

3D-ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND
LIGANDENBINDUNG DES DODEKAEDERISCHEN
ACETYLCHOLIN-BINDEPROTEINS AUS DER
POSTHORNSCHNECKE *Biomphalaria glabrata*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Dr. rer. nat.“

an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dipl.-Chem. Sandra Arnold

geb. am 10.07.1984 in Arnsberg

Mainz, 20.12.2018

Dekan: [REDACTED]

Erster Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Markl

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dirk Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2018

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
1. Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren	1
2. Aufbau des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors	1
3. Acetylcholin-Bindeproteine	2
4. Das Acetylcholin-Bindeprotein von <i>Biomphalaria glabrata</i>	3
5. Ligandenbindung	4
6. Ziele der Arbeit	6
B. Material und Methoden	7
1. Rekombinante Expression und Mutagenese des <i>BgAChBP</i>	7
1.1. Mutagenese	7
1.1.1. Erstellen des Mutageneseprimers	8
1.1.2. Polymerase-Kettenreaktion	8
1.1.3. Dpn1 Verdau	10
1.1.4. DNA-Gelelektrophorese und DNA Extraktion	10
1.1.5. Zyklisierung der linearen DNA	11
1.1.6. Glycerinkultur	11
1.1.7. Isolierung des zyklisierten Plasmids	12
1.1.8. Transformation in <i>E. coli</i> BL21-AI™	12
1.2. Expression und Aufreinigung	12
1.2.1. Anzucht der Bakterien	12
1.2.2. Ernte der Bakterien	13
1.2.3. Aufbrechen der Einschlusskörper	13
1.2.4. Aufreinigen des Proteins mittels Affinitätschromatographie	13
1.2.5. Proteinfaltung	14
1.2.6. Einengen und Dialysieren des <i>BgAChBP</i>	14
1.2.7. Konzentrationsbestimmung mittels Absorption	15

2.	Probenvorbereitung	16
2.1.	Enzymatische Abspaltung des Polyhistidin-Tags	16
2.2.	Thermofluor zur Validierung geeigneter Pufferbedingungen	16
2.3.	Proteinaufreinigung	18
2.3.1.	Größenausschluss-Chromatographie	18
2.3.2.	GraFix	19
3.	Strukturaufklärung	20
3.1.	Probenvorbereitung	20
3.1.1.	Hydrophilisierung des Objektträgers mittels Glimmentladung	21
3.2.	Negativkontrastierung	21
3.3.	Kryo-Fixierung	22
3.4.	Elektronenmikroskopie	24
3.5.	Datenverwaltung mit Appion	25
3.6.	CTF-Korrektur	25
3.7.	Qualitätskontrolle	26
3.8.	Partikelselektion und Erstellen des Bildstapels	26
3.9.	Zentrieren der Einzelpartikel	28
3.10.	Klassifizierung	28
3.11.	Ausrichtung der Einzelpartikel	29
3.12.	Rückprojektionen und Symmetrie	31
3.13.	Iterative Verbesserung der Rekonstruktion	32
3.14.	Auflösungsbestimmung	33
3.15.	Erstellen des Startmodells mit Sparx	34
3.16.	3D-Rekonstruktion mit FREALIGN	34
3.17.	Flexibles Fitten mit Coot	35
4.	Ligandenbindung	36
4.1.	Trp-Fluoreszenz	36
4.2.	Protein-Ligand-Docking	41
C. Ergebnisse		44
1.	3D-Elektronenmikroskopie des Dodekaeders	44
1.1.	Rekombinante Expression des BgAChBP1	44
1.2.	Gelfiltrations-Chromatographie	44
1.3.	Thermofluor-Methode zur Optimierung des Puffers	44

1.4.	Stabilisierung der Dodekaeder mit der GraFix-Methode . . .	48
1.5.	Negativkontrastierung des <i>BgAChBP1</i> in BisTris-Puffer . . .	49
1.6.	Kryo-3D-EM des <i>BgAChBP1</i> in BisTris-Puffer	50
1.7.	Kryo-3D-EM des <i>BgAChBP1</i> in Anwesenheit von Nikotin . .	54
2.	Homologiemodell der 3,7 Å-Rekonstruktion	58
2.1.	Flexibles Fitting eines pseudo atomaren Homologiemodells in die 3D-Rekonstruktionen	58
2.2.	Strukturdetails der 3,7 Å-Rekonstruktion	58
2.3.	Strukturdetails der 4,6 Å-Rekonstruktion	63
3.	Herstellung der Mutante <i>BgAChBP1-F92Y</i>	67
4.	Ligandenbindung von <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP1-F92Y</i>	69
4.1.	Inner-Filter Effekt	69
4.2.	Titration von <i>BgAChBP1</i> mit Nikotin	69
4.3.	Titration der Mutante <i>BgAChBP1-F92Y</i> mit Nikotin	75
4.4.	Titration mit Acetylcholin	76
4.5.	Titration mit BisTris, GABA und Glycin	78
4.6.	Fluoreszenz zeigt den Alterungseffekt bei der Mutante <i>BgAChBP1-F92Y</i>	78
5.	Protein-Ligand-Docking	85
5.1.	Vorbereitung des Protein-Ligand-Dockings	85
5.2.	Validierung des Protein-Ligand-Dockings mit <i>Autodock4</i>	85
5.3.	Protein-Ligand-Docking des <i>BgAChBP1</i> und der Mutante <i>BgAChBP1-F92Y</i> mit <i>Autodock4</i>	89
5.3.1.	Protein-Ligand-Docking des <i>BgAChBP1</i> mit Nikotin	89
5.3.2.	Protein-Ligand-Docking des <i>BgAChBP1</i> mit Acetyl- cholin	90
5.3.3.	Protein-Ligand-Docking des <i>BgAChBP1</i> mit GABA	91
5.3.4.	Protein-Ligand-Docking der Mutante <i>BgAChBP1-F92Y</i> mit Nikotin	93
5.3.5.	Vergleich der verschiedenen Protein-Ligand-Docking mit Nikotin	94
5.4.	Protein-Ligand-Docking des <i>BgAChBP1</i> und der Mutante <i>BgAChBP1-F92Y</i> mit <i>Autodock Vina</i>	95
5.4.1.	Protein-Ligand-Docking des <i>BgAChBP1</i> mit Nikotin	96

5.4.2.	Protein-Ligand-Docking des <i>BgAChBP1</i> mit Acetylcholin	96
5.4.3.	Protein-Ligand-Docking des <i>BgAChBP1</i> mit GABA	98
5.4.4.	Protein-Ligand-Docking der Mutante <i>BgAChBP1-F92Y</i> mit Nikotin	98
D.	Diskussion	99
1.	3D-Elektronenmikroskopie des Dodekaeders von <i>BgAChBP1</i>	99
2.	Ligandenbindung von <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP1-F92Y</i>	102
3.	Protein-Ligand-Docking von <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP1-F92Y</i>	104
E.	Zusammenfassung	107
	Literaturverzeichnis	108
	Danksagung	116
	Erklärung	117
	Abkürzungen	118
	Anhang	121

A. Einleitung

1. Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren

Der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) ist Teil der großen Familie der Cys-Loop Rezeptoren. Zu dieser Proteinfamilie zählen auch der 5-HT₃-Rezeptor, der Glycin-Rezeptor und der GABA_A-Rezeptor (Klebe, 2009). Diese ionotropen Rezeptoren zeigen mit einer membrandurchspannenden Pore, die sich unter Ligandeneinfluss öffnen oder schließen kann, den gleichen Aufbau. Die nAChR sind als Bestandteil der Synapsen an der schnellen Nervenenerregungsübertragung beteiligt. Sie sind vermehrt an der motorischen Endplatte zu finden, wo sie chemische Signale in Form von Acetylcholin-Ausschüttungen in elektrische Signale umwandeln. Störungen dieses Rezeptors werden mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. Hierzu gehören u.a. Myasthenia gravis (Lindstrom, 1997), autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie (Steinlein et al., 1995) oder Arthrogryposis multiplex congenita (Steinlein et al., 1995). Des Weiteren wurde ein Effekt von Ethanol (Nagata et al., 1996) und Nikotin (Koob, 1996) auf die nAChRs nachgewiesen.

2. Aufbau des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors

Beim nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor handelt es sich um ein großes Glycoprotein, welches sich aus fünf Untereinheiten zusammensetzt (Abb. 1a). Die fünf Untereinheiten sind nicht kovalent verbunden. Jede dieser Untereinheiten lässt sich nach Unwin (2005) in drei Domänen unterteilen:

- die hydrophile, extrazelluläre N-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD),
- die hydrophobe Transmembrandomäne und
- die hydrophile intrazelluläre Domäne.

Im Bereich der LBD liegt die Bindungstasche im Interface zwischen je zwei Untereinheiten, so dass fünf Liganden gebunden werden können (Arias, 2000).

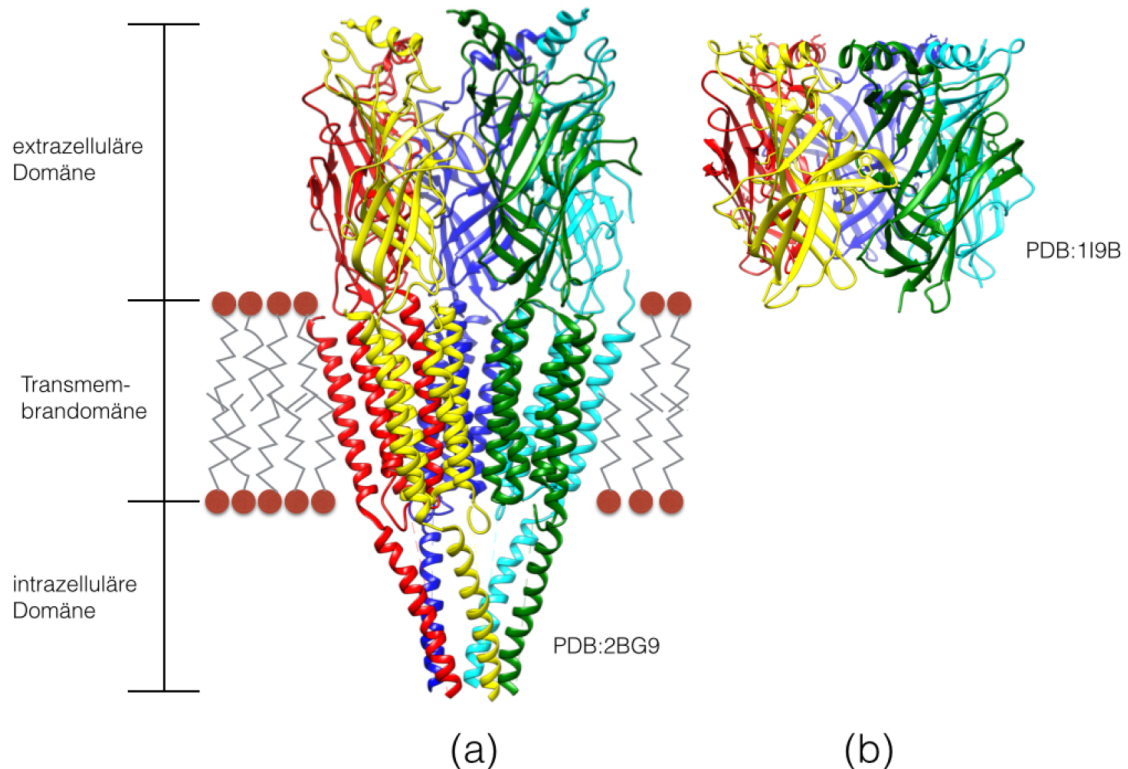


Abb. 1.: Aufbau des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors (nAChR) und des Acetylcholin-Bindeproteins (AChBP). (a) nAChR von *Torpedo marmorata* (Unwin, 2005). (b) AChBP von *Lymnaea stagnalis* (Brejc et al., 2001). Das AChBP ist ein wasserlösliches Protein, welches zur extrazellulären Domäne des nAChRs homolog ist.

