

BAKTERIELLE ÜBEREXPRESSION UND  
RENATURIERUNG DER  
LIGANDENBINDUNGSDOMÄNE DER ALPHA-  
UNTEREINHEIT DES NIKOTINISCHEN  
ACETYLCHOLINREZEPTORS AUS *TORPEDO*  
*MARMORATA*

**DOKTORARBEIT**

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie der

Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Sascha Pfeiffer

geboren in Bad Kreuznach

Mainz, 2000

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DER NIKOTINISCHE ACETYLCHOLINREZEPTOR	1
1.2	DER AUFBAU DES NIKOTINISCHEN ACETYLCHOLIN REZEPTORS AUS <i>TORPEDO MARMORATA</i>	5
1.2.1	Der cytosolische Bereich des nAChR	5
1.2.2	Die Transmembrandomänen des nAChR	7
1.2.3	Der extrazelluläre Bereich	8
1.3	EIN REZEPTORFRAGMENT DES NIKOTINISCHEN ACETYLCHOLINREZEPTORS	10
1.3.1	Expression der Ligandenbindungsdomäne in Bakterien	12
1.4	AUFGABENSTELLUNG UND DURCHFÜHRUNG	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
2.1	MATERIAL	18
2.1.1	Chemikalien	18
2.1.2	Proteine und Vektoren	20
2.1.3	Geräte	21
2.2	METHODEN	21
2.2.1	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	21
2.2.2	Aufzucht der Bakterien auf LB <sub>Amp,Chl</sub> -Platten	22
2.2.3	Aufzucht und IPTG-Induktion der transformierten Bakterien in LB-Flüssigkulturen	23
2.2.4	Herstellung von Einschlusskörpern (Inclusionbodies) mit M9-Minimalmedium	23
2.2.5	Ernten der Einschlusskörper	24
2.2.6	Reinigen der Einschlusskörper	24
2.2.7	Solubilisierung	25
2.2.8	Renaturierung	26
2.2.9	Dialyse	26
2.2.10	Aufkonzentrierung	28
2.2.10.1	Aufkonzentrierung größerer Volumina	28
2.2.10.2	Aufkonzentrierung kleinerer Volumina	29
2.2.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	29
2.2.12	Färbung mit Coomassie	31
2.2.13	Silberfärbung	31
2.2.14	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	32
2.2.15	Western-Blot und Chemolumineszenz-Immunfärbung (ECL, <i>enhanced-chemiluminescence</i> )	33
2.2.16	Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Test	35
2.2.17	Nachweis freier SH-Gruppen	36
2.2.18	CD-Spektren	36
2.2.19	Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)	37
2.2.20	Theoretische Grundlagen von Bindungsexperimenten	38
2.2.20.1	Im Gleichgewicht	38
2.2.20.2	Kinetik	40
2.2.21	Experimentelle Durchführung der Bindungskurven	42
2.2.21.1	Gleichgewichts-Bindungsanalyse	43
2.2.21.2	Hemmungsexperimente	44
2.2.21.3	Kinetische Bindungsanalyse	45
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
3.1	PRODUKTION UND RENATURIERUNG DES $\alpha$ nAChR <sub>1-209</sub> FRAGMENTES (LBD)	46
3.1.1	Expressionsvektorkontrolle und Transformation	47
3.1.2	Reinigung der Einschlusskörper	49
3.1.3	Renaturierung	51
3.1.4	Aufkonzentrierung	55
3.2	BILANZ DER RENATURIERUNG	57
3.3	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER LIGANDENBINDUNGSDOMÄNE	58
3.3.1	Nachweis von freien SH-Gruppen	58
3.3.2	Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) und des molaren Extinktionskoeffizienten	58
3.3.3	N-terminale Aminosäuresequenz und MALDI-Massenspektroskopie	59
3.3.4	CD-Spektrum des $\alpha$ nAChR <sub>1-209</sub> -Fragments	59
	Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)	60
3.4	BINDUNGSEIGENSCHAFTEN	62
3.4.1	Western Blot mit monoklonalem Antikörper WF6	62
3.4.2	Gleichgewichtsbindung von $\alpha$ -Bungarotoxin	63

3.4.3	<i>Kompetitionsstudien mit verschiedenen Liganden</i> .....	66
3.4.4	<i>Kinetische Bindungsdaten</i> .....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>75</b>
4.1	BIOCHEMISCHE UND BIOPHYSIKALISCHE DATEN .....	76
4.2	SEKUNDÄRSTRUKTURDATEN .....	79
4.3	PHARMAKOLOGISCHE DATEN.....	81
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>88</b>

**Abkürzungen:**

$\alpha$ nAChR <sub>1-209</sub>	Fragment der ersten 209 Aminosäuren der $\alpha$ -Untereinheit des nAChR
$\alpha$ -Btx	$\alpha$ -Bungarotoxin
5HT	5-Hydroxytryptamin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	engl. <i>absorption units</i> ; Absorptionseinheiten
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie: entspricht $3,7 \cdot 10^{10}$ Zerfallsereignisse pro Sekunde
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EZD	extrazelluläre Domäne
FPLC	engl. <i>fast performance liquid chromatography</i>
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
Gdm	Guanidinium
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IB	engl. <i>inclusion bodies</i> ; Einschlusskörper
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid
LMW	engl. <i>low molecular weight</i> ; niedriges Molekulargewicht
MWCO	engl. <i>molecular weight cut-off</i> ; Molekulargewichts-Ausschlussgrenze
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> ; Kernspinresonanz
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600nm
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
PKA	Proteinkinase Typ A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
tPA	engl. <i>tissue plasminogen activator</i> ; Gewebe-Plasminogen-Aktivator
Upm	Umdrehungen pro Minute
x*g	x-fache der Erdbeschleunigung g; ( $9,81 \text{ [m*s}^{-2}\text{]}$ )

## 1 Einleitung

Membranrezeptoren sind Proteine, die extrazelluläre Reize in intrazelluläre Signale umwandeln, und damit Informationen von Aussen an die Zelle weiterleiten. Man unterscheidet zwischen ionotropen und metabotropen Rezeptoren, wobei erstere (z.B. der nikotinsche Acetylcholinrezeptor) durch Öffnen eines Ionenkanals direkt auf das Membranpotential einwirken. Metabotropen Rezeptoren (z.B. der muscarinsche Acetylcholinrezeptor) besitzen keinen intrinsischen Ionenkanal, sie beeinflussen das Membranpotential indirekt über sekundäre Botenstoffe und nachgeschaltete Reaktionen. Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind eine Untergruppe der Ionenkanäle. Der nikotinsche Acetylcholinrezeptor (nAChR) ist der Prototyp eines liganden-gesteuerten Ionenkanals. Zur gleichen Familie gehören auch die Glycin-, 5HT<sub>3</sub> und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. GABA<sub>A</sub>- und Glycinrezeptoren sind dabei anionenselektiv, wohingegen nikotinsche Acetylcholin- und 5HT<sub>3</sub>-Rezeptoren als kationenselektive Ionenkanälen fungieren.

Der nikotinsche Acetylcholinrezeptor ist ein Hauptbestandteil in den Membranen der Zellen in elektrischen Organen von Fischen (*Torpedo marmorata*; über 50% des Proteinanteils in Torpedomembranfragmenten).<sup>1</sup> Da er aus diesem Organ mit einfachen Verfahren in grossen Mengen isoliert werden kann, ist der Rezeptor für Forschungen auf dem Gebiet der liganden-gesteuerten Ionenkanäle leicht zugänglich. Die meisten strukturellen Informationen über diese Superfamilie wurde durch Arbeiten am nAChR aus diesen elektrischen Organen gewonnen. Er ist damit einer der am besten untersuchten Rezeptoren dieser Superfamilie. Das elektrische Organ von *Torpedo marmorata* hat sich evolutionär aus einem Muskel entwickelt, weshalb der nAChR aus diesem Organ zum muskulären Typ gezählt wird.

### 1.1 Der nikotinsche Acetylcholinrezeptor

Der nikotinsche Acetylcholinrezeptor aus *Torpedo marmorata* ist ein pentameres allosterisches Glykoprotein mit einer Pseudo-C<sub>5</sub>-Symmetrie (Abbildung 2) und einem Molekulargewicht von 290 kDa. Der muskuläre nAChR ist an der Signalübertragung im

cholinergen System beteiligt (Abbildung 1). An der muskulären Endplatte (der Verbindung zwischen Nervenzellen und Muskel) läuft die Signalübertragung folgendermaßen ab:

Ein auf der präsynaptischen Seite ankommendes ausreichendes Aktionspotential induziert über eine Öffnung von  $\text{Ca}^{++}$ -Kanälen und weitere nachgeschaltete Vorgänge die Freisetzung von Vesikeln mit dem Neurotransmitter Acetylcholin. Der Neurotransmitter diffundiert durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran und binden an dort vorhandene nikotinische Acetylcholinrezeptoren, die in der Membran als lokale Anhäufungen (sogenannten Clustern) vorliegen. Zur Öffnung des Ionenkanals des Rezeptors kommt es, wenn zwei Acetylcholinmoleküle angedockt sind. Entlang des elektrochemischen Gradienten strömen dann Kationen ( $\text{Na}^+$  und in geringem Maße auch  $\text{Ca}^{2+}$ ) aus dem synaptischen Spalt in die postsynaptische Zelle, bzw.  $\text{K}^+$  aus dem Cytosol der Zelle in den synaptischen Spalt. Das Acetylcholin löst sich vom Rezeptor und wird von der im synaptischen Spalt vorhandenen Acetylcholinesterase in Acetat und Cholin gespalten, während der Kanal sich wieder schließt. Ist der Rezeptor längere Zeit dem Neurotransmitter ausgesetzt, ein Ereignis, das zum Beispiel bei einer Vergiftung mit Organophosphaten eintritt (Inaktivierung der Acetylcholinesterase), so desensibilisiert der Rezeptor: Trotz gebundenen Neurotransmitters kann keine Kanalöffnung mehr erfolgen.

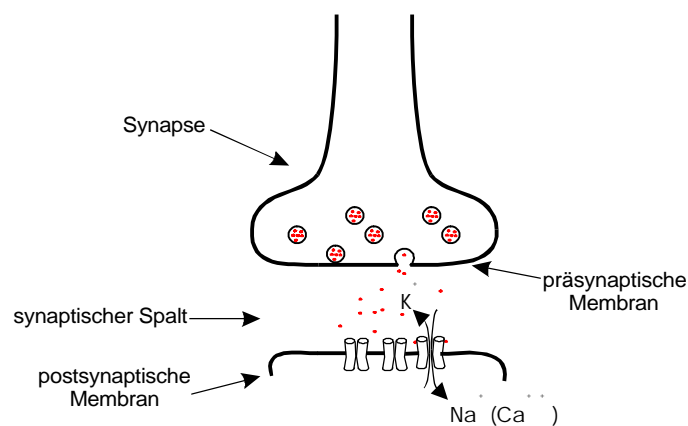


Abbildung 1: Cholinerge Signaltransduktion: Freisetzung des in Vesikeln gespeicherten Neurotransmitters Acetylcholin auf der präsynaptischen Seite, Diffusion von Acetylcholin (rot) durch den Spalt, Öffnen des intrinsischen Ionenkanals des nAChR für Kationen ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{++}$ ) nach dem Andocken von zwei Acetylcholinmolekülen.

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor wird aufgrund seines Vorkommens in den neuronalen (zentrales und peripheres Nervensystem) und den muskulären Typ unterteilt. Da sich diese Arbeit mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des muskulären Typs beschäftigt, soll im folgenden hauptsächlich auf diesen eingegangen werden.

Der muskuläre Typ ist an der neuromuskulären Endplatte und im elektrischen Organ von Fischen lokalisiert und setzt sich aus den Untereinheiten  $\alpha(1)_2\beta(1)\delta(\gamma$  bzw.  $\epsilon)^2$  zusammen (Abbildung 2). Der muskuläre Typ bindet das Neurotoxin  $\alpha$ -Bungarotoxin, ein im Gift der südostasiatischen, gestreiften Krait-Schlange (*Bungarus multicinctus*) vorkommendes 8 kDa Protein (74 Aminosäuren), das aufgrund seiner hohen Affinität ( $10^{-10}$  bis  $10^{-12}$  M für den Rezeptor<sup>3,4,26</sup>) in der folgenden Arbeit zur Charakterisierung des Rezeptorfragments eingesetzt wurde. Die  $\alpha$ -Bungarotoxinbindung erfolgt dabei kompetitiv mit Acetylcholin an die Ligandenbindungsdomäne der  $\alpha$ -Untereinheit (s.u.).

Bei den in Neuronen exprimierten Acetylcholinrezeptoren (neuronalen nAChR) unterscheidet man zwischen solchen, die  $\alpha$ -Bungarotoxin binden ( $\alpha 7$  bis  $\alpha 9$ ) und solchen, die dies nicht tun (Kombinationen der Untereinheiten  $\alpha 2$  bis  $\alpha 6$  mit  $\beta 2$  bis  $\beta 4$ ).<sup>5</sup> Die Untereinheiten  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  und  $\alpha 9$  bilden Homopentamere, sie besitzen damit 5 mögliche Acetylcholinbindungsstellen.<sup>6</sup> Alle anderen neuronalen AChR und der muskuläre AChR sind aufgrund ihrer Zusammensetzung hingegen Heteropentamere.

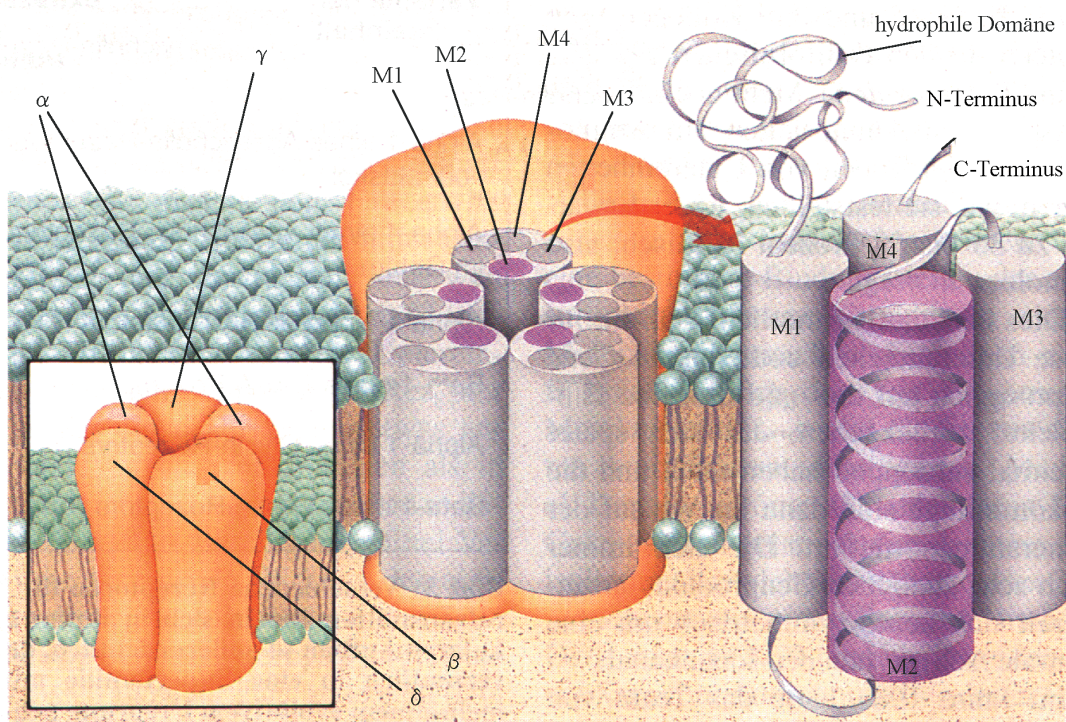


Abbildung 2: Schematische Darstellung des nikotinischen Acetylcholinrezeptors des muskulären Typs. Links unten: Quartärstruktur des Rezeptors eingebunden in die Lipiddoppelschicht mit Pseudo- $C_5$ -Symmetrie; Mitte: jede Untereinheit besitzt vier transmembrane Domänen (M1-M4), wobei jeweils die M2-Helix am Aufbau der Kanalpore beteiligt ist; Rechts: Aufbau einer Untereinheit mit dem extrazellulären N-Terminus, den vier transmembran Helices und dem cytosolischen Bereich (zwischen M1 und M2 sowie M3 und M4). Aus JP.Changeux, Scientific American 296(5) 30, 1993

Muskulärem und neuronalen nAChR gemeinsam ist der Aufbau aus fünf homologen (mehr als 40% Homologie), membrandurchspannenden Untereinheiten, die um eine zentrale kationenspezifische Kanalpore angeordnet sind (Abbildung 2). Diese Kanalpore ist im Falle der Aktivierung des Rezeptors, z.B. durch Acetylcholin, in der durchlässig für Kationen (hauptsächlich einwertige  $[Na^+ \text{ und } K^+]$ , in geringerem Ausmass auch zweiwertige  $[Ca^{++}]$ ), die entlang ihrem elektrochemischen Gradienten durch die Kanalöffnung diffundieren<sup>7</sup>. Erste Hinweise auf die Anordnung des Rezeptors in der Lipidmembran liefert das Hydrophathiediagramm (nach Kyte & Doolittle<sup>8</sup> Abbildung 3), welches vier hydrophobe Bereiche (M1-M4) aufweist, die in der Lipidmembran lokalisiert sind.<sup>2</sup>

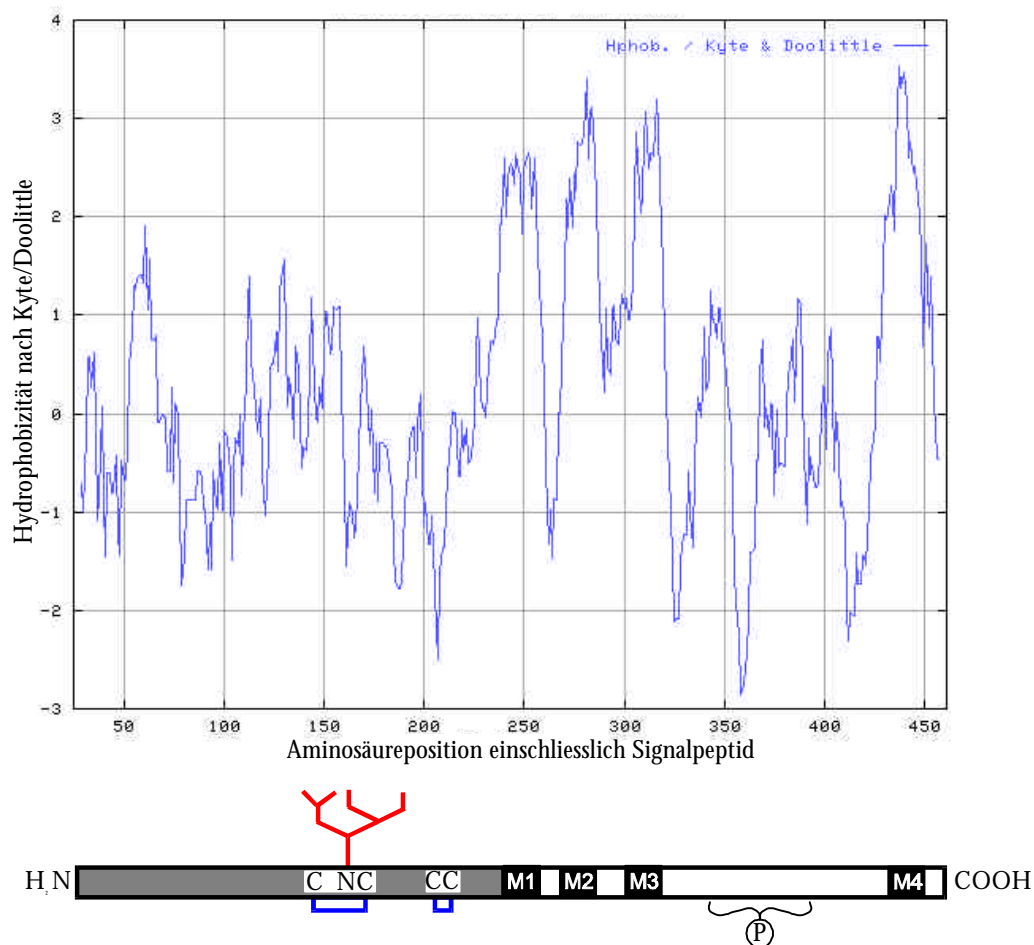


Abbildung 3: oben: Hydrophathiediagramm der  $\alpha$ -Untereinheit des nAChR aus *Torpedo marmorata* berechnet nach Kyte&Doolittle; je größer die Werte auf der Y-Achse, desto hydrophober ist der Bereich um die entsprechende Aminosäure; auf der X-Achse sind die Aminosäurepositionen angegeben ermittelt aus der cDNA (SWISS-Prot-Code:P02711) beginnend bei 25 (1-24: Signalpeptid), der ersten Aminosäure der  $\alpha$ -Untereinheit des Rezeptors. unten: Schematische Darstellung der Transmembranorganisation der  $\alpha$ -Untereinheit des nAChR mit den beiden Disulfidbrücken (blau/C für Cystein) und der Glycosylierungsstelle (rot/N für Asparagin) innerhalb der Liganden-bindungsstelle und der Phosphorylierungsregion (P) im cytosolischen Bereich sowie den 4 Transmembranomänen M1 bis M4. Die im Rahmen der Doktorarbeit behandelte Ligandenbindungsdomäne ist grau unterlegt, reicht vom N-Terminus bis zur ersten Transmembranomäne M1 und umfaßt 209 Aminosäuren.



## 1.2 Der Aufbau des nikotinischen Acetylcholin Rezeptors aus *Torpedo marmorata*

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor ist in drei Bereiche gegliedert: den intrazellulären, den extrazellulären und der transmembranen Bereich (Abbildung 3 unten und Abbildung 4). Alle Untereinheiten besitzen aufgrund ihrer Homologie den gleichen Aufbau.

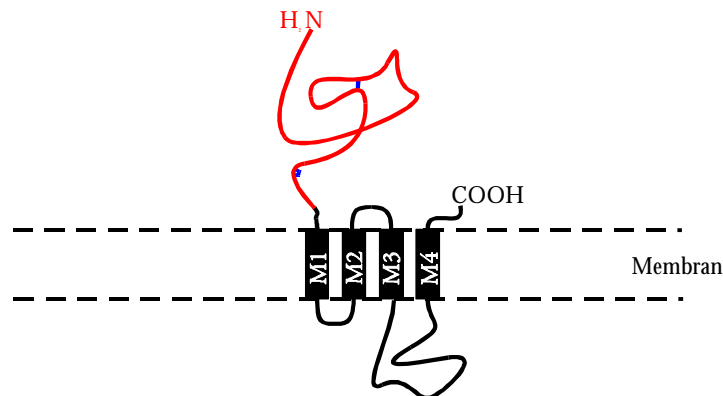


Abbildung 4: Anordnung der einzelnen Bereiche der  $\alpha$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors innerhalb der Lipidmembran. Die N-terminale Domäne (rot) mit den zwei Disulfidbrücken (blau) liegt extrazellulär, die 4 Transmembranomänen M1 bis M4 sind zwischen M3 und M4 durch den cytosolischen Teil der Untereinheit getrennt. Der C-Terminus jeder Untereinheit liegt wieder im Extrazellulärraum.

### 1.2.1 Der cytosolische Bereich des nAChR

Der cytosolische Bereich einer Untereinheit besteht aus einer sehr kurzen Sequenz zwischen den Transmembranregionen M1 und M2 (Abbildung 4) und einer längeren Sequenz (je nach Untereinheit zwischen 109-142 Aminosäuren groß) zwischen M3 und M4. Dieser Bereich ist wichtig für die Bildung von Acetylcholinrezeptorclustern (lokale Anhäufung von nAChR in der Lipidmembran) und deren Befestigung an das Cytoskelett über das Rapsyn- Protein (receptor associated protein of the synapse; 43 kDa).<sup>9</sup> Die cytosolische Domäne (zwischen M3 und M4) ist mit dafür verantwortlich, dass nur Kationen den Kanal passieren und Anionen sowie größere Moleküle davon abgehalten werden.<sup>10</sup> Dies wird dadurch erreicht, dass die Ionen, vor ihrem Eintritt in den Ionenkanal, im cytosolischen Bereich schmale (8 Å breit, 15 Å lang), transversale Kanäle passieren müssen. Diese führen zu einem 20 Å breiten zentralen Hohlraum, der in den Kanal mündet. Dieser Hohlraum wird von den intrazellulären Domänen aller Untereinheiten umschlossen (Abbildung 6). Der intrazelluläre Teil des Rezeptors weist eine negative Nettoladung auf. Auffällig ist eine Sequenz von vier negativ geladenen Aminosäuren (Glu377, Glu384, Glu391, Glu398 für  $\alpha$ ), die in einer als amphipatische  $\alpha$ -Helix vorhergesagten

Struktur lokalisiert sind.<sup>11</sup> In einer  $\alpha$ -Helix ist jeder Aminosäurerest um  $100^\circ$  und um 0,15 nm entlang der Helixachse versetzt (Abbildung 5).

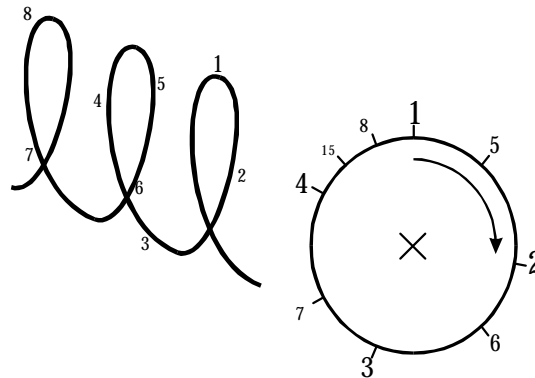


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Anordnung der Aminosäurereste in einer  $\alpha$ -Helix. links: Seitenansicht, rechts: Frontansicht der  $\alpha$ -Helix. Jede Aminosäure ist um  $100^\circ$  und um 0,15 nm entlang der Helixachse versetzt. Die Zahlen stehen für die einzelnen Aminosäurereste (1 bis 8, 15 als nächste Aminosäure einer heptoiden Sequenz).

Somit liegen Aminosäuren, die in der Primärsequenz sieben Reste auseinanderliegen auf der gleichen Seite der Helix. Die vier negativ geladenen Carboxylgruppen, die auf einer Seite der  $\alpha$ -Helix liegenden Glutamatreste, üben so eine gerichtete elektrostatische Anziehung aus, die Kationen leiten kann. Dabei ist auch noch die Tatsache interessant, dass die entsprechenden Aminosäuren im anionenselektiven Glycin-Rezeptor positiv geladene Seitenketten besitzen (Lys371, Lys378, Lys385, Arg392).<sup>12</sup>

Weiterhin befinden sich in der intrazellulären Domäne mehrere Phosphorylierungsstellen, die durch eine cAMP-abhängige Kinase (PKA), Proteinkinase C sowie durch eine Tyrosinkinase phosphoryliert werden<sup>13</sup> und dadurch Modulationen des Rezeptors von der cytosolischen Seite ermöglichen.

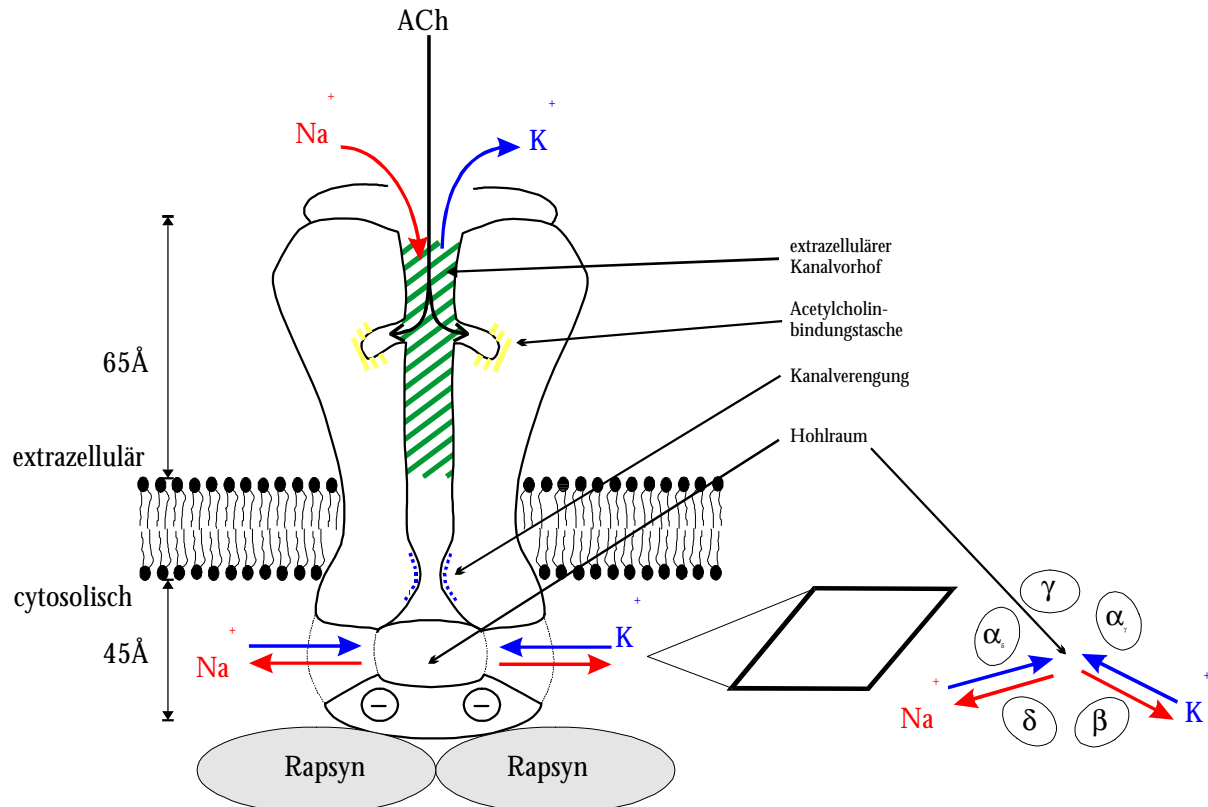


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Architektur des nAChR bei geöffnetem Kanal; Links abgebildet ist der 20 Å breite Vorhof (grün) des extrazellulären Teils des Rezeptorkanals mit den beiden Bindungstaschen (gelb), zu denen jeweils ein schmaler, 10-15 Å langer Kanal führt. In der Kanalpore selbst sitzt eine Verengung (blau), die bei inaktivem Rezeptor den Kanal verschliesst. Auf der cytosolischen Seite befindet sich der Kanalausgang in Form eines ca 20 Å großen Hohlraums, der durch schmale Kanäle mit dem Intrazellulärraum verbunden ist. Der cytosolische Teil besitzt eine negativen Nettoladung; grau: an den Rezeptor assoziiertes Rapsyn Protein. Rechts: vertikaler Schnitt auf Höhe des intrazellulären Hohlraums. Dieser wird von Teilen der cytosolischen Domänen jeder Untereinheit umrahmt.<sup>10,14</sup>

### 1.2.2 Die Transmembrandomänen des nAChR

Die vier Transmembrandomänen (M1-M4) jeder Untereinheit bestehen aus 19-27 Aminosäuren mit hydrophobem Charakter. Sie sind in jeder Untereinheit so angeordnet, dass M1, M3 und M4 (die hydrophobste Sequenz) der Lipidschicht zugewandt sind.<sup>7</sup> Dies wurde dadurch gezeigt, dass Aminosäuren aller drei Elemente durch in der Lipidmembran gelöste, unpolare, vernetzende Substanzen markiert wurden<sup>15</sup>. Die hydrophile Seite der Transmembranregion M2 jeder Untereinheit bildet die Kanalpore (Abbildung 2 mitte und rechts). Sie ist damit wasserlöslichen (polaren), quervernetzenden Substanzen zugänglich.<sup>2</sup> Ursprünglich wurde für alle Transmembranregionen (M1 bis M4) eine  $\alpha$ -helicale Sekundärstruktur postuliert. Neuere Forschungsergebnisse liefern aber Hinweise für eine mögliche  $\beta$ -Konformation von M1 und

M3.<sup>7,16,20</sup> Die Kanalpore selbst ist im Vergleich zum 20 Å durchmessenden Vorhof etwas schmaler (ca. 10 bis 15 Å). Sie besitzt im geschlossenen Zustand im unteren Drittel eine Verengung, die durch ein oder zwei Aminosäurereste (Val und/oder Leu-Ringe) der jeweiligen M2-Domäne, die in den Kanal ragen, gebildet wird und den Kanal verschließt.<sup>7</sup> Die Ionenselektivität des Rezeptors wird auch durch Aminosäurereste innerhalb des Kanals beeinflusst: So kann man diesen vom Kationen- in einen Anionenkanal umwandeln, in dem man Val251 und Glu237 (Aminosäuren in M2) durch die entsprechenden Aminosäuren (Thr und Ala) des anionenselektiven Glycinrezeptors ersetzt.<sup>17</sup>

### 1.2.3 Der extrazelluläre Bereich

Der extrazelluläre Bereich (EZB) des Rezeptors besteht hauptsächlich aus dem N-terminalen Fragment (im Falle der  $\alpha$ -Untereinheit; Aminosäuren 1-209). Ausserdem liegen noch eine kleine Sequenz zwischen den Transmembrandomänen M2 und M3 und der kurzen C-terminalen Bereich auf der extrazellulären Seite der Lipidmembran (Abbildung 4). Die beiden zuletzt genannten liefern keinen nennenswerten Struktur- und Funktionalitätsbeitrag zur Ligandenbindung.<sup>18</sup> Der extrazelluläre Bereich der  $\alpha$ -Untereinheit besitzt eine Glykosylierung bei Asn141 und zwei Disulfidbrücken bei Cys128/Cys142 und Cys192/Cys193. Auf den nicht- $\alpha$  Untereinheiten befinden sich ebenfalls Glykosylierungsstellen (z.B.  $\delta$ 70,  $\delta$ 143 und  $\delta$ 208).<sup>19</sup> Der grösste Teil des Rezeptors (>50%) sitzt extrazellulär und ragt 65 Å aus der Plasmamembran heraus (Abbildung 6).<sup>20</sup> Alle fünf EZB umschließen einen Kanalvorhof mit 20 Å Durchmesser (Abbildung 6, grün markiert), der den Eingang zum Ionenkanal bildet. Die Bindung des Liganden Acetylcholin findet hauptsächlich an der  $\alpha$ -Untereinheiten statt, der Ligandenbindungsdomäne (LBD). Die LBD beinhaltet die N-terminalen Aminosäuren 1-209 der  $\alpha$ -Untereinheit bis zur Transmembrandomäne M1. Dabei wurden drei unterschiedliche Bereiche der LBD in der Primärsequenz durch Photoaffinitätsmarkierungs- und Mutationsstudien als an der Acetylcholinbindung beteiligt identifiziert ( $\alpha$ 86-93,  $\alpha$ 149-154 und  $\alpha$ 190-198).<sup>21,2,22,23</sup> Zu dieser Bindungsstelle tragen ausser der  $\alpha$ -Untereinheit auch noch Bereiche aus den benachbarten extrazellulären Bereichen der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten bei (34, 55-59, 113-119 und 174-180).<sup>24,23</sup> Dadurch existieren zwei nicht äquivalente Acetylcholinbindungsstellen pro Rezeptor ( $\alpha/\gamma$  und  $\alpha/\delta$ ). Dies äussert sich in für die  $\alpha/\gamma$ - und  $\alpha/\delta$ -Bindungsstelle unterschiedlichen Ligandenaffinitäten (z.B. für den kompetitiven Antagonisten d-Tubocurare:  $\alpha/\gamma$ -K<sub>D</sub> 12 nM im Vergleich zu  $\alpha/\delta$ : 240 nM bezogen auf den

gesamten Rezeptor)<sup>25</sup>, sowie durch eine zweistufige Dissoziation von gebundenem  $\alpha$ -Neurotoxin<sup>26</sup>. Der Kanal öffnet sich erst, wenn an beide extrazellulären Bindungsstellen ( $\alpha/\gamma$  und  $\alpha/\delta$ ) Acetylcholin gebunden ist.

