus mit C-Linker und CNBD sowie jeweils die beiden Nukleotide in gebundener Form. Darauf aufbauend wurden weitere Röntgenkristallstrukturen mit ähnlichen Größen, aber verschiedenen Spezies, wie human (Lolicato et al. 2011), MloK1 (Clayton et al. 2004) und SplH (Flynn et al. 2007) oder weitere Unter-einheiten wie HCN1 und HCN4 (Moller et al. 2014) aufgelöst. Zudem wurden aufgelöste Strukturen verschiedener gebundener Liganden (Ng et al. 2016) oder sogar einer ungebundenen Struktur, die sogenannte apo-Form, publiziert (Taraska et al. 2009, Goldschen-Ohm et al. 2016). Weitere Strukturaufklärungen brachten wie bereits erwähnt die Messungen mit Cryo-EM am humanen HCN1-Kanal (Lee et MacKinnon 2017) und am TAX4-Kanal des Fadenwurms *C.elegans* (Li et al. 2017).

Da die Struktur der CNBD und die Interaktionen für alle beschriebenen CNBD-Kanäle sehr ähnlich sind, wird der Bindungsmechanismus hier am ersten beschriebenen Beispiel des mHCN2-Kanals nach Zagotta (2003) erläutert und die entsprechenden Aminosäuren des CNG-Kanals in Klammern aufgeführt. Mit Hilfe des *Alignments* (Abb. 6) sind die interagierenden Aminosäuren in beiden Ionenkanälen gekennzeichnet. Zudem ist davon auszugehen, dass alle Proteine mit einer CNBD ähnliche Prozesse zeigen, wie nachfolgend spezifiziert. Die CNBD ist eine sehr konservierte Domäne aus A- bis C-Helices und acht β -Faltblättern, welche eine sogenannte Phosphatbindungskassette beinhalten (P-Helix). Damit der Ligand bindet, muss das zyklische Nukleotid zu einer Aushöhlung in den β -Faltblättern bis an die P-Helix gelangen, um dort die wichtigsten Interaktionen einzugehen. Hierbei kommt es zu einer direkten polaren Bindung (Salzbrücke) der negativ geladenen Phosphatgruppe des zyklischen Nukleotids mit der positiven Seitenkette des Arginins 591 (R538). Diese Aminosäure ist eine der am stärksten konservierten Bestandteile der CNBD und Mutationen zeigen erhebliche Affinitätsverluste in allen Kanälen (Tibbs et al. 1998, Wainger et al. 2001, Ulens et Siegelbaum 2003, Clayton et al. 2004). Des Weiteren ist die Phosphatgruppe durch drei Wasserstoffbrücken zum C584 (S525) und zwei Mal zum T592 (T539) stabilisiert. Die Hydroxylgruppe des Zuckers in 2'-Position ist über eine Wasserstoffbrücke mit dem Amid des Glycin 581-Rückgrates (E523) fixiert. Somit

sind die Phosphat- und die Zuckergruppe am Protein verankert und die F'-Helix sowie C-Helix bekommen eine stärkere helikale Struktur, sodass diese nicht mehr in ihrer flexiblen Konformation vorliegen. Dies ist auch der Grund, weshalb Veränderungen an diesen Struktureinheiten des Nukleotids mit einem Affinitätsverlust einhergehen (KAPITEL 2.2.2 MODIFIKATIONEN AN DEN SAUERSTOFFATOMEN DES PHOSPHATES UND DER RIBOSE). Des Weiteren legt sich die C-Helix wie ein Augenlid über die Bindetasche (Rehmann et al. 2007, Taraska et al. 2009, Puljung et Zagotta 2013). Dies führt zu weiteren Interaktionen, besonders mit dem Purin-Ring, welche ursächlich für die Ligandenselektivität sind. Weiter beschrieben sind das Arginin 635, Isoleucin 636 und Lysin 638 (Flynn et al. 2007, Zhou et Siegelbaum 2007) zur Erhöhung der Selektivität für cAMP und weniger für cGMP (K582, E583, L585). Hydrophobe Wechselwirkung zwischen Purinring und den Aminosäuren I636, V564, M572 und L574 (E583, V502, A513, L515) treten auf. Das Amin (N2) des cGMP ist ein Wasserstoffdonor zum Sauerstoff des Threonin 592 (T539). Bei der TAX4-Kanalstruktur mittels Cryo-EM zeigt das Lysin (K619 TAX4-Kanal) in der C-Helix eine weitere Wasserstoffbrückenbindung mit dem Sauerstoff an Position 6. Die Hintergründe für die Selektivität sind aber noch wenig verstanden. Jedoch sind für die Ligandensensitivität weitere van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen cNMP und der C-Helix wichtig, um gleichfalls eine störungsfreie Kanalfunktion zu gewährleisten (Varnum et al. 1995, Tibbs et al. 1998, Matulef et al. 1999, Wainger et al. 2001). Zudem wurden unterschiedliche Bindemodi der Liganden in der CNBD festgestellt (Zagotta et al. 2003). Das cAMP bindet in der *anti*-Konfiguration, das cGMP in der *syn*-Konfiguration (Vgl. KAPITEL 2.2).

Ein Vergleich der RMSD-Werte von ungebundener und gebundener Form zeigt eine sehr geringe strukturelle Abweichung von 0,9 Å des HCN2-Kanals (Schünke et Stoldt 2013). Der RMSD-Wert beschreibt in diesem Fall ein Maß zur Beschreibung der Ähnlichkeiten von Proteinen zueinander.

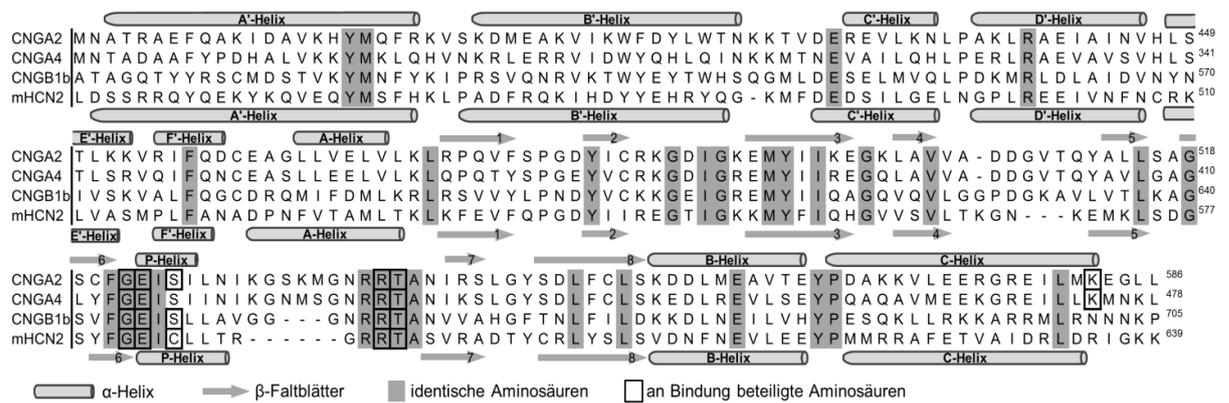


Abbildung 6. Alignment der verwendeten Untereinheiten. Die Untereinheiten CNGA2 (Q00195), A4 (Q64359), B1b (O55157) jeweils von der Ratte und HCN2 von der Maus (O88703). Sequenzausschnitt auf C-Linker (A'-F'-Helix) und CNBD (A-C-Helix) begrenzt. Bindungsrelevante Aminosäuren aus KAPITEL 5.6 übernommen.

2.3.2. Ionenkanalaktivierung

Die Bindung eines Liganden an einen Ionenkanal hat nicht immer eine Kanalöffnung zur Folge, sodass nach der Bindung der cNMP an die CNBD ein Transfer dieser Information hin zur Pore erfolgen muss. Bei Bindung von Agonisten wird die Offenwahrscheinlichkeit des Ionenkanals erhöht und es kommt zur Aktivierung. Basierend auf Strukturen von Offen- und Geschlossen-Zuständen von ähnlichen Ionenkanälen oder durch Daten die anhand von Mutationsstudien ermittelt wurden, lässt sich ein Modell der strukturellen Veränderungen bei Aktivierung skizzieren (Goulding et al. 1994, Gordon et Zagotta 1995, Zagotta et al. 2003, Flynn et al. 2007, Taraska et Zagotta 2007, Zhou et Siegelbaum 2007, Li et al. 2017, Mazzolini et al. 2018).

Die Aktivierung wird hauptsächlich durch eine koordinierte Bewegungsabfolge dreier Strukturelemente, der CNBD, des C-Linkers und des *Gates* vermittelt. Die Bindung eines Agonisten führt zu einer Konformationsänderung in der CNBD. Folgend der Rotation des gesamten C-Terminus bewegt sich der C-Linker, als allosterische Verbindung zwischen CNBD und Kanalgate, teilweise hinauf zur Membran. Das verengte Kanalgate befindet sich anfänglich im geschlossenen Zustand, vermutlich vorgegeben durch den C-Linker. Durch die vorangegangenen Bewegungen nach Ligandenbindung wird das *Gate* aus den A'B'C'D'-Helices aufgelockert und ändert seine Konformation, woraufhin das S6-Segment als Teil der Pore verschoben und die Ionenpermeation ermöglicht wird. Das Öffnen aller vier Untereinheiten muss man sich ähnlich der Irisblende einer Photokamera vorstellen (Marchesi et al. 2018).

2.3.3 Modell der Aktivierung am CNGA2-Kanal

Der CNG-Kanal wird ausschließlich durch Ligandenbindung aktiviert. Durch das Fehlen der Aktivierung überlagernder Prozesse, wie Inaktivierung oder der Mangel an Desensibilisierung nach cNMP-Bindung, wurde besonders der homotetramere CNGA2-Kanal als Modell für allosterische Konformationsänderungen genutzt. Anhand dieser Eigenschaften und der Verfügbarkeit von Offenwahrscheinlichkeitsdaten wird der homotetramere CNGA2-Kanal häufig als Präzedenzkanal in der Biophysik verwendet, um die Kooperativität der Untereinheiten ligandenaktivierter Ionenkanäle zu bestimmen (Li et Lester 1999, Biskup et al. 2007). Für die CNG-Kanäle wurden bereits viele Modelle einer möglichen kooperativen Bindung der Liganden postuliert (Kaupp et Seifert 2002, Nache et al. 2005, Craven et Zagotta 2006). Unter anderem konnten aber das Sequenzmodell (Karpen et al. 1988) und das Symmetriemodell (Monod-Wyman-Changeux Modell; MWC-Modell) durch eine unzureichende Unterstützung durch experimentelle Daten ausgeschlossen werden (Ruiz et Karpen 1997, Tibbs et al. 1997). Dies führte zu einem Modell in dem zwei Untereinheiten als funktionelle Untereinheit fungieren (Coupled-Dimer-Modell; Liu et al. 1998). Um jedoch die Erkenntnisse der Daten aus parallel gemessenen Bindungs- und Aktivierungsexperimenten in einem Modell zu beschreiben, wurde das C4L-Modell entwickelt, welches den kooperativen Schaltmechanismus (*Gating*) des CNGA2-Kanals am besten (Biskup et al. 2007) beschreibt. Dabei sind die einzelnen Ligandenbindungsschritte nicht identisch und der Ligandierungsgrad kann nur im geschlossenen Zustand geändert werden. Charakteristisch bei diesen Experimenten waren die sich kreuzenden Aktivierungs- und Bindungsgraphen im geringen Konzentrationsbereich. Somit wurde erkennbar, dass bei einer geringen Konzentration der Ligand bindet, aber noch keine Aktivierung erfolgt. Erst bei höheren Konzentrationen ist der Ligandierungsgrad ausreichend für eine Ionenkanalöffnung, aber es ist keine vollständige Bindung an allen vier Untereinheiten nötig. Dadurch hat der Gleichgewichts-Aktivierungsgraph einen steileren Verlauf und kreuzt den Gleichgewichts-Bindungsgraphen bei BC_{25} -Konzentration ($\approx 1 \mu\text{M}$). Dabei verursacht die erste Ligandenbindung bereits eine kleine, aber gering detektierbare Ionenkanalaktivierung und eine Offenwahrscheinlichkeit von 4%. Die zweite bewirkt den Großteil der Ionenkanalöffnung. Jedoch unterliegt der zweite Bindungsschritt einer negativen Kooperativität. Somit ist dieser Zustand sehr instabil und kritisch, sodass durch die Bindung eines dritten oder vierten Liganden der Offenzustand weiter stabilisiert bzw. vom zweiten diffizilen Bindungsschritt

separiert wird (Abb. 7). Ein ähnliches Modell (C3L) kann ebenfalls auf den heterotetrameren CNGA2:A4:B1b-Kanal übertragen werden (Nache et al. 2005). Eine Modellbeschreibung des Gatingmechanismus für den HCN2-Kanal mit cAMP-Bindung erfolgte ebenfalls durch ein Markov-Modell mit vier Bindungsschritten, welches aber vom Modell des olfaktorischen CNG-Kanals abweicht (Kusch et al. 2011).

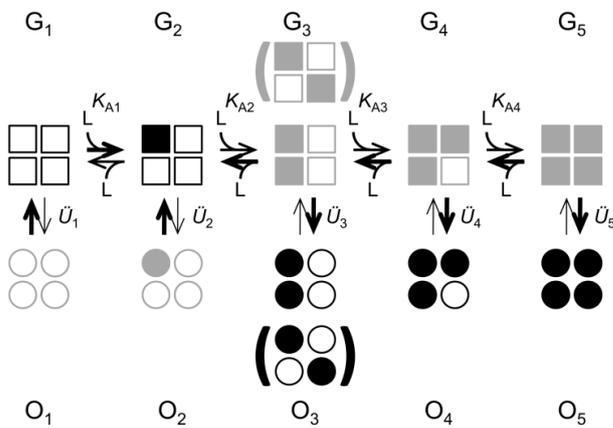


Abbildung 7. C4L-Modell. Vierecke (G_x) stellen geschlossene Zustände und Kreise (O_x) offene Ionenkanalzustände dar. L ist der Ligand und ausgefüllte Formen symbolisieren die Bindung. K_{Ax} ist die Assoziationskonstante und Ü_x ist der Offen-/ Geschlossen-Übergang nach der Ligandenbindung. Die Stärke der Pfeile gibt die Wahrscheinlichkeit der Übergänge der Zustände an und die Färbung der Symbole zeigt auf welcher Seite das Gleichgewicht liegt (schwarz vorherrschend). Modifiziert nach Biskup et al., 2007.

2.4 Farbstoffe

Zur Beschreibung des Bindungsprozesses ist es möglich, fluoreszierende Agonisten zu verwenden. Für diese Fluoreszenzmessungen wird ein Farbstoff benötigt, der an die Bedingungen des Experimentes angepasst ist und die Interaktion zwischen Protein und Ligand nicht negativ beeinflusst. Die Eigenschaft eines fluoreszierenden Farbstoffes ist es, ein Photon (entsprechender Wellenlänge/Energie $E=h \cdot \nu$) durch das konjugierte Elektronensystem zu absorbieren, um in ein energetisch höheres Orbital zu gelangen (S_n-Zustand) (siehe Jablonski-Termschema; Abb. 8). Dabei muss das Photon die Energiedifferenz überwinden, welche zwischen dem S₀-Grundzustand und dem nächst höherem, angeregtem Zustand (S₁) besteht. Bei höherer Energie können dementsprechend auch höhere Zustände erreicht werden (S₂, S₃ etc.), jedoch kann dies auch zum Bruch von Bindungen führen und die Molekülstruktur ist zerstört.

Diese Energieniveaus sind instabil, sodass das Molekül nach wenigen Pico- bis Mikrosekunden in unterschiedlichen Möglichkeiten auf seinen Grundzustand (S₀-Grundzustand) relaxiert. Gibt der Farbstoff bei diesem Prozess wieder ein Photon von geringerer Energie (höhere Wellenlänge – bathochrome Verschiebung) ab, welches durch sensitive Detektoren erkannt wird, spricht man von Fluoreszenz. Durch diese sogenannte Stokes-Verschiebung (*Stokes Shift*) gibt es Unterschiede in Anregungs- und Emissionswellenlängen. Weitere charakteristische Parameter von Farbstoffen neben den Maxima von Absorption und Emission sind der Extinktionskoeffizient (ϵ) als

Maß für die Absorption auftreffendes Lichtes (Lakowicz 2006) sowie die Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_F). Diese Größe gibt die Effizienz des Farbstoffes an und bildet sich aus der Relation der emittierten zu den absorbierten Photonen eines einzelnen fluoreszierenden Moleküls und ist < 1 . Hierbei spielt die Fluoreszenzlebensdauer eine entscheidende Rolle.

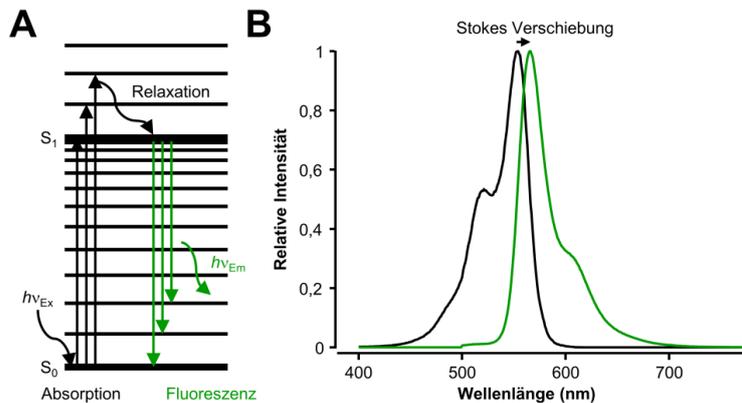


Abbildung 8. Fluoreszenzeigenschaften des Cy3-Farbstoffes.

A) Jablonski-Termschema. Grundzustand (S_0), angeregter Zustand (S_1) mit dem Schwingungsniveau 0, 1, 2. Anregung durch Aufnahme eines Photons mit der Energie E ($E=h\nu$). Abgabe eines Photons mit geringer Energie. Vereinfachte Darstellung, zudem wurde der Triplettzustand vernachlässigt. B) Absorptions- (schwarz) und Fluoreszenzspektrum (grün) nach Stokes-Verschiebung.

2.4.1 Molekülstruktur eines Fluorophores

Ein Fluorophor ist ein Molekül, welches aufgrund des strukturellen Aufbaus in der Lage ist, absorbiertes Licht in Form von Fluoreszenz zu emittieren. Für die Absorption muss das fluoreszierende Molekül über ein großes durchkonjugiertes Doppelbindungssystem verfügen. Dadurch entsteht ein chromophores π -Elektronensystem, welches in der Lage ist, Energie aufzunehmen und zu verteilen. Durch die rigiden, aromatischen Kohlenwasserstoffstrukturen kann das Molekül Photonen aussenden und fluoreszieren. Mit zunehmender Konjugation des π -Systems nähern sich das höchste besetzte (HOMO) und das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (LUMO) energetisch immer weiter an (Frank-Condon-Prinzip). Die benötigte Energie nimmt dadurch ab, sodass sich Absorptions- und Emissionsmaxima bathmochrom verschieben (Kanaoka 1977). Moderne Farbstoffe beinhalten zumeist eine oder mehrere positive oder negative Ladungen als Substituenten, um zum einen die Löslichkeit zu verbessern, zum anderen einen Zieh- oder Druck- Mechanismen auf das Chromophor auszuüben und somit das Elektronensystem zu vergrößern bzw. die Umgebungsempfindlichkeit zu minimieren. Dadurch können Farbstoffe mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima generiert werden und zeitgleich mehrere Farbstoffe in einer Probe detektiert werden. Dazu kommt, dass die Stellung dieser Substituenten am Aromaten entscheidend ist.

Die *Para*- und *Ortho*-Substituenten erhöhen die Fluoreszenz, während *Meta*-Substituenten selbige verringern (Kanaoka 1977).

Für die Markierung von Molekülen braucht ein Farbstoff zusätzlich zum Fluorophor eine koppelbare Gruppe, meist eine aktivierte Carbonsäure als NHS-Ester oder Maleimid. Ferner benötigt der Ligand eine Thiolgruppe oder ein aliphatisches Amin, um mit diesen funktionellen Gruppen eine kovalente Bindung einzugehen. Dabei kann es von großer Wichtigkeit sein, dass Ligand und Fluorophor nicht direkt miteinander verbunden, sondern mit einem „Abstandshalter“ (Linker) voneinander getrennt sind. Somit kann der Ligand seine nativen Eigenschaften beibehalten und trotzdem markiert bleiben. Dabei spielt die Auswahl des richtigen Linkers eine entscheidende Rolle. Es müssen Länge, Flexibilität, Löslichkeit, Ladung und weitere Aspekte beachtet werden. Zu kurze Linker könnten Funktionen des Proteins beeinflussen oder es kann zum *Quenchen* zwischen Ligand und Farbstoff kommen. Zu lange Linkerketten könnten den Farbstoff mit anderen Bereichen im Protein oder Biomembran interagieren lassen und so die spektralen Eigenschaften wie Intensität, Spektrum, Lebensdauer oder Polarisation verändern. Zusätzlich könnte die Größe des Linkers die Diffusionsgeschwindigkeit verringern. Jedoch kann die Flexibilität durch größere Linker ein wichtiger Faktor sein, damit der Ligand die meist verborgenen Bindetaschen der Proteine erreicht und der Farbstoff weit aus der funktionellen Einheit herausragt. Zudem kann die Beweglichkeit einen wesentlichen Einfluss auf die Entropie haben und sich somit positiv auf die Affinität auswirken (KAPITEL 6.2 OPTIMIERUNG DES LINKERS).

2.4.2 Fluorophorgruppen

2.4.2.1 Cyanin-Farbstoffe

Das Chromophor der Cyanine (Abb. 9A) besteht strukturell aus einer tertiären Aminogruppe (Auxochrom) und einer quartären Ammoniumgruppe (A^- und A), die über eine Polymethinkette miteinander verknüpft sind. Je länger diese Kette ist, desto stärker verschiebt sich das Absorptionsmaximum bathochrom (Mujumdar et al. 1993). Durch *cis-trans*-Isomerisierung ist die Quantenausbeute (Φ_F) von Cy3 eher gering 0,04-0,09 (Cooper et al. 2004). Dies kann aber durch Fixierung, wie bei Cy3B auf $\Phi_F = 0,67$ verbessert werden (Cooper et al. 2004). Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Cy3, Cy3B, DY547, DY547P1, Cy3Me.

2.4.2.2 Xanthen-Farbstoffe

Die Farbstoffklasse der Xanthere besteht aus zwei weiteren großen Farbstoffklassen, den Rhodaminen (Abb. 9B) und Fluoresceinen (Abb. 9C). Sie beinhalten drei planar-konjugierte Aromaten (Xanthen) und an Position 9 einen Benzoessäurerest. An Position 3 und 6 befinden sich entweder die Amino- (Rhodamin) oder Hydroxylgruppen (Fluorescein). Dadurch besitzen die Rhodamin-Derivate eine höhere pH-Stabilität als ihre Fluorescein-Analoga und sind in Bezug auf Photostabilität und Bleichen den Fluoresceinen überlegen. Weitere Modifikationen sind an den funktionellen Gruppen sowie direkt an den Aromaten möglich und verändern entsprechend der Substituenten die Eigenschaften des Fluorophors. Als Beispiel werden oft Sulfonsäuregruppen für eine verbesserte Löslichkeit verwendet. Diese Farbstoffgruppe besitzt häufig hohe Fluoreszenzausbeuten z.B. Fluorescein $\Phi_F = 0,95$ oder Rhodamine 101 $\Phi_F \approx 1$ (Lakowicz 2006). Wichtige Vertreter sind die Rhodamine Tetramethylrhodamin (TMR) und DY557, sowie die Fluoresceine Eosin und Fluorescein.

2.4.2.3 Rylene-Farbstoffe

Strukturell besteht diese Farbstoffgruppe aus einer homologen Reihe aus in *peri*-Position kondensierten Naphtalineinheiten (poly *peri*-Naphtalin). Der wichtigste Vertreter, das Perylen, besteht aus der niedrigsten Homologie ($n=1$). Dieser ist zugleich einer mit der höchsten Quantenausbeute (Φ_F) bei 0,9 (Rademacher et al. 1982) und zeigt Spektren mit charakteristischen Teilbanden. Aufgrund ihres hydrophoben Kernes müssen zur Löslichkeitsverbesserung polare Gruppen hinzugefügt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimide (PDI) verwendet. Hierbei wird zusätzlich ein zyklisches Imid an den Stellen 3, 4 und 9, 10 eingebaut (Abb. 9D), welches zu den Vorteilen dieser Gruppe führt, wie die hohe Temperatur- und Säurebeständigkeit sowie die hohe Photostabilität (Rademacher et al. 1982, Sun et al. 2016). Weitere Vertreter dieser Gruppe sind Terylene und Quaterylen.

Auf weitere Farbstoffe aus den Gruppen Bodipy, Nitro-, Oxazin-, Azo-, Indigo- und Anthrachinonfarbstoffe soll in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden. Diese Farbstoffklassen stellten anhand ihrer strukturellen oder photophysikalischen Eigenschaften keine geeigneten Alternativen dar.

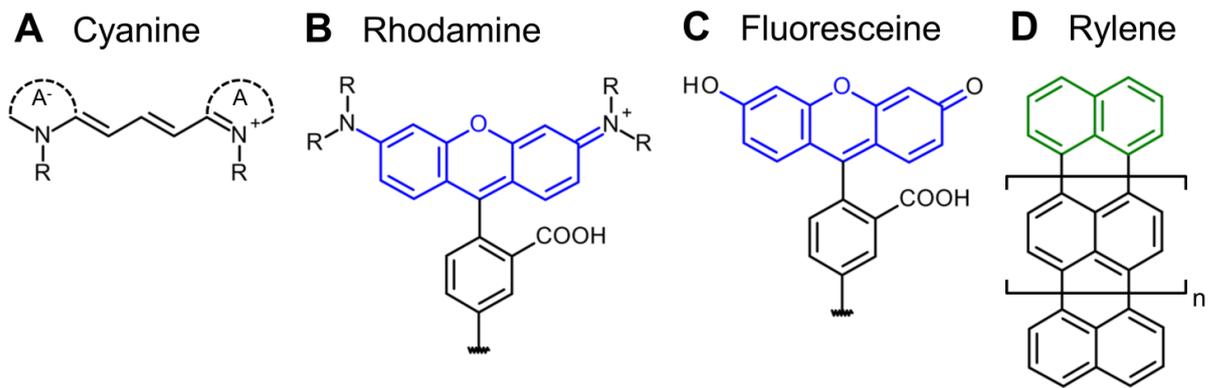


Abbildung 9. Strukturen der Farbstoffgruppen. R kennzeichnet Substituenten verschiedener Arten. A) Allgemeine Struktur von Cyanin-Farbstoffen. B+C) Struktur von Rhodamin- und Fluorescein-Farbstoffen, blau markiert die Xanthenstruktur. D) Allgemeine Struktur der Rylene-Farbstoffe, grün markiert die Naphtalinstruktur. Bei $n=1$ erhält man Perylene, $n=2$ Terrylene und $n=3$ Quaterylene.

2.4.3 Kriterien eines geeigneten Farbstoffes

Bei der Auswahl eines optimalen Farbstoffes müssen verschiedene Aspekte beachtet werden. Dabei kommt es auch auf die Bedingungen des Experimentes an, zum Beispiel gibt es die Option von membrangängigen Farbstoffen, die bei der *Patch-Clamp*-Technik nicht geeignet wären, da diese in der Membran partitionieren und den Patch destabilisieren. Des Weiteren gibt es Farbstoffe, die bei bestimmten pH-Einflüssen unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Der Farbstoff sollte photostabil sein (geringes Bleichen), eine große Stokes-Verschiebung besitzen, zudem Emissionsspektren weit entfernt von Autofluoreszenzen der Zellstrukturen, sowie scharfe Banden in den Spektren aufweisen, um Crosstalk und direkte Anregung mit einem zweiten Farbstoff (Referenzfarbstoff) zu minimieren. Weitere Faktoren für ein Fluorophor zur Nutzung bei Einzelmolekülexperimenten ist ein hoher Extinktionskoeffizient und eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute mit kurzer Fluoreszenzlebensdauer. Unabhängigkeit von Temperatur und pH-Wert, aber gut löslich in wässrigen Pufferlösungen zu sein und funktionelle Gruppen zur Kopplung an den Liganden aufzuweisen und keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Liganden zu haben, sind optimale zusätzliche Eigenschaften.

3. Zielstellung

Die zyklischen Nukleotide nehmen eine Schlüsselrolle in zellulären Prozessen ein und regulieren biochemische Abläufe. Dabei bilden Ionenkanäle wichtige Zielproteine, um eine Wirkung auszulösen. Umso bedeutender ist es, mehr über die Funktionen von cNMP auf zyklisch-Nukleotid aktivierte Ionenkanäle zu erfahren und Rückschlüsse auf die Ionenkanalfunktion nach Ligandenbindung zu erhalten. Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Optimierung eines zyklischen Nukleotides mit gekoppeltem Farbstoff, um für Einzelmolekülmessungen ein geeignetes Werkzeug zu generieren und Möglichkeiten der Liganden-Rezeptor-Interaktion darzustellen. Darüber hinaus sollte ein fluoreszierender Ligand entwickelt werden, welcher auf cAMP-Struktur basierend im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich den CNGA2-Kanal aktiviert, um so die Qualität der Messungen und weitere Einzelheiten der Ionenkanaleigenschaften mittels cPCF durchzuführen.

Aufgrund von Beobachtungen in der Arbeitsgruppe Benndorf, dass ein längerer Linker 8-[DY547]-AHT-cAMP im Vergleich zu einem kürzeren Linker 8-[DY547]-AET-cAMP höhere Affinitäten aufweist (Nache et al. 2016), sollte diese These näher betrachtet werden und systematisch Verbesserungen am fluoreszierenden Liganden vorgenommen werden. Dafür sollten mittels molekularer Modellierung und passgenauer Synthesen, vollagonistische Liganden elektrophysiologisch getestet werden. Dies führt zu einer Fülle von neuen Substanzen und vielen Experimenten, um den affinsten Liganden zu finden. Zur Modulation des Liganden kommen besonders drei Struktureinheiten in Frage. Zum einen kann das zyklische Nukleotid modifiziert sowie die Substitutionsstelle des Linkers optimiert werden. Zum anderen besitzt der Linker eine bedeutende Aufgabe bei fluoreszierenden Liganden, die ausführlich geprüft werden sollte, denn der Linker stellt das Bindeglied zwischen dem kleinen endogenen Liganden und dem großen Farbstoff dar. Somit ist er wichtiger Bestandteil, um negative Beeinflussungen des Farbstoffes auf die Bindung am Ionenkanal oder unspezifische Bindungen an Membranen zu minimieren. Als drittes sollte auch ein stabiler Farbstoff mit verbesserten spektraloptischen Eigenschaften gefunden werden. Zur Charakterisierung solch neuer Liganden sollten die bekannten Methoden für Ionenkanalexperimente angewendet und die Liganden immer weiterentwickelt werden. Als Expressionssystem dienten die Oozyten des Krallenfrosches, welche die homo- und heterotetrameren CNGA2-Kanäle nach Injektion der cRNA in großer Menge exprimierten. Sowohl die *Patch-Clamp*-Technik als auch die konfokale

Patch-Clamp-Fluorometrie (cPCF) wurden angewendet. Die erhobenen Daten wurden systematisch mit den Daten von endogenen Liganden verglichen.

Mit der Möglichkeit von Einzelmolekülmessungen von Liganden steigt der Anspruch an den Linker und den Farbstoff. Die bisher verwendeten fluoreszierenden zyklischen Nukleotide sind anhand ihrer Affinitäten und optischen Eigenschaften nicht optimal. Zudem ist das fcGMP und fcAMP der Firma Biolog LSI GmbH und Co KG (Bremen) kommerziell nicht mehr erhältlich und bedürfen eines Ersatzes. Umso wichtiger für die Einzelmolekültechnik ist eine chemische Verbindung, die bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich eine Aktivität zeigt und eine verbesserte Helligkeit des Farbstoffes aufweist, bei gleichbleibenden kanalaktivierenden und spektraloptischen Merkmalen der Einzelbestandteile eines solchen fluoreszierenden Liganden. Damit kann das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich erhöht werden, um eindeutigere Ergebnisse zu liefern.

Bisher sind viele Modelle über die Bindung von Liganden und Aktivierung der Proteine nur über makroskopische Experimente erstellt. Um präzisere Vorhersagen über individuelle Bindungsereignisse und daraus resultierende Aktivierungsprozesse zu generieren, bedarf es eines optimalen fluoreszierenden Liganden. Bei der Untersuchung von dieser großen Anzahl an neuen chemisch-synthetisierten Liganden sollten die Eigenschaften des Kanals erhalten bleiben und die komplexen Mechanismen des Kanalgatings näher aufgeklärt werden.

4. Methodik

4.1 Lösungen

Die Ligandenkonzentrationen in den verwendeten Lösungen wurde mittels NanoDrop 2000c Spectrophotometer[®] (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA) anhand der Absorptionsmaxima bestimmt. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten der Substanzen wurden je Nukleotid (cAMP: 14.500 bzw. cGMP: 13.500 L·mol⁻¹·cm⁻¹) einheitlich oder bei den fluoreszierenden Liganden und kommerziellen Substanzen nach Herstellerangaben verwendet. Viele der Nukleotide konnten kommerziell bei der Firma Biolog (Bremen, Dtl.) bezogen werden. Die Farbstoffe stammten von Dyomics (Jena, Dtl.), Lumiprobe (Hannover, Dtl.), GE Healthcare (Freiburg, Dtl.) und Prof. Dr. K. Peneva (Institut für Organische und Makromolekulare Chemie, FSU Jena, Dtl.)

Tabelle 1. Lösungen mit Mengenangaben der enthaltenen Stoffe.

Barth-Medium	(in mM) 84 NaCl, 1 KCl, 2,4 NaHCO ₃ , 0,82 MgSO ₄ , 0,41 CaCl ₂ , 0,33 Ca(NO ₃) ₂ , 7,5 TRIS, mit bzw. ohne Antibiotika: Cefuroxim (4,0 µg×ml ⁻¹), Penicillin/Streptomycin (100 µg×ml ⁻¹); pH 7,4 mit KOH eingestellt.
Tricaine-Lösung	(Ethyl-3-Aminobenzoat, E10521, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
CNG-Puffer I	(in mM) 150 KCl, 1 EGTA, 5 HEPES; pH 7,4 mit KOH
CNG-Puffer II	(in mM) 150 KCl, 1 EGTA, 20 HEPES; pH 7,4 mit KOH

4.2 Zellkultur und Molekularbiologie

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die Untersuchungen wurden am olfaktorischen Kanal der Ratte mit den Untereinheiten CNGA2 (AF126808), CNGA4 (U12623) und CNGB1b (AF068572) durchgeführt. Die cDNA der Untereinheiten wurden in den pGEMHEnew-Oozytenvektor mit einer spezifischen T7-Promoter-Sequenz umklontiert und mit Hilfe von *E.coli* vervielfältigt. Aus der DNA erfolgte die Transkription der cRNA mittels mMESSAGING mMACHINE T7 Kit der Firma Ambion[®] (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). Nach Aufreinigung wurde die Konzentration mittels NanoDrop 2000[®] auf 200 ng/µL eingestellt, in 2,0 µL Aliquots abgefüllt und bei -80°C gelagert. Diese Arbeiten wurden bereitgestellt von Prof. Thomas Zimmer, Karin Schoknecht und Claudia Ranke.

4.2.2 Oozytenpräparation und Injektion

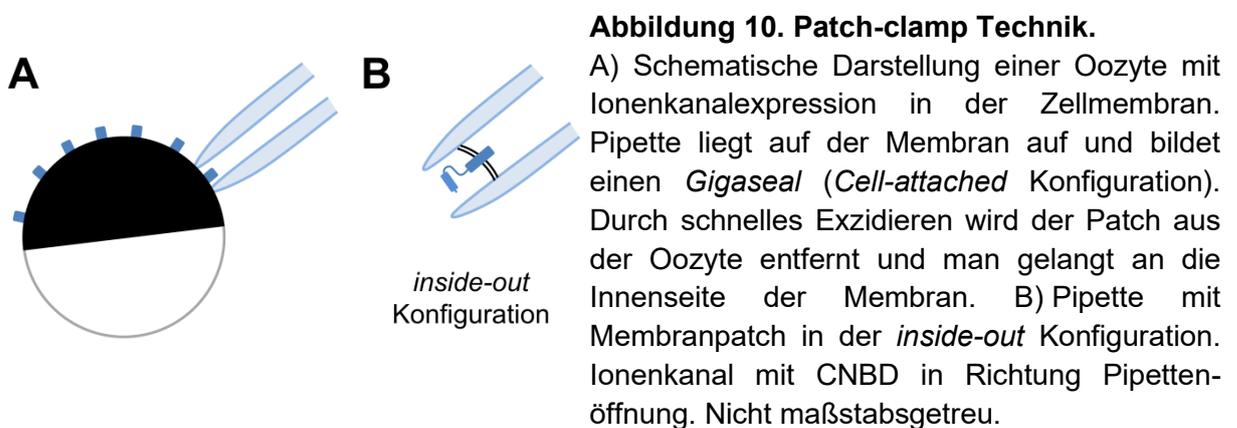
Als Expressionssystem wurden *Xenopus laevis*-Oozyten verwendet. Diese wurden kommerziell über die Firma EcoCyte Bioscience (Dortmund, Dtl.) bezogen oder durch eigene Tierhaltung, in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und durch die Genehmigung vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, erhalten. Die Gewinnung von Oozyten aus dem *Xenopus laevis* (südafrikanischer Krallenfrosch) erfolgte durch Sandra Bernhardt, Uta Enke, Claudia Ranke und Andrea Kolchmeier nach einem Protokoll von Goldin (1992). Den weiblichen Fröschen wurden unter Anästhesie mit 0,3% Tricaine-Lösung (vgl. Tab. 1) die Ovarien entnommen. Danach wurden die Oozyten für 105 min in Ca^{2+} -freiem Barth-Medium mit Kollagenase A (3,0 mg/ml, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) bei 20°C leicht geschüttelt. Im Anschluss wurden die Eizellen mit Ca^{2+} -haltigem Barth-Medium ohne Kollagenase mehrmals gespült und die Follikelmembran mit Hilfe eines Stereomikroskops und Pinzetten entfernt. Für die weitere Verwendung wurden nur Oozyten der Entwicklungsstufe V (Dumont 1972) verwendet. Zumeist erfolgte bereits am Tag der Isolierung die Injektion von 0,1 – 0,2 μL cRNA pro Zelle mittels dünnen Glas-Mikropipetten. Zum Teil wurden Oozyten ebenfalls nach zwei oder drei Tagen bei Kühlschranklagerung injiziert. Die Injektionspipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser 2,0 mm, Innendurchmesser 1,6 mm; Hilgenberg, Malsfeld) durch ein Pipettenziehgerät (Sutter Instruments Company, P-97 Flaming/Brown, Novato, USA) in die gewünschte Größe gezogen und danach an einem Mikroskop mit einem Metalldraht in eine Kanülenform gebrochen. Die injizierten Eizellen wurden 2-8 Tage in Ca^{2+} -haltigem Barth-Medium im Inkubator bei 18°C bis zum Versuchstag aufbewahrt. In einigen Fällen konnten die Oozyten bei Lagerung im Kühlschrank über einen größeren Zeitraum verwendet werden. Vor jeder *Patch-Clamp*-Messung wurde die Vitellinmembran mechanisch entfernt und die Zellmembran freigelegt. Dies erfolgte ebenfalls unter stereomikroskopischer Kontrolle mittels Pinzetten in der jeweils verwendeten Kontroll-Badlösung (ohne Ligand), um Effekte von unerwünschten Ionen zu vermeiden.