3. Acetylcholin-Bindeproteine

Im zentralen Nervensystem der Spitzschlammschnecke *Lymnaea stagnalis* wiesen Smit et al. (2001) eine lösliche Form der N-terminalen Ligandenbindungsdomäne nach, das Acetylcholin-Bindeprotein (AChBP). Dieses Protein zeigt einen homologen Aufbau zur LBD des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors und setzt sich ebenfalls aus fünf Untereinheiten zusammen (Abb. 1). Es konnte gezeigt werden, dass sich das AChBP aus fünf identischen Untereinheiten zusammensetzt, welche nahe mit der Untereinheit $\alpha 7$ des nAChBP verwandt ist und so ein Homopentamer

bildet (Brejc et al., 2001). Brejc et al. (2001) erhielten mittels Röntgenkristallographie eine Struktur des AChBP mit einer Auflösung von 2,7 Å. Diese weist eine Höhe von 62 Å und einen Durchmesser von 80 Å auf.

Die Untereinheit besitzt eine N-terminale α -Helix und zehn β -Stränge ($\beta 1 - \beta 10$) (Abb. 2a), die über flexible Loops verbunden sind (Abb. 2b).

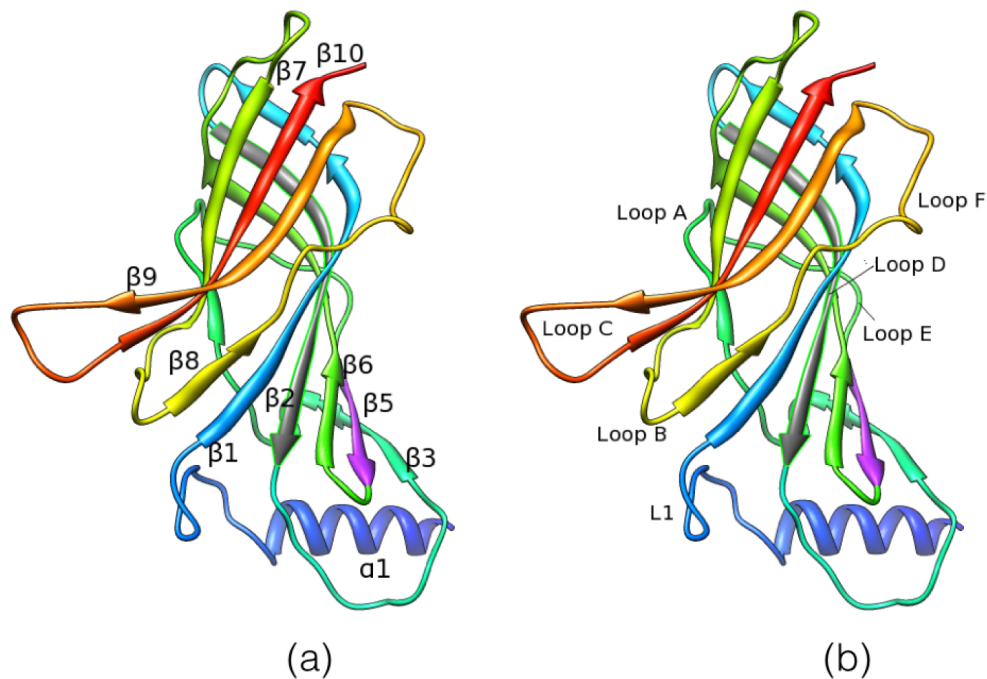


Abb. 2.: Aufbau eines Monomers. (a) N-terminale α -Helix und zehn β -Stränge des Monomers. (b) Beschriftung der Loops wurden nach Brejc et al. (2001) vorgenommen.

4. Das Acetylcholin-Bindeprotein von *Biomphalaria glabrata*

Als Zwischenwirt des Parasiten *Schistosoma mansoni* wurde die Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata* intensiv untersucht. In dieser Arbeitsgruppe wurde in der Hämolymphe der Schnecke ein Protein beschrieben, das ein rosettenförmiges Aussehen unter dem Elektronenmikroskop zeigte (Lieb et al., 2006). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei diesem Protein um zwei Isoformen eines AChBP handelt: *BgAChBP1* und *BgAChBP2* (Saur et al., 2012). Es wurde ge-

zeigt, dass die *BgAChBP1* Variante zu einem Dodekaeder assembliert und so die Rosettenform (Abb. 3a) bildet. Hierzu setzen sich je 12 Pentamere (Abb. 3b) zu dieser übergeordneten Struktur zusammen, die bisher einmalig unter den AChBP ist. In dieser Publikation wurde zudem eine Sequenzanalyse des *BgAChBP1* durch-

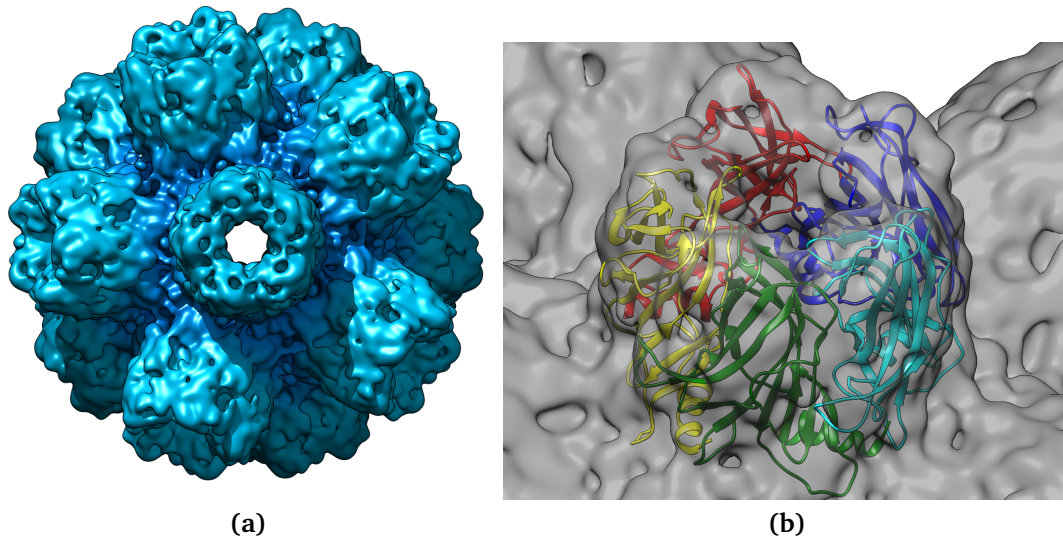


Abb. 3.: (a) Kryo-EM Struktur des *BgAChBP1* (EMDB-2055) von Saur et al. (2012). Blick entlang der C5-Symmetrieachse. (b) Molekulares Modell eines Pentamers (PDB-ID: 4AOD) in die Rekonstruktion eingepasst (Saur et al., 2012).

geführt. Es wurde eine Übereinstimmung von 30-36 % zwischen den Sequenzen von *Biomphalaria glabrata* und *Lymnaea stagnalis*, *Bulinus truncatus* bzw. *Aplysia californica* gefunden. Auffällig ist die hohe Konserviertheit innerhalb der Ligandenbindungstasche. Als Beispiel werden hier unter anderem die Aminosäuren W146, Y186, C188, C189 and Y193 genannt. In der Isoform *BgAChBP1* ist jedoch die Aminosäure Y92 durch ein F92 substituiert.

5. Ligandenbindung

Der bekannteste Ligand des nAChBP ist das namensgebende Acetylcholin. Für die Entdeckung dieses Transmitters erhielten Henry Hallet Dale und Otto Loewi 1963 den Nobelpreis in Medizin. Acetylcholin wird an der präsynaptischen Membran ausgeschüttet und moduliert über die Bindung an den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor die interneuronale Kommunikation. Weiterhin gut untersuchte Liganden sind Nikotin (Celie et al., 2004), Epibatidin (Hansen et al., 2005)

und α -Bungarotoxin (Dellisanti et al., 2007).

Die Ligandenbindungstasche befindet sich wie beim nAChR im Interface zwischen zwei Monomeren und wird von dem Loop C verdeckt. Die eine Hälfte der Bindungstasche wird von dem Loop A, dem Loop B und dem Loop C gebildet. Das Nachbarmonomer bildet mit dem Loop D, dem Loop E und dem Loop F den komplementären Teil (Sixma and Smit, 2003).

In der Bindungstasche befinden sich keine negativ geladenen Aminosäuren. Die

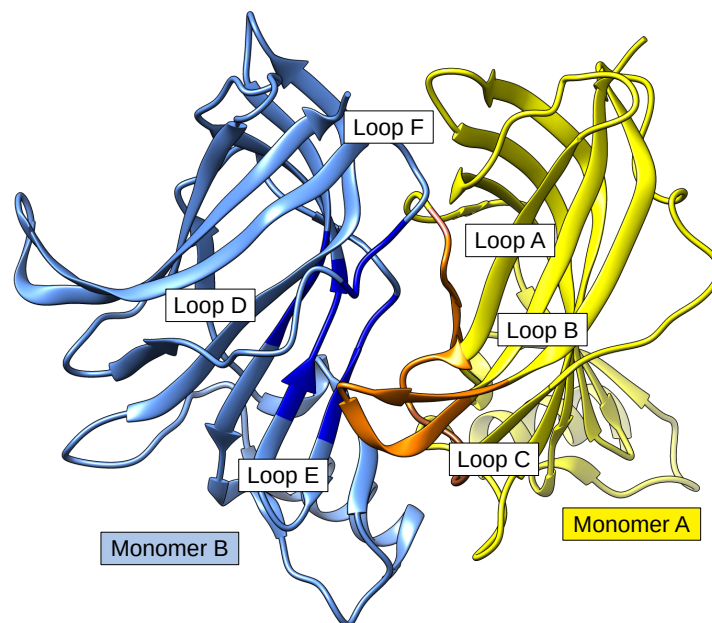


Abb. 4.: Eine Ligandenbindungstasche wird aus zwei Monomeren gebildet. Loop A, Loop B und Loop C von Monomer A bilden einen Teil der Tasche. Loop D, Loop E und Loop F des Monomers B bilden den komplementären Teil.

aromatischen Aminosäuren, die sich in der Tasche befinden, wurden als Bindungspartner der kationischen Liganden identifiziert (Zhong et al., 1998) und eine Kation- π -Bindung angenommen.