Die räumliche Struktur des Rezeptors ist durch elektronenmikroskopische Studien an in amorphem Eis schockgefrorenen rezeptor-reichen Membranen bis auf 4,6 Å aufgelöst worden.<sup>10</sup> Dabei sind zwei Ausbuchtungen in den LBD der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten zu erkennen (Abbildung 6, gelb), die durch zwei 10-15 Å lange Tunnel mit dem wassergefüllten Vorhof des Ionenkanals (Abbildung 6, grün) verbunden sind. Diese Ausbuchtungen sind nur in den  $\alpha$ -Untereinheiten vorhanden und stellen die Acetylcholinbindungsstellen dar. Sie besitzen ähnliche aber nicht gleiche Strukturen, die das Vorhandensein von Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität für d-Tubocurare und Acetylcholin erklären könnten.<sup>10</sup> Durch die Tunnel kann das Acetylcholin die Bindungsstelle in der Ausbuchtung erreichen, da sie ähnliche Eigenschaften aufweisen, wie die für die Acetylcholinesterase nachgewiesene „Schlund“-Struktur, die dort das positiv geladene Acetylcholin durch aromatische Aminosäurereste wie ein „Staubsauger“ anzieht.<sup>27</sup> Ebenso wie in der Acetylcholinesterase ist auch im Acetylcholinrezeptor die Bindungsstelle (bzw. das aktive Zentrum) in Nachbarschaft zu einer analog aufgebauten  $\beta$ -Faltblatt-Struktur.

Außer der Acetylcholinbindungsstelle beinhaltet die LBD der  $\alpha$ -Untereinheit noch einen Bereich mit stark immunogenem Charakter (MIR, main immunogenic region), der bei der Autoimmunerkrankung *Myasthenia gravis* als Bindungsort vieler auto-Antikörper der Patienten identifiziert wurde.<sup>28</sup> Weiterhin ist der extrazelluläre Bereich des Rezeptors essentiell für die richtige Assemblierung der einzelnen Untereinheiten des nAChR.<sup>29</sup>

Ausserdem binden so unterschiedliche Substanzen wie das bereits oben erwähnte d-Tubocurare, Nikotin ( $K_D$   $10^{-7}$  M), Physostigmin, Adenosintriphosphat, Epibatidin ( $K_D$   $10^{-5}$  M), Methyllycaconitin ( $K_D$   $10^{-5} - 10^{-6}$  M) und Anatoxin-a ( $K_D$   $10^{-7}$  M) an die LBD des nAChR und regulieren dadurch die Rezeptorfunktion. Darunter versteht man unter anderem die Frequenz und Dauer der Rezeptorkanalöffnung und die Desensibilisierung des Rezeptors.<sup>30,31</sup>

Studien an  $\alpha 7/5HT_3$ -chimären-Rezeptoren haben gezeigt, dass die LBD des nAChR in der Lage ist ihre Struktur und damit ihre Ligandenbindungseigenschaften selbständig zu bilden: Die  $\alpha 7/5HT_3$ -Rezeptoren wurden in Oozyten exprimiert und bestehen aus der LBD der  $\alpha 7$ -Untereinheit des nAChR (eines homopentamere bildenden nAChR-Subtyps) und dem

transmembranen und cytosolischen Bereich des auch zur Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle gehörenden 5HT<sub>3</sub>-Rezeptors. Diese Chimäre bildete in den Oozyten funktionelle Ionenkanäle, die die Kanaleigenschaften des 5HT<sub>3</sub>-Rezeptors aufweisen, aber durch Acetylcholin und nicht durch Serotonin aktiviert werden.<sup>32</sup> Das gleiche gilt für  $\alpha$ 4-5HT<sub>3</sub>-Chimären-Rezeptoren.<sup>33</sup> Aufgrund der grossen Homologie der  $\alpha$ -Untereinheiten untereinander kann die Fähigkeit der LBD, selbständig die native Struktur zu bilden, den Ligandenbindungsdomänen der  $\alpha$ -Untereinheiten aller Subtypen zugeschrieben werden

### 1.3 Ein Rezeptorfragment des nikotinischen Acetylcholinrezeptors

Trotzdem nun schon über 30 Jahre auf dem Gebiet des nikotinischen Acetylcholinrezeptors geforscht wurde, ist es immer noch nicht gelungen, die Struktur des Rezeptors bis auf atomare Ebene aufzulösen, da man nicht in der Lage war Rezeptorkristalle zu züchten, die für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet waren (s.u.). Das gilt auch für die anderen Mitglieder der Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Dieses Wissen ist aber unerlässlich, um genau zu verstehen, wie der Rezeptor Liganden, wie Agonist (Acetylcholin) und Antagonist (z.B. d-Tubocurare) bindet und unterscheidet, oder wie es dazu kommen kann, dass der Rezeptor, wenn er längere Zeit einer erhöhten Acetylcholinkonzentration ausgesetzt ist, desensibilisiert und damit keine Kanalöffnung mehr auslöst, oder wie die unterschiedlichen Pharmakologien der einzelnen nAChR-Subtypen zustande kommen (z.B. bindet Methyllycaconitin [Abbildung 16] an neuronale nAChR 1000 mal stärker als an den muskulären nAChR). Ein besseres Verständnis der Struktur des nikotinischen Acetylcholinrezeptors könnte auch helfen, die Ursache von Erkrankungen bei denen der Rezeptor involviert ist, wie *Morbus Alzheimer*, *Myasthenia Gravis* und Schizophrenie, besser zu verstehen und neue Heilungsmethoden aufzeigen.<sup>34</sup> Es wurden bereits viele Versuche unternommen, den Rezeptor zu kristallisieren, um eine Strukturauflösung mit Röntgenstrukturanalyse zu ermöglichen. Da der Rezeptor in Form von Membranfragmenten mit Detergentien solubilisiert werden muss, erschwert dies die Kristallisation. Man vermutet, dass durch die Solubilisierung mit Detergentien der Rezeptor nicht in **einer** stabilen Konformation vorliegt, sondern in **vielen** Strukturen, was die Bildung von Einkristallen genügender Qualität erschwert. Einzig ist es bisher gelungen schlauchförmige, „zweidimensionale Kristalle“ von Torpedomembranfragmenten zu züchten<sup>20,14,10</sup>, die räumliche Auflösung von

Elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser „Kristalle“ betrug aber nur 4,6 Å und war damit nicht genau genug, um die oben aufgeworfenen Fragen hinreichend zu untersuchen. Bei kleineren Molekülen (max. 25 kDa) ist es möglich die atomare Struktur durch mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie aufzulösen, dazu sind keine Einkristalle notwendig, der gesamte nAChR ist aufgrund seiner Größe von 290 kDa dafür aber nicht geeignet.

Um nun doch genauere Informationen über die Struktur des Rezeptors zu erhalten, kann man die Struktur einzelner Domänen des Rezeptors untersuchen. Eine mögliche Vorgehensweise ist die, die DNA der Domäne in einen Vektor zu klonieren und diese dann in Bakterien zu exprimieren (Abbildung 7). Das exprimierte Rezeptorfragment wird dann mit geeigneten Methoden isoliert und in seine native Struktur gefaltet (Renaturierung).<sup>35</sup> Dieses renaturierte Fragment kann dann biochemisch und strukturell untersucht werden, wodurch man Aufschluss über die Rezeptorfunktion (z.B. Ligandenerkennung) erhalten kann. Diese Vorgehensweise war bereits beim menschlichen Wachstumshormon Rezeptor<sup>36</sup> oder dem neonatalen F<sub>C</sub>-Rezeptor<sup>37</sup> erfolgreich und soll nun auf die Ligandenbindungsdomäne des nikotinischen Acetylcholinrezeptors angewendet werden.

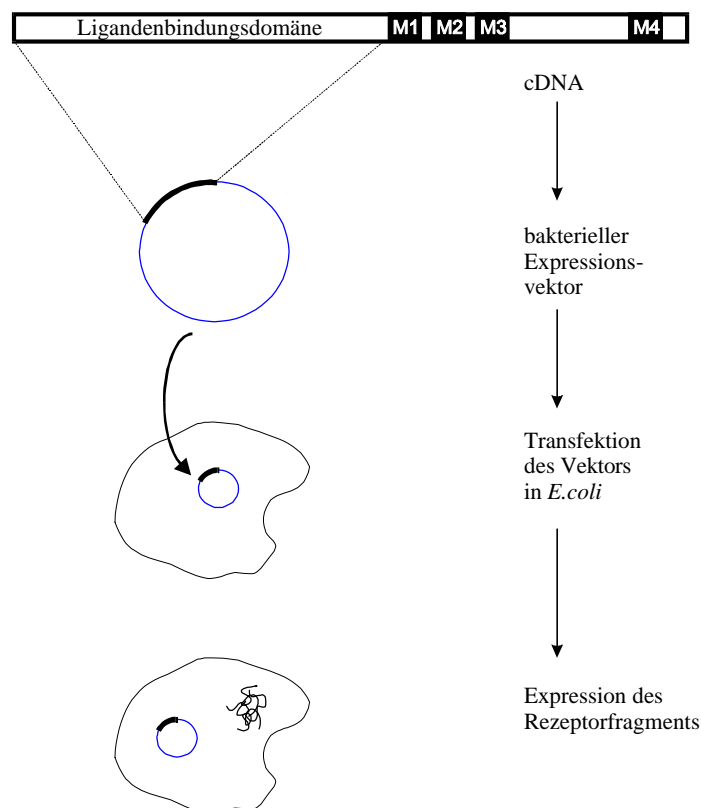


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Expression der Ligandenbindungsdomäne (LBD) in Bakterien; dazu wird die DNA der LBD des nAChR in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert, der dann in Bakterien transferiert wird. Dort wird die LBD durch Induktion des Promotors des Vektors (mit Isopropylthiogalactosid, IPTG) exprimiert und kann dann extrahiert werden.

Die am N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit sitzende Ligandenbindungsdomäne (Aminosäuren 1-209) verspricht mit den Hauptbindungsregionen für Liganden wie Acetylcholin, Tubocurare, Methyllycaconitin, Anatoxin,  $\alpha$ -Bungarotoxin oder vieler Auto-Antikörper von *Myasthenia-Gravis*-Erkrankten die meisten funktionellen Informationen über den nAChR zu liefern. Somit bietet die Aufklärung der Struktur der Ligandenbindungsdomäne ( $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub>) die Möglichkeit Informationen über die Art und Weise zu erhalten, wie der Rezeptor Agonisten und Antagonisten unterscheidet und wie diese genau binden.

### 1.3.1 Expression der Ligandenbindungsdomäne in Bakterien

Bei der Expression von Fremdproteinen in Bakterien kommt es häufig zur Bildung von sog. Einschlusskörpern (engl. Inclusionbodies).<sup>38,39</sup> Diese bestehen hauptsächlich aus falsch gefaltetem und damit unlöslichem rekombinanten Protein, sowie ribosomaler RNA, RNA-Polymerase und einigen anderen Proteinen.<sup>40</sup> Die Gründe für die Bildung von Einschlusskörpern sind noch nicht genau bekannt, man vermutet aber, dass das Cytoplasma als reduzierend wirkende Umgebung die stabilisierende Wirkung von Disulfidbrücken unterbindet und die in Bakterien nicht vorhandene Glykosylierung die Löslichkeit des Proteins negativ beeinflusst.<sup>41</sup> Ausserdem werden ektopisch exprimierte Proteine häufig unter der Kontrolle eines starken Promotors und damit mit einer hohen Expressionsrate synthetisiert. Die Faltungshelfer des Bakteriums (z.B. Chaperone) werden mit einer zu grossen Menge an zu faltenden Proteinen konfrontiert.<sup>42</sup> Die ungefalteten Proteine werden dann als inaktive Aggregate in Form von Einschlusskörpern abgelagert. Enthalten die rekombinanten Proteine Cysteine, so kann es zur Ausbildung von zufälligen Disulfidbrücken zwischen einzelnen Molekülen in den Einschlusskörpern kommen (schematische Einschlusskörperstruktur auf der linken Seite von Abbildung 9). Der biotechnische Vorteil dieser Einschlusskörper liegt darin, dass sie mit einfachen Mitteln (Lyse der Bakterien mit anschliessender Zentrifugation) zu isolieren sind. Da die darin enthaltenen rekombinanten Proteine in nicht definierten Strukturen vermischt mit anderen Proteinen und mRNA vorliegen, müssen diese zuerst gereinigt und entfaltet werden. Anschliessend muss das entfaltete Protein in einem Renaturierungsprozess in seine native Form gebracht werden.

Das ideale Expressionssystem für die LBD der  $\alpha$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors sollte das Fragment in ausreichender Reinheit und Konzentration und in seiner nativen Form exprimieren. Das schliesst die beiden Disulfidbrücken und die



Glycosylierung mit ein. Für die LBD des nAChR existiert ein solches Expressionssystem leider nicht. Deshalb muss die Expression der LBD in Bakterien mit der oben erwähnten Notwendigkeit der Renaturierung des Rezeptorfragments erfolgen.

### 1.4 Aufgabenstellung und Durchführung

Im Rahmen der Doktorarbeit soll nun erreicht werden, dass die Ligandenbindungsdomäne des muskulären nAChR in einem geeigneten Expressionssystem in ausreichender Menge und Reinheit hergestellt wird. Weiterhin soll die bakteriell exprimierte LBD ähnliche Eigenschaften (Bindung von  $\alpha$ -Bungarotoxin, d-Tubocurare, Nikotin, Anatoxin, MLA und Acetylcholin) wie die native LBD des Rezeptors aufweisen. Da sie in den Bakterien in nicht-nativer Struktur exprimiert wird, muss die LBD in einem genau auf sie abgestimmten Verfahren entfaltet und dann rückgefaltet werden.

Dazu muss die cDNA der LBD der  $\alpha$ -Untereinheit des muskulären nAChR in einem Vektor zur bakteriellen Expression in Bakterien transferiert werden. Die LBD-DNA ist in diesem Vektor unter der Kontrolle eines Promotors ( $P_{\Phi 10}$ ), der durch Induktion mit Isopropyl- $\beta$ -Galactosid (IPTG) die Expression einleitet. Die durch die IPTG-Induktion gebildeten LBD-enthaltenden Einschlusskörper werden dann isoliert und von Verunreinigungen befreit. Nach der Reinigung der Einschlusskörper besteht der erste Schritt der Renaturierung aus dem vollständigen Entfalten und Solubilisieren der in den Einschlusskörpern enthaltenen LBD. Dies geschieht in einer denaturierenden und schwefelbrücken-spaltenden Lösung (6M Guanidinium Hydrochlorid, 100 mM Dithioerythritol). Die Information für die dreidimensionale Struktur eines Proteins in seiner vorgegebenen Umgebung ist in seiner Aminosäuresequenz codiert.<sup>43</sup> Die Hauptaufgabe der Renaturierung besteht darin, ideale Umgebungsbedingungen zu schaffen, dass sich die LBD in ihre native Struktur faltet. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit angewandte Strategie der Rekonstitution der nativen Struktur der LBD nach deren Expression in Form von Einschlusskörpern in Bakterien war in ihrem Grundkonzept bereits bei anderen Proteinen erfolgreich (z.B. bakteriell produziertem menschlichem Gewebe-Plasminogen-Aktivator).<sup>44,45</sup> Sie ist im Labor von Prof. Dr. Rainer Rudolph, Institut für Biotechnology, Martin Luther-Universität Halle entwickelt worden.<sup>35</sup> Für jedes Protein muss diese Rückfaltungsstrategie optimiert werden. Sie beruht auf drei Eigenschaften der Renaturierungslösung:

- Der Unterdrückung der unerwünschten Aggregationsreaktion: Während der Renaturierung der LBD durchläuft das Protein viele Faltungszwischenstufen, bei denen hydrophobe Bereiche auf der Proteinoberfläche exponiert sind. Diese können zu unerwünschten Aggregationsreaktionen führen. Dadurch, dass in der Renaturierungslösung die Konzentration der LBD sehr niedrig ist (weniger als 50µg/ml) wird die Aggregationreaktion unterdrückt (Abbildung 8). Die Aggregationsreaktion ist eine Reaktion zweiter Ordnung und wird damit durch höhere Konzentrationen begünstigt, während die Faltungsreaktion eine Reaktion erster Ordnung und damit unabhängig von der Konzentration ist. Ausserdem wird durch die niedrige Konzentration die erneute Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken unterdrückt, die ebenfalls zu Aggregationen führt.

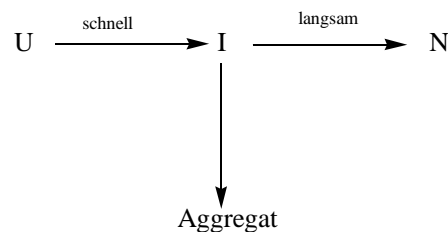


Abbildung 8: Vereinfachtes Reaktionsschema für Proteinrenaturierung: U ist das entfaltete Protein, I ist das Intermediat und N ist die native Form. Aggregate bilden sich zwischen den teilweise gefalteten Intermediaten, die noch exponierte hydrophobe Bereiche besitzen.

- Bei Proteinen mit Disulfidbrücken (die LBD enthält zwei Disulfidbrücken Abbildung 3) ist die Oxidation der Cysteine zu Cystinen und damit die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken bei der Rückfaltung von entscheidender Bedeutung.<sup>46</sup>

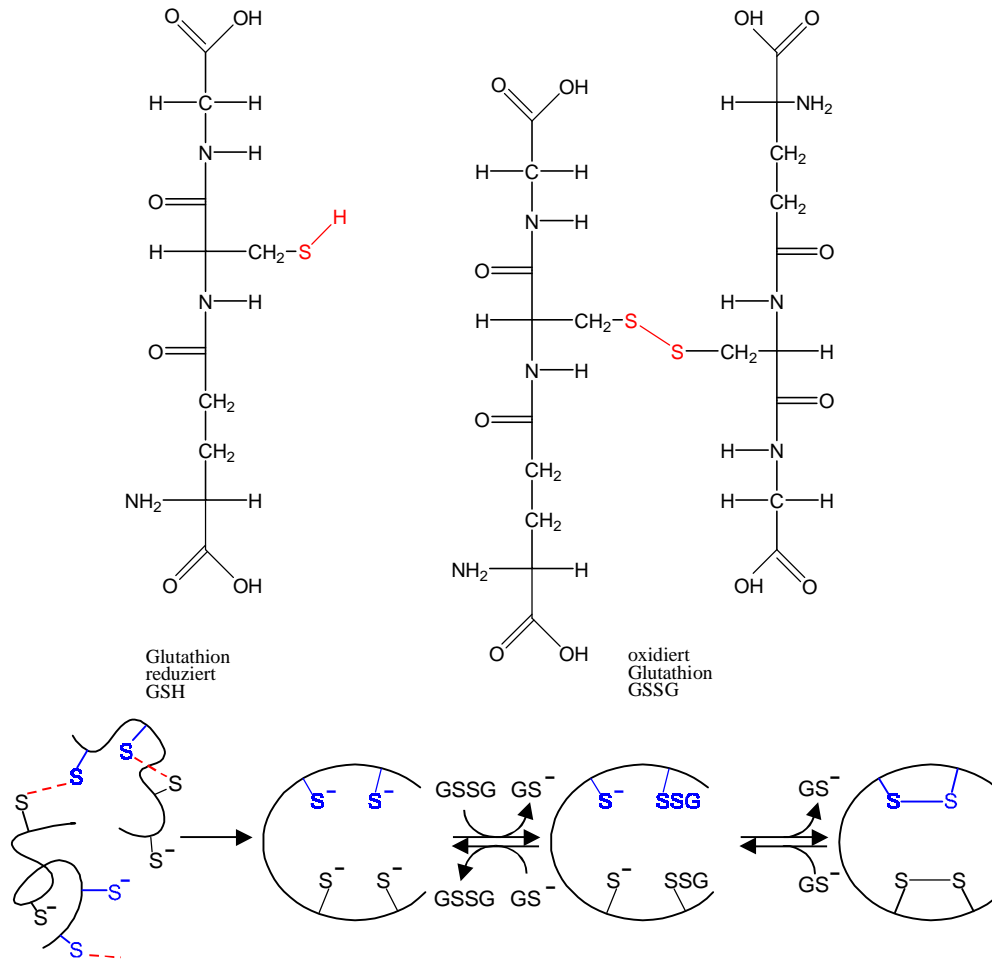


Abbildung 9: oben: chemische Formel der reduzierten (links) und oxitierten (rechts) Form des Glutathions; unten: Schema der ersten Schritte der Renaturierung: (von links nach rechts) Die Solubilisierung der Einschlusskörper durch Reduktion der Disulfidbrücken und Aufbrechen der hydrophoben Wechselwirkungen mit DTE und Guanidiniumhydrochlorid. Die zwei Schritte rechts stellen das oxidoshuffling Systems dar, bei dem das oxidierte und reduzierte Glutathion die Proteindisulfidbrücken so lange öffnet und schließt bis der native Zustand, erreicht ist. Nichtnative Disulfidbrücken sind mit einer roten Linie dargestellt. Im nativen Zustand verbrückte Cysteine sind in gleichen Farben abgebildet.

Bei der in dieser Doktorarbeit angewendeten Strategie wird die Bildung korrekter Disulfidbrücken durch ein sog. „oxido-shuffling“-System gewährleistet: Der Renaturierungslösung in der die solubilisierete, denaturierte LBD verdünnt wird (s.o.), ist Glutathion sowohl in oxidiertes als auch in reduzierter Form zugesetzt. Dieser Vorgang ist vorteilhafter als die früher häufig angewandte Oxidation durch Luftsauerstoff,<sup>35</sup> da die Disulfidbrücken beim „oxido-shuffling“-System immer wieder geöffnet und geschlossen werden, bis die native Struktur erreicht ist. Bei der Luftsauerstoffoxidation ist dies nicht möglich. Sie birgt auch die Gefahr der Bildung von höheren Oxidationsstufen. Deshalb ist der Renaturierungslösung auch ein Komplexbildner (Ethylendinitrilotetraessigsäure;

EDTA) zugesetzt, damit zweiwertige Metallionen wie  $\text{Cu}^{2+}$ , die die Oxidation der Cysteine durch Luftsauerstoff katalysieren, inaktiviert werden.

- Die Renaturierungslösung enthält faltungsunterstützenden Reagentien: Arginin erhöhte bei der Renaturierung von menschlichem Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) die Renaturierungsausbeute und unterdrückte die Aggregation.<sup>44</sup> Es besitzt eine Guanidino-Gruppe, destabilisiert die native Struktur aber nicht so stark wie dies bei Guaninuinimhydrochlorid der Fall ist. Die genaue Wirkung des Arginins bei Renaturierungen ist noch nicht geklärt, es wird aber diskutiert, dass es die Stabilität von Faltungsintermediaten, die zu Aggregaten führen, negativ beeinflusst.<sup>46</sup> Durch den Zusatz von Arginin konnte bei anderen Proteinen (tPA, Fab-Fragmente)<sup>44;47</sup> die Renaturierungsausbeute um mehr als 50% gesteigert werden.

Die Faltung kann als zweistufiger Prozeß beschrieben werden, bei dem in einem ersten Schritt (*in vitro* nach Entfernen des Denaturants) das Protein in einer schnellen Reaktion erster Ordnung in ein Faltungsintermediat übergeht, welches bereits große Elemente der Sekundärstruktur aufweist.<sup>48</sup> Der Übergang vom Intermediat zum nativen Protein ist der geschwindigkeitsbestimmende zweite Schritt (erster Ordnung Abbildung 8). *In vivo* dauert der Faltungsprozess einer Domäne zwischen Millisekunden und Sekunden, *in vitro* dauert der Renaturierungsprozess mehrere Stunden oder sogar Tage. Nachdem die solubilisierte LBD im Renaturierungspuffer, der ein Oxidoshuffling-System und faltungsunterstützende Substanzen enthält, auf weniger als 50µg/ml verdünnt wurde, muss sie langsam (48h) ihre native Struktur ausbilden. Anschliessend muss das Protein umgepuffert werden (durch Dialyse), um das Glutathion und das Arginin zu entfernen. Der Erfolg der Renaturierung muss anschliessend dadurch überprüft werden, dass man untersucht, inwieweit die renaturierte LBD die Eigenschaften des nativen muskulären nikotinischen Acetylcholinrezeptors besitzt. Dies bedeutet eine Analyse der physikalischen Eigenschaften (pI, Molekülgewicht, der Anteile an Sekundärstruktur durch Analyse der CD-Spektren) und der Bindungseigenschaften (von Bungarotoxin, Nikotin, Methyllycaconitin, Anatoxin, Tubocurare und Acetylcholin) und der Vergleich mit den Werten für den nativen Rezeptor. Der Erste Schritt der zu einer Kristallisation bzw. einer mehrdimensionalen NMR-Spektroskopischen Analyse führen könnte, ist die Aufkonzentrierung der LBD, da für beide Methoden Konzentrationen von mehr als 5 mg/ml benötigt werden. Da die Ligandenbindungsdomäne des nikotinischen Acetylcholinrezeptors aber einen hohen Anteil an lipophilen Aminosäuren enthält (siehe Hydropathiediagramm Abbildung 3) besteht bei einer Aufkonzentrierung die Gefahr, dass sich

Aggregate bilden. Die Bildung von Aggregaten kann man durch Größenausschlusschromatografie (z.B. FPLC mit einer Größenausschlussäule) erfassen. Sollte es sich zeigen, dass die renaturierte LBD solche Aggregate bildet, so bedeutet dies nicht unbedingt, dass die spätere Kristallisation unmöglich ist, es zeigt aber doch, dass es nicht einfach sein wird eine Struktur des Rezeptors zu erhalten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Name:	Spezifikation:	Hersteller:
$\alpha$ -Bungarotoxin		Sigma/Aldrich, Deisenhofen
$\alpha$ -Bungarotoxin, N-[propionyl- <sup>3</sup> H]propionylated	54-68 [Ci/mmol]	Amersham/Pharmacia
Ampicillin		Merck, Darmstadt
Anatoxin-a	Formel Abbildung 47	RBI
Antifoam A®	Silikonpolymer zur Schaumzerstörung	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Arginin		Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Atropin		ICN
Celtone® Algenlysat	enthält alle Nährstoffe (Aminosäuren, Vitamine usw.) die zur Bakterienaufzucht benötigt werden.	Martek
Chloramphenicol		Merck, Darmstadt
Complete Protease Inhibitor Cocktail	enthält PMSF, EDTA und verschiedene Proteaseinhibitoren	Boehringer Mannheim
D(+)-Sucrose	p.a.	Roth, Karlsruhe
DE81® Filterblätter	Diethylaminoethyl-cellulosefilter	Whatman
Dithioerythritol	p.a.	ICN
Dithionitrobenzoat, Natriumsalz (DTNB)		ICN
Dithiotreitol	p.a.	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
d-Tubocurare	Formel Abbildung 47	RBI
EDTA		Roth, Karlsruhe
Glutathion oxidiert (GSSG)		Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Glutathion reduziert (GSH)		Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Guanidinium Hydrochlorid	Prot grade	Roth, Karlsruhe
LMW-Standard	Phosphorylase b (94kD), BSA (67kD), Ovalbumin (43kD), Carboanhydrase (30kD), Sojabohne Trypsin Inhibitor (20kD), $\alpha$ -Lactalbumin (14,4kD)	Pharmacia
Methyllycaconitin	Formel Abbildung 47	RBI
Nikotin	Formel Abbildung 47	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Peptone 140	Bestandteil von Nährmedien für Bakterien	Gibco BRL
PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid		Sigma/Aldrich, Deisenhofen

## Material und Methoden

---

Proccain		RBI
Solvable®	Lösung zum Solubilisieren von DE81-Filtern; enthält: NaOH und verschiedene nicht näher bezeichnete Tenside	Canberra Packard GmbH, Dreieich
Superdex® 75	Dextrose-Substrat für die Gelfiltration mit einer optimalen Auflösung für Proteine zwischen 3 und 70 kD	Pharmacia-Upjohn
Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold®		Canberra Packard GmbH, Dreieich
Triton X-100®		Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Yeast-Extract	Bestandteil von Nährmedien für Bakterien	Gibco BRL

Soweit nicht anders vermerkt, wurde Ionenaustauscher gereinigtes Wasser (10 MΩ) verwendet. Alle anderen verwendeten Substanzen und Chemikalien der Firmen Fluka, Merck, Roth, Pharmacia-Upjohn, Sigma und Serva waren von p.A. Qualität.

2.1.2 Proteine und Vektoren

Das cDNA-Fragment, kodierend für die Aminosäuren 1-209 der  $\alpha$ -Untereinheit des nAChR aus *Torpedo marmorata*, war durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus einem vollständigen cDNA-Klon der  $\alpha$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors aus *T. marmorata* (bereitgestellt von Dr. Kretschmer, Bayer) vervielfältigt worden. Die bei der PCR verwendeten Primer (komplementär zu den Nukleotidsequenzen 1-18 und 610-627) fügten dabei eine NdeI und eine BamHI Schnittstellen ein, über die die cDNA in den pET3a-Vektor eingefügt wurde. Diese Arbeiten waren von Dr. Martin Rentrop, Institut für Physiologische Chemie, Abt. Prof. Maelicke durchgeführt worden.

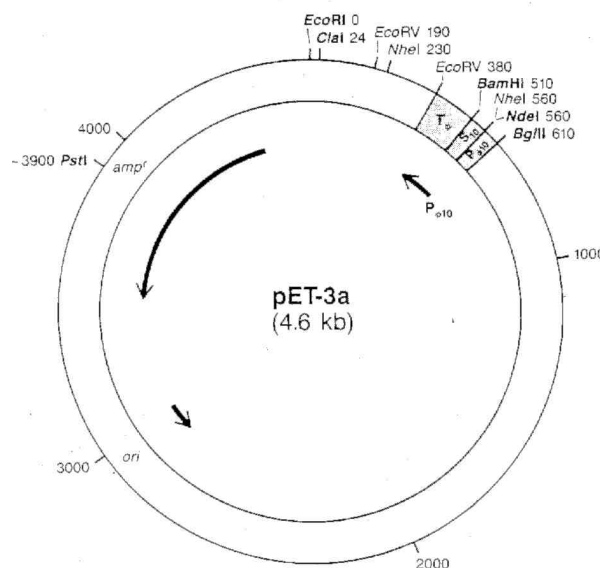


Abbildung 10: Der pET-3a Vektor<sup>49</sup>

1	11	21	31	41	51
SEHETRLVANLLENYNKVI R PVEHHTHFVDITVGLQLIQ LINVDEVNQ IVE' TNVRLRQQW					
61	71	81	91	101	111
IDVRLRWNPADYGGIKKIRLPSDDVWLPDLVLYNNADGDFAI VHMTKLLLDYTGKIMWTP					
121	131	141	151	161	171
PAIFKSYCEIIVTHFPFDQQNCTMKLGIWTDGTKVSI SPESDRPDLSTFMESGEWVMKD					
181	191	201	209		
YRGWKHWVYYTCCPDTPYLDITYHFIMQR					

Tabelle 2.1-a: Die Sequenz der 209 Aminosäuren der LBD der  $\alpha$ -Untereinheit des nAChR aus *Torpedo marmorata* im Einbuchstabencode.



2.1.3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Hohlfiber-Dialysem modul	Variperm L Online (Abbildung 11)	YMC-Kronlab
Geltrocknungsapparatur	Slab Gel Dryer Model SE1160	Hoefer, Heidelberg
Ultrafiltrationsmodul	Mini-Ultrasette (Abbildung 12)	Pall-Gellman
Isoelektrische-Fokussierungsapparatur	Multiphor II	Pharmacia-Upjohn
Zentrifugenaufkonzentratoren mit 10ml Startvolumen	Macrosep Aufkonzentratoren	Pall-Gellman
UV-Vis-Spektrometer	SpectraMax Plus UV-VIS Spektrometer	Molecular Devices
Aufkonzentrierungssystem	Provario bestehend aus Schlauchpumpe, Druckmesser, Drosselventil und Mini-Ultrasette	Pall-Gellman

2.2 Methoden

Alle Zentrifugationen in diesem Abschnitt wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 4°C durchgeführt.