4.3 Elektrophysiologie

4.3.1 *Patch-Clamp*-Technik

Die von Neher und Sakmann entwickelte *Patch-Clamp*-Technik dient der Charakterisierung des Verhaltens von Ionenkanälen in biologischen Membranen von lebenden

Zellen (Hamill et al. 1981). Damit kann man die biophysikalischen Eigenschaften, wie Leitfähigkeit, *Gating* (Abhängigkeit des Schaltverhaltens von Spannung, Liganden, Licht, Temperatur oder Dehnung) oder Kinetiken genauer beschreiben. Ein Vorteil gegenüber der Zwei-Mikroelektroden-Technik ist die hohe Auflösung des Signals, sodass auch einzelne Kanäle mit einer sehr geringen Leitfähigkeit, wie zum Beispiel der HCN2-Kanal mit 1,67 pS (Thon et al. 2013), vermessen werden können. Dies ist nur möglich, da das Hintergrundrauschen durch die enge Verbindung zwischen Zellmembran und Glaspipette einen Widerstand von mehreren Giga-Ohm erzeugt (sogeannter *Gigaseal* = *Giga* von GΩ und *seal* aus dem Englischen für Versiegelung bzw. Dichtung; Abb. 10A). In verschiedenen Publikationen wurde diese starke Abdichtung durch Wasserstoff-, Salzbrücken sowie van-der Waals-Kräfte beschrieben und ein Abstand von 1 nm beobachtet (Corey et Stevens 1983, Opsahl et Webb 1994). Neben biophysikalischen Parametern können zudem pharmakologische Effekte, wie die Offenwahrscheinlichkeit der Ionenkanäle und Konzentrations-Aktivierungsbeziehungen ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde für alle Messungen die *inside-out* Konfiguration verwendet, (Abb. 10B), bei welcher die Membraninnenseite in Richtung Pipettenöffnung zeigt. Da die CNBD der verwendeten Ionenkanäle intrazellulär vorkommt, wurden die Liganden auf diese Weise von außen an die Pipette angespült.



4.3.2 Patch-Clamp-Pipetten

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden Patchpipetten aus Quarzglas (AD 1,0 mm und ID 0,7 mm; VITROCOM, New Jersey, USA) verwendet. Diese Kapillaren wurden mit einem Laser-Horizontal-Pipettenziehgerät (Sutter Instruments Company, P-2000, Novato, USA) in zwei Zügen auf den gewünschten Durchmesser ausgezogen. Nach der Befüllung der Pipetten mit den jeweiligen Pipettenlösungen (vgl. Tab. 1) wiesen diese einen Pipettenwiderstand von 0,7 – 2,2 MΩ auf.

4.3.3 Patch-Clamp-Messstand

Jeder der verwendeten Messstände bestand aus einem schwingungsgedämpften Labortisch und einem Faraday-Käfig, welche äußere mechanische und elektrische Einflüsse verringern. Die Messungen erfolgten in einer Messkammer aus Plexiglas und einem Boden aus einem Deckglas der Stärke 1 (0,13 mm - 0,16 mm). Mit Hilfe eines Applikationssystem konnte ein ständiger Badlösungszufluss sowie der Wechsel zwischen verschiedenen konzentrierten Ligandenlösungen ermöglicht werden. Das Applikationssystem bestand aus gekürzten Kanülen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.) mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm. In Spritzen gefüllt und über Kunststoffschläuche aus PTFE (0,56:1,07 mm; Adtech Polymer Engineering Ltd., Aston Down East, UK) wurden die Liganden mit einer Geschwindigkeit von 0,8 bis 1,2 mL/min appliziert. In eine mit CNG-Lösung befüllte Messpipette wurde eine Elektrode (chlorierter Silberdraht) eingeführt und in einem Pipettenhalter fixiert. Der Pipettenhalter war auf einem Vorverstärker (*Headstage*) befestigt. Die Elektrode diente als Kontakt zwischen Verstärker und Messkammer.

Zudem befand sich in der Messkammer ein geerdetes *Ag/AgCl-Pellet*, welches als Badelektrode fungierte, wodurch sich ein Stromkreis bildete und befand sich . Der Pipettenhalter konnte mittels eines Mikromanipulators unter optischer Kontrolle eines Mikroskops dreidimensional positioniert werden. Als inverse Mikroskope wurden das Olympus IX71 (Tokio, Japan) und das Zeiss Axiovert 200 M (Jena, Dtl.) genutzt. Des Weiteren befand sich im Pipettenhalter ein weiterer Anschluss, um über eine Spritze Über- oder Unterdruck auf die Pipettenspitze zu applizieren. Die kinetischen Messungen des schnellen Lösungswechsels wurden zusätzliche mit einer piezoelektrisch-gesteuerten zweikanaligen Theta-Glaspipette (*Switchpipette* - Abb. 11A) durchgeführt (Jonas 1995).

Die Aufnahme des Signals erfolgte durch den Vorverstärker und Verstärker als Einheit eines Axopatches 200B (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA) bzw. des EPC10 (HEKA Elektronik Dr. Schulz GmbH, Lambrecht, Dtl.). Die Signale wurden mit einem 2 kHz-Tiefpass-Besselfilter (4-polig) gefiltert.

4.3.4 Patch-Clamp-Protokolle

Vor jedem Eintauchen einer Pipette in die Badlösung wurde Überdruck auf die Pipette angelegt, um Verschmutzungen der Spitze zu vermeiden. Danach wurde die Pipette an die Zellmembran der Oozyte herangeführt (Abb. 10A) und der Überdruck gelöst und etwas Unterdruck angelegt. Nach wenigen Sekunden sollte sich eine feste Dichtung zwischen Glas und Membran bilden (*Gigaseal*) und somit einen hochohmigen Widerstand bilden ($G\Omega$). Durch den Mikromanipulator wurde die Pipette erst etwas in Richtung der Membran geschoben und dann zügig mit einem Membranstück (*Patch*) herausgerissen (Thon et Benndorf 2014). Der Patch in der *inside-out* Konfiguration (Abb. 10B) wurde zum Applikationssystem geführt und konnte vermessen werden.

Das Spannungsprotokoll für die olfaktorischen CNG-Kanäle beinhaltet das Haltepotential bei 0 mV und besitzt mit -10 mV und +10 mV eine geringe Kommandospannung für jeweils 1200 ms (Abb. 12A - Einschub). Währenddessen ist der Patch über die komplette Dauer mit Ligandenlösung umspült.

Für die Bestimmung der Ionenkanalkinetik am CNG-Kanal wurde ein modifiziertes Protokoll angewendet (Abb. 11). Zu Beginn wurde ein Haltepotential von 10 mV angelegt und nach 0,5 s der Konzentrationssprung von 0 μM auf 0,1; 0,2; 1; 2 oder 10 μM mit einem piezo-gesteuerten Theta-Glas durchgeführt. Nach dem Erreichen eines Gleichgewichtes gab es einen inversen Konzentrationssprung zur Ausgangskonzentration (0 μM). Parallel wurde die Stromantwort des Kanals auf die Konzentrationsunterschiede aufgenommen (Abb. 11B).

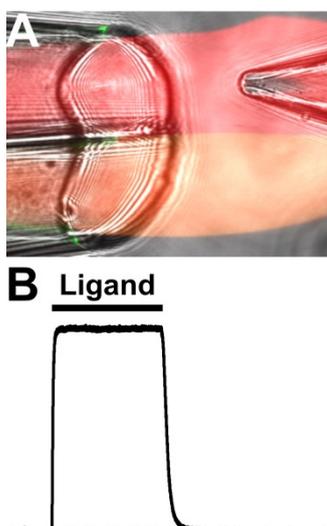


Abbildung 11. Bestimmung der Ionenkanalkinetik.

A) Bild einer *Switch*pipette (Θ -Glas) mit zwei farblich unterschiedlichen Lösungen (rot + orange). Die *Patch*pipette wird im Lösungsfluss positioniert. Nach einer gewünschten Zeit springt die piezo-gesteuerte *Switch*pipette in die nächste Position und die *Patch*pipette befindet sich im zweiten Lösungsfluss. Danach springt die *Switch*pipette in die Ausgangsposition zurück. Verschiedene Liganden mit unterschiedlichen Konzentrationen können somit auf Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken durch sehr schnelle Sprünge zweier Lösungen (z.B. Ligand- + Kontrolllösung) an einem *Patch* untersucht werden. B) Beispielhafter Stromverlauf durch schnellen Lösungswechsel an einem *Patch* mit Ionenkanälen.

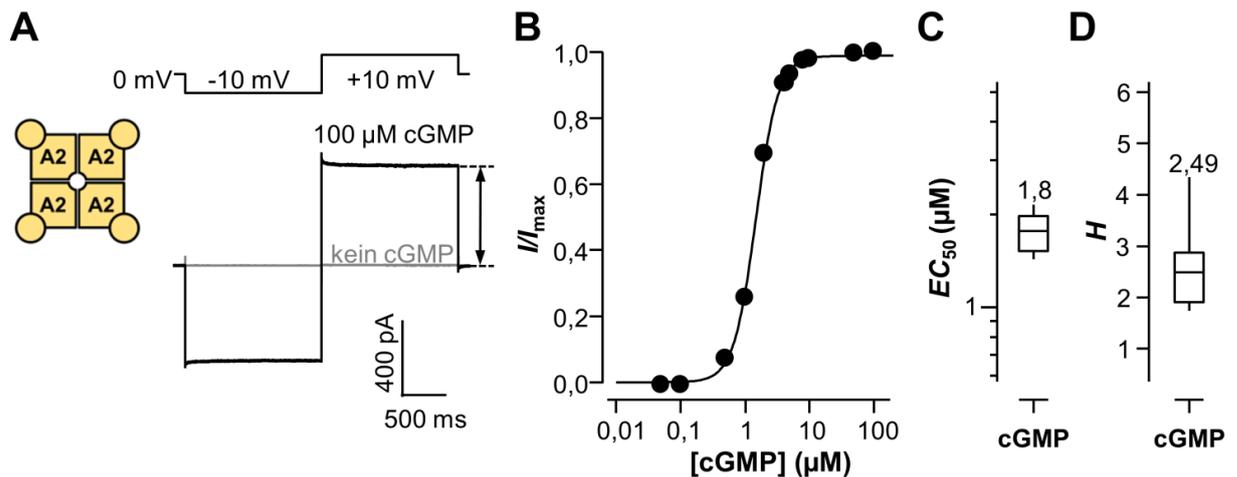


Abbildung 12. Schematisches Messprotokoll der Gleichgewichtsaktivierungen mit Auswertung A) Repräsentative Stromantwort des CNGA2-Kanals auf Pufferlösung und sättigende Konzentration cGMP. Ein analoges Verfahren wurde beim Heterotetramer genutzt. Schwarze Pfeile zeigen die Amplitude, welche bei +10 mV ausgewertet wurden. Oberer Einschub zeigt das dazugehörige Spannungsprotokoll. B) Logarithmische Konzentrations-Aktivierungsbeziehung an einem Patch. In diesem Fall betrug der EC_{50} -Wert = 1,47 μM und $H = 2,52$. Box-Plots der EC_{50} -Werte (C) und Hill-Koeffizienten (D) aus allen Einzelpatches der Versuchsreihe erstellt. Der Zahlenwert über der Box und die horizontale Linie in der Box repräsentieren den Mittelwert. Die Boxen zeigen die 25. und 75. Perzentile und die Antennen die 10. und 90. Perzentile der Daten. Dies gilt für alle abgebildeten Box-Plots dieser Arbeit. Modifiziert nach Otte et al., 2018.

4.4 Patch-Clamp-Fluorometrie

4.4.1 Konfokale Patch-Clamp-Fluorometrie (cPCF)

Bei der Konfokalen *Patch-Clamp*-Technik behilft man sich der sogenannten *Patch-Clamp*-Fluorometrie (PCF) (Zheng et Zagotta 2000). Dabei kombiniert man die herkömmliche Elektrophysiologie mit Fluoreszenz-Methoden. Eine mögliche Anwendung dabei ist die Aufnahme des Stromes der Ionenkanäle in einem Patch bei gleichzeitig aufgenommenen Fluoreszenzsignalen. Zum Beispiel kann der Ligand mit einem Farbstoff markiert werden und dessen Bindung an das Zielprotein mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (Biskup et al. 2007, Kusch et al. 2010). Somit kann die enge Beziehung zwischen Ligandenbindung und Kanalaktivierung direkt gemessen werden und bei der Ermittlung von möglichen Kooperationsmodellen helfen (Hummert et al. 2018).

Die in dieser Arbeit verwendete optische Methode beruht auf der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie die von Marvin Minsky (1957) zum Patent angemeldet (US 3013467 A) wurde. Bei dieser Technik wird der Laser in der Probe fokussiert. In der Bildebene des Fluoreszenzsignales wird eine konfokale Lochblende (*Pinhole*) platziert, die fokusfernes Licht herausfiltert (Abb. 13) und somit nur das Signal aus einem kleinen Volumen des Fokus und der Fokusebene detektiert wird. Dies erhöht

das Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) durch Unterdrückung des Hintergrundsignals. Mit Hilfe eines Scanners wird die xy-Ebene systematisch abgescannt. Durch diese Technik gelangt nur Fluoreszenz von fluoreszierenden Liganden aus einem stark verringerten Probenvolumen (am Patch) in das System. Ein Referenzfarbstoff (in dieser Arbeit DY647) dient als Gegenfärbung und zur Differenzbilderstellung.

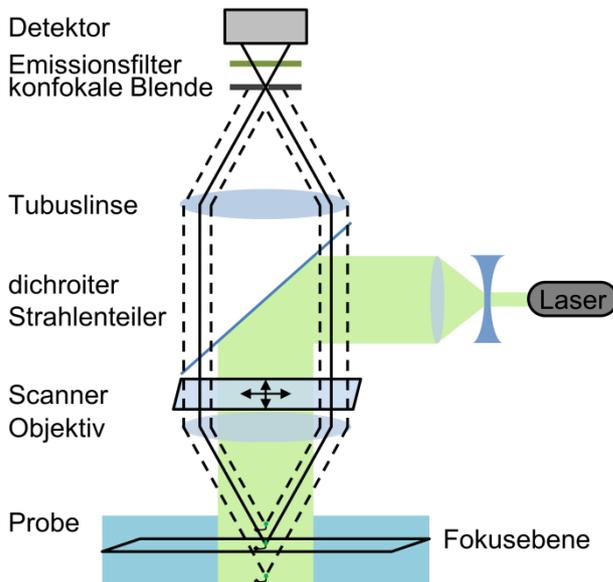


Abbildung 13. Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops.

Ein Laser dient als Lichtquelle und wird mittels eines dichroitischen Strahlenteilers auf die Probe gelenkt. Der fluoreszierende Farbstoff gibt Photonen (stabile Linie) zurück, welche den Strahlenteiler passieren und nach der konfokalen Blende (*Pinhole*) auf den Detektor treffen. Dabei können nur Moleküle in der Fokusebene und im Fokus detektiert werden. Außerhalb dieser Ebene gelangen die Fluoreszenzstrahlen (gestrichelte Linie) nicht durch die Lochblende. Anhand des Scanners wird der Fokus punktgenau gerastert und sequentiell aufgenommen.

4.4.2 cPCF-Pipetten

Für die cPCF-Experimente wurden Patchpipetten aus Borosilikatglaskapillaren (AD 2,0 mm, ID 1,0 mm; Hilgenberg, Malsfeld) verwendet. Diese Kapillaren wurden mit einem Horizontal-Pipettenziehgerät (Sutter Instruments Company, P-97, Novato, USA) in fünf bis sieben Zügen auf den gewünschten Durchmesser ausgezogen. Die Ränder der Borosilikatglaspipettenspitzen wurden zur Glättung über einem glühenden Platindrath poliert. Nach der Füllung der Pipetten mit der Pipettenlösung wiesen diese einen Pipettenwiderstand von 0,7 – 1,5 M Ω auf.

4.4.3 cPCF-Messstand

Der verwendete Messstand besteht in seinen Grundzügen aus einem einfachen elektrophysiologischen Aufbau (KAPITEL 4.3.3) mit zusätzlichem Fluoreszenzmikroskop (LSM 710 konfokales Mikroskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Dtl.). Ein weiterer Unterschied ist die verwendete Aufnahmesoftware. Der Verstärker, Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Union City (CA), USA) gibt sein Signal weiter an die ISO3- Hard- und Software (MFK, Niedernhausen, Dtl.). Die Signale wurden mit einem 1 kHz-Tiefpass-Besselfilter (4-polig) gefiltert und mit 200 Hz aufgenommen.

Das Fluoreszenzmikroskop beinhaltete zwei He-Ne-Laser mit den Emissionswellenlängen von 543 nm und 633 nm für die Anregung der jeweiligen Farbstoffe. Die Laserstrahlen wurden durch den dichroitischen Hauptstrahlenteiler (MBS 488/543/633) auf die Probe gelenkt. Dabei wurde der fluoreszierende Ligand bei 543 nm (He/Ne-Laser) angeregt und das emittierte Signal im Detektionsbereich von 546-635 nm aufgenommen, bzw. der Referenzfarbstoff DY647 bei 633 nm (He/Ne-Laser) angeregt und das Fluoreszenzsignal im Detektionsbereich von 637-759 nm registriert. Die Lochblende (*Pinhole*) wurde auf einen Durchmesser von 49,5 μm festgesetzt. Die Aufnahmerate lag zwischen 7 - 10 Hz. Zur Aufnahme wurde das C-Apochromat 40x Wasser-Immersionsobjektiv der Firma Zeiss verwendet (1,2 N.A.). Mit der mitgelieferten LSM-Software (Zen 2010 B, Jena, Dtl.) konnte die Lage des *Patches* in der Pipette kontrolliert werden und in der Größe von 200 x 70 Pixel bei einer Pixelgröße von $< 0,2 \mu\text{m}$ aufgenommen werden.

4.4.4 cPCF-Protokolle

Das Messprotokoll bei der cPCF-Messung ist ähnlich der reinen Elektrophysiologie (KAPITEL 4.3.4). Unterschiede sind nur für das Spannungsprotokoll zu nennen. Dies beträgt 5 s und begann mit einem Haltepotential von 0 mV. Danach folgte eine positive Kommandospannung von +10 mV und wieder zurück auf das Haltepotential. Diese Versuche wurden aufgrund der Komplexität und der zeitintensiven Experimente allein für den homotetrameren CNGA2-Kanal durchgeführt. Während der Aufnahmen der Elektrophysiologie wurde parallel das Fluoreszenzsignal aufgenommen. Bei den Versuchen zur Bestimmung der Fluoreszenzspektren wurde keine Spannung angelegt, sondern nur eine Aufnahme der Fluoreszenzsignale vorgenommen.

Bei allen Messungen wurde der Ligandenlösung der Referenzfarbstoff (DY647, Dyomics, Jena, Dtl.) mit einer Konzentration von 5 μM beigefügt,

4.5 Fluoreszenzspektren (Lambda-Modus)

Um mögliche negative Interaktionen zwischen Farbstoff und Protein auszuschließen, wurden die Fluoreszenzspektren des Farbstoff-markierten Liganden am Ionenkanal aufgenommen. Dazu diente das Fluoreszenzmikroskop LSM 710 (konfokales Mikroskop, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Dtl.) im Lambda-Modus. Das Fluoreszenzsignal wurde durch ein Gitter spektral aufgespalten und wird von einem 32-Kanal Photomultiplier (PMT)-Detektor bei unterschiedlichen Wellenlängen (λ) in 3,2 nm Abständen im Bereich von 546 – 659 nm detektiert. Abbildung 14 zeigt

ausgewählte Bilder bei unterschiedlichen Wellenlängen und das entsprechende Spektrum, welche am *Patch* und in der Badlösung nach Fluoreszenzintensität ausgewertet wurden. Zur Anregung diente der He/Ne-Laser 543 nm.

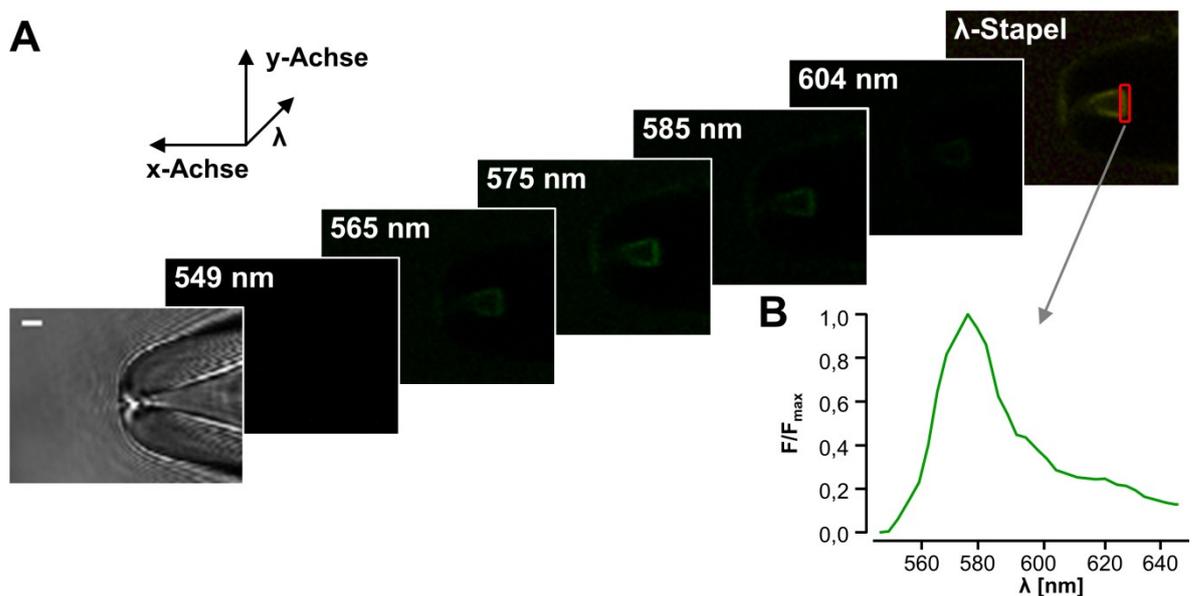


Abbildung 14. Lambda-Modus. A) Auswahl der aufgenommenen Bilder im Lambda-Modus. Erstes Bild zeigt das Transmissionsbild, Skale: 2 µm. Die fünf darauffolgenden Bilder zeigen die Fluoreszenzintensität bei der angegebenen Wellenlänge. Das letzte Bild zeigt alle aufgenommenen Wellenlängen zusammengefasst. B) Fluoreszenzspektrum des rot gekennzeichneten Bereiches.

4.6 Datenanalyse

4.6.1 Bestimmung der Gleichgewichtsaktivierung

Um Signale verschiedener *Patche* zu vergleichen, wurde an jedem *Patch* eine sättigende Konzentration von 500 µM cAMP bzw. 100 µM cGMP als Maximalstrom (I_{\max}) verwendet. In allen weiteren Auswertungen, z.B. andere Liganden und Konzentrationen, wurden die Stromantworten auf den jeweiligen Maximalstrom des *Patches* normiert. Bei den CNG-Kanälen wurde nur der Gleichgewichtstrom bei +10 mV ausgewertet (Abb. 12A - Pfeile). Die Aktivierungswerte der Pufferlösung wurden von der Stromantwort der Ligandenkonzentrationen abgezogen (I) und auf I_{\max} normiert.

4.6.2 Konzentrations-Aktivierungsbeziehung

Die normierten Stromamplituden I/I_{\max} eines *Patches* wurden in das Verhältnis zur jeweiligen Konzentration gestellt, sodass eine komplette Konzentrations-Aktivierungsbeziehung entstand (Abb. 12B+F). Mittels des Programms IGOR Software® wurde die Hill-Gleichung (Gleichung 1) an I/I_{\max} im Verhältnis zur Konzentration angepasst und

so die EC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten (H) erhalten. Die Werte wurden danach in Box-Plots (Abb.12C+D) und Tabellen 7+8 (siehe Anhang) zusammengefasst.

$$I/I_{\max} = 1/(1+(EC_{50}/[Ligand])^H) \quad (1)$$

- I - Stromamplitude der jeweiligen Konzentration nach Puffersubtraktion
- I_{\max} - Maximalstrom bei sättigender Konzentration des cNMPs spezifisch für jedes cNMP und Ionenkanal
- EC_{50} - cNMP-Konzentration bei halbmaximalem Strom
- H - Hill-Koeffizient

4.6.3 Bestimmung der Ionenkanalkinetiken

Die ligandenabhängigen Aktivierungs- sowie Deaktivierungskinetiken wurden mittels der IGOR Software® bei verschiedenen Konzentrationen ermittelt. Nach einer anfänglichen Verzögerung t_0 wurden die Ströme mono- oder biexponentiell gefittet.

$$y = A * e^{-(t_0+t) / \tau_{kin}} \quad (2)$$

$$y = A_1 * e^{-t / \tau_{kin1}} + A_2 * e^{-t / \tau_{kin2}} \quad (3)$$

Um die monoexponentiellen Verläufe mit den biexponentiellen zu Vergleichen wurden letztgenannte gemittelt und eine mittlere Zeitkonstante (τ_{Mittel}) berechnet.

$$\tau_{Mittel} = \frac{A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2}{A_1 + A_2} \quad (4)$$

4.6.4 Konzentrations-Bindungsbeziehung

Die Fluoreszenzbilder wurden mittels einer, von Herrn Prof. Biskup, programmierten Software auf Grundlage von MATLAB (MathWorks Inc, Natick (MA), USA), ausgewertet. Das sogenannte LSM-GUI Programm diente dabei der *Patch*-Findung sowie der Erstellung eines Differenzbildes. Die Aufnahme eines Bildes bestand aus dem grünen Fluoreszenzkanal (Abb. 15A - fluoreszierender Ligand) und dem roten Fluoreszenzkanal (Abb. 15B - Referenzfarbstoff DY647). Bei Überlagerung dieser beiden Kanäle wird ein starkes grünes Fluoreszenzsignal am Patch (Abb. 15C + D) sichtbar, wo die Fluoreszenz des Referenzfarbstoffes stark abnimmt. Dies stellt ein Indiz für die spezifische Bindung des fluoreszierenden Liganden an die Bindestellen des Kanals dar. Bei der Quantifizierung (Gleichung 5) des Fluoreszenzsignals wurde zu Beginn sowohl das Hintergrundsignal ermittelt, und vom Bild abgezogen, als auch die Intensität der Lösung bestimmt und skaliert. Danach wurde der Referenzfarbstoff am *Patch* von dem grünen Signal abgezogen, sodass im Differenzbild nur der

Überschuss an Fluoreszenzsignal (ΔF) erkennbar wurde (Abb. 15E). Zudem wurde durch die Software mittels der Steilheit des Fluoreszenzabfalls die Position des *Patches* automatisch bestimmt. Durch unterschiedliche Helligkeiten der Farbstoffe, wurde für jeden fluoreszierenden Liganden das Maximum an Helligkeit bei maximal möglicher Konzentration bestimmt.

$$D_{\text{Bild}} = (\text{Patch}_L - H_L) - [(\text{Patch}_R - H_R) * \Delta_L / \Delta_R] \quad (5)$$

- D_{Bild} – Differenzbild (ΔF)
- Patch_L – Fluoreszenzsignal des fluoreszierenden Liganden am Patch
- H_L – Hintergrund fluoreszierender Ligand (hinter dem Patch in der Pipette)
- Patch_R – Fluoreszenzsignal des Referenzfarbstoffes am Patch
- H_R – Hintergrund Referenzfarbstoff (hinter dem Patch in der Pipette)
- Δ_L – Badlösung (vor der Pipette) - Hintergrund fluoreszierender Ligand
- Δ_R – Badlösung (vor der Pipette) - Hintergrund Referenzfarbstoff

Entsprechend KAPITEL 4.6.2 wurde die Hill-Gleichung (1) auf das Fluoreszenzsignal bezogen (Gleichung 6) und beim Fitten das Maximum auf eins gesetzt.

$$F/F_{\text{max}} = 1/(1+(BC_{50}/[\text{Ligand}])^H) \quad (6)$$

- F – Fluoreszenzsignal der jeweiligen Konzentration
- F_{max} – Maximalfluoreszenzsignal bei sättigender Konzentration des fluoreszierenden Liganden
- BC_{50} – Konzentration des fluoreszierenden Liganden bei halbmaximaler Bindung
- H – Hill-Koeffizient.

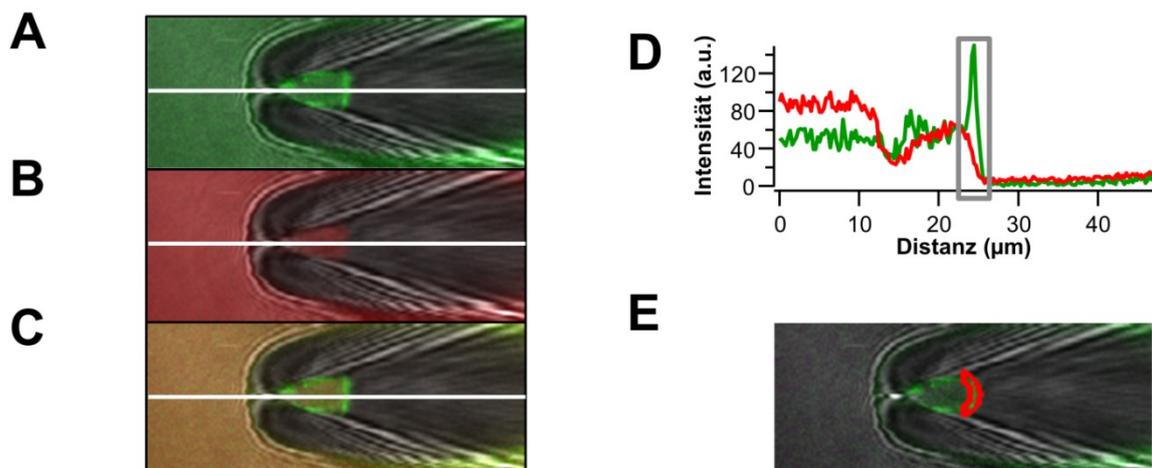


Abbildung 15. Auswertung der Bindung eines fluoreszierenden Liganden an CNGA2-Kanäle mittels cPCF. A) Überlagerung der Fluoreszenzintensität (FI) des Farbstoffes mit dem Transmissionsbild (TB). B) Überlagerung der FI des Referenzfarbstoffes (DY647) mit dem TB. C) Überlagerung der beiden vorherigen Bilder (A+B). D) Profil entlang der weißen Linie. Dabei wird die FI der roten Fluoreszenz auf die grüne Fluoreszenz normiert. Graues Rechteck als Region mit dem stärksten Abfall der FI. E) Daraus resultierendes Differenzbild. Bereich des *Patchdome*s (rote Markierung) mit der größten FI wurde ausgewertet. Seitliche Bereiche des *Patches* wurden bei der Fluoreszenzbestimmung nicht miterfasst.

4.7 Homologie-Modell und Docking

Um Informationen über die Oberflächeneigenschaften der Proteinbindestelle und des Liganden zu erhalten, helfen Röntgenkristallstrukturen oder Kryo-EM-Aufnahmen. Da jedoch für den CNGA2-Kanal eine dreidimensionale Struktur fehlt, wurde aus bereits aufgelösten Strukturen ein Homologie-Modell erstellt. Um für den homotetrameren CNGA2-Kanal der Ratte (UniProt-Nummer: Q00195) ein solches Modell zu generieren wurde die 3,5 Å Cryo-EM-Struktur von Li (2017) als Vorlage genutzt. Die Struktur stellt den TAX4-Kanal des *C. elegans* in der ligandengebundenen und porengeöffneten Konformation (PDB-Nummer: 5H3O) dar. Zur Modellierung und Herstellung eines *Alignments* (engl. Abgleich) und eines 3D-Modells diente der SWISS-MODEL-Server (Biasini et al. 2014) mit einer Sequenzidentität von 54,5%, einer Deckungsgleichheit von 69% und einem Sequenzbereich von 127-583. Die Modellqualität wurde auf dem Server mithilfe der MolProbity Software (Chen et al. 2010) mit einer Bewertung von 1,42 und als gut-definiert eingestuft. Für die computergestützten Dockingexperimente wurde das oben beschriebene Homologie-Modell verwendet und mit AutoDockTool 4.2 (ADT 4.2) ein Ligand in die CNBD angefügt. Die drei-dimensionalen Strukturen der Liganden wurden entweder von der Software durch die Docking-Krauffelder oder von Michele Bonus (AG Gohlke, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dtl.) durch Parameterisierung mittels GAUSSIAN software[®] definiert. ADT 4.2 verwendet Netze für die verschiedenen Atomtypen und lässt jedes Atom im Netz mit seiner Umgebung interagieren, wobei die beste Position des Atoms anhand des niedrigsten Energiezustandes gespeichert wird. Solch ein Netz wird über die Bindestelle gestülpt und als möglicher Aufenthaltsort des Liganden festgesetzt. Die X-, Y-, Z-Dimensionen eines solchen Netzes betragen 60*60*60 Punkte bei einem Abstand von 0,375 Å. Bei den Versuchen wurden keine Beschränkungen für funktionelle Gruppen oder Aminosäure des Proteins festgelegt. Die Einstellung für alle Versuchsabläufe wurde bei *Maximum Number of evals*: 25.000.000 und *Maximum Number of generations*: 27.000 eingestellt. Um die beste Bindepote des Liganden am Protein zu finden, benutzt ADT 4.2 den genetischen Algorithmus nach Lamarck. Eine Bindepote bedeutet dabei eine bestimmte Orientierung und Konformation des Liganden im Raum. Jedes Dockingexperiment für einen Liganden wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und die beste Bindepote in KAPITEL 5.6 dargestellt. Zur Visualisierung der Bindepotes in der CNBD wurde *PyMol1.8*[®] verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Native Liganden der olfaktorischen CNG Ionenkanäle

Mithilfe der *Patch-Clamp* Technik können Agonisten bzw. Antagonisten in Bezug auf Kanalaktivierung oder -inhibierung charakterisiert werden. Wie in zahlreichen Lehrbüchern beschrieben, bilden die zyklischen Nukleotide die einzige Aktivierungsmöglichkeit der CNG-Kanäle. Da die Bindestelle für Nukleotide der CNG-Kanäle intrazellulär liegt, wurde die *inside-out* Konfiguration genutzt. Im KAPITEL 4.3.4 wurde bereits in der Abbildung 12 das Spannungsprotokoll des Versuches skizziert.

Als erstes wurde der Effekt der nativen Liganden vermessen. Dabei zeigt Abbildung 16 die Konzentrations-Aktivierungsbeziehungen von cAMP und cGMP bei +10 mV am homotetrameren CNGA2 und am heterotetrameren CNGA2:A4:B1b. Die hier ermittelten EC_{50} -Werte lagen im Bereich der bereits publizierten Konzentrationen, sodass das Testsystem etabliert wurde. Die höchste scheinbare Affinität zeigte das cGMP am CNGA2:A4:B1b-Kanal (1,3 μ M). Der natürliche Ligand dieses Kanals, cAMP, zeigt einen EC_{50} -Wert von 5,0 μ M. Beim CNGA2-Kanal sind die Graphen weiter nach rechts verschoben, sodass die EC_{50} -Werte höher lagen, wie zum Beispiel cGMP bei 1,8 μ M bzw. cAMP bei 54,5 μ M. Dies bestätigt, dass die verschiedenen Untereinheiten einen wichtigen Einfluss auf die scheinbare Affinität der Liganden haben, denn besonders der EC_{50} -Wert wurde beim endogenen Liganden, cAMP, durch die Untereinheiten A4 und B1b erheblich verringert. Die Hill-Koeffizienten lagen für alle Konstrukte über zwei und deuteten auf eine positive Kooperativität hin mit einer Beteiligung von mehr als zwei Untereinheiten am *Gating*prozess. Ersichtlich war am Verlauf der Graphen, dass die endogenen cNMP keine Partialagonisten darstellten, sondern vollwertige Agonisten waren. Ein partialagonistischer Effekt wurde bereits für cAMP an den rod CNG-Kanälen beschrieben (Kaupp and Seifert 2002). Aufgrund der Übersichtlichkeit werden die aus der Hill-Gleichung (Gleichung 1) erhaltenen EC_{50} -Werte der folgenden Liganden als Box-Plots dargestellt und sind somit direkt miteinander vergleichbar (siehe KAPITEL 4.3.4 + Abb. 12). An gegebener Stelle wird auf Besonderheiten der Konzentrations-Aktivierungsbeziehungen hingewiesen.