Aufgrund der hydrophoben Transmembrandomäne der nAChR ist die Untersuchung der Bindungseigenschaften der Rezeptoren erschwert. In vielen Fällen konnte die Bindung verschiedener Liganden an dem homologen AChBP untersucht werden. Da es sich hier um Homologe der löslichen extrazellulären Domäne handelt, können viele technische Probleme umgangen werden. Durch die gerichtete Mutagenese von Aminosäuren in der Bindungstasche konnten die Bindungsverhältnisse im nAChR nachgestellt werden (Olsen et al., 2014).

Um die Bindung von Liganden auf molekularer Ebene zu verstehen oder ein screening von Liganden durchzuführen, wurden *in silico*-Methoden angewendet (Sander et al., 2010). So wurde der Einfluss verschiedener Aminosäuren (Schapira et al., 2002) bzw. der Einfluss von Wassermolekülen innerhalb der Bindungstasche (Amiri et al., 2007) untersucht.

6. Ziele der Arbeit

Nach der Publikation von (Saur et al., 2012) sollte eine 3D-Rekonstruktion mit einer höheren Auflösung des *BgAChBP* erstellt werden. Hierzu wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen eines rekombinanten *BgAChBP* der Berechnung zugrunde gelegt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Bindung von Nikotin einen messbaren Effekt auf die Struktur des *BgAChBP* hat. Hierzu wurde eine weitere Kryo-Struktur angefertigt, für die der Proteinprobe Nikotin zugegeben wurde.

Neben der Struktur des rekombinanten *BgAChBP* sollte auch ein erster Einblick in die Bindungseigenschaften dieses Proteins gewonnen werden. Hierzu sollte die Stabilität verschiedener Liganden-*BgAChBP*-Komplexe mittels Tryptophan Fluoreszenz untersucht werden.

Des Weiteren sollte eine Variante des *BgAChBP* mit der Mutation des Phenylalanins an der Position 92 zu einem Tyrosin hergestellt werden, umso so die Ligandenbindungstasche des AChBP von *Lymnaea stagnalis* zu simulieren. Die Methode der Trp-Fluoreszenz sollte eingesetzt werden, um die Bindungen der Liganden Nikotin, Acetylcholin, GABA und Glycin an das Protein zu untersuchen. Die Bindung dieser Liganden sollte darüber hinaus *in silico* mittels Protein-Ligand-Docking simuliert werden, um Anhaltspunkte über die Ligandenbindung auf molekularer Ebene zu gewinnen.

B. Material und Methoden

1. Rekombinante Expression und Mutagenese des *BgAChBP*

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits das native Acetylcholin-Bindeprotein von *Biomphalaria glabrata* untersucht (Saur et al., 2012). Die Proben, die für die hochaufgelöste Rekonstruktion in dieser Publikation verwendet wurden, sind direkt aus der Hämolymphe der Schnecke gewonnen worden, was aufgrund der Größe der Tiere oft einen limitierenden Faktor darstellt. Um jedoch relativ schnell an größere Mengen des Proteins zu gelangen, kann dieses auch rekombinant exprimiert werden. Zudem werden so auch Mutationsstudien möglich, die ein tiefergehendes Verständnis des Proteins ermöglichen.

Hierzu wird mit einem Vektor die Gensequenz des zu exprimierenden Proteins in ein Bakterium, eine Insekten- oder Säugerzelle eingebracht. Dieses kann anschließend die Gensequenz translatieren und das gewünschte Protein exprimieren. Zudem ist es möglich, die Sequenz zu modifizieren.

Für die Expression des *BgAChBP* wurden von Frau [REDACTED] präparierte Enterobakterkulturen (*Escherichia coli*) verwendet. Diese tragen die Gensequenz des nativen *BgAChBP*, sowie die Informationen für eine Proteaseschnittstelle und ein Polyhistidin-Peptid.

Zur Untersuchung der Ligandenbindungseigenschaften wurde für diese Arbeit auch eine Mutation in die native Genstruktur im Bereich der Bindungstasche eingefügt. Die nötigen Arbeitsschritte werden im Folgenden beschrieben.

1.1. Mutagenese

Wegen der hohen Sequenz- und Strukturidentität werden oft Proteine aus der Gruppe der löslichen Acetylcholin Bindeproteine als Modelle für die Transmem-

branproteine der „Cys-Loop“ Rezeptoren herangezogen. Zahlreiche Arbeiten an den löslichen Bindeproteinen schließen auf die Bindungseigenschaften (Celie et al. (2004), Olsen et al. (2014)) der Rezeptoren und deren Struktur (Celie et al. (2005)). Um den Anteil einer einzelnen Aminosäure an der Bindung von Liganden zu untersuchen, kann eine gezielte Punktmutation an dieser Stelle eingeführt werden. In dieser Arbeit wurde für das BgAChBP1 eine Mutation des Phenylalanins an der Position 92 zu einem Tyrosin (BgAChBP1-F92Y) durchgeführt.

1.1.1. Erstellen des Mutageneseprimers

Mit dem Programm „PrimerX - Automated design of mutagenic primers for site-directed mutagenesis“¹ wurde ein Mutageneseprimer erstellt, der die Mutation BgAChBP1-F92Y trägt. Der Primer muss dabei folgende Kriterien erfüllen, die mittels OligoAnalyzer 3.1² (Integrated DNA Technologies, USA) überprüft wurden:

- Eine Länge von 15 - 20 Basen,
- Einen GC-Gehalt von 40 -50 %,
- Darf keine Haarnadelstrukturen ausbilden und
- Nicht komplementär mit sich selbst sein.

Die lyophilisierten Primer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) zu einer Konzentration von 100 pmol gelöst und bei -20 °C gelagert.

1.1.2. Polymerase-Kettenreaktion

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Fragmente *in vitro* vervielfältigt werden. Der erstellte Primer ist in der Lage an den komplementären Abschnitt der Template-DNA zu binden und wird dort mit Hilfe einer Polymerase anhand der Informationen des Templates komplementiert. So kann ein Produkt erhalten werden, das neben der Mutation alle Merkmale (*His-Tag*, Proteaseschnittstelle) trägt, die bereits im Vorhinein im Template vorhanden waren.

¹<http://www.bioinformatics.org/primerx/>; Stand: Juli 2014

²<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>; Stand: Juli 2014

1. Rekombinante Expression und Mutagenese des BgAChBP

Als Template-DNA diente in dieser Arbeit ein Plasmid, welches aus dem *E. coli* Bakterium XL1-Blue präpariert wurde (von Frau Dr. Kristiane Rusitzka in dieser Arbeitsgruppe kloniert). Für die Kettenreaktion wurde die Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet.

Der Master-Mix wurde wie folgt zusammengesetzt:

22,5 µl	5x Phusion HF Puffer
2,25 µl	10 mM dNTPs
2,25 µl	Template-DNA
3,37 µl	5% DMSO
74,8 µl	H ₂ O

Zum Master-Mix wurde noch der Primer und die Polymerase hinzugefügt:

47,5 µl	Master-Mix
1,0 µl	1:10 <i>forward</i> -Primer
1,0 µl	1:10 <i>reverse</i> -Primer
0,5 µl	Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase

Die PCR läuft in verschiedenen Schritten ab, die über ein individuelles Temperaturprogramm kontrolliert werden. Zunächst trennen sich bei relativ hoher Temperatur die beiden Doppelstränge der Template-DNA und des Primers. Das Absenken der Temperatur unter die Schmelztemperatur des Primers führt zu einer Anlagerung des Primers an die Template-DNA, wo dieser durch die zugesetzte Polymerase komplettiert wird. Dieser Zyklus wird wiederholt um die Sequenz mit der eingebrachten Mutation zu vervielfältigen.

Die PCR für die BgAChBP1-F92Y wurde mit dem folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

1 min	95 °C	} 17x wiederholen
30 s	95 °C	
45 s	55 °C	
5 min	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

1.1.3. Dpn1 Verdau

Nach der PCR lagen sowohl das amplifizierte Produkt als auch die Template-DNA in dem Reaktionsgemisch vor. Um eine vollständige Mutation zu gewährleisten, muss die Template-DNA aus der Lösung entfernt werden. Aus diesem Grund wurde das Template-Plasmid aus dem *E. coli*-Stamm XL1-Blue extrahiert. Somit ist die Template-DNA methyliert und kann mit Hilfe des Enzyms Dpn1 (New England Biolabs, Frankfurt) verdaut werden.

Für den Dpn1-Verdau wurden 45 µl des PCR-Produkts mit 1 µl Dpn1 versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

1.1.4. DNA-Gelelektrophorese und DNA Extraktion

Das Ergebnis des Dpn1 Verdau wurde mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft. Diese Methode erlaubt eine Trennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Aufgrund des negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats wandert die DNA in einem Agarosegel zur Anode, wobei größere Fragmente langsamer wandern als kleinere. Aus den aufgetrennten Banden können anschließend die verschiedenen DNA-Fragmente isoliert und aufgereinigt werden.

Zur Auftrennung, Kontrolle und Isolierung des PCR-Produkts vor und nach dem Dpn1 Verdau wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer gelöst und zum Anfärben der DNA ist Ethidiumbromid zugesetzt worden. Durch die Zugabe eines Größenmarkers kann die Größe der DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 100 V angelegt.

Nach der Trennung der verschiedenen Probenbestandteile wurde die Bande mit dem mutierten DNA-Fragment unter eine UV-Lampe mit einem Skalpell herausgeschnitten. Mit Hilfe des GeneJet™ Gel Extraction Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) ist

die DNA anschließend aus dem Agarosegel extrahiert worden. Dabei wurde, wie in den Herstellerangaben beschrieben, verfahren.

1.1.5. Zyklisierung der linearen DNA

Das aufgereinigte und isolierte PCR-Produkt, welches die Mutation BgAChBP1-F92Y trägt, liegt nach der Extraktion in linearer Form vor. Die Expressionsbakterien BL21-AI™ (Invitrogen, Darmstadt) benötigen zur Transformation jedoch zyklisierte Plasmide. Das Bakterium *E. coli* DH5α™ (Invitrogen, Darmstadt) ist in der Lage lineare DNA aufzunehmen und zu zyklisieren.

Die DNA wird mittels Hitzeschock in die chemisch kompetenten Bakterien *E. coli* DH5α™ eingebracht. Hierzu wurde zu 50 µl Bakterienlösung 5 µl der linearen DNA pipettiert. Nach 30 min auf Eis wird die Lösung für 30 s in ein 42 °C warmes Wasserbad gehalten um den Hitzeschock auszuführen. Damit die Zellen keinen Schaden nehmen, müssen sie für 2 min auf Eis inkubieren. Anschließend wurden 950 µl vorgewärmtes SOC-Medium (siehe Anhang) hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler belassen. Zwischen 200 µl - 400 µl wurden auf ampicillinhaltige LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aufgrund der Ampicillinresistenz in den transformierten Bakterien konnten nur diese auf den LB-Platten wachsen. Insgesamt wurden fünf verschiedene Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen aufgenommen und in je 5 ml LB-Medium (siehe Anhang) mit 0,5 %igem Ampicillin überführt. Zur Anzucht der Bakterien wurden die fünf Ansätze über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

1.1.6. Glycerinkultur

Vom Bakterienstamm *E. coli* DH5α™, der das Plasmid mit der Mutation BgAChBP1-F92Y trägt, wurden Glycerinkulturen angelegt. So ist es möglich, die Bakterien zu lagern und bei Bedarf darauf zurückzugreifen.

