

# I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung	1
1.1	Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle	1
1.2	Funktion und physiologische Bedeutung von CNG-Kanälen in Photorezeptorzellen	4
1.3	"Klassische" CaM-Bindestellen	7
1.4	Zielsetzung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.2	Puffer und Lösungen	12
2.3	Bakterienstämme und Plasmidvektoren	13
2.3.1	<i>E.coli</i> K12-Bakterienstämme	13
2.3.2	Plasmidvektoren	13
2.4	Größenstandards	14
2.5	Anzucht von <i>E.coli</i> K12-Bakterienkulturen	14
2.5.1	Herstellung von kompetenten Zellen zur Transformation mit Plasmid- DNA	15
2.6	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	15
2.7	Quantifizierung von Nukleinsäuren	15
2.8	Präparation von Plasmid-DNA	16
2.8.1	Mini-Präparation	16
2.8.2	Midi-Präparation	17
2.9	Analyse von DNA	17
2.9.1	Restriktionsanalyse	17
2.9.2	Sequenzierung von DNA	18

2.9.3	Gelelektrophorese von DNA	18
2.9.3.1	Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	18
2.9.3.2	Auftrennung von Sequenzierreaktionen	18
2.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.11	Klonierung von DNA-Fragmenten	19
2.11.1	Ligation	19
2.11.2	Transformation	19
2.12	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	20
2.13	Elektrophysiologische Untersuchungen an <i>Xenopus laevis</i> Oocyten	21
2.14	Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP)-Fusionsproteinen	21
2.15	Reinigung von Maltose-Bindeprotein (MBP)-Fusionsproteinen	22
2.15.1	Abspaltung und Abtrennung des MBP-Anteils aus dem Fusionsprotein FP $\beta$ NT	22
2.16	Gelelektrophorese, Transfer und Immobilisierung von Proteinen	23
2.17	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	23
2.18	Immunisierung von Kaninchen	24
2.19	Biotinylierung von Calmodulin	24
2.20	CaM-Overlay	24
2.21	Präparation von Sechstäbchenaußensegmenten (ROS)	25
2.22	Reinigung des nativen CNG-Kanals aus Sechstäbchenaußensegmenten (ROS)	25
2.23	Kovalentes Quervernetzen von Untereinheiten des gereinigten CNG- Kanals ( <i>cross-linking</i> )	26
2.24	Quantifizierung von Proteinen	27
2.24.1	Bestimmung der Konzentration von löslichen Proteinen	27
2.24.2	Bestimmung der Konzentration von Membranproteinen	27
2.25	Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (SPR)	28
2.25.1	Das Meßprinzip	28
2.25.2	Quantitative Analyse der Sensorgramme	30
2.25.3	Immobilisierung von Peptiden und Proteinen auf der Sensorchipoberfläche	31

3	Ergebnisse	33
3.1	Identifizierung und Charakterisierung von CaM-Bindestellen in der $\beta$ -Untereinheit des CNG-Kanals	33
3.1.1	Enthält die $\beta$ -Untereinheit des CNG-Kanals Sequenzmotive mit Ähnlichkeiten zu "klassischen" CaM-Bindestellen?	33
3.1.2	Wechselwirkung von Calmodulin mit Sequenzabschnitten aus dem N- und aus dem C-terminalen Bereich der $\beta$ -Untereinheit	35
3.1.3	Eingrenzung der CaM-Bindestelle im C-terminalen Abschnitt der $\beta$ -Untereinheit	38
3.1.3.1	Identifizierung und Charakterisierung der CaM-Bindestelle im C-terminalen Abschnitt der $\beta$ -Untereinheit durch spektroskopische Untersuchungen	40
3.1.3.2	Quantitative Analyse der CaM-Bindung an FP $\beta$ CT3	43
3.1.3.3	Sequenzanalyse der C-terminalen CaM-Bindestelle in der $\beta$ -Untereinheit	45
3.1.4	Elektrophysiologische Untersuchungen zur CaM-Modulation an funktionell exprimierten CNG-Kanälen	46
3.1.5	Identifizierung und Charakterisierung der CaM-Bindestelle im N-terminalen Bereich der $\beta$ -Untereinheit des CNG-Kanals	51
3.1.5.1	Identifizierung einer CaM-Bindestelle im N-terminalen Bereich der $\beta$ -Untereinheit	51
3.1.5.2	Wechselwirkung von Calmodulin mit Peptiden aus dem N-terminalen Bereich der $\beta$ -Untereinheit	53
3.1.5.3	Wechselwirkung von Calmodulin mit Fusionsproteinen aus dem N-terminalen Bereich der $\beta$ -Untereinheit	55
3.1.5.4	CaM-Bindung an FP $\beta$ NT und FP $\beta$ NT $\Delta$ CaM1 im Overlay Experiment	58
3.1.5.5	SPR-spektroskopische Untersuchung der CaM-Bindung an P2 und an FP $\beta$ NT in der umgekehrten Konfiguration	59
3.1.6	Elektrophysiologische Untersuchungen einer N-terminalen Deletionsmutante der $\beta$ -Untereinheit	63
3.2	Bestimmung der oligomeren Struktur des CNG-Kanals aus Sehtäbchen	65

3.2.1	Reinigung des CNG-Kanals durch CaM-Affinitätschromatographie	65
3.2.2	Kovalente Vernetzung der Untereinheiten des nativen CNG-Kanals	66
4	Diskussion	71
4.1	Die $\beta$ -Untereinheit in Sehstäbchen besitzt zwei Bindestellen für $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$	71
4.1.1	Die CaM-Bindestelle im C-terminalen Bereich der $\beta$ -Untereinheit trägt nur unwesentlich zu der CaM-Sensitivität des CNG-Kanals bei	72
4.1.2	Der N-terminale Bereich der $\beta$ -Untereinheit enthält eine ungewöhnliche CaM-Bindestelle, die dem Sehstäbchen CNG-Kanal die CaM-Sensitivität verleiht	73
4.2	Werden die CNG-Kanäle im Photorezeptor durch Calmodulin oder durch ein anderes, noch unbekanntes Protein moduliert?	77
4.3	Die CNG-Kanäle aus Sehstäbchen bestehen aus drei $\alpha$ -Untereinheiten und einer $\beta$ -Untereinheit	79
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	81
7	Anhang	89