2.2.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Zusammensetzung der verwendeten Medien:

**LB-Medium**

10 g	Peptone 140
5 g	Yeastextract
10 g	NaCl
Mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen; mit 2 M NaOH auf pH 7,4 einstellen; autoklavieren; Antibiotika wurden erst nach dem Autoklavieren zugesetzt	

**FB-Medium**

50 ml	1 M CaCl <sub>2</sub> -Lsg
50 ml	2 M KCl-Lsg
10 ml	1 M Kaliumacetat-Lsg. pH 7,5
100 g	Glycerin wasserfrei
Mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen; ergibt pH 6,2; autoklavieren	

**LB-Platten**

100 ml	LB-Medium
1,5 g	Agar
Erhitzen und je 20 ml in Petrischalen abkühlen lassen	

**Bedarfsweise zugesetzte Antibiotika**

100 µg/ml	Ampicillin (amp)
130 µg/ml	Chloramphenicol (chl)

Kompetente *E. coli*-Bakterien BL21(DE3)pLysS wurden nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode<sup>50</sup> hergestellt. Durch die Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> werden die Bakterien für die DNA aufnahmefähig gemacht.

Zu diesem Zweck wurden die Bakterien in einer Flüssigkultur mit LB-Medium bei 37°C in einem Schüttler bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,6 (bei 600 nm) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Bakterien wurden 10 min bei 2000\*g abzentrifugiert, in 1/3 Kulturvolumen FB-Medium resuspendiert und 30-45 min inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der gequollenen und nun sehr empfindlichen Zellen (5 min bei 1200\*g) wurde der Niederschlag erneut in 1/12 Volumen FB-Medium vorsichtig aufgenommen und 30 min inkubiert. Dann wurden die Bakterien bei -80°C aufbewahrt.

Der pET3a-Vektor mit dem Insert des extrazellulären Teils der α-Untereinheit des nAChRs (20-50 ng) wurde mit 50-200 µl kompetenten Bakterien versetzt und 5 min auf Eis gestellt. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde dem Ansatz 500 µl LB-Medium zugesetzt und dieser wurde für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf eine LB<sub>amp,chl</sub> (das pLysS-Plasmid enthält ein Chloramphenicol-Resistenzgen) ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

*2.2.2 Aufzucht der Bakterien auf LB<sub>Amp,Chl</sub>-Platten*

**TE-Puffer**

10 mM	TRIS
1 mM	EDTA
Mit HCl auf pH 8 einstellen	

LB-Platten (enthalten 20 ml Medium) wurden mit 2,6 mg Chloramphenicol und 2 mg Ampicillin gelöst in Ethanol bzw. TE-Puffer benetzt und bei 37°C im Trockenschrank für 20 min inkubiert. Danach wurden die in Glycerin-Stocks bei -80°C aufbewahrten Bakterien aufgetaut und mit einem sterilen Glasstab auf die LB<sub>Amp,Chl</sub>-Platten appliziert. Anschließend wurden die Platten ü.N. bei 37°C inkubiert und dann bei 6°C im Kühlschrank gelagert.

### 2.2.3 Aufzucht und IPTG-Induktion der transformierten Bakterien in LB-Flüssigkulturen

Die Expression des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub>-Fragments wurde mittels des T7-Expressionssystems nach IPTG-Induktion von transformierten BL21(DE3)pLysS-Bakterien durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die transformierten Bakterienklone in einer Flüssigkultur mit LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika (100 $\mu$ g Ampicillin, Amp-Resistenzgen ist auf dem pET3a-Vektor; sowie 130 $\mu$ g Chloramphenicol, Chl-Resistenzgen ist auf dem pLysS-Vektor den die Bakterien bereits enthalten) bei 37°C im Schüttler kultiviert. Um optimale und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden zuerst 3 ml Startkulturen verwendet, die dann auf 100 ml überimpft wurden. Anschließend wurde der eigentliche Produktionsansatz mit der 100ml Startkultur auf 0,1 OD<sub>600</sub> angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 bis 0,9 kultiviert. Dann wurde der Ansatz auf 1 mM IPTG eingestellt und für weitere 3 h bei 37°C geschüttelt.

### 2.2.4 Herstellung von Einschlusskörpern (Inclusionbodies) mit M9-Minimalmedium

#### M9-5\* Salz

42,5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O
15 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5 g	NH <sub>4</sub> Cl (bzw. <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl)
2,5 g	NaCl
mit Wasser auf 1 l auffüllen und in 200 ml Aliquots autoklavieren	

#### Celtonelösung

2 g	Celtone Algenlysat
in 40 ml Wasser lösen (30 min rühren) und nach 1 h zentrifugieren, 8000*g; anschließend mit 0,2 $\mu$ Filter filtrieren.	

#### Celtone-M9-Medium

200 ml	M9-5*Salz (autoklaviert)
20 ml	20% (w/v) Glucoselösung (sterilfiltriert)
20 ml	Celtonelösung (sterilfiltriert)
760 ml	Wasser
2 ml	1 M MgSO <sub>4</sub> (autoklaviert)
100 mg	Ampicillin
130 mg	Chloramphenicol
0,1 ml	1 M CaCl <sub>2</sub> (autoklaviert)
Alles in der Sterilbank ansetzen, da das Medium nicht autoklaviert werden kann.	

Das Medium wurde in der Sterilbank angesetzt. Ansonsten wurde wie in 2.2.3 vorgegangen.

2.2.5 Ernten der Einschlusskörper

**Lyse-Puffer**

10 Mm	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	NaCl
10 mM	TRIS
Mit HCl auf pH 8 einstellen	

Die Bakteriensuspension aus 2.2.3 wurde bei 2000\*g im GSA-Rotor bei 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde dann mit 25 ml Lyse-Puffer pro Gramm Pellet resuspendiert und mit dem Glashomogenisator (ca. 20 x) bei 4°C bearbeitet. Daraufhin wurde 5 min mit dem Ultraschallgerät auf Stufe 50/50 unter Argon und auf Eis sonifiziert. Dadurch wurde erreicht, dass das (durch pLysS) im Zellinneren enthaltene Lysozym freigesetzt wird, um die Bakterienwände zu zersetzen. Die Suspension wurde ü.N bei 10°C inkubiert und dann erneut homogenisiert und sonifiziert. Die Einschlusskörper wurden dann durch Zentrifugation bei 8000\*g im SS34 Rotor für 1h im Niederschlag separiert.

2.2.6 Reinigen der Einschlusskörper

**Waschpuffer Ix100**

10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	NaCl
10 mM	TRIS
0,1% (w/v)	Triton X-100
Mit HCl auf pH8 einstellen	

**Waschpuffer II**

100 mM	NaCl
10 mM	TRIS
3 M	Gdm-HCl (proteingrade)
Mit NaOH auf pH11 einstellen	

**Waschpuffer IIx100**

100 mM	NaCl
10 mM	TRIS
3 M	Gdm-HCl (proteingrade)
0,1% (w/v)	Triton X-100
Mit NaOH auf pH11 einstellen	

Der Niederschlag aus 2.2.5 wurde in 30 ml/g (pro Gramm bezieht sich auf dem Niederschlag) Waschpuffer Ix100 aufgenommen und mit einem Glashomogenisator auf Eis homogenisiert. Danach wurde bei 8000\*g für 30 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde dann in der gleichen Menge Waschpuffer Iix100 aufgenommen und anschließend wurde genauso verfahren wie oben (Homogenisierung und Zentrifugation). Dann wurde noch mit Waschpuffer II wie oben gewaschen und anschließend mit Lyse-Puffer homogenisiert. Zu dieser Suspension (normalerweise 50-60 ml) wurde zur Deaktivierung evtl. vorhandener Proteasen eine Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail zugesetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Dieser Cocktail enthält Proteaseinhibitoren, die hauptsächlich Serin- und Cystein-Proteasen inhibieren. Zur Entfernung des Proteaseinhibitors wurde dann bei 8000\*g für 30 min abzentrifugiert und der Niederschlag mit 50 ml Lyse-Puffer suspendiert. Abschließend wurde die Suspension bei 10000\*g 60 min zentrifugiert.

### 2.2.7 Solubilisierung

#### S(+)-Puffer

6 M	Gdm-HCl (protein grade)
100 mM	TRIS
10 mM	EDTA
100 mM	DTE
Mit HCl auf pH 8,5 einstellen	

#### S(-)-Puffer

6 M	Gdm-HCl (protein grade)
100 mM	TRIS
10 mM	EDTA
Mit HCl auf pH 8,5 einstellen	

Die gewaschenen Einschlusskörper aus 2.2.6 konnten bei -20°C mehrere Wochen gelagert werden.

500 mg der Einschlusskörper wurden in 50 ml S(+)-Puffer suspendiert. Durch 5 minütige Behandlung mit Ultraschall (Einstellung cycle 50/ power 50) unter Argon und auf Eis wurde eventuell vorhandene DNA zerstört. Anschließend wurde die Suspension bei 10000\*g für 60 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt das solubilierte Fragment und wurde dann in einen vorher befeuchteten Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 12000 kD) gefüllt und zweimal für je 24 h bei 4°C gegen 2 l S(-)-Puffer dialysiert. Dies diente der Entfernung des reduzierenden Dithioerythritols.

Zur Überprüfung der vollständigen Entfernung des DTEs wurde eine Analyse des zweiten Dialysats mit dem Ellmans Reagenz (Dithionitbenzoat, DTNB) durchgeführt. Sind im Dialysat noch freie SH-Gruppe vorhanden, so bildet das DTNB mit diesen eine bei 405 nm absorbierende Substanz (molarer Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{405\text{nm}} = 1353 \text{ [cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}]$  0 und Abbildung 14).

Die dialysierte Fragmentlösung wurde zur Entfernung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (1h 10000\*g). Zur Aufbewahrung wurde die Lösung in 5 ml Aliquots überführt und dann bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.8 Renaturierung

<b>R-Puffer (Renaturierungspuffer)</b>	
1 M	Arginin
100 mM	TRIS
10 mM	EDTA
5 mM	GSH
0,5 mM	GSSG
Mit HCl pH 9,5 einstellen	

Zur Herstellung des Renaturierungspuffers (R-Puffer) wurden Arginin, EDTA und TRIS in Wasser gelöst und anschließend auf pH 9,5 eingestellt. Dann wurde der Puffer auf Eis 1 h entgast und daraufhin mit Argon überschichtet, um jegliche spätere Oxidation des Fragments durch Luftsauerstoff auszuschließen. Als letztes wurden die *Oxido-Shuffling*-Reagenzien GSH und GSSG zugegeben.

Je 5 ml solubilisiertes Fragment aus 2.2.7 wurden in 1 l R-Puffer gelöst und 48 h bei  $10^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 2.2.9 Dialyse

<b>D-Puffer (Dialysepuffer)</b>	
100 mM	NaCl
10 mM	TRIS
10 mM	Sucrose
Mit HCl pH 7,4 einstellen	

Die Dialyse wurde mit Hilfe des Online Dialyse Moduls Variperm XL der Firma Kronlab im Kühlraum (4°C) durchgeführt (siehe Abbildung 11).

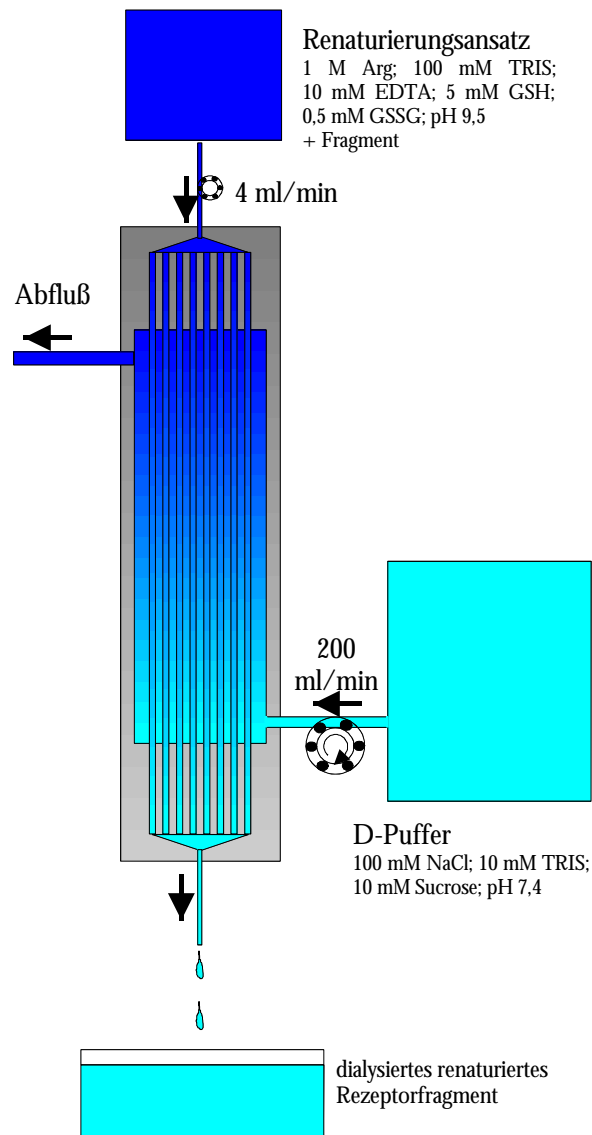


Abbildung 11: Schema der Gegenstrom-Dialyse-Apparatur

Vor Inbetriebnahme der Dialyse wurde die Anlage mit 1 l 0,1 M NaOH gespült, um evtl. vorhandene Ablagerungen zu entfernen. Dann wurde der D-Puffer-Kreislauf mit einer Geschwindigkeit von ca. 200 ml/min und anschließend der Renaturierungskreislauf mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/min gestartet. Beide Lösungen wurden, bevor sie in das Gegenstrommodul eintreten, durch einen Filter (5µm für den D-Puffer und 0,2 µm für den Renaturierungsansatz) gepresst, um zu verhindern, dass makromolekulare Verunreinigungen in die feinen Kapillare eindringen und diese verstopfen.

Dieser Vorgang wurde zwei Mal durchgeführt, um einen möglichst vollständigen Austausch des Lösungsmittels zu erreichen.

### 2.2.10 Aufkonzentrierung

Hierbei unterscheidet man zwischen großen Volumina (mehr als 200 ml), für die das Ultrafiltrationssystem Provario® (Pall-Gellman) eingesetzt wurde (siehe 2.2.10.1) und kleinen Volumina (weniger als 200 ml), bei denen mittels Zentrifugationsfiltration aufkonzentriert wurde (siehe 2.2.10.2).

#### 2.2.10.1 Aufkonzentrierung größerer Volumina

Das aus 2.2.9 erhaltene, hochverdünnte Rezeptorfragment wurde mittels einer Ultrafiltrationsanlage wieder auf eine Konzentration von mehreren hundert Mikrogramm/Milliliter angereichert. Der Vorgang wurde bei 4°C durchgeführt und dauerte für 1,6 l Ansatz (entspricht einem Startvolumen von 1 l im Renaturierungsansatz aus 2.2.8) ca. 6 h. Durch das Drosselventil am Ende der Ultrafiltrationseinheit wurde ein Druck von 2-2,5 bar erreicht, der zusätzlich mit den Verwirbelungsströmen im Innern der Einheit für eine Beschleunigung des Filtrationsvorgangs sorgte.

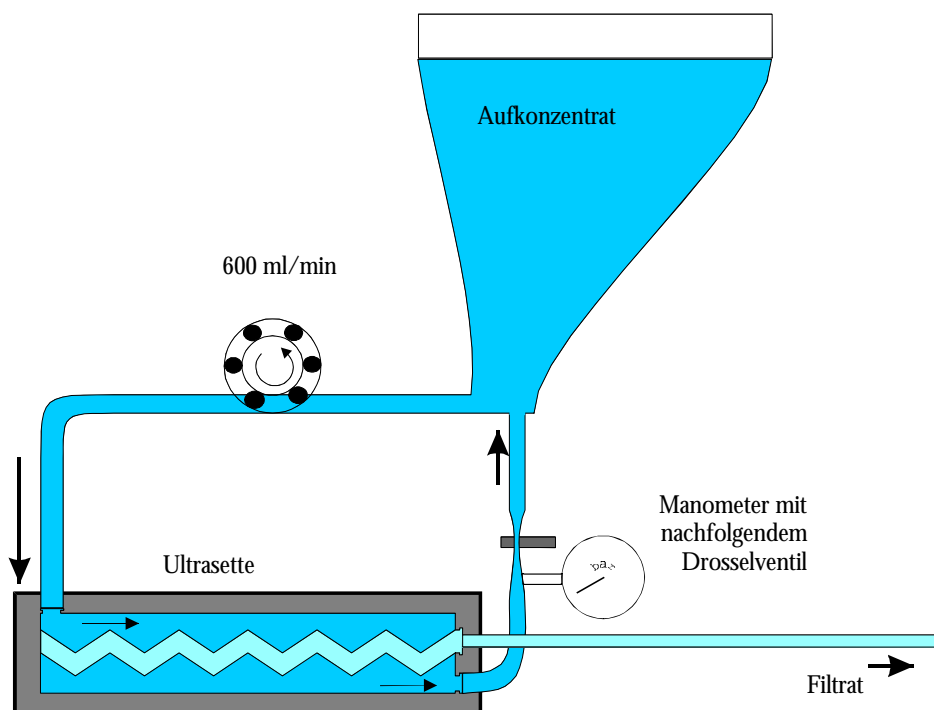


Abbildung 12: Schema der Aufkonzentrierungseinheit: Das Aufkonzentrat wird im Kreislauf (600 ml/min) immer wieder durch eine Cross-Flow-Apparatur gepumpt, in der durch Druck und Verwirbelungsströme eine optimale Aufkonzentrierungsrate erreicht wird.



Durch den vertikalen Fluß (600 ml/min) über die Filtrationsmembran wurde erreicht, dass diese nicht mit Sediment verstopft. Nachdem ein Aufkonzentratvolumen von ca. 50 ml erreicht war, wurde dieses bei 10000\*g für 1 h zentrifugiert, um mögliche unlösliche Bestandteile zu entfernen. Zur weiteren Aufkonzentrierung wurde die in 2.2.10.2 beschriebene Methode verwendet.

#### 2.2.10.2 Aufkonzentrierung kleinerer Volumina

Zur Aufkonzentrierung der kleinen Volumina (ca 20-50ml), die aus 2.2.10.1 anfallen, wurden Macrosep®-Aufkonzentratoren verwendet. Dabei wird die Proteinlösung durch die Zentrifugalkraft durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 8 kD gepresst. Falls erforderlich wurde vor Start der Aufkonzentrierung die entsprechende Menge Proteaseinhibitor zugefügt. Es wurde einerseits ein gewerblich erhältlicher Cocktail verwendet (complete-EDTA-free® Boehringer Mannheim, eine Tablette auf 50ml), andererseits wurden auch PMSF (Endkonzentration 0,1 mM) und EDTA (10 mM) zugesetzt. Die Lösungen wurden daraufhin ca. 30 min bei 4°C inkubiert und schliesslich bei 4°C und 2000\*g für 1 h im entsprechenden Aufkonzentratoren zentrifugiert.

#### 2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

##### Trenngelpuffer

375 mM	TRIS
0,1% (w/v)	SDS
Mit HCl pH 8,8 einstellen	

##### Sammelgelpuffer

125 mM	TRIS
0,1% (w/v)	SDS
Mit HCl pH 6,8 einstellen	

##### Reduzierender Probenpuffer

62,5 mM	TRIS
2% (w/v)	SDS
2% (v/v)	β-Mercaptoethanol
10% (w/v)	Glycerol
0,001% (w/v)	Bromphenolblau
Mit HCl pH 6,8 einstellen	

### Elektrodenpuffer

25 mM	TRIS
192 mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS
Mit HCl pH 8,3 einstellen	

### Sammelgel (4%)

1 ml	Acrylamidlösung (30%)
1,9 ml	Sammelgelpuffer
4,6 ml	Wasser
3 µl	TEMED
100 µl	0,1 % (w/v)APS-Lösung in Wasser (frisch angesetzt)
pH stellt sich ein	

### Trenngel (n%)

0,25*n ml	Acrylamidlösung (30%)
3 ml	Trenngelpuffer
9 – n*0,25 ml	Wasser
4,8 µl	TEMED
100 µl	0,1 % (w/v)APS-Lösung in Wasser (frisch angesetzt)
pH stellt sich ein	

Als Marker wurde der LMW-Standard (engl. *low-molecular weight*) von Pharmacia-Upjohn verwendet, der Proteine der Molekulargewichte 96, 67, 44, 30, 20 und 14,4 kDa (Phosphorylase b, BSA, Ovalbumin, Carboanhydrase, Sojabohnen Trypsin inhibitor und  $\alpha$ -Lactalbumin) enthält.

Die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach Lämmli<sup>51</sup> durchgeführt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) und des Radikalkettenträgers N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin bei Raumtemperatur gestartet. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und die Lösung vorsichtig mit Ethanol p.A. überschichtet. Dieses ist nach ca. 45 min auspolymerisiert und der Ethanol wurde entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel aufgetragen, welches ca. 20 min zur Polymerisierung benötigt. Die Proben wurden 1:1 mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, 5 min bei 90°C aufgeköcht und dann in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Der Elektrophoresevorgang wurde mit einer konstanten Spannung von 150 V durchgeführt. Für ein Gel mit den Ausmassen 60\*150\*1 mm (Höhe/Breite/Tiefe) wurden ca. 80 min benötigt. Die Elektrophorese wurde

beendet, wenn die blaue Laufmittelfront das Gelende erreicht hatte. Das Gel wurde anschliessend gefärbt (Coomassie oder Silberfärbung) oder geblottet.

### 2.2.12 Färbung mit Coomassie

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	
2,5 g	Coomassie Brilliant Blue R250
450 ml	Ethanol
90 ml	Eisessig
450 ml	Wasser
filtrieren	

<b>Entfärbelösung</b>	
250 ml	Ethanol
75 ml	Eisessig
675 ml	Wasser

Zuerst wurde das Gel für 1 h in Coomassie-Färbelösung eingeweicht. Danach wurde es kurz mit Wasser abgewaschen und anschließend in Entfärbelösung inkubiert. Diese wurde ausgetauscht, bis die Entfärbelösung keine Blaufärbung mehr aufwies.

Die Gele wurden in feuchtem Zustand mit einem Scanner „abfotografiert“. Um die Gele zu trocknen wurden sie zuerst ü.N. in 4% (w/v) Glycerin-Lösung eingeweicht und dann auf 2 Lagen 3MM Filterpapier gelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und für 60 min bei 70°C unter Vakuum in einer Geltrocknungsapparatur (Slab Gel Dryer Model SE1160, Hoefer) getrocknet.

### 2.2.13 Silberfärbung

<b>Entwickler</b>	
15 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (wasserfrei)
mit Wasser auf 500 ml auffüllen und erst kurz vor Gebrauch 250 µl Formaldehydlösung (37%) zusetzen	

Alle Lösungen waren wässrige Lösungen. Die Chemikalien waren von bester Qualität (p.A.), da Verunreinigungen die Färbung beeinflussen. Die Vorschrift bezieht sich auf 1 mm dicke Gele, bei dünneren Gelen mussten die Zeiten entsprechend verkürzt werden.

Das Gel wurde für 25 min in 50% (v/v) Ethanol eingeweicht, danach noch einmal für 15 min in 5% (v/v) Ethanol. Anschließend wurde dreimal mit Wasser gewaschen und dann für 30 min in 10 µM DTT-Lösung inkubiert. Darauf folgte eine 30 minütige Behandlung mit 0,1% (w/v)

AgNO<sub>3</sub>-Lösung. Schliesslich wurde die eigentliche Färbevorgang durchgeführt: Das Gel wurde kurz mit Wasser und dann mit Entwickler gewaschen, um Reste der AgNO<sub>3</sub>-Lösung zu entfernen. Sodann wurde das Gel solange in der Entwicklerlösung belassen, bis sich die Banden farblich herausgebildet hatten. Dann wurde mit Zitronensäure abgestoppt (je 10g Zitronensäure auf 200 ml Entwicklerlösung)

Die Archivierung der Gele erfolgte analog der in 2.2.12 beschriebenen Methode.

### 2.2.14 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

#### IEF-Puffer (Isoelektrische-Fokussierungs-Puffer)

7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
20 mM	TRIS-Base
4% (w/v)	CHAPS
0,8% (v/v)	Pharmalyte® 3-10 for IEF
1% (w/v)	DTT
1% (v/v)	Triton X-100
auf pH 9,2 einstellen	

#### Elektrophoreseprogramm:

Spannung [V]	Zeit
150	30
300	60
600	60
1500	60
3500	bis insgesamt 50000 Vh geflossen sind

Die Isoelektrischen Fokussierung wurde mit dem Multiphor-II® Gerät von Pharmacia-Upjohn durchgeführt.

Zur Probenvorbereitung wurde aufkonzentrierte Fragmentlösung (200µg/ml) verwendet. Diese wurde einer Acetonfällung unterzogen: Dazu wurden 100µl Fragmentlösung mit 900µl eiskaltem Aceton versetzt und für 30 min auf Eis gestellt. Anschliessend wurde für 10 min bei 10000\*g bei 4°C zentrifugiert. Das überstehende Aceton wurde abgenommen und der Niederschlag wurde luftgetrocknet, bis das restliche Aceton verdampft war. Das aceton-gefällte α nAChR<sub>1-209</sub> Fragment wurde dann in 500µl IEF-Puffer gelöst. Diese Lösung wurde daraufhin für 20 min bei 28°C geschüttelt und anschliessend für 5 min im Ultraschallbad sonifiziert.

Diese Lösung wurde dann auf den in einem Equilibrierungstrog lagernden Immobiline® Drystrip (pH3-10) gegeben. Diese IEF-Streifen enthalten einen immobilisierten pH-Gradienten. Die in IEF-Puffer gelöste  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung wird dann über Nacht auf dem Immobiline® Drystrip belassen. Um unerwünschte Verdunstung zu verhindern wird die Lösung dazu mit inert Öl überschichtet.

Der ü.N. equilibrierte Streifen wird dann an eine Elektrophoresekammer (IPG-phor von Pharmacia-Upjohn) angeschlossen und einer Elektrophorese (siehe Tabelle) unterworfen, bei der insgesamt 50000 Vh fließen (ca. 27h). Danach kann der Streifen mit einer Coomassiefärbung entwickelt werden.

### 2.2.15 Western-Blot und Chemoluminiszenz-Immunfärbung (ECL, *enhanced-chemiluminescence*)

#### Transferpuffer

39 mM	Glycin
1,3 mM	SDS
48 mM	TRIS
20% (v/v)	Methanol
auf pH 9,2 einstellen	

#### PBS (engl. *Phosphat-Buffer-Saline; Phosphat-Salz-Puffer*)

140 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
6,5 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH stellt sich von selbst ein	

#### Blockierungslösung

0,1% (w/v)	TRITON X-100
5% (w/v)	Milchpulver mit geringem Fettanteil
in PBS lösen	

#### Antikörperverdünnungslösung entspricht auch Waschlösung 1

0,1% (w/v)	TRITON X-100
1% (w/v)	Milchpulver mit geringem Fettanteil
in PBS lösen	

**Waschlösung 2**

0,1% (w/v)	TRITON X-100
in PBS lösen	

**Luminollösung**

2,5 mM	Luminol
0,4 mM	p-Cumarsäure
100 mM	TRIS
mit HCl auf pH 8,5 einstellen	

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung**

5,4 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
100 mM	TRIS
mit HCl auf pH 8,5 einstellen	

Zum Transfer der Proteine vom SDS-PA-Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) wurde das Elektroblot-Verfahren verwendet. Dazu wurden zuerst 12 gleichgroße 3MM-Papier- und ein PVDF-Membran-Stück entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde dann mit Methanol p.A. benetzt. Das Methanol wurde anschließend mit Wasser abgewaschen. Schliesslich wurden alle 13 Stücke in Transferpuffer eingeweicht. Entsprechend dem in Abbildung 13 gezeigten Aufbau wurde dann elektrophoretisch transferiert.

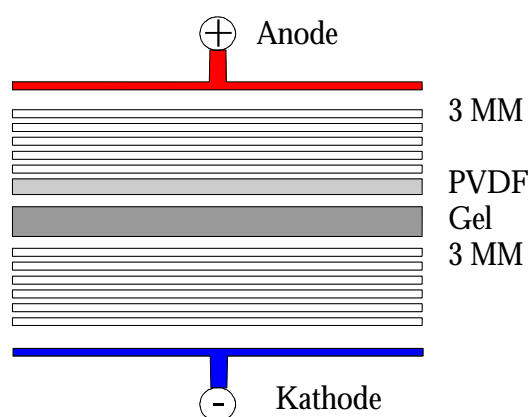


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der Blotkammer

Es wurde 90 min bei einem konstanten Strom von  $0,7\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  transferiert. Die PVDF-Membran wurde dann 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungslösung inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran zu blockieren. Dann wurde die Membran

ü.N. bei 4°C in 1:2000 verdünnter Erstantikörperlösung (WF6<sup>52</sup>, ein monoklonaler Antikörper gewonnen aus Maus) geschwenkt. Danach wurde die Membran fünf mal mit Waschlösung 1 gewaschen und nachfolgend 1 h mit 1:2000 verdünntem, Peroxidase gekoppeltem Zweitantikörper (anti-Mouse-Immunglobulin) inkubiert. Anschließend wurde noch fünf mal mit Waschlösung 2 gewaschen.

Zur Chemilumineszens-Immunfärbung wurde die Membran 1 min in 1:1 Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert. Dann wurde die Membran in einem Sandwich zwischen zwei Klarsichtfolien und einem lichtempfindlichen Film (Fuji RX) in einer Belichtungsbox für ca. 1-5 min exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

### *2.2.16 Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Test*

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der BCA-(bicinchonic acid)-Methode, Fa. Pierce, Oud Beijerland (Niederlande). Das Prinzip der Methode ist die photometrische Konzentrationsbestimmung eines blauen Cu<sup>+</sup>-BCA-Komplexes. Dazu wurden zunächst 10 µl der acht Rinderserumalbumin (BSA)-Eichlösungen (200, 400, 600, 800, 1000, 1200 µg/ml), die reinen Puffer für die Leerwerte und die Probenlösungen in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Im nächsten Schritt wurde ein Teil der Stammlösung A mit 50 Teilen Stammlösung B des BCA-Kits zur Proteinbestimmung gemischt und je 190 µl in die Mikrotiterplatte gegeben. Die so hergestellten Proben wurden leicht geschüttelt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen der Proben im Photometer bei 562 nm gemessen. Die Werte für die Eichgerade wurden dann in einen Grafen aufgetragen (Konzentration gegen Extinktion) und mittels der durch linearer Regression der Eichgerade ermittelten Geradengleichung (ORIGIN 5.0, Microcal) wurden die für die Probe gemessene Wert in Konzentrationen umgerechnet.

2.2.17 Nachweis freier SH-Gruppen

**Ellmanns Puffer**

2,1 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
6,27 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
100 mg	DTNB
mit H <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen (ergibt pH 7,2)	

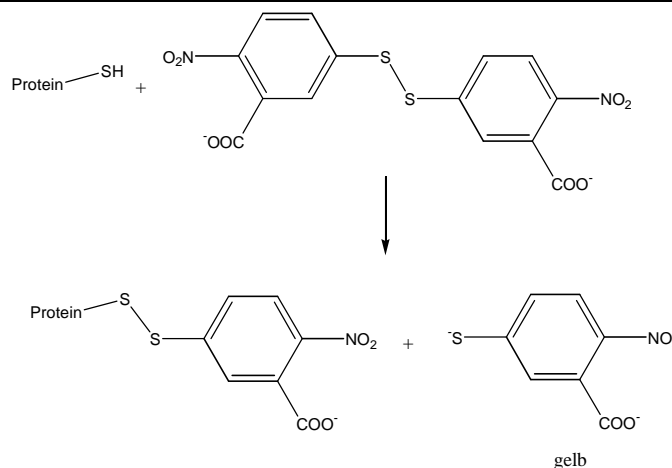


Abbildung 14: Reaktion von SH-Gruppen mit DTNB

Der Nachweis freier SH-Gruppen erfolgte mittels Ellmans Reaktion (Abbildung 14).

Dazu wurden 50 µl Proteinlösung mit 950 µl Ellmans-Puffer in einer Küvette gemischt und die Extinktion bei 405 nm bestimmt. Außerdem wurde ein Leerwert (950 µl Ellmans Puffer mit 50 µl Lösungsmittel, z.B. D-Puffer) ermittelt. Der molare Extinktionskoeffizient von TNB beträgt 13530 cm<sup>2</sup>·mmol<sup>-1</sup>.

2.2.18 CD-Spektren

Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-710 Spectropolarimeter bei 24°C aufgenommen. Die eingesetzte Rezeptorfragment-Konzentration war 40 µM (bestimmt durch BCA-Test). Die gemessene optische Aktivität wurde als „Mean residue ellipticity“  $\theta$  in degrees\*cm<sup>2</sup>\*dmol<sup>-1</sup> in eine Datei ausgegeben (durchschnittliche Aminosäurerest Eliptizität), welche dann mit den Programm JFIT<sup>53</sup> bzw. CONTIN<sup>54</sup> ausgewertet wurde. Dabei wurde das „mean residue weighth“ mit 118 berücksichtigt (durchschnittliches Molekülgewicht der Aminosäuren des Fragments).

**Einstellung des Spectrometers:**

Lichtweg	0,1 mm
Scangeschwindigkeit	50 nm*min <sup>-1</sup>
Zeit	4 s



### *2.2.19 Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)*

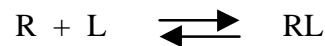
Die Analyse der Proteinlösungen erfolgte auf einer Superdex 75 Säule (XK26 Pharmacia), die aufgrund der Porengröße für die Auftrennung von Proteinen mit einer Größe zwischen 3000 und 70000 Da am besten geeignet ist. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt. Das Laufmittel war der sterilfiltrierte D-Puffer (10 mM Sucrose, TRIS; 100 mM NaCl; pH 7,4). Die aufgetragenen Proteinlösungen wurden vorher 20 min bei 4°C und 14000 Upm (Eppifuge) zentrifugiert, um mögliche unlösliche Bestandteile zu entfernen. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption des Eluats bei 280nm bestimmt.