Hierzu wurden je 500 µl der *E. coli* DH5α™ in LB-Medium (Übernachtkultur, siehe Kapitel 1.1.5) und der gleichen Menge Glycerin vermischt. Die Glycerinkultur kann in dieser Form bei -80 °C konserviert werden.

1.1.7. Isolierung des zyklisierten Plasmids

Zur Expression des Proteins muss das Plasmid zunächst aus *E. coli* DH5 α TM isoliert werden und in das Expressionsbakterium *E. coli* BL21-AITM transformiert werden. Die Isolation des Plasmids wurde mit dem GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon Rot) durchgeführt. Hierbei wurde nach der Herstellerangabe verfahren.

1.1.8. Transformation in *E. coli* BL21-AITM

Die Transformation der in Kapitel 1.1.7 isolierten Plasmide in das Expressionsbakterium *E. coli* BL21-AITM erfolgte wie bei *E. coli* DH5 α TM über Hitzeschock. Die Durchführung der Transformation ist analog zu den in Abschnitt 1.1.5 beschriebenen Arbeitsschritte. Von der erhaltenen Übernachtskultur wurde wie in Kapitel 1.1.6 eine Glycerinkultur angelegt, die bei -80 °C aufbewahrt wird.

1.2. Expression und Aufreinigung

Das Protokoll für Expression und Aufreinigung des BgAChBP wurde, sowohl für die Bakterien, die die native Genstruktur enthalten, als auch für die Kulturen, die die mutierte Genstruktur tragen, gleich durchgeführt. Alle hier angegebenen absoluten Werte beziehen sich immer auf eine Expression mit einem Startvolumen von 1 L LB-Medium (siehe Anhang).

1.2.1. Anzucht der Bakterien

Für die Anzucht der genveränderten Bakterien wurde zunächst eine Vorkultur angelegt. Hierzu wurde jeweils mit einer Pipettenspitze ein Aliquot der entsprechenden Glycerinkultur in 50 mL LB-Medium gegeben, welches mit 50 μ L 0,5 %igem Ampicillin (0.1 v/v) versetzt wurde. Diese Vorkultur ist bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttler belassen worden.

Für die Vermehrung der Bakterien ist je eine Vorkultur (50 mL) zu 1 L LB-Medium mit 1 mL 0,5 %igem Ampicillin (0.1 v/v) gegeben worden. Die Anzuchtkulturen wurden bei 37 °C inkubiert, bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,75 - 0,80 gemessen werden konnte. Die Proteinexpression ist durch die Zugabe von 10 mL 20 %iger L-Arabinose (1,0 v/v) induziert worden. Als Negativkontrolle wurde ein

Teil des Ansatzes nicht induziert, im weiteren Verlauf jedoch wie die induzierten Proben behandelt. Alle Ansätze wurden bei 25 °C über Nacht inkubiert.

1.2.2. Ernte der Bakterien

Um die Bakterienzellen vom LB-Medium zu trennen, wurden diese bei 4 °C für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet mit den Bakterienzellen kann an dieser Stelle des Protokolls entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt aufgebrochen werden. Hierzu wird das Pellet 4 x abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem 42 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Durch diesen Vorgang werden die Zellmembranen der Bakterien aufgebrochen. Dem Pellet wurde 100 mL Lysis-Puffer (siehe Anhang) mit 400 µL Lysozym zugegeben. Während der einstündigen Inkubation auf Eis wurde das Pellet durch wiederholtes Vortexen komplett gelöst.

Durch die Zugabe von 10 µL Benzonase (2500 Units) werden bakterielle DNA und RNA abgebaut. Dazu muss der Ansatz zunächst für 15 min bei 37 °C und anschließend für weitere 30 min auf Eis inkubieren. Die Proteine, die in Einschlusskörpern vorliegen, wurden bei 5000 rpm für 40 min bei 4 °C abzentrifugiert. Nach diesem Schritt ist es möglich, das Pellet zur Lagerung bei -20 °C einzufrieren.

1.2.3. Aufbrechen der Einschlusskörper

Das exprimierte BgAChBP liegt in den Bakterienzellen in Einschlusskörpern vor, die zur Isolation des Proteins aufgebrochen werden müssen. In dieser Arbeit wurde das bei der Ernte (Kapitel 1.2.2) erhaltene Pellet in 30 ml Bindungspuffer (siehe Anhang) aufgenommen und sonifiziert (Labsonic 1510, B.Braun, Melsungen). Durch diese Prozedur werden die Membranen der Einschlusskörper aufgebrochen und die enthaltenen Proteine gehen in Lösung. Durch Zentrifugation (15 min, 2500 rpm, 10 °C) können die Membranfragmente als Pellet von der Proteinlösung abgetrennt werden.

1.2.4. Aufreinigen des Proteins mittels Affinitätschromatographie

Um das BgAChBP vom restlichen Proteinen in der Lösung zu trennen wird sich zunutze gemacht, dass an die Sequenz des BgAChBP ein Polyhistidin-Tag (His-Tag) angehängt wurde, der bei den natürlichen Proteinen nicht zu finden ist. Mittels

diesen His-Tags kann das *BgAChBP* an das Nickel des Säulenmaterials Ni Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, Freiburg) reversibel binden, wohingegen die anderen Proteine in Lösung verbleiben.

Das Säulenmaterial wurde zunächst wie vom Hersteller empfohlen vorbereitet. Die Proteinlösung, die in Kapitel 1.2.3 erhalten wurde, ist mit dem Säulenmaterial (5 ml/1l Expression) vereinigt worden und über Nacht bei 10 °C auf einem Schüttler belassen. Über eine Säule wurde anschließend die mobile Phase vom Säulenmaterial getrennt (Durchfluss). Um eventuell verbliebene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit dem 5-fachen ihres Volumens an Bindungspuffer gespült (Waschfraktion). Die reversible Bindung des *BgAChBP* an das Nickel der Säulenmatrix wurde durch Verdrängung mit dem im Elutionspuffer (siehe Anhang) enthaltenen Imidazol gelöst. Das *BgAChBP* sollte nun vollständig im Eluat zu finden sein.

1.2.5. Proteinfaltung

Das *BgAChBP* liegt unter denaturierenden Bedingungen im Elutionspuffer vor und muss im folgenden Schritt zu seiner korrekten Struktur gefaltet werden. Dieser Schritt geschieht durch Eintropfen des Eluats in den Rückfaltungspuffer (siehe Anhang), der eine spezifische Umgebung für die Faltung des Proteins bietet. Hierzu wurde eine Econo pump EP-1 (Bio-Rad, München), bei einer Förderungsgeschwindigkeit von 0,2 ml/min verwendet. Die Menge des Rückfaltungspuffers wurde abhängig von der eluierten Proteinmenge so gewählt, dass eine finale Proteinkonzentration von 30 µg/ml erreicht wurde.

1.2.6. Einengen und Dialysieren des *BgAChBP*

Die Konzentration, in der das *BgAChBP* nach der Rückfaltung im Faltungspuffer vorliegt, ist für die folgenden Analysen zu gering. Des Weiteren ist das Protein in diesem Puffer nicht lagerungsstabil. Aus diesen Gründen muss das Protein zunächst mit Hilfe der Ultrafiltrationsrührzelle 8400 (Merck Millipore, Darmstadt) aufkonzentriert werden. Die Rührzelle wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und verwendet. Als Filter wurde eine Ultrafiltrationsscheibe mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Mit Stickstoff ist während der Filtration ein Druck von ca. 3 bar aufgebaut worden. Die Proteinprobe wurde auf diese Weise auf ein Volumen von ca. 20 ml - 40 ml eingeengt.

Um das Protein lagern zu können, wurde der Rückfaltungspuffer mittels Dialyse durch einen Tris-Puffer (20 mM, pH = 7,5) ersetzt. Der Visking Dialyseschlauch (Rotz, Karlsruhe) wurde vor der Verwendung zur Reinigung aufgekocht. Die Dialyse fand über zwei Tage bei 10 °C unter mehrfachem Pufferwechsel statt.

1.2.7. Konzentrationsbestimmung mittels Absorption

Die Konzentration eines Proteins kann über die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm bestimmt werden. Zur Berechnung der Konzentration wird das Lambert-Beer'sche Gesetz angewandt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (1)$$

Wobei E der Extinktion, ε der molarer Extinktionskoeffizienten, c der Probenkonzentration und d der Länge der Küvette entspricht. I_0 bzw. I ist die Intensität vor bzw. nach Durchgang der Probe.

Bei Proteinproben setzt sich ε additiv aus dem Anteil der absorbierenden Aminosäuren (Tryptophan ($\varepsilon = 5500$) und Thyrosin ($\varepsilon = 1490$)) und der Disulfidbrücken zusammen ($\varepsilon = 125$) und lässt sich für jedes Protein individuell mit folgender Formel berechnen (Grimsley and Pace, 2003):

$$\varepsilon_{280} = (n_{Trp} \cdot 5500 \frac{1}{M \cdot cm}) + (n_{Tyr} \cdot 1490 \frac{1}{M \cdot cm}) + (n_{SS} \cdot 125 \frac{1}{M \cdot cm}) \quad (2)$$

Mit dieser Formel ergibt sich ein molarer Extinktionskoeffizient für BgAChBP1 von $\varepsilon = 35325 \frac{1}{M \cdot cm}$, für BgAChBP1-F92Y von $\varepsilon = 36815 \frac{1}{M \cdot cm}$ und für BgAChBP2 von $\varepsilon = 41160 \frac{1}{M \cdot cm}$.

Daraus ergibt sich ein Faktor für die Umrechnung der Extinktion in die Konzentration (mg/ml) von:

BgAChBP1:	$c = 0,66 \cdot E$
BgAChBP1-F92Y:	$c = 0,64 \cdot E$
BgAChBP2:	$c = 0,57 \cdot E$

2. Probenvorbereitung

In dieser Arbeit wurden sowohl die Struktur, als auch das Ligandenbindungsverhalten des Acetylcholin-Bindeprotein von *B. glabrata* (BgAChBP) untersucht. Hierfür ist es entscheidend, dass die exprimierte pentamere Form des BgAChBP in die dodekaedrische Form assembliert. Die räumliche Ausdehnung des His-Tags am N-terminalen Ende verhindert jedoch die Assemblierung und muss mit Hilfe einer Protease abgespalten werden. Somit liegen beide Assemblierungsformen in einer Probe vor und müssen über verschiedene Verfahren getrennt werden. Des Weiteren müssen Pufferbedingungen evaluiert werden, bei denen das Protein möglichst stabil ist. Sämtliche Methoden, die für die Probenvorbereitung wichtig sind, werden im Folgenden erläutert.

2.1. Enzymatische Abspaltung des Polyhistidin-Tags

Nach der Proteinexpression liegt das BgAChBP aufgrund der sterischen Hinderung durch den Polyhistidin-Tag (His-Tag) in pentamerer Form vor. Für die hier aufgeführten Methoden wird jedoch immer eine Probe benötigt, in der ausschließlich Dodekaeder vorliegen. Der His-Tag muss hierfür enzymatisch abgespalten werden. Das in dieser Arbeitsgruppe von [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] etablierte Konstrukt erlaubt es, mit Hilfe einer TEV-Protease den His-Tag über eine Schnittstelle zu entfernen (Möller, 2012). Bei der TEV-Protease handelt es sich um eine Protease des *Tobacco etch virus*. Durch die proteolytische Spaltung liegt der N-Terminus frei und je zwölf Pentamere können zu einer übergeordneten dodekaedrischen Struktur assemblieren.