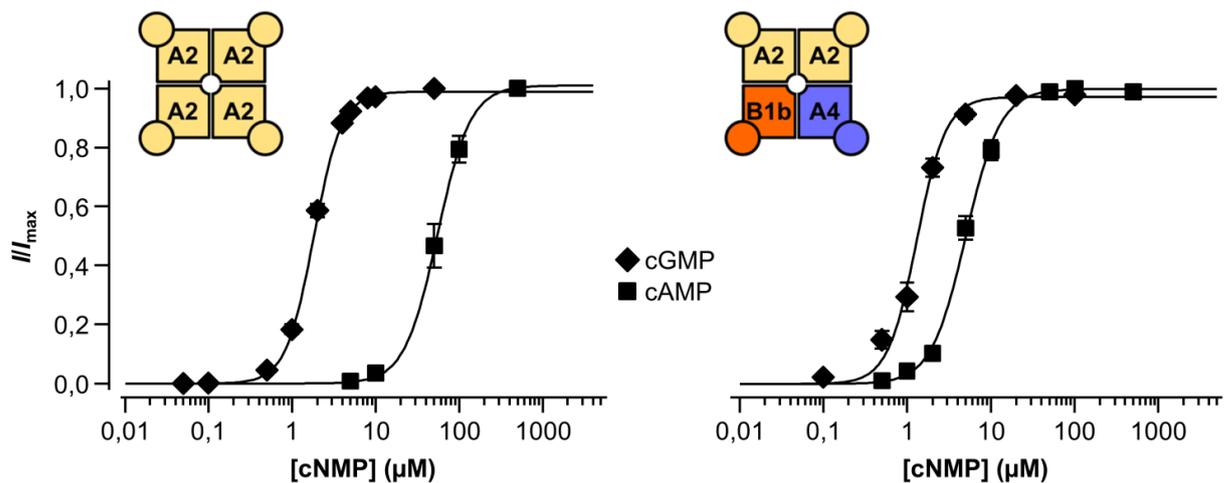


Abbildung 16. Konzentrations-Aktivierungsbeziehungen endogener Nukleotide an den olfaktorischen CNG-Kanälen. Die jeweiligen Konzentrationen der Liganden (Raute – cGMP, Quadrat – cAMP) wurden mit der Hill-Gleichung gefittet. Die EC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten (H) betragen für den homotetrameren CNGA2-Kanal 54,8 μM und 2,2 (cAMP) bzw. 1,8 μM und 2,6 (cGMP), für den heterotetrameren CNGA2:A4:B1b-Kanal 5,0 μM und 2,1 (cAMP) bzw. 1,3 μM und 2,5 (cGMP). Die Werte werden als Referenzwerte in den jeweiligen Box-Plots immer angeführt oder in Tabellenform (siehe Anhang 9.3) dargestellt.

5.2 Modifikationen und Substitutionen an der Nukleobase

Basierend auf kürzlich veröffentlichten Ligandenuntersuchungen nach affineren Liganden, mit verbesserten Bindungseigenschaften, an der CNBD (Moller et al. 2014) oder auch potenteren Agonisten für die HCN-Ionenkanäle (Ng et al. 2016) sollten verschieden modifizierte Nukleotide getestet werden, um mögliche Verbesserungen zu identifizieren. Dabei wurden bereits zu Beginn die Modifikationen ausgeschlossen, die nachweislich einen negativen Effekt auf die Ligandenaffinität zeigten (siehe KAPITEL 2.2 ZYKLISCHE NUKLEOTIDE). Eine Übersicht aller verwendeten Liganden liegt dieser Arbeit bei und ist im Anhang (KAPITEL 9.1 ÜBERSICHTSBLATT) zu finden.

Die Abbildung 17 zeigt die verschiedenen cNMP-Derivate, welche in diesem Kapitel an den homo- und heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanälen bei +10 mV getestet wurden (Abb. 18). Zuerst wurde die direkte Modifikation der Nukleobase (**2A/2G**) untersucht. Dabei wurde das Stickstoffatom an Position 7 durch ein Kohlenstoffatom ersetzt (sog. Deaza-Nukleotide). Dieses cAMP-Derivat (**2A**) zeigte eine starke Erhöhung der scheinbaren Affinitäten im Vergleich zum nativen cAMP an den homo- (2,15 μM) und heterotetrameren (0,37 μM) CNG-Kanälen. Bei **2G** verdoppelt sich der EC_{50} -Wert auf 3,53 μM am Homotetramer, wohingegen der EC_{50} -Wert beim Heterotetramer leicht sinkt. Dies führte dazu, dass **2G** für weitere Synthesen und Experimente nicht betrachtet wurde.

Positive Effekte auf die Affinität konnten bereits durch die Substitution von Bromatomen an Position 8 (**3A/G**) gezeigt werden (Caretta et al. 1985, Koch et Kaupp 1985,

Tanaka et al. 1989). Diese These wurde in der vorliegenden Arbeit an den CNG-Kanälen verifiziert. Die Bromderivate **3_A** (15,93 µM/ 1,64 µM) und **3_G** (0,13 µM/ 0,33 µM) erhöhten signifikant die scheinbare Affinität. Daraufhin sollte überprüft werden, ob sich dieser Effekt ebenfalls auf **2_A** übertragen ließ (**4_A**). Es stellte sich heraus, dass die halogensubstituierten Derivate an beiden CNG-Kanälen höhere scheinbare Affinitäten aufwiesen als **1_A**. Im Vergleich jedoch zum Deaza-Nukleotid (**2_A**) besaß das Bromatom eher einen negativen Einfluss auf **4_A** (6,75 µM/ 0,65 µM). Bemerkenswert ist, dass wiederum eine Bromierung an anderer Stelle am Nukleotid (Position 7 - **8_A**) den positiven Effekt des Halogens widerspiegelte. Für nähere Informationen siehe Abbildung 35 im Anhang und die Publikation nach Lelle et al. (2019).

Nichtsdestotrotz konnte bisher keine Synthesestrategie gefunden werden, um an bromierten Nukleotiden einen Linker oder gar einen Farbstoff zu koppeln, sodass eine andere Herangehensweise erfolgte, die ähnlich der Halogenierung war, aber für weitere Substitutionen zugänglich sein musste. Eine Möglichkeit war die Substitution mit einer Aminogruppe, welche koppelbar ist. Versuche mit solchen Liganden zeigten aber weniger Erfolg als mit einer Thiolgruppe (Brown et al. 1993). Zudem sind Thiole als Substituenten isoster zum Bromid (Siebert 2004), chemisch substituierbar und bieten Beweglichkeit für potentielle Linkergruppen, sodass Thiolgruppen eine hervorragende Alternative boten (**5_{AG}**). Die Substitutionen mit einem Schwefelatom erwies an beiden Ionenkanälen einen positiven Effekt (**5_A** – 6,42 µM/ 3,68 µM sowie **5_G** – 0,15 µM/ 0,37 µM).

Des Weiteren konnten Strassmaier und Karpen (2007) mit einer 8-Chlorphenylthio-Substitution (**6_{AG}**) die höchste publizierte scheinbare Affinität für CNG-Kanäle darstellen. Daraufhin testete Frau Uta Enke diese beiden Substanzen (**6_{AG}**) an beiden olfaktorische CNG-Kanälen und erhielt ebenfalls sehr gute Ergebnisse. Zwar besitzt **6_A** etwas höhere *EC*₅₀-Werte (3,26 µM/ 0,5 µM) als **2_A**, jedoch ist **6_G** unter den cGMP-Derivaten die affinste Verbindung (0,07 µM/ 0,06 µM). Aufgrund des positiven Effektes der Substitution eines Phenylringes in Position 8 (**6_A**) sollte die Wirkung eines Phenylringes an einer anderen Position getestet werden (Position 6 - **7_A**). Die positiven Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe am HCN2-Kanal zeigten eine deutliche Affinitätssteigerung (Leypold et al. 2019), die an den CNGA2-Kanälen ebenfalls überprüft werden sollte. Jedoch konnten die *EC*₅₀-Werte von **6_A** nicht erreicht werden (8,15 µM). Tests mit der gleichen Verbindung (**7_A**) an heterotetrameren CNG-Kanälen (Abb. 3B, D) zeigten ebenfalls vollagonistische Potenz, jedoch bei höheren

Konzentrationsbereichen als **6_A** bzw. **2_A** (EC_{50} -Wert: 0,84 μ M). Bei den cGMP-Derivaten gibt es nur wenige Möglichkeiten der Modifikation, sodass **7_G** nicht synthetisiert werden konnte.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass alle getesteten Substanzen als Vollagonisten fungierten und höhere scheinbare Affinitäten aufwiesen als die nativen Liganden. Dabei war ein ähnliches Verteilungsmuster der EC_{50} -Werte bei cAMP- und cGMP-Derivaten festzustellen (Abb. 18). Jedoch ist zu beachten, dass die Effekte am Homotetramer im Vergleich zu den endogenen cNMPs stärker sind als beim Heterotetramer. Eine Ausnahme mit geringerer scheinbarer Affinität, im Vergleich zu den Ausgangsnukleotiden, stellte das 7-CH-cGMP (**2_G**) am Homotetramer dar.

Die Vorteile einer Substitution in Position 8 sollte für die weitere Optimierung der fluoreszierenden Liganden genutzt werden. Jedoch ist eine weitere Substitution eines bromierten Nukleotids beschwerlicher. Somit wurden die positiven Effekte einer Substitution durch eine Thiol-Gruppe an der 8-Position konserviert. Zudem zeigte **2_A** ein hohes Potential als Ausgangsnukleotid für äquivalente Synthesen mit Linkern und Farbstoff. Ein weiteres Derivat des Deaza-cAMPs (siehe Anhang Abbildung 35 - **8_A**) zeigte ebenfalls das große Potential dieser Verbindung.

Die Daten für 8-CPT-cNMP (**6_{A/G}**) (Abb. 17) wurden von Frau Uta Enke zur Verfügung gestellt. Die Messungen der Deaza-Derivate (**5_{A/G}**, **6_A**, **7_A**) (Abb. 17) sind Teil der Publikation Lelle et al. (2019).

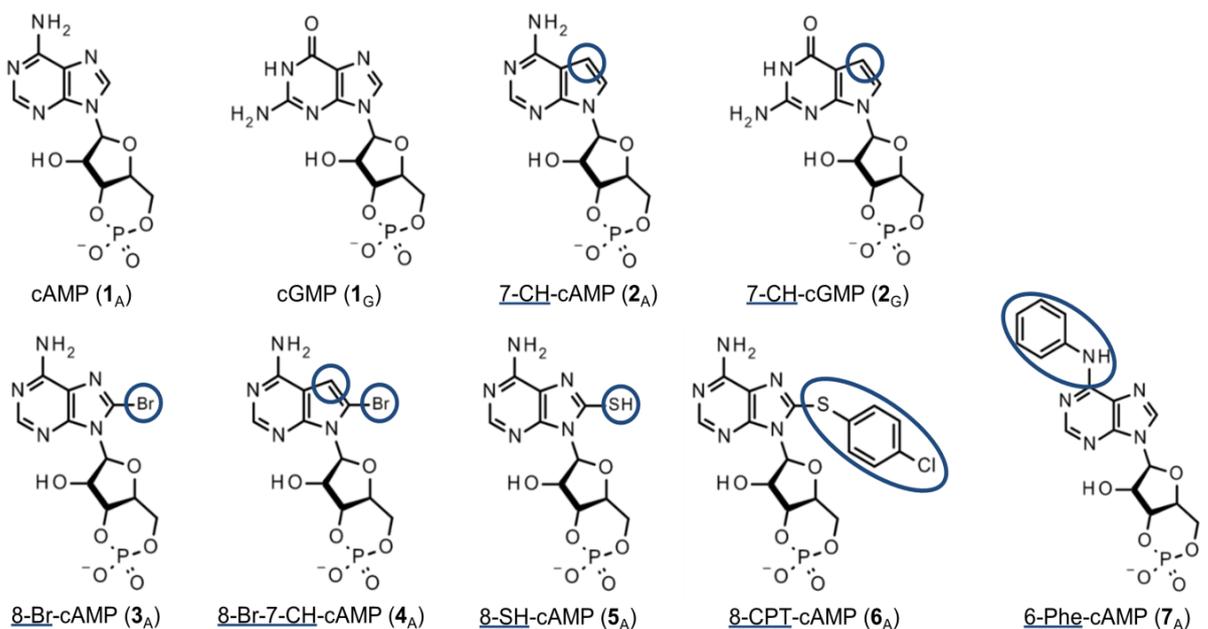


Abbildung 17. Schema der Nukleotide. Nummer und Indizes identifizieren die unterschiedlichen Nukleotide. Index A für cAMP-Derivate bzw. Index G für cGMP-Derivate. Blaue Rahmen deuten auf die Veränderungen im bzw. am zyklischen Nukleotid hin. Die Moleküle 3, 5 und 6 wurden ebenfalls als cGMP-Derivate vermessen (siehe Abb. 18).

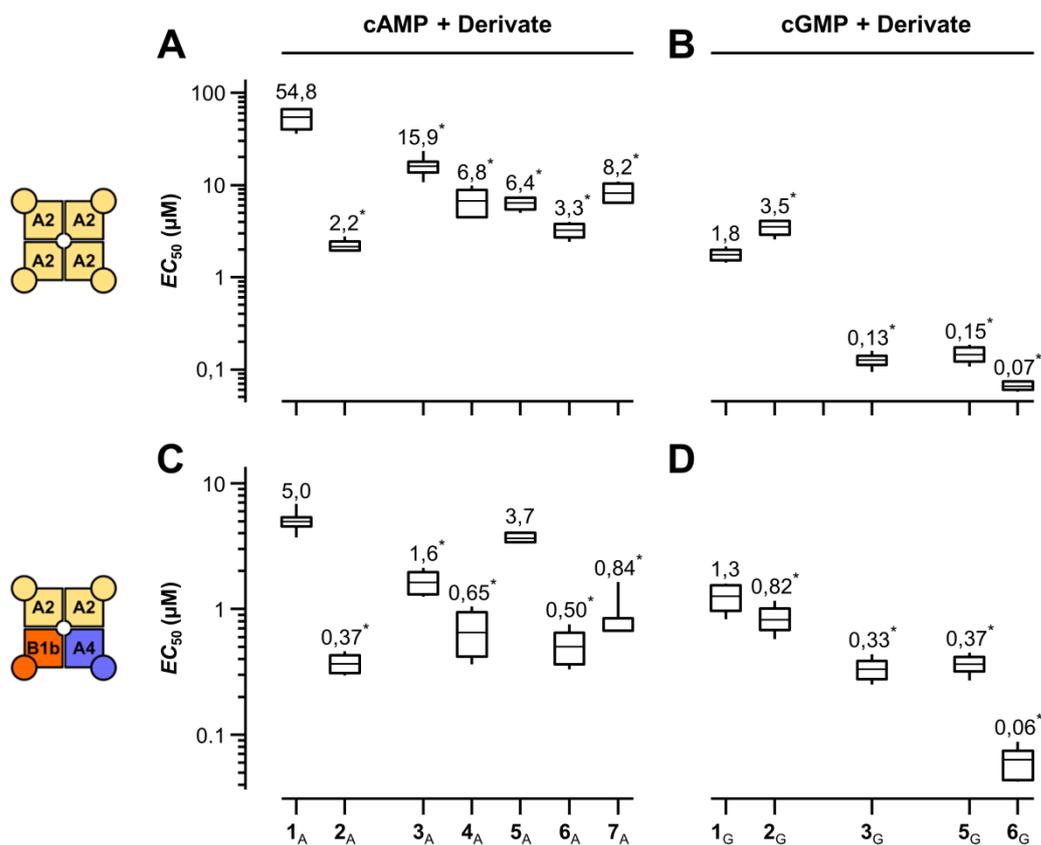
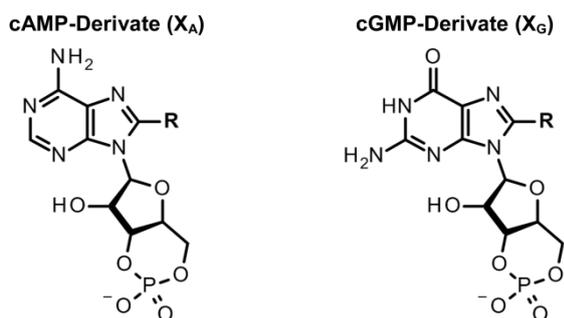


Abbildung 18. Effekte der modifizierten und substituierten cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den olfaktorischen CNG-Kanälen. Für die Beschreibung der Box-Plots vgl. Abb.12. A) CNGA2-Kanäle mit cAMP-Derivaten. B) CNGA2-Kanäle mit cGMP-Derivaten. C) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cAMP-Derivaten. D) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cGMP-Derivaten. Markierung (*) bedeutet signifikante Unterschiede der EC_{50} -Werte zum nativen cNMP $1_{A/G}$ ($p < 0.01$). Das Derivat 2_G am Homotetramer zeigt einen signifikanten erhöhten EC_{50} -Wert bzw. 5_A am Heterotetramer zeigt keine Signifikanz. Alle weiteren Liganden besitzen eine signifikant erhöhte, scheinbare Affinität und sind Vollagonisten.

5.3 Substitution der cNMP mit Linkerkette

Ein Großteil der Ergebnisse der cAMP- und cGMP-Derivaten mit Linkerkette wurde bereits in der Publikation Otte et al. (2018) veröffentlicht. Tabelle 2 zeigt die Nummerierung der verwendeten Liganden und deren Kettenstruktur. Die Synthese wurde durch die chemische Abteilung des Institutes für Physiologie II des Universitätsklinikums Jena in persona von Dr. Andrea Schweinitz, Uta Enke und Dr. Marco Lelle durchgeführt. Die Messungen wurden durch Frau Uta Enke und Dr. Andrea Schweinitz unterstützt. Das Manuskript wurde durch Herrn Prof. Benndorf vorangetrieben und mit meinen Analysen und Abbildungen vervollständigt. Die Charakterisierung der Kinetik erfolgte allein durch den Autor.

Tabelle 2 Schematische Darstellung der Linkerketten. Namen und Strukturen der verwendeten zyklischen Nukleotid-Derivate. L_X-Index bedeutet cAMP- (A) oder cGMP- (G) Derivate. Modifiziert nach Otte et al., 2018.



Nr. des Derivates	Kettentyp	Kettenstruktur an Position 8 (R)	R'
L1 _{A/G}	–	–H	–
L2 _{A/G}	8-AET-		–H
L3 _{A/G}	8-(Ac)AET-		–COCH ₃
L4 _{A/G}	8-AHT-		–H
L5 _{A/G}	8-(Ac)AHT-		–COCH ₃
L6 _{A/G}	8-ADT-		–H
L7 _{A/G}	8-(Ac)ADT-		–COCH ₃
L8 _{A/G}	8-(Ac)APT-		–COCH ₃
L9 _{A/G}	8-(Ac)APET-		–COCH ₃
L10 _{A/G}	8-(Ac)AGET-		–COCH ₃
L11 _{A/G}	8-(Ac)AGGET-		–COCH ₃
L12 _{A/G}	8-APP-		–H
L13 _{A/G}	8-APPT-		–H

5.3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung verschiedener aliphatischer Kohlenwasserstoffketten an Position 8

Publikationen von Brown et al. (1993) am Stäbchen-CNG-Kanal, von Möller et al. (2014) am HCN2-Monomer oder Nache et al. (2016) zeigten, dass eine Abhängigkeit der Kettenvariation auf die scheinbare Affinität bzw. die Bindung an Ionenkanäle besteht. In der vorliegenden Arbeit dienten diese Linker-Verbindungen (Tabelle 2) als Testliganden für nachfolgende Kopplungen mit Farbstoffen. Aus diesem Grund wurden nur Verbindungen mit einer freien Aminogruppe, als mögliche Kopplungsgruppe, sowie die jeweilige acetylierte Form als mögliches neutrales Molekül, wie es nach einer Kopplung mit einem Farbstoff als Amid-Brücke vorliegt, generiert. Die Verbindungen mit negativen Gruppen wurden wegen instabiler Kopplungsmöglichkeiten nicht synthetisiert. Allen gemein ist die Kopplung an das Nukleotid an Position 8 (Tabelle 2). Dabei hatten positiv geladene Ketten einen negativen Einfluss auf die Affinität. Um

dies zu verifizieren, wurden aliphatische Kohlenwasserstoffketten mit freien Aminogruppen (Tabelle 2 - gerade Zahlen **L2**, **L4**, **L6**) synthetisiert, um so in wässrigem Milieu eine positive Partiaalladung zu generieren. Um den Effekt zu neutralisieren wurde diese Aminogruppe mit einer Acetylgruppe substituiert, welche eine mögliche Amidbindung mit einem Farbstoff nachahmt (ungerade Zahlen **L3**, **L5**, **L7**). Die Auswirkung dieser weiteren Partiaalladung im Molekül wurde mit Hilfe der *inside-out Patch-Clamp*-Konfiguration am olfaktorischen CNGA2-Kanal ermittelt und zeigte für beide zyklischen Nukleotide ein ähnliches Muster (Abb. 19A + B). Eine Substitution an Position 8 zeigte immer eine signifikante Verbesserung der EC_{50} -Werte zum nativen cNMP, ausgenommen **L2_A** (128,3 μ M zu **1_A** – 54,8 μ M) was sowohl eine geringere scheinbare Affinität aufwies als auch einen Partialagonisten darstellte. Die Effekte zwischen den längeren aliphatischen Ketten und cGMP (1,8 μ M **1_G** – 0,05 μ M **L7_G**) bzw. cAMP (54,8 μ M **1_A** – 0,63 μ M **L6_A**) waren am größten. Die acetylierten Verbindungen wiesen tendenziell eine höhere scheinbare Affinität auf, als die freie Aminogruppe. Diese Verbesserung nimmt aber mit zunehmender Kettenlänge ab, sodass bei der Decylkette entweder kein signifikanter Unterschied (**L6_G** – **L7_G**) erkennbar wurde oder sogar die freie Aminogruppe eine höhere scheinbare Affinität (0,63 μ M **L6_A** – 2,3 μ M **L7_A**) zeigte. Zusammenfassend lässt sich behaupten, dass fast alle Derivate stärkere Agonisten waren als die nativen zyklischen Nukleotide, ausgenommen **L2_A** am Homotetramer, welches partialagonistische Wirkungen zeigte. Zudem führte eine Verlängerung der Kette zu einem geringeren EC_{50} -Wert unabhängig von einer Ladung. Ähnliche Verläufe zeigten sich beim heterotetrameren CNGA2:A4:B1b-Kanal. Hier stieg die scheinbare Affinität mit zunehmender hydrophober Kettenlänge und der größte Effekt war beim 8-(Ac)ADT-cAMP (**L7_A** - 0,47 μ M) im Vergleich zu **1_A** erkennbar.

Bereits die kleinste Kette des acetylierten Aminoethylthio-cNMP (**L3_{A/G}**) zeigte an beiden Ionenkanaltypen eine Verbesserung der scheinbaren Affinität im Vergleich zu den nativen Liganden (**1_{A/G}**). Ein weiterer positiver Effekt zeigte sich durch die Verlängerungen um weitere vier Kohlenwasserstoffeinheiten zum acetylierten Aminohexylthio-cNMP (**L5_{A/G}**) bzw. um acht C-Atome (Aminodecylthio-cNMP – **L7_{A/G}**) dar. Die größte Abnahme des EC_{50} -Wertes erfolgte somit von 54,8 μ M (**1_A**) auf 0,63 μ M (**L6_A**) beim homotetrameren CNGA2-Kanal.

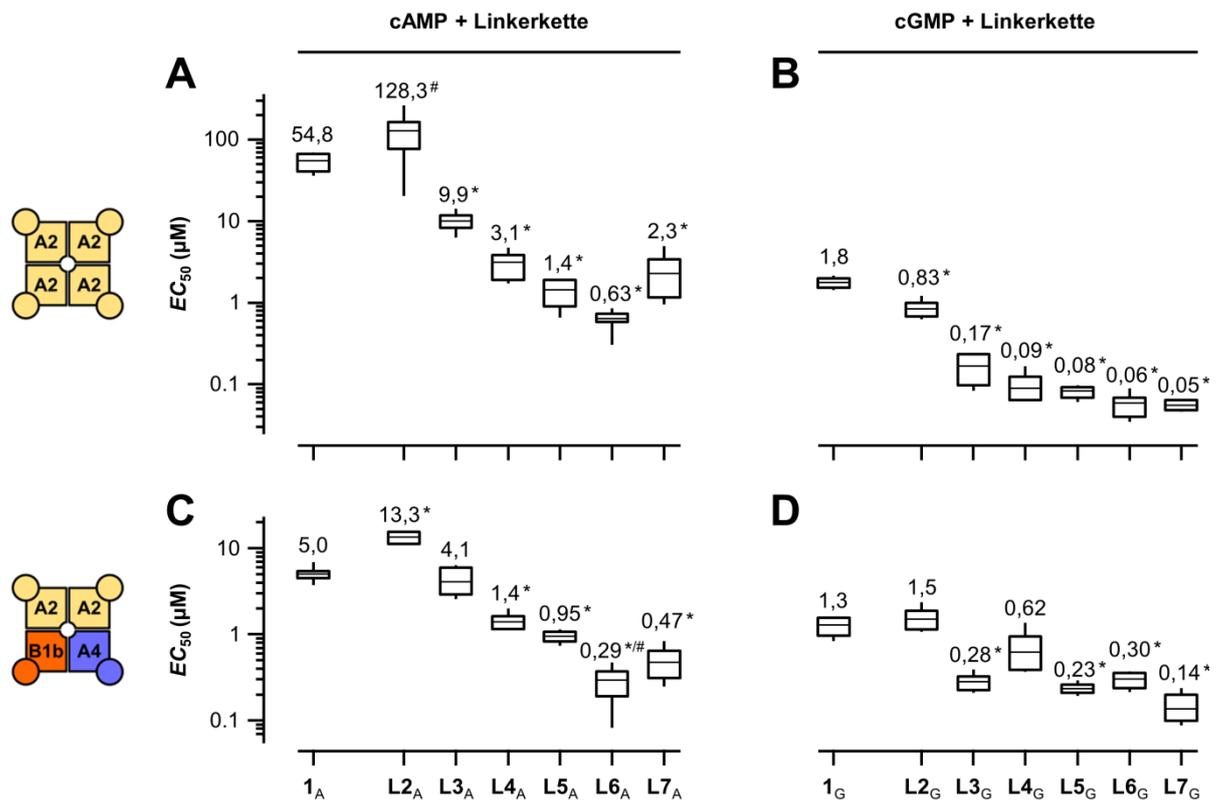


Abbildung 19. Effekte der aliphatischen hydrophoben cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen. A) CNGA2-Kanäle mit cAMP-Derivaten. B) CNGA2-Kanäle mit cGMP-Derivaten. C) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cAMP-Derivaten. D) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cGMP-Derivate. Markierung (*) bedeutet signifikante Unterschiede der EC_{50} -Werte zum nativen cNMP 1_{A/G} ($p < 0.01$). Alle Verbindungen außer L2_A sowie L2_G am Heterotetramer zeigen über beide olfaktorische CNG Kanäle einen verringerten EC_{50} -Wert. Dabei zeigen einige Moleküle keine Signifikanz (L3_A, L2_G, L4_G am Heterotetramer). Besonders die längeren Linkerketten (L5_{A/G}-L7_{A/G}) besitzen eine erhöhte scheinbare Affinität. L2_A am Homotetramer und L6_A am Heterotetramer stellen Partialagonisten dar ([#]). Modifiziert nach Otte et al., 2018.

5.3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung verschiedener aliphatischer Kohlenwasserstoffketten mit Heteroatomen an Position 8

Um die Befunde weiter systematisch zu belegen, wurden die verschiedenen Kohlenwasserstoffketten zum Teil mit Heteroatomen, wie Sauerstoff und Stickstoff, substituiert und an der Position 8 der Nukleobase gekoppelt (Tab. 2 L8 – L11). Die elektrophysiologische Charakterisierung erfolgte am CNGA2- sowie CNGA2:A4:B1b-Kanal (Abb. 20). Ein Vorteil solcher hydrophileren Linkerketten war die verbesserte Löslichkeit im Vergleich zu den längergliedrigen aliphatischen hydrophoben Linkerketten. Dazu wurde zum einen eine kleine Polyethylenglykol-Kette (PEG-Kette) mit zwei Sauerstoffen substituiert (L8_{A/G}), zum anderen eine der Aminosäure nachempfundene glycinähnliche Kette integriert (L10_{A/G}). 8-(Ac)APET-cNMP (L9_{A/G}) ist eine Mischform aus der kurzen Ethylkette (L2) und der Ethylenglycol-Kette (L8) und

8-(Ac)AGGET-cNMP beinhaltet zwei Glycin-Motive (**L11_{AG}**). Zum Vergleich dienten immer die beiden acetylierten aliphatischen Linkerverbindungen (**L5_{AG}**, **L7_{AG}**) mit den geringsten EC_{50} -Werten (Abb. 20).

Zwar konnte die Löslichkeit durch die eingebauten Heteroatome verbessert werden, jedoch führten die hydrophileren Ketten nur teilweise zu einer Verbesserung der scheinbaren Affinität. Allein am homotetrameren CNGA2-Kanal gab es Reduktionen der EC_{50} -Werte von 1,8 μ M (**1_G**) auf 0,55 (**L8_G**); 0,52 (**L9_G**); 0,34 (**L10_G**) und 0,33 μ M (**L11_G**) bzw. von 54,8 μ M (**1_A**) auf 24,9 (**L8_A**); 46,2 (**L9_A**); 34,3 (**L10_A**) sowie 29,4 μ M (**L11_A**). Beim heterotetrameren CNGA2:A4:B1b-Kanal ist die scheinbare Affinität entweder gleich oder es deutete sich ein Anstieg bei den EC_{50} -Werten an, 1,1 μ M (**L8_G**, **L9_G**) und 1,0 (**L11_G**) bzw. 6,0 (**L8_A**); 7,1 (**L9_A**); 6,6 (**L10_A**) und 5,1 μ M (**L11_A**). Einzige Ausnahme bildete das 8-(Ac)APET-cGMP (**L10_G**) mit einer Abnahme des EC_{50} -Wertes von 1,3 μ M (**1_G**) um mehr als die Hälfte auf 0,63 μ M.

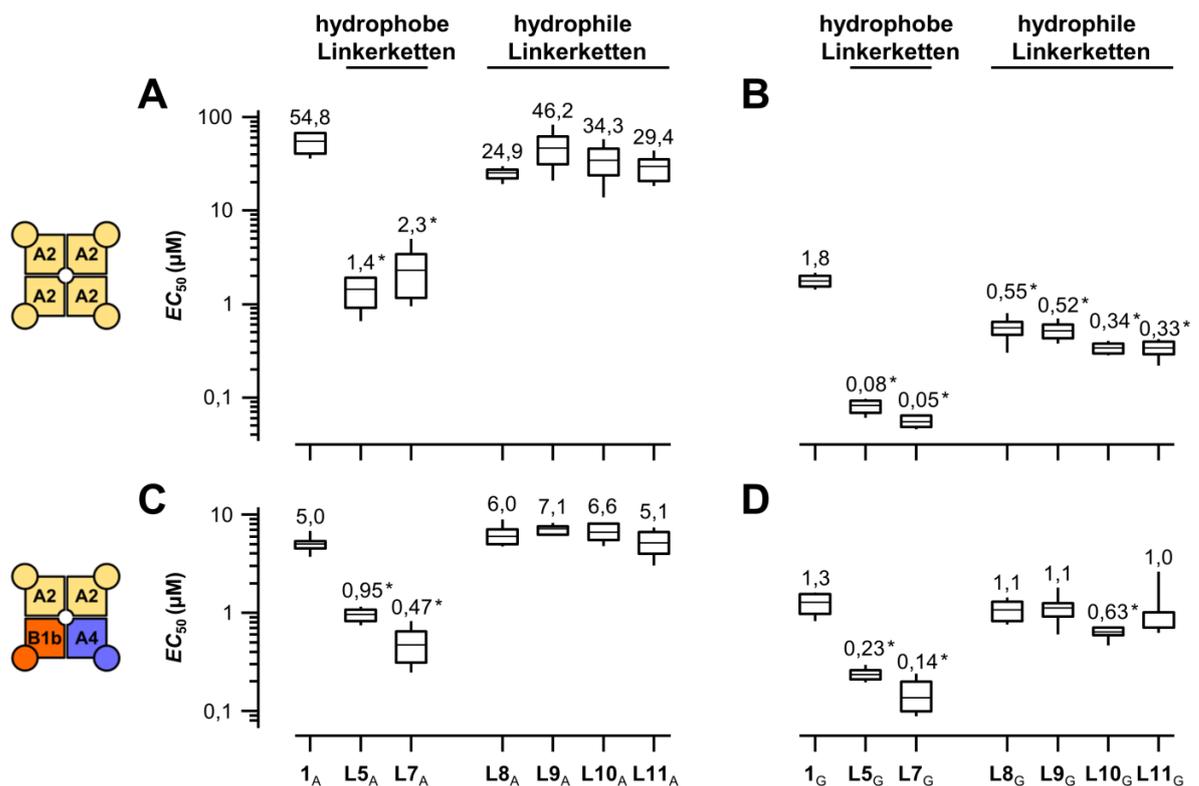


Abbildung 20. Effekte der aliphatischen hydrophoben cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen. A) CNGA2-Kanäle mit cAMP-Derivaten. B) CNGA2-Kanäle mit cGMP-Derivaten. C) CNGA2:A4:B1b mit cAMP-Derivaten. D) CNGA2:A4:B1b Kanäle mit cGMP-Derivate. Markierung (*) bedeutet signifikante Unterschiede der EC_{50} -Werte zum nativen cNMP **1_{AG}** ($p < 0.01$). Alle hydrophilen Verbindungen zeigen über beide olfaktorischen CNG Kanäle einen erhöhten EC_{50} -Wert als **L5_x** und **L7_x**. Dabei liegt die scheinbare Affinität annähernd zu den nativen cNMP. Die Ausnahme bildet das Homotetramer mit den cGMP-Derivaten sowie **L10_G** am Heterotetramer mit signifikanten geringeren EC_{50} -Werten. Modifiziert nach Otte et al., 2018.

5.3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung aromatischer Kohlenwasserstoffe an Position 8

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse, wie der negative Einfluss von Heteroatomen in der Linkerkette (**L8-L10_{AG}**) und der positive Einfluss eines Phenylringes (**6_{AG}**) sollte ein aromatischer Linker getestet werden. Dabei versprochen zwei verschiedene Syntheserouten Erfolg. Zum einen wurde der Aromat direkt an das Nukleotid gekoppelt (**L12_{AG}**), zum anderen wurde abermals eine Thiolgruppe (**L13_{AG}**) dazwischen eingefügt. Auch hier wurden der beste aliphatische Alkyllinker als Vergleich mit aufgeführt (Abb. 21), jedoch mit der freien Aminogruppe (**L6_{AG}**), da die aromatischen Derivate ebenfalls als freie Amine synthetisiert wurden (Tab. 2 **L12 – L13**). Dabei lässt sich im gesamten Quadrupel (Abb. 21) erkennen, dass die Verbindung mit einer Thiolgruppe wesentlich affiner war als ohne Thiolgruppe. Zudem waren die Derivate am heterotetrameren CNG-Kanal häufig Partialagonisten (Ausnahme: **L13_G**), wohingegen am homotetrameren Ionenkanal keine Beeinträchtigungen zu beobachten waren.

Bemerkenswert war, wie empfindlich die Bindedomänen der Kanäle auf verschiedene Liganden ansprachen. Als bestes Beispiel diente die Phenyl-Substitution am cGMP. **6_G** und **L12_G** ähneln sich strukturell sehr stark und unterscheiden sich nur im Vorhandensein eines Schwefel- und Halogenatoms im Vergleich zur direkten Verbindung vom Aromaten an das Nukleotid, gefolgt von einer Linkerkette. Der Unterscheid dieser Verbindungen in der scheinbaren Affinität betrug jedoch mehr als eine Zehnerpotenz (0,07/0,06 bzw. 2,3/7,6).

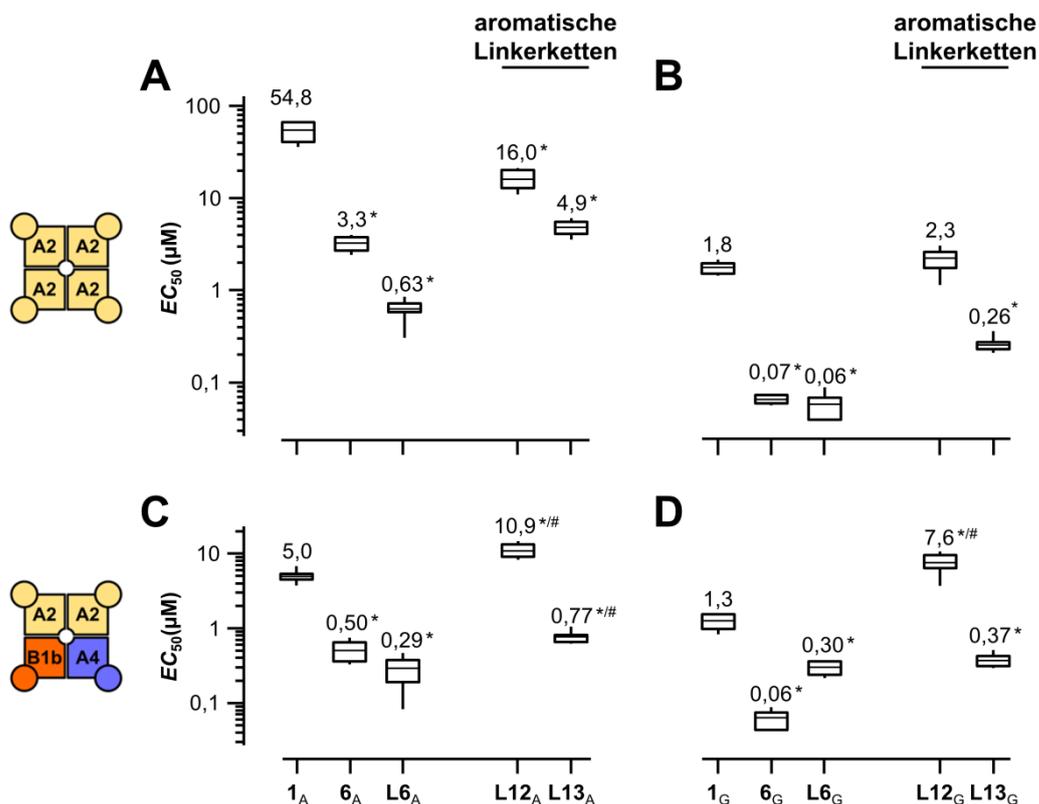


Abbildung 21. Effekte der aliphatischen hydrophoben cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen. A) CNGA2-Kanäle mit cAMP-Derivaten. B) CNGA2-Kanäle mit cGMP-Derivaten. C) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cAMP-Derivaten. D) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cGMP-Derivate. Markierung (*) bedeutet signifikante Unterschiede der EC_{50} -Werte zum nativen cNMP 1_{A/G} ($p < 0.01$). Alle aromatischen Verbindungen zeigen über beide olfaktorischen CNG Kanäle einen höheren EC_{50} -Wert als L6_{A/G}. Zudem ist der Schwefel (L13_{A/G}) essenziell wichtig im Vergleich zu L12_{A/G} für eine verbesserte scheinbare Affinität. Modifiziert nach Otte et al., 2018.