2.2.20 Theoretische Grundlagen von Bindungsexperimenten

2.2.20.1 Im Gleichgewicht

Die Grundlage für Bindungsexperimente bildet das Massenwirkungsgesetz. Eine vollständige Beschreibung findet sich in vielen Lehrbüchern<sup>55</sup> und Artikeln (für den Acetylcholinrezeptor<sup>59</sup>). Deshalb soll hier nur kurz auf die verwendeten Formeln und Rechnungen eingegangen werden.

Die Bindung eines Liganden (L) an einen Rezeptor (R) wird durch die Dissoziationskonstante  $K_D$  beschrieben.



$$K_D = \frac{[L] \cdot [R]}{[RL]}$$

Gleichung 1:

Durch Umformen erhält man Gleichung 2.

$$[RL] = \frac{[R]_0 \cdot [L]}{K_D + [L]}$$

Gleichung 2:  $[R]_0$ : Eingesetzte Rezeptorkonzentration ( $B_{\max}$ )<sup>55</sup>

Durch eine Auftragung von gebundenem gegen freien Liganden kann man die Dissoziationskonstante  $K_D$  und den  $B_{\max}$ -Wert (entspricht bei nur einer Bindungsstelle der eingesetzten Rezeptorkonzentration  $[R]_0$ ) bestimmen. Die Konzentration der Liganden ermittelt man dadurch, dass man einen radioaktiven Liganden einsetzt, dessen Konzentration über die spezifische Aktivität berechnet werden kann. Wie bei der Michaelis-Menten-Darstellung bevorzugt man auch hier eine Linearisierung der Daten und eine anschließende Regressionsanalyse zur Ermittlung des  $K_D$ - und  $B_{\max}$ -Wertes. Dazu verwendet man z.B. die Linearisierung nach Scatchard oder Hill. Bei der Scatchard-Auftragung wird Gleichung 2 in die folgende Gleichung 3 umgewandelt, aus der man durch eine Auftragung des Quotienten von  $[RL]$  und  $[L]$  gegen  $[RL]$  aus der Steigung  $K_D$  und aus dem Achsenabschnitt  $[R]_0$  berechnen kann.

$$\frac{[RL]}{[L]} = -\frac{1}{K_D} [RL] + \frac{1}{K_D} [R]_0$$

Gleichung 3: Linearisierung nach Scatchard<sup>56</sup>

Da die Werte bei einer Scatchard-Auftragung an beiden Enden der Geraden aufgrund der Berechnungsmethode sehr stark streuen ist eine gewichtete Regressionsanalyse notwendig, die diese Fehler miteinbezieht.

Eine andere Darstellung der Bindungsdaten ist die nach Hill. Zugrunde liegt die Umformung von Gleichung 3:

$$\log \frac{[RL]}{[R]_0 - [RL]} = n_H \log [L] - n_H \log K_D$$

Gleichung 4: Linearisierung nach Hill;  $n_H$ : Hillkoeffizient<sup>57</sup>

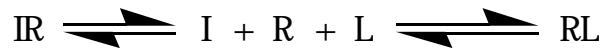
Man trägt dann  $\log([RL]/\{[R]_0-[RL]\})$  gegen  $\log [L]$  auf und erhält aus der Steigung den Hillkoeffizient  $n_H$ . Ein Hillkoeffizienten  $<1$  korreliert mit einer abwärts konkaven Scatchard-Kurve und deutet auf heterogene Bindungsstellen oder negative Kooperativität hin. Ist  $n_H > 1$  weist auf positive Kooperativität der Ligandenbindung hin.

Die Konzentration des spezifisch gebundenen Liganden  $[RL]$  wird standardgemäß dadurch ermittelt, dass man zwei Messreihen durchführt, wobei eine Messreihe zusätzlich zum Radioliganden noch einen 100- bis 1000-fachen Überschuss des nicht-radioaktiven (kalten) Liganden enthält. Dann wird die Reihe mit kaltem Liganden von der mit Radioliganden subtrahiert, wodurch man die spezifische Bindung  $[RL]$  erhält.

$$[RL] = [RL]_{\text{Radioligand}} - [RL]_{\text{mit Überschuss an kaltem Liganden}}$$

Gleichung 5

Zur Analyse von Hemmungsexperimenten wird die Inhibitor konstante bestimmt, auch hierzu wird als Grundlage das Massenwirkungsgesetz angewendet.



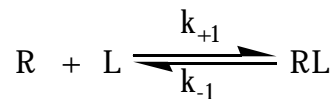
$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L}{K_D}}$$

Gleichung 6:  $K_I$ ; Dissoziationskonstante des Inhibitor-Rezeptor-Komplexes IR;  $IC_{50}$ ; Konzentration des Inhibitors bei 50% spezifischer Bindung des Radioliganden; L; Freier Radioligand, Konstante aufgrund hoher Konzentration; darunter Cheng-Prusoff-Gleichung<sup>58</sup>

Zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes eines Inhibitors wird eine Auftragung von spezifisch gebundenem Radioliganden (als % der Bindung ohne Inhibitor) gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration verwendet. Durch Auswertung der Daten mit einem Rechenprogramm (ORIGIN 5.0, one-site-competition curve fitting) werden die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt und dann mittels Gleichung 6 in  $K_I$ -Werte umgerechnet.

### 2.2.20.2 Kinetik

Durch Analyse der Bindung des Liganden an den Rezeptor als Funktion der Zeit kann man die Dissoziationskonstante bestimmen.



Gleichung 7:  $k_{+1}$  Geschwindigkeitskonstante der Bildung;  $k_{-1}$  Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des RL-Komplexes

Eine Ableitung nach der Zeit ergibt:

$$v_t = \frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \cdot [R]_t \cdot [L]_t - k_{-1} \cdot [RL]_t$$

Gleichung 8. v: Reaktionsgeschwindigkeit;  $[R]_t$ ,  $[L]_t$ ,  $[RL]_t$  jeweilige Konzentrationen zur Zeit t

Im Gleichgewicht ändert sich die Rezeptor-Ligandenkonzentration  $[RL]$  nicht mehr, Gleichung 8 kann somit vereinfacht werden zu:

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = K_D$$

Gleichung 9

Löst man die Gleichung nach  $k_{+1}$  auf und setzt in Gleichung 8 ein, so erhält man für die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$ :

$$v_t = k_{+1} \cdot \left( [R]_t \cdot [L]_t - \frac{[RL]_t \cdot [R]_{t \rightarrow \infty} \cdot [L]_{t \rightarrow \infty}}{[RL]_{t \rightarrow \infty}} \right)$$

Gleichung 10: R,L, RL mit Zusatz  $t \rightarrow \infty$  entspricht der jeweiligen Konzentration im Gleichgewicht

Durch Substitution von  $[R]_t = [R]_0 - [RL]_t$ ;  $[L]_t = [L]_0 - [RL]_t$  mit anschließender Integration erhält man:

$$k_{+1} = \frac{[RL]_{t \rightarrow \infty}}{[RL]_{t \rightarrow \infty}^2 - [R]_0 \cdot [L]_0} \cdot \frac{1}{t} \cdot \left( \ln \frac{[RL]_{t \rightarrow \infty} - [RL]_t}{[R]_0 \cdot [L]_0 - [RL]_{t \rightarrow \infty} \cdot [RL]_t} + \ln \frac{[R]_0 \cdot [L]_0}{[RL]_{t \rightarrow \infty}} \right)$$

$$Y = \ln \frac{[RL]_{t \rightarrow \infty} - [RL]_t}{[R]_0 \cdot [L]_0 - [RL]_{t \rightarrow \infty} \cdot [RL]_t}$$

Gleichung 11

Durch Auftragung von Y gegen die Zeit kann man über die Steigung der Geraden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{+1}$  berechnen.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung von  $k_{-1}$  ist nach Einstellung des Gleichgewichts ein Überschuß an nicht-radioaktivem Liganden zuzusetzen (Verdrängungsexperiment). Dadurch wird abdissoziierter radioaktiver Ligand durch nicht-radioaktiven Liganden ersetzt (entsprechend dem Verhältnis der beiden Ligandenkonzentrationen, deshalb der große Überschuss an nicht-radioaktivem Liganden L). Da man nur den radioaktiven Liganden-Rezeptorkomplex mit dem Filtertest misst, kann man dadurch den Zerfall desselben dokumentieren. In diesem Falle gilt:

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_{-1} [RL]_t$$

Gleichung 12

Nach Umformen und Integration erhält man Gleichung 13. Trägt man  $\ln([RL]_t/[RL]_{t \rightarrow \infty})$  gegen t auf, so erhält man aus der Steigung den Wert für  $k_{-1}$ .

$$\ln \frac{[RL]_t}{[RL]_{t \rightarrow \infty}} = -k_{-1} \cdot t$$

Gleichung 13

### 2.2.21 Experimentelle Durchführung der Bindungskurven

#### B-Puffer

20 mM	NaCl
10 mM	TRIS
10 mM	Sucrose
mit HCl auf pH 7,4 einstellen	

#### Waschpuffer

20 mM	NaCl
10 mM	TRIS
10 mM	Sucrose
0,1% (w/v)	TRITON X-100

Zur Bestimmung der Ligandenbindungseigenschaften des renaturierten Rezeptorfragments wurden Bindungsstudien durchgeführt. Die Trennung von gebundenem und freiem Ligand erfolgte mit Hilfe eines Filtrationsassays,<sup>59</sup> bei dem die ionischen Eigenschaften (pI: 5,5) des Rezeptorfragments ausgenutzt wurden. Als Filtermaterial wurde DE81 verwendet, das aufgrund der vorhandenen Diethylaminoethyl(DEAE)-Gruppen das negativ geladene Fragment und das an das Fragment gebundene Toxin (Radioligand) im Filter zurückhielt, den freien Radioliganden aber passieren ließ.

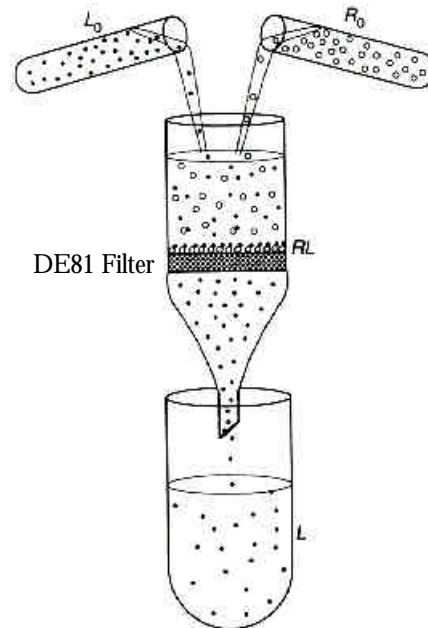


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Filtrationsassays;  $L_0$ : gesamter Ligand (Endkonzentration 1,25-80nM),  $R_0$ : gesamtes Rezeptorfragment (3nM), RL: gebundener Rezeptor-Ligand-Komplex, L: freier Ligand. Ligand und Rezeptor (50 $\mu$ l-Ansatz) wurden 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Je 35  $\mu$ l wurden dann auf die Filter aufgetragen und R und RL bleiben auf dem Filter haften.

Zuerst wurden die DE81-Filter für 30 min in 0,1 M NaOH eingeweicht. Anschliessend wurde zweimal mit Wasser gewaschen. Dann wurden die Filter mit 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Cobratoxin (*Naja naja siamensis*) behandelt, um die unspezifische Bindung des Radioliganden an den Filter zu minimieren. Daraufhin wurde erneut zweimal mit Wasser gewaschen.

Auf die Filter wurden dann die jeweiligen Ansätze pipettiert. Nach 30 sec Einwirkzeit wurde mit 1 ml Waschpuffer und 1 ml Wasser gewaschen (beide 4°C). Das Filtrat wurde aufgefangen und mit einem Tropfen Antifoam A versetzt, wodurch der vorhandene Schaum zerstört wurde. Dann wurden Triplikate (3 mal je 200  $\mu$ l) aus dem Filtrat entnommen, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold®) versetzt und in einem Scintillations Counter (TriCarb, Packard) gemessen. Die Filter wurden getrocknet und mit 2 ml Solvable® (zersetzt die Zellulose der DE81 Filter) in Counterröhrchen aufgelöst. Anschließend wurden diese mit 8 ml Ultima Gold versetzt und gezählt. Die mathematische Verarbeitung der so erhaltenen Daten wird in 2.2.20 diskutiert.

### 2.2.21.1 Gleichgewichts-Bindungsanalyse

Das für die Equilibrium-Bindungskurven verwendete Rezeptorfragment war jeweils frisch hergestellt worden und wurde mit B-Puffer auf eine Endkonzentration von 3 nM eingestellt

(ermittelt über BCA-Test). Es wurden 11 Ansätze nach dem in Tabelle 2.2-a dargestellten Schema hergestellt.

<sup>3</sup> H-αBtx (L)	1,25		5		20		80
αBtx (L*)	10000		10000		10000		10000
Fragment(R)	3		3		3		3
<sup>3</sup> H-αBtx (L)	1,25	2,5	5	10	20	40	80
αBtx (L*)	–	–	–	–	–	–	–
Fragment(R)	3	3	3	3	3	3	3

Tabelle 2.2-a: Konzentrationen [nM], der in den verschiedenen Ansätzen enthaltenen Proteine; L: Radioligand <sup>3</sup>H-αBtx, L\*: αBtx, R: Fragment.

Darauf folgte eine 3 stündige Inkubation bei Raumtemperatur (kinetische Messungen (3.4.4) zeigten, dass sich die Reaktion dann im Gleichgewicht befand). Anschließend wurden die Ansätze wie in 2.2.20 und 2.2.21 beschrieben analysiert.

#### 2.2.21.2 Hemmungsexperimente

Zur weiteren pharmakologischen Charakterisierung wurden Hemmungsexperimente (Kompetitionsstudien) mit kleinen Liganden durchgeführt. Dabei wurde mit einer festen Rezeptorfragment- und Radioligandkonzentration gearbeitet (1nM bzw. 6nM). Die verwendeten Liganden (Dissoziationskonstanten für den muskulären nAChR jeweils in Klammern) waren d-Tubocurare ( $K_D$ : 12 bzw 240 nM), (+)-Nikotin ( $K_D$ : 120 nM), Anatoxin-a ( $K_D$ : 100 nM), Methyllycaconitin ( $K_D$ : 1000 nM) und Acetylcholin ( $K_D$ : 210 bzw 5700 nM) über einen Konzentrationsbereich von  $10^{-10}$  M bis  $10^{-2}$  M. Zur Negativkontrolle wurden Atropin und Procain getestet, die auf den metabotropen bzw. in der Kanalpore des nikotinischen Acetylcholinrezeptor wirken. Ausserdem wurden für jeden Liganden jeweils zwei Ansätze ohne Kompetitor durchgeführt, die dann zur Normierung der erhaltenen Daten verwendet wurden (100 % Bindung entspricht der Bindung ohne Hemmstoff). Die Ansätze wurden jeweils 3h bei Raumtemperatur inkubiert und analog zu 2.2.20 und 2.2.21 analysiert.



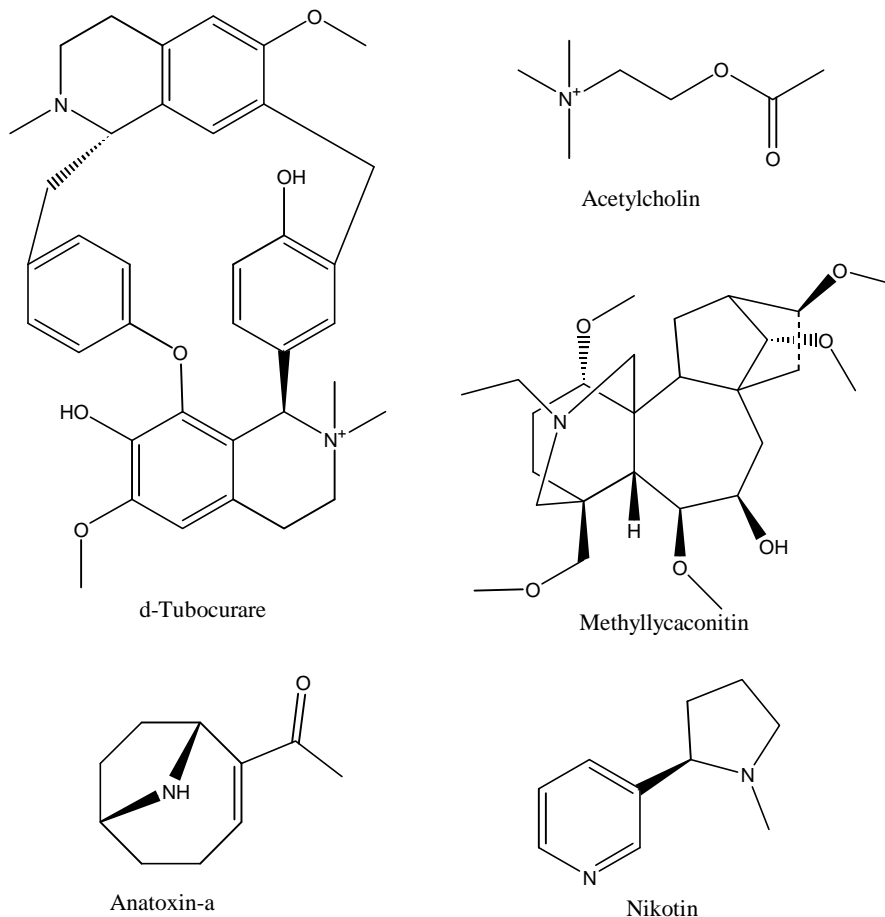


Abbildung 16 Strukturformeln von d-Tubocurare, (-)-Anatoxin-a, Acetylcholin, Methyllycaconitin und (+)-Nikotin. Substanzen, die auf die Ligandenbindungsdomäne des nAChR wirken und in den Hemmungsexperimenten verwendet wurden.

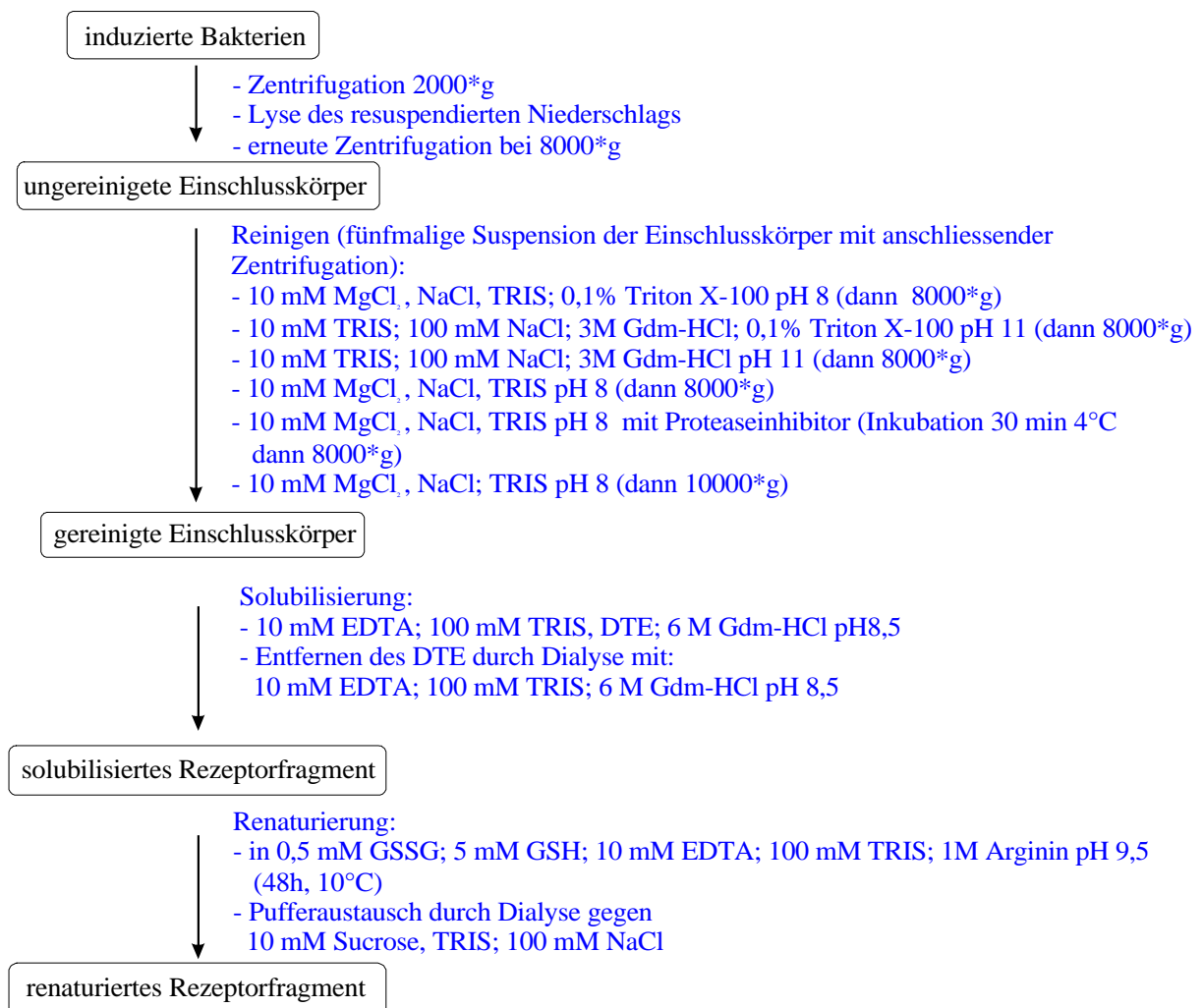
### 2.2.21.3 Kinetische Bindungsanalyse

Das verwendete Rezeptorfragment wurde mit B-Puffer verdünnt, so dass im Ansatz eine Konzentration von 11 nM vorhanden war. Die  $^3\text{H}$ - $\alpha\text{Btx}$ -Konzentration im Ansatz betrug 30 nM. Zu bestimmten Zeitpunkten (10, 240, 480, 720, 1800 und 3600 s) wurden 35  $\mu\text{l}$  entnommen und wie in 2.2.21 beschrieben mittels Filtrationsassay analysiert. Nachdem das Gleichgewicht der Reaktion erreicht war (bei 4000 s) wurde ein Überschuß an nicht-radioaktivem  $\alpha\text{Btx}$  zugegeben, so dass eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  erreicht wurde. Erneut wurden 35  $\mu\text{l}$  Aliquots entnommen (20, 235, 470, 1750 und 17380 s) und wie oben beschrieben analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Produktion und Renaturierung des $\alpha$ nAChR<sub>1-209</sub> Fragments (LBD)

In Schema 17 sind alle Schritte, die zum renaturierten  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment führen zusammengefasst. Sie enthält die Zusammensetzung der in 3.1 optimierten Wasch-, Solubilisierungs- und Renaturierungspuffer. Die einzelnen Schritte werden in 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.3 genauer beschrieben.



Schema 17: Schema der Expression, Reinigung, Entfaltung und Renaturierung des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments, die in 3.1 genau beschrieben wird.

### 3.1.1 Expressionsvektorkontrolle und Transformation

Zur ektopischen Expression wurde der pET3a(1-627  $\alpha$ AChR)-Vektor verwendet. Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenzgen und durch Vorarbeiten von Martin Rentrop<sup>60</sup> war die 627 bp DNA der Aminosäuren 1-209 des N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit des nikotinischer Acetylcholinrezeptor über eine NdeI und BamHI Schnittstelle bereits in den pET3a-Vektor eingefügt. Zur Kontrolle wurde nochmals eine Restriktion des Vektors mit diesen Enzymen durchgeführt. Der geschnittene Vektor wurde auf ein Agarosegel (0,9%) aufgetragen (Abbildung 18). Es zeigten sich die drei typischen Banden, jeweils eine für den Vektor mit Insert (5,2kb), ohne Insert (4,6kb) und nur das Insert (0,627kb).

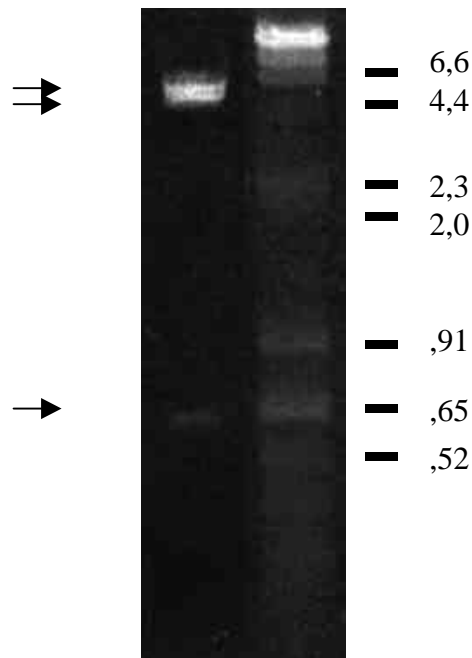


Abbildung 18: Gelelektrophoretische Auftrennung von 10  $\mu$ l der pET3a(1-627  $\alpha$ AChR) Vektor-DNA in einem 0,9% Agarosegel; rechts: Marker mit Längenangaben in kb; links pET3a(1-627  $\alpha$ AChR)-Vektor partiell geschnitten: oben Vektor mit Insert (5,2kb), Mitte Vektor ohne Insert (4,6kb) und unten Insert (0,6kb)

Dieser Vektor wurden dann mittels der  $\text{CaCl}_2$ -Methode<sup>50</sup> in den *E.coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS transformiert. Dieser Bakterienstamm enthält ein Chloramphenicolresistenzgen und mit dem pET3a(1-627  $\alpha$ nAChR)-Vektor zusätzlich ein Ampicillinresistenzgen. Die Bakterien wurden auf  $\text{LB}_{\text{amp,chl}}$ -Platten ausplattiert. Dadurch vermehrten sich nur Klone, die den Vektor enthielten. Anschließend wurden einzelne Klone in 5ml LB-Medium-Ansätzen mit 1mM Isopropyl- $\beta$ -Galactosid (IPTG) induziert. IPTG wirkt wie auf den im pET3a-Vektor enthaltenen  $P_{\phi 10}$ -Promotor. Im Gegensatz zu Lactose wird IPTG jedoch nicht durch das Enzym Galactosidase gespalten. Dadurch führt die Induktion mit IPTG zu einer längerfristigen Produktion des unter der Kontrolle des Promotors stehenden  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Proteinfragments. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert und mit Ultraschall lysiert. Durch Zentrifugation (2000\*g) wurden die unlöslichen Bakterienproteine, die auch die Einschlusskörper und damit das gewünschte Proteinfragment enthalten, separiert. Abbildung 19 zeigt die Auswirkungen von IPTG auf die Fragmentproduktion. Obwohl eine latente Produktion des Fragments (25kDa) auch ohne IPTG vorhanden ist (mittlere Spur), so ist doch eine markante Steigerung mit IPTG zu beobachten (linke Spur, Pfeil). Drei Klone mit den besten Produktionsausbeuten wurden dann in Glycerinstocks bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und zur weiteren Produktion des N-Terminalen Fragments verwendet.

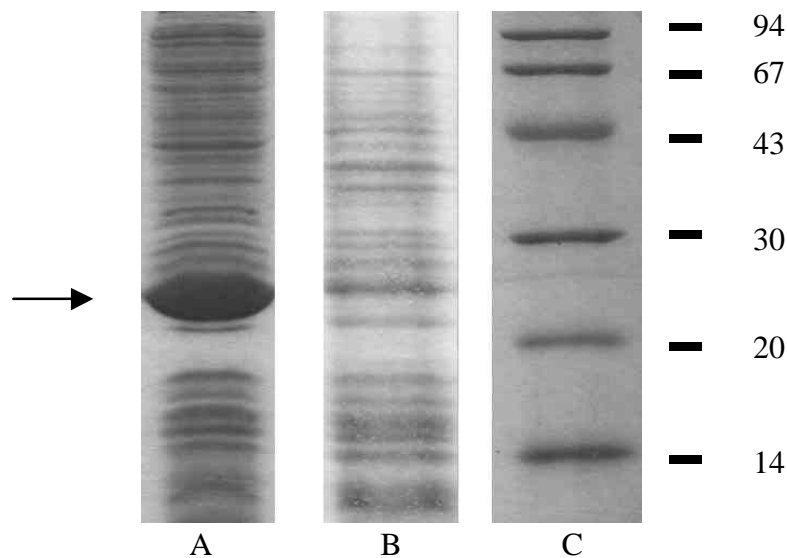


Abbildung 19: Auswirkung der IPTG-Induktion auf die Produktion des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments 12,5% SDS-PAGE Coomassie Blau gefärbt von je 10 $\mu$ l unlöslichen Bakterienproteinen. Jede Spur enthält 1% der unlöslichen Proteine aus 1ml Bakteriensuspension Pfeil kennzeichnet das Proteinfragment bei 25kDa. Spur A: nach 3h IPTG-Induktion; Spur B: gleiche Wachstumszeit wie bei A nur ohne IPTG; Spur C: Marker mit angegebenen Proteingewichten in kDa

3.1.2 Reinigung der Einschlusskörper

Die Induktion der transformierten Bakterien führte zu der oben beschriebenen Produktion des gewünschten Proteinfragments. Die Frage, ob das Fragment als lösliches Protein oder in Einschlusskörpern (engl. *inclusionbodies*) vorliegt, wurde dadurch untersucht, dass die Bakterien nach der Lyse zentrifugiert (2000\*g) und daraufhin sowohl der Überstand als auch der Niederschlag auf ein 12,5% SDS-PA-Gel aufgetragen wurden (Abbildung 20). Es zeigte sich, dass das Fragment hauptsächlich im Niederschlag vorkam und somit als unlösliches Protein exprimiert wurde.

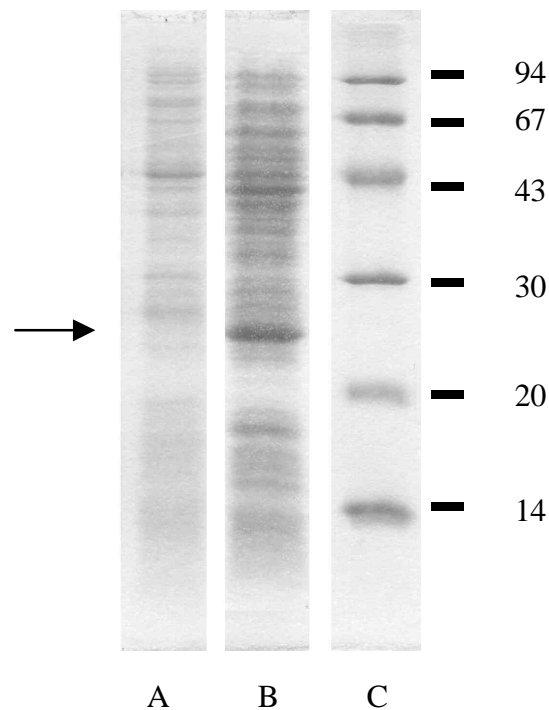


Abbildung 20: Lösliche und unlösliche Bakterienproteine; 12,5% SDS-PAGE Coomassie Blau gefärbt; jeweils 10 $\mu$ l Protein wie in Abbildung 19 beschrieben; Spur A: Lösliche Bakterienproteine aus dem Überstand nach Lyse; Spur B: nichtlösliche Bakterienproteine aus dem Präzipitat.; Spur C: Markerproteine

Zur Reinigung der Inclusionbodies wurden unterschiedliche Puffer getestet. Diesen war zur Deaktivierung von Proteasen ein Inhibitionscocktail zugesetzt. Aufgrund ihrer Konsistenz sind Einschlusskörper nur mit stark denaturierenden Puffern zu lösen bzw. zu reinigen. Die vier Cysteine in der Primärstruktur des Fragments führen nicht nur zu intramolekularen sondern auch zu intermolekularen Disulfidbrücken (Disulfidbrücken zwischen verschiedenen  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub>-Molekülen). Diese Quervernetzung kann man sich bei der Reinigung zu Nutzen machen:

Alle Verunreinigungen, die nicht über kovalente Disulfidbrücken vernetzt waren, wurden durch einen Waschlösungspuffer aus Guanidinium-Hydrochlorid, dessen Konzentration mit 3M nicht ganz an die Stärke des Solubilisierungspuffers heranreicht (6M), entfernt. Dadurch blieben die kovalent vernetzten (und dadurch sehr grossen) Moleküle weiterhin unlöslich, während viele der nicht vernetzten Moleküle durch diesen Puffer gelöst werden. Bei der Reinigung wurden die Einschlusskörper dabei immer in der Waschlösung in einem Glashomogenisator (2.2.6) aufgeschwemmt. Die ausgewaschenen löslichen Bestandteile der Einschlusskörper wurden dann durch Zentrifugation vom gereinigten, weiterhin unlöslichen  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment, das als Niederschlag zurückblieb, getrennt. Es wurden unterschiedliche Ionenstärken (in Form der NaCl-Konzentrationen 100, 200 und 400 mM Abbildung 21) und pH-Werte (6,5; 7,2; 8,3; 9,4; 10,2 und 11,0 Abbildung 22) des Waschlösungspuffers auf seine Reinigungseigenschaften untersucht.

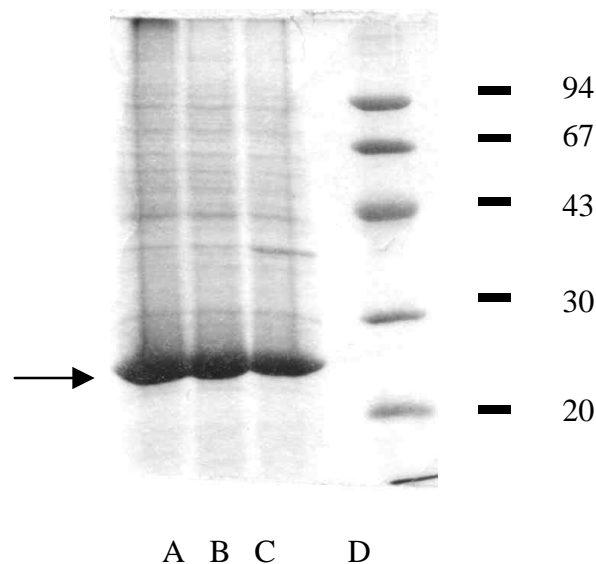


Abbildung 21: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Reinigung der Einschlusskörper; 10% SDS-PAGE Coomassie Blau gefärbt; Spur A-C: 100, 200, 400mM NaCl im Waschlösungspuffer; Spur D: Marker

Dabei zeigte der Waschlösungspuffer mit 100mM NaCl (Abbildung 21 Spur A) und einem pH-Wert von 11 (Abbildung 22 Spur C) ein ideales Waschverhalten, d.h. es wurden die meisten Verunreinigungen entfernt und der größte Teil des Fragments blieb erhalten.