Für den TEV-Verdau wurde hier nach folgendem Protokoll verfahren. Zu 100 mg BgAChBP werden 50 Units TEV-Protease (Roboklon, Berlin) gegeben und für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Ein größerer Anteil an Dodekaedern wurde erreicht, wenn der Probe vor der Aufreinigung genügend Zeit eingeräumt wurde um zu assemblieren (über Nacht bei ca. 10 °C).

2.2. Thermofluor zur Validierung geeigneter Pufferbedingungen

Wie bereits erwähnt ist es für die Strukturaufklärung unbedingt notwendig, dass das Protein in einer stabilen und löslichen Form vorliegt. Diese Bedingungen hän-

gen zum großen Teil vom Puffer ab, in dem sich die Probe befindet. Sowohl die Art als auch die Konzentration von Puffersubstanzen oder der Zusatz von Additiven (z. B. Salzen) haben einen maßgeblichen Einfluss. Die Thermofluor-Methode stellt eine Möglichkeit dar, die Stabilität von Proteinen quantitativ zu erfassen. Dabei wird die Stabilität am Faltungszustand des Biomoleküls fest gemacht, bzw. am Schmelzpunkt, der den Übergang von gefaltetem zu denaturiertem Protein kennzeichnet (Gomez et al., 1995). Bei der Thermofluor-Methode wird sich zunutze gemacht, dass viele Proteine einen hydrophoben Kern besitzen, der nach außen durch eine hydrophile Oberfläche abgeschirmt wird. Dem System muss zusätzlich noch ein hydrophobes Fluorophor zugesetzt werden, welches durch Wasser gequencht wird. Bei niedrigen Temperaturen, zu Beginn der Messung, sollte deshalb idealerweise keine Fluoreszenz auftreten. Je mehr sich das Protein entfaltet (schmilzt) und seine hydrophoben Bereiche präsentiert, desto mehr Fluorophore können am Protein binden. Die gemessene Fluoreszenz steigt immer weiter an, bis alle Proteine denaturiert vorliegen (Schuldt and Weiss, 2010). Im Idealfall wird eine sigmoidale Kurve erhalten, deren Wendepunkt der Schmelztemperatur (T_m) entspricht (Abb. 5).

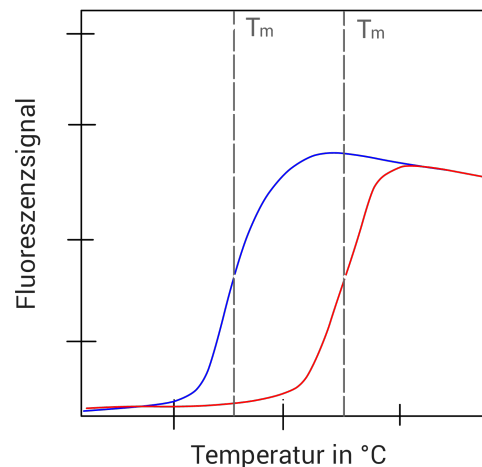


Abb. 5.: Bei gefaltetem Protein wird im Idealfall keine Fluoreszenz gemessen. Das Fluorophor kann erst binden, wenn das Protein denaturiert und seine hydrophoben Bereiche präsentiert. Der Schmelzpunkt kann am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve abgelesen werden. Die Stabilität des Proteins der blauen Kurve ist in diesem Beispiel geringer als das der roten Kurve.

Diese Methode ist in der Gruppe von ████████ ████ ████████ ████████ am MPI in Göttingen soweit automatisiert worden, dass eine Vielzahl von Pufferbedingungen in kurzer

Zeit getestet werden kann. Durch Miniaturisierung wird zudem der Probeneinsatz klein gehalten (Pantoliano et al., 2001).

Für diese Arbeit wurde eine BgAChBP Probe (Dodekaeder) mit der Thermoflour Methode in Kooperation mit Ashwin Chari (MPI Göttingen) vermessen. Hierzu wurde vollautomatisch eine 96-well Platte mit jeweils 900 μL Probe und 800 μL Puffer bestückt. Als Puffersubstanzen sind die Standardpuffer der Arbeitsgruppe von [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] verwendete worden. Eine Liste der getesteten Puffersubstanzen findet sich im Anhang. Als Fluorophor wurden 10 μL SYPRO Orange zugefügt.

2.3. Proteinaufreinigung

Nach Expression der Proteine und dem TEV-Verdau liegen sowohl Dodekaeder als auch Pentamere in der Probe vor. Für die 3D-Rekonstruktion und noch wichtiger für die Ligandenbindungsstudien sind reine Dodekaeder Proben entscheidend. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Größenausschlussverfahren eingesetzt. Alle Proben sind über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt worden. Die Kryo-EM Proben, die in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut (MPI) Göttingen gemessen worden sind, wurden zusätzlich über die GraFix Methode (Kastner et al., 2008) aufgereinigt.

2.3.1. Größenausschluss-Chromatographie

Um die Dodekaeder für die Ligandenbindungsstudien aufzureinigen wurde eine Größenausschluss-Säule verwendet. Bei dieser Methode werden die Makromoleküle in der Probe nach ihrem hydrodynamischen Volumen getrennt. Die Trennsäule ist mit einem porösem Polymer, z. B. Silikat, vernetzte Agarose oder Dextrane, befüllt. Die Porengröße der Partikel entscheidet über den Größenbereich, in dem die Trennsäule auftrennen kann. Partikel mit kleinem hydrodynamischen Volumen können die Poren penetrieren und legen somit eine längere Wegstrecke zurück als Partikel mit einem großen hydrodynamischen Volumen, die nicht einwandern können. Somit verlassen diese die Trennsäule zuerst und können in gesonderten Fraktionen aufgefangen werden.

Um die Pentamere der Isoform 1 des BgAChBP von den Dodekaedern zu trennen, wurde eine Trennsäule mit dem Füllmaterial Bio-Gel A 1.5m (Biorad) befüllt. Die-

se stationäre Phase besitzt eine Trennschärfe von 10 kDa bis 1,5 MDa und eignet sich somit um Dodekaeder (1,5 MDa) von Pentameren (125 kDa) und der TEV-Protease (30 kDa) zu trennen. Die Säule wurde vor dem Beladen mit Probe zunächst für mehrere Stunden mit dem benötigten Puffer gewaschen. Als Detektor diente ein Spektrometer, welches die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm aufzeichnete. Fraktionen wurden über einen Zeitraum von 6 min gesammelt, was bei diesem Aufbau einer ungefähren Fraktionsgröße von 800 μ L entsprach.

2.3.2. GraFix

Für sämtliche Methoden, die zur Strukturaufklärung von Proteinen dienen ist es essentiell, dass es bei der Probenvorbereitung nicht zu Veränderungen oder Zerstörung der nativen Struktur kommt. Am MPI in Göttingen wird eine Methode eingesetzt, mit der sich Proteingemische, bzw. Proteinaggregate nach Größe auftrennen lassen und zusätzlich die einzelnen Proteine stabilisiert werden. Durch diese GraFix Methode soll so die Probenqualität erheblich verbessert werden (Kastner et al., 2008). Während der GraFix Fixierung werden die Makromoleküle intramolekular schwach vernetzt und gleichzeitig über einen Dichtegradienten aufgereinigt. So können auch heterogene Datensätze aufgrund von Aggregationen während der Probenpräparation vermieden werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Anlagerung der Proteine an den Kohlefilm der Objektträger verbessert wird (Stark, 2010). Für die GraFix Fixierung wird zunächst ein Gradient erzeugt, in dem ein Teil des Puffers mit einer niedrigen Konzentration an Kohlenhydraten (z. B. Glycerin, Saccharose) versetzt wird und ein anderer Teil mit einer hohen Konzentration. Dem Puffer, mit der hochkonzentrierten Kohlenhydrat-Lösung, wird zusätzlich noch der chemische Vernetzter hinzugefügt. So wird sichergestellt, dass das Protein erst langsam durch Einwandern in den Gradienten mit dem Vernetzter in Berührung kommt. Auf diese Weise können Artefakte und intermolekulare Vernetzungen vermieden werden (Kastner et al., 2008).

Alle Proben, die in Kooperation mit dem MPI in Göttingen am Titan Krios (FEI) aufgenommen wurden, sind mit der GraFix-Methode präpariert worden. Die Kooperationspartner waren in diesem Fall Dr. Ashwin Chari, [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED].

Die Probe wurde auf einen Saccharose Gradienten (10 % - 30 %) gegeben und

über Nacht bei 30 g für 16 Stunden zentrifugiert. Der Gradient wurde in 200 μL große Aliquots unterteilt und die Vernetzung mit L-Aspartat gequenchet. Um die Fraktionen auf Protein zu untersuchen, wurden jeweils 2 μL jedes Aliquots auf eine Nitrocellulosemembran getropft. Durch eine Färbung mit Amidoblack konnten die Proteine sichtbar gemacht werden. Da sich die verwendeten Additive (z. B. Saccharose) negativ auf die Qualität der Elektronenmikroskop (EM)-Aufnahmen auswirken, wurde ein Pufferaustausch vorgenommen.

3. Strukturaufklärung

Um die Struktur des BgAChBP aufzuklären, sind die Methoden der Einzelpartikelanalyse (*single-particle*) zum Einsatz gekommen. Hier werden elektronenmikroskopische Bilder von wahllos orientierten Proteinen aufgenommen. Für jede Ansicht des Proteins wird mittels bioinformatischer Methoden die räumliche Orientierung bestimmt und über dieses kann aus allen Aufnahmen eine dreidimensionale Struktur berechnet werden. Die für diese Methode entscheidenden Schritte werden im Folgenden beschrieben.

3.1. Probenvorbereitung

Der Probenvorbereitung muss für die Strukturaufklärung mittels Elektronenmikroskopie besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Im Elektronenmikroskop herrschen extreme Bedingungen, bei denen biologische Proben nicht stabil sind. So muss das Elektronenmikroskop (EM) beispielsweise evakuiert sein, da nur so die mittlere freie Weglänge erreicht werden kann, die für einen störungsfreien Elektronenstrahl entscheidend ist. Biologische Objekte sind unter diesen Hochvakuumbedingungen allerdings nicht stabil. Des Weiteren kommt es durch die hohe Strahlendosis zu irreversiblen Strahlenschäden an der Probe.

Um eine aussagekräftige Struktur des Proteins berechnen zu können, muss die Probe vor den Einflüssen im EM geschützt werden (Schatz, 1992). Für die Fixierung der Proteinproben sind hauptsächlich zwei Methoden etabliert. Zum einen können die Proteine in einer Hülle aus Schwermetallen fixiert werden (Negativkontrastierung (Brenner and Horne, 1959)) , zum anderen können die Proben in Eis eingebettet werden (Dubochet and McDowell (1981), Dubochet et al. (1985)).

