

Berichte aus der Biophysik

**Anne Kathrin Zuber**

**Spektroskopische Untersuchungen  
zur Aufklärung der Transportmechanismen  
eines Glutamattransporters und eines  
zyklisch-Nukleotid gesteuerten Ionenkanals**

Shaker Verlag  
Aachen 2009

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Bielefeld, Univ., Diss., 2008

Copyright Shaker Verlag 2009

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-7927-1

ISSN 1439-7897

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • E-Mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Reaktionsmechanismen zweier Transportproteine mit Hilfe der FTIR-Differenzspektroskopie auf molekularer Ebene untersucht. Bei den Proteinen handelt es sich um einen sekundär aktiven Transporter, den Glutamattransporter aus *E. coli* (ecGLTP) und um ein Kanalprotein, den zyklisch-Nukleotid gesteuerten Ionenkanal (CNG) aus *M. luti*. Trotz des großen medizinischen Interesses an den beiden Proteinfamilien konnten bislang weder der Transportmechanismus des Glutamattransporters noch das Öffnungsverhalten des Ionenkanals aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck eignet sich die FTIR-Differenzspektroskopie besonders, da sie sehr sensitiv gegenüber den sich ändernden Schwingungen von Molekülgruppen ist, welche direkt an der Reaktion beteiligt sind.

Für die FTIR-Untersuchungen wurden die Proteine zunächst in rekombinanten *E. coli*-Zellen exprimiert, gereinigt, biochemisch charakterisiert und ihre Funktionalität überprüft. Der Aktivitätsnachweis erfolgte beim ecGLTP über Transportversuche mit (3,4-<sup>3</sup>H) L-Glutaminsäure in Proteoliposomen. Die Transportgeschwindigkeit konnte mit 3 s pro Zyklus unter optimalen Bedingungen bestimmt werden, welche durch eine pH-Differenz von 2 und durch ein Membranpotential mittels des Ionophors Valinomycin eingestellt wurden. Des Weiteren konnte anhand dieser Versuche gezeigt werden, dass ein Glutamatgradient ohne Membranpotential und pH-Gradienten für eine geringe Transportaktivität des Transporters ausreichend ist. Die Transportgeschwindigkeit pro Zyklus lag unter diesen Bedingungen im Bereich von Minuten. Durch diese Beobachtungen erschien es möglich, durch stationäre FTIR-Differenzspektroskopie Konformationsänderungen des Proteins während des Transportprozesses aufzudecken. Dazu wurden umfangreiche schwingungsspektroskopische Untersuchungen an dem Glutamattransporter durchgeführt. Diese bedienen sich der Methoden der ligandeninduzierten sowie der spannungsinduzierten Differenzspektroskopie, indem modifizierte Aufbauten der abgeschwächten Totalreflexion, der Transmission und der Oberflächenverstärkung eingesetzt wurden. Die erhaltenen Versuchsergebnisse weisen jedoch in keinem Fall auf eine IR-aktive Konformationsänderung des Transportproteins hin. Es ist sehr wahrscheinlich, dass aufgrund fehlender Synchronisierung des Transportprozesses die Änderungen im IR-Spektrum nicht aufgelöst werden konnten.

Beim ligandengesteuerten Ionenkanal (CNG) konnten Differenzsignale während der cAMP-Bindung spektroskopisch detektiert werden. Um diese induzierten Strukturänderungen des Proteins im Hinblick auf die Proteinregion einzuordnen, wurden als Probe das Volllängenprotein und die isolierte Bindedomäne untersucht. Bei den FTIR-Differenzmessungen wurde der Ligand im Durchfluss oder als inerte photolabile Vorstufe zur Verfügung gestellt. Erstmals konnte gezeigt werden, dass das Volllängenprotein sowie die Bindedomäne Strukturänderungen nach cAMP-Zugabe aufwiesen. Diese lagen sowohl im Amid I- als auch im Amid II-Bereich in den Sekundärstrukturregionen der  $\alpha$ -Helix und des  $\beta$ -Faltblattes und konnten regional der Bindedomäne zugeordnet werden. Außerdem konnte herausgearbeitet werden, dass der Bindungsprozess von cAMP an die Nukleotid-Bindedomäne des Ionenkanals *in vitro* reversibel ist. Des Weiteren deuten die Daten auf mit der cAMP-Bindung verbundenen Protonierungen von den Seitenketten der Aminosäuren Arginin und Glutaminsäure hin, was bisher trotz zahlreicher Untersuchungen – etwa der Kristallstruktur durch Röntgenstrukturanalyse – nicht aufgedeckt werden konnte.