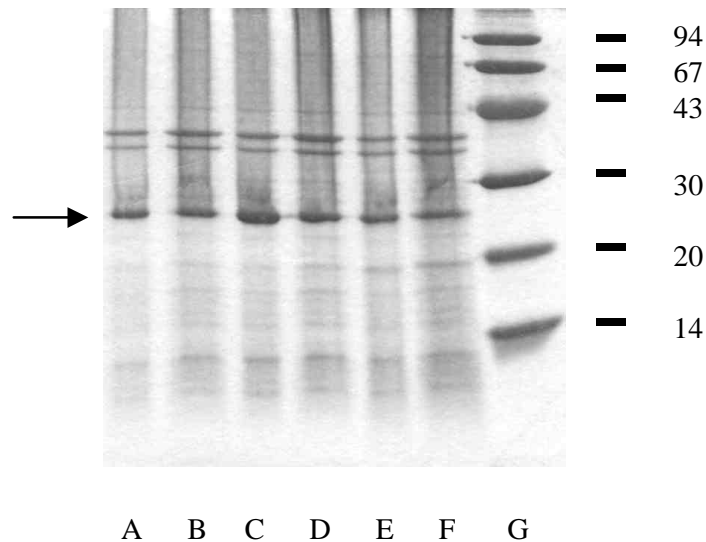


Abbildung 22: Auswirkungen unterschiedlicher pH-Werte auf die Reinigung; 12,5% SDS-PAGE Coomassie Blau gefärbt; Spur A-F Waschpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten: 6,5; 7,2 ; 11,0 ; 10,2 ; 9,4 ; 8,3

Abbildung 23 zeigt nochmals die Qualität der gewaschenen Einschlusskörper, dabei waren die Einschlusskörper zusätzlich zum zweimaligen Waschen mit Waschpuffer II noch einmal mit Waschpuffer IIx100 (entspricht Waschpuffer II mit 0,1% Triton X-100) behandelt wurden. Zum Waschen wurden die Einschlusskörper mit einem Glas-Homogenisator in der entsprechenden Waschlösung suspendiert, was durch eine Behandlung mit Ultraschall unterstützt wurde.

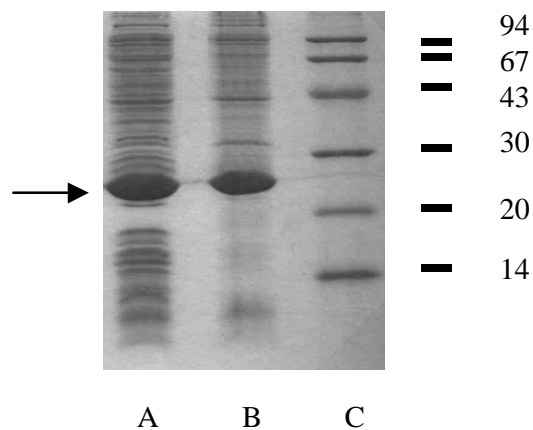


Abbildung 23: Einschlusskörper vor und nach der Reinigung; 12,5% SDS-PAGE Coomassie Blau gefärbt; Spur A: ungereinigte Einschlusskörper; Spur B: mit Waschpuffer II und Waschpuffer IIx100 gereinigte Einschlusskörper; Spur C: Marker

### 3.1.3 Renaturierung

Nachdem durch den Reinigungsprozeß der Anteil des Fragments in den gewaschenen Einschlusskörpern auf mehr als 80% gesteigert werden konnte, wurden diese in

Solubilisierungspuffer gelöst. Die Reinheit wurde aus den Comassie gefärbten Gelen (Abbildung 23) geschätzt und konnte, da die genaue Zusammensetzung der Einschlusskörper nicht bekannt ist und damit nicht klar war wieviele lipophile Aminosäuren die Verunreinigungen enthalten, nicht genauer bestimmt werden. Der Solubilisierungspuffer enthält zum Aufbrechen der Disulfidbrücken 100 mM DTE, dessen aktive Gruppe das Thiolat-Anion ist, besitzt einen  $pK_s$ -Wert von 8-10 und ist somit in leicht alkalischer Lösung am wirksamsten (pH des Solubilisierungspuffers ist 8,5). Um eine Carbamylierung des Proteins zu vermeiden, wurde zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen anstelle von Harnstoff, welcher als Verunreinigungen Cyanate enthalten kann, Guanidinium Hydrochlorid verwendet. Da Spuren von Metallionen (z.B.  $Cu^{2+}$ ) die Oxidation von Thiol-Gruppen bei neutralem pH fördern wurde dem Solubilisierungspuffer 10 mM EDTA zugesetzt. EDTA wirkt ausserdem als Inhibitor einiger Metalloproteasen. Das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment lag nun im Solubilisierungspuffer (6 M Gdm-HCl, 100 mM DTE, 100 mM TRIS, 10 mM EDTA und pH 8,5) vollständig denaturiert vor. Durch anschließende Dialyse wurde das Reduktionsmittel DTE entfernt. Die Proteinkonzentration im Solubilisierungspuffer betrug 5-10 mg/ml. Für spätere Renaturierungen wurde das solubilisierte Protein in 1 ml Fraktionen bei  $-80^\circ C$  eingefroren. 1 ml entspricht der Menge für 200 ml Renaturierungslösung.

Nachdem das Protein im Solubilisierungspuffer entfaltet worden war, musste es wieder korrekt gefaltet werden. Dies geschah mit Hilfe eines Renaturierungspuffers (1 M Arginin; 100 mM TRIS; 10 mM EDTA; 5 mM GSH; 0,5 mM GSSG; pH 9,5). Die Renaturierung des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments beruhte auf drei Prinzipien:

- Ein sogenannten *oxido-shuffling* System, bei dem Glutathion in seiner oxidierten und reduzierten Form verwendet wird, öffnet und schliesst die Disulfidbrücken des Fragments (0,5mM GSSG und 5mM GSH in der Lösung).
- Außerdem enthält der Renaturierungspuffer noch L-Arginin als faltungsunterstützendes Reagenz (siehe 1.4). Die optimale Argininkonzentration von 1M wurde dadurch ermittelt, dass der Proteinanteil, der aus dem Renaturierungspuffer ausfiel, einer SDS-PAGE unterworfen wurde (Abbildung 24). Dabei zeigte sich, dass bei 1M Arginin (Spur A) fast kein Protein ausfiel, während ohne Arginin kein Protein mehr in Lösung blieb (Spur F).
- Um die intramolekularen Wechselwirkungen, zu denen die Faltungsprozesse gehören (Selbstorganisation), gegenüber den intermolekularen Wechselwirkungen, die zu



Aggregation führen können, zu bevorzugen, wurde das solubilisierte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment um den Faktor 200 verdünnt, d.h. 5ml Fragment (5-10mg/ml) wurde in 1l Renaturierungslösung aufgelöst (Endkonzentration 25 – 50 $\mu$ g/ml).

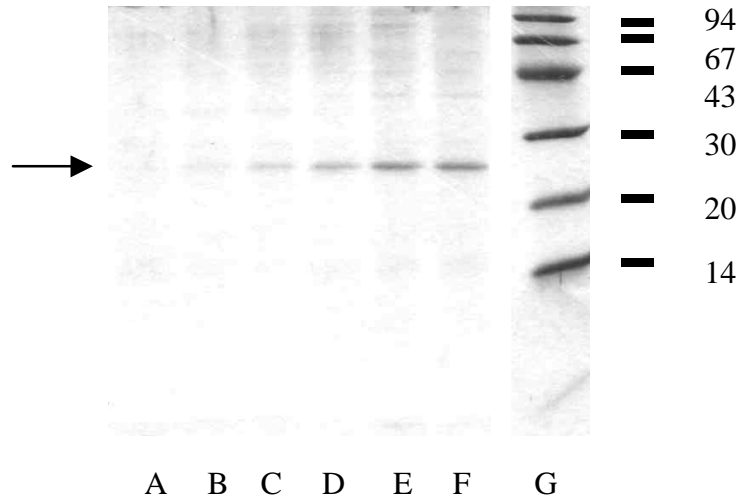


Abbildung 24: Ausgefallenes Protein aus Renaturierungspuffer in Abhängigkeit der Argininkonzentration nach 24h; 15% SDS-PAGE Coomassie Blau gefärbt; Spur A-F: 1000mM, 800mM, 600mM, 400mM, 200mM und ohne Arginin im Renaturierungspuffer (100mM TRIS, 10mM EDTA, pH9,5); Spur G: Marker

Um unerwünschte Oxidation durch Sauerstoff zu unterbinden, wurde der Renaturierungspuffer vor Zusatz des Fragments entgast und mit Argon überschichtet.

Durch diese drei Faktoren („*Oxido-shuffling*“-System, niedrige Fragmentkonzentration und Faltungsunterstützer) wurde die unerwünschte Aggregationsreaktion zurückgedrängt, womit dem  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment ermöglicht wurde in seine native Struktur zu falten.

Das aufgefaltete Protein wurde in der Renaturierungslösung für 48h bei 10°C inkubiert. Dann wurde sowohl das Arginin als auch das Glutathion durch Dialyse entfernt. Bei einem Liter auszutauschender Lösung bot sich als Verfahren der Wahl die Gegenstromdialyse an. Dies geschah mit einem Gegenstromdialysemodul (Variperm XL Abbildung 11), in dem die zu dialysierende Lösung durch 350 Kapillaren mit einem Durchmesser von 0,24mm, einer Länge von 710mm und einer Porengröße von 5kD gepumpt (maximal 4 ml/min) und dabei von Dialysepuffer (100mM NaCl; 10mM Sucrose; 10mM TRIS; pH 7,4) umströmt (ca. 200ml/min) wurde. Ein Dialysedurchlauf dauerte für einen Liter Renaturierungspuffer ca. 2,5h und wurde bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Um eine vollständige Entfernung von Arginin und Glutathion zu gewährleisten, wurde zweimal dialysiert. Dadurch ergab sich ein Zeitbedarf von 5,5h und ein D-Pufferbedarf von 120 l für einen Liter Renaturierungslösung. Die Konzentration

des  $\alpha$ -nAChR<sub>1-209</sub>-Fragments betrug ca. 20-40 $\mu$ g/ml und war damit fast nur noch mit der Silberfärbetechnik bzw. Westernblot (2.2.13) nachzuweisen.

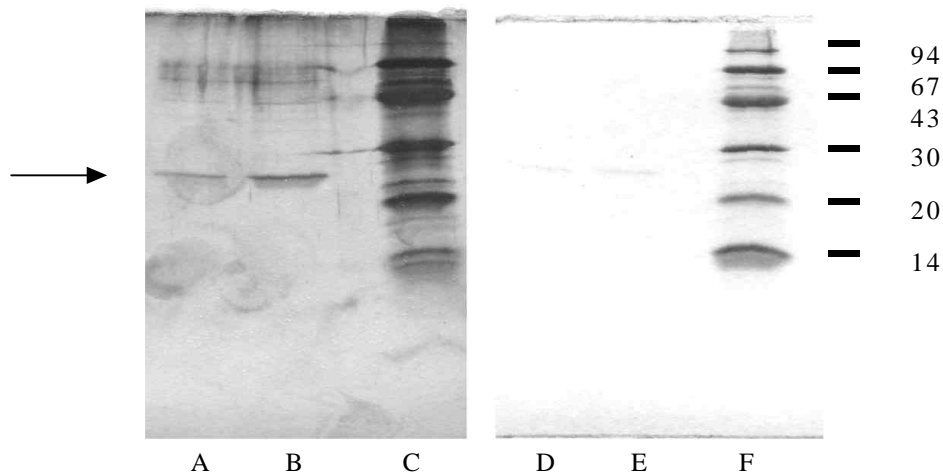


Abbildung 25: Analyse des renaturierten dialysierten Proteins; 15% SDS-PAGE silber-gefärbt (links, Spur A-C) bzw. Coomassie Blau gefärbt (rechts, Spur D-F); Spur A/D: lösliches  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub>-Fragment (20 $\mu$ l der dialysierten Fragmentlösung), der Pfeil kennzeichnet das 25 kD Protein; Spur B/E: Niederschlag nach der Dialyse; Spur C/F: Marker;

Die Proteinbande war im Coomassie Blau gefärbten Gel schlecht erkennbar (Spur D, Abbildung 25). Für spätere Bindungsexperimente, bei denen die Konzentration (z.B. 3 nM bei den Gleichgewichtsbindungskurven) genau bekannt sein musste, wurde aufkonzentriertes  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment (0,2mg/ml) auf die erforderlichen Konzentrationen verdünnt. Vorher war die Proteinkonzentration der aufkonzentrierten Lösung mittels BCA-Tests (2.2.16) bestimmt worden. Nach der Dialyse beobachtete man die Bildung eines feinen Niederschlags, der sich nach Zentrifugation und anschließender SDS-PAGE als  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub>-Fragment erwies (Spur B und E, Abbildung 25). Dies bedeutet, dass nach der Renaturierung und während des Pufferaustauschs ein Teil des Fragments ausfällt. Ursachen dafür können einerseits sein, dass es sich dabei um nicht-natives Protein handelt, das nach der Entfernung des Arginins nicht mehr löslich ist, d.h. die nicht-nativen Strukturen waren zwar im Renaturierungspuffer (1 M Arginin; 100 mM TRIS; 10 mM EDTA; 5 mM GSH; 0,5 mM GSSG; pH 9,5) löslich, fielen aber im Dialysepuffer (100mM NaCl; 10mM Sucrose; 10mM TRIS; pH 7,4) aus. Andererseits besitzt das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub>-Fragment einige hydrophobe Bereiche (siehe Hydropathiediagramm Abbildung 3) die das Fragment für eine Aggregation anfällig machen. Die Menge des ausgefallenen Proteins wurde bestimmt (trocknen und abwiegen). Sie betrug zwischen 30-40% des im Renaturierungspuffers enthaltenen  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments. Somit verblieben 60-70% der LBD in Lösung.

3.1.4 Aufkonzentrierung

Um später Charakterisierungen des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub>-Fragments durchführen zu können musste dessen genaue Konzentration bekannt sein, da die Konzentration des Fragments in die Berechnung des  $K_D$ -Wertes eingeht. Dies war bei so hohen Verdünnungen nicht mit der gewünschten Genauigkeit möglich. Deshalb war es nötig, die Konzentration des Fragments zu erhöhen. Nach der Dialyse betrug diese ca. 10-20 $\mu$ g/ml (ca. 0,4 bis 0,8 $\mu$ M geschätzt durch Abzug des ausgefallenen Proteins). Die ca. 1,4 bis 1,6l Lösung wurden dann mittels der in 2.2.10.1 und Abbildung 12 beschriebenen Methode der Ultrafiltration auf ca. 50ml aufkonzentriert. Dabei fiel 30-40% des Proteins aus, was durch Abzentrifugation, Trocknen und Wiegen des Niederschlags ermittelt wurde. Die verbliebene Proteinkonzentration betrug ca. 200 bis 400 $\mu$ g/ml (Abbildung 26 Spur A, bestimmt mit BCA-Test). Das ausgefallene Protein wurde durch Zentrifugation (8000\* $g$ ) abgetrennt und auf ein 15% Gel aufgetragen (Abbildung 26 Spur B). Der Frage warum erneut  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment als unlösliches Protein ausfiel, wird in der biochemischen Charakterisierung der Ligandenbindungsdomäne (3.3) nachgegangen.

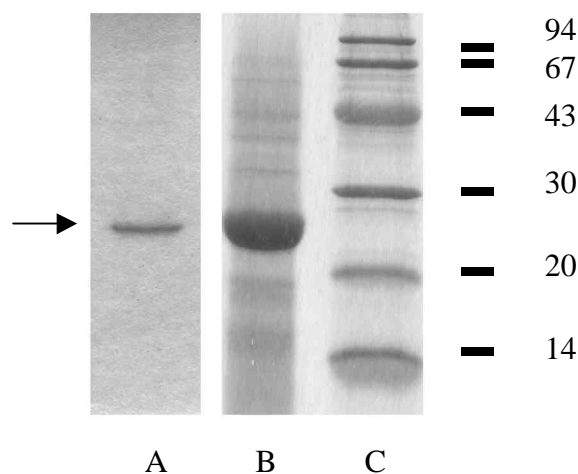


Abbildung 26: Analyse des aufkonzentrierten löslichen  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments und des sich bildenden Niederschlags; 15% SDS-PAGE Coomassie Blau gefärbt; Spur A: 20 $\mu$ l der von 1600 auf 50ml aufkonzentrierten Fragmentlösung nach Zentrifugation (350 $\mu$ g/ml); Spur B: ausgefallenes Protein aufgenommen in 200 $\mu$ l reduzierendem Probenpuffer; Spur C: Marker

Um noch höhere Konzentrationen zu erreichen (für NMR bzw. Kristallisation sind Konzentrationen zwischen 1 und 10mg/ml erforderlich), wurden die 50ml weiter mit Macrosep® Aufkonzentratoren bis auf ein Volumen von 1ml eingengt, dabei wurde die  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment-Lösung mittels Zentrifugalkraft (3500\* $g$  für 1h bei 4°C) durch eine Cellulosemembran (Ausschlussgröße von 8 kD) gepresst. Die Fragmentkonzentration der auf 1

ml aufkonzentrierten Lösung betrug zwischen 3 bis 5 mg/ml (entspricht 25-35% der möglichen Proteinkonzentration). Bei diesem Vorgang fiel 65-75% des Proteins als Niederschlag aus (erneut bestimmt durch Abzentrifugieren, Trocknen und Wiegen des Niederschlags) der die in Abbildung 26 Spur B gezeigten Eigenschaften aufwies. Diese stark aufkonzentrierte Proteinlösung wurde einer FPLC (*Fast-Performance-Liquid-Chromatography* 3.3.5) unterzogen.

Um zu analysieren, wie rein die hergestellte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung war, wurde die auf 50 ml aufkonzentrierte Lösung einer Silberfärbung (Abbildung 27 Spur C) unterzogen, bei der die Zeit, in der das Gel in der Entwicklerlösung lag, verlängert wurde, um selbst kleinste Verunreinigungen sichtbar zu machen. Dadurch wurde gleichzeitig die Hintergrundfärbung verstärkt, was die starke Graufärbung des rechten Teils in Abbildung 27 erklärt. Die auf 1ml aufkonzentrierte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung (Abbildung 27 Spur A) läßt im Coomassie Blau gefärbten Gel keine Verunreinigungen erkennen. Auch in der Silberfärbung sind keine erkennbaren Verunreinigungen vorhanden. Aufgrund dieser Färbeergebnisse (Abbildung 27) wird die Reinheit des 98%.

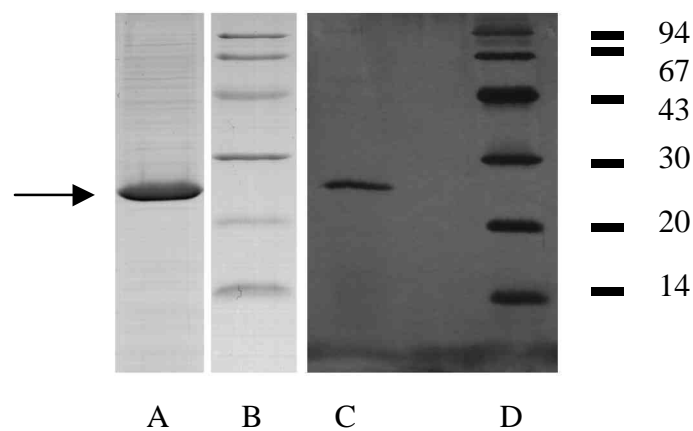


Abbildung 27: Analyse der Reinheit des aufkonzentrierten Proteins; 15% SDS-PAGE Spur A und B Coomassie Blau; Spur C und D Silber gefärbt;; Spur A: 20 $\mu$ l der von 1600ml auf 1ml aufkonzentrierten  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung (4,2mg/ml); Spur C: lang entwickelte Silberfärbung von 20 $\mu$ l der von 1600ml auf 50ml aufkonzentrierten  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung; Spur B und D: entsprechende Marker

### 3.2 Bilanz der Renaturierung

Aus einem Liter Bakterienkultur wurden 500mg Inclusionbodies gewonnen. Von denen nach Reinigung noch 125mg Inclusionbodies solubilisiert wurden. Nach der Renaturierung waren noch 80mg vorhanden. Die während der Dialyse entstandenen Verluste (durch Niederschlag) verringerten die Menge auf 50mg. Im letzten Schritt der Herstellung, der Aufkonzentrierung bis auf eine Konzentration von 3-5mg/ml, fiel ein Teil des Fragments als Niederschlag aus und verringerte die Menge an renaturiertem, aufkonzentrierten  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments auf 10 mg. Somit konnten aus 125 mg solubilisiertem Fragment 10 mg renaturierte Ligandenbindungsdomäne gewonnen werden, was einer Ausbeute von 8% entspricht.

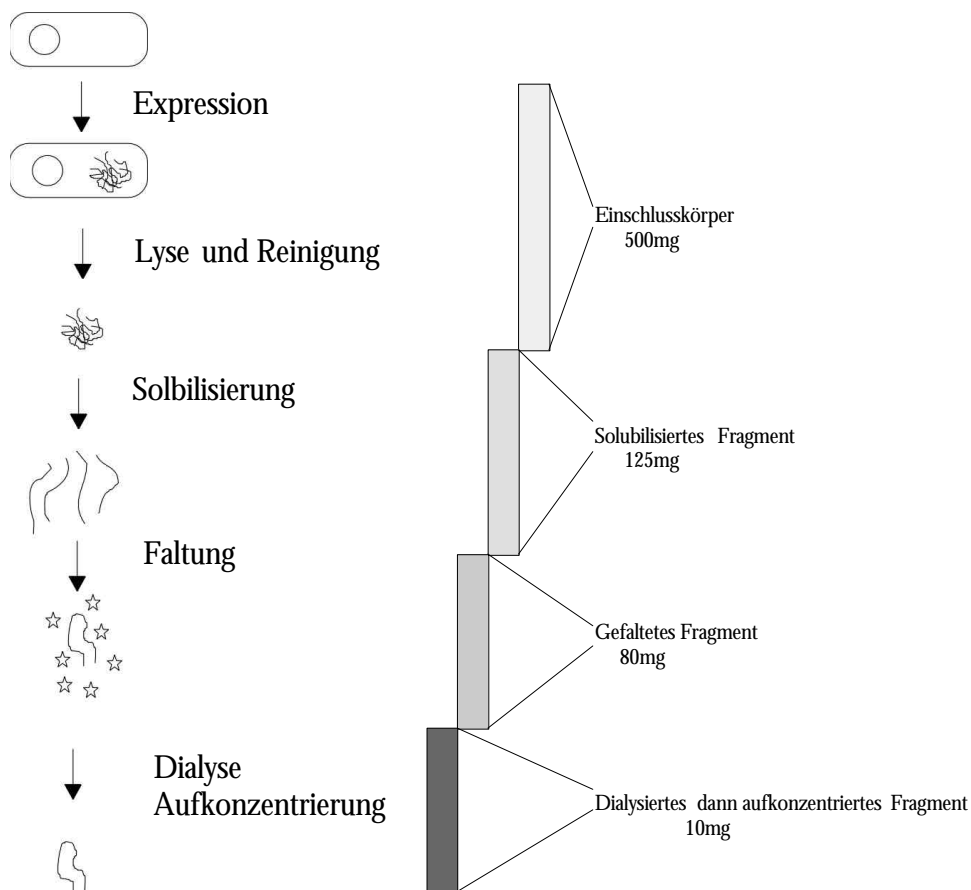


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der LBD mit beigefügten Ausbeuteangaben der jeweiligen Zwischenstufen für 1l Bakterienkultur

### 3.3 Biochemische Charakterisierung der Ligandenbindungsdomäne

Alle folgenden Versuche wurden mit dem aus 3.1.3 oder 3.1.4 gewonnenen Fragment durchgeführt. Das verwendete Fragment war dabei nie älter als 2 Wochen. Die Zustand des Proteins (mgl. Verunreinigung: Abbau durch Proteasen) wurde vor jedem Versuch noch mit einer SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung überprüft.

#### 3.3.1 Nachweis von freien SH-Gruppen

Zur Überprüfung des Oxidationszustandes der SH-Gruppen, die bei einem korrekt gefalteten Protein vollständig in Form von Disulfidbrücken vorliegen müssen, wurde die aufkonzentrierte  $\alpha$ -nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung einer Reaktion mit DTNB unterworfen. Diese sog. Ellmansreaktion führt bei Vorhandensein von freien SH-Gruppen zu einem gelb gefärbten Produkt (Thionitrobenzoesäureanion, für Formel siehe Abbildung 14). Die für 4,2 mg/ml Ausgangskonzentration (entspr. 210  $\mu$ g/ml bzw. 8,4  $\mu$ M in der Küvette) ermittelte Extinktion bei 405nm wurde mit der entsprechenden Extinktion des D-Puffers verglichen. Innerhalb der Messgenauigkeit des Spektrometers (SpectraMax Plus, Molecular Devices) konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Extinktionen festgestellt ( $\Delta E_{405} \leq 0,001$ ). Bei einem molaren Extinktionskoeffizienten von 13530 [ $\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ ] und einer Länge von 1cm, die das Licht durch die Fragmentlösung zurücklegt, entspricht diese Extinktionsdifferenz einer Konzentration von weniger als 70 nM. Damit lagen zwischen 92 und 100% der Cysteine in oxidierter Form vor.

#### 3.3.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) und des molaren Extinktionskoeffizienten

Die  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung (4,2mg/ml) wurde einer isoelektrischen Fokussierung mit Immobiline Drystrips (nichtlinearer pH Gradient von 3 – 10) unterworfen. Dabei ergab sich ein isoelektrischer Punkt von 5,5. Außerdem wurde der Extinktionskoeffizient bei 280nm einer 40  $\mu$ M  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung ermittelt und daraus ein molarer Extinktionskoeffizient  $\epsilon(280\text{nm})$  von  $61000 \pm 500 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$  berechnet.

Aufgrund der Primärstruktur ist es möglich, theoretische Vorhersagen über den IEP und den molaren Extinktionskoeffizienten zu machen. Diese Programme werden auf der Homepage des

Swiss Institute of Bioinformatics<sup>61</sup> angeboten. Die theoretischen Werte für das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment liegen bei  $pI_{\text{theor.}} = 5,4$  und  $\epsilon(280\text{nm})_{\text{theor.}} = 59840 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ . Die gemessenen Werte für  $pI$  und  $\epsilon(280\text{nm})$  liegen somit im Bereich der theoretischen Werte für  $pI$  und  $\epsilon(280\text{nm})$ .

### 3.3.3 N-terminale Aminosäuresequenz und MALDI-Massenspektroskopie

Das renaturierte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment (25kD) wurde einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurde die N-terminale Aminosäuresequenz der 25 kD Proteinbande der PVDF-Membran durch Edmanabbau ermittelt. Als Ergebnis erhielt man folgende Sequenz: SEHETRLVANLLENY. Diese entspricht genau den ersten 15 Aminosäuren der Sequenz der  $\alpha$  Untereinheit des nAChR aus *Torpedo* (Tabelle 2.1-a).

Mittels MALDI-MS wurde die Molekülmasse auf 24896,2 Da bestimmt. Die aufgrund der Aminosäuresequenz berechnete Molekülmasse beträgt 24796,3 Da. Sowohl der Edmanabbau selbst als auch die Massenspektroskopie wurden im Labor von J. Godovac-Zimmermann, Institut for Molekulare Biotechnologie, Jena<sup>62</sup> durchgeführt.

### 3.3.4 CD-Spektrum des $\alpha$ nAChR<sub>1-209</sub>-Fragments

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile wurde ein CD-Spektrum (Abbildung 29) von der auf 1 mg/ml aufkonzentrierten, umgepufferten (10 mM TRIS/HCl, 50 mM NaCl, pH7,4)  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung aufgenommen (Spezifikationen siehe 2.2.18), dessen Ergebnisse dann mit dem Programm CONTIN<sup>54</sup> in folgende Werte für Sekundärstrukturelemente umgerechnet wurden:  $\alpha$ -Helix: 15%;  $\beta$ -Faltblatt: 45%.

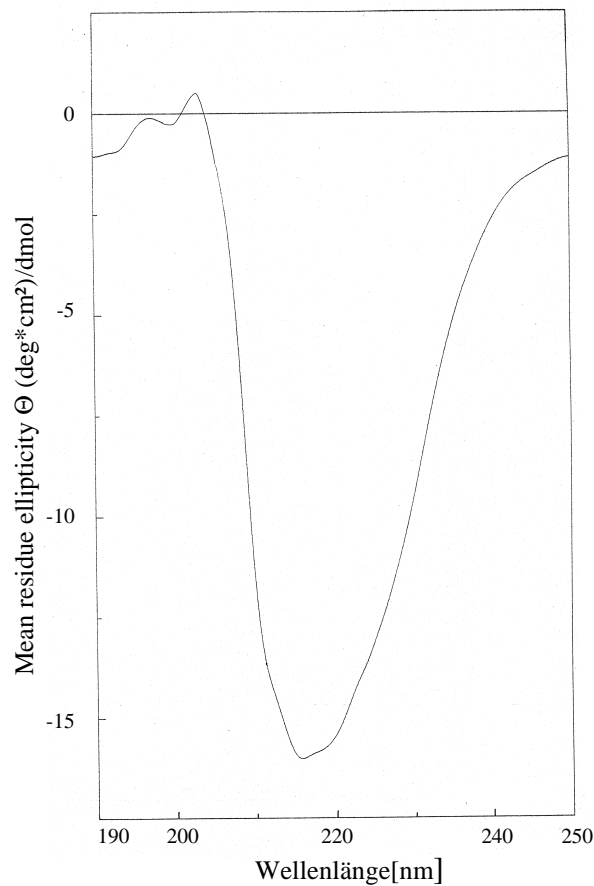


Abbildung 29: CD-Spektrum der  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung (40 $\mu$ M) in 10 mM TRIS/HCl, 50 mM NaCl, pH7,4. Aus den CD-Daten wurde mit dem CONTIN-Program<sup>54</sup> der Anteil von  $\alpha$ -Helix auf 15% und der für  $\beta$ -Struktur auf 45% berechnet.

### 3.3.5 Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)

Um zu ermitteln in welcher Größe die native LBD vorliegt, wurde eine Grössenausschlusschromatografie in Form einer FPLC durchgeführt. Dazu wurde das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment 20 min bei 8000\*g zentrifugiert, um evtl. vorhandenen Niederschlag zu entfernen, und anschließend auf eine Superdex-75 Chromatographiesäule (12cm Länge, 1,6cm Durchmesser) aufgetragen. Das Laufmittel war D-Puffer, in dem das Protein auch gelöst war (10mM TRIS, 10mM Sucrose, 100mM NaCl, pH7,4). Bei einem Fluß von 1ml/min wurden alle 30 s Fraktionen entnommen. Die Konzentration des aufgetragenen Proteins betrug 50 $\mu$ g/ml (Spektrum A Abbildung 30) bzw. 5mg/ml (Spektrum B1u B2), wobei die höhere Konzentration durch Aufkonzentration des 50 $\mu$ g/ml Proteins gewonnen worden war.