3.1.1. Hydrophilisierung des Objektträgers mittels Glimmentladung

Als Objektträger dient in der Elektronenmikroskopie ein Kohlenstofffilm, der auf einem Kupfernetz aufliegt. Je nach Präparationsmethode kann dieser Kohlenstofffilm durchgängig sein oder löchrig (Abb. 6 bzw. Abb. 7).

In jedem Fall ist der Kohlenstofffilm überwiegend hydrophob. Da gerade bei biologischen Fragestellungen fast ausschließlich wässrige Proben untersucht werden, muss diese Eigenschaft des Objektträgers vor der Probenpräparation umgekehrt werden. Die gängige Methode um die Oberfläche des Kohlefilms zu hydrophilisieren ist mittels Glimmentladung (*glow discharge*) (Aebi and Pollard, 1987). Der Objektträger wird hierzu unter Vakuumbedingungen bei 25 mA für ca. 30 s einem Plasma ausgesetzt. Hierzu wurde ein Gerät der Firma Emitech K100X (Quorum Technologies, Ontario, Kanada) verwendet. Durch diesen Vorgang werden sowohl Kontaminationen von der Oberfläche entfernt, als auch positive und negative Ladungen aufgebracht. Diese Eigenschaft macht den Kohlenstofffilm zu einer sehr reaktiven Oberfläche, was bei der Probenpräparation nicht außer Acht gelassen werden sollte (Harris, 1997).

3.2. Negativkontrastierung

Bei der Probenfixierung mittels Negativkontrastierung sind die Proteine in eine Schicht aus Schwermetallsalzen gebettet. Zu den am häufigsten eingesetzten Kontrastierlösungen zählen Uranylformat, Uranylacetat und Ammoniummolybdat.

In den Bereichen des Objektträgers, in dem die Proteine in der Schwermetallhülle vorliegen, werden die Elektronen des Mikroskops anders gestreut als durch das sie umgebende Kontrastmittel. Die Proteine sind als weiße Objekte vor einem dunklen Hintergrund sichtbar. So wird durch den Z-Kontrast der Schwermetalle aus dem Phasenkontrastobjekt (Zernike F., 1955) ein Amplitudenkontrastobjekt erzeugt. Für die Negativkontrastierung der Proben wurde in dieser Arbeit eine leicht abgewandelte Form der *single-droplet*-Methode angewendet. Hierzu wird 5 μL der Proteinlösung (ca. 0,1 mg/mL) auf eine hydrophobe Oberfläche (z. B. Parafilm) pipettiert, so dass ein möglichst großer Kontaktwinkel vorliegt. Der Tropfen wird anschließend mit dem hydrophilisierten, kontinuierlichen Kohlenstofffilm des Objektträgers aufgenommen. Um eine gute Adsorption von Proteinen an der Oberfläche zu gewährleisten, wurde die Probe nach einer Inkubationszeit von ca. 30 s mit einem Filterpapier abgenommen. Anschließend wurden 3 mal je 3 μL der

jeweiligen Schwermetalllösung auf die Kohlenstoffseite des Objektträgers pipettiert und nach wenigen Sekunden wieder abgenommen. Nach dem die Oberfläche des Objektträgers abgetrocknet war (ca. 10 min), konnte die Probe im EM untersucht werden. So wurden eine gleichmäßige Einbettung der Proteine in das Kontrastiermittel erreicht. In Abb. 6 sind die einzelnen Schritte dargestellt.

Diese Methode der Probenfixierung eignet sich für Fragestellungen, die keine hochaufgelösten Strukturen ($> 20 \text{ \AA}$ (Ohi et al., 2004)) verlangen, da die Feinstruktur durch die Einbettung verloren geht. In dieser Arbeit wurde die Negativkontrastierung hauptsächlich dazu eingesetzt um den Assemblierungszustand des BgAChBP zu überprüfen. Hier kommen auch die Vorteile der Methode zu tragen, da die Probe im Gegensatz zu den kryofixierten Proben über einen längeren Zeitraum bei Raumtemperatur stabil ist.

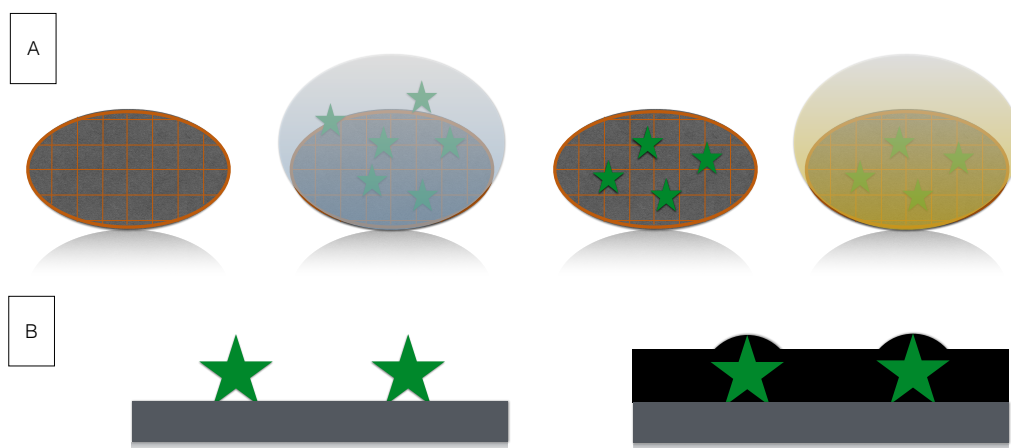


Abb. 6.: (A) Zunächst wird auf ein Kupfernetzobjektträger die Proteinprobe aufgebracht. Der überstehende Tropfen wird mit einem Filterpapier abgenommen. Anschließend wird eine Schwermetalllösung auf den Objektträger pipettiert und der Überstand abgenommen. (B) Die Proteine lagern sich an den Kohlenstofffilm des Objektträgers an und werden von den Schwermetallen in der Färbelösung umschlossen.

3.3. Kryo-Fixierung

Im Gegensatz zur Probenfixierung durch Schwermetalle (Negativkontrastierung) können mit kryofixierten Proben Strukturen mit hoher Auflösungen ($< 3 \text{ \AA}$ (Grant

and Grigorieff, 2015)) erreicht werden. Ein weiterer entscheidender Vorteil gegenüber der Negativkontrastierung oder der Kristallisation besteht darin, dass die Proteine in ihrem nativen Zustand fixiert werden können und keine Artefakte durch Schwermetalle oder Einflüsse des Kristallgitters eingetragen werden. Allerdings ist sowohl die Präparation bei dieser Methode als auch das Handling der fixierten Probe ungleich komplexer und zeitaufwendiger als bei der Negativkontrastierung. Hinzu kommt, dass Proteine einen ähnlichen Z-Kontrast wie ihre Umgebung aufweisen, was sie zu schwachen Phasenobjekten macht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen erscheinen hier sehr kontrastarm. Des Weiteren sind die Proteine empfindlicher gegenüber Strahlenschäden und können nur mit geringer Strahlendosis untersucht werden, was zu verrauschten Bildern führt.

Die Proteinprobe wird bei der Kryofixierung auf einen löchrigen Kohlenstofffilm (Abb. 7) des Objektträgers aufgetragen. Mit einem Filterpapier wird überflüssige Flüssigkeit vom Objektträger abgenommen (*Blotting*), so dass sich die Proteinprobe in den Löchern des Kohlefilms befindet (Abb. 8). Die wässrige Probe wird anschließend schockartig gefroren, so dass keine Kristallisationskeime entstehen und sich glasartiges Eis bildet. Hierzu kann die Probe z. B. in flüssiges Ethan oder Propan eingetaucht werden. Flüssiger Stickstoff eignet sich aufgrund des Leidenfrosteffektes (Murray and Ward, 1987) nicht zum Gefrieren der Probe, dient jedoch zur Lagerung des Objektträgers.

Alle in dieser Arbeit verwendeten kryofixierten Proben wurden mit einem Vitrobot (FEI, Niederlande) am MPI in Göttingen präpariert und dort in flüssigem Stickstoff gelagert.

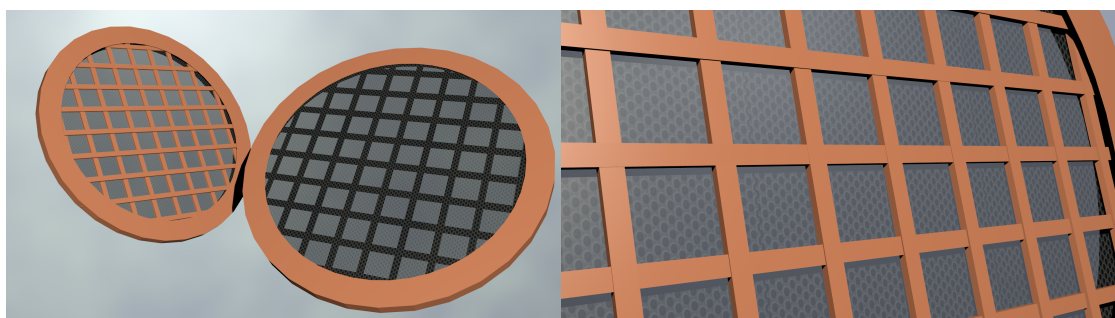


Abb. 7.: Objektträger für Kryo-Proben. Hier liegt ein löchriger Kohlenstofffilm auf dem Kupfernetz auf.

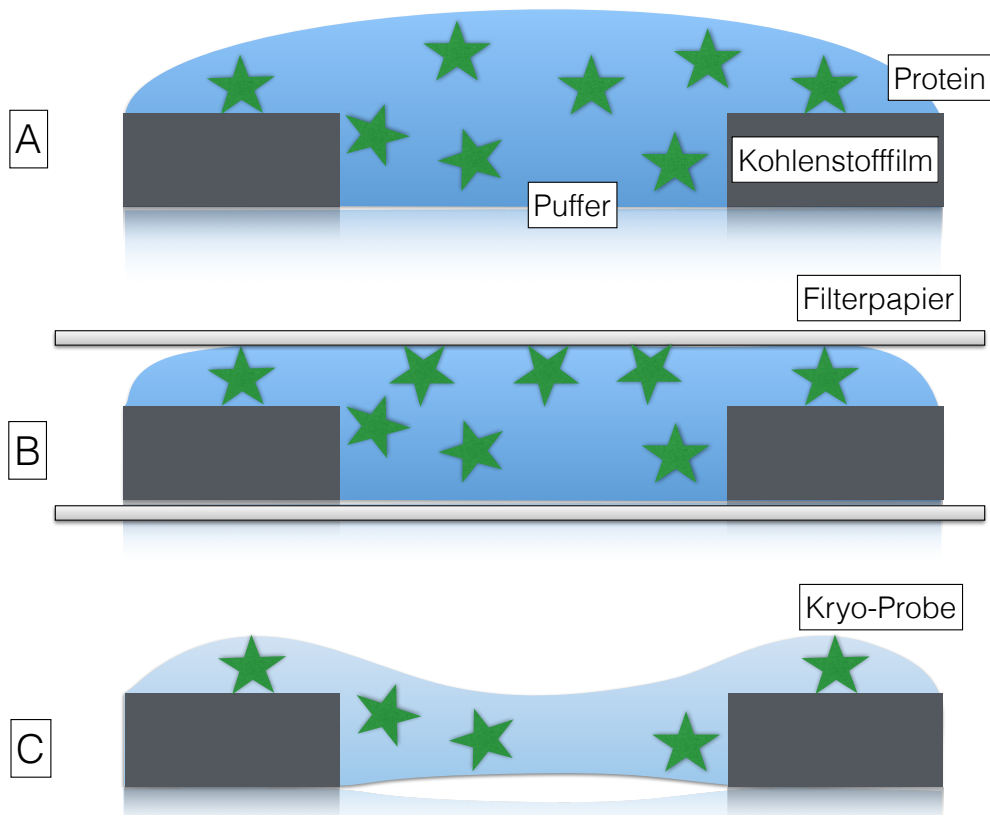


Abb. 8.: (A) Zunächst wird auf die Proteinprobe aufgebracht. (B) Überschüssige Probe wird mit einem Filterpapier vom Objektträger abgenommen. (C) Die Probe wird schockartig eingefroren.