5.3.4 Kinetische Charakterisierung von 1_G und L5_G

Wie bereits in Abbildung 13 (KAPITEL 4.3.4) beschrieben, wurde die Bestimmung von Aktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten (τ_a bzw. τ_d) mit Hilfe eines Theta-Glases durchgeführt. Der schnelle Konzentrationssprung erfolgte von 0 μM zur gewünschten Konzentration und wieder zurück. Für diese anspruchsvollen Messungen wurde einer der besten Linker und potenzielle Verbindung für eine Kopplung mit einem Farbstoff ausgewählt. Das 8-(Ac)AHT-cGMP (L5_G) wurde im Vergleich zum cGMP an den CNGA2- und CNGA2:A4:B1b-Kanälen vermessen. Abbildung 22A und D zeigen die Überlagerung der Kinetiken der beiden Liganden (1_G - L5_G). Wie zu erwarten war, unterschieden sich die Aktivierungszeitkonstanten der beiden Liganden nach Sprung auf 10 μM nicht wesentlich voneinander. Nach wenigen Sekunden sprang die Konzentration auf 0 μM zurück und es wurden deutliche Differenzen in der Deaktivierungszeitkonstante kenntlich.

Die Abbildungen 22B + C bzw. E + F repräsentieren die Abhängigkeit von $\tau_{a/d}$ zur entsprechenden Konzentration am Homo- bzw. Heterotetramer. Die Aktivierungszeitkonstanten (τ_a – Abb. 22B + E) unterschieden sich in höheren Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ nur in einem sehr engen Bereich zwischen 0,05 - 0,5 s und erwiesen keine eindeutigen Unterschiede in der Aktivierung zwischen 1_G und $L5_G$. Konzentrationen unter $1 \mu\text{M}$ zeigten kleine Abweichungen und verlangsamten die Werte der Aktivierungszeitkonstante auf bis zu 2,1 s. Ein größerer Unterschied wurde deutlich bei der Deaktivierungszeitkonstante des $L5_G$ im Vergleich zum 1_G am CNGA2-Kanal (Abb. 22C). Der Wert τ_d verlangsamte sich im Mittel um circa das Fünfzehnfache des nativen cGMPs über alle Konzentrationen.

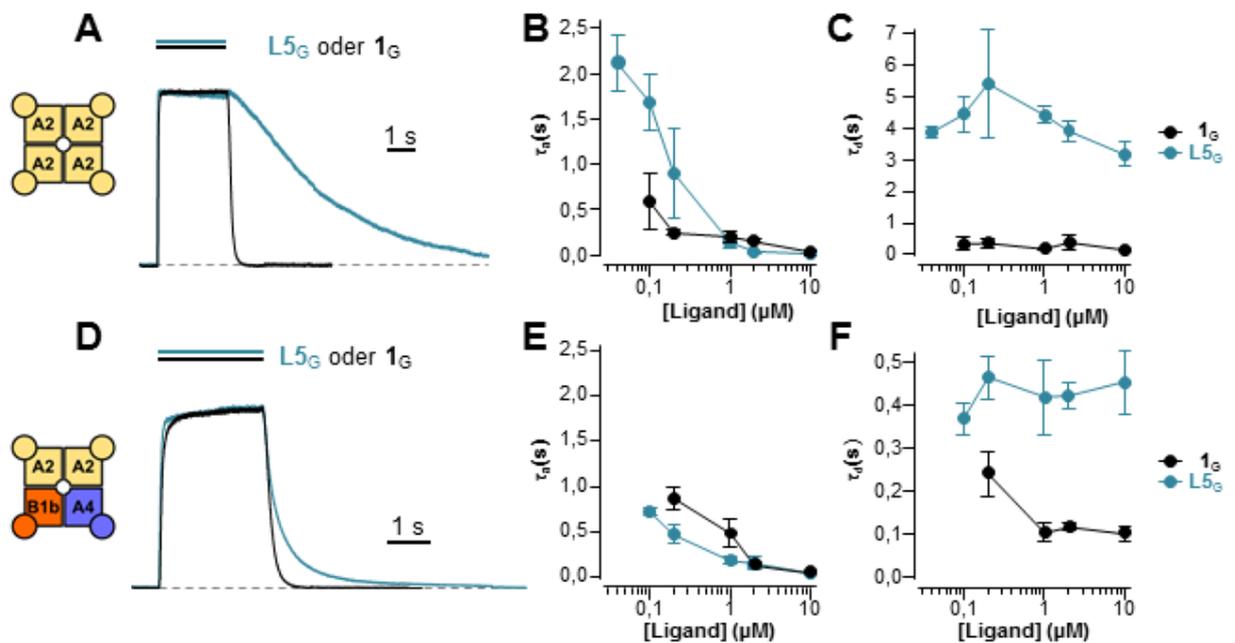


Abbildung 22. Ionenkanalaktivierung und -deaktivierung der olfaktorischen CNG-Kanäle. Verschiedene Liganden mit unterschiedlichen Konzentrationen können auf Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken durch sehr schnelle Sprünge zweier Lösungen (Ligand- + Kontrolllösung) in einer piezo-gesteuerten Thetaglas-Pipette untersucht werden. Überlagerung der normierten Ströme eines repräsentativen hydrophoben aliphatischen cGMP-Derivat ($L5_G$) und nativem cGMP (1_G) am CNGA2 Kanal (A) bzw. am Heterotetramer (D). B) + E) zeigen die Aktivierungszeitkonstante, C) + F) zeigen die Deaktivierungszeitkonstante der beiden olfaktorischen CNG-Kanäle durch Konzentrations sprünge. Modifiziert nach Otte et al., 2018.

Ebenfalls beim heterotetrameren CNG-Kanal verlangsamte sich die Deaktivierungszeitkonstante bei allen Konzentrationen im Vergleich zu **1_G**. Zwar sind an diesem Kanal die Effekte nicht so stark ausgeprägt, jedoch unterscheiden sich die EC_{50} -Werte (**1_G** 1,3 μM – **L5_G** 0,23 μM) ebenfalls nicht so stark wie beim CNGA2-Kanal (1,8 μM – 0,08 μM). Daraus resultierte, dass **L5_G** in den CNBDs der regulatorischen Untereinheiten A4 sowie B1b des heterotetrameren Kanals eine geringere Verweildauer besaß als in den CNBDs der Untereinheit CNGA2.

Als Konsequenz dieser Versuche ergab sich, dass die Aktivierungszeitkonstanten mit einer Linkerkette (wie mit **L5_G** nachgewiesen), sich annähernd gleich zum cGMP (**1_G**) verhielten. Die Deaktivierungszeitkonstanten waren hingegen signifikant erhöht. Dies hatte Auswirkungen auf die Dissoziationskinetik, was wiederum eine längere Verweildauer in der CNBD zur Folge hat und eine Ursache für die erhöhte scheinbare Affinität war (siehe KAPITEL 5.3.1).

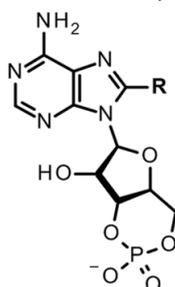
5.4 Substitution der cNMP mit Linker und Farbstoff

Wie sich bereits im KAPITEL 5.3 SUBSTITUTION DER CNMP MIT LINKERKETTE herausstellte, wurden positive Effekte mit längeren aliphatischen Kohlenwasserstoffketten beobachtet. Ebenfalls zeigten Messungen anderer Wissenschaftler in der Arbeitsgruppe Benndorf, dass mit einem längeren Linker für das fcAMP, also ein Wechsel von einer Ethyl- zu einer Hexylkette, die Affinität des Liganden gesteigert werden konnte (Nache et al. 2016). In dieser Arbeit wurde jedoch keine vollständige Konzentrations-Aktivierungsbeziehung erhoben.

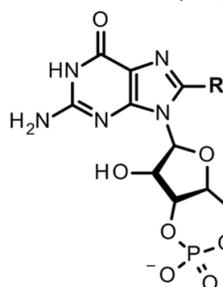
Diesbezüglich wurde systematisch der Einfluss verschiedener Linkerlängen der fluoreszierenden Nukleotide auf das Aktivierungsverhalten untersucht. Zum einen wurden die bekannten fluoreszierenden Nukleotide (fcAMP und fcGMP) mit Hexylkette verglichen. Zum anderen sollte die Abhängigkeit der Affinität in Bezug auf die Wahl des Farbstoffes beobachtet werden. Woraufhin die Farbstoffe DY547P1 und Cy3Me mit einer ähnlichen Cyanstruktur (siehe Abb. 23) an Linker mit ähnlicher Länge gekoppelt wurden. Des Weiteren sollten Effekte von anderen Farbstoffstrukturen (Rhodamine oder Rylene) beobachtet werden. Eine Übersicht zu den fluoreszierenden Liganden bietet Tabelle 3 und zu den chemischen Strukturen der Farbstoffe die Abbildung 23.

Tabelle 3. Schematische Darstellung der fluoreszierenden Liganden. Namen und Strukturen der verwendeten zyklischen Nukleotid-Derivate, Linkerketten und Farbstoffe (chemische Strukturen siehe Abb. 23). F_X-Index bedeutet cAMP- (A) oder cGMP- (G) Derivate. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

cAMP-Derivate (F_XA)

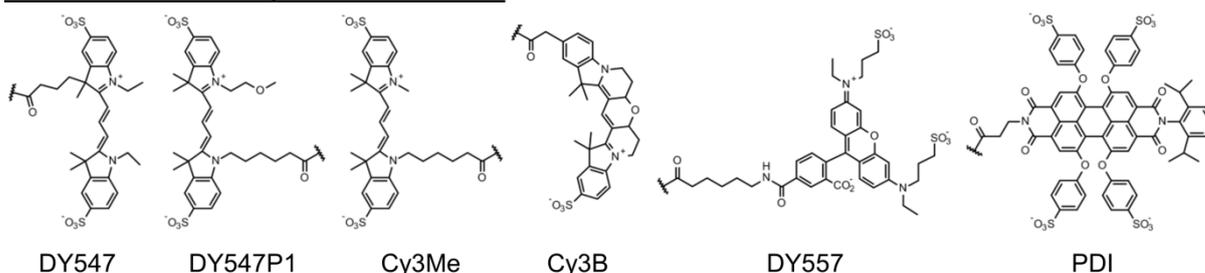


cGMP-Derivate (F_XG)



Nr. des Derivates	Linker	Linkerstruktur an Position 8 (R)	Anzahl Atome	Farbstoff
1 _{A/G}	–	–H	–	–
F2 _{A/G}	8-AET-		8	–DY547
F3 _{A/G}	8-AHT-		12	
F4 _{A/G}	8-AET-		10	–DY547P1
F5 _{A/G}	8-AHT-		14	
F6 _{A/G}	8-AET-		10	–Cy3Me
F7 _{A/G}	8-AHT-		14	
F8 _{A/G}	8-AHT-		10	–Cy3B
F9 _{A/G}	8-ADT-		14	
F10 _{A/G}	8-AET-		12	–DY557
F11 _{A/G}	8-AHT-		16	
F12 _G	8-AHT-		11	–PDI

Konventionelle Cyanin-Struktur



DY547

DY547P1

Cy3Me

Cy3B

DY557

PDI

Abbildung 23. Schematische Darstellung der Farbstoffstrukturen. Chemische Struktur der verwendeten Farbstoffe der fluoreszierenden Liganden. Die Farbstoffe wurden durch die Linkerkette an die Position 8 der cNMP gekoppelt. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

5.4.1 Elektrophysiologische Charakterisierung des Einflusses der Linkerlänge auf die Liganden-Rezeptor-Interaktion

Um die zum größten Teil neu synthetisierten Derivate zu testen, wurde wie bereits in den vorherigen Kapiteln die *inside-out Patch-Clamp* Konfiguration angewendet. Dabei sollte zu Beginn ein möglicher Linker-Effekt getestet werden (Abb. 24). Zudem sollte eine mögliche Alternative für den Farbstoff DY547, welcher nicht mehr kommerziell erhältlich ist, entwickelt und charakterisiert werden. Aus diesem Grund wurden einige strukturell verwandte Farbstoffe der Cyanin-Gruppe getestet. Dazu zählen das DY547P1 (Dyomics, Jena, Dtl.) und das Cy3Me (Lumiprobe, Hannover, Dtl.), welche an die Ethyl- bzw. an die Hexyl-Kette über die Aminogruppe gekoppelt wurden. Zum Vergleich sind die Nukleotide, die nur mit dem Linker substituiert waren, **L5_{AG}** und **L7_{AG}**, in Abbildung 24 mitangeführt.

Am Beispiel des homotetrameren CNGA2 mit den cAMP-Derivaten wird erkennbar, dass die Farbstoffe die scheinbare Affinität beeinflussen. Dabei zeigte **F2_A** einen sehr hohen EC_{50} -Wert, der auf 271 μM abgeschätzt wurde. Beim Fitten wurde ein voller Agonist angenommen und somit auf den Wert 1 extrapoliert. Anhand wirtschaftlicher Gründe, wie die Kosten für Synthese größerer Mengen und hoher Substanzverbrauch, konnte diese Annahme nicht geprüft werden. Weitere Liganden mit einer Ethylkette aber längeren Gesamtlinker präsentierten geringere EC_{50} -Werte (**F4_A** - 60,8 μM bzw. **F6_A** 10,5 μM). Die fluoreszierenden Liganden (**F3_A**, **F5_A**, **F7_A**) mit einer Hexylkette wiesen alle eine ähnliche Affinität auf (5,2 μM – 7,4 μM).

Bei den fluoreszierenden cGMP-Derivaten führte das Einführen der Linker an Position 8 des zyklischen Nukleotids zu einer Verringerung des EC_{50} -Wertes. Dieses Phänomen wurde bereits bei den reinen aliphatischen Linkerketten (**L2_G** – **L11_G**) beobachtet. Dort lagen die EC_{50} -Werte der Ethyl-Linker (**F2_G**, **F4_G**, **F6_G**) bei ca. 1 μM auf einem ähnlichen Niveau sowie die Werte der Hexyl-Linker zwischen 0,09 – 0,21 μM (**F3_G**, **F5_G**, **F7_G**) annähernd eine Zehnerpotenz niedriger. Im Vergleich zum unmarkierten cGMP (**1_G**) wird mit dem 8-[DY547]-AHT-cGMP (**F3_G**) eine Verbesserung der scheinbaren Affinität um das Zwanzigfache erreicht.

Ein vergleichbares Muster der EC_{50} -Werte wurde auch mit den Verbindungen am heterotetrameren CNGA2:A4:B1b (Abb. 24C, D) erreicht. Zusammenfassend ließ sich eine signifikante Verbesserung der scheinbaren Affinität an den Ionenkanäle durch die Hexyl-Kette erreichen und der bisher verwendete DY547 zeigte tendenziell die höchste scheinbare Aktivität im Quadrupel-Vergleich (Abb. 24A - D). Jedoch konnte der Farbstoff nur annäherungsweise adäquat ersetzt werden.

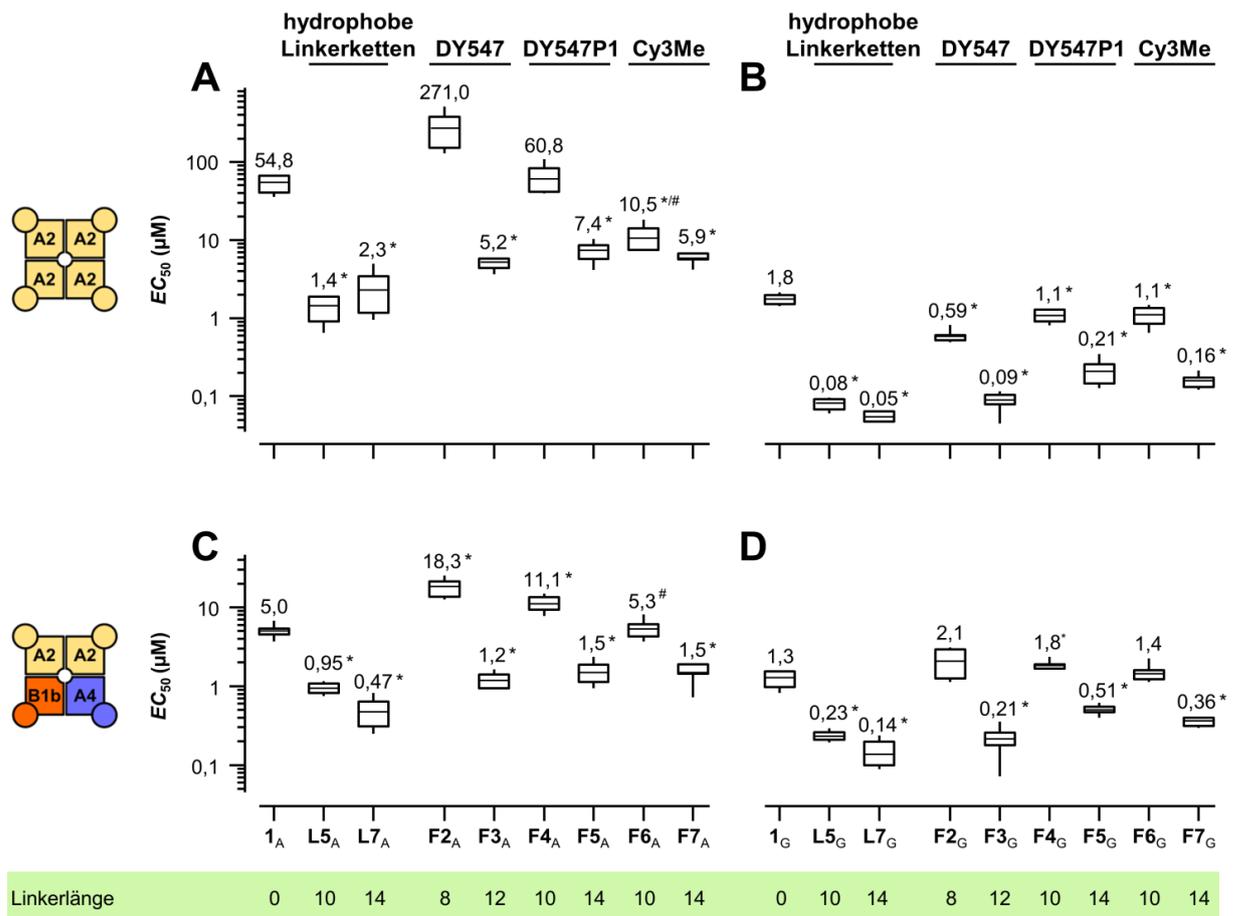


Abbildung 24. Effekte der konventionellen cyanin-ähnlichen, fluoreszierenden cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen. A) CNGA2-Kanäle mit cAMP-Derivaten. B) CNGA2-Kanäle mit cGMP-Derivaten. C) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cAMP-Derivaten. D) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cGMP-Derivaten. Die Linkerlänge gibt die Anzahl der Atome, vom Schwefelatom bis zum letzten Atom vor dem Fluorophor, an (Anhang – Abb. 36). Markierung (*) bedeutet signifikante Unterschiede der EC_{50} -Werte zum nativen cNMP $1_{A/G}$ ($p < 0.01$). Alle fluoreszierenden Verbindungen verlieren an Potenz im Vergleich zum reinen Decyllinker ($L7_{A/G}$). Jedoch nähern sich Liganden mit längerer Gesamtlinkerlänge dem Hexyllinker ($L5_{A/G}$) stark an. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

5.4.2 Elektrophysiologische Charakterisierung weiterer Farbstoffe an Position 8

Zusammenfassend aus den vorherigen Resultaten (KAPITEL 5.4.1) war der Austausch mit einem anderen Cyanin-Farbstoff möglich, jedoch stellte der Farbstoff einen möglichen Einfluss auf die Affinität dar. Um die Suche nach einer besseren Alternative weiter voranzutreiben, wurden andere Farbstoffgruppen, wie rigidisierte Cyanine (Cy3B, GE Healthcare (Freiburg, Dtl.), Rhodamine (DY557, Dyomics, Jena, Dtl.) oder Perrylene (Institut für Organische und Makromolekulare Chemie, FSU Jena, Dtl.), verwendet (Tab. 3 + Abb. 23). Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Messungen wurden die fluoreszierenden Verbindungen auf die Eigenschaft der Helligkeit überprüft. Dies stellte ein weiteres Selektionskriterium dar.

Aufgrund der unterschiedlichen Linkerlängen, die die Farbstoffe bereits enthielten (Abb. 23), wurden die Kettentypen so variiert, dass die Gesamtlänge zwischen 10 bis 16 Atomen lag. Dabei wurde vom Schwefelatom bis zum letzten Atom vor dem Fluorophor gezählt (siehe Anhang – Abb. 36). Als Vergleich (Abb. 25) dienten wieder die Linkerverbindungen **L5_A** und **L7_A** sowie der bisher affinste fluoreszierende Ligand (**F3_{A/G}**).

Ebenfalls sollten an dieser Stelle am homotetrameren CNGA2-Kanal die scheinbaren Affinitäten der cAMP-Derivate als erstes erläutert werden (Abb. 25A), da ein potenter fluoreszierender Ligand für cPCF-Messungen fehlt. Es ist wünschenswert einen Liganden mit einer EC_{50} -Konzentration unter 5 μM zu finden. Erfolgsversprechend waren dabei die Derivate mit Cy3B mit EC_{50} -Werten von **F8_A** - 2,8 μM bzw. **F9_A** - 1,8 μM . Signifikante Unterschiede zu **1_A** gab es bei den Derivaten mit DY557 (**F10_A** - 51,9 μM bzw. **F11_A** - 46,2 μM) nicht.

Bei den weiteren fluoreszierenden cGMP-Verbindungen stellten alle fünf Substitutionen (**F8_G** - **F12_G**) gleichermaßen einen Anstieg der scheinbaren Affinität zum nativen cGMP dar und lagen mit einem EC_{50} -Wert von 0,26 – 0,58 μM etwas über den Werten der Cyanin-Derivate mit Hexyllinkern (**F3_G**, **F5_G**, **F7_G**). Antithetisch zu den bisherigen Ergebnissen waren die Effekte der längeren Linker (**F9_G**, **F11_G**) im Vergleich zu den entsprechenden kurzen Kettenderivaten (**F8_G**, **F10_G**), sodass eine längere Linkerkette keinen Vorteil (**F9_G** - **F10_G**) bzw. einen Nachteil (**F10_G** - **F11_G**) auf die Affinität brachte. Ein ähnliches Bild mit vergleichbaren scheinbaren Affinitäten zeigte sich beim heterotetrameren CNGA2:A4:B1b (Abb. 25C + D). Die Verbindungen mit Cy3B (**F8_A** + **F9_A**) zeigten signifikante Unterschiede; DY557 (**F10_A** + **F11_A**) aber keine deutlichen Veränderungen zum endogenen Liganden. Ebenfalls waren hier die Ergebnisse der Linkerlängen der cAMP-Derivate kontrovers zu den cGMP-Derivaten.

Das PDI wurde aufgrund der schlechten Ergebnisse als cGMP-Derivat (**F12_G** – 0,36 μM bzw. 0,24 μM), dem geringen Hill-Koeffizienten (< 2) und der schlechten Auswaschbarkeit, nicht in der cAMP-Reihe synthetisiert.

Zusammenfassend sind die Affinitäten der 21 fluoreszierenden Liganden heterogen verteilt, sodass Nukleotid, Linkerkette und Farbstoff jeweils einen wesentlichen Einfluss auf die scheinbare Affinität der Liganden ausübten und die Kombinationen immer überprüft werden mussten. Zu alledem waren die meisten Verbindungen Vollagonisten an den olfaktorischen CNG-Kanälen (Ausnahme: **F6_A**).

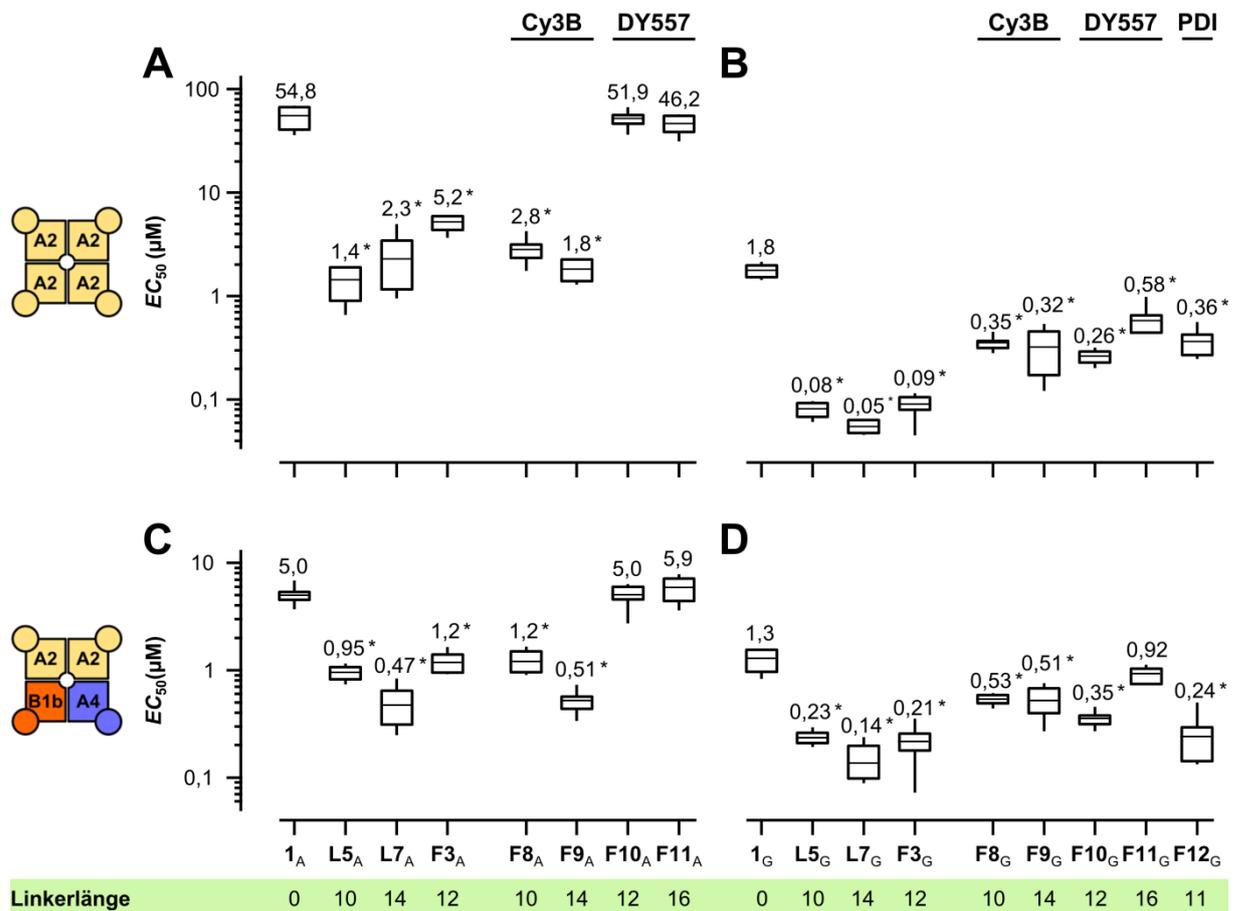


Abbildung 25. Effekte weiterer fluoreszierender cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen. A) CNGA2-Kanäle mit cAMP-Derivaten. B) CNGA2-Kanäle mit cGMP-Derivaten. C) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cAMP-Derivaten. D) CNGA2:A4:B1b-Kanäle mit cGMP-Derivate. Markierung (*) bedeutet signifikante Unterschiede der EC_{50} -Werte zum nativen cNMP 1_{AVG} ($p < 0.01$). Auch hier verlieren fast alle fluoreszierenden Verbindungen an Potenz im Vergleich zum reinen Decyllinker ($L7_{AVG}$). Jedoch bildet $F9_A$ keine signifikanten Unterschiede zu $L7_A$ und stellt somit einen neuen interessanten Liganden dar. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

5.4.3 Optische Charakterisierung der fluoreszierenden Liganden (cPCF)

5.4.3.1 Simultane Messung von Bindung und Aktivierung

Eine Voraussetzung für direkte Bindungsmessungen, wie zum Beispiel mit PCF, sind unter anderem fluoreszierende Liganden. Bezogen auf die fluoreszierenden cNMPs wurde die Bindung an die Bindestelle des Ionenkanals parallel zu dessen Aktivierung detektiert. Hierbei wurde sowohl die Intensität der Fluoreszenz als auch die Stromantwort am CNGA2-Kanal bei unterschiedlichen Konzentrationen und einer Spannung von +10 mV bestimmt und in Beziehung gesetzt (Abb. 26). Bei diesem Versuchsaufbau konnten bisher nur die fluoreszierenden cGMP-Derivate verwendet werden, da die Detektion der sättigenden Konzentration unter 25 μ M liegen muss, welches bei den fluoreszierenden cAMP-Derivaten bisher nicht möglich ist.

Die vier getesteten Liganden (**F2_G**, **F4_G**, **F8_G**, **F10_G**) zeigten ähnliche Konzentrationsabhängigkeiten der Bindung und Aktivierung. Dabei wiesen der Bindungs- und Aktivierungsgraph unterschiedliche Anstiege auf, beschrieben mittels Hillkoeffizient (H). Diese Unterschiede führten zur charakteristischen Überschneidung des Bindungsgraphens mit dem Aktivierungsgraphen im unteren Konzentrationsbereich und die Aktivierung stieg erst bei höheren Konzentrationen an, jedoch mit einem steileren Anstieg. Diese paradoxe Beobachtung konnte mit komplexen Modellen bereits im Jahre 2007 für fcGMP (**F2_G**) mithilfe einer Beschreibung des C4L-Modells erklärt werden (siehe KAPITEL 2.3.2). Dabei sei noch einmal darauf hingewiesen, dass ebenfalls die drei anderen fluoreszierenden Liganden diese Eigenschaften aufwiesen und diese unabhängig von der Linkerlänge oder des Farbstoffes waren. Somit ist ein Einfluss der fluoreszierenden Liganden auf die Kooperativität des Kanals sehr unwahrscheinlich. Besonders im niedrigen Konzentrationsbereich ($F/F_{\max} < 0,2$) war die Bindung zum Teil gleich oder sogar leicht erhöht. Erst danach stieg die Aktivierung steiler und die Bindung folgte mit einem flacheren Verlauf. Zudem zeigten die vier Derivate ähnliche Effekte wie in den einfachen elektrophysiologischen Messungen (vgl. KAPITEL 5.3.1 + 5.3.2), sodass die gleiche Reihenfolge von Bindung (BC_{50}) und Aktivierung (EC_{50}) beobachtet wurde (**F4_G** > **F2_G** > **F8_G** ≥ **F10_G**). Der beste Binder ($0,63 \mu\text{M}$) und zugleich der beste Aktivator ($0,52 \mu\text{M}$) der vier getesteten fluoreszierenden Liganden am CNG-Kanal ist das **F10_G**.

5.4.3.2 Vergleiche der Helligkeit der Liganden am Patch

Bei den vorangegangenen Experimenten (KAPITEL 5.4.3.1) zur Erstellung der Bindungskurven wurden Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der verschiedenen Derivate festgestellt. Um dies unter konfokalen Bedingungen am LSM zu verifizieren, wurden die Liganden **F2_G**, **F4_G**, **F8_G** und **F10_G** an demselben Patch unter gleichen Messbedingungen in cPCF-Experimenten getestet (Abb. 27A). Dabei wurde erkennbar, dass bei gleicher Konzentration der Liganden ($10 \mu\text{M}$) unterschiedliche Intensitäten in der Badlösung (Bereich vor der Pipette) detektiert wurden. Der Referenzfarbstoff DY647 wurde bei allen Lösungen mit einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ hinzugefügt und zeigte innerhalb des Rauschens identische Fluoreszenzintensitäten (hellere Graphen – Abb. 27B), was als interner Standard einen systematischen Fehler am Mikroskop bei der Lösungszubereitung ausschließt.

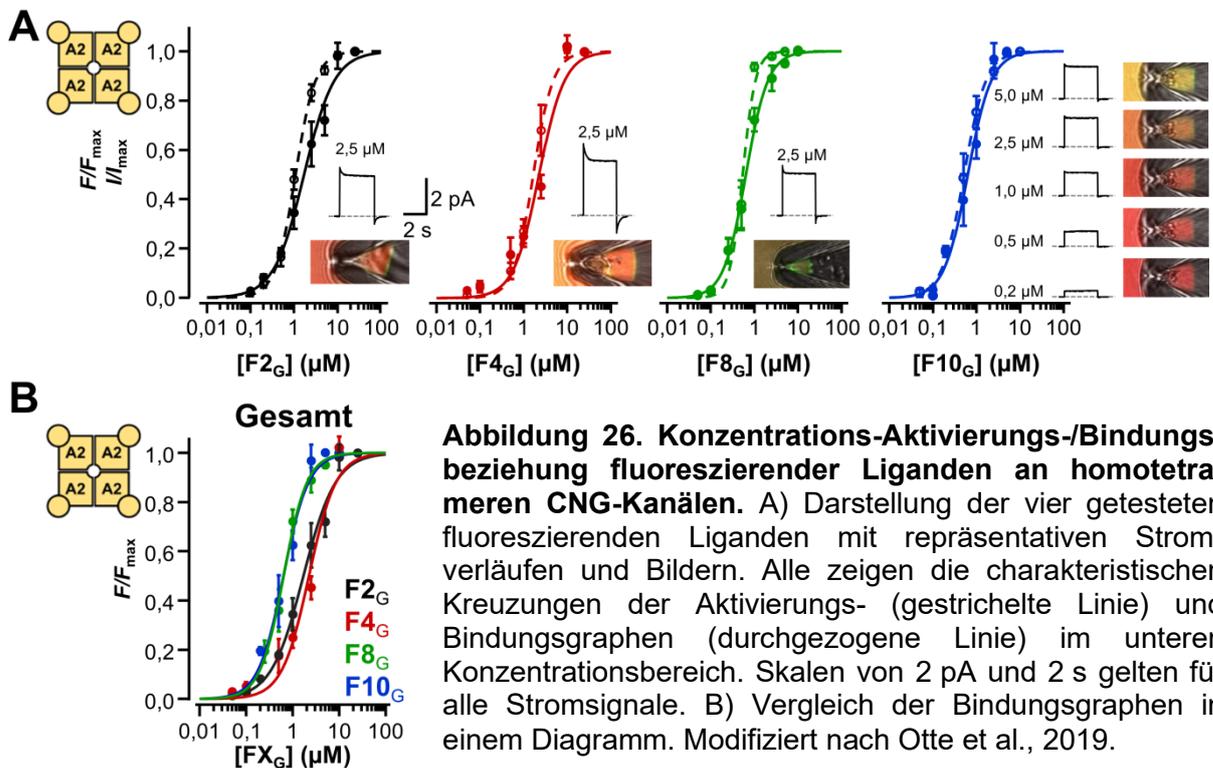


Abbildung 26. Konzentrations-Aktivierungs-/Bindungsbeziehung fluoreszierender Liganden an homotetrameren CNG-Kanälen. A) Darstellung der vier getesteten fluoreszierenden Liganden mit repräsentativen Stromverläufen und Bildern. Alle zeigen die charakteristischen Kreuzungen der Aktivierungs- (gestrichelte Linie) und Bindungsgraphen (durchgezogene Linie) im unteren Konzentrationsbereich. Skalen von 2 pA und 2 s gelten für alle Stromsignale. B) Vergleich der Bindungsgraphen in einem Diagramm. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

Tabelle 4. Nennungen der EC_{50} -, BC_{50} -, Hill-Werte für die in Abb. 26 dargestellten Liganden.

	Aktivierung		Bindung	
	EC_{50} [μ M]	Hill	BC_{50} [μ M]	Hill
F2_G	1,08	1,88	1,70	1,25
F4_G	1,65	1,92	2,24	1,49
F8_G	0,54	2,94	0,64	1,71
F10_G	0,52	1,71	0,63	1,60

Daraufhin wurde die Helligkeit der Liganden am Patch beobachtet. Ein verwendeter fluoreszierender Ligand sollte nicht von der Umgebung beeinflusst werden und somit unabhängig von der Lösung oder der Bindestelle des Zielproteins sein. Alternativ kann der Ligand in gebundener Form heller sein, wenn der Mechanismus des Quenchens bekannt ist und die Affinität dadurch nicht beeinflusst wird. Um die Helligkeit der vier Liganden im gebundenen Zustand zu vergleichen, wurden die Verbindungen an demselben *Patch* bei sättigender Konzentrationen (10 μ M) vermessen. Der Vorteil gegenüber den Konzentrations-Bindungsbeziehungen, bei denen die Liganden an unterschiedlichen *Patches* detektiert und normiert wurden, ist bei Messungen an einem *Patch* die Vergleichbarkeit der Helligkeit bei gleichen Messbedingungen, wie *Patch*größe, Fokusbildung und Expressionsdichte. Deswegen wurde das Fluoreszenzsignal bzw. die Bindung für sättigende Konzentrationen (10 μ M) in Bezug auf **F2_G** und in Abbildung 27C dargestellt. Es wurden signifikante Unterschiede zu **F8_G** und **F10_G** beobachtet. Der Farbstoff Cy3B wies eine annähernd zweimal stärkere Helligkeit am Ionenkanal auf als die beiden Cyanin-Farbstoffe.