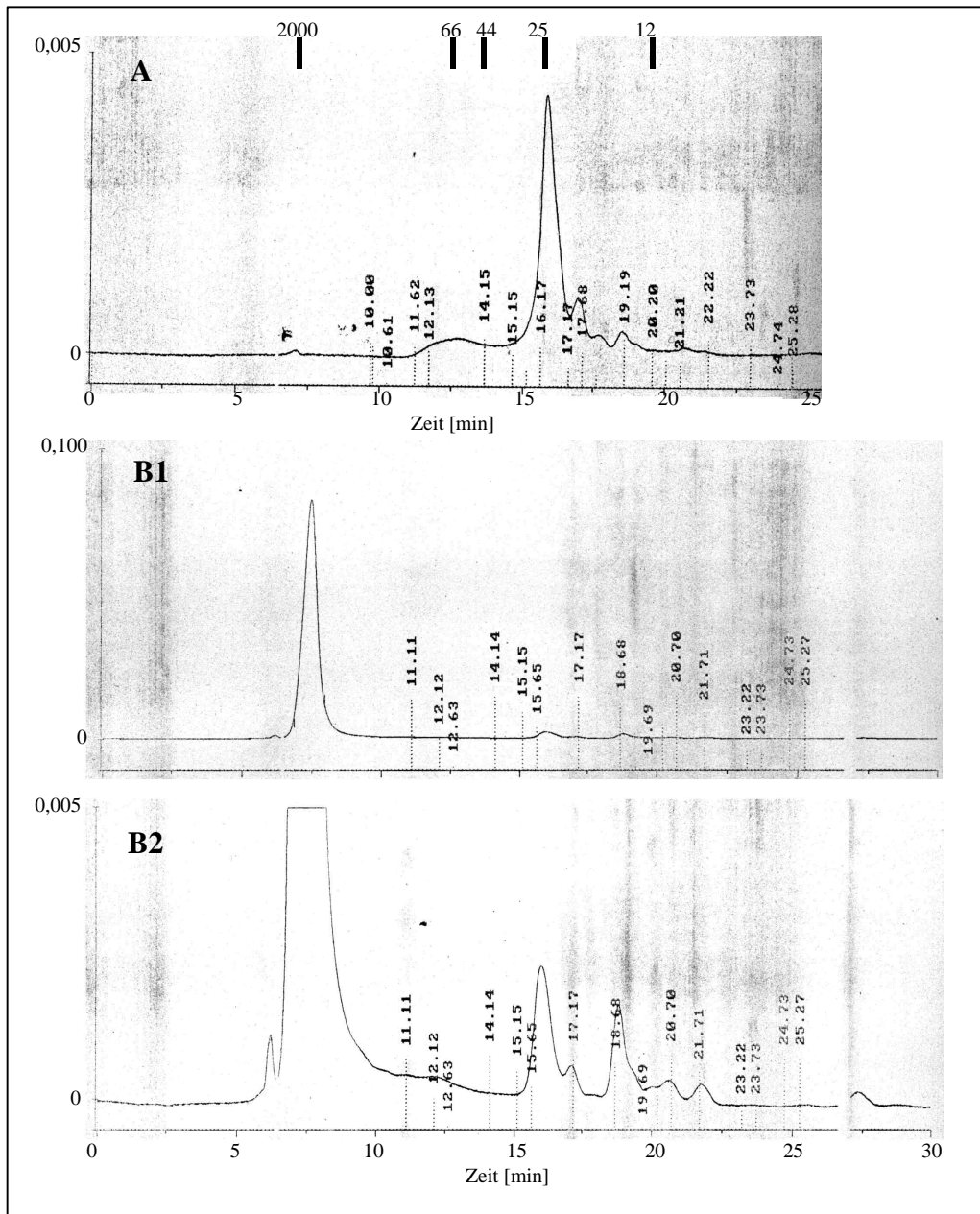


Abbildung 30: FPLC des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments mit 50  $\mu$ g/ml (A) bzw. 5mg/ml (B1 und B2) Konzentration; Auftragung der Absorption bei 280nm gegen die Elutionszeit; Elutionsgeschwindigkeit 1ml/min; Spektrum A: 50 $\mu$ g/ml Konzentration, Auftragungsmenge 2,5 $\mu$ g; Oben aufgetragen die durch Eichen der Säule ermittelten Größen in kD (Dextran: 2000kD; BSA: 66kD; Ovalbumin: 44kD; cyt c: 12 kD); das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment eluiert nach 16min; Spektrum B1: 5mg/ml Konzentration, Auftragungsmenge 250 $\mu$ g; der Peak bei 7min entspricht der Laufmittelfront und damit einer Größe von >200kD (aus Spezifikation des Säulenmaterials); Spektrum B2: Vergrößerung der Y-Achse von Spektrum B1 um den Faktor 20, dadurch Vergrößerung des Peaks bei 16min ( $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment Monomer)

Bei der geringer konzentrierten  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung konnte ein Peak bei 16 min aufgefangen werden, dessen gelelektrophoretische Analyse, nach Aufkonzentrierung von 500 $\mu$ l auf 60 $\mu$ l, die 25 kDa Bande des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments aufwies (Abbildung 31, Spur B). Die aufkonzentrierte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung (5mg/ml) wies hingegen auf den ersten Blick

ein vollkommen anderes Elutionsprofil auf, der größte Peak und damit das meiste Protein kam mit der „Laufmittelfront“ von der Säule. Auch dieses Protein wurde gelelektrophoretisch analysiert. Das Ergebnis (Abbildung 31, Spur A) zeigte, dass auch das Protein der Laufmittelfront aus  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment besteht. Eine Vergrößerung der Y-Achse von Spektrum B1 zeigte jedoch, dass immer noch Protein in der 16 min Fraktion eluiert wurde, allerdings in noch geringerer Menge als bei Spektrum A (0,02 Absorption Units im vgl. zu 0,04 AU). Die Bande dieses Proteins war selbst auf einer Silberfärbung aufgrund der geringen Konzentration nicht mehr zu erkennen.

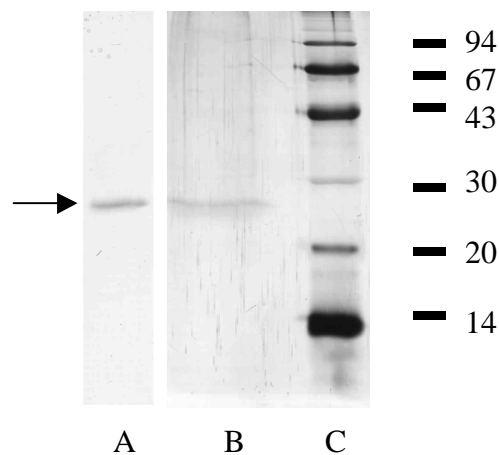


Abbildung 31: 15% SDS-PAGE Coomassie Blau (Spur A) und Silber (Spur B und C) gefärbt, Auftragung verschiedener Fraktionen der FPLC; Spur A: 20  $\mu$ l der 7 min Fraktion der 5mg/ml  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung mit relativ starker Bande bei 25 kD; Spur B: 20  $\mu$ l der 16 min Fraktion der verdünnten  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentlösung, nach Aufkonzentrierung des Eluats von 500  $\mu$ l auf 60  $\mu$ l, mit kaum sichtbarer Bande bei 25 kD; Spur C: Marker

### 3.4 Bindungseigenschaften

#### 3.4.1 Western Blot mit monoklonalem Antikörper WF6

Der WF6 Antikörper wurde im Labor von Alfred Maelicke entwickelt und bindet an die Acetylcholinbindungsstelle der  $\alpha$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors ( $\alpha$  181-200).<sup>52,63,64</sup> Um eine Bindung nachzuweisen, wurde eine 15% SDS-PAGE des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments sowie aufgereinigter Inclusion Bodies aus 2.2.6 mittels Elektrobloßtechnik auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach Inkubation mit dem WF6 Antikörper wurde dessen Bindung mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass das mitaufgetragene Bakterienextrakt aus E.coli C600 erwartungsgemäß keine Bindung aufweist, wohingegen sowohl die Inclusionbodies als auch das renaturierte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment den WF6 Antikörper binden.

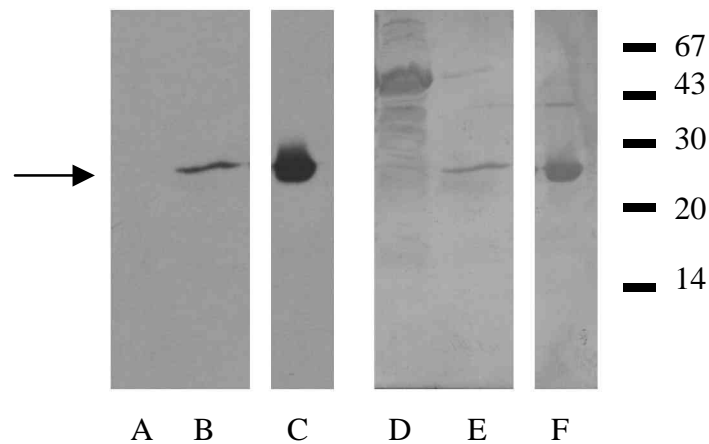


Abbildung 32: Bindung von WF6 Antikörper an das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment; Immunoblot eines 15% SDS PAGE-Gels; Spur A-C: mit Chemilumineszenz sichtbar gemachte Antikörperbindung; Spur D-F Coomassie Blau Färbung der PVDF-Membran, nach dem Elektroblothen; Spur A/D: bakterieller Proteinextrakt aus E.coli C600 als Negativprobe; Spur B/E: aufgereinigtes, renaturiertes  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment; Spur C/F: gereinigte Inclusionbodies

### 3.4.2 Gleichgewichtsbindung von $\alpha$ -Bungarotoxin

Alle Bindungsexperimente wurden mit  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment durchgeführt, dessen Renaturierung nicht länger als 1 Woche zurücklag und dem Proteaseinhibitoren (Complete® Proteaseinhibitorcocktail, PMSF und EDTA) zugesetzt waren. Unter R ist im folgenden immer das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment und als L immer  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin zu verstehen. Die Fragmentlösungen hatten eine Konzentration zwischen 50-200 $\mu\text{g/ml}$  und wurden auf die entsprechenden Endkonzentrationen verdünnt. Es wurde immer 3h inkubiert, um Gleichgewichtsbedingungen zu schaffen (dieser Wert war durch kinetische Messungen ermittelt worden 3.4.4). Für sehr kleine Konzentrationen von  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin sind die Gleichgewichtsbedingungen nach 3 h noch nicht erreicht, da die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration der Liganden abhängt. Deshalb sind die Werte für das spezifisch gebundenes Toxin in diesem Fall niedriger, als im Falle eines bereits erreichten Gleichgewichtszustandes. Aus diesem Grund wird ein  $K_{\text{Dapp}}$ -Wert bestimmt, der höher (scheinbar niedrigere Affinität) ist als der tatsächliche  $K_{\text{D}}$ -Wert. In der Diskussion wird auf diese Tatsache nochmals eingegangen. Alle Fehler berechneten sich direkt aus den Standardabweichungen der Meßwerte und flossen über Fehlerfortpflanzung in die kalkulierten Werte mit ein.

Die Gleichgewichtsbindung von  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin an  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment wurde als Triplikat gemessen. Die Fragmentkonzentration betrug 3nM, die des Radioliganden zwischen 1 und 80nM. Sowohl freier Radioligand [L] als auch gebundener Radioligand [RL] und eingesetzter Radioligand [L]<sub>0</sub> wurden wie in 2.2.21 und 2.2.20 beschrieben mittels Filtrationsmethode bestimmt. Die primär erhaltenen dpm-Werte (Zerfallsereignisse pro Minute) wurden über die spezifische Radioaktivität des Radioliganden in Konzentrationen umgerechnet. Die Auftragung der Daten erfolgte einerseits als spezifisch gebundener Ligand [RL] gegen freien Liganden [L] (Abbildung 33) und andererseits in linearisierter Form als Scatchard- (Abbildung 34) bzw. Hill-Auftragung (Abbildung 35).

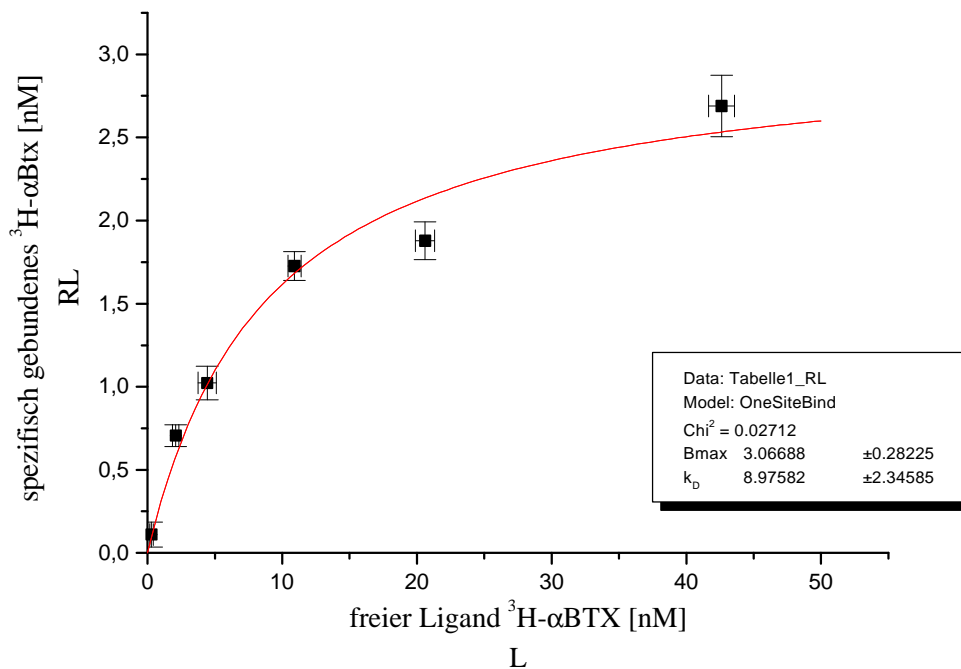


Abbildung 33: Auftragung des spezifisch gebundenen  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin [RL] gegen das freie  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin [L]; unspezifische Bindung wurde mit 1000 fachem Überschuß an  $\alpha$ -Bungarotoxin (nicht radioaktiv) ermittelt und betrug 10%; rote Kurve: Berechnung mit Origin 5.0 nach der Gleichung für Bindung an einer Bindungsstelle ergab für  $K_D$   $8,98 \pm 2,35$  nM und für  $B_{\max}$   $3,07 \pm 0,28$  nM; eingesetzte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragmentkonzentration 3nM; Inkubationsdauer 3h bei Raumtemperatur; die Punkte sind Durchschnittswerte von Dreifachmessungen (Triplikate)

Die Daten der Sättigungskurve (Abbildung 33) wurden nach der Gleichung für einseitige Bindung (Gleichung 14) entsprechend Gleichung 2 analysiert (mit Origin 5.0). Damit wurde für  $K_D$  ein Wert von  $8,98 \pm 2,35$  nM und für  $B_{\max}$  ein Wert von  $3,07 \pm 0,28$  nM erhalten.

$$y = \frac{B_{\max} \cdot x}{K_D + x}$$

Gleichung 14: Gleichung, nach der die Sättigungskurve analysiert wurde

Bei der Analyse nach Scatchard wurde wie in 2.2.20 ausgeführt eine gewichtete lineare Regressionsanalyse durchgeführt, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass die Meßwerte im Randbereich der Geraden die größten Fehlerbalken tragen (hervorgerufen durch die Linearisierung), jedoch bei einer normalen Regressionsanalyse am stärksten berücksichtigt werden. Dies ist bei einer gewichteten Regressionsanalyse nicht der Fall.<sup>55</sup>

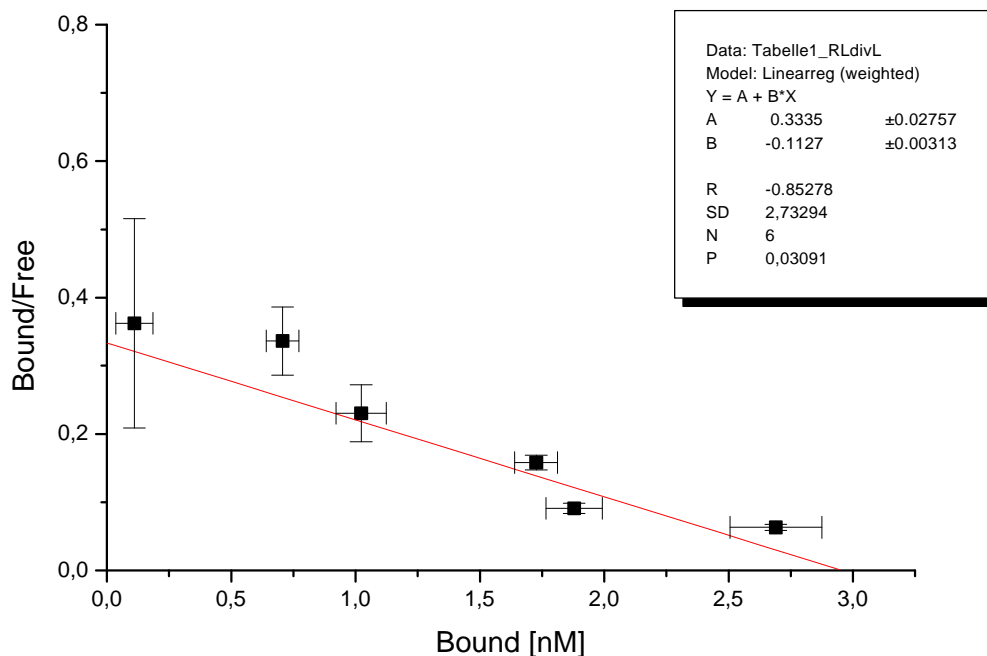


Abbildung 34: Scatchard-Auftragung der Bindung von <sup>3</sup>H- $\alpha$ -Bungarotoxin an  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment aus Abbildung 33, eingesetzte Konzentrationen wie in Abbildung 33; rote Linie: gewichtete lineare Regression (Origin 5.0) unter Einbeziehung der Fehlerbalken ergab nach Umrechnung für  $K_D = 1/B = 8,87 \pm 0,25$  und für  $B_{\max} = 2,95 \pm 0,26$  nM;

Für  $K_{Dapp}$  ergab die Scatchard-Kurve einen Wert von  $8,87 \pm 0,25$  nM und für  $B_{\max}$   $2,95 \pm 0,26$  nM. Die Literaturwerte für den nativen Rezeptor liegen zwischen  $1\text{nM}^{59}$  und  $0,01\text{nM}^{86}$ . Somit sind die Werte der renaturierten LBD etwas schlechter als die des nativen Rezeptors. Um zu ermitteln ob Kooperativität bei der Bindung vorliegt verwendet man die Linearisierung der Bindungsdaten nach Hill.<sup>55</sup>

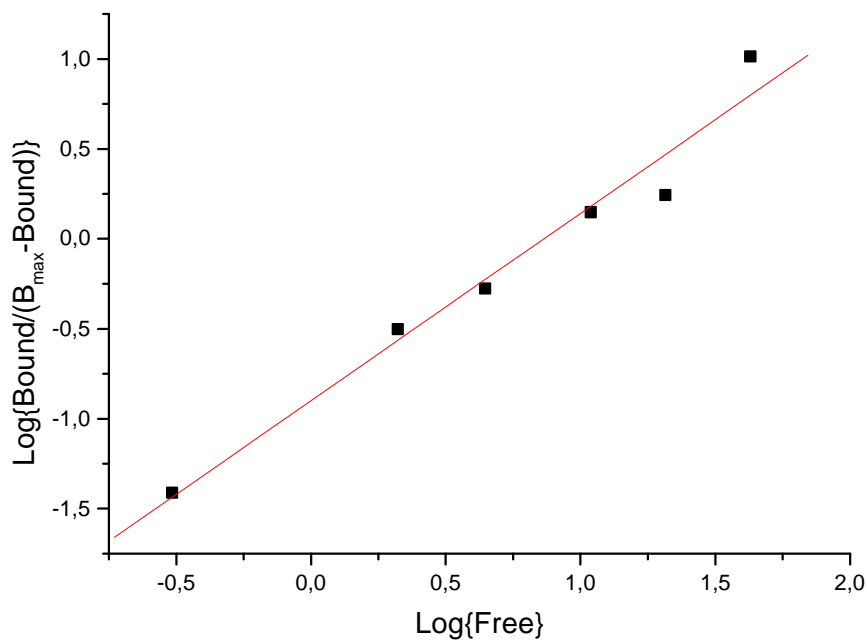


Abbildung 35: Hill-Auftragung; Darstellung der Daten aus Abbildung 33 nach Gleichung 4 ergibt einen Hillkoeffizienten von  $1,04 \pm 0,09$ .

Der ermittelte  $n_H$  Wert von 1,04 zeigt die Abwesenheit jeglicher Kooperativität, wie sie auch zu erwarten war, da Kooperativität bedeuten würde, dass die Bindung eines Liganden die Bindung eines zweiten Liganden an das Rezeptorfragment beeinflussen würde. Das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment besitzt aber nur eine Bindungsstelle für  $\alpha$ -Bungarotoxin und kann deshalb diese Eigenschaft nicht aufweisen.

### 3.4.3 Wettbewerbsstudien mit verschiedenen Liganden

Die Bindung von  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin an  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment kann durch Liganden beeinflusst werden. Als Liganden wurden die aktiven Isomere von Methyllycaconitin, d-Tubocurare, Nikotin, Anatoxin-a und Acetylcholin verwendet. Zur Negativkontrolle wurden noch Wettbewerbsstudien mit Procain (bindet in der Kanalpore des nAChR) und Atropin (bindet am den muscarinischen AChR) durchgeführt; Liganden, die nicht an der LBD des nikotinischen Acetylcholinrezeptors binden und deshalb keinen Einfluss auf die  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxinbindung an die LBD zeigen dürfen. Die Fragmentkonzentration betrug 1 nM, die des  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxins 6 nM und die Konzentration der mit der Toxinbindung konkurrierenden Liganden zwischen  $10^{-10}$  und  $10^{-2}$  M. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentrationen an gebundenem  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxins wurden durch die in 2.2.21

beschriebenen Filtermethode ermittelt. Dabei wird die Radioaktivität des an den Filter (durch tertiäre Aminogruppen basisch) gebundenen LBD/<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Bungarotoxin-Komplexes gemessen. Dies geschieht durch Messen der Zerfallsereignisse pro Minute (dpm-Werte). Diese Werte werden auf die spezifische Bindung ohne Inhibitor normiert (100%). Für jeden Kompetitor wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Prozentwerte wurden als Semilogarithmische Auftragung dargestellt. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit Origin 5.0 nach der Gleichung für Einseitige Kompetition (Gleichung 15) bestimmt.

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(x - \log x_0)}}$$

Gleichung 15: A<sub>1</sub>: obere Asymptote, A<sub>2</sub>: untere Asymptote, x<sub>0</sub>: log(IC<sub>50</sub>)

Im folgenden sind die Auftragungen aller Kompetitionsexperimente (Abbildung 36 bis Abbildung 42) dargestellt. Am Ende erfolgt eine grafische und tabellarische Zusammenfassung.

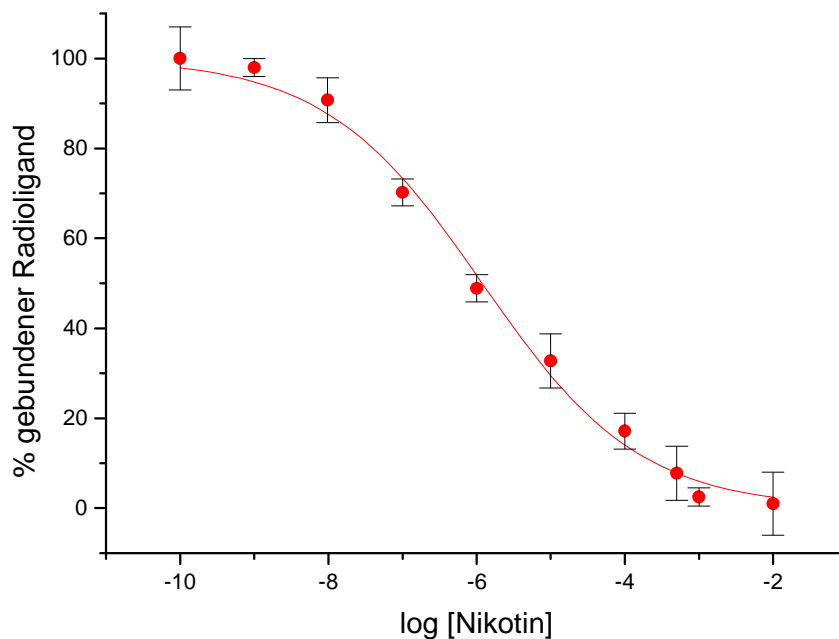


Abbildung 36: Auftragung des Hemmungsexperiments mit Nikotin; Konzentration des Fragments [R]<sub>0</sub>: 1 nM; Konzentration des Radioliganden [L]<sub>0</sub>: 6 nM; Inkubationsdauer: 3h bei Raumtemperatur; die Punkte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen; spezifische Bindung genormt auf spezifische Bindung ohne Inhibitor; rote Linie: Berechnung nach Gleichung 15; daraus errechneter IC<sub>50</sub>-Wert: 1,19 ± 0,17  $\mu$ M

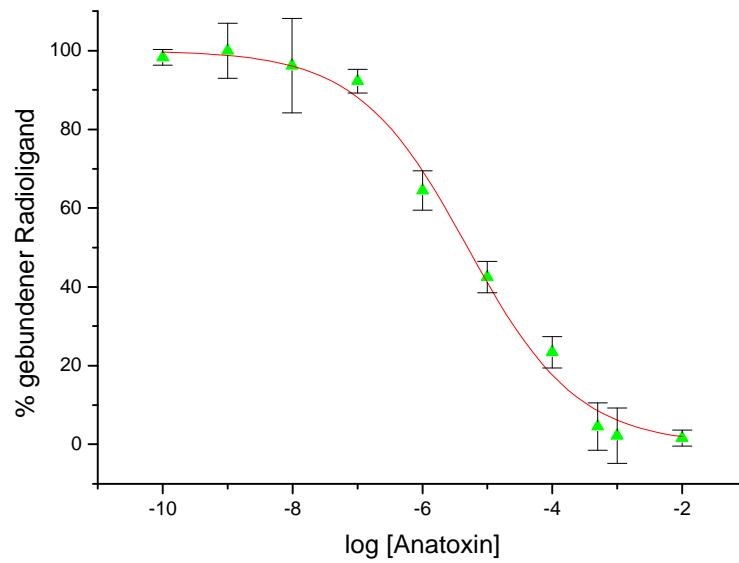


Abbildung 37: Auftragung des Hemmungsexperiments mit Anatoxin-a; Konzentration des Fragments  $[R]_0$ : 1 nM; Konzentration des Radioliganden  $[L]_0$ : 6 nM; Inkubationsdauer: 3h bei Raumtemperatur; die Punkte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen; spezifische Bindung genormt auf spezifische Bindung ohne Inhibitor; rote Linie: Berechnung nach Gleichung 15; daraus errechneter  $IC_{50}$ -Wert:  $4,97 \pm 1,0 \mu M$

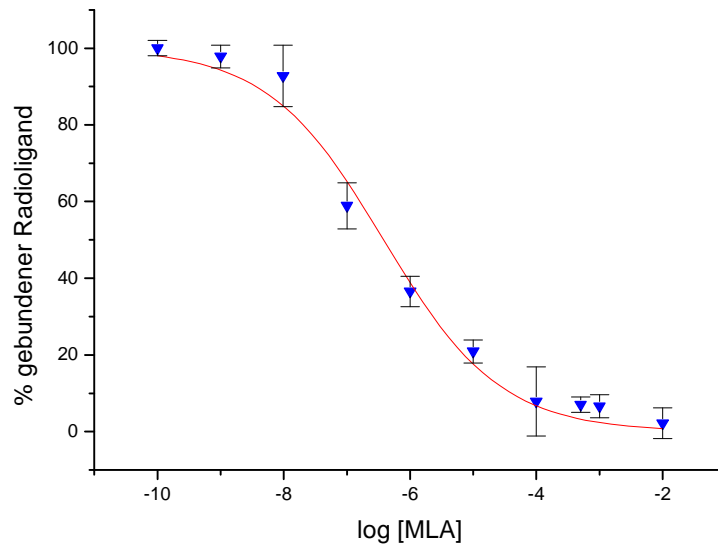


Abbildung 38: Auftragung des Hemmungsexperiments mit Methylcaconitin; Konzentration des Fragments  $[R]_0$ : 1 nM; Konzentration des Radioliganden  $[L]_0$ : 6 nM; Inkubationsdauer: 3h bei Raumtemperatur; die Punkte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen; spezifische Bindung genormt auf spezifische Bindung ohne Inhibitor; rote Linie: Berechnung nach Gleichung 15; daraus errechneter  $IC_{50}$ -Wert:  $0,38 \pm 0,1 \mu M$



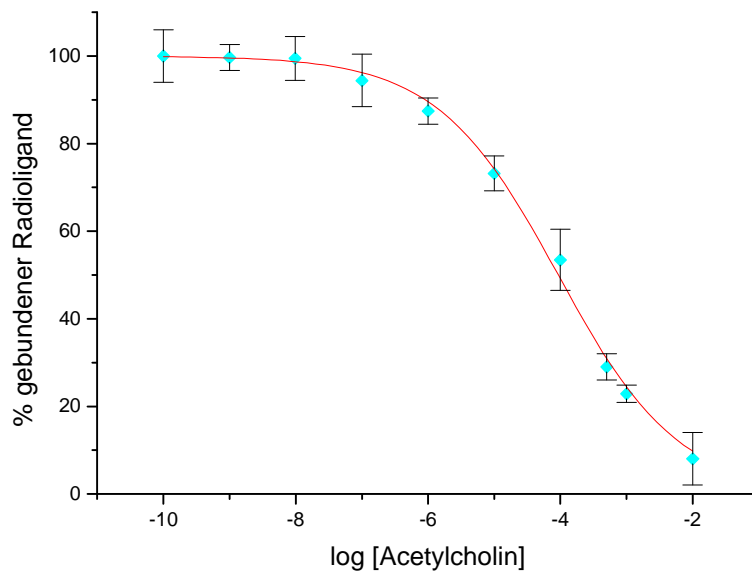


Abbildung 39: Auftragung des Hemmungsexperiments mit Acetylcholin; Konzentration des Fragments  $[R]_0$ : 1 nM; Konzentration des Radioliganden  $[L]_0$ : 6 nM; Inkubationsdauer: 3h bei Raumtemperatur; die Punkte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen; spezifische Bindung genormt auf spezifische Bindung ohne Inhibitor; rote Linie: Berechnung nach Gleichung 15; daraus errechneter  $IC_{50}$ -Wert:  $92,8 \pm 11 \mu\text{M}$

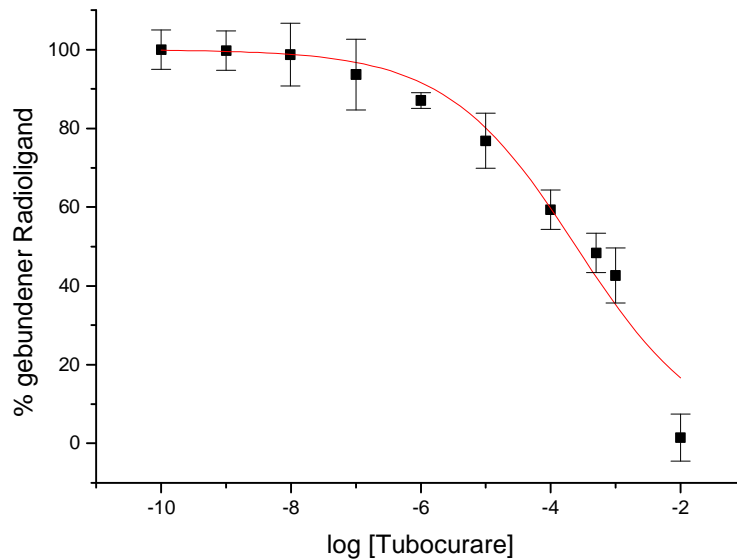


Abbildung 40: Auftragung des Hemmungsexperiments mit d-Tubocurare; Konzentration des Fragments  $[R]_0$ : 1 nM; Konzentration des Radioliganden  $[L]_0$ : 6 nM; spezifische Bindung genormt auf spezifische Bindung ohne Inhibitor; rote Linie: Berechnung nach Gleichung 15; daraus errechneter  $IC_{50}$ -Wert:  $247 \pm 95 \mu\text{M}$

## Ergebnisse

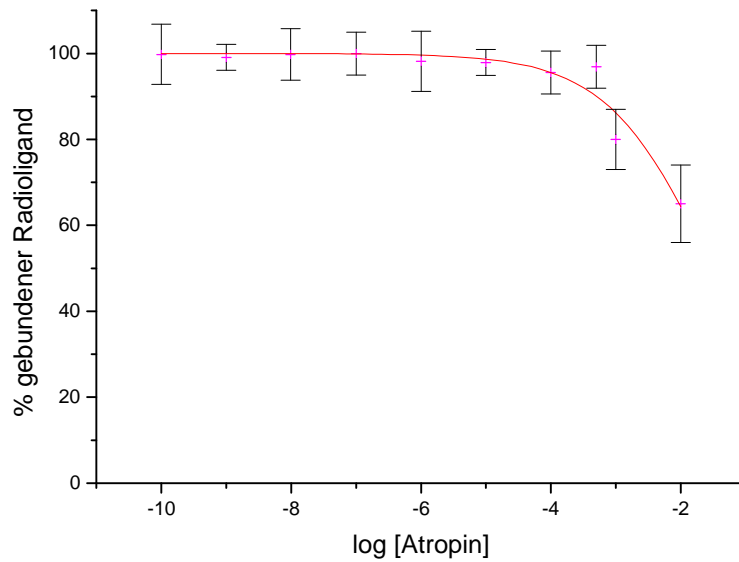


Abbildung 41: Auftragung des Hemmungsexperiments mit Atropin; Konzentration des Fragments  $[R]_0$ : 1 nM; Konzentration des Radioliganden  $[L]_0$ : 6 nM; Inkubationsdauer: 3h bei Raumtemperatur; die Punkte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen; spezifische Bindung genormt auf spezifische Bindung ohne Inhibitor; rote Linie: Berechnung nach Gleichung 15; aufgrund fehlender Konkurrenz wurde kein  $IC_{50}$ -Wert berechnet

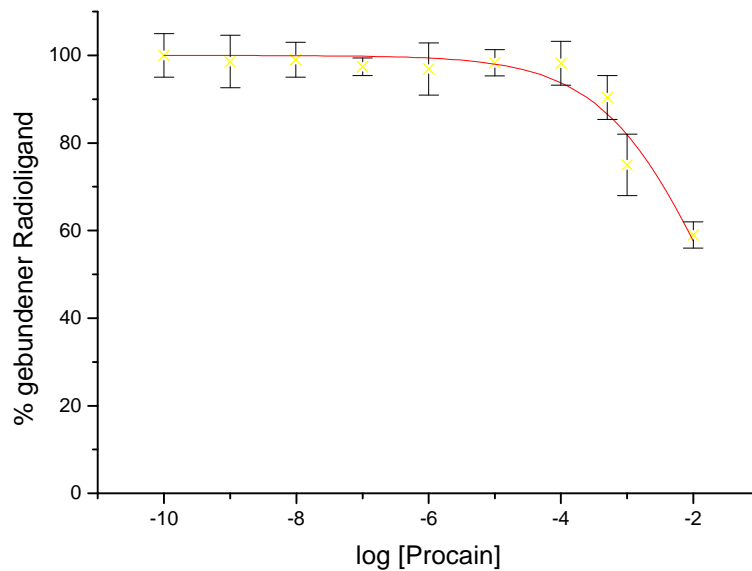


Abbildung 42: Auftragung des Hemmungsexperiments mit Procain; Konzentration des Fragments  $[R]_0$ : 1 nM; Konzentration des Radioliganden  $[L]_0$ : 6 nM; Inkubationsdauer: 3h bei Raumtemperatur; die Punkte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Messungen; spezifische Bindung genormt auf spezifische Bindung ohne Inhibitor; rote Linie: Berechnung nach Gleichung 15; aufgrund fehlender Konkurrenz wurde kein  $IC_{50}$ -Wert berechnet

Mit der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 6) können die  $IC_{50}$ -Werte in  $K_I$ -Werte umgerechnet werden (Tabelle 3.4-a). Dazu wurden für [L] 6 nM und für  $K_D$  9 nM verwendet.