3.4. Elektronenmikroskopie

Für diese Arbeit wurden verschiedenen Elektronenmikroskope verwendet. Die Kontrolle der Expression des *BgAChBP* bzw. deren Mutante wurde an einem Tecnai G2 12 BioTWIN (FEI, Eindhoven, Niederlande) durchgeführt. Dieses institutseigene Mikroskop ist mit einer LaB_6 -Kathode ausgestattet und wird mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV betrieben. Die Proben wurden zur Überprüfung bei Raumtemperatur negativ kontrastiert und mit der CCD-Kamera (TVIPS F416) dokumentiert.

Als Startmodell für die hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion wurde aus negativ kontrastiertem *BgAChBP1* eine gering aufgelöste Rekonstruktion berechnet. Der Datensatz, der hier zugrunde lag, wurde an einem Philips CM 200 (Koninklijke, Niederlande) am MPI in Göttingen von ■■■■ aufgenommen. Das

Mikroskop wurde dabei mit einer Beschleunigungsspannung von 160 kV betrieben. Der Kryo-Datensatz des BgAChBP1 wurde am MPI in Göttingen von [REDACTED] [REDACTED] an einem Titan Krios (FEI, Eindhoven, Niederlande) aufgenommen. Das Mikroskop war mit einer Falcon II (FEI, Eindhoven, Niederlande), einem *Direct Electron Detector* als auch einem C_s -Korrektor ausgestattet. Für die Bildakquise wurde ein Spannung von 300 kV angelegt.

3.5. Datenverwaltung mit Appion

Neuste Entwicklungen am Elektronenmikroskop erlauben eine immer weitergehende Automatisierung der Datenakquise. Hier ist besonders die Entwicklung des *direct-electron-detectors* zu nennen. Herkömmliche CCD-Kameras, die in der Elektronenmikroskopie zum Einsatz kommen, sind nicht sensitiv genug um in der hochauflösenden, *low-dose* Kryo-Elektronenmikroskopie zum Einsatz zu kommen (Ruskin et al., 2013). Für hochaufgelöste Strukturen wurde bisher photographischer Film verwendet, der zwar sensitiv genug ist, jedoch keine Automatisierung der Bildaufnahmen erlaubt. Der *direct-electron-detector* vereint die Vorteile der beiden genannten Methoden, da automatisierte Bildakquise mit hoher Sensitivität realisiert werden kann. Das hat zur Folge, dass große Datenmengen erzeugt werden, die verwaltet und bearbeitet werden müssen. Am Scripps Research Institut (Kalifornien, USA) wurde hierzu das Programm `Appion` entwickelt, welches eine Datenbank zur Archivierung und Verwaltung der Daten bereitstellt. Des Weiteren können verschiedene Schritte der 3D-Rekonstruktion über eine graphische Oberfläche ausgeführt werden (Lander et al., 2010).

Für diese Arbeit wurde `Appion` zur Archivierung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie zur CTF-Korrektur und Partikelselektion verwendet. Auf diese zwei Funktionen wird im Folgenden näher eingegangen.

3.6. CTF-Korrektur

Wie jedes optische System erzeugt auch das Elektronenmikroskop während der Datenakquise einen Bildfehler, der durch die Kontrast-Transfer-Funktion (CTF) beschrieben wird. Hierbei handelt es sich um die Faltung der Punktspreizfunktion (*point spread function*) (PSF) der Objektivlinsen auf die Bildfunktion. Die Auswirkung der Konvolution lassen sich im Fourier transformierten Bild als alternierende

helle und dunkle Ringe (Thon-Ringe, (Thon, 1966)) erkennen, die die Modulation der Funktion um die Nullstellen zeigt.

Die CTF verfälscht die korrekte Massenverteilung der Makromoleküle und limitiert die erreichbare Auflösung auf den ersten Nulldurchgang. Um eine korrekte, hochaufgelöste Rekonstruktion zu erhalten, muss darum der Datensatz CTF-korrigiert werden. Die CTF hängt unter anderem von den genauen Defokuswerten, der Größe der Elektronenquelle, der Energieverteilung der Elektronen und dem Amplitudenkontrast ab (Penczek et al., 1997). Die Funktion wird in den negativen Bereichen mit -1 multipliziert wobei im Bereich der Nullstellen Informationslücken existieren. Um diese Lücken mit Informationen zu füllen, sollten mikroskopische Bilder bei verschiedenen Defokuswerten aufgenommen werden.

Die Korrektur der elektronenmikroskopischen Bilder wurde in `Appion` durchgeführt. Um die CTF für die einzelnen Bilder des Datensatzes zu bestimmen ist das implementierte Programm `ctffind3` (Mindell and Grigorieff, 2003) verwendet worden. Die benötigten Werte wurden hierzu aus der integrierten Datenbank abgerufen. Lediglich der Defokuswert wurde über das Modul `ctffind3` bestimmt. Hierzu wurde manuell die Lage der Thon-Ringe im mikroskopischen Bild mit der Lage der simulierten Funktion abgeglichen und die zugehörigen Werte in der Datenbank hinterlegt.

3.7. Qualitätskontrolle

Es wurden vor Erstellung der Rekonstruktion elektronenmikroskopische Aufnahmen von minderer Qualität aussortiert. Die Kriterien hierfür werden beispielhaft in Abb. 9 gezeigt, wobei die Abb. 9a eine optimale Aufnahme zeigt. Zu den aussortierten Aufnahmen zählten alle Bilder, die eine Bewegungsunschärfe (*Drift*) aufwiesen (siehe Abb. 9c) oder keine Informationen unterhalb von 7 Å beinhalteten (siehe Abb. 9b). Des Weiteren wurden alle Aufnahmen verworfen, bei denen die ermittelte CTF keine Übereinstimmung mit der transformierten Aufnahme zeigten (siehe Abb. 9d).

3.8. Partikelselektion und Erstellen des Bildstapels

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die nach der Qualitätskontrolle (Abschnitt 3.7) im Datensatz verblieben, sind zahlreiche Proteine in verschiede-

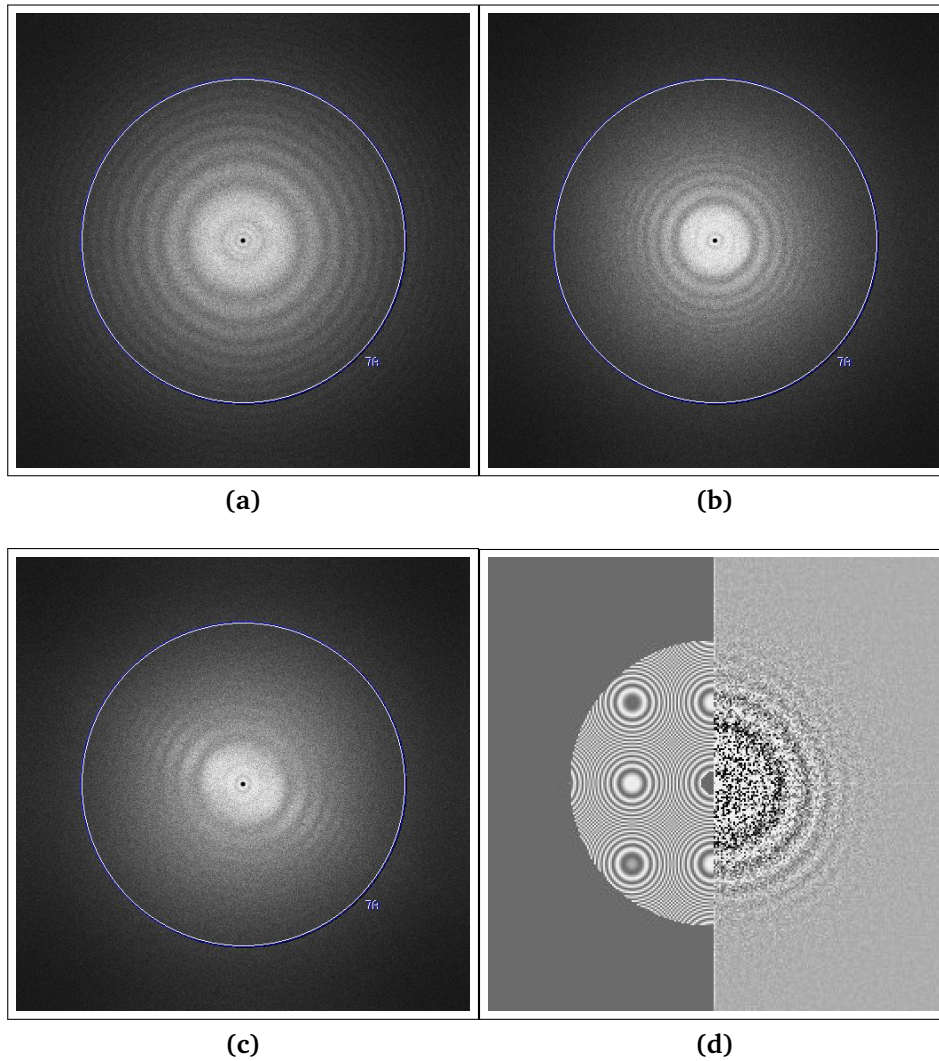


Abb. 9.: Fourier transformierte elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Qualität. (a) Aufnahme, die allen Qualitätsansprüchen genügt; (b) Aufnahme, die keine Informationen besser als 7 Å beinhaltet; (c) Bild mit Bewegungsunschärfe; (d) Misslungene CTF-Bestimmung.

nen Ansichten abgebildet. Für die Berechnung der 3D-Struktur müssen die einzelnen Partikel selektiert und als Einzelpartikel abgespeichert werden. Die Selektion der Partikel kann entweder manuell oder automatisch erfolgen. In dieser Arbeit kamen beide Methoden zum Einsatz und wurden in `Appion` durchgeführt. Der Datensatz des *BgAChBP1* in BisTris Puffer wurde automatisch selektiert, wohingegen die Partikel des Datensatzes mit Nikotin manuell ausgewählt wurden. Die selektierten Partikel werden in beiden Fällen mit einer quadratischen Box virtuell ausgeschnitten, wobei die Box mindestens den 1,5- bis 2-fachen Durchmesser des Proteins aufweisen sollte (Downing and Glaeser, 2008). Aus den selektierten Partikeln kann nun ein Bildstapel für die 3D-Rekonstruktion erstellt werden. Um die Einzelpartikelbilder untereinander vergleichen zu können, müssen diese auf ihre Grauwertverteilung normiert werden. Hierbei werde die Maxima zur Deckung gebracht und die Halbwertsbreite (*Full width at half maximum, (FWHM)*) angeglichen.