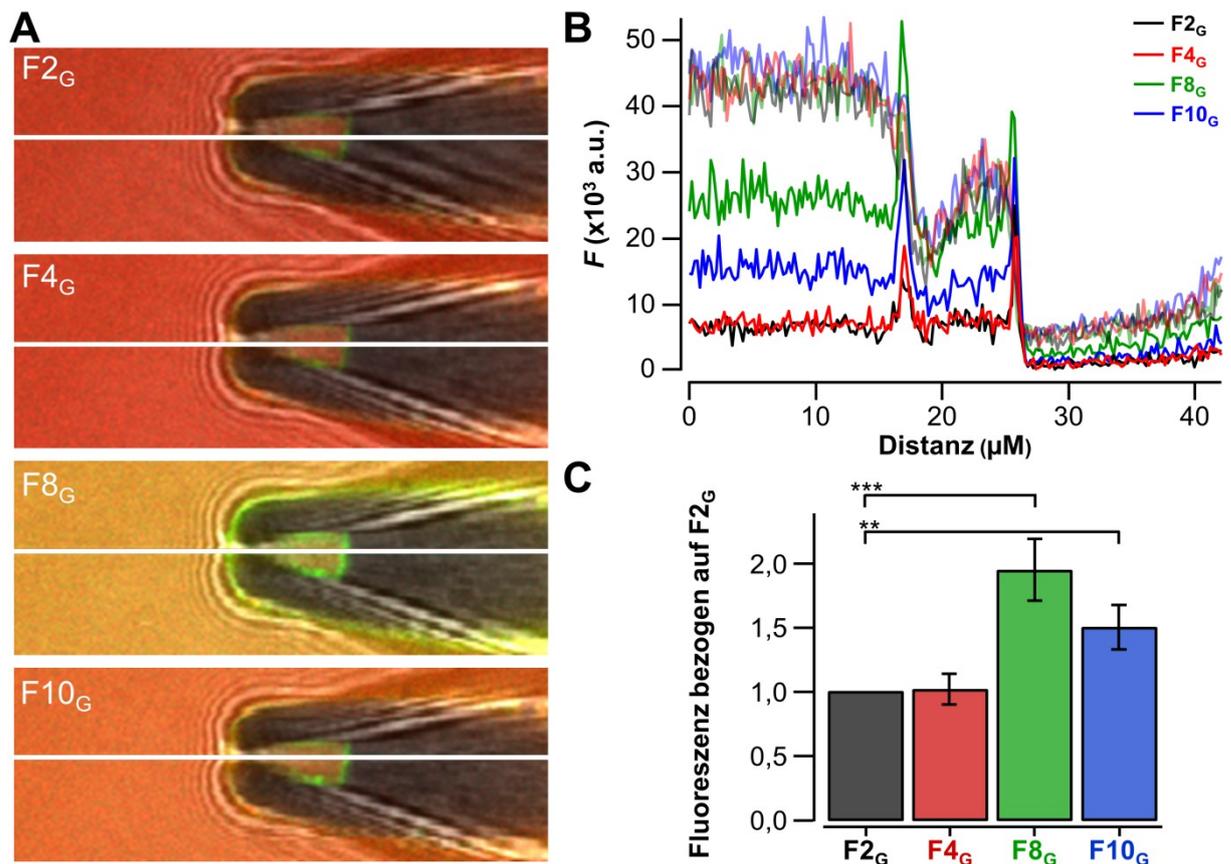


Abbildung 27. Helligkeit der fluoreszierenden Liganden. A) Repräsentative Bilder einer Messung bei 10 µM. B) Profilverlauf entlang der weißen Linien von A. Hellere Linien zeigen die Fluoreszenzsignale des Referenzfarbstoffes (DY647 – 5 µM). Dunklere Linien zeigen die Liganden mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten. C) Balkendiagramm der relativen Helligkeiten in gebundenem Zustand von **F2_G**, **F4_G**, **F8_G** und **F10_G** bei 10 µM am CNGA2-Kanal. Alle vier Liganden wurden an den gleichen *Patches* getestet. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität ins Verhältnis zu **F2_G** gesetzt. Fehler als SEM. ** p < 0,05; *** p < 0,01. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

5.4.3.3 Vergleiche der Fluoreszenzspektren der Liganden am Patch

Bei dem Größenverhältnis von Ligand zu Fluorophor wird deutlich, dass der Farbstoff oft größer und lipohiler ist. Dies trifft ebenfalls auf die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe im Vergleich zu den kleineren zyklischen Nukleotiden zu. Zudem besitzen die Fluorophore funktionelle Gruppen, die mögliche Interaktionen mit dem Zielprotein auslösen können. Damit einhergehend würde auch das fluorophore System beeinflusst werden und zu unvorhersehbaren spektraloptischen Eigenschaften führen. Damit verbunden müssten verschiedene optische Filter sowie Detektoren verwendet werden. Bei starken Veränderungen der Eigenschaften durch viele Interaktionen mit Erhöhung der scheinbaren Affinität ohne ordnungsgemäße Bindung an der Bindestelle, müssten diese Farbstoffe gegebenenfalls ausgeschlossen werden.

Die Messungen der Fluoreszenzspektren wurden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt und dabei das emittierte Licht spektral aufgelöst. (siehe

KAPITEL 4.5 und Abb. 15) Hierbei wurden Spektren des freien Farbstoffes in freier Lösung (Badlösung) vor der Pipette mit dem Signal am *Patch* verglichen. Letzteres ist ein Konvolut aus gebundenem und geringem Anteil an freien Liganden. Ursächlich dafür ist das etwas größere konfokale Volumen im Verhältnis zur Membrandicke. Die möglichen Veränderungen sind eine Abschätzung der realen Veränderungen, wobei der Fehler bei der hohen verwendeten Ionenkanalexpression eher gering ausfällt. Eine mögliche Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Protein kann sich in einer Verschiebung der Spektren am *Patch* und freier Lösung (Badlösung) zeigen, wenn die Energie des Elektronensystems ausreichend beeinflusst wird. Jedoch zeigten sich bei allen vier fluoreszierenden Liganden kaum Unterschiede. Besonders bemerkenswert waren die deckungsgleichen Spektren des fcGMPs (**F2_G**) in Lösung und am *Patch*. Unter der Annahme, dass das Anregungs- und Absorptionsspektrum (**F2_G**) identisch sind, wurde eine Stokes-Verschiebung von 11 nm beobachtet. Die größten Verschiebungen im Emissionsmaximum und -spektrum sind bei Cy3B erkennbar, jedoch ist der Unterschied zu gering, um eine Unterscheidung von Stokes-Verschiebung oder Wechselwirkung zu treffen. Für andere Farbstoffe wurden bereits Proteinkonjugate mit leichten Stokes-Verschiebungen beschrieben, aber stellten in dieser Arbeit kein Ausschlusskriterium dar. Die beobachtete Stokes-Verschiebung war 6 bzw. 13 nm. Die größte Stokes-Verschiebung konnte jedoch bei dem Farbstoff DY557 (**F10_G**) mit 21 nm von 560 auf 581 nm ermittelt werden.

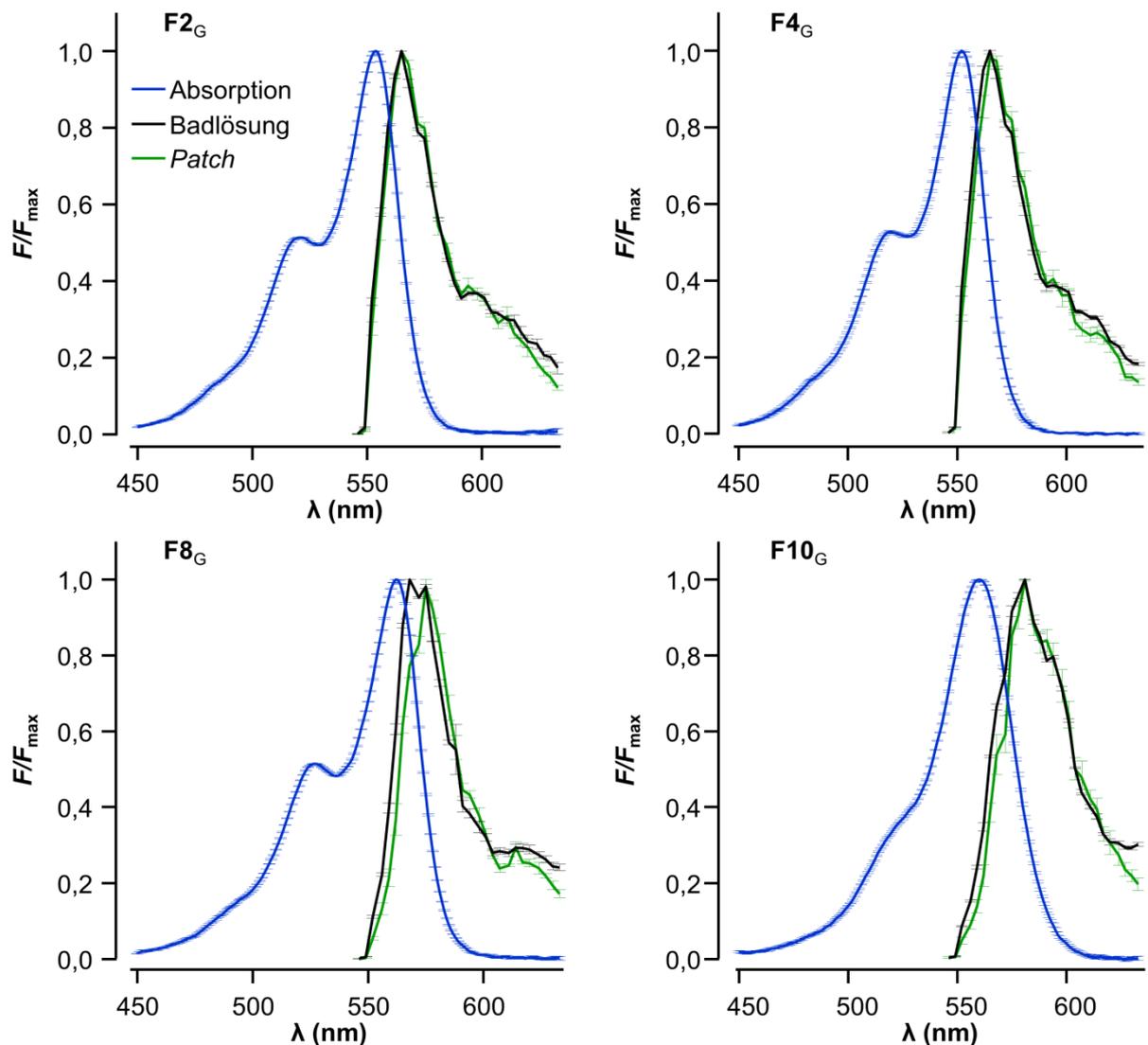


Abbildung 28. Absorptions- und Fluoreszenzspektren. Messungen der fluoreszierenden Liganden $F2_G$, $F4_G$, $F8_G$ und $F10_G$ in Pufferlösung und am homotetrameren CNGA2-Kanal. Dazu wurde auf die höchste Intensität des jeweiligen Liganden normiert. Fehler als SEM.

Tabelle 5. Nennungen der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der fluoreszierenden Liganden.

	Absorption (λ_{\max} nm)	Badlösung (λ_{\max} nm)	Patch (λ_{\max} nm)
$F2_G$	554	565	565
$F4_G$	552	565	565
$F8_G$	562	568	575
$F10_G$	560	581	581

5.5 Hill-Koeffizienten

Die Hill-Koeffizienten sind ein grobes, aber schnell ermitteltes Maß der Kooperativität der Untereinheiten. Um zu testen, ob es Hinweise auf eine unterschiedliche Kooperativität der Ionenkanäle bei Aktivierung durch die verschiedenen Liganden gibt, wurden die gefitteten Hill-Koeffizienten verglichen. Dafür wurden zusammenfassend eine Übersicht der Ergebnisse mittels Box-Plots (Abb. 29), bzw. die Tabellen des Anhangs (ANHANG TAB. 7 + 8) erstellt. Die einzelnen Hill-Koeffizienten der Derivate, die bei cAMP und cGMP und an beiden Ionenkanälen vermessen wurden, wurden

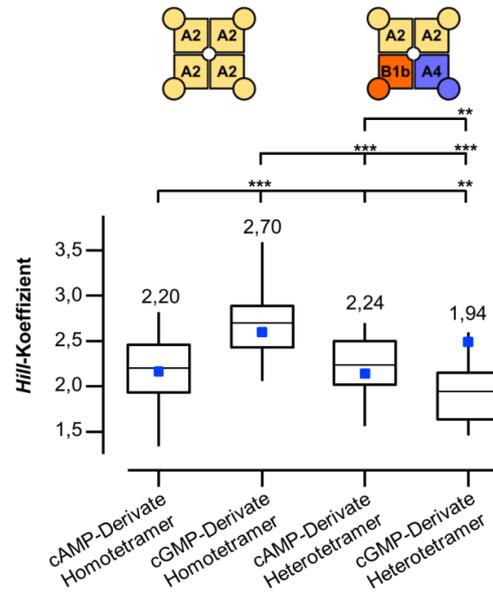
zusammengetragen. Nicht berücksichtigt wurden die Hill-Koeffizienten für die Liganden **4_A**, **7_A** und **F12_G**, weil diese drei Derivate nicht als **4_G** und **7_G** bzw. **F12_A** synthetisiert wurden. Die Hill-Koeffizienten der cAMP- und cGMP-Derivaten wichen geringfügig von denen der endogenen Liganden ab, mit der Ausnahme der cGMP-Derivate am Heterotetramer (Derivate - 1,94 bzw. cGMP - 2,58). Dies verdeutlichen die blauen Vierecke als Maß für die Hill-Koeffizienten der nativen Liganden (Abb. 29A). Die dünnen Linien innerhalb und der Zahlenwert oberhalb der Box-Plots repräsentieren den Mittelwert der Hill-Koeffizienten der Derivate. Zudem wurden beim homotetrameren CNGA2-Kanal signifikante Unterschiede der cAMP-Derivate (2,20) zu den cGMP-Derivaten (2,70) beobachtet, ähnlich den Werten für die nativen Liganden cAMP (2,16) und cGMP (2,60). Bei den heterotetrameren CNG-Kanälen zeigten besonders die cAMP-Derivate (2,24) eine Erhöhung des Koeffizientens zum Vergleich von cAMP (2,14). Konträr verhielten sich die cGMP-Derivate (1,94), die besonders bei den Linkerverbindungen (Anhang Tab. 7 + 8) sowie im gesamten Vergleich eine starke Verringerung des Hill-Koeffizienten in Beziehung zum cGMP (2,58) herbeiführten. Somit hatten die Veränderungen am cGMP einen negativen Effekt auf die scheinbare Kooperativität.

Vergleiche zwischen den olfaktorischen Kanälen wiesen beim Homotetramer annähernd gleiche Koeffizienten für die cAMP-Derivate auf (2,20 bzw. 2,24), im Gegensatz zu den cGMP-Derivaten mit einem signifikanten Unterschied zu Gunsten des Homotetramers (2,70 bzw. 1,94). Dieser Unterschied muss auf die zwei unterschiedlichen Untereinheiten des Heterotetramers zurückzuführen sein, denn diese beiden Untereinheiten sind ebenfalls der Grund für die erhöhte scheinbare Affinität für cAMP am Heterotetramer (siehe KAPITEL 5.1). Bedenkt man nun, dass der Hill-Koeffizient zur groben Abschätzung der Wechselwirkung der einzelnen Untereinheiten zu einander steht, lassen sich anhand eines Liganden-Screening ebenfalls Aussagen zur Beteiligung der verschiedenen Untereinheiten am *Gating* treffen. Diese wurden bereits durch Mutationsversuche im Ionenkanal (Nache et al. 2016) überprüft und konnten nun ebenfalls durch verschiedene Liganden bestätigt werden. Somit wurden durch die cAMP-Derivate die Interaktionen zwischen den verschiedenen Untereinheiten des heterotetrameren CNG-Kanals mehr gefördert als beim Homotetrameren. Der Hill-Koeffizient am CNGA2-Kanal wird eher durch den affineren Liganden cGMP erhöht.

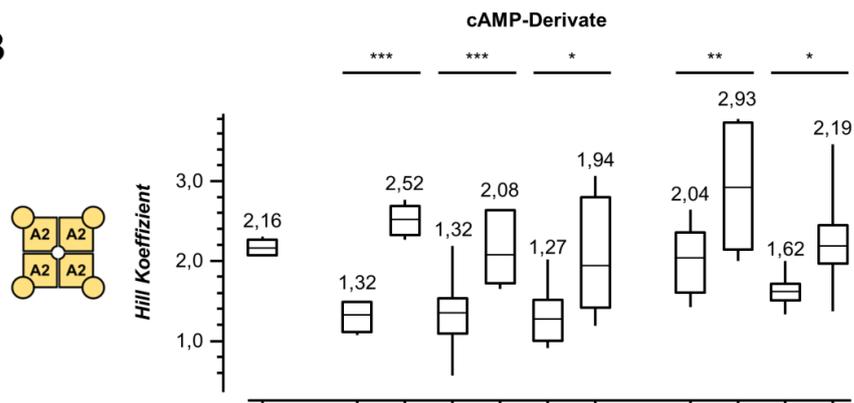
Das unterschiedliche *Gating*verhalten muss noch eingehender untersucht werden, jedoch steht nun mit **F9_A**, ein Ligand zur Verfügung, mit dem die Bindung sowohl am

hetero- als auch am homotetrameren CNG-Kanal beobachtet werden kann, was wiederum wichtige Informationen bei der Erstellung eines Modells liefert.

A



B



C

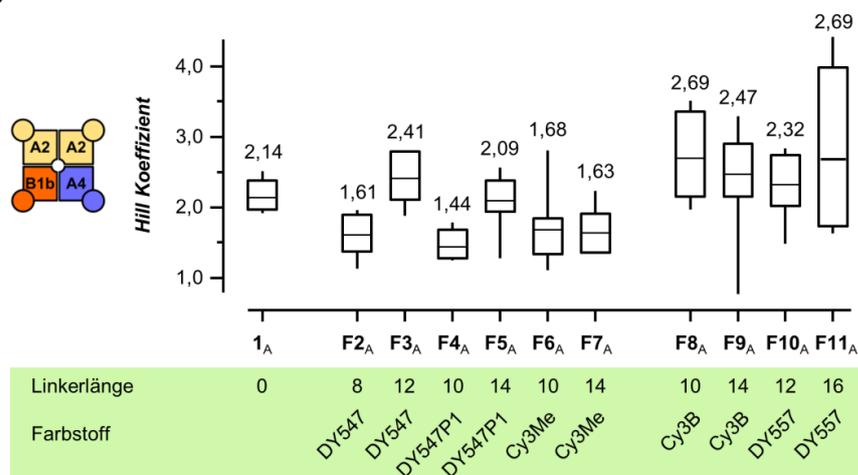


Abbildung 29. Effekt der Liganden auf den Hill-Koeffizienten. A) Zusammenfassung der Hill-Koeffizienten (H) aller Liganden als Box Plot. Blauer Punkt repräsentiert H der endogenen Liganden. Der Zahlenwert über der Box und die horizontale Linie in der Box repräsentieren den Mittelwert der Derivate. Box-Plots der Hill-Koeffizienten der fluoreszierenden Liganden am Homotetramer (B) und Heterotetramer (C). * $p < 0,1$ ** $p < 0,05$ *** $p < 0,01$. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

Bemerkenswert war ebenfalls, wie die Ionenkanäle auf die fluoreszierenden Derivate verschiedener Linkerlängen reagierten. Als Beispiel dienen die fluoreszierenden cAMP-Derivate an den CNG-Kanälen (Otte et al. 2019). Dabei unterschied sich der Großteil der fluoreszierenden Liganden mit kurzer Linkerkette von denen mit längeren Linkerketten signifikant bei den Hill-Koeffizienten (Abb. 29B - C). Somit ist ein klarer Einfluss der Linkerlänge erkennbar und führt scheinbar zu einer Behinderung der Kooperativität zwischen den Untereinheiten, möglicherweise durch sterische Behinderung durch den Farbstoff an der kürzeren Linkerkette. Die fluoreszierenden cGMP-Derivate zeigten diese Korrelation jedoch nicht (ANHANG TAB. 7 + 8). Dort schwankten die Hill-Koeffizienten in einem Bereich von 1,44 – 3,66, wobei auch hier höhere Werte am Homotetramer erreicht wurden.

5.6 Dockingexperimente der Liganden

Um die unterschiedlichen scheinbaren und wahren Affinitäten in der Aktivierung (KAPITEL 5.3 + 5.4) und der Bindung (KAPITEL 5.4.3) der verschiedenen Derivate näher erläutern zu können, sollten Struktur-Wirkungsbeziehungen beschrieben und mögliche Ursachen gefunden werden. Dabei waren wir die erste Gruppe in Kooperation mit der AG Prof. Gohlke aus Düsseldorf, die ein Homologie-Modell in annäherungsweise vollständiger Länge des olfaktorischen homotetrameren CNGA2-Kanals erstellten (Abb. 30A + C) und daran einige Dockingexperimente durchführten (Abb. 30D - G). Dafür diente die Kryo-EM Struktur des TAX4-Kanals (PDB-Nr.: 5H3O - Li et al. 2017) als Vorlage und wurde mit dem Swiss-Server* generiert. Abbildung 30A zeigt den homotetrameren CNGA2-Kanal von 127 - 583 AS und die einzelnen vier Untereinheiten die symmetrisch zusammengelagert zu einer zentralen Pore assemblieren. Die Untereinheiten sind besonders im intrazellulären Bereich stark mit einander verzahnt, sodass sich diese gegenseitig beeinflussen. Zudem beinhaltet eine einzelne Untereinheit die Transmembrandomänen (1-6 TMD) mit extrazellulären Schleifen und einem Verbindungsstück (C-Linker), welcher als *Gatingring* fungiert. Für die Dockingversuche diente die CNBD einer Untereinheit (Abb. 30C) als Proteinstruktur zur Anlagerung des zyklischen Nukleotides oder dessen Derivate.

Als erstes sollten die endogenen Liganden in die Bindetasche der CNBD gedockt werden. Bei diesen Dockingexperimenten entstanden verschiedene Bindeposen der Liganden, d.h. verschiedene räumliche Orientierungen und Konformationen. Dabei wurden die Posen mit dem häufigsten Vorkommen und der geringsten Bindungsenergie als bestes Beispiel des jeweiligen Derivates selektiert und in den

*<https://swissmodel.expasy.org/interactive>

Abbildungen 30D - I dargestellt. Es ist zu beachten, dass diese Versuche mittels Holo-Form der Proteine ermittelt und dadurch kleinere und strukturiertere Bindetaschen als in der Apo-Form verwendet wurden. Die Apo-Form bildet eine raumgreifendere und flexiblere Bindetasche, was möglicherweise die Zugangswege erleichtert. Nicht wirksame Bindungsmodi mit sterischen Substituenten an den Liganden würden eventuell trotzdem möglich sein.

Für die Bindungen der zyklischen Nukleotide musste das Molekül tief in das Protein mit der Phosphatgruppe vordringen, um die typische Salzbrücke mit dem Arginin 538 zu bilden. Diese Aminosäure (AS) ist sehr konserviert sowie verborgen (siehe Oberfläche der Untereinheit - Abb. 30D) und Mutanten dieser AS haben eine verschlechterte Affinität für den Liganden. Darauf folgend ging auch die Ribose die bekannten Interaktionen (G522, E523) ein, sodass der Zuckerrest und das zyklische Phosphat fest mit der Bindetasche verbunden waren. Darüber bildete sich mehr Raum für die Purinbasen, sodass diese flexibler in der CNBD lagen und zum Teil Interaktionen mit der C-Helix eingingen. Vorrangig lagen beide Nukleotide in unterschiedlichen Konfigurationen vor. Das cGMP (grau) lag in der *syn*-Konfiguration vor und wurde stabilisiert durch das Lysin (K582 - Abb. 30D). Das cAMP (dunkelrot) wendete sich von der Phosphatgruppe ab und lag somit in der *anti*-Konfiguration vor. Jedoch besitzt es eine geringere errechnete Bindungsenergie, was ein Hinweis auf die geringe Bindungsaffinität und Aktivität ist, welche in den vorausgegangenen Experimenten gezeigt wurde. Diese große räumliche Freiheit zeigte aber die Möglichkeit der Substitution der Nukleotide, sodass mit verschiedenen Kettenlängen bestimmte chemische Gruppen aus der Bindetasche herausragen und die Purinbasen dementsprechend positionieren konnten.

In diesem Fall wurde eine polare ungeladene Acetylgruppe (**L5_G**) überprüft, jedoch konnten auch positiv geladene Amine (**L4_G**) davon profitieren, da somit mögliche Abstoßungen durch positiv geladene Aminosäuren (K486, K533, K582) verhindert werden konnten (vgl. Otte et al. 2018). Eine längere hydrophobe Alkylkette hatte zudem einen weiteren Vorteil, welcher durch das Docking mit dem 8-Br-cGMP verdeutlicht wurde (Abb. 30E). Hierbei konnte beobachtet werden, dass sich die zyklischen Nukleotide mit der Purinbase direkt in einer hydrophoben Umgebung befanden, was als dunkle Oberflächen der beteiligten Aminosäuren (V503, L515, F521, I524, I542, I579) dargestellt wurde. Somit wird klar, wie wichtig der polare Phosphat- und Zuckerrest für die enthalpische Bindung ist und die hydrophoben Substitutionen (Br-Atom, Alkylketten, 7-CH-cAMP (**2_A**), Chlor-Phenylthio-Derivate

(6_{AVG}) entropische Effekte haben. Bei den Linker-Verbindungen kommt hinzu, dass keine einheitliche Konfiguration vorherrschte (Abb. 30F). Mehrere Experimente zeigten unterschiedliche Orientierungen des Liganden, sodass in Abbildung 30F die *syn* und *anti*-Konfiguration dargestellt wurde. Diese Flexibilität war vorteilhaft für die fluoreszierenden Liganden, da somit die *anti*-Konfiguration bevorzugt eingenommen werden konnte (Abb. 30G). In dieser Form schlängelte sich der Linker aus der Bindetasche zwischen den β -Faltblättern und der C-Helix hindurch, hin zum Intrazellularraum. Somit konnte der Linker den Farbstoff fern von der CNBD halten, umso negative Einflüsse zu minimieren (Abb. 30G). Der genauere Blick auf die Interaktionen (Abb. 30H) zeigte die große Übereinstimmung der Wechselwirkungen verglichen zum nativen cGMP. Interaktionen mit Linker und Farbstoff konnten ebenfalls festgestellt werden, sind aber bei den generierten anderen Posen nur selten aufgetreten und somit nicht vorrangig an der Bindung beteiligt. Sie sind aber möglicherweise für die kurze Stokes-Verschiebung bei **F8_G** verantwortlich (KAPITEL 5.4.3.3).

Um die ähnlichen Effekte der Liganden an den unterschiedlichen Untereinheiten und Proteinen zu erklären, wurden ebenfalls von CNGA4 und CNGB1b Homologie-Modelle erstellt und mit der Kristallstruktur des Maus-HCN2 (Zagotta et al. 2003) verglichen (Abb. 30I). Dabei ist eine hohe Similarität zwischen den einzelnen CNG-Untereinheiten (RMSD < 0,11 Å) mittels *PyMol1.8*[®] beobachtet worden, aber auch zur HCN-CNBD bestehen große Ähnlichkeiten (RMSD < 0,9 Å). In allen vier Fällen wurde das cGMP gedockt (CNG-Untereinheit) oder aus der Kristallstruktur (HCN2-Kanal) entnommen. Dabei sind besonders auffällig die Bereiche der C-Helix (α C), die besonders beim HCN2-Kanal etwas enger am Nukleotid war und die β 4- β 5-Schleife beim HCN2-Kanal, die kürzer im Vergleich zu den Untereinheiten CNGA2 (grau) und CNGA4 (lila – liegen fast deckungsgleich in diesem Bereich) war, bzw. die etwas größere Schleife bei CNGB1b. Zusammenfassend konnten bei diesen Testsystemen ähnliche Interaktionen, bei ähnlichen Effekten in den elektrophysiologischen Versuchen betrachtet werden. Gewisse Abstufungen der Affinitäten nach Länge und Hydrophobizität wurden bei den Linkern (Otte et al. 2018), den fluoreszierenden Liganden (Otte et al. 2019) und den bromierten Deaza-Nukleotiden (Lelle et al. 2019) nachgewiesen. Für weitere Informationen dienen die genannten Quellen sowie eine Übersicht im KAPITEL 6.5 VERGLEICH MIT ANDEREN CNBD-ENTHALTENDEN PROTEINEN.

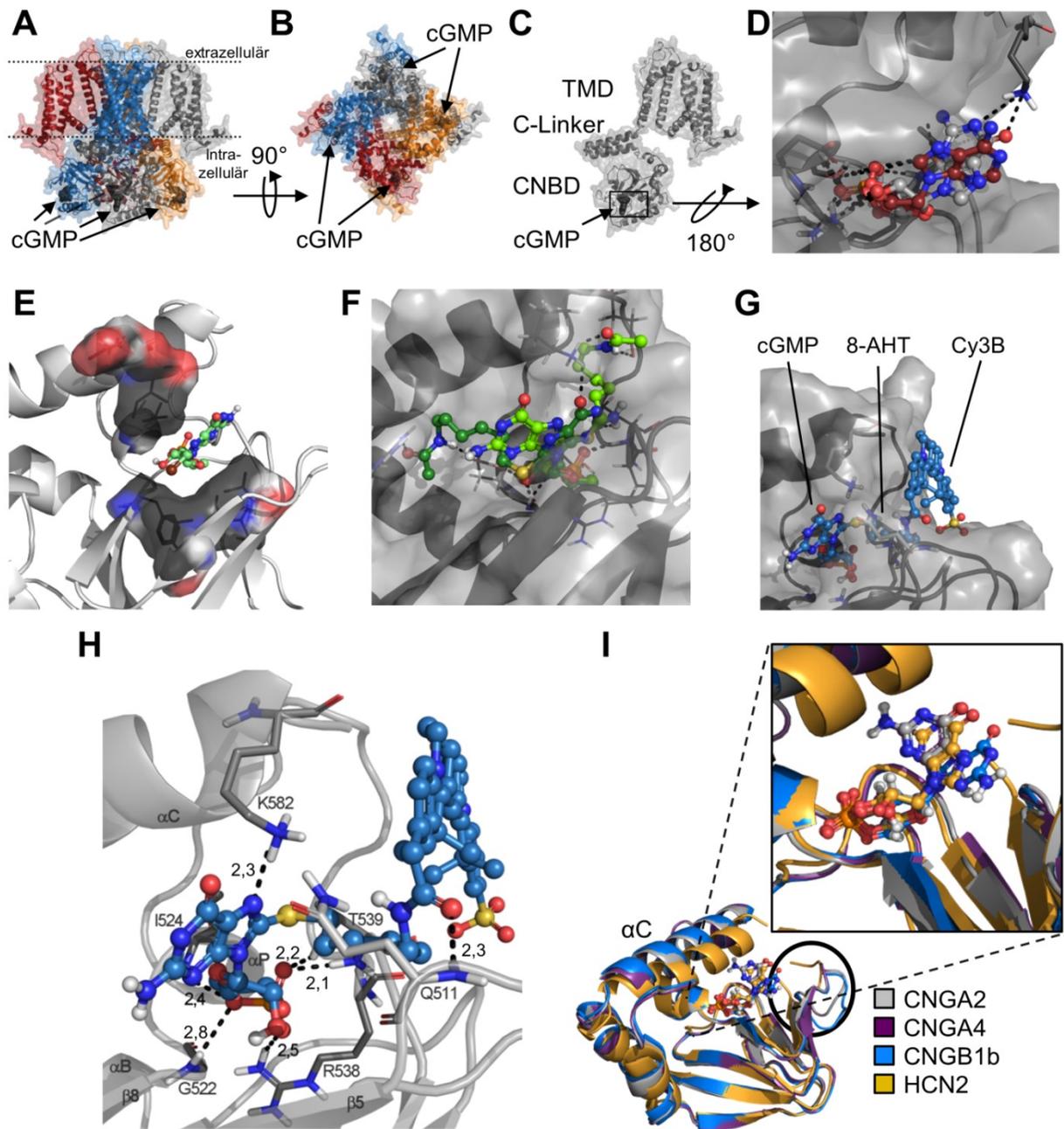


Abbildung 30. Homologie-Modell und Dockingexperimente. A) Homologie-Modell des CNGA2. B) Ansicht von unten. A+B) Untereinheiten in unterschiedlicher Färbung (hellgrau, blau, rot, dunkelorange). cGMP (1_G -dunkelgrau) gebundenen in der CNBD. C) Darstellung einer Untereinheit mit Transmembrandomäne (TMD), C-Linker, zyklische Nukleotid-bindende Domäne (CNBD) und cGMP. D-I) grau: Ausschnitt der CNBD der CNGA2-UE, dunkelgraue Linien interagierende AS, gestrichelte schwarze Linien mögliche Interaktionen. Färbung der Atome: dunkelblau: Stickstoff, weiß: Wasserstoff, rot: Sauerstoff, gelb: Schwefel, orange: Phosphat, braun: Brom. Kohlenstoff je nach Molekül gefärbt. D) Docking der endogenen CN: hellgrau-cGMP + dunkelrot-cAMP. E) Minzgrün: 8-Br-cGMP (3_G), schwarz lipophile Umgebung der entsprechenden AS. F) Hellgrün: $L5_G$ *anti*-Konfig., Dunkelgrün: $L5_G$ *syn*-Konfiguration. G) Blau: $F8_G$; Linker distanziert Farbstoff von Bindetasche und Proteinoberfläche. H) Entsprechende Interaktionskarte von G zwischen CNGA2 und $F8_G$ mit Distanzen zu den AS. I) Überlagerung der Untereinheiten CNGA2 (grau), CNGA4 (lila), CNGB1b (blau) und HCN2 (gelb PDB-1Q3E). β_4 - β_5 -Schleife schwarz markiert. Einsatz zeigt vergrößert die gedockten cGMP-Posen der olfaktorischen CNG-Untereinheiten und aus der Kristallstruktur (HCN2). G-I modifiziert nach Otte et al., 2019.

6. Diskussion

Die nachfolgende Erörterung der Ergebnisse dieser Arbeit ist zum Teil in den Manuskripten der jeweiligen Publikationen verarbeitet. Die vorliegende Arbeit soll Möglichkeiten der Modulation eines fluoreszierenden zyklischen Nukleotids aufzeigen und somit einen optimierten Liganden für den olfaktorischen CNG-Kanal darstellen. Dabei wurde an mehreren Stellschrauben des Moleküls gearbeitet, wie Nukleotid, Linkerkette und Fluorophor. Die zum großen Teil neuen Moleküle wurden mittels *Patch-clamp*- und Fluoreszenzmethoden charakterisiert. Dazu wurden Parameter, wie EC_{50} -Werte, BC_{50} -Werte, Hillkoeffizienten und Aktivierungs- sowie Deaktivierungskinetiken ermittelt. Zudem wurde die Helligkeit einzelner fluoreszierender Liganden sowie dessen Fluoreszenzspektren verglichen. Abschließend sollte ein Einblick in die Bindedomäne des Proteins gegeben werden, um mögliche Erklärungen für die Effekte zu erhalten.

6.1 Konzentrations-Aktivierungs-/Bindungs-Beziehungen

Mithilfe von Konzentrationsreihen der Testverbindungen wurde im Gleichgewicht an liganden-gesteuerten Ionenkanälen eine Konzentrations-Wirkungs-Relation aufgestellt. Daraus ergeben sich charakteristische Parameter wie die Bindung und Aktivierung (scheinbare Affinität) mit den typischen BC_{50} - und EC_{50} -Werten, Hill-Koeffizienten (H) und Wirksamkeit (Voll- oder Partialagonisten) von verschiedenen Liganden. Dabei zeigt der EC_{50} -Wert die entsprechende Ligandenkonzentration, bei der der Kanal halbmaximal aktiviert ist bzw. der BC_{50} -Wert die halbmaximale Bindung der Liganden an den Kanal. Die Ermittlung des Hill-Koeffizienten (H) aus den elektrophysiologischen Messungen (KAPITEL 5.5) dient der Beschreibung der sigmoidalen Kurvensteilheit und ermöglicht eine grobe Abschätzung der mindestbenötigten Anzahl an gebundenen Liganden für eine maximale Kanalaktivierung (Kaupp et Seifert 2002). Der Hill-Koeffizient ist ein dimensionsloser Parameter und wurde für die Stöchiometrie der Ligandierung/Bindung von Sauerstoff an das Hämoglobin eingeführt (Hill 1910, Wyman 1964). Viele der bisher publizierten Hill-Koeffizienten für die CNG-Kanäle zeigten Werte über 1 (1,5 bis 3,5). Somit wird ein kooperativer Prozess für die Aktivierung angenommen. Jedoch können durch die parallele Detektion der Ligandenbindung und -aktivierung in Verbindung mit den Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken genauere Rückschlüsse auf die

Kooperativitäten zwischen Untereinheiten eines Ionenkanals gezogen werden, im Vergleich zum reinen Hill-Koeffizienten.

Ebenfalls lassen sich die experimentell ermittelten EC_{50} -Werte auch mit EC_{50} -Werten aus anderen Publikationen vergleichen, um die eigenen Werte zu verifizieren und einzuordnen. Jedoch verwenden andere Labore häufig andere Expressionssysteme (HEK-, native Zellen) oder andere Patch-Konfigurationen (*Whole-cell*), verschiedene Messspannungen (+50 oder +100 mV bei CNG), Ionenkanäle von anderen Spezies (Human, Rind, Ratte, Maus) oder andere Assays (Fluoreszenzpolarisation, Verdrängungsversuche). Dennoch wurden Werte für die Nukleotide mit Werten aus den Publikationen von Altenhofen (1991), Varnum (1995) sowie Bönigk (1999) verglichen und eine Übereinstimmung für cAMP am heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanal ($K_{D1/2} \approx 4 \mu\text{M}$) bzw. homotetrameren CNG-Kanal ($K_{D1/2} \approx 54 \mu\text{M}$) festgestellt.

Um zusammenfassend eine Übersicht der Ergebnisse zu erhalten, wurden alle in dieser Arbeit bestimmten EC_{50} -Werte in einem Diagramm (Abb. 31) verglichen. Es war auffällig, dass sich die scheinbare Affinität der cAMP-Derivate mehr bei den heterotetrameren CNG-Kanälen erhöhte, wohingegen die scheinbaren Affinitäten der cGMP-Derivate eine Verbesserung am homotetrameren CNG-Kanal zeigten.

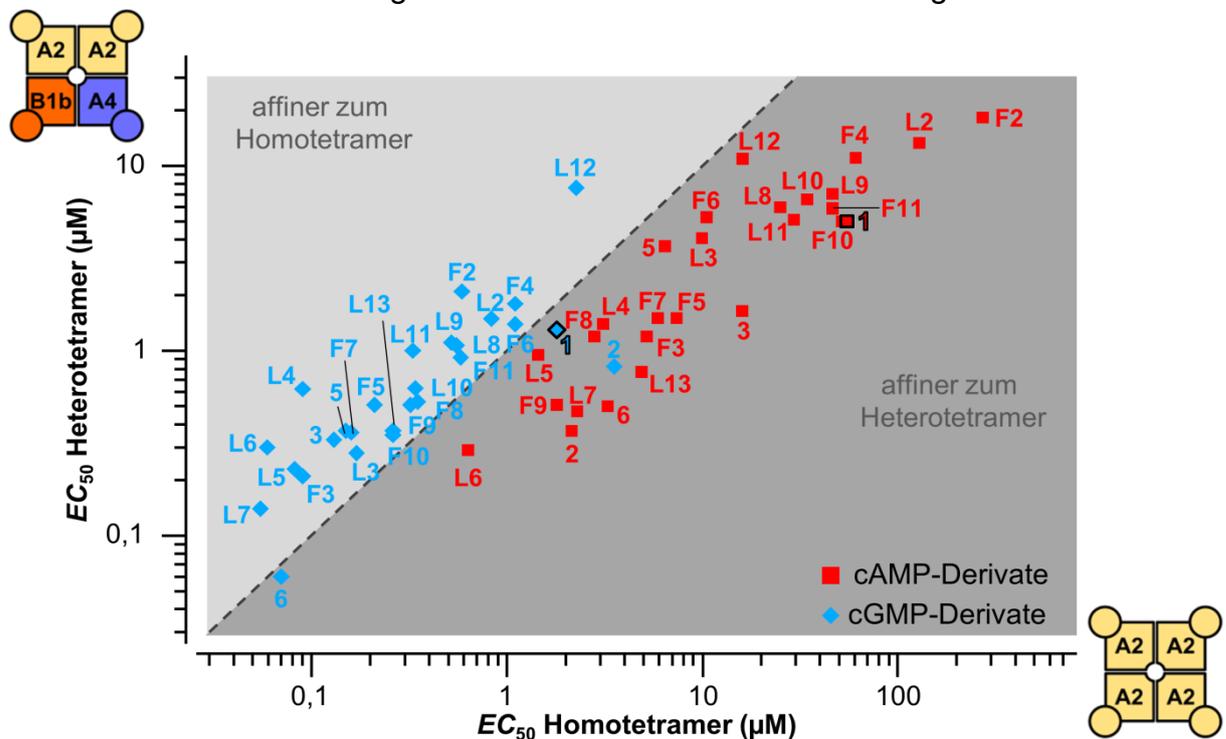


Abbildung 31. Zusammenfassung aller elektrophysiologisch vermessenen Liganden. Aufgetragen sind die EC_{50} -Werte des Heterotetramers gegen die des Homotetramers. Die gestrichelte schwarze Linie gibt die theoretische Potenz eines Liganden an, wenn dieser für beide Ionenkanäle identische Affinität aufweist. Die cAMP-Derivate sind affiner für das Heterotetramer und die cGMP-Derivate etwas affiner für das Homotetramer. Die umrandeten 1_{AG} kennzeichnen die nativen Liganden. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

Ähnlich dazu verhielt sich auch der Hill-Koeffizient (KAPITEL 5.5 HILL-KOEFFIZIENT), welcher ebenfalls bei den cAMP-Derivaten bei den heterotetrameren CNG-Kanälen erhöht war, wohingegen H bei den cGMP-Derivate einen Anstieg am homotetrameren CNG-Kanal verursachte. Diesen Auffälligkeiten liegen die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der Untereinheiten zugrunde (siehe KAPITEL 6.6.1).

6.2 Optimierung des Linkers

Bereits vorherige Publikationen zeigten Hypothesen, dass ein Austausch des Linkers unterschiedliche Effekte auf die Affinität der Liganden zur Bindestelle hat. Zum Beispiel beobachteten Brown und Kollegen, dass CN mit verschiedenen Ketten an Position 8 höhere bzw. niedrigere scheinbare Affinitäten zu den *rod* CNG-Kanälen aufwiesen (Brown et al. 1993). Hierbei konnte ebenfalls die Abhängigkeit einer funktionellen Gruppe mit positiver oder negativer Ladung an solchen Linkern beschrieben werden. Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass mit zunehmender Kettenlänge ein negativer Einfluss einer positiven Ladung verringert wird (Vgl. **L2** - **L7_{AG}**).

Zudem zeigten Studien aus der AG Prof. Benndorf, dass das $f_{\text{hexyl}}\text{cAMP}$ (in dieser Arbeit als **F3_A** bezeichnet) eine Untersuchung der Untereinheiten am Heterotetramer ermöglicht und somit eine höhere Potenz als der endogene Ligand aufweist (Nache et al. 2016). Jedoch gab es bisher keinen systematischen Ansatz diese Effekte zu ergründen. Zudem sollten weitere Verbesserungen angestrebt werden und verschiedene hydrophobe Alkyl- (**L2** - **L7**), PEG- (**L8** - **L9**) und glycinähnliche Ketten (**L10** - **L11**) sowie Linker mit einem Phenylring und zusätzlicher Alkylkette (**L12** - **L13**) entworfen und charakterisiert werden. Dabei wurde eine Abhängigkeit der hydrophoben Eigenschaften und der Länge für beide olfaktorischen CNG-Kanäle beobachtet, sodass die scheinbare Affinität mit steigender Alkylkette in nachstehender Reihenfolge Ethyl, Hexyl, Decyl zunehmend steigt. Dabei ist der Unterschied zwischen Hexyl zu Decyl geringer, sodass hier von einem kaum steigerungsfähigen Effekt zu noch längeren Linkerketten (Do- oder Tetradecyl) auszugehen ist. Zudem kommt problematisch hinzu, dass die Wasserlöslichkeit mit steigender Kohlenstoffatomanzahl sinkt und unspezifische Effekte mit lipophilen Verbrauchsmaterialien oder Biomembranen einhergehen und die Experimente erschweren. Dies war der Grund warum nicht noch längere hydrophobe Linkerketten verwendet und Messungen mit hydrophileren Linkerketten durchgeführt wurden. Ein weiterer Vorteil des Glycinlinkers

sollte die Ähnlichkeit zu den Aminosäuren in der Bindetasche darstellen. Jedoch konnten keine stärkeren Effekte als bei den hydrophoben Ketten beobachtet werden. Abbildung 31 zeigt, dass **L6_A** und **L7_G** die potentesten Linkerverbindungen sind. Nur das 8-CPT-cGMP (**6_G**) erwies eine noch höhere scheinbare Affinität mit 0,07 bzw. 0,06 μM . Dies ist konform mit dem EC_{50} -Wert (73 nM) von Strassmaier und Karpen (2007). Deshalb wurde der Phenylring als eine Option des Linkers genutzt und die Verbindungen **L12** - **L13_{AG}** wurden neu synthetisiert und charakterisiert (KAPITEL 5.3.3). Erkennbar war hier, dass ein Schwefelatom unabdingbar für einen positiven Effekt auf die Beweglichkeit war und das **L13_{AG}** an beiden Ionenkanälen eine höhere scheinbare Affinität zeigten als die endogenen Liganden. Jedoch konnte keine Verbesserung zu den reinen aliphatischen Kohlenwasserstoffen, im Speziellen zu **L6_A**, erreicht werden. Somit wird für **6_G** ebenfalls ein positiver Halogeneffekt, wie bei den Brom-Derivaten, vermutet.

Ein möglicher Grund für die erhöhte scheinbare Affinität stellte die verlängerte Verweildauer des Moleküls am Protein dar, durch eine verringerte effektive Ratekonstante (k_{off}) bzw. einer verlängerten Deaktivierungszeitkonstante (τ_{deakt}) (KAPITEL 5.3.4). Eine Erklärung für die erhöhte Verweildauer konnte in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Gohlke (Düsseldorf) gefunden werden. Dabei wurde eine diffizile enthalpisch-entropische Kompensation mittels MD-Simulationen beobachtet. Die computerberechnete freie Bindungsenergie bot eine sehr gute Korrelation zu den experimentell ermittelten EC_{50} -Werten der aliphatischen Linkerketten **L2** - **L7_A** (Otte et al. 2018). Basierend auf diesen Experimenten wurden die Fluorophore nun an aliphatische, hydrophobe Kohlenwasserstoffketten gekoppelt und somit wurde der affinste fluoreszierende Ligand ebenfalls mittels elektrophysiologischer Experimente charakterisiert (KAPITEL 5.4.1 + 5.4.2 + 6.3).

Auffällig waren einige Derivate, die am heterotetrameren CNG-Kanal vorrangig als Partialagonisten fungierten. Besonders sticht dabei **L12_{AG}** hervor, welches als **L12_G** am heterotetrameren CNG-Kanal nur eine maximale Aktivierung von 50% erreichte (siehe Anhang – Tab.7 + 8). **L12** zeichnete sich durch ein fehlendes Schwefelatom aus, welches die Beweglichkeit des Linkers stark negativ beeinflusste. Fehlt dieses Schwefelatom kann der Phenyllinker durch eine sterische Hinderung in einer ungünstigeren Konformation des Liganden vorliegen und zu einer verminderten Bindung in der CNBD führen. Andere Atome wie Stickstoff erhöhen ebenfalls die Beweglichkeit, aber in einem geringeren Ausmaß (Brown et al. 1993).

Ein anderes Phänomen der verschiedenen Funktionen von zyklischen Liganden ist von der PKA und dem EPAC bekannt, zwei Proteinen mit ähnlicher CNBD (KAPITEL 6.5). Hierbei ist 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP beim EPAC ein Agonist, aber bei der PKA ein Antagonist (Enserink et al. 2002). Eine Ursache ist die unterschiedliche Größe der Bindetaschen. Das EPAC besitzt einen größeren Zugang und toleriert somit sterische Substituenten einfacher als die PKA mit einer kleinen, kompakteren Bindetasche. Ein ähnlicher Effekt ist auch bei den verschiedenen Untereinheiten der CNG-Kanäle zu vermuten. Das **L12_{AVG}** zeigt am Homotetramer eine vollständige Aktivierung, jedoch am Heterotetramer eine partialagonistische, sodass die Untereinheiten A4 und B1b diesen Liganden weniger tolerieren. Allerdings muss diese These erst durch weitere Tests oder ein computergestütztes Modell manifestiert werden.

6.3 Optimierung und Nutzen eines neuen fluoreszierenden Liganden

Um einen geeigneten fluoreszierenden Liganden für Einzelmolekülmessung oder weitere spektroskopische Analysen zu erhalten, wurden mehrere Ansätze zur Optimierung des Moleküls gewählt. Zum einen zeigte die Modifikation der Nukleobase (KAPITEL 5.2; Lelle et al. 2019) einen vielversprechenden Ansatz der Affinitäts-erhöhung. Zum anderen zeigten auch die Substitutionsstellen am Nukleotid verschiedene Effekte (KAPITEL 5.2). Die gewählte 8-Position offenbarte sich als chemisch reaktiv und gut zugänglich für Substitutionen. Jedoch konnten Veränderungen an der 6-Position (KAPITEL 5.2) ebenfalls positive Effekte vorweisen. Trotz der schlechten Verfügbarkeiten sollten die bereits beschriebenen Positionen wie N1 und N7 (Strassmaier et Karpen 2007) für weitere Versuche nicht ausgeschlossen werden.

Nichtsdestotrotz wurde Position 8 zur Linkerkettenkopplung verwendet und mit verschiedenen Eigenschaften der Linkerketten optimiert. Dazu wurden aliphatisch hydrophobe (KAPITEL 5.3.1), aliphatisch hydrophile (KAPITEL 5.3.2) sowie aromatische Linker (KAPITEL 5.3.3) untersucht. Dabei stellte sich eine Abhängigkeit zur erhöhten Hydrophobizität und linearer Länge dar, die ein Optimum bei Hexyl- bzw. Decylketten hatte. Aus diesem Grund wurden fluoreszierende Liganden mit ähnlicher Länge synthetisiert und charakterisiert. Da die Farbstoffe zum Teil ebenfalls aliphatische Ketten besaßen, wurde der Linker in der Länge angepasst, sodass die Gesamtlinkerkette zwischen 10 und 16 Atomen lag (Nummerierung siehe Anhang Abb. 36). Dabei konnte bei den strukturell verwandten Cyanfarbstoffen (**F2 - F7**) eine direkte Abhängigkeit in der Linkerlänge festgestellt werden, die bei **F8 - F11** mit anderen

Farbstoffklassen etwas aufgeweicht wurde. Zusammenfassend und mit einzelnen Ausnahmen war das fluoreszierende Derivat mit längerer Linkerkette affiner als der fluoreszierende Ligand mit kurzem Linker. Die fluoreszierenden cAMP-Derivate (**F3_A**, **F5_A**, **F7_A**) mit Hexylkette wiesen alle eine ähnliche Affinität für das Homotetramer auf (5,2 μM – 7,4 μM). Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine gewisse Länge aus der Bindedomäne heraus erreicht werden muss, um den negativen Einfluss des Farbstoffes zu vermindern. Denn mit den längeren Linkern plus Farbstoff wurden annähernd EC_{50} -Werte der affineren Linkerketten ohne Farbstoff erreicht. Als Beispiel dient das Heterotetramer mit Decyllinker **L7_A** (0,47 μM) und **F9_A** (0,51 μM). Zudem konnte dieser Effekt ebenfalls bei den cGMP-Derivaten beobachtet werden. Hier zeigten der Hexyllinker **L5_G** (0,23 μM) und **F3_G** (0,21 μM) ähnliche EC_{50} -Werte. Besonders herauszustellen sind mit **F9_A** und **F3_G** die fluoreszierenden Liganden mit den höchsten scheinbaren Affinitäten auf beiden olfaktorischen CNG-Kanälen. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den cPCF-Messungen (KAPITEL 5.4.3.1). Aufgrund der Komplexität der Messungen wurde mit nur vier fluoreszierenden cGMP-Derivaten gearbeitet. Dabei wurde in der Bindung eine ähnliche Reihenfolge der Affinitäten nachgewiesen wie in den reinen elektrophysiologischen Messungen. Bemerkenswert war die Ähnlichkeit der Bindungs- und Aktivierungs-Konzentrationsbeziehungen zu früheren Publikationen, mit dem typischen Schnittpunkt der beiden Graphen (Biskup et al. 2007).

6.3.1 Helligkeit

Die Helligkeit stellt die Menge der abgegebenen Photonen pro Molekül dar, die in erster Näherung (bei geringen Laserleistungen) proportional zum Produkt aus Fluoreszenzquantenausbeute und Extinktionsfaktor bei entsprechender Wellenlänge ist. Der Nachteil des bisher verwendeten fcGMP bzw. $f_{\text{hexyl}}\text{cAMP}$ liegt in genau diesen photophysikalischen Eigenschaften des Farbstoffes DY547. Der Cyanin-Farbstoff zeigt durch Isomerisierungsprozesse Hell-Dunkelzustände und besitzt eine geringere Quantenausbeute. Dies kann durch eine intramolekulare Zyklisierung im Farbstoff vermieden werden (Vorteil des Cy3B-Farbstoffes). Somit kann ein Farbstoffmolekül mehr Photonen abgeben und hebt sich über das Hintergrundrauschen deutlicher ab. Die nachgewiesene doppelte Helligkeit erscheint zwar anfänglich nur ungenügend (KAPITEL 5.4.3.2), jedoch unterliegt die Auflösung des Fluoreszenzsignals des gebundenen Liganden des Photonenzählungsrauschens der Poissonverteilung und

die Standardabweichung der Messung ist proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der detektierten Photonen. Praktisch angewendet bedeutet dies, dass eine geringere Aufnahmegeschwindigkeit oder eine geringe Ionenkanalexpression für die gleiche Qualität der Experimente benötigt wird.

Die Helligkeit ist über den Extinktionskoeffizienten und die Fluoreszenzquantenausbeute näherungsweise abschätzbar und kann durch Vorversuche mittels FCS verifiziert werden. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sind deckungsgleich zu weiteren Ergebnissen der AG Benndorf. Dabei wurde beobachtet, dass die freien Farbstoffe vor der Kopplung an ein zyklisches Nukleotid zumeist heller sind als nach der Kopplung. Zudem gibt es sogar Unterschiede bei der Art des zyklischen Nukleotides (siehe Anhang – Abb. 37). Guanin ist ein bekanntes Nukleotid, um Farbstoffe, wie Rhodamine, durch gewisse Elektronentransferprozesse zu quenchen (Torimura et al. 2001).

Jedoch ist der Unterschied in der Helligkeit der fluoreszierenden Liganden am Patch geringer, denn durch Fixierung des Farbstoffes kommt es zu geringer Isomerisierung. Das Verhältnis ist praktisch nicht vorauszusagen und muss für jedes Derivat und jeden Ionenkanal überprüft werden. Sowohl die FCS-Daten als auch die cPCF-Daten zeigen die Überlegenheit der Helligkeit der Cy3B-Derivate. Ein Vergleich mit den anderen Farbstoffgruppen DY557 bzw. PDI mittels dieser Techniken (PDI nur mittels FCS), zeigt ebenfalls die Überlegenheit des Cy3B aufgrund der Helligkeit (siehe Anhang – Abb. 37).

Für eine größere Helligkeit wäre ein Wechsel der Farbstoffe zu längeren Wellenlängen und Absorptionsmaxima möglich. Erkennbar war dies am Referenzfarbstoff, der ein wesentlich höheres Fluoreszenzsignal mit 5 μM aufwies als die fluoreszierenden Liganden mit 10 μM , bei geringer Laserleistung (KAPITEL 5.4.3.2). Farbstoffe wie DY647, Cy5 oder Cy5B zeigen sowohl höhere Fluoreszenzquantenausbeuten (Cy3 \approx 13%; Cy5 \approx 25%), als auch höhere Extinktionskoeffizienten (Cy3 150.000; Cy5 250.000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) und ermöglichen somit noch höhere molekulare Helligkeit. Dies kann für zukünftige und weiterführende Experimente in Betracht gezogen werden. Für Einzelmolekülexperimente wäre dies problemlos möglich, da für diese Versuchsaufbauten zumeist kein Referenzfarbstoff benötigt wird und zudem die Eigenschaften der Farbstoffe wie Quantenausbeute und Extinktionskoeffizienten verbessert sind. Außerdem können negative Einflüsse der geringeren Wellenlängen, wie Autofluoreszenz oder Phototoxizität, vermieden werden.

Eine weitere Optimierung ist am Setup möglich. Der verwendete HeNe-Laser erzeugt eine Wellenlänge von 543 nm und ist 10 - 20 nm von den Absorptionsmaxima der fluoreszierenden Liganden entfernt. Somit fehlt die Möglichkeit der vollen Anregung des Farbstoffes und der Farbstoff erzeugt eine geringere Helligkeit. Beim Cy3B-Farbstoff wird durch den 543 nm Laser nur 53% der Energie absorbiert. Durch Verwendung eines passenden Lasers könnte somit das Signal-zu-Rauschverhältnis verbessert werden.

6.4 Vergleich mit anderen fluoreszenzmarkierten Liganden

Ein optimaler fluoreszierender Ligand sollte mehrere Bedingungen je nach Fragestellung der Experimente erfüllen. Für Einzelmolekülmessungen sollte zum Beispiel ein Ligand eine hohe Bindungsneigung für die Bindetasche des Proteins besitzen bei gleichzeitiger geringer unspezifischer Bindung an Glas, Membranen oder Proteinen. Zudem sollte der Farbstoff eine starke Helligkeit aufweisen, stabil in wässrigen Puffern oder bei geringen pH-Schwankungen sein und keine negativen photophysikalischen Effekte mitbringen. Die Zusammenführung dieser Eigenschaften konnten am besten mit dem neuen 8-[Cy3B]-Hexyl-cGMP (**F8_G**) bzw. 8-[Cy3B]-Decyl-cAMP (**F9_A**) gezeigt werden. Dafür wurden unterschiedliche Farbstoffe und Linkermodifikationen getestet, sodass viele der Eigenschaften überprüft und mit anderen fluoreszierenden Liganden verglichen wurden. Die bereits bekannten Derivate mit dem DY547-Farbstoff (Biskup et al. 2007, Kusch et al. 2010, Nache et al. 2016) werden in naher Zukunft kommerziell nicht mehr erhältlich sein, sodass die Suche nach einer Alternative unerlässlich war. Zudem sind nur wenige fluoreszierende zyklische Nukleotide bekannt, sodass die große Anzahl an neuen Verbindungen die Forschung bereichert. Auch die früher etablierten Liganden zeigten bereits einige Schwächen. Wu und Kollegen (2011) zeigten mit dem 8-NBD-cAMP einen weiteren fluoreszierenden Liganden für den HCN-Kanal. Ein Vorteil dieses Farbstoffes ist die große Stokes-Verschiebung, sowie die umgebungsbedingte Fluoreszenzintensität. In einer hydrophoben Bindetasche erscheint der Ligand heller als in der wässrigen Pufferlösung, sodass sich das Signal-zu-Rauschverhältnis wesentlich erhöht und kein konfokales Mikroskop notwendig ist. Hierin kann aber auch ein Problem liegen, indem in diesem Prozess eine unbekannt Kinetik versteckt ist und so für kinetische Messungen nicht verwendet werden kann.

Zudem wird dieser Farbstoff häufig an Lipide gekoppelt, um so Lipidtransportvorgänge oder Prozesse in der Biomembran zu detektieren (Chattopadhyay 1990). Dies zeigt einen möglichen weiteren Nachteil, denn eine unspezifische Fluoreszenz durch Partitionierung in die Biomembran bei der *Patch-Clamp*-Technik ist ein Ausschlusskriterium bzw. benötigt aufwändige Kontrollen zur Subtraktion dieses Effektes auf die Ergebnisse. Es würde eine mögliche Bindung suggeriert, wobei kein Kanal exprimiert ist. Ein weiterer Vorteil der zum Beispiel Cy3B-markierten Liganden ist das Absorptionsmaximum von 562 nm (KAPITEL 5.4.3.3). Der Farbstoff NBD besitzt ein Absorptionsmaximum von 463 nm und muss durch einen 463 nm Laser angeregt werden, was wiederum erhöhte Autofluoreszenz und Phototoxizität hervorruft. Des Weiteren liegt die Helligkeit des NBD um das Zehnfache unter der des Cy3B, anhand der groben Abschätzung von Extinktionskoeffizient multipliziert mit der Fluoreszenzquantenausbeute.

Die zweite fluoreszierende Verbindung ist das 8-Fluo-cGMP, welches durch Tanaka und Kollegen (1989) das erste Mal verwendet wurde. Dabei wurde eine höhere Affinität am Stäbchen-CNG-Kanal (*rod*) beobachtet. Gegenwärtig wird dieser Ligand bzw. das cAMP-Analogon für kompetitive Bindungsassays verwendet (Moller et al. 2014). Ein Grund könnte die molekulare Helligkeit sein, mit einer Fluoreszenzausbeute von $\approx 0,95$ und einem Extinktionskoeffizient von $80.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Lakowicz 2006). In unserer Arbeitsgruppe jedoch wurden nachteilige Erfahrungen gemacht. Unter anderem wurden irreversible Kanalaktivierungen nachgewiesen. Weiteres Ausschlusskriterium ist die pH-Abhängigkeit und das vergleichsweise schnelle Bleichen.

Wie immens wichtig solche fluoreszierenden Liganden auch in anderen Bereichen sind, zeigen Studien zu markierten endogenen Substanzen wie NBD-5- (Prinz et Maelicke 1992), Cy3-3-Acetylcholin (Fujimoto et al. 2008), CNS-C₆-Cholin (Heidmann et Changeux 1979) oder verschiedene ATP-Derivate (Bagshaw 2001) bzw. pharmakologische Substanzen wie Epibatidin (Grandl et al. 2007, Schmauder et al. 2011) oder die Serotoninantagonisten (sog. Setrone) (Jack et al. 2015). Wie wichtig die Wahl der richtigen Substitutionsstelle des Linkers oder des Fluorophors ist, dokumentierten bereits Anderson und Cohen (1974) mit dem Bungarotoxin, welches mit einem Farbstoff markiert, eine verringerte Affinität aufwies. Besonders bei ATP und seinen vielen verschiedenen Zielproteinen ist die Position des Linkers und des Farbstoffes über die Eigenschaften mitentscheidend. Als Beispiel dienen die P2X-Ionenkanäle. Bisher werden nur zwei fluoreszierende ATP-Derivate, TNP-ATP sowie Alexa-647-ATP, eingesetzt. Dabei wirkt TNP-ATP als kompetitiver Antagonist (Kasuya et al.

2017) und Alexa-647-ATP als Vollagonist nur für P2X1-Kanäle (Bhargava et al. 2013, Ruepp et al. 2015). Auch hier ist ein neuer Ligand in der AG Prof. Benndorf entwickelt worden (Sattler et al. 2020). Außerdem muss bei der Verwendung auf eine erhöhte Hydrolysestabilität geachtet werden, da ATP in wässrigen Puffern sehr instabil ist. Dies ist aber ebenfalls bei vielen anderen fluoreszierenden Derivaten ein Problem (Acetylcholin). Somit muss für jedes Zielprotein und jede Versuchsbedingung ebenfalls eine Struktur-Wirkungsbeziehung erprobt werden. Hierbei zeigt diese Arbeit Strategien und ein Beispiel für CNG-Kanäle.

6.5 Vergleich mit anderen CNBD-enthaltenden Proteinen

Proteine, die cNMP binden, ähneln sich sehr stark in der Binderegion, der sog. CNBD. Ihre AS-Sequenzen und Strukturen sind hoch konserviert. Somit wäre ein weiterer Ansatz die neu synthetisierten Verbindungen auch an diesen Zielstrukturen zu testen. Eventuell können Parallelitäten, aber auch Unterschiede entdeckt werden und somit selektivere Liganden für eine bestimmte Zielproteinklasse entwickelt werden. In den verschiedenen Publikationen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden die Derivate ebenfalls am HCN2-Kanal getestet (Abb. 32). Hiermit konnten die verschiedenen Thesen ebenfalls für den HCN2-Kanal bestätigt werden. Zudem zeigt Abbildung 30I, dass sich die Bindedomänen stark ähneln und sich somit die Effekte möglicherweise ähnlich verhalten.

Es wurde gezeigt, dass cAMP als endogener Ligand auch am HCN2-Kanal ein Vollagonist (Abb. 32A + B) sowie **2_A** ein Vollagonist mit hoher Potenz ist (Lelle et al. 2019), dass längere hydrophobe Linkerketten affiner sind als hydrophile Linker (Otte et al. 2018; Abb. 32C), dass ein Schwefelatom notwendig ist für eine verbesserte scheinbare Affinität (Abb. 32D) und dass die fluoreszierenden Liganden ebenfalls für optische Messungen am HCN2-Kanal verwendet werden können (Otte et al. 2019, Abb. 32E, Tab. 7). Somit stellte sich heraus, dass Ergebnisse am CNG-Kanal parallel als vielversprechende Hypothese für den HCN2-Kanal genutzt werden können. Denn auch andere Verbindungen wie **7_A** am HCN2-Kanal zeigen ähnlich große Affinitäten (≈ 7 fach affiner, Leypold et al. 2019) die ebenfalls am olfaktorischen CNG-Kanal beobachtet wurden (6-7 fach affiner). Jedoch lässt dies den Schluss zu, dass ein aromatischer Linker an Position 6 für HCN2-Kanäle eine bessere Affinität vermittelt als eine Kohlenwasserstoffkette an Position 8 (**L7_A** ≈ 2 fach affiner).

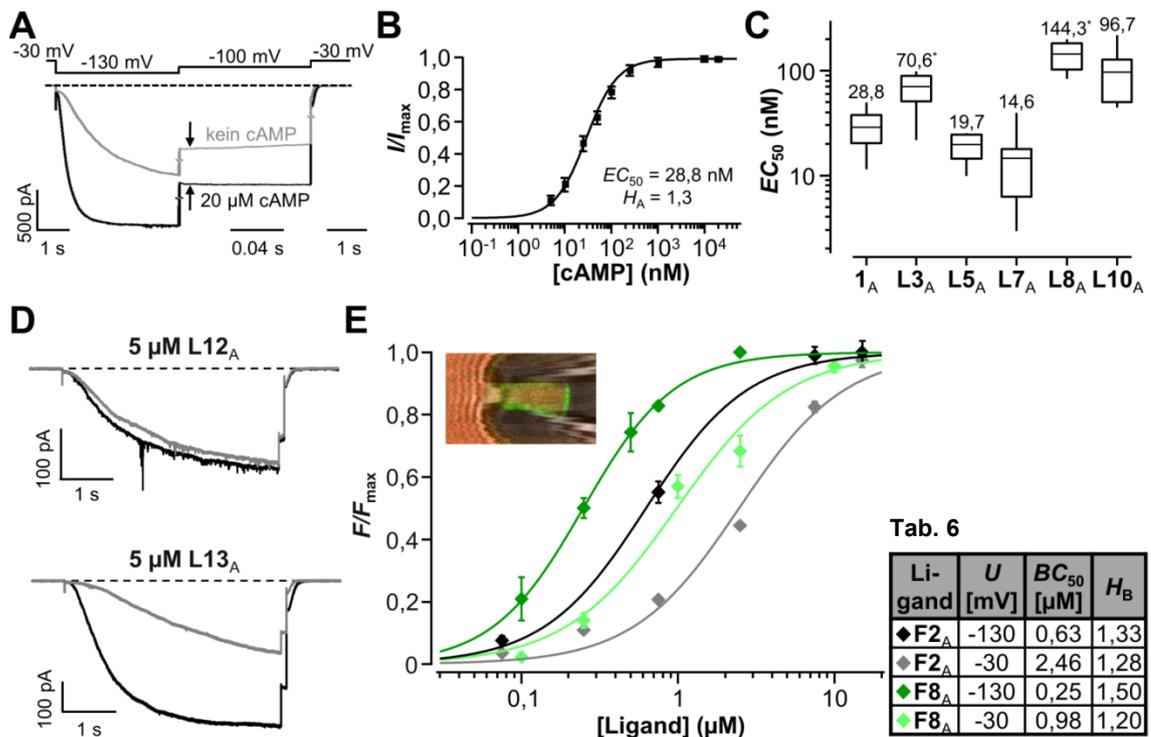


Abbildung 32. Effekte der cAMP-Derivate am HCN2-Kanal. A) Spannungsprotokoll mit entsprechender Stromantwort ohne/mit sättigender Konzentration **1_A** (20 µM). Die Differenz zwischen den Pfeilen wurde ausgewertet und in die Konzentrations-Aktivierungsbeziehung für cAMP-vermittelte Stromantwort gesetzt (B). Der Graph wurde durch Fitten der Hill-Gleichung ermittelt. C) Box-Plot der EC_{50} -Werte für die cAMP-Derivate **L3**, **L5**, **L7**, **L8** und **L10**. Die EC_{50} -Werte waren nicht signifikant kleiner zu **1_A**. Nur **L3_A** und **L8_A** sind signifikant größer (Asterisks; $p < 0.01$). A-C) Modifiziert nach Otte et al., 2018. D) Effekt von **L12_A** und **L13_A** bei 5 µM. **L12_A** zeigt nur eine schwache Aktivierung; **L13_A** zeigt eine starke Aktivierung vergleichbar mit einer cAMP-Antwort. E) Konzentrations-Bindungsbeziehung bei -30 und -130 mV für **F8_A** bzw. **F2_A**. Die Graphen wurden durch Gleichung 4 ermittelt. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

Tabelle 6. Nennungen der Spannung, BC_{50} , Hill-Werte für die in Abb. 32 E abgebildeten Liganden.

In der Arbeit von Lelle und Kollegen (2019) wurde ein Teil der Liganden (**1_A**, **2_A**, **3_A** und **4_A**) ebenfalls an der PKA und der EPAC mit verschiedenen Assays vermessen. Abbildung 33 zeigt eine Zusammenfassung dieser Experimente. Diese beiden Proteinfamilien kommen ebenfalls in Eukaryonten vor und besitzen eine CNBD mit großer Ähnlichkeit der CNG- und HCN-Kanälen (Kannan et al. 2007). Der Versuchsteil um die olfaktorischen CNG-Kanäle ist aus dem KAPITEL 5.2 bekannt und zeigt noch einmal den positiven Effekt der Substitution des Stickstoffatoms durch ein Kohlenstoffatom in Position 7 (**2_A**). Eine Bromierung an Position 8 zeigte eine Verbesserung (**3_A**, **4_A**) im Vergleich zum endogenen Liganden, zu **2_A** jedoch nicht. Ein etwas anderes Bild zeigte sich jedoch bei den anderen Proteinen. Die qualitative, relative Affinität ist für die Derivate innerhalb der Proteinfamilien gleich, jedoch

verschieben sich die Absolutwerte. **2_A** ist bei den PKA-Enzymen und EPAC nicht mehr am affinsten. Auch hier wurden die Liganden am HCN2-Kanal getestet und zeigten ebenfalls einen agonistischen Effekt (vgl. Lelle et al. 2019).

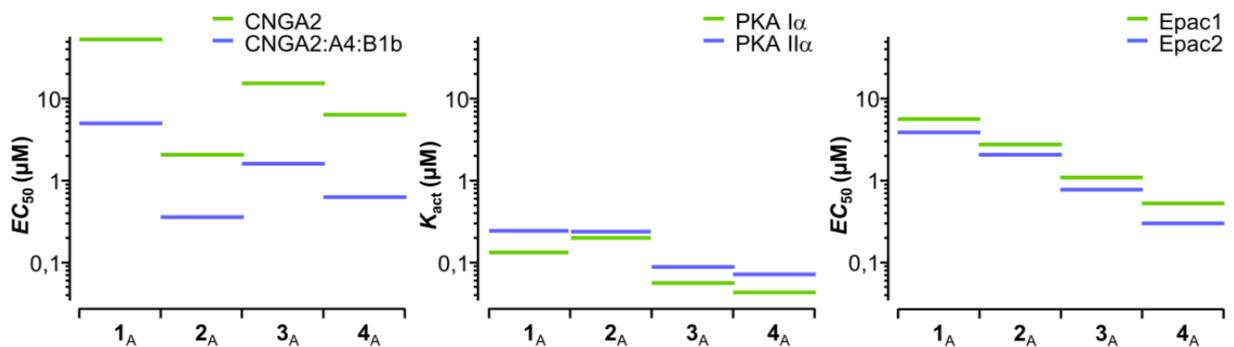


Abbildung 33. Zusammenfassung der Effekte von CNBD-enthaltenen Proteinen. Testung von zyklischen Nucleotiden und deren 8-Br-Derivaten an CNG Kanälen, PKA und Epac Proteinen. Darstellung der EC₅₀- und K_{act}-Werte. Modifiziert nach Lelle et al., 2019.

6.6 CN und CNBD

6.6.1 Affinität der Liganden

Im KAPITEL 5.1 NATIVE LIGANDEN DER OLFAKTORISCHEN CNG IONENKANÄLE wurde gezeigt, dass cGMP am Homotetramer eine um die 30-fach höhere scheinbare Affinität als cAMP aufweist. Um dies zu verstehen, muss ein tieferer Einblick in die Struktur der CNBD vollzogen werden (Vgl. Abb. 5, 6, 30). Bisher sind keine kristallographischen Strukturen eines gebundenen Liganden am CNGA2 publiziert, sodass Rückschlüsse durch andere Ionenkanäle gezogen werden müssen. Durch Mutationen am HCN2- (Zhou et Siegelbaum 2007) und am CNGA1-Kanal (Varnum et al. 1995) wurde beobachtet, dass eine Aminosäure der C-Helix einen entscheidenden Einfluss auf die Affinität der zyklischen Nucleotide besitzt (Goulding et al. 1994). Diese Aminosäure in der CNGA1-Untereinheit ist eine polare Asparaginsäure (604). In der CNGA2-Untereinheit (Vgl. Abb. 6 - *Alignment*) ist es vergleichbar mit der Glutaminsäure (583) und ist ursächlich für die erhöhte Affinität für cGMP-Derivate. Der Grund für diese Präferenz ist noch nicht eindeutig geklärt, aber die Gruppe um Varnum (1995) gibt eine mögliche Hypothese. Dabei soll die protonenreiche Guanidin-Struktur (N1 + Amin am C2) des cGMP mit der negativen Ladung der Carboxylgruppe der sauren Aminosäure Wasserstoffbrücken eingehen. Dabei würde das cGMP in einer *anti*-Konfiguration vorliegen. Das cAMP besitzt kein Amin an Position 2, jedoch aber an Position 6, welches aber aufgrund der erhöhten Distanz nicht als zusätzlicher Protonendonor dient und somit die Konfiguration nicht zusätzlich stabilisiert.

An dieser gleichen Stelle in der CNBD besitzt der HCN2-Kanal an Position 636 ein ungeladenes Isoleucin und besitzt eine höhere Affinität für cAMP. Diese Aminosäureposition ist vergleichbar mit dem unpolaren Methionin (475) der CNGA4-Untereinheit und mit dem neutralen Asparagin (702) der CNGB1b-Untereinheit. Dies korreliert mit der höheren Affinität des olfaktorischen Heterotetramers für cAMP im Vergleich zum Homotetramer und dient im physiologischen System der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) zur Reduktion der notwendigen cAMP-Konzentration. Somit lassen sich diese Erkenntnisse auf die olfaktorischen Ionenkanäle übertragen und dienen als Erklärung für die Unterschiede der endogenen Liganden.

6.6.2 Konformation der Liganden

Durch die Publikationen von Zagotta (2003) und Li (2017) sowie Lee und MacKinnon (2017) gab es viele Einblicke in den strukturellen Aufbau der Ionenkanäle und der CNBD mit endogenen Liganden. Weiterführend wurden die Konformationen von verschiedenen Liganden in der CNBD strukturell aufgelöst (Moller et al. 2014, Ng et al. 2016) und geben Auskunft über die Protein-Liganden-Wechselwirkungen (KAPITEL 2.3). Bemerkenswert sind einige hochkonservierte Wechselwirkungen über weitere CNBD-enthaltende Proteine hinweg (Berman et al. 2005, Kannan et al. 2007). In Zusammenarbeit mit der AG Prof. Gohlke (Düsseldorf) konnte erstmals ein Homologie-Modell des CNGA2 generiert werden und Rückschlüsse auf mögliche Wechselwirkungen gewonnen werden.

Das cGMP wurde in einer *syn*-Konfiguration sowohl im TAX4-, als auch im HCN-Kanal aufgelöst, wobei die *syn*-Konformation durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen Threonin und Aminogruppe am Purinring stabilisiert ist (Wei et al. 1998, Zagotta et al. 2003, Li et al. 2017). Diese Interaktion wurde ebenfalls durch das Molekulare Docking (KAPITEL 5.6) am Homologie Modell an der CNGA2-Untereinheit beobachtet. Dies ist sehr spezifisch für cGMP-regulierte Proteine (Weber et al. 1989, Kumar et Weber 1992).

Bei der cAMP-Bindung ist bisher nur die *anti*-Konfiguration im HCN2-Kanal bekannt (Zagotta et al. 2003), denn für die CNG-Kanäle oder dem verwandten TAX4-Kanal gibt es bisher noch keine Erkenntnisse über die Bindungskonfiguration. Bei der *anti*-Konfiguration des cAMPs im HCN ist die Purinbase der Ribose abgewandt und wird durch drei Aminosäuren in der C-Helix stabilisiert (Arg, Iso, Lys) (Zhou et Siegelbaum 2007). Weitere Beispiele wie das katabolisch aktivierte Protein (CAP) (Weber et al.

1987) oder der *Sp/H*-Kanal weisen ebenfalls *anti*-Konfiguration des cAMP auf. Bisher gibt es nur Vorhersagen (Scott et al. 1996) oder durch Molekulares Docking computer-gestützte Annahmen der *anti*-Konfiguration an den CNG-Kanälen (KAPITEL 5.6). Jedoch bedarf es hier noch weiterer Untersuchungen bis hin zu einer kristall- oder kryoelektronenmikroskopisch aufgelösten Struktur. Denn im Gegensatz zu den zuvor genannten Proteinen, bindet das cAMP in der PKA in der *syn*-Konformation (Su et al. 1995).

Der neue Ligand **L5_G** zeigt ebenfalls verschiedene Konformationen (Abb. 30F). Die Zuordnung der *anti*- oder *syn*-Struktur ist computertechnisch nicht eindeutig und beweist, dass die Bindetasche in der Region sehr flexibel ist sowie, dass das cNMP mühelos drehbar ist. Die Energiebarrieren unterscheiden sich in schwachem Ausmaß (Scott et al. 1996). Jedoch gibt es oft durch bestimmte Wechselwirkungen oder Abstoßungen präferierte Bindeposen. Dabei spielen die Substitutionsstelle am Liganden und der chemische Substituent eine entscheidende Rolle. Dies ist nachfolgend mit Punktmutationen der Ionenkanalsequenzen zu verifizieren.

Mit der Arbeitsgruppe aus Düsseldorf (AG Prof. Gohlke) konnte nachgewiesen werden, dass die 6-Position am HCN2-Kanal die *anti*-Konformation und die 8-Position die *syn*-Konformation am olfaktorischen CNG-Kanal und am HCN2-Kanal bevorzugt. Hierbei kann das 6- (**7_A**) und das 8-Phenylderivat (**L13_{A/G}**) verglichen werden. Dies ist unabhängig vom cNMP, denn **L13_A** zeigen ebenfalls wie **L13_G** in *syn*-Richtung. Beiden Substitutionsstellen gemein ist ebenfalls die Orientierung des Linkers in Richtung C-Terminus des Proteins.

Dementgegen wurde beim Docking mit aliphatischen Linkerderivaten und fluoreszierenden Liganden die *anti*-Konformation als günstigste Pose identifiziert. Aufgrund der großen Flexibilität der aliphatischen Linker (**L2** - **L7_{A/G}**) kann somit, vermutlich durch sterische Limitierungen, die energieungünstigere Form bevorzugt werden. In der Publikation von 2018 (Otte et al.) wurde bereits eine *anti*-Konformation von **L4_A** dargestellt und der Linker schlängelte sich in die Richtung des C-Terminus des Proteins zum vermeintlichen Ausgang. Die Abbildung 30H bestätigt ebenfalls die Annahme, dass das cNMP in *anti*-Konformation vorkommt, der Linker Richtung C-terminalen Ende gewandt ist und den Farbstoff somit weit von der Bindestelle außerhalb des Proteins führt. Zusammenfassend veranschaulichte das Molekulare Docking wichtige Erkenntnisse über die Eigenschaften der Liganden in der Bindetasche und mögliche Interaktionen. Damit können nun neue Thesen und Liganden entwickelt werden, welche die *anti*-Konformation weiter fördern, um den

Farbstoff weit von der CNBD zu schieben und zusätzliche Wechselwirkungen zu generieren. Zum Beispiel können substituierte Halogenatome an den hydrophoben Alkylinkerketten bzw. an der Purinbase weitere Verbesserungen zeigen. Zudem sollten die Linkerketten mit Heteroatomen (**L8** - **L11_{A/G}**) getestet werden, da in der *anti*-Konformation zusätzliche Interaktionen gebildet werden, die in der *syn*-Konformation nicht vorkamen. Außerdem stützt sich diese Annahme auf die Beobachtung, dass die Amid-Bindung zwischen Linkerkette und Farbstoff eine Wechselwirkung mit dem Protein eingeht. Eine ähnliche Amid-Bindung besteht bereits mit dem glycinähnlichem Linker (**L10** - **L11_{A/G}**).

Zu beachten ist, dass die 6-Position (**7_A**, siehe oben) zwar in *anti*-Konformation vorkommt, aber der Linker in Richtung C-Terminus zeigt und dadurch für eine Kopplung mit Farbstoff ebenfalls in Betracht kommt. Der Weg aus dem Protein würde dem der 8-Position mit Linkerkette und Farbstoff ähneln, wäre aber länger. **L12_G** zeigte in den Dockingversuchen mit CNGA2-CNBD keine spezifischen Interaktionen (Vgl. Leypold et al. 2019, Kation- π -Interaktionen). Jedoch könnte eine geschickte Kombination aus den Substitutionen an Position 6 und 8 den Liganden weiter optimieren. Denn die 6-Phenylsubstitution würde das CN in anti-Konfiguration in der CNBD fixieren und an der anderen Substitutionsstelle kann mit einer aliphatischen Linkerkette der Farbstoff gekoppelt werden. Eine Möglichkeit, um diesen zusätzlichen Effekt der zwei Substitutionen auf das cGMP zu transferieren, wäre die Substitution der Aminogruppe am C2-Atom mit einem Phenylring und in 8-Position eine Linkerkette. Eventuell wären auch die Strukturen 8-CPT-6AHA-cAMP oder 8-CPT-2AHA-cGMP möglich. Denn 8-CPT würde die Linkerkette (6 oder 2 AHA) dann C-terminal lenken und die Konfiguration wäre mit *syn* dem cGMP nachempfunden.

Weitere Affinitätserhöhungen könnten durch gezielte Mutationen am Protein erzielt werden. Aufgrund der publizierten *anti*-Konformation sollte über eine Mutation der CNGA2-Untereinheit an der Glutaminsäure (583) nachgedacht werden, um somit die Affinität für die cAMP-Derivate noch weiter zu steigern. Ferner sollte die CNBD so konfiguriert werden, dass die *anti*-Konformation für cGMP präferiert wird, um so die fluoreszierenden Liganden, welche in der *anti*-Konfiguration vorkommen, affiner für die CNBD zu gestalten. Dies würde durch weitere Protein-Ligandenwechselwirkungen im Bereich zwischen den β 6- und β 7-Faltblättern oder der α C-Helix eine verstärkte Bindung hervorrufen (Ng et al. 2016).

6.7 Ausblick

Mit der Synthese einer großen Anzahl neuer Liganden wurde ein besseres Verständnis des Liganden-Bindungsprozesses und der CNBD des Ionenkanals erlangt. Außerdem wurden optimale fluoreszierende Liganden mit einer erhöhten Affinität gefunden. Dies hilft nun weitere Fragestellungen in zukünftigen Projekten zu bearbeiten.

Zum einen können die neuen Liganden ebenfalls an den anderen CNG-Kanälen, wie dem retinalen *rod* (Stäbchen) und dem retinalen *cone* (Zapfen) CNG-Kanal, getestet werden. Diese Ionenkanäle haben eine geringere Affinität für die endogenen zyklischen Nukleotide. Es ist zu vermuten, dass die Liganden ähnliche Effekte zeigen. Eventuell sind diese neuartigen Verbindungen so affin, dass mit diesen Kanälen ebenfalls cPCF durchgeführt werden kann und Thesen zur Interaktion der Untereinheiten entwickelt werden können. In diesem Zusammenhang werden auch immer selektivere Liganden gesucht, die insbesondere auf eine Ionenkanalart (*rod*, *cone*, olfaktorisch; HCN-Kanäle) oder spezifisch für Proteinfamilien (Proteinkinasen, EPAC, CAP, etc.) einen Einfluss zeigen.

Zum anderen resultiert aus einer verlängerten Verweildauer des Liganden am Ionenkanal eine höhere Affinität. Durch die geringere Konzentration im Hintergrund bei gleichem Bindungsgrad bzw. mehr Photonen bei Bindung kann das Signal-zu-Rauschverhältnis verbessert werden. Im nächsten Schritt müssen mögliche Einzelmolekülmethoden mit der *Patch-clamp*-Technik kombiniert werden. Mögliche Methoden sind in Abbildung 34 mit der konfokalen Detektion an einem Punkt mit hoher Zeitauflösung analog zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) oder der Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) dargestellt. Durch die zwei sehr unterschiedlichen Ansätze soll mit der vermeintlich besten Methodik die Einzelmolekül- und Einzelkanaluntersuchungen fortgeführt werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollen Modelle erstellt werden, um das Aktivierungsverhalten und die Beeinflussung der Untereinheiten eines Ionenkanals näher zu verstehen.

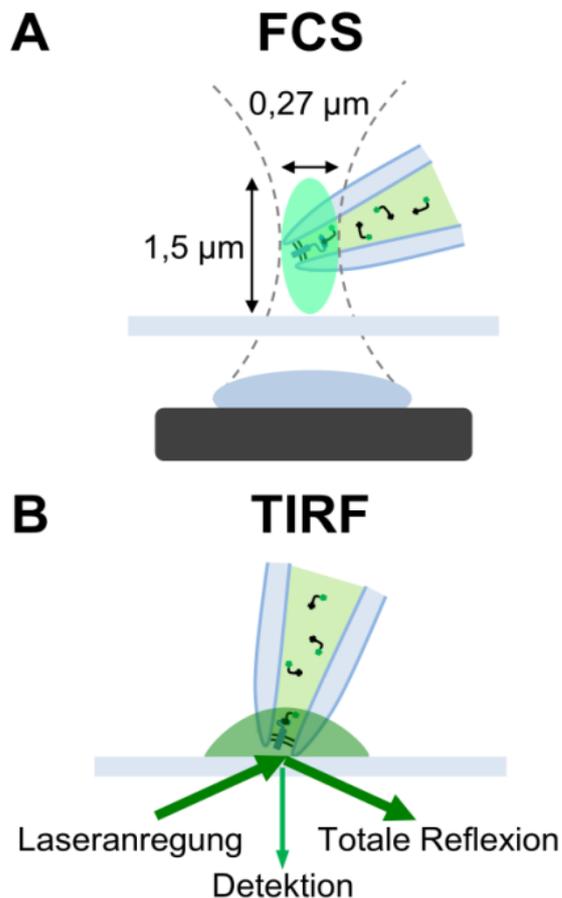


Abbildung 34. Schematische Darstellung der Methoden zur Einzelmolekülmessung. Hierbei sollen einzelne Kanäle bei der Bindung von fluoreszierenden Liganden beobachtet werden. Als nächster Schritt sollen diese neuen Ansätze mit der Elektrophysiologie verknüpft werden und die Aktivierung des einzelnen Ionenkanals nachgewiesen werden. A) Die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) nutzt die konfokale Mikroskopie zur Detektion von diffundierenden, fluoreszierenden Molekülen und ermittelt somit die Diffusionsgeschwindigkeit und die Photonenrate. Türkisfarbene Ellipse stellt das konfokale Volumen dar, welches durch die Pipette noch stärker reduziert wird. B) Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) nutzt die Entstehung eines evaneszenten Feldes (dunkelgrüne Halbellipse) durch die Totalreflexion des Lasers an dielektrischen Grenzflächen. Dabei kommt es zu einem Übergang von einem optisch dichteren (Glas) zu einem optisch dünneren Medium (wässrige Lösung). Nicht maßstabsgetreu.

7. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit sollten die bereits verwendeten fluoreszierenden Liganden (fcGMP, fcAMP) in ihren Eigenschaften optimiert werden. Dafür wurde eine Fülle an neuen Liganden, darunter auch Testmoleküle ohne Farbstoff, synthetisiert und charakterisiert. Der Großteil war vollagonistisch sowie mit erhöhter Affinität für die olfaktorischen CNG-Kanäle und wies verbesserte molekulare Helligkeit auf. Zu Beginn wurden die Substitutionen an der Purinbase und dem Linker kontrolliert, um so die präferierten Verbindungen mit Farbstoffen zu koppeln.

Die Arbeit hilft für nachfolgende Experimente einen passenden fluoreszierenden Liganden zu finden. Zu nennen sind hier **F3_{AG}** und **F8_{AG}** als *potentielle* fluoreszenzmarkierte Agonisten, mit der höchsten scheinbaren Affinität (Homotetramer **F3_G** – 0,09 µM) sowie **F8_G** mit der doppelten Helligkeit am Patch.

Zudem dient die Arbeit dem besseren Verständnis der Ligandenbindung und Ionenkanalaktivierung. Diese dynamischen Prozesse sollen nun auf Einzelmolekülniveau heruntergebrochen werden, um so ein genaueres Bild über die Kooperativität der Untereinheiten zu skizzieren. Für zukünftige Einzelmolekülmessungen werden

besondere Anforderungen an die Liganden gestellt. Darunter zählen die hohe Affinität zur Bindedomäne (1) sowie eine volle Effizienz (2), um die Ionenkanäle bereits im unteren nanomolaren Konzentrationsbereich zu aktivieren (van Oijen 2011). Zudem muss der Farbstoff für die Versuchsbedingungen geeignet sein (3), wie zum Beispiel eine erhöhte Helligkeit und Stabilität. Dies wurde in zahlreichen Experimenten bestätigt.

Weitere Vorteile von diesen markierten Molekülen sind die Reduktion von gesundheitsgefährdenden radioliganden-basierten Testmethoden. Zudem sind Fluoreszenzliganden kostengünstiger als iodidierte oder tritiierte Radioliganden und sind lagerfähig und zerfallen nicht. Ein fluoreszierender Ligand besitzt ein besseres Auflösungsvermögen und kann ebenfalls für bildgebende Verfahren und kompetitive Assays mit nicht markierten Liganden genutzt werden. Beispiele für die praktische Anwendung sind FRET- oder Polarisationsmessungen. Nachteilig sind die Größe und die veränderten Eigenschaften des Moleküls. Jedoch konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Funktion der olfaktorischen CNG-Kanäle nicht beeinträchtigt wird und die Liganden mit einer erhöhten Affinität binden.

Daran anschließend lassen sich diese neuen Verbindungen für weitere Proteine mit einer CNBD, wie Proteinkinase, EPAC oder Phosphodiesterasen, verwenden, um so einen Vergleich der Bindungs- und Aktivierungsprozesse zu erhalten oder gewisse Spezifitäten zu unterscheiden. Mit der FRET-Technik oder Detektion in Zeitsubkompartimenten können selektiv die Interaktionen einzelner Proteinklassen in zellulärer Umgebung beobachtet werden.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Alfonso, A., M. Estévez, M. C. Louzao, M. R. Vieytes and L. M. Botana (1995). "Determination of phosphodiesterase activity in rat mast cells using the fluorescent cAMP analogue anthraniloyl cAMP." Cellular Signalling **7**(5): 513-518.
- Altenhofen, W., J. Ludwig, E. Eismann, W. Kraus, W. Bönigk and U. B. Kaupp (1991). "Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium." Proceedings of the National Academy of Sciences **88**(21): 9868-9872.
- Anderson, M. J. and M. W. Cohen (1974). "Fluorescent staining of acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscle." The Journal of Physiology **237**(2): 385-400.
- Bagshaw, C. R. (2001). "ATP analogues at a glance." Journal of Cell Science **114**(3): 459-460.
- Beavo, J. A. and L. L. Brunton (2002). "Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 710-718.
- Berman, H. M., L. F. Ten Eyck, D. S. Goodsell, N. M. Haste, A. Kornev and S. S. Taylor (2005). "The cAMP binding domain: An ancient signaling module." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(1): 45-50.
- Bhargava, Y., A. Nicke and J. Rettinger (2013). "Validation of Alexa-647-ATP as a powerful tool to study P2X receptor ligand binding and desensitization." Biochemical and Biophysical Research Communications **438**(2): 295-300.
- Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli and T. Schwede (2014). "SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information." Nucleic Acids Research **42**(W1): W252-W258.
- Biel, M. and S. Michalakis (2007). "Function and Dysfunction of CNG Channels: Insights from Channelopathies and Mouse Models." Molecular Neurobiology **35**(3): 266-277.
- Biskup, C., J. Kusch, E. Schulz, V. Nache, F. Schwede, F. Lehmann, V. Hagen and K. Benndorf (2007). "Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels." Nature **446**(7134): 440-443.
- Blackburn, G. M., M. J. Gait, D. Loakes and D. M. Williams (2006). Chapter 2 DNA and RNA Structure. Nucleic Acids in Chemistry and Biology (3), The Royal Society of Chemistry: 13-76.
- Bois, P., B. Renaudon, M. Baruscotti, J. Lenfant and D. DiFrancesco (1997). "Activation of f-channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes." Journal of Physiology-London **501**(3): 565-571.
- Bradley, J., J. Reisert and S. Frings (2005). "Regulation of cyclic nucleotide-gated channels." Current Opinion in Neurobiology **15**(3): 343-349.

- Brown, R. L., R. J. Bert, F. E. Evans and J. W. Karpén (1993). "Activation of retinal rod cGMP-gated channels: What makes for an effective 8-substituted derivative of cGMP?" Biochemistry **32**(38): 10089-10095.
- Buck, L. and R. Axel (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition." Cell **65**(1): 175-187.
- Builder, S. E., J. A. Beavo and E. G. Krebs (1980). "Stoichiometry of Camp and 1,N6-Etheno-Camp Binding to Protein-Kinase." Journal of Biological Chemistry **255**(6): 2350-2354.
- Bönigk, W., J. Bradley, F. Müller, F. Sesti, I. Boekhoff, G. V. Ronnett, U. B. Kaupp and S. Frings (1999). "The Native Rat Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Channel Is Composed of Three Distinct Subunits." The Journal of Neuroscience **19**(13): 5332-5347.
- Caretta, A., A. Cavaggioni and R. T. Sorbi (1985). "Binding stoichiometry of a fluorescent cGMP analogue to membranes of retinal rod outer segments." European Journal of Biochemistry **153**(1): 49-53.
- Castillo, J. D. and B. Katz (1957). "Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives." Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences **146**(924): 369-381.
- Chattopadhyay, A. (1990). "Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes." Chemistry and Physics of Lipids **53**(1): 1-15.
- Chen, H., T. Tsalkova, F. C. Mei, Y. Hu, X. Cheng and J. Zhou (2012). "5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP." Bioorg Med Chem Lett **22**(12): 4038-4043.
- Chen, V. B., W. B. Arendall, III, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson and D. C. Richardson (2010). "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography." Acta Crystallographica Section D **66**(1): 12-21.
- Cheng, K.-T., F. L. Chan, Y. Huang, W.-Y. Chan and X. Yao (2003). "Expression of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channel (CNGA2) in vascular tissues." Histochemistry and Cell Biology **120**(6): 475-481.
- Christensen, A. E., F. Selheim, J. de Rooij, S. Dremier, F. Schwede, K. K. Dao, A. Martinez, C. Maenhaut, J. L. Bos, H.-G. Genieser and S. O. Døskeland (2003). "cAMP Analog Mapping of Epac1 and cAMP Kinase: DISCRIMINATING ANALOGS DEMONSTRATE THAT Epac AND cAMP KINASE ACT SYNERGISTICALLY TO PROMOTE PC-12 CELL NEURITE EXTENSION." Journal of Biological Chemistry **278**(37): 35394-35402.
- Clayton, G. M., W. R. Silverman, L. Heginbotham and J. H. Morais-Cabral (2004). "Structural Basis of Ligand Activation in a Cyclic Nucleotide Regulated Potassium Channel." Cell **119**(5): 615-627.

- Cobbs, W. H., A. E. Barkdoll III and E. N. Pugh Jr (1985). "Cyclic GMP increases photocurrent and light sensitivity of retinal cones." Nature **317**: 64.
- Colquhoun, D. (1998). "Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors." British journal of pharmacology **125**(5): 924-947.
- Colquhoun, D. (2006). "Agonist-activated ion channels." British journal of pharmacology **147 Suppl 1**(Suppl 1): S17-S26.
- Contreras, J. E., D. Srikumar and M. Holmgren (2008). "Gating at the selectivity filter in cyclic nucleotide-gated channels." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(9): 3310-3314.
- Cooper, M., A. Ebner, M. Briggs, M. Burrows, N. Gardner, R. Richardson and R. West (2004). "Cy3B™: Improving the Performance of Cyanine Dyes." Journal of Fluorescence **14**(2): 145-150.
- Corey, D. and C. F. Stevens (1983). Science and Technology of Patch-Recording Electrodes. Single-Channel Recording. B. Sakmann and E. Neher, Plenum Press: 53-68.
- Craven, K. B. and W. N. Zagotta (2006). "CNG and HCN channels: two peas, one pod." Annu Rev Physiol **68**: 375-401.
- Cremonesi, C. R. (2003). [5] Fluorescent nucleotides: Synthesis and characterization. Methods in Enzymology, Academic Press. **360**: 128-177.
- Dao, K. K., K. Teigen, R. Kopperud, E. Hodneland, F. Schwede, A. E. Christensen, A. Martinez and S. O. Døskeland (2006). "Epac1 and cAMP-dependent Protein Kinase Holoenzyme Have Similar cAMP Affinity, but Their cAMP Domains Have Distinct Structural Features and Cyclic Nucleotide Recognition." Journal of Biological Chemistry **281**(30): 21500-21511.
- de Rooij, J., F. J. T. Zwartkruis, M. H. G. Verheijen, R. H. Cool, S. M. B. Nijman, A. Wittinghofer and J. L. Bos (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." Nature **396**: 474.
- Doyle, D. A., J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon (1998). "The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity." Science **280**(5360): 69-77.
- Dumont, J. N. (1972). "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals." Journal of Morphology **136**(2): 153-179.
- Ehrlich, P. (1913). "Address in Pathology ON CHEMOTHERAPEUTICS: SCIENTIFIC PRINCIPLES, METHODS, AND RESULTS." The Lancet **182**(4694): 445-451.
- Emmer, M., B. deCrombrughe, I. Pastan and R. Perlman (1970). "Cyclic AMP receptor protein of *E. coli*: its role in the synthesis of inducible enzymes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **66**(2): 480-487.

- Enserink, J. M., A. E. Christensen, J. de Rooij, M. van Triest, F. Schwede, H. G. Genieser, S. O. Doskeland, J. L. Blank and J. L. Bos (2002). "A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK." Nature Cell Biology **4**(11): 901-906.
- Fesenko, E. E., S. S. Kolesnikov and A. L. Lyubarsky (1985). "Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment." Nature **313**: 310.
- Fischer, E. (1894). "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme." Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **27**(3): 2985-2993.
- Flynn, G. E., K. D. Black, L. D. Islas, B. Sankaran and W. N. Zagotta (2007). "Structure and Rearrangements in the Carboxy-Terminal Region of SpIH Channels." Structure **15**(6): 671-682.
- Francis, S. H. and J. D. Corbin (1999). "Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases: Intracellular Receptors for cAMP and cGMP Action." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences **36**(4): 275-328.
- Frings, S., D. Reuter and S. J. Kleene (2000). "Neuronal Ca²⁺-activated Cl⁻ channels — homing in on an elusive channel species." Progress in Neurobiology **60**(3): 247-289.
- Fujimoto, K., Y. Yoshimura, M. Ihara, K. Matsuda, Y. Takeuchi, T. Aoki and T. Ide (2008). "Cy3-3-acyleholine: A fluorescent analogue of acetylcholine for single molecule detection." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **18**(3): 1106-1109.
- Goldin, A. L. (1992). [15] Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. Methods in Enzymology, Academic Press. **207**: 266-279.
- Goldschen-Ohm, M. P., V. A. Klenchin, D. S. White, J. B. Cowgill, Q. Cui, R. H. Goldsmith and B. Chanda (2016). "Structure and dynamics underlying elementary ligand binding events in human pacemaking channels." eLife **5**: e20797.
- Gordon, S. E. and W. N. Zagotta (1995). "A histidine residue associated with the gate of the cyclic nucleotide-activated channels in rod photoreceptors." Neuron **14**(1): 177-183.
- Goulding, E. H., G. R. Tibbs and S. A. Siegelbaum (1994). "Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation." Nature **372**: 369.
- Grandl, J., E. Sakr, F. Kotzyba-Hibert, F. Krieger, S. Bertrand, D. Bertrand, H. Vogel, M. Goeldner and R. Hovius (2007). "Fluorescent Epibatidine Agonists for Neuronal and Muscle-Type Nicotinic Acetylcholine Receptors." Angewandte Chemie International Edition **46**(19): 3505-3508.
- Hagen, V., J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter and U. B. Kaupp (2001). "Highly Efficient and Ultrafast Phototriggered cAMP and cGMP by Using Long-Wavelength UV/Vis-Activation This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, the European Union, and the Fonds der Chemischen Industrie. We thank B. Dekowski and J. Lossmann for technical assistance and S. Hecht for proof reading." Angew Chem Int Ed Engl **40**(6): 1045-1048.

- Hagen, V., B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geissler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf and B. Wiesner (2005). "Coumarinylmethyl esters for ultrafast release of high concentrations of cyclic nucleotides upon one- and two-photon photolysis." Angew Chem Int Ed Engl **44**(48): 7887-7891.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflügers Archiv **391**(2): 85-100.
- Haynes, L. and K.-W. Yau (1985). "Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones." Nature **317**: 61.
- Heidmann, T. and J.-P. Changeux (1979). "Fast Kinetic Studies on the Allosteric Interactions between Acetylcholine Receptor and Local Anesthetic Binding Sites." European Journal of Biochemistry **94**(1): 281-296.
- Hill, A. V. (1910). "The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves." The Journal of Physiology **40**: i--vii.
- Hille, B. (2001). Ionic Channels of Excitable Membranes, Sinauer.
- Hiratsuka, T. (1982). "New fluorescent analogs of cAMP and cGMP available as substrates for cyclic nucleotide phosphodiesterase." Journal of Biological Chemistry **257**(22): 13354-13358.
- Hofmann, F., M. Biel and U. B. Kaupp (2005). "International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Cyclic Nucleotide-Regulated Channels." Pharmacological Reviews **57**(4): 455-462.
- Hummert, S., S. Thon, T. Eick, R. Schmauder, E. Schulz and K. Benndorf (2018). "Activation gating in HCN2 channels." PLoS Comput Biol **14**(3): e1006045.
- Jack, T., J. Simonin, M.-D. Ruepp, A. J. Thompson, J. Gertsch and M. Lochner (2015). "Characterizing new fluorescent tools for studying 5-HT₃ receptor pharmacology." Neuropharmacology **90**: 63-73.
- Jonas, P. (1995). Fast Application of Agonists to Isolated Membrane Patches. Single-Channel Recording. B. Sakmann and E. Neher, Springer US. **2nd edition**: 231-243.
- Kanaoka, Y. (1977). "Organische Fluoreszenzreagentien für die Untersuchung von Enzymen und Proteinen." Angewandte Chemie **89**(3): 142-152.
- Kannan, N., J. Wu, G. S. Anand, S. Yooseph, A. F. Neuwald, J. C. Venter and S. S. Taylor (2007). "Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module." Genome Biology **8**(12).
- Karpen, J. W., A. L. Zimmerman, L. Stryer and D. A. Baylor (1988). "Gating kinetics of the cyclic-GMP-activated channel of retinal rods: flash photolysis and voltage-jump studies." Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(4): 1287-1291.
- Kasuya, G., T. Yamaura, X.-B. Ma, R. Nakamura, M. Takemoto, H. Nagumo, E. Tanaka, N. Dohmae, T. Nakane, Y. Yu, R. Ishitani, O. Matsuzaki, M. Hattori and O. Nureki (2017). "Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel." Nature Communications **8**(1): 876.

Kaupp, U. B., T. Niidome, T. Tanabe, S. Terada, W. Bonigk, W. Stuhmer, N. J. Cook, K. Kangawa, H. Matsuo, T. Hirose and et al. (1989). "Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel." Nature **342**(6251): 762-766.

Kaupp, U. B. and R. Seifert (2002). "Cyclic nucleotide-gated ion channels." Physiol Rev **82**(3): 769-824.

Koch, K. W. and U. B. Kaupp (1985). "Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membranes of bovine rods by a cooperative mechanism." Journal of Biological Chemistry **260**(11): 6788-6800.

Koshland, D. E. (1958). "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **44**(2): 98-104.

Kraemer, A., H. R. Rehmman, R. H. Cool, C. Theiss, J. de Rooij, J. L. Bos and A. Wittinghofer (2001). "Dynamic interaction of cAMP with the rap guanine-nucleotide exchange factor epac111 Edited by A. R. Fersht." Journal of Molecular Biology **306**(5): 1167-1177.

Kramer, R. and G. Tibbs (1996). "Antagonists of cyclic nucleotide-gated channels and molecular mapping of their site of action." The Journal of Neuroscience **16**(4): 1285-1293.

Kumar, V. D. and I. T. Weber (1992). "Molecular model of the cyclic GMP-binding domain of the cyclic GMP-gated ion channel." Biochemistry **31**(19): 4643-4649.

Kusch, J., C. Biskup, S. Thon, E. Schulz, V. Nache, T. Zimmer, F. Schwede and K. Benndorf (2010). "Interdependence of Receptor Activation and Ligand Binding in HCN2 Pacemaker Channels." Neuron **67**(1): 75-85.

Kusch, J., S. Thon, E. Schulz, C. Biskup, V. Nache, T. Zimmer, R. Seifert, F. Schwede and K. Benndorf (2011). "How subunits cooperate in cAMP-induced activation of homotetrameric HCN2 channels." Nature Chemical Biology **8**: 162.

Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer US. **3rd edition**.

Lee, C. H. and R. MacKinnon (2017). "Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel." Cell **168**(1-2): 111-120 e111.

Lelle, M., M. Otte, S. Thon, D. Bertinetti, F. W. Herberg and K. Benndorf (2019). "Chemical synthesis and biological activity of novel brominated 7-deazaadenosine-3',5'-cyclic monophosphate derivatives." Bioorganic & Medicinal Chemistry **27**(8): 1704-1713.

Leybold, T., M. Bonus, F. Spiegelhalter, F. Schwede, T. Schwabe, H. Gohlke and J. Kusch (2019). "N⁶-modified cAMP derivatives that activate protein kinase A also act as full agonists of murine HCN2 channels." J Biol Chem.

Li, J. and H. A. Lester (1999). "Single-Channel Kinetics of the Rat Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Channel Expressed in *Xenopus* Oocytes." Molecular Pharmacology **55**(5): 883-893.

- Li, M., X. Zhou, S. Wang, I. Michailidis, Y. Gong, D. Su, H. Li, X. Li and J. Yang (2017). "Structure of a eukaryotic cyclic-nucleotide-gated channel." Nature **542**(7639): 60-65.
- Liu, D. T., G. R. Tibbs, P. Paoletti and S. A. Siegelbaum (1998). "Constraining Ligand-Binding Site Stoichiometry Suggests that a Cyclic Nucleotide–Gated Channel Is Composed of Two Functional Dimers." Neuron **21**(1): 235-248.
- Lolicato, M., M. Nardini, S. Gazzarrini, S. Möller, D. Bertinetti, F. W. Herberg, M. Bolognesi, H. Martin, M. Fasolini, J. A. Bertrand, C. Arrigoni, G. Thiel and A. Moroni (2011). "Tetramerization Dynamics of C-terminal Domain Underlies Isoform-specific cAMP Gating in Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels." Journal of Biological Chemistry **286**(52): 44811-44820.
- Long, S. B., E. B. Campbell and R. MacKinnon (2005). "Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling." Science **309**(5736): 903-908.
- Long, S. B., X. Tao, E. B. Campbell and R. MacKinnon (2007). "Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment." Nature **450**: 376.
- Macri, V., D. Angoli and E. A. Accili (2012). "Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation." Scientific Reports **2**: 894.
- Marchesi, A., X. Gao, R. Adaixo, J. Rheinberger, H. Stahlberg, C. Nimigean and S. Scheuring (2018). "An iris diaphragm mechanism to gate a cyclic nucleotide-gated ion channel." Nature Communications **9**(1): 3978.
- Matulef, K., G. E. Flynn and W. N. Zagotta (1999). "Molecular Rearrangements in the Ligand-Binding Domain of Cyclic Nucleotide–Gated Channels." Neuron **24**(2): 443-452.
- Mazzolini, M., M. Arcangeletti, A. Marchesi, L. M. R. Napolitano, D. Grosa, S. Maity, C. Anselmi and V. Torre (2018). "The gating mechanism in cyclic nucleotide-gated ion channels." Scientific Reports **8**(1): 45.
- McKay, D. B. and T. A. Steitz (1981). "Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA." Nature **290**: 744.
- Minsky, M. (1957). MICROSCOPY APPARATUS. **US 3013467 A**.
- Moll, D., A. Prinz, C. M. Brendel, M. Berrera, K. Guske, M. Zaccolo, H. G. Genieser and F. W. Herberg (2008). "Biochemical characterization and cellular imaging of a novel, membrane permeable fluorescent cAMP analog." BMC Biochem **9**: 18.
- Moll, D., A. Prinz, F. Gesellchen, S. Drewianka, B. Zimmermann and F. W. Herberg (2006). "Biomolecular interaction analysis in functional proteomics." Journal of Neural Transmission **113**(8): 1015-1032.
- Moller, S., A. Alfieri, D. Bertinetti, M. Aquila, F. Schwede, M. Lolicato, H. Rehmann, A. Moroni and F. W. Herberg (2014). "Cyclic nucleotide mapping of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels." ACS Chem Biol **9**(5): 1128-1137.

- Mucignat-Caretta, C. and A. Caretta (1997). "Binding of two fluorescent cAMP analogues to type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases." Biochim Biophys Acta **1357**(1): 81-90.
- Mujumdar, R. B., L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis and A. S. Waggoner (1993). "Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters." Bioconjugate Chemistry **4**(2): 105-111.
- Nache, V., T. Eick, E. Schulz, R. Schmauder and K. Benndorf (2013). "Hysteresis of ligand binding in CNGA2 ion channels." Nature Communications **4**: 2866.
- Nache, V., E. Schulz, T. Zimmer, J. Kusch, C. Biskup, R. Koopmann, V. Hagen and K. Benndorf (2005). "Activation of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channels is highly cooperative." Journal of Physiology-London **569**(1): 91-102.
- Nache, V., N. Wongsamitkul, J. Kusch, T. Zimmer, F. Schwede and K. Benndorf (2016). "Deciphering the function of the CNGB1b subunit in olfactory CNG channels." Scientific Reports **6**.
- Nakamura, T. and G. H. Gold (1987). "A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia." Nature **325**: 442.
- Ng, L. C. T., I. Putrenko, V. Baronas, F. Van Petegem and E. A. Accili (2016). "Cyclic Purine and Pyrimidine Nucleotides Bind to the HCN2 Ion Channel and Variably Promote C-Terminal Domain Interactions and Opening." Structure **24**(10): 1629-1642.
- Opsahl, L. R. and W. W. Webb (1994). "Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes." Biophysical journal **66**(1): 75-79.
- Otte, M., A. Schweinitz, M. Bonus, U. Enke, C. Schumann, H. Gohlke and K. Benndorf (2018). "Hydrophobic alkyl chains substituted to the 8-position of cyclic nucleotides enhance activation of CNG and HCN channels by an intricate enthalpy - entropy compensation." Scientific Reports **8**(1): 14960.
- Otte, M., A. Schweinitz, M. Lelle, S. Thon, U. Enke, S. Yüksel, R. Schmauder, M. Bonus, H. Gohlke and K. Benndorf (2019). "Novel Fluorescent Cyclic Nucleotide Derivatives to Study CNG and HCN Channel Function." Biophys J **116**(12): 2411-2422.
- Otte, M., A. Schweinitz, M. Lelle, S. Thon, U. Enke, S. Yüksel, R. Schmauder, M. Bonus, H. Gohlke and K. Benndorf (2019). "Novel Fluorescent Cyclic Nucleotide Derivatives to Study CNG and HCN Channel Function." Biophysical Journal **116**(12): 2411-2422.
- Peuker, S., A. Cukkemane, M. Held, F. Noé, U. B. Kaupp and R. Seifert (2013). "Kinetics of ligand-receptor interaction reveals an induced-fit mode of binding in a cyclic nucleotide-activated protein." Biophys J **104**(1): 63-74.
- Pifferi, S., A. Boccaccio and A. Menini (2006). "Cyclic nucleotide-gated ion channels in sensory transduction." FEBS Letters **580**(12): 2853-2859.

- Podda, M. V. and C. Grassi (2014). "New perspectives in cyclic nucleotide-mediated functions in the CNS: the emerging role of cyclic nucleotide-gated (CNG) channels." Pflügers Archiv - European Journal of Physiology **466**(7): 1241-1257.
- Poppe, H., S. D. Rybalkin, H. Rehmann, T. R. Hinds, X.-B. Tang, A. E. Christensen, F. Schwede, H.-G. Genieser, J. L. Bos, S. O. Doskeland, J. A. Beavo and E. Butt (2008). "Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways." Nature Methods **5**: 277.
- Prinz, H. and A. Maelicke (1992). "Ligand binding to the membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata*: a complete mathematical analysis." Biochemistry **31**(29): 6728-6738.
- Puljung, M. C. and W. N. Zagotta (2013). "A Secondary Structural Transition in the C-helix Promotes Gating of Cyclic Nucleotide-regulated Ion Channels." Journal of Biological Chemistry **288**(18): 12944-12956.
- Rademacher, A., S. Märkle and H. Langhals (1982). "Lösliche Perylen-Fluoreszenzfarbstoffe mit hoher Photostabilität." Chemische Berichte **115**(8): 2927-2934.
- Rehmann, H., B. Prakash, E. Wolf, A. Rueppel, J. de Rooij, J. L. Bos and A. Wittinghofer (2003). "Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2." Nat Struct Biol **10**(1): 26-32.
- Rehmann, H., A. Wittinghofer and J. L. Bos (2007). "Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies." Nature Reviews Molecular Cell Biology **8**: 63.
- Roy, B., A. Depaix, C. Périgaud and S. Peyrottes (2016). "Recent Trends in Nucleotide Synthesis." Chemical Reviews **116**(14): 7854-7897.
- Ruepp, M.-D., J. A. Brozik, I. J. P. de Esch, R. W. Farndale, R. D. Murrell-Lagnado and A. J. Thompson (2015). "A fluorescent approach for identifying P2X1 ligands." Neuropharmacology **98**: 13-21.
- Ruiz, M. and J. W. Karpen (1997). "Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states." Nature **389**: 389.
- Sattler, C., R. Schmauder, T. Schwabe, A. Schweinitz, C. Unzeitig, F. Schwede, M. Otte and K. Benndorf (2019). Relating ligand binding to activation gating in P2X2 receptors, *Journal of Neurochemistry*. **eingereicht**.
- Schmauder, R., D. Kosanic, R. Hovius and H. Vogel (2011). "Correlated Optical and Electrical Single-Molecule Measurements Reveal Conformational Diffusion from Ligand Binding to Channel Gating in the Nicotinic Acetylcholine Receptor." ChemBioChem **12**(16): 2431-2434.
- Schwede, F., E. Maronde, H. Genieser and B. Jastorff (2000). "Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs." Pharmacol Ther **87**(2-3): 199-226.

- Schünke, S. and M. Stoldt (2013). Structural snapshot of cyclic nucleotide binding domains from cyclic nucleotide-sensitive ion channels. Biological Chemistry **394**: 1439.
- Scott, S.-P., R. W. Harrison, I. T. Weber and J. C. Tanaka (1996). "Predicted ligand interactions for 3',5'-cyclic nucleotide-gated channel binding sites: comparison of retina and olfactory binding site models." Protein Engineering, Design and Selection **9**(4): 333-344.
- Scott, S.-P., P. W. Shea and S. E. Dryer (2007). "Mapping Ligand Interactions with the Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Modulated (HCN) Ion Channel Binding Domain Using a Soluble Construct." Biochemistry **46**(33): 9417-9431.
- Scott, S.-P. and J. C. Tanaka (1995). "Molecular Interactions of 3',5'-Cyclic Purine Analogs with the Binding Site of Retinal Rod Ion Channels." Biochemistry **34**(7): 2338-2347.
- Siebert, C. D. (2004). "Das Bioisosterie-Konzept: Arzneistoffentwicklung." Chemie in unserer Zeit **38**(5): 320-324.
- Strassmaier, T. and J. W. Karpen (2007). "Novel N7- and N1-Substituted cGMP Derivatives Are Potent Activators of Cyclic Nucleotide-Gated Channels." Journal of Medicinal Chemistry **50**(17): 4186-4194.
- Su, Y., W. R. Dostmann, F. W. Herberg, K. Durick, N. H. Xuong, L. Ten Eyck, S. S. Taylor and K. I. Varughese (1995). "Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains." Science **269**(5225): 807-813.
- Sun, M., K. Müllen and M. Yin (2016). "Water-soluble perylenediimides: design concepts and biological applications." Chemical Society Reviews **45**(6): 1513-1528.
- Tanaka, J. C., J. F. Eccleston and R. E. Furman (1989). "Photoreceptor channel activation by nucleotide derivatives." Biochemistry **28**(7): 2776-2784.
- Taraska, J. W., M. C. Puljung, N. B. Olivier, G. E. Flynn and W. N. Zagotta (2009). "Mapping the structure and conformational movements of proteins with transition metal ion FRET." Nature Methods **6**: 532.
- Taraska, J. W. and W. N. Zagotta (2007). "Structural dynamics in the gating ring of cyclic nucleotide-gated ion channels." Nature Structural & Molecular Biology **14**: 854.
- Thon, S. and K. Benndorf (2014). "Avoiding the formation of vesicles by patch excision from *Xenopus* oocytes." Journal of Neuroscience Methods **225**: 29-31.
- Thon, S., R. Schmauder and K. Benndorf (2013). "Elementary Functional Properties of Single HCN2 Channels." Biophysical Journal **105**(7): 1581-1589.
- Tibbs, G. R., E. H. Goulding and S. A. Siegelbaum (1997). "Allosteric activation and tuning of ligand efficacy in cyclic-nucleotide-gated channels." Nature **386**: 612.
- Tibbs, G. R., D. T. Liu, B. G. Leybold and S. A. Siegelbaum (1998). "A State-independent Interaction between Ligand and a Conserved Arginine Residue in Cyclic

- Nucleotide-gated Channels Reveals a Functional Polarity of the Cyclic Nucleotide Binding Site." Journal of Biological Chemistry **273**(8): 4497-4505.
- Torimura, M., S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa and R. Kurane (2001). "Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base." Anal Sci **17**(1): 155-160.
- Tsou, K. C., K. F. Yip and K. W. Lo (1974). "1,N6-Etheno-2-Aza-Adenosine 3',5'-Monophosphate - New Fluorescent Substrate for Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase." Analytical Biochemistry **60**(1): 163-169.
- Ulens, C. and S. A. Siegelbaum (2003). "Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry." Neuron **40**(5): 959-970.
- van Oijen, A. M. (2011). "Single-molecule approaches to characterizing kinetics of biomolecular interactions." Current Opinion in Biotechnology **22**(1): 75-80.
- Varnum, M. D., K. D. Black and W. N. Zagotta (1995). "Molecular mechanism for ligand discrimination of cyclic nucleotide-gated channels." Neuron **15**(3): 619-625.
- Wainger, B. J., M. DeGennaro, B. Santoro, S. A. Siegelbaum and G. R. Tibbs (2001). "Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels." Nature **411**(6839): 805-810.
- Walsh, D. A., J. P. Perkins and E. G. Krebs (1968). "An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle." Journal of Biological Chemistry **243**(13): 3763-3765.
- Weber, I. T., G. L. Gilliland, J. G. Harman and A. Peterkofsky (1987). "Crystal structure of a cyclic AMP-independent mutant of catabolite gene activator protein." Journal of Biological Chemistry **262**(12): 5630-5636.
- Weber, I. T., J. B. Shabb and J. D. Corbin (1989). "Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: a key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites." Biochemistry **28**(14): 6122-6127.
- Wei, J.-Y., E. D. Cohen, H.-G. Genieser and C. J. Barnstable (1998). "Substituted cGMP analogs can act as selective agonists of the rod photoreceptor cGMP-gated cation channel." Journal of Molecular Neuroscience **10**(1): 53-64.
- Wu, S. J., Z. V. Vysotskaya, X. P. Xu, C. A. Xie, Q. L. Liu and L. Zhou (2011). "State-Dependent cAMP Binding to Functioning HCN Channels Studied by Patch-Clamp Fluorometry." Biophysical Journal **100**(5): 1226-1232.
- Wyman, J. (1964). Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin: A Second Look. Advances in Protein Chemistry. C. B. Anfinsen, M. L. Anson, J. T. Edsall and F. M. Richards, Academic Press. **19**: 223-286.
- Yau, K.-W. and K. Nakatani (1985). "Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment." Nature **313**: 579.

Yu, F. H., V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman and W. A. Catterall (2005). "Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily." Pharmacological Reviews **57**(4): 387-395.

Zagotta, W. N., N. B. Olivier, K. D. Black, E. C. Young, R. Olson and E. Gouaux (2003). "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels." Nature **425**(6954): 200-205.

Zheng, J. and W. N. Zagotta (2000). "Gating Rearrangements in Cyclic Nucleotide-Gated Channels Revealed by Patch-Clamp Fluorometry." Neuron **28**(2): 369-374.

Zhou, L., N. B. Olivier, H. Yao, E. C. Young and S. A. Siegelbaum (2004). "A Conserved Tripeptide in CNG and HCN Channels Regulates Ligand Gating by Controlling C-Terminal Oligomerization." Neuron **44**(5): 823-834.

Zhou, L. and S. A. Siegelbaum (2007). "Gating of HCN channels by cyclic nucleotides: Residue contacts that underlie ligand binding, selectivity, and efficacy." Structure **15**(6): 655-670.

8.1 Eigene Publikationen

8.1.1 Projektrelevante Artikel

- 2020 Fluorophore-labeled cyclic nucleotides as potent agonists of cyclic nucleotide-regulated ion channels
Lelle M, Otte M, Bonus M, Gohlke H, Benndorf K.
Chembiochem, im Druck.
- 2020 Relating ligand binding to activation gating in P2X2 receptors
Sattler C, Schmauder R, Schwabe T, Schweinitz A, Unzeitig C, Schwede F, Otte M, Benndorf K.,
Journal of Neurochemistry **00**: e14948.
- 2019 Novel fluorescent cyclic nucleotide derivatives to study CNG and HCN channel function
Otte M, Schweinitz A, Lelle M, Thon S, Enke U, Yüksel S, Schmauder R, Bonus M, Gohlke H, Benndorf K.
Biophysical Journal **116**(12): 2411-2422.
- 2019 Chemical synthesis and biological activity of novel brominated 7-deazaadenosine-3',5'-cyclic monophosphate derivatives.
Lelle M, Otte M, Thon S, Bertinetti D, Herberg F W, Benndorf K.
Bioorganic & Medicinal Chemistry **27**(8): 1704-1713.
- 2018 Hydrophobic alkyl chains substituted to the 8-position of cyclic nucleotides enhance activation of CNG and HCN channels by an intricate enthalpy - entropy compensation.
Otte M, Schweinitz A, Bonus M, Enke U, Schumann C, Gohlke H, Benndorf K.
Scientific Reports **8**(1): 14960.

8.1.2 Nicht-Projektrelevante Artikel

- 2014 CXCL14 is no direct modulator of CXCR4.
Otte M, Kliewer A, Schutz D, Reimann C, Schulz S, Stumm R.
FEBS Letters **588**(24): 4769-4775.

8.1.3 Poster

- 2017 Relating the binding of single ligands to activation in single HCN and CNG channels.
Otte M, Lelle M, Schmauder R, Schirmeyer J, Thon S, Schweinitz A, Benndorf K.
Poster, Jahrestagung der Jungen Physiologen, Jena.
- 2016 The effect of newly designed cAMP analogues on HCN2 Channels,
Otte M, Schweinitz A, Thon S, Schmauder R, Enke U, Benndorf K.
Poster, 95. Jahrestagung der DPG, Lübeck.
- 2016 Activation of olfactory CNG channels by newly designed cyclic nucleotide derivatives.
Otte M, Enke U, Schirmeyer J, Schweinitz A, Thon S, Schmauder R, Lelle M, Benndorf K.
Poster, Jahrestagung der DGfB, Erlangen.

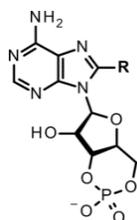
9. Anhang

9.1 Übersichtsblatt

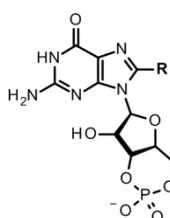
Strukturen aus der Dissertation: *Funktionelle Charakterisierung fluoreszenz-markierter Agonisten an zyklisch Nukleotid-aktivierten Ionenkanälen*, von Maik Otte, 2020.

Zusammenfassung der Seiten 55, 56 und 64.

cAMP-Derivate (X_A)

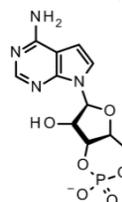


cGMP-Derivate (X_G)

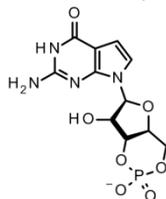


Sonderformen:

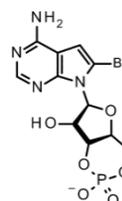
7-CH-cAMP (2_A)



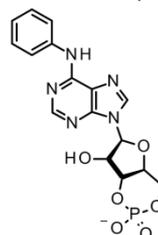
7-CH-cGMP (2_G)



7-CH-8-Br-cAMP (4_A)



6-Phe-cAMP (7_A)



Nr. des Derivates	Substitution/ Kettentyp	Kettenstruktur an Position 8 (R)	Anzahl Linkeratom	R'/ Farbstoff
1 _{A/G}	–	–H	–	–
3 _{A/G}	8-Br	–Br	1	–
5 _{A/G}	8-SH	–SH	1	–
6 _{A/G}	8-CPT		6	–
L2 _{A/G}	8-AET-		4	–H
L3 _{A/G}	8-(Ac)AET-		6	–COCH ₃
L4 _{A/G}	8-AHT-		8	–H
L5 _{A/G}	8-(Ac)AHT-		10	–COCH ₃
L6 _{A/G}	8-ADT-		12	–H
L7 _{A/G}	8-(Ac)ADT-		14	–COCH ₃
L8 _{A/G}	8-(Ac)APT-		12	–COCH ₃
L9 _{A/G}	8-(Ac)APET-		16	–COCH ₃
L10 _{A/G}	8-(Ac)AGET-		9	–COCH ₃
L11 _{A/G}	8-(Ac)AGGET-		12	–COCH ₃
L12 _{A/G}	8-APP-		10	–H
L13 _{A/G}	8-APPT-		11	–H
F2 _{A/G}	8-AET-		8	–DY547
F3 _{A/G}	8-AHT-		12	–DY547P1
F4 _{A/G}	8-AET-		10	–DY547P1
F5 _{A/G}	8-AHT-		14	–DY547P1
F6 _{A/G}	8-AET-		10	–Cy3Me
F7 _{A/G}	8-AHT-		14	–Cy3Me
F8 _{A/G}	8-AHT-		10	–Cy3B
F9 _{A/G}	8-ADT-		14	–Cy3B
F10 _{A/G}	8-AET-		12	–DY557
F11 _{A/G}	8-AHT-		16	–DY557
F12 _G	8-AHT-		11	–PDI

9.2 Abbildungen

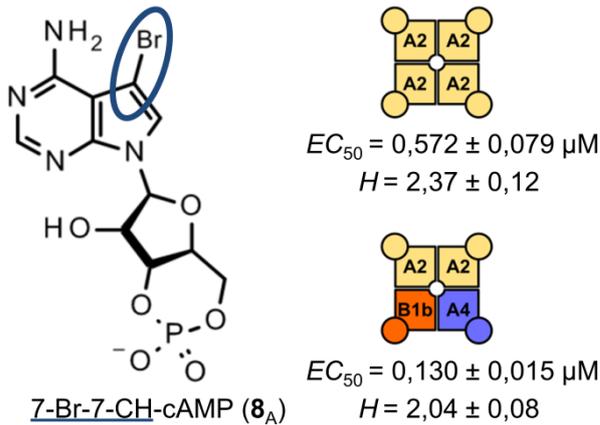


Abbildung 35. Effekte eines weiteren bromierten Nukleotids. Modifiziert nach Lelle et al., 2019. Es zeigt die strukturellen Änderungen im Molekül im Vergleich zu cAMP und die EC_{50} -Werte sowie die Hill-Koeffizienten für die olfaktorischen CNG-Kanäle.

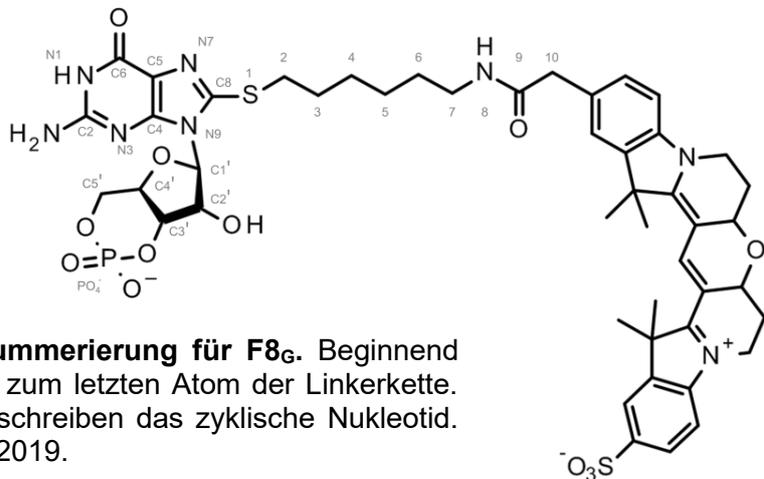


Abbildung 36. Beispielnummerierung für F8_G. Beginnend mit dem Schwefelatom bis zum letzten Atom der Linkerkette. Die weiteren Nummern beschreiben das zyklische Nukleotid. Modifiziert nach Otte et al., 2019.

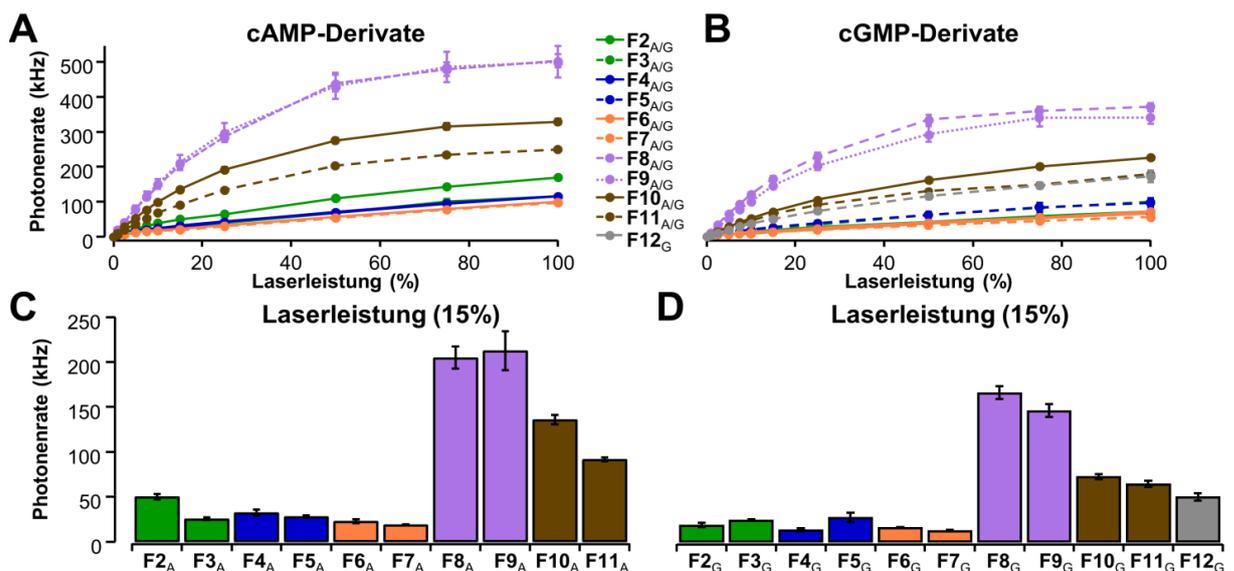
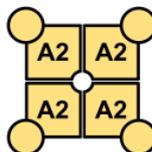


Abbildung 37. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS). Methode zur Charakterisierung von molekularer Helligkeit der Liganden. Größte Helligkeit bei den Derivaten (A: cAMP-Derivate; B: cGMP-Derivate) mit Cy3B (**F11_{A/G}**); geringste Helligkeit bei den konventionellen Cyaninen (**F2-F7_{A/G}**). C+D) stellen die häufig verwendete Laserleistung der Experimente dar.

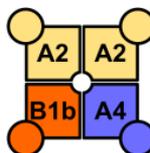
9.3 Tabellen

Tabelle 7. Effekte der cNMP-Derivative am homotetrameren CNGA2-Kanal. Zusammenfassung der EC_{50} Werte, Hill-Koeffizienten H_a , maximale Aktivierung (Mittelwert \pm SEM) und Anzahl an Experimenten, n. * deutet auf $L2_A$ und $F6_A$ als Partialagonisten am CNGA2-Kanal hin.



Nr.	EC_{50} (μ M)	H_a	Maximum	n	Nr.	EC_{50} (μ M)	H_a	Maximum	n
1 _A	54,83 \pm 6,98	2,16 \pm 0,05	1,01 \pm 0,00	4	1 _G	1,77 \pm 0,07	2,60 \pm 0,04	0,99 \pm 0,00	16
2 _A	2,15 \pm 0,14	2,28 \pm 0,11	1,03 \pm 0,01	6	2 _G	3,53 \pm 0,23	2,62 \pm 0,45	1,03 \pm 0,01	7
3 _A	15,93 \pm 1,51	2,45 \pm 0,23	1,01 \pm 0,02	7	3 _G	0,13 \pm 0,01	2,79 \pm 0,16	0,97 \pm 0,01	7
4 _A	6,75 \pm 1,02	2,38 \pm 0,22	1,03 \pm 0,01	6					
5 _A	6,42 \pm 0,39	2,49 \pm 0,13	1,01 \pm 0,01	6	5 _G	0,15 \pm 0,01	2,43 \pm 0,15	0,99 \pm 0,00	13
6 _A	3,26 \pm 0,19	2,73 \pm 0,13	0,98 \pm 0,01	9	6 _G	0,07 \pm 0,00	3,26 \pm 0,66	0,97 \pm 0,03	5
7 _A	8,15 \pm 0,71	2,39 \pm 0,09	1,00 \pm 0,00	8					
8 _A	0,57 \pm 0,08	2,37 \pm 0,12	1,02 \pm 0,01	7					
L2 _A *	128,3 \pm 20,4	1,82 \pm 0,17	0,46 \pm 0,07	14	L2 _G	0,83 \pm 0,05	2,43 \pm 0,29	0,95 \pm 0,02	14
L3 _A	9,95 \pm 0,76	2,30 \pm 0,11	0,99 \pm 0,01	9	L3 _G	0,17 \pm 0,03	1,80 \pm 0,24	1,06 \pm 0,05	5
L4 _A	3,10 \pm 0,32	2,23 \pm 0,12	1,01 \pm 0,02	10	L4 _G	0,09 \pm 0,02	2,49 \pm 0,54	0,95 \pm 0,03	5
L5 _A	1,44 \pm 0,17	3,06 \pm 0,28	0,99 \pm 0,01	8	L5 _G	0,08 \pm 0,00	2,68 \pm 0,14	0,98 \pm 0,01	10
L6 _A	0,63 \pm 0,06	2,34 \pm 0,18	0,97 \pm 0,02	7	L6 _G	0,06 \pm 0,01	1,78 \pm 0,09	1,02 \pm 0,01	7
L7 _A	2,28 \pm 0,37	2,40 \pm 0,23	1,07 \pm 0,02	14	L7 _G	0,05 \pm 0,00	2,16 \pm 0,11	0,99 \pm 0,01	8
L8 _A	24,94 \pm 1,26	2,37 \pm 0,11	0,99 \pm 0,01	7	L8 _G	0,55 \pm 0,04	2,71 \pm 0,25	0,99 \pm 0,01	12
L9 _A	46,21 \pm 6,88	2,26 \pm 0,09	0,94 \pm 0,02	8	L9 _G	0,52 \pm 0,03	2,29 \pm 0,13	0,99 \pm 0,00	11
L10 _A	34,25 \pm 4,51	2,09 \pm 0,22	0,95 \pm 0,05	10	L10 _G	0,34 \pm 0,01	2,55 \pm 0,08	0,98 \pm 0,01	12
L11 _A	29,37 \pm 3,09	1,91 \pm 0,11	0,91 \pm 0,03	7	L11 _G	0,33 \pm 0,02	2,43 \pm 0,11	0,98 \pm 0,01	11
L12 _A	16,05 \pm 1,46	2,44 \pm 0,12	1,00 \pm 0,01	7	L12 _G	2,26 \pm 0,24	2,51 \pm 0,06	0,98 \pm 0,01	7
L13 _A	4,87 \pm 0,28	2,77 \pm 0,12	1,00 \pm 0,01	9	L13 _G	0,26 \pm 0,02	2,58 \pm 0,08	0,98 \pm 0,00	8
F2 _A	271,0 \pm 56,6	1,32 \pm 0,07	1,00	6	F2 _G	0,59 \pm 0,03	2,73 \pm 0,07	1,02 \pm 0,02	9
F3 _A	5,21 \pm 0,41	2,52 \pm 0,09	1,01 \pm 0,02	5	F3 _G	0,09 \pm 0,01	2,46 \pm 0,17	0,99 \pm 0,00	9
F4 _A	60,83 \pm 7,48	1,35 \pm 0,14	1,00	11	F4 _G	1,08 \pm 0,08	2,79 \pm 0,19	0,99 \pm 0,02	6
F5 _A	7,42 \pm 0,78	2,08 \pm 0,15	1,03 \pm 0,01	7	F5 _G	0,21 \pm 0,02	2,55 \pm 0,13	1,00 \pm 0,01	9
F6 _A *	10,52 \pm 1,76	1,28 \pm 0,16	0,89 \pm 0,03	6	F6 _G	1,10 \pm 0,09	2,48 \pm 0,25	1,00 \pm 0,01	9
F7 _A	5,90 \pm 0,32	1,94 \pm 0,27	1,01 \pm 0,03	7	F7 _G	0,16 \pm 0,01	3,57 \pm 0,40	0,99 \pm 0,00	11
F8 _A	2,81 \pm 0,23	2,04 \pm 0,13	1,01 \pm 0,01	10	F8 _G	0,35 \pm 0,02	3,64 \pm 0,28	0,99 \pm 0,01	11
F9 _A	1,82 \pm 0,15	2,93 \pm 0,28	0,96 \pm 0,02	8	F9 _G	0,32 \pm 0,05	3,66 \pm 0,58	1,00 \pm 0,01	11
F10 _A	51,89 \pm 2,92	1,62 \pm 0,06	1,00	9	F10 _G	0,26 \pm 0,01	3,54 \pm 0,16	0,98 \pm 0,01	9
F11 _A	46,20 \pm 3,62	2,18 \pm 0,24	1,00	7	F11 _G	0,58 \pm 0,07	3,18 \pm 0,26	1,00 \pm 0,01	8
					F12 _G	0,36 \pm 0,04	1,66 \pm 0,11	0,98 \pm 0,01	8

Tabelle 8. Effekte der cNMP-Derivative am heterotetrameren CNGA2:CNGA4:CNGB1b-Kanal. Zusammenfassung der EC_{50} Werte, Hill-Koeffizienten H , maximale Aktivierung (Mittelwert \pm SEM) und Anzahl an Experimenten, n. * deutet auf **L12_A**, **L13_A**, **F6_A** und **L12_G** einen Partial-agonisten. # deutet auf **L6_A** eine ungewohnte Inhibition bei einer Konzentration $>$ 2 μ M an CNGA2:CNGA4:CNGB1b-Kanälen.



Nr.	EC_{50} (μ M)	H_a	Maximum	n	Nr.	EC_{50} (μ M)	H_a	Maximum	n
1_A	4,99 \pm 0,36	2,14 \pm 0,09	1,00 \pm 0,01	7	1_G	1,27 \pm 0,10	2,49 \pm 0,30	0,97 \pm 0,01	8
2_A	0,37 \pm 0,03	2,14 \pm 0,18	1,00 \pm 0,02	5	2_G	0,82 \pm 0,07	2,58 \pm 0,17	1,01 \pm 0,00	9
3_A	1,64 \pm 0,12	2,23 \pm 0,08	0,99 \pm 0,00	7	3_G	0,33 \pm 0,03	1,48 \pm 0,09	0,98 \pm 0,00	5
4_A	0,65 \pm 0,13	2,02 \pm 0,09	0,99 \pm 0,01	5					
5_A	3,68 \pm 0,11	2,16 \pm 0,07	0,98 \pm 0,00	7	5_G	0,37 \pm 0,02	1,39 \pm 0,05	0,96 \pm 0,01	11
6_A	0,50 \pm 0,05	2,34 \pm 0,12	0,98 \pm 0,00	11	6_G	0,06 \pm 0,01	1,95 \pm 0,14	0,97 \pm 0,01	7
7_A	0,84 \pm 0,12	1,77 \pm 0,13	0,97 \pm 0,01	8					
8_A	0,13 \pm 0,02	2,04 \pm 0,08	0,99 \pm 0,00	7					
L2_A	13,34 \pm 0,66	0,96 \pm 0,02	0,96 \pm 0,13	8	L2_G	1,49 \pm 0,20	1,78 \pm 0,21	1,07 \pm 0,15	5
L3_A	4,06 \pm 0,63	1,77 \pm 0,37	0,97 \pm 0,02	5	L3_G	0,28 \pm 0,02	1,95 \pm 0,10	1,02 \pm 0,02	6
L4_A	1,40 \pm 0,12	2,50 \pm 0,06	0,99 \pm 0,16	6	L4_G	0,62 \pm 0,17	1,30 \pm 0,14	1,01 \pm 0,17	5
L5_A	0,95 \pm 0,06	2,49 \pm 0,19	0,98 \pm 0,03	5	L5_G	0,23 \pm 0,01	1,96 \pm 0,09	0,97 \pm 0,01	10
L6_A[#]	0,29 \pm 0,04	3,89 \pm 1,04	0,77 \pm 0,10	9	L6_G	0,30 \pm 0,02	1,55 \pm 0,10	1,00 \pm 0,14	6
L7_A	0,47 \pm 0,06	2,73 \pm 0,20	1,00 \pm 0,01	10	L7_G	0,14 \pm 0,02	1,92 \pm 0,12	0,98 \pm 0,01	7
L8_A	5,98 \pm 0,42	2,21 \pm 0,10	0,98 \pm 0,01	10	L8_G	1,07 \pm 0,08	1,60 \pm 0,07	0,97 \pm 0,01	8
L9_A	7,08 \pm 0,26	2,22 \pm 0,13	0,99 \pm 0,01	7	L9_G	1,11 \pm 0,10	1,97 \pm 0,18	0,97 \pm 0,01	9
L10_A	6,60 \pm 0,45	2,22 \pm 0,14	0,99 \pm 0,01	8	L10_G	0,63 \pm 0,03	1,87 \pm 0,07	0,96 \pm 0,01	9
L11_A	5,12 \pm 0,59	2,51 \pm 0,23	0,99 \pm 0,01	6	L11_G	1,00 \pm 0,19	1,74 \pm 0,12	0,96 \pm 0,01	10
L12_A[*]	10,94 \pm 0,98	2,43 \pm 0,08	0,74 \pm 0,01	6	L12_G[*]	7,59 \pm 0,86	1,76 \pm 0,10	0,52 \pm 0,03	7
L13_A[*]	0,77 \pm 0,05	2,28 \pm 0,01	0,90 \pm 0,01	7	L13_G	0,37 \pm 0,03	1,64 \pm 0,09	0,97 \pm 0,01	8
F2_A	18,26 \pm 1,18	1,61 \pm 0,07	1,00	17	F2_G	2,06 \pm 0,26	1,76 \pm 0,05	1,00	10
F3_A	1,18 \pm 0,11	2,41 \pm 0,15	1,00	6	F3_G	0,21 \pm 0,03	2,02 \pm 0,17	0,99 \pm 0,01	9
F4_A	11,14 \pm 0,85	1,44 \pm 0,07	1,00	8	F4_G	1,83 \pm 0,08	2,39 \pm 0,06	0,95 \pm 0,01	8
F5_A	1,49 \pm 0,15	2,10 \pm 0,13	0,97 \pm 0,01	10	F5_G	0,51 \pm 0,02	1,49 \pm 0,04	0,98 \pm 0,01	8
F6_A[*]	5,32 \pm 0,50	1,68 \pm 0,18	0,82 \pm 0,04	8	F6_G	1,43 \pm 0,13	2,11 \pm 0,25	0,96 \pm 0,01	8
F7_A	1,50 \pm 0,15	1,63 \pm 0,12	0,99 \pm 0,02	7	F7_G	0,36 \pm 0,02	2,07 \pm 0,35	1,01 \pm 0,01	5
F8_A	1,20 \pm 0,12	2,69 \pm 0,25	0,98 \pm 0,01	6	F8_G	0,53 \pm 0,02	2,65 \pm 0,12	0,98 \pm 0,01	7
F9_A	0,51 \pm 0,04	2,47 \pm 0,23	0,94 \pm 0,01	11	F9_G	0,51 \pm 0,05	2,27 \pm 0,17	0,97 \pm 0,01	11
F10_A	5,02 \pm 0,34	2,32 \pm 0,13	1,00	12	F10_G	0,35 \pm 0,02	2,63 \pm 0,08	0,97 \pm 0,01	8
F11_A	5,85 \pm 0,69	2,69 \pm 0,55	1,00	5	F11_G	0,92 \pm 0,06	2,34 \pm 0,32	0,96 \pm 0,01	6
					F12_G	0,24 \pm 0,05	1,82 \pm 0,10	0,94 \pm 0,00	7

9.4 Abbildungsverzeichnis

Nr.	Beschriftung
1	Schematische Darstellung der chemischen Struktur von fcGMP
2	Schematische Darstellung der CNG-Ionenkanalisoformen mit den verschiedenen stöchiometrischen Verteilungen der jeweiligen Untereinheiten
3	Schematische olfaktorische Transduktionskaskade
4	Schematische Darstellung der Struktur des CNG-Kanals
5	Aufbau eines Nukleotids
6	Alignment der verwendeten Untereinheiten
7	C4L-Modell
8	Fluoreszenzeigenschaften des Cy3-Farbstoffes.
9	Strukturen der Farbstoffgruppen
10	Patch-clamp Technik
11	Bestimmung der Ionenkanalkinetik
12	Schematisches Messprotokoll der Gleichgewichtsaktivierungen mit Auswertung
13	Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskopes
14	Lambda-Modus
15	Auswertung der Bindung eines fluoreszierenden Liganden an CNGA2-Kanäle mittels cPCF
16	Konzentrations-Aktivierungsbeziehungen endogener Nukleotide an den olfaktorischen CNG-Kanälen
17	Schema der Nukleotide
18	Effekte der modifizierten und substituierten cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG Kanälen
19	Effekte der aliphatischen hydrophoben cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen
20	Effekte der aliphatischen hydrophoben cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen
21	Effekte der aliphatischen hydrophoben cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen
22	Ionenkanalaktivierung und -deaktivierung der olfaktorischen CNG-Kanäle
23	Schematische Darstellung der Farbstoffstrukturen
24	Effekte der konventionellen cyanin-ähnlichen, fluoreszierenden cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen
25	Effekte weiterer fluoreszierender cNMP-Derivate als EC_{50} -Werte an den CNG-Kanälen
26	Konzentrations-Aktivierungs-/Bindungsbeziehung fluoreszierender Liganden an homotetrameren CNG-Kanälen
27	Helligkeit der fluoreszierenden Liganden
28	Absorptions- und Fluoreszenzspektren von F2 _G , F4 _G , F8 _G und F10 _G
29	Effekt der Liganden auf den Hill-Koeffizienten
30	Homologie-Modell und Dockingexperimente
31	Zusammenfassung aller elektrophysiologisch vermessenen Liganden
32	Effekte der cAMP-Derivate am HCN2-Kanal
33	Zusammenfassung der Effekt von CNBD-enthaltenen Proteinen
34	Schematische Darstellung der Methoden zur Einzelmolekülmessung
35	Effekte eines weiteren bromierten Nukleotids
36	Beispielnummerierung für F8 _G .
37	FCS-Experimente

9.5 Tabellenverzeichnis

Nr.	Beschriftung
1	Verwendete Lösungen mit Mengenangaben der enthaltenen Stoffe
2	Schematische Darstellung der Linkerketten
3	Schematische Darstellung der fluoreszierenden Liganden
4	Nennungen der EC_{50} -, BC_{50} -, <i>Hill</i> -Werte für die in Abb. 26 dargestellten Liganden
5	Nennungen der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der fluoreszierenden Liganden
6	Nennungen der Spannung, BC_{50} -, <i>Hill</i> -Werte für die in Abb. 32E dargestellten Liganden
7	Effekte der cNMP-Derivative am homotetrameren CNGA2-Kanal
8	Effekte der cNMP-Derivative am heterotetrameren CNGA2:CNGA4:CNGB1b-Kanal

9.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. Klaus Benndorf
- Dr. Jana Kusch
- Dr. Susanne Thon
- Dr. Ralf Schmauder
- Dr. Andrea Schweinitz
- Dr. Marco Lelle
- Uta Enke

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

9.7 Danksagung

Die Anfertigung der vorliegenden Dissertation erfolgte am Universitätsklinikum Jena am Institut für Physiologie II unter Aufsicht des Institutsleiters Herrn Prof. Dr. Klaus Benndorf. Daher gebührt Ihm an dieser Stelle mein erster und besonderer Dank für die gebotene Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchzuführen, sowie für die Betreuung und Unterstützung. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz für die Zweitbetreuung der Promotion.

Mein herzlicher Dank geht auch an alle Personen, die mich bei der Erstellung dieser Promotion immer unterstützt haben. Besonders zu erwähnen sind meine geliebte Freundin und meine Familie, die mich jederzeit auf diesem schwierigen Weg begleitet haben. Danke für alles und euren Rückhalt!

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie II für die kollegiale Atmosphäre und geleisteten Hilfestellungen. Besonders danke ich Frau Dr. Susanne Thon und Herrn Dr. Ralf Schmauder für die theoretischen und praktischen Grundlagen sowie Frau Dr. Andrea Schweinitz und Herrn Dr. Marco Lelle für die chemische Unterstützung dieses Projektes. Ebenfalls danken möchte ich Frau Sandra Bernhardt, Frau Uta Enke, Frau Andrea Kolchmeier, Frau Claudia Ranke und Frau Karin Schoknecht für die exzellente technische Unterstützung bei allen Experimenten. Zudem danke ich Frau Nicole Baier bei der Bewältigung von allen bürokratischen Prozessen am Uniklinikum Jena.

Zudem gebührt meinem Büro mit Frau Dr. Sezin Yüksel und Milica Gusic ein besonderer Dank für die stets aufmunternden Worte und geteilten Sorgen. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Jana Kusch, Frau Dr. Vasilica Nache und Herrn Prof. Thomas Zimmer für den Beistand bei den Lehrveranstaltungen. Nicht zu vergessen ist die routinemäßige Mittagsrunde, unter anderem mit Frau Dr. Christin Arnold, Frau Dr. Sonja Fey, Herrn Dr. Thomas Eick und Herrn Dr. Christian Sattler für konstruktive Diskussionen. Dazu möchte ich allen weiteren Kollegen danken für ihre Unterstützung, Dr. Kathrin Groeneveld, Sabine Hummert, Abhilasha Ladha, Dr. Jana Schirmeyer, Dr. Tina Schwabe, Christian vom Dahl, Dr. Gunter Ehrlich, Mahesh Kondapuram, Taulant Kukaj, Thomas Linke, Dominik Lenz und Mallikarjuna Rao Sunkara.

Auch meinen Kooperationspartner gilt ein großer Dank für die mir entgegengebrachte Hilfe: AG Prof. Gohlke aus Düsseldorf, besonders Michelle Bonus, Dr. Christopher Pflieger und Prof. Dr. Holger Gohlke sowie Herrn Prof. Dr. Eckhard Schulz aus Schmalkalden für Aufnahmen der *Patch*-Pipetten und AG Prof. Dr. Christoph Biskup aus Jena für die Analysesoftware der PCF-Experimente.

Ein besonderer Dank gilt noch einmal Frau Dr. Jana Kusch, Frau Dr. Susanne Thon und Herrn Dr. Ralf Schmauder für die vielen wichtigen Anmerkungen beim Durchlesen dieses schier endlos erscheinenden Manuskriptes.

Zu guter Letzt gilt mein Dank den Südafrikanischen Krallenfröschen, ohne deren Oozyten diese Arbeit nicht möglich war. Auch wenn es nicht immer einfach war, konnte ich die notwendigen Versuche häufig durchführen und so wichtige Erkenntnisse für die wissenschaftliche Gemeinschaft erbringen.