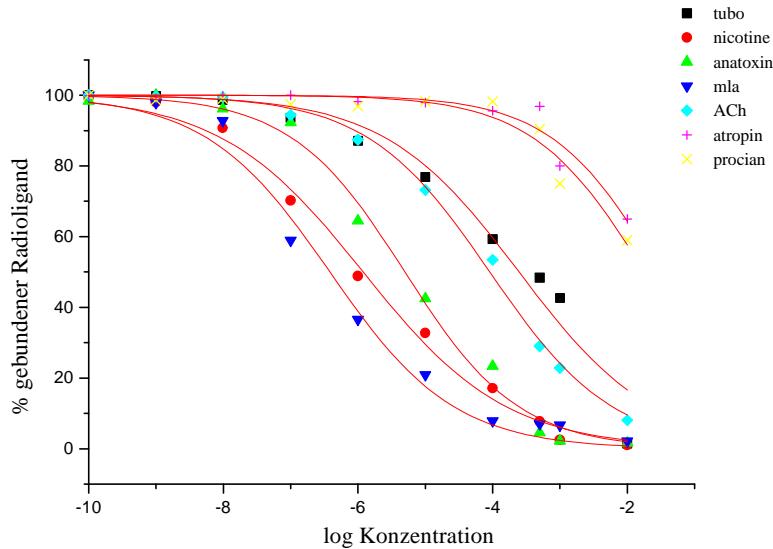


Abbildung 43: Zusammenfassung aller Hemmungsexperimente aus Abbildung 36 bis Abbildung 42, Fehlerbalken siehe dort

Ligand	$IC_{50}$ [ $\mu$ M] n = 3	$K_I$ [ $\mu$ M]	$K_I$ [ $\mu$ M] aus der Literatur
Nikotin	$1,19 \pm 0,17$	$0,72 \pm 0,1$	1,0 bis $0,1^{59,85}$
Anatoxin	$4,97 \pm 1,0$	$2,98 \pm 0,61$	0,2 bis $0,1^{88}$
Methyllycaconitin	$0,38 \pm 0,1$	$0,23 \pm 0,06$	$1,0^{89}$
Acetylcholin	$92,8 \pm 11$	$55,7 \pm 6,7$	5,7 bis $0,2^{96}$
Tubocurare	$247 \pm 95$	$148 \pm 57$	4,0 bis $0,24^{96,85}$
Atropin	----	----	
Procain	----	----	

Tabelle 3.4-a: Zusammenfassung der durch jeweils drei unabhängige Hemmungsexperimente ermittelten  $IC_{50}$ - und daraus berechneten  $K_I$ -Werte,

Die Stärke der Inhibition der  $\alpha$ -Bungarotoxinbindung an das renaturierte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment steigt damit von Tubocurare < Acetylcholin < Anatoxin < Nikotin < MLA. Die zur Kontrolle verwendeten Substanzen Procain und Atropin waren nicht fähig, die Bindung von  $\alpha$ -Bungarotoxin zu kompetitieren. Aus den Vergleich mit den Literaturwerten zeigt sich, dass mit einer Ausnahme (MLA) die renaturierte LBD leicht schlechtere  $K_I$ -Werte aufweist. Sie liegen aber immer noch sehr nahe an den Werten des nativen Rezeptors (max. Faktor 40) und deuten darauf hin, dass die renaturierte LBD die Ligandenbindungseigenschaften des nativen Rezeptors besitzt.

3.4.4 Kinetische Bindungsdaten

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{+1}$  und  $k_{-1}$  und damit auch des  $K_D$ -Wertes wurden wie in 2.2.21.3 und 0 beschrieben Experimente durchgeführt, bei denen zu bestimmten Zeiten der Anteil an spezifisch gebundenem  $\alpha$ -Bungarotoxin [RL] bestimmt wurde. Die eingesetzte Fragmentkonzentration  $[R]_0$  betrug 11 nM und die  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Bungarotoxinkonzentration 30 nM. Zu den beschriebenen Zeiten wurden Aliquots entfernt und [RL] wurde durch die Filtermethode (2.2.21) bestimmt (Abbildung 44). Durch eine Auftragung von Y

$$k_{+1} = \frac{[\text{RL}]_{t \rightarrow \infty}}{[\text{RL}]_{t \rightarrow \infty}^2 - [R]_0 \cdot [L]_0} \cdot \frac{1}{t} \cdot \left( \ln \frac{[\text{RL}]_{t \rightarrow \infty} - [\text{RL}]_t}{[R]_0 \cdot [L]_0 - [\text{RL}]_{t \rightarrow \infty} \cdot [\text{RL}]_t} + \ln \frac{[R]_0 \cdot [L]_0}{[\text{RL}]_{t \rightarrow \infty}} \right)$$

$$Y = \ln \frac{[\text{RL}]_{t \rightarrow \infty} - [\text{RL}]_t}{[R]_0 \cdot [L]_0 - [\text{RL}]_{t \rightarrow \infty} \cdot [\text{RL}]_t}$$

Gleichung 16

gegen die Zeit wurde aus der Steigung die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{+1}$  berechnet. Dabei wurden für die Gleichgewichtswerte ( $t \rightarrow \infty$ ) die Werte verwendet, bei denen sich [RL] nicht mehr änderte ( $t > 3000\text{s}$ ). Nach dieser Zeit war komplette Sättigung erreicht.

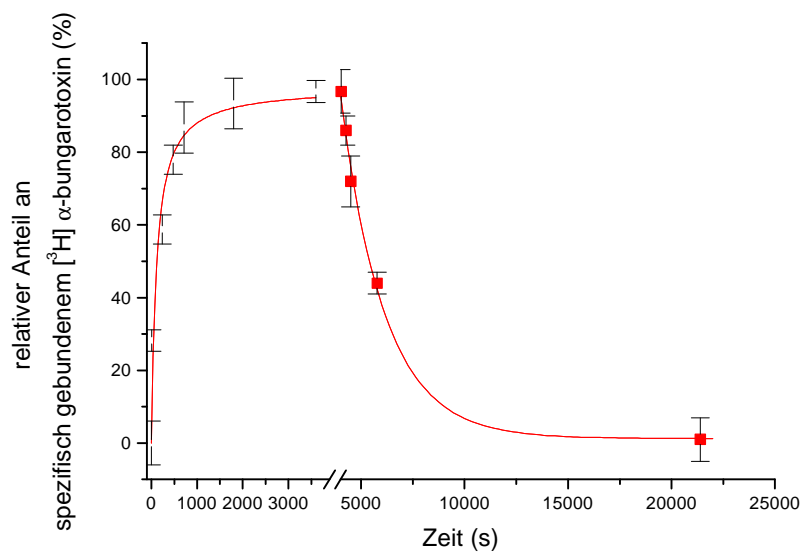


Abbildung 44: Kinetik der Assoziation und Dissoziation von  $^3\text{H}$   $\alpha$  Bungarotoxin und  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment; Auftragung von spezifisch gebundenem Liganden als Prozentanteil der Equilibriumbindung gegen die Zeit;  $[R]_0$  11 nM,  $[L]_0$  30 nM, schwarze Punkte: Assoziation, rote Punkte: nach Zugabe von  $10\mu\text{M}$  kalten  $\alpha$ -Bungarotoxin zum Zeitpunkt  $t=4000$  s

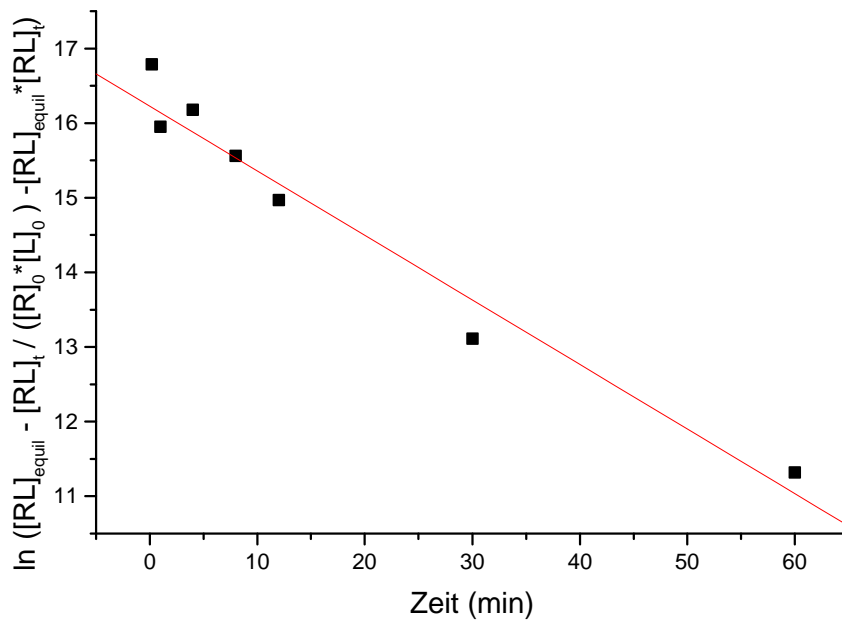


Abbildung 45: Linearisierung der Assoziationskinetikdaten nach Y (Gleichung 16); Daten aus Abbildung 44; rote Gerade: lineare Regressionsanalyse der Assoziationsdaten, aus der Steigung berechnet sich  $k_{+1} = 0,82 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

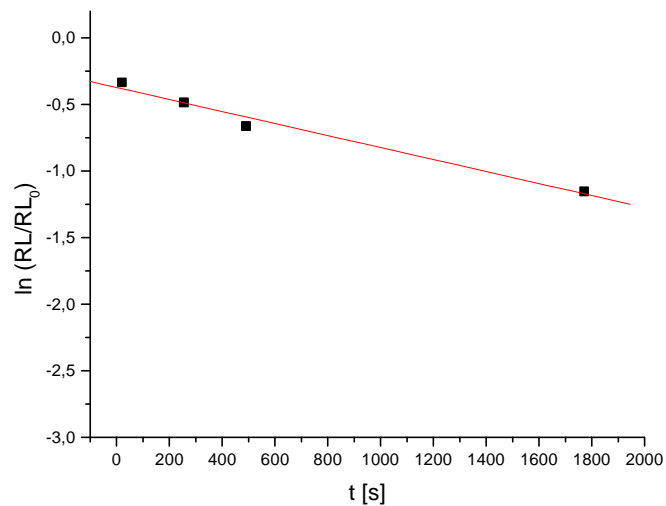


Abbildung 46: Linearisierung der Dissoziationskinetikdaten nach  $\ln([RL]_t / [RL]_{t \rightarrow \infty})$ ; Daten aus Abbildung 44; rote Gerade: lineare Regressionsanalyse der Dissoziationsdaten; aus der Steigung berechnet sich  $k_{-1} = 0,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Aus der Analyse der Kinetikdaten erhält man somit für die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{+1} = 0,82 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und für die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1} = 0,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Wie in 2.2.20.2 ausgeführt erhält man  $K_D$  aus dem Quotienten von  $k_{-1}$  und  $k_{+1}$ . Damit wurde als  $K_D = 0,4 / 0,82 \cdot 10^{-9} \text{ M} = 0,5 \text{ nM}$  bestimmt. Damit weicht der  $K_D$ -Wert, der

aus der kinetischen Messungen bestimmt wurde um eine Größenordnung von den aus den Gleichgewichtsmessungen (9 nM) bestimmten  $K_D$ -Wert ab. Eine genauere Diskussion dieser Diskrepanz findet in 4.3 statt.

## 4 Diskussion

Der *Torpedo* nAChR gilt als der Prototyp des schnellen, Liganden-gesteuerten Ionenkanals des zentralen und peripheren Nervensystems und der muskulären Endplatte. Durch sein Vorkommen im elektrischen Organ von Fischen ist der Rezeptor für biochemische und biophysikalische Studien leicht zugänglich. Trotz vieler Versuche ist es aber bis heute nicht gelungen die Struktur des Rezeptors bis auf atomare Ebene aufzulösen, da es nicht möglich war die aus den elektrischen Organen gewonnenen, mit Detergentien solubilisierten Membranfragmente zu kristallisieren (siehe Einleitung).

Aufgrund der Tatsache, dass die Ligandenbindungsdomäne der  $\alpha$ -Untereinheit des Rezeptors für eine Vielzahl von Eigenschaften und Funktionen des Rezeptors verantwortlich ist (Acetylcholinbindungsstelle; Wirkort vieler pharmakologisch wirksamer Substanzen, wie kompetitiven Antagonisten und nichtkompetitiver Agonisten<sup>65</sup>) und sich selbständig falten kann<sup>32</sup>, bietet sich die Möglichkeit, diese Domäne als Fragment heterolog zu exprimieren und als lösliches Protein in seine native Form zu überführen.

Das renaturierte Fragment sollte dann die ähnliche Eigenschaften aufweisen, die auch der LBD des Rezeptors zugeschrieben werden. Dies beinhaltet sowohl Größe, Isoelektrischen Punkt, Sekundärstruktur, Bindung von Antikörpern im Western Blot, die Bindung von Agonisten und kompetitiven Antagonisten als auch die kinetischen Eigenschaften. Das ektopisch exprimierte Fragment soll also die Konformation der intakten LBD der  $\alpha$ -Untereinheit reproduzieren.

Während der Dauer dieser Doktorarbeit wurden zwei Veröffentlichungen publiziert, die genau diesen Ansatz für andere Subtypen des Rezeptors wählten.<sup>66,67</sup> Dabei wurde die LBD der  $\alpha 7$ -Untereinheit, bzw die LBD der  $\alpha$ -Untereinheit des muskulären Maus-nAChR (als Fusionsprotein mit einer GPI-Ankersequenz [Glykosylphosphatidylinositol]), in transient transfizierten Oozyten exprimiert. Es zeigte sich, dass in beiden Fällen die wasserlösliche extrazelluläre Domäne relativ schwach exprimiert wurde. Pharmakologische Untersuchungen der beiden LBD fanden in beiden Fällen nur begrenzt statt. Soweit vorhanden werden die Ergebnisse dieser Veröffentlichungen mit den hier gemachten Ergebnissen verglichen.

## 4.1 Biochemische und biophysikalische Daten

Wie bereits in der Einleitung erläutert, führt die heterologe Expression von Proteinen in Bakterien häufig zu Einschlusskörpern (sogenannten *Inclusionbodies*). Trotz der Notwendigkeit einer späteren Wiederherstellung der nativen Struktur (Renaturierung) wird diese Strategie oft verwendet, da die Proteine dadurch dem Zugang von Proteasen entzogen sind und in grosser Menge produziert werden. Die genetische Information für die ersten 209 Aminosäuren des N-Terminus (627 Basen) der  $\alpha$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors aus *Torpedo marmorata* liegt bereits im pET3a-Vektor vor. Dieser wurde dann in E.coli Bakterien transformiert. Im pET3a-Vektor unterliegt die DNA der Kontrolle eines starken Promotors ( $P_{\Phi 10}$ ), der durch Isopropyl- $\beta$ -Galactosid (IPTG) induziert wird.

Es zeigte sich, dass die Induktion der transformierten Bakterien (E. coli) mit IPTG die Bildung eines 25kD grossen Proteins bewirkte, das in Form von Einschlusskörpern vorliegt. Das unlösliche Protein liess sich durch Anwendung von Detergentien und mittelstark denaturierenden Reagentien reinigen (80-90%) und durch stark denaturierende Reagentien in Verbindung mit Reduktionsmitteln (Thiolen), aber ohne Detergentien solubilisieren. Im weiteren Verlauf der Renaturierung konnte die Reinheit sogar soweit gesteigert werden, dass mit Silberfärbung keine Verunreinigungen mehr nachweisbar waren, einer Methode, die bereits Mengen von 100ng sichtbar macht.

Bereits für andere Proteinen erfolgreiche Strategien (Prof R. Rudolph, Institut für Biotechnology, Universität Halle) zur in-vitro Renaturierung<sup>35,44,68,69</sup> wurden bei dem  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment verwendet und dabei speziell für dieses Fragment optimiert. Die Verwendung eines „oxido-shuffling“-Systems (GSH/GSSG) und der Einsatz von faltungsunterstützenden Reagentien (Arginin) bieten ideale Bedingungen, die native Konformation des Fragments, beginnend vom vollständig denaturierten Protein, durch Ausbildung korrekt verbrückter Disulfidbrücken (nativ Cys192/Cys193 und Cys128/Cys142) und durch Destabilisierung von falsch gefalteten Intermediaten, wiederherzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass das vorher in Einschlusskörpern vorliegende, unlösliche  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment (LBD) durch diese Renaturierungsmethode in eine lösliche Konformation überführt wurde. 8% des Proteins aus den gereinigten Einschlusskörpern (10 mg renaturiertes Fragment aus 125mg aus einem Liter Bakterienkultur) konnte renaturiert werden, der Rest fiel während des Renaturierungsprozesses als falsch gefaltetes Fragment (Aggregat), aus und wurde durch



Zentrifugation entfernt. Da die *in-vivo* Faltung der  $\alpha$ -Untereinheit in Muskelzellen auch nur mit 30% Effizienz abläuft<sup>73</sup> (das restliche falsch gefaltete Protein wird dort dem zellulären Abbausystem zugeführt<sup>70</sup>) kann man bei einer 8%igen *in-vitro* Faltungsausbeute von einer relativ guten Ausbeute sprechen. Bei einem anderen *in vitro* System (Reticulocyten Translationssystem aus Kaninchen mit Pankreas Mikrosomen)<sup>75</sup>, bei dem man das zelluläre Translationssystem der Reticulocyten zur Produktion der gesamten  $\alpha$ -Untereinheit des nAChR verwendete, betrug die Faltungsausbeute 15%. Zwar war sie damit doppelt so effizient wie das hier vorgestellte Verfahren, man konnte aber nur geringe Mengen der  $\alpha$ -Untereinheit exprimieren. Diese mussten, da sie noch die lipophilen Transmembranregionen der Untereinheit enthielten, noch mit Detergentien in Lösung gehalten werden. *In vivo* wird die Faltung auch durch die Bildung von Heterodimeren aus  $\alpha$  und  $\delta$  bzw.  $\gamma$  erleichtert, die dann in einem finalen Schritt aus einem  $\alpha\delta$ , einem  $\alpha\gamma$  Dimer und der  $\beta$ -Untereinheit den Rezeptor aufbauen.<sup>71</sup>

Im Rahmen der Renaturierung wird auf die Verwendung von Detergentien verzichtet, da diese die Eigenschaften des Rezeptors verfälschen und damit eine Untersuchung der Renaturierung erschweren. So erhöht Natriumdodecylsulfat (SDS) und Triton X-100 die Affinität des Rezeptors für  $\alpha$ -Bungarotoxin.<sup>85,5</sup>

Die renaturierte LBD zeigte die isoelektrischen ( $pI_{\text{gemessen}}:5,5$ ) Eigenschaften die aus seiner Sequenz theoretisch bestimmt worden waren ( $pI_{\text{theor.}}:5,4$ ). Die durch Massenspektroskopie (MALDI) ermittelte Größe von 24896 Da (berechnet 24796 Da) für die renaturierte LBD weist eine Differenz von 100 im Vergleich zum theoretischen Wert auf. Dies ist aber nicht ungewöhnlich, da einerseits die Genauigkeit dieser Methode in diesem Massenbereich bei  $\pm 50$  Da liegt<sup>72</sup> und sich andererseits zufällige Acrylamidadditionsprodukte (+70) bilden können, die die Masse der renaturierten LBD vergrößern. Die Analyse der N-terminalen Sequenz ergab eine vollständige Übereinstimmung der überprüften ersten 15 Aminosäuren. Die Bindung des gegen die Acetylcholinbindungsstelle des nAChR gerichteten, monoklonalen Antikörpers WF6 im Western Blot gibt auch Aufschluß darüber, dass die für dessen Bindung wichtigen Bereiche<sup>52,63,64</sup> zwischen  $\alpha$ 181-200 vorhanden sind. Der ermittelte molekulare Absorptionskoeffizient  $\epsilon$  bei 280 nm stimmt mit dem aufgrund der Sequenz berechneten Wert überein.

Da keine freien SH-Gruppen nachgewiesen werden konnten, liegen alle Cysteine in der renaturierten LBD in oxidiertem Form (zB. als Cystine) vor. Dies war von besonderer Relevanz, da frühere Veröffentlichungen auf die Bedeutung der Disulfidbrückenbildung für die

Faltungsreaktion der  $\alpha$ -Untereinheit hingewiesen haben.<sup>73,74,75</sup> So ist die in vitro Faltung der  $\alpha$ -Untereinheit mit reduzierten Cysteinen nicht möglich.<sup>75</sup> Außerdem sind die Disulfidbrücken an der Ligandenerkennung beteiligt, so führt eine Reduktion der Disulfidbrücken zu einer verringerten Affinität des Rezeptors für cholinerge Liganden.<sup>76</sup> Durch die Verwendung des GSH/GSSG Systems (*oxido-shuffling*) konnte, durch ständiges Öffnen und Schliessen der Disulfidbrücken, die native Konformation entstehen. Diese Strategie wurde bereits bei anderen Disulfidbrücken enthaltenden Proteinen angewandt.<sup>35</sup>

Das Chromatografiediagramm zeigt, dass die renaturierte LBD bei Konzentrationen unter 1mg/ml als 25 kDa Protein und damit als Monomer eluiert. Geht man zu höheren Konzentrationen über, so beobachtet man die Bildung von Aggregaten mit Molekulargewichten über 2 MDa. Dies bedeutet, dass man bei der Aufkonzentrierung im hier verwendeten Puffersystem (100mM NaCl, 10mM TRIS/Sucrose, pH 7,4) die Konzentration der LBD nicht über 1 mg/ml sein sollte, da sonst Wechselwirkungen zu Aggregationsreaktionen führen und das Protein ausfallen lassen. Dies hat große Relevanz für später stattfindende Versuche zur Ermittlung der atomaren Struktur (mehrdimensionales NMR, Kristallisation mit anschließender Röntgenbeugung), bei denen man mit hohen Konzentrationen (> 5mg/ml) arbeiten muss. Es bedeutet aber auch, dass man bei den für pharmakologische Studien verwendeten LBD-Lösungen (die aus aufkonzentrierten Lösungen verdünnt werden) immer unter der Konzentration von 1 mg/ml bleiben muss, da sonst nicht-native, aggregierte LBD in der Lösung vorhanden ist und somit die aktive Proteinkonzentration nicht der gemessenen Proteinkonzentration (BCA-Test) entspricht. Dies würde die  $K_D$ - bzw.  $K_I$ Werte verfälschen, da dort die Proteinkonzentration in die Berechnung eingeht. Die genaue Kenntnis der LBD-Konzentration ist für die Bestimmung der Bindungsdaten äusserst wichtig.

Die biochemischen und biophysikalischen Daten zeigen damit, dass es sich bei der ektopisch exprimierten, aufgereinigten und renaturierten LBD um die ersten 209 Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheit des nAChR aus *Torpedo marmorata* handelt.

## 4.2 Sekundärstrukturdaten

$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]	Protein	Author
34	29	gesamter Rezeptor	Moore et al. <sup>77</sup>
35	33	gesamter Rezeptor	Yager et al. <sup>78</sup>
23	43	gesamter Rezeptor	Mielke and Wallace <sup>79</sup>
40	20	gesamter Rezeptor	Wu et al. <sup>80</sup>
39	36	gesamter Rezeptor	Méthot et al. <sup>81</sup>
drei Stränge je $\geq 12$ Å	----	LBD $\alpha$ -UE (Torpedo)	Unwin <sup>20</sup>
30	45	LBD $\alpha$ -UE (Torpedo)	Alexeev et al. <sup>82</sup>
12	51	LBD $\alpha$ -UE (Maus)	West et al. <sup>67</sup>
29,7	24,9	LBD (theor. Modell)	Ortells <sup>83</sup>
20	35	LBD (theor. Modell)	Tsigelny et al. <sup>23</sup>
15	45	$\alpha$ nAChR <sub>1-209</sub> (renat. LBD)	

Tabelle 4.2-a: Sekundärstrukturvorhersagen für den nikotinischen Acetylcholinrezeptor aus *Torpedo* bzw. dessen Ligandenbindungsdomäne. Die Daten sind Ergebnisse von spektroskopischen, elektronenmikroskopischen oder *Molecular Modeling* Versuchen. letzte Zeile: Ergebnis der Analyse des CD-Spektrums der renaturierten LBD mit dem CONTIN-Program

Bei der Untersuchung von nAChR aus *Torpedo marmorata* mit Kryoelektronenmikroskopie wurden in extrem dicht gepackten tubulären Membranen im extrazellulären Teil des Rezeptors drei Stränge mit  $\alpha$ -Helix-Struktur entdeckt.<sup>20</sup> Die Länge dieser Strukturelemente betrug dabei jeweils mindestens 12Å (also insgesamt mehr als 36Å). Die Analyse des CD-Spektrums der renaturierten LBD lieferte einen  $\alpha$ -Helixanteil von 15%, das bedeutet bei einer Länge von 209 Aminosäuren, dass insgesamt 31 Aminosäuren in  $\alpha$ -Helices vorliegen. Die  $\alpha$ -Helix hat eine Ganghöhe von 5,4 Å (Länge pro Windung, Abbildung 5).<sup>84</sup> Dies entspricht 1,5 Å pro Aminosäure. Die 31 Aminosäuren ergeben damit  $\alpha$ -Helices mit einer Gesamtlänge von  $31 \cdot 1,5 = 47$  Å. Soweit es den Anteil an  $\alpha$ -Helix betrifft stimmt die Sekundärstruktur der renaturierten LBD mit den im extrazellulären Teil des Rezeptor beobachteten Strukturelementen überein. Das bedeutet, dass im extrazellulären Teil des Rezeptors außer den drei  $\alpha$ -Helix-Strängen kaum noch oder gar keine  $\alpha$ -Struktur mehr vorhanden ist. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass für die LBD des Rezeptors vorwiegend  $\beta$ -Struktur vorhersagt wird.<sup>11,23</sup> Eine in *Xenopus* Oocyten exprimierte  $\alpha$ -nAChR-LBD besaß einen  $\alpha$ -Helixanteil von 12% und einen Anteil von 51% an  $\beta$ -Faltblatt und weist damit ähnliche Sekundärstrukturmerkmale wie das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment auf.<sup>67</sup> Eine in *Escherichia coli* exprimierte  $\alpha$ -nAChR-LBD aus *Torpedo* mit His6 tag<sup>82</sup> wies hingegen mit 30% einen höheren Anteil an  $\alpha$ -Helix auf, der  $\beta$ -Faltblattanteil (45%) war jedoch mit dem der renaturierten LBD identisch. Theoretische Modelle sagen für die LBD

der  $\alpha$ -Untereinheit einen Anteil von 20%  $\alpha$ -Helix und 35%  $\beta$ -Faltblatt voraus.<sup>23,83</sup> Dabei wurde die Sequenz 31-200 der  $\alpha$ -Untereinheit nach den bekannten Röntgenstrukturdaten von Plastocyanin und Pseudoazurin modelliert. Hier zeigte sich ebenso der auch in der Sekundärstruktur der renaturierten LBD vorhandene, große Anteil an  $\beta$ -Struktur. Es wurde aber ein etwas höherer Anteil an  $\alpha$ -Helix vorhergesagt, dies kann aber daran liegen, dass dabei die ersten 30 Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheit nicht berücksichtigt worden sind. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die für die renaturierte LBD ermittelten Sekundärstrukturdaten in guter Übereinstimmung mit den theoretischen und experimentellen Daten anderer Forscher sind.

Der große Anteil an  $\beta$ -Struktur, der durch die CD-Spektren impliziert wird, bietet auch eine Erklärung für die Bereitwilligkeit der renaturierten LBD zu aggregieren (FPLC-Daten). *In vivo* erleichtert die  $\beta$ -Struktur das Zusammenlagern zum Pentamer und ist mitverantwortlich für die Bindung von  $\alpha$ -Neurotoxinen, wie  $\alpha$ -Bungarotoxin.<sup>95</sup> Weiterhin weist die LBD immer noch Bereiche mit einer hohen Lipophilie auf (Abbildung 3). Aufgrund des hohen Grads an Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Untereinheiten (35-40%) kann man die Daten für die renaturierte LBD der  $\alpha$ -Untereinheit auch auf den gesamten Rezeptor übertragen. Da dieser laut CD-Spektrum 48%  $\alpha$ -Helix enthalten soll<sup>67</sup>, die renaturierte LBD aber nur 15% aufweist, muß der nicht-extrazelluläre Teil des Rezeptors einen noch höheren Anteil an  $\alpha$ -Helixstruktur besitzen.

Inwieweit all diese Ergebnisse, die durch den Vergleich mit CD-Spektren von Proteinen bekannter Struktur berechnet wurden, wirklich die Sekundärstruktur des Rezeptors widerspiegeln, kann aber in letzter Konsequenz erst die Aufklärung der atomaren Struktur des Rezeptors zeigen.

### 4.3 Pharmakologische Daten

Ligand	Protein			Author
	Gesamter Rezeptor	Solubilisierte $\alpha$ -Untereinheit	$\alpha$ nAChR <sub>1-209</sub> (renat. LBD)	
$\alpha$ -Bungarotoxin	0,01		0,5 (Kinetik) bzw 9 (Equilibrium)	Maelicke et al. <sup>59</sup>
		120-400		Haggerty und Froehner <sup>85</sup>
	1	3-6		Tzartos und Changeux <sup>86</sup>
Nikotin (Agonist)	930		720	Blanchard et al. <sup>87</sup>
	120			Maelicke et al. <sup>59</sup>
		~1000		Haggerty und Froehner <sup>85</sup>
Acetylcholin (Agonist)	210 5700		56000	Martin et al. <sup>96</sup>
Anatoxin-a (Agonist)	100-200		3000	Aronstam et al. <sup>88</sup>
Methyllycaconitin (Antagonist)	~1000		230	Ward et al. <sup>89</sup>
d-Tubocurare (Antagonist)	12		148000	Martin et. al. <sup>96</sup>
	240			
		200000		Haggerty und Froehner <sup>85</sup>
	4000	900000		Gershoni et al. <sup>90</sup>

Tabelle 4.3-a: Affinitäten (in nM) verschiedener Liganden gegenüber dem nativen nikotinischen Acetylcholinrezeptor; der isolierten, solubilisierten  $\alpha$ -Untereinheit des Rezeptors und dem renaturierten  $\alpha$ nAChR<sub>1-209</sub> Fragment, soweit Daten aus der Literatur vorhanden. Alle Daten beziehen sich auf *Torpedo* bzw. Muskelrezeptoren und stammen aus Bindungsstudien mit Radioliganden. Bei Acetylcholin und Tubocurare gibt es zwei Werte für den ganzen Rezeptor, da es zwei verschiedene, eine hoch- und eine niedrig affine, Bindungsstellen gibt.

Eines der Hauptmerkmale, welches eine *in-vitro* renaturierte LBD besitzen muss, ist die der  $\alpha$ -Untereinheit des nAChR eigene Fähigkeit,  $\alpha$ -Bungarotoxin mit hoher Affinität und Spezifität zu binden. Die Reaktion der Bindung des Toxins an den Rezeptor ist quasi-irreversibel<sup>55,59</sup>, weshalb die Analyse von LBD-Ligand-Wechselwirkungen nur auf der Basis von Assoziationskinetik und Kompetitionsstudien zuverlässig ist.<sup>55</sup> Die für die renaturierte LBD ermittelte Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{on}$  von  $8,2 \times 10^5$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ] liegt genau zwischen dem Wert für die Assoziation von  $\alpha$ -Bungarotoxin an in Fibroblasten exprimierte  $\alpha$ -Untereinheit<sup>91</sup> und an den nativen Rezeptor<sup>59</sup> ( $\sim 5 \times 10^4$  bzw.  $4,6 \times 10^6$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ])<sup>18</sup>. Der für das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment ermittelte  $k_{off}$  Wert von  $4 \times 10^{-4}$  [ $s^{-1}$ ] lag ebenfalls im Bereich der für den native Rezeptor und die solubilisierter  $\alpha$ -Untereinheit ermittelten Werte ( $\sim 3 \times 10^{-4}$  bzw.  $2 \times 10^{-5}$

$[s^{-1}]^{18}$ ).<sup>75,59</sup> Der aus den kinetischen Daten berechnete  $K_D$ -Wert (0,5nM) ist um eine Größenordnung kleiner als die Gleichgewichtskonstante, die aus den Bindungsdaten bestimmt wurde (9nM). Diese Beobachtung kann man bei vielen Bindungsstudien mit quasi irreversiblen Bindungen machen.<sup>55,75,92</sup> Die lange Lebensdauer des Komplexes führt dazu, dass Messungen der Dissoziation über längere Zeiten (z.T. Tage) gemacht werden müssen, was unerwünschte Nebenwirkungen ermöglicht (z.B. enzymatischer Abbau oder Oxidationsreaktionen mit Luftsauerstoff), die die Affinität des Proteins bzw. des Liganden beeinflussen. Dadurch kann man die Reaktionsgleichung nicht mehr auf die Gleichung ( $R + L \leftrightarrow RL$ , Gleichung 1) vereinfachen und damit auch nicht mehr die hier verwendete Methode der Berechnung benutzen. Bei den Bindungsstudien ist eine Gefahr, dass man bei geringen Ligandenkonzentrationen selbst nach sehr langer Inkubationszeit noch kein Gleichgewicht erreicht hat. Bei dieser Bindungsreaktion gehen die beiden Konzentrationen R und L in die Geschwindigkeitsgleichung ein (Gleichung 10). Deshalb sind die gemessenen „spezifisch-gebundenes-Toxin“-Werte zu niedrig und der daraus berechnete  $K_D$ -Wert ebenfalls zu niedrig. Mit den aus den Kinetikmessungen bekannten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  und  $k_{off}$  ist es zwar möglich diese zu niedrigen Werte zu berichtigen, aber wie schon oben erläutert sind auch diese Werte nicht gänzlich fehlerfrei. Deshalb wird für die Berechnung der  $K_I$ -Werte mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 6) der schlechtere  $K_D$ -Wert aus den Bindungsstudien (9nM) verwendet.