3.9. Zentrieren der Einzelpartikel

Zu Beginn der Berechnung einer 3D-Rekonstruktion sind keine Referenzen vorhanden, an denen die Einzelpartikel ausgerichtet werden können. Aus diesem Grund werden alle Einzelbilder des Datensatzes aufaddiert und anhand ihres Massenschwerpunkts in ihrer Box zentriert. Dieser Prozess kann iterativ durchgeführt werden.

3.10. Klassifizierung

Die Einzelbilder, die sich im Einzelpartikelstapel befinden, sind durch die Bedingungen während der Bildakquise stark verrauscht. Zum einen zeigen, wie schon beschrieben biologische Proben einen geringen Amplitudenkontrast, zum anderen kann bei biologischen Proben nur mit einer geringen Elektronendosis gearbeitet werden um die Proteine nicht zu beschädigen. Hier sollten Dosen von $20 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ nicht überschritten werden (Dubochet et al., 1988), was zu einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) führt. Dieses muss für die anstehende 3D-Rekonstruktion verbessert werden. Hierzu werden Einzelbilder, mit der gleichen Bildinformation in einer Klasse zusammengefasst. Es addiert sich die immer gleiche Bildinformation auf, wohingegen sich das statistisch verteilte Rauschen mittelt (Abb. 10). Bei

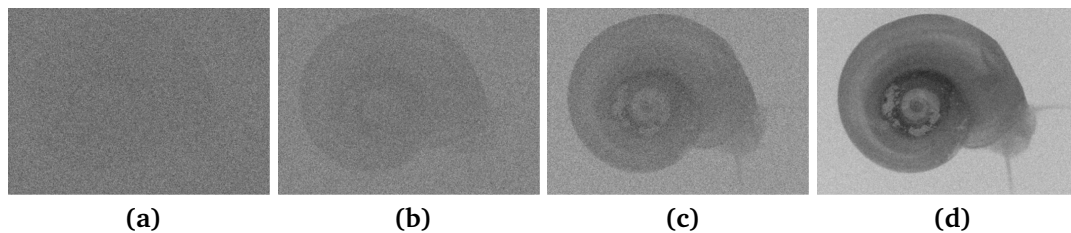


Abb. 10.: Prinzip der Klassensummen. Durch Aufaddieren der gleichen Bildinformationen kann ein Bild aus verrauschten Aufnahmen. Mit steigender Anzahl addierter Bilder wird die Information immer deutlicher: (a) Einzelnes Bild; (b) 10 Bilder wurden aufaddiert; (c) 100 Bilder wurden aufaddiert; (d) 1200 Bilder wurden aufaddiert.

Proteinen werden in einer Klasse idealerweise die gleichen Orientierungen des Proteins mit der gleichen Konformation in einer Klasse zusammengefasst.

Ist die 3D-Struktur für das Protein noch unbekannt und dementsprechend noch keine Referenzen vorhanden, wird die Klassifizierung zunächst ohne Referenzen (*reference free alignment*) durchgeführt. Hier kommen die Methoden der Multivariaten Statistischen Analyse (MSA) zum Einsatz. Jedes Bild besteht aus einer Anzahl an n Pixeln, die mit ihren Helligkeitswerten in einem n -dimensionalen Koordinatensystem (MSA-Hyperraum) dargestellt werden können (Abb. 11). Ein Maß für die Ähnlichkeit der Bilder ist der Abstand zwischen den einzelnen Datenpunkten im Koordinatensystem. Die Bilder werden nun so in Klassen zusammengefasst, dass der Unterschied innerhalb einer Klasse minimiert wird und der Unterschied zwischen den Klassen maximal ist.

3.11. Ausrichtung der Einzelpartikel

Um durch Klassifizierung der Einzelbilder das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) verbessern zu können, müssen die verschiedenen Ansichten der Proteine gleich ausgerichtet vorliegen. Hierzu können Klassensummen bzw. Rückprojektionen (vgl. Abschnitt 3.12) als Referenzen herangezogen werden. Die Einzelbilder werden rotational und translational gegen alle Referenzen ausgerichtet bis eine maximale Korrelation gefunden wird. Auf diese Weise werden alle Einzelbilder jeweils einer Referenz zugeordnet und zu einer Klassensumme aufaddiert (Abb. 12).

Für die translationale Ausrichtung der Einzelbilder werden die Aufnahmen und die Referenzen im Fourierraum komplex multipliziert (Saxton and Frank, 1977).

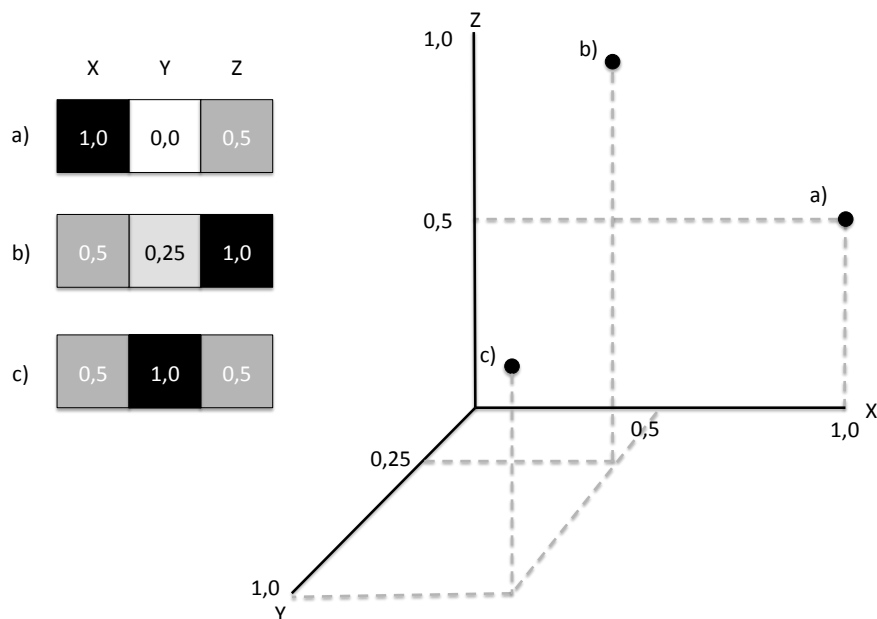


Abb. 11.: Prinzip der multivariate statistischen Analyse (MSA). Jedes Bild mit n Pixeln lässt sich als Punkt in einem n -dimensionalen Koordinatensystem darstellen. Die Bilder a,b und c, mit jeweils drei Pixeln, lassen sich aufgrund der Grauwertverteilung an den Achsen X,Y und Z darstellen.

Bei der Multiplikation zweier Bilder mit gleichem Informationsgehalt wird die Autokorrelation (*auto correlation function*, ACF) erhalten (Schatz, 1992). Im Realbildraum ergibt hier eine Helligkeitsmaximum im Mittelpunkt des Bildes. Andernfalls, wenn die Bilder verschiedene Informationen enthalten, ergibt sich die Kreuzkorrelationsfunktion (*cross correlation function*, CCF). Ist die gleiche Information jedoch um einen Vektor gegen die Referenz verschoben, wird eine CCF erhalten, die um eben jenen Vektor verschoben ist. Die translationale Verschiebung kann anschließend um diesen Vektor korrigiert werden.

Die rotationale Verschiebung kann auf ähnliche Weise über die Drehkorrelationsfunktion (*rotational correlation function*, RCF) korrigiert werden. Hierzu werden die Bilder vor der Fouriertransformation und der komplexen Multiplikation zunächst in ein Kreiskoordinatensystem umgewandelt. Das Helligkeitsmaximum, welches durch die Multiplikation erhalten wird, gibt den Verschiebungswinkel bezüglich der Referenz an (Schatz, 1992).

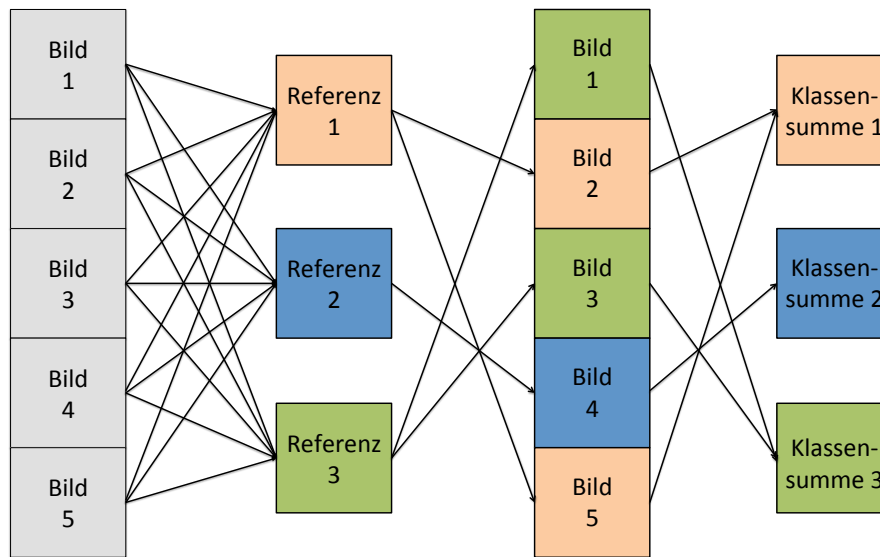


Abb. 12.: Prinzip der Multi-Referenz-Alignment (MRA). Die Einzelbilder werden an allen Referenzen ausgerichtet und der Referenz mit der höchsten Korrelation zugeordnet. Alle Bilder, die zur gleichen Referenz gehören, werden anschließend zu einer Klassensumme aufsummiert.

3.12. Rückprojektionen und Symmetrie

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, sind für die Ausrichtung der Einzelbilder Referenzen von Nöten. Diese Referenzen können u.a. aus Rückprojektionen bestehen, welche aus bereits bestehenden 3D-Rekonstruktionen gewonnen werden. Hierzu werden aus verschiedenen Winkeln Projektionen der Rekonstruktion erstellt um verschiedene Ansichten der Struktur zu erhalten. Die Winkelschritte können hier variiert werden. Je kleiner der Abstand zwischen den Winkeln gewählt wird, desto mehr Projektionen werden vom Partikel erhalten. So kann die Auflösung auf Kosten der Rechenzeit verbessert werden. Die Einzelbilder können nun wie in Abschnitt 3.11 beschrieben an diesen Referenzen ausgerichtet werden. Dieses bietet den Vorteil, dass den Referenzen bereits Raumwinkel zugeordnet sind, welche auf die zugeordneten Einzelbilder übertragen werden.

Um eine realistische Rekonstruktion zu erzeugen, ist es notwendig, dass die Rückprojektionen verschiedene Ansichten des Partikels abbilden. Bei symmetrischen Partikeln kann sich die Symmetrie zu Nutze gemacht werden um die Anzahl der Rückprojektionen zu verringern und gleichzeitig die Zahl der Einzelpartikel künstlich zu erhöhen. Wie bereits in Saur et al. (2012) beschrieben, handelt es sich bei dem BgAChBP um ein Protein mit ikosaedrischen Symmetrie (Abb. 13). Diese