Der für das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub>-Fragment (renaturierte LBD) ermittelte  $K_D$ -Wert (9nM) ist um ein bis zwei Größenordnungen schlechter als der des nativen Rezeptors (0,01-1nM), aber immer noch um eine Größenordnung besser als der Wert für die solubilisierte, isolierte  $\alpha$ -Untereinheit (100-400nM).<sup>85</sup> Gründe für die etwas geringere Affinität können darin liegen, dass die  $\alpha$ -Bungarotoxinbindungsstelle, wie bereits in elektronenmikroskopische Studien gezeigt, im Rezeptor durch andere Untereinheiten ( $\gamma$  und  $\delta$ ) beeinflusst wird.<sup>93,94</sup> Ausserdem bindet  $\alpha$ -Bungarotoxin auch an kleine Bereiche der Nachbaruntereinheiten, z.B. an Regionen um die Aminosäuren  $\gamma$ Leu119,  $\gamma$ Glu176 bzw.  $\delta$ Leu121.<sup>95,96</sup> Da das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment in E. coli exprimiert worden war, besaß es auch keine post-translationalen Modifikationen, wie N-Glykosylierungen, die im nativen Torpedo nAChRezeptor vorhanden sind. In der  $\alpha$ -Untereinheit ist dort Asn 141 glykosyliert. Die Glykosylierung spielt zwar hauptsächlich eine Rolle bei dem Transport verschiedener Rezeptoruntereinheiten zur Plasmamembran und bei der Zusammenlagerung der Untereinheiten zum vollständigen Rezeptor,<sup>2,97</sup> aber auch ein Einfluß auf die Toxinbindung wird kontrovers diskutiert.<sup>98</sup> All dieses kann die um ein bis zwei

Größenordnungen geringere Affinität des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments für  $\alpha$ -Bungarotoxin erklären.

Der  $B_{\max}$ -Wert, der sich aus der Scatchard-Kurve ergibt (3nM), stimmt mit der Konzentration des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments in der Lösung überein. Dies deutet darauf hin, dass das gesamte renaturierte Protein die Fähigkeit zur Bindung von  $\alpha$ -Bungarotoxin besitzt. Dies ist eine sehr viel bessere Renaturierungsausbeute, als die mit (His)<sub>6</sub>-tag versehenen Proteinfragmente erreichen konnten (28%).<sup>82</sup> Die Gleichmässigkeit der Scatchard-Auftragung, zeigt dass es sich um eine homogene Population von Bindungsstellen handelt. Wären zwei Fragmentpopulationen mit unterschiedlicher Affinitäten vorhanden, so würde man in der Scatchard-Auftragung im Bereich kleiner X ein stärker abfallende Gerade und im Bereich größerer X eine flachere Gerade sehen, d.h. die Auftragung würde sich aus zwei Geraden zusammensetzen.

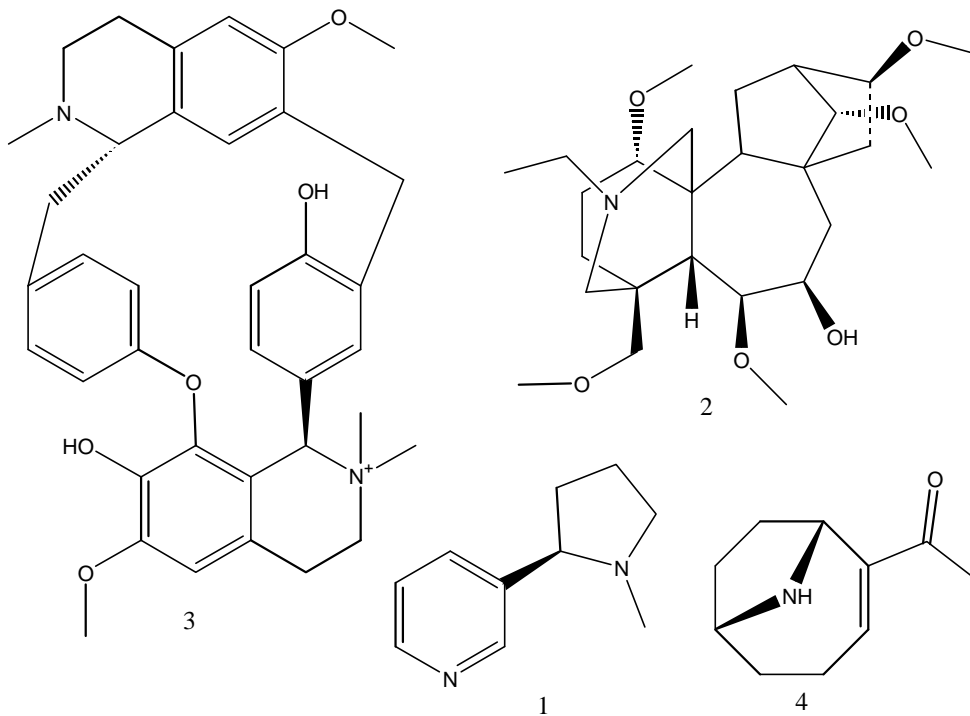


Abbildung 47 Strukturformeln einiger kompetitiver Liganden; 1: Nikotin, 2: Methyllycaconitin, 3: d-Tubocurarine, 4: Anatoxin-a

Im nativen Rezeptor binden auch kleine Liganden an die extrazelluläre Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit. Zum Nachweis seiner Funktionalität muss das renaturierte Fragment auch kleine Liganden mit einer Affinität vergleichbar mit der des Rezeptors binden. Da die kleinen Liganden keine so große Affinität für den nAChR besitzen (mindestens um Faktor 100 schlechter), wie das für  $\alpha$ -Bungarotoxin der Fall ist, wird die Bindung durch indirekte Studien

(Kompetitionsexperimente) nachgewiesen. Die Bindung von Nikotin (Abbildung 47-1), dem Alkaloid, das dem Rezeptor seinen Namen gab, ist vergleichbar mit der an den nativen Rezeptor. Methyllycaconitin (Abbildung 47-2), ein Norditerpen isoliert aus *Delphinium* (z.B. Rittersporn), bindet an das renaturierte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment besser als dies für den Muskelrezeptor der Fall ist (eine Größenordnung). Dieser Antagonist besitzt für neuronale nAChR eine um den Faktor 1000 höhere Affinität. So bindet es mit einem  $K_D$  von 1,6nM an  $\alpha 7$ -nAChR in Rattenhirnmembranen.<sup>99</sup> Der  $\alpha 7$  nAChR ist ein Homopentamer aus fünf  $\alpha 7$  Untereinheiten, wie es zum Teil auch für andere neuronale Untereinheiten diskutiert wird. Deshalb ist es möglich, dass die nicht- $\alpha$ -Untereinheiten für die geringere Affinität des muskulären Rezeptors für MLA verantwortlich sind. Wie dies geschieht, muss noch genauer untersucht werden, es ist aber denkbar, dass die nicht- $\alpha$ -Untereinheiten die Struktur der Antagonistenbindungsstellen negativ beeinflussen oder den Zugang zu den Bindungsstellen behindern und damit die Affinität von Methyllycaconitin im muskulären Rezeptor absenken. Die Affinität des Fragments für Anatoxin-a (Abbildung 47-4), einem bicyclischen Amin isoliert aus Cyanobakterien, ist vergleichbar mit der für den Rezeptor (um eine Größenordnung schlechter).<sup>100,101</sup> Tubocurare (Abbildung 47-3), ein bisquartäres Isochinolin-Derivat isoliert aus *Menispermaceae*-Arten, besitzt eine Affinität für das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment, die sich um den Faktor 1000 von dem des Rezeptors unterscheidet, aber vergleichbar ist mit der für die solubilisierete  $\alpha$ -Untereinheit (eine Größenordnung besser als solubilisierete Untereinheit). Die Bindungsstelle von Tubocurare befindet sich an der Schnittstelle zwischen den Untereinheiten.<sup>102,96</sup> Es sind auch Aminosäuren aus der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheit an der Tubocurarebindung beteiligt ( $\delta$ Asp180 und  $\gamma$ Asp174).

Für Acetylcholin ist die Affinität des renaturierten Fragments um zwei Größenordnungen schlechter als für die hochaffine Bindungsstelle im nativen Rezeptor. Der nativen Rezeptor existiert in zwei Bindungszuständen, dem hoch-affinen und dem niedrig-affinen Zustand. Es kommt nur zur Öffnung des Kanals, wenn zwei Moleküle eines Agonisten mit relativ niedriger Affinität an den Rezeptor binden ( $EC_{50}$  0,1-10 $\mu$ M, je nach Agonist). Ist der Rezeptor für längere Zeit Agonisten ausgesetzt, so geht er in den hoch-affinen Zustand über (z.B. steigert sich für Nikotin die Affinität um den Faktor 1000), einem Zustand, in dem der Kanal nicht mehr aktiviert werden kann. Die Affinität des Fragments für Acetylcholin ist zwar immer noch um eine Größenordnung schlechter als die des niedrig-affinen Rezeptorzustandes (5600 nM), im nativen Rezeptor bilden aber auch noch andere Untereinheiten die Acetylcholinbindungsstelle. Wie bei Tubocurare wird auch hier die Beteiligung von negativ geladenen Aminosäuren aus  $\delta$



und  $\gamma$  diskutiert.<sup>96,18</sup> Möglicherweise könnte man die Affinität des  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragments für Acetylcholin steigern, wenn man ektopisch exprimierte  $\gamma$ - bzw.  $\delta$ -Untereinheitfragmente hinzufügt. Dies wurde bereits bei der Koexpression von vollständigen  $\alpha$ - und  $\delta$ -Untereinheiten gezeigt.<sup>75</sup> Wie zu erwarten zeigten die beiden Kontrollsubstanzen Atropin, ein auf den muskarinischen Acetylcholinrezeptor wirkendes Alkaloid, und Procain, ein im Ionenkanal des nAChR bindendes Lokalanästhetikum, keine Konkurrenz der Bungarotoxinbindung.

Somit zeigt das renaturierte  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment sowohl für Agonisten als auch für Antagonisten des nikotinischen Acetylcholinrezeptors pharmakologische Eigenschaften, die mit denen des nativen Rezeptors vergleichbar sind. Damit ist die Funktionalität der renaturierten LBD bewiesen

Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ist in einem Artikel unter dem Titel: „*Expression and Renaturation of the N-terminal Extracellular Domain of Torpedo Nicotinic Acetylcholine Receptor  $\alpha$ -Subunit*“ im „Journal of Biological Chemistry“ erschienen.<sup>103</sup>

### 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die 209 Aminosäuren umfassende N-terminale Ligandenbindungsdomäne der  $\alpha$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors aus *Torpedo marmorata* durch Expression der cDNA in *Escherichia coli* als Einschlusskörper hergestellt. Durch die Anwendung eines speziell optimierten Rückfaltungsprotokolls, bei dem auf den Einsatz von Detergentien verzichtet wurde, konnte die LBD in ein wasserlösliches, 25 kDa großes Protein überführt werden, das mit 15%  $\alpha$ -Helix und 45%  $\beta$ -Struktur Sekundärstrukturmerkmale trägt, die mit experimentellen und theoretischen Daten für die LBD der  $\alpha$ -Untereinheit des nativen Rezeptors übereinstimmen. Das  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment liegt in einer homogenen Konformation vor und zeigt dem Rezeptor vergleichbare Eigenschaften, was die Bindung von  $\alpha$ -Bungarotoxin und die kleinerer Liganden angeht. Das gilt sowohl für die Gleichgewichts- als auch für die Kinetikdaten. Die Affinitäten des Fragments waren, verglichen mit denen für die solubilisierete  $\alpha$ -Untereinheit, meist um ein bis zwei Größenordnungen besser. Es ist somit gelungen, die LBD so zu exprimieren und zu renaturieren, dass sie ohne Detergentien in löslicher Form vorliegt und die Funktionalität und die Eigenschaften der LBD des nAChR aufweist.

Für die hier hergestellte LBD müsste nun die Ermittlung der genauen räumlichen Struktur folgen. Damit wird man einem Verständnis der Rezeptorfunktion einen grossen Schritt näher kommen. Zu diesem Zweck bieten sich einerseits die Kristallisation mit anschließender Röntgenstrukturanalyse sowie die Anwendung von mehrdimensionalen NMR-Verfahren an. Erste Vorversuche hierzu wurden bereits gemacht: so konnten transformierten Bakterien in M9-Celtone Medium zur Produktion von Einschlusskörpern und damit von  $\alpha$  nAChR<sub>1-209</sub> Fragment angeregt werden. Dieses Medium ist besonders für die Aufzucht von <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-dotierten Proteinen geeignet. Für die Kristallisation ist die Bereitschaft des Fragments zur Aggregation hinderlich, die aber durch gewisse Lösungsmittelzusätze wie Polyethylenglykole möglicherweise unterdrückt werden kann. Versuche in dieser Richtung wurden bereits unternommen und zeigen erste Erfolge. Weiterhin kann man mit diesem löslichen Fragment nach Substanzen suchen die auf den nAChR wirken (*High-Throughput-Screening*).

Es ist vielleicht möglich, diese Methode der Produktion und Charakterisierung von renaturierten Ligandenbindungsdomänen auf die LBD anderer nAChR-Untereinheiten, z.B. neuronaler

Subtypen zu übertragen. Dadurch könnten diese Domänen dann intensiver untersucht werden, als dies ist zur Zeit möglich ist. Neuronale nAChR können bisher nicht so einfach isoliert werden, wie dies für den muskulären Rezeptor in elektrischen Organen von Torpedo der Fall ist. Möglicherweise ist diese Renaturierungsmethode auch auf andere Mitglieder der Superfamilie der Liganden gesteuerten Ionenkanäle anwendbar.

## 6 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Klett, R. P., Fulpius, B. W., Cooper, D., Smith, M., Reich, E., and Possani, L. D. (1973) in The acetylcholine receptor. I. Purification and characterization of a macromolecule isolated from *Electrophorus electricus*. *J.Biol.Chem.* 248(19), 6841-6853.
- <sup>2</sup> Maelicke, A. (1992) in Receptor Subunits and Complexes (Barnard, E. A., Burgen, A. S. V. and Roberts, G. C. K., eds) 119-162, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
- <sup>3</sup> Wilson, Lentz (1988) in Binding of alpha-bungarotoxin to synthetic peptides corresponding to residues 173-204 of the alpha subunit of Torpedo, calf, and human acetylcholine receptor and restoration of high-affinity binding by sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry* 27, 6667-6674
- <sup>4</sup> Lukas RJ, Morimoto H, Hanley MR, Bennett EL (1981) in Radiolabeled alpha-bungarotoxin derivatives: kinetic interaction with nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* 20, 7373-7378
- <sup>5</sup> Wells, G. B., Anand, R., Wang, F., and Lindstrom, J. (1998) in Water-soluble nicotinic acetylcholine receptor formed by alpha7 subunit extracellular domains. *J.Biol.Chem.* 273(2), 964-973.
- <sup>6</sup> Sargent, P. B. (1993) in The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Curr.Opin.Neurobiol.* 3, 299-309
- <sup>7</sup> Hucho, F., Tsetlin, V. I., and Machold, J. (1996) in The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur.J.Biochem.* 239(3), 539-557.
- <sup>8</sup> Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982) in A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157, 105-132
- <sup>9</sup> Yu, X. M. and Hall, Z. W. (1994) in Amino- and carboxyl-terminal domains specify the identity of the delta subunit in assembly of the mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J.Neurosci.* 14, 785-795
- <sup>10</sup> Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M. and Unwin, N. (1999) in Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J.Mol.Biol.* 288, 765-786
- <sup>11</sup> Finer-Moore, J. and Stroud, R. M. (1984) in Amphiphatic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor. *Proc.NatlAcad.Sci. USA*, 81, 155-159
- <sup>12</sup> Grenningloh, G., Rienitz, A., Schmitt, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E. D. and Betz, H. (1987) in The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with the nicotinic acetylcholine receptor. *Nature*, 328, 215-220
- <sup>13</sup> Léna, C., Changeux, J. P., (1993) in Allosteric modulations of the nicotinic acetylcholine receptor. *Trends in Neurological Science* 16 (5) 181-186
- <sup>14</sup> Unwin, N. (1996) in Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: Distinct Conformations of the  $\alpha$  subunits. *J.Mol.Biol.* 257, 586-596
- <sup>15</sup> Blanton, M. P. and Cohen, J. B. (1994) in Identifying the lipid-protein interface of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry* 33, 2859-2872
- <sup>16</sup> Ortells, M. O. and Lunt, G. G. (1994) The transmembrane region of the nicotinic acetylcholine receptor: is it an all-helix bundle. *Receptors and Channels* 2; 53-59
- <sup>17</sup> Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Hussy, N., Bertrand, S. and Changeux, J. P. (1992) Mutations in the ion channel domain of neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Natur* 359, 500-505
- <sup>18</sup> Sugiyama, N., Boyd, A. E. and Palmer, R. (1996) in Anionic residues in the  $\alpha$ -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor contributing to subunit assembly and ligand binding. *J.Biol.Chem.* 271, 26575-26581
- <sup>19</sup> Poulter, L., Earnest, J. P., Stroud, R. M. and Burlingame, A. L. (1989) in Structure, oligosaccharide structures and posttranslational modified sites of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 6645-6649
- <sup>20</sup> Unwin, N. (1993) in Nicotinic acetylcholine receptor an 9 Å resolution. *J.Mol.Biol* 229, 1101-1124

- <sup>21</sup> Schrattenholz,A., Roth,U., Godovac-Zimmermann,J. and Maelicke A. (1997) in Mapping of a binding site for ATP within the extracellular region of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor beta-subunit. *Biochemistry*36, 13333-13340
- <sup>22</sup> Neumann,D.,Barchan,D., Fridkin,M. and Fuchs,S. (1986) in Analysis of ligand binding to the synthetic dodecapeptide 185-196 of the acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83, 9250-9253
- <sup>23</sup> Tsigelny,I., Sugiyama,N.,Sine,S.M. and Taylor,P.(1997) in A model of the nicotinic receptor extracellular domain based on sequence identity and residue location. *Biophys. J.* 73,52-66
- <sup>24</sup> Galzi,J.L. and Changeux,J.P.(1994) in Neurotransmitter-gated ion channels as unconventional allosteric proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4,554-565
- <sup>25</sup> Neubig,R.R. and Cohen,J.B. (1979) in Equilibrium binding of [<sup>3</sup>H]tubocurarine and [<sup>3</sup>H]acetylcholine by Torpedo postsynaptic membranes: stoichiometry and ligand interactions. *Biochemistry* 18,5464-5475
- <sup>26</sup> Maelicke,A. and Reich,E.(1976) in On the interaction between cobra  $\alpha$ -neurotoxin and the acetylcholine receptor. *Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.* 203-210
- <sup>27</sup> Sussmann, J.L., Harel,M.,Frolow,F.,Oefner,C.,Goldman,A.,Toker,L. and Silman,I.(1991) in Atomic structure of acetylcholineesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253,872-878
- <sup>28</sup> Léna,C. and Changeux,J.P.(1997) in Pathological mutations of nicotinic receptors and nicotine-based therapies for brain disorders. *Curr.Opin.Neurobiol.* 7, 674-682
- <sup>29</sup> Verall,S. and Hall,Z.W. (1992) in The N-terminal domain of acetylcholine receptor subunits contain recognition signals for the initial step of receptor assembly. *Cell*, 68, 23-31
- <sup>30</sup> Maelicke, A., Coban, T., Storch, A., Schrattenholz, A., Pereira, E.F. and Albuquerque, E.X. (1997) in Allosteric modulation of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor ion channel activity by noncompetitive agonists. *J Recept Signal Transduct Res* 17, 11-28
- <sup>31</sup> Maelicke,A., Schrattenholz,A., Storch,A., Schroder,B., Gutbrod,O., Methfessel,C., Weber,K.H., Pereira,E.E., Alkondon,M. and Albuquerque,E.X. (1995) in Noncompetitive agonism at nicotinic acetylcholine receptors; functional significance for CNS signal transduction. *J Recept Signal Transduct Res* 15, 333-53
- <sup>32</sup> Eisele,J.L.,Bertrand,S.,Galzi,J.L.,Devillers-Thiery,A.,Changeux,J.P. and Bertrand,D.(1993) in Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366, 479-483
- <sup>33</sup> van Hoof,J.A.,Spier,A.D.,Yakel,J.L.,Lummis,S.C.R. and Vijverberg,H.P.M. (1997) in Promiscuous coassembly of serotonin 5-HT<sub>3</sub> and nicotinic  $\alpha$ 4 receptor subunits into Ca<sup>2+</sup> permeable ion channels. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11456-11461
- <sup>34</sup> Gotti,C.,Fornassi,D. and Clementi,F.(1997) in Human neuronal nicotinic receptors. *Prog.Neurobiol.*53, 199-237
- <sup>35</sup> Rudolph,R.(1990) in Renaturation of recombinant, disulfide-bonded proteins from „inclusion bodies“. *Modern Methods in Protein- and Nucleic Acid Research.* Ed. Tscheche,H. 149-171; Walter de Gruyter, Berlin
- <sup>36</sup> de Vos,A.M.,Ultsch,M. and Kossiakoff,A.A.(1992) in Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255, 306-312
- <sup>37</sup> Burmeister,W.P., Gastinel,N.E., Simister,N.E., Blum,M.L. and Bjorkman,P.J.(1994) in Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 336-343
- <sup>38</sup> Bass,S. and Yang,M (1997) in Expressing cloned genes in *Escherichia coli*. *Protein function – A Practical Approach* Vol. 175. Ed. T.E. Creighton 29-55; Oxford University Press
- <sup>39</sup> Hanning,G. and Makrides,S.C.(1998) in Strategies for optimizing heterologous expression in *Escherichia coli*. *TIBTECH* 16, 54-60
- <sup>40</sup> Sadana,A. (1995) in Protein refolding and inactivation during bioseparation: bioprocessing implications. *Biotech. Bioeng.* 48, 481-489
- <sup>41</sup> Guise,A.D.,West,S.M. and Chaudhuri,J.B.(1996) in Protein folding in vivo and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. *Mol.Biotech.* 6, 53-64

- <sup>42</sup> Hartl, F.U. (1996) in Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381, 571
- <sup>43</sup> Anfinsen, C.B. (1973) in Principles that govern the folding of protein chains. Science 181, 223-230
- <sup>44</sup> Rudolph, R., Opitz, U., Hesse, F., Riebl, R. and Fischer, S. (1992) Reactivation of microbially produced human tissue-type plasminogen activator. Biotechnol. Int. 321-325
- <sup>45</sup> Perutz, M. (1980) in Protein folding. Elsevier North-Holland Biomedical Press, p. 14  
Ed. Jaenicke, R.
- <sup>46</sup> Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. and Jaenicke, R. (1997) in Folding Proteins. Protein function – A Practical Approach Vol. 175. Ed. T.E. Creighton 56-99; Oxford University Press
- <sup>47</sup> Buchner, J. and Rudolph, R. (1991) in Renaturation and purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *E. coli*. Bio/Technology 9, 157-162
- <sup>48</sup> Dinner, A.R., Šali, A. and Karplus, M. (1996) in The folding mechanism of larger model proteins: Role of native structure. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 8356-8361
- <sup>49</sup> Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- <sup>50</sup> Hanahan, D. (1985) in Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover, D.M.: DNA cloning . Vol. 1, A practical approach. IRL Press, Oxford, 109-135
- <sup>51</sup> Laemmli, U.K. (1970) in Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685
- <sup>52</sup> Schröder, B., Rheinhardt-Maelicke, S., Schrattenholz, A., McLane, K.E., Kretschmer, A., Conti-Tronconi, B.M. and Maelicke, A. (1994) in Monoclonal antibodies FK1 and WF6 define two neighboring ligand binding sites on Torpedo acetylcholine receptor alpha-polypeptide. J. Biol. Chem. 269, 10407-10416
- <sup>53</sup> Provencher, S.W., and Glöckner, J. (1981) in Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. Biochemistry 20, 33-37
- <sup>54</sup> Altschuler, E.L., Hud, N.V., Mazrimas, J.A. and Rupp, B. (1997) in Random coil conformation for extended polyglutamine stretches in aqueous soluble monomeric peptides. J. Peptide Res. 50, 73-78
- <sup>55</sup> Repke, H. und Liebmann, C. (1987) in Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. VCH, Weinheim
- <sup>56</sup> Scatchard, G. (1949) in The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51. 660
- <sup>57</sup> Hill, A.W. (1910) in The possible effect of the aggregation of the molecules of hemoglobin to its dissociation curves. J. Physiol. 40, IV-VII
- <sup>58</sup> Cheng, Y.-C. and Prusoff, W.H. (1973) in Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction. Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108
- <sup>59</sup> Maelicke, A., Fulpius, B.W., Klett, R.P. and Reich, E. (1977) in Acetylcholine receptor. Responses to drug binding. J. Biol. Chem. 252, 4811-4830
- <sup>60</sup> unveröffentlichte Arbeiten von Martin Rentrop und André Kaufmann
- <sup>61</sup> [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)
- <sup>62</sup> Institut für Molekulare Biotechnologie, Beutenbergstraße 1, 07745 Jena, Deutschland
- <sup>63</sup> McLane, K.E., Fritzen, M., Wu, X., Diethelm, B., Maelicke, A. and Conti-Tronconi, B.M. (1992) in Species- and subtype-specific recognition by antibody WF6 of a sequence segment forming an alpha-bungarotoxin binding site on the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. J Recept Res 12, 299-321
- <sup>64</sup> Conti-Tronconi BM, Diethelm BM, Wu XD, Tang F, Bertazzon T, Schröder B, Reinhardt-Maelicke S, Maelicke A (1991) in Alpha-bungarotoxin and the competing antibody WF6 interact with different amino acids within the same cholinergic subsite. Biochemistry 30, 2575-84
- <sup>65</sup> Schrattenholz, A., Coban, T., Schröder, B., Okonjo, K.O., Kuhlmann, J., Pereira, E.F., Albuquerque, E.X., Maelicke, A. (1993) in Biochemical characterization of a novel channel-activating site on nicotinic acetylcholine receptors. J Recept Res 13, 393-412

- <sup>66</sup> Wells, G.B., Anand, R., Wang, F. and Lindstrom, J. (1998) in Water-soluble nicotinic acetylcholine receptor formed by  $\alpha 7$  subunit extracellular domains. *J. Biol. Chem.* 273, 964-973
- <sup>67</sup> West, A.P. jr., Bjorkman, P.J., Dougherty, D.A. and Lester, H.A. (1997) in Expression and circular dichroism studies of the extracellular domain of the  $\alpha$  subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 25468-25473
- <sup>68</sup> Sadana, A. (1995) in Protein Refolding and inactivation during bioseparation: bioprocessing implications. *Biotech. Bioeng.* 48, 481-489
- <sup>69</sup> Chaudhuri, J.B. (1994) in Refolding recombinant Proteins: Process strategies and novel approaches. *Annals New York Academy of Sciences*, 721, 374-385
- <sup>70</sup> Merlie, J.P., Sebbane, R., Tzartos, S. and Lindstrom, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2694-2701
- <sup>71</sup> Blount, P., and Merlie, J.P. (1989) in Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 3, 349-357
- <sup>72</sup> Siuzdak, G. (1996) in *Mass Spectrometry for Bio/Technology*, 141-190, Academic Press NY
- <sup>73</sup> Merlie, J.P. and Lindstrom, J. (1983) in Assembly in vivo of mouse muscle acetylcholine receptor: identification of an alpha subunit species that may be an assembly intermediate. *Cell* 34, 747-757
- <sup>74</sup> Kao, P.N. and Karlin, A. (1986) in Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J. Biol. Chem.* 261, 8085-8088
- <sup>75</sup> Shtrom, S.S. and Hall, Z.W. (1996) in Formation of a ligand-binding site for the acetylcholine receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* 271
- <sup>76</sup> Walker, J.W., Richardson, C.A. and McNamee, M.G. (1984) in Effects of thiol group modifications of *torpedo californica* acetylcholine receptor ion flux activation and inactivation kinetics. *Biochemistry* 23, 2329-2338
- <sup>77</sup> Moore, W.M., Holladay, L.A., Puett, D., and Brady, R.N. (1974) in On the conformation of the acetylcholine receptor protein from *Torpedo nobiliana*. *FEBS Lett.* 45, 145-149
- <sup>78</sup> Yager, P., Chang, E.L., Williams, R.W., and Dalziel, A.W. (1984) *Biophys. J.* 45, 26-28
- <sup>79</sup> Mielke, D.L., and Wallace, B.A. (1988) in Secondary structural analyses of the nicotinic acetylcholine receptor as a test of molecular models *J. Biol. Chem.* 263, 3177-3182
- <sup>80</sup> Wu, C.-S.C., Sun, X.H., and Yang, J.T. (1990) in Conformation of acetylcholine receptor in the presence of agonists and antagonists. *J. Protein Chem.* 9, 119-126
- <sup>81</sup> Méthot, N., McCarthy, M.P., and Baenziger, J.E. (1994) in Secondary structure of the nicotinic acetylcholine receptor: implications for structural models of a ligand-gated ion channel. *Biochemistry* 33, 7709-7717
- <sup>82</sup> Alexeev, T., Krivoshein, A., Shevalier, A., Kudelina, I., Telyakova, O., Vincent, A., Utkin, Y., Hucho, F., and Tsetlin, V. (1999) in Physiocochemical and immunological studies of the N-terminal domain of the *torpedo* acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 259, 310-319
- <sup>83</sup> Ortells, M.O. (1997) in Prediction of the secondary structure of the acetylcholine receptor nontransmembrane regions. *Proteins* 29, 391-398
- <sup>84</sup> Stryer, L. (1990) in *Biochemie; I.2 Struktur und Funktion von Proteinen* 15-44
- <sup>85</sup> Haggerty, J.G., and Froehner, S.C. (1981) in Restoration of 125I-alpha-bungarotoxin binding activity to the alpha subunit of *Torpedo* acetylcholine receptor isolated by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 256, 8294-8297
- <sup>86</sup> Tzartos, S.J., and Changeux, J.P. (1984) in Lipid-dependent recovery of alpha-bungarotoxin and monoclonal antibody binding to the purified alpha-subunit from *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor. Enhancement by noncompetitive channel blockers. *J. Biol. Chem.* 259, 11512-11519
- <sup>87</sup> Blanchard, S.G., Quast, U., Reed, K., Lee, T., Schimerlik, M.I., Vandlen, R., Claudio, T., Strader, C.D., Moore, H.H., and Raftery, M.A. (1979) in Interaction of [125I]-alpha-bungarotoxin with acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* 18, 1875-1883
- <sup>88</sup> Aronstam, R.S. and Witkop, B. (1981) in Anatoxin-a interactions with cholinergic synaptic molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 78, 4639-4463
- <sup>89</sup> Ward, J.M., Cockcroft, V.B., Lunt, G.G., Smillie, F.S., and Wonnacott, S. (1990) in Methyllycaconitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites. *FEBS Lett* 270, 45-48

- <sup>90</sup> Gershoni JM, Hawrot E, Lentz TL (1983) in Binding of alpha-bungarotoxin to isolated alpha subunit of the acetylcholine receptor of *Torpedo californica*: quantitative analysis with protein blots. *Proc Natl Acad Sci* 80, 4973-4977
- <sup>91</sup> Blount,P., and Merlie,J.P. (1988) in Native folding of an acetylcholine receptor alpha subunit expressed in the absence of other receptor subunits. *J Biol Chem* 263, 1072-1080
- <sup>92</sup> Aronheim,A,Eshel,Y.,Mosckovitz,R., and Gershoni,J.M. (1988) in Characterization of the binding of  $\alpha$ -bungarotoxin to bacterially expressed cholinergic binding sites. *J.Biol.Chem.* 263, 9933-9937
- <sup>93</sup> McLane,K.E.,Wu,X.,Diethelm,B., and Conti-Tronconi,B.M.(1991) in Structural determinants of  $\alpha$ -bungarotoxin binding to the sequence segment 181-200 of the muscle nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit: effects of cysteine/cystine modification and species-specific amino acid-substitutions. *Biochemistry* 30, 4925-4934
- <sup>94</sup> Conti-Tronconi,B.M.,Tang,F.,Diethelm,B.M.,Spencer,S.R.,Reinhardt-Maelicke,S., and Maelicke,A. (1990) in Mapping of a cholinergic binding site by means of synthetic peptides, monoclonal antibodies, and alpha-bungarotoxin..*Biochemistry* 29, 6221-6230
- <sup>95</sup> Arias,H.R. (2000) in Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem Int* 36, 595-645
- <sup>96</sup> Martin,M.,Czajkowski,C., and Karlin,A.(1996) in The contribution of Aspartyl residues in the acetylcholine receptor  $\gamma$  and  $\delta$  subunits to the binding of agonists and competitive antagonists. *J.Biol.Chem.* 271, 13497-13503
- <sup>97</sup> Wonnacott,S.,Harrison,R., and Lunt,G.G.(1980) Interrelations of carbohydrate and the  $\alpha$ -toxin binding site on the acetylcholine receptor from *torpedo marmorata*. *Life Sci.* 27, 1769-1775
- <sup>98</sup> Zegloul,S.,Marchot,P.,Bougis,P.E., and Ronin,C. (1988) in Selective loss of binding sites for the iodinated  $\alpha$ -neurotoxin I from *Naja mossambica mossambica* venom upon enzymatic deglycosylation of torpedo electric organ membranes. *Eur. J. Biochem.* 174, 543-550
- <sup>99</sup> Davies,A.R.,Hardick, D.J.,Blagbrough, I.S.,Potter, B.V.,Wolstenholme, A.J,Wonnacott, S. (1999) in Characterisation of the binding of [3H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 38, 679-690
- <sup>100</sup> Swanson,K.L.,Allen,C.N.,Aronstam,R.S.,Rapoport,H.,Albuquerque,E.X. (1986) in Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Mol. Pharmacol.* 29, 250-257
- <sup>101</sup> Pereira,E.F.,Alkondon,M.,Tano,T.,Castro,N.G.,Fróes-Ferrão,M.M.,Rozental,R.,Aronstam,R.S., Schrattenholz A, Maelicke A, Albuquerque EX (1993) in A novel agonist binding site on nicotinic acetylcholine receptors. *J. Recept. Res.* 13, 413-36
- <sup>102</sup> Pedersen,S.E., and Cohen,J.B. (1990) in d-tubocurarine binding sites are located at  $\alpha$ - $\gamma$  and  $\alpha$ - $\delta$  subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci* 87, 2785-2789
- <sup>103</sup> Schrattenholz,A.,Pfeiffer,S.,Pejovic,V.,Rudolph,R., Godovac-Zimmermann,J. and Maelicke,A. (1998) in Expression and renaturation of the N-terminal extracellular domain of *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit. *J.Biol.Chem.* 273, 32393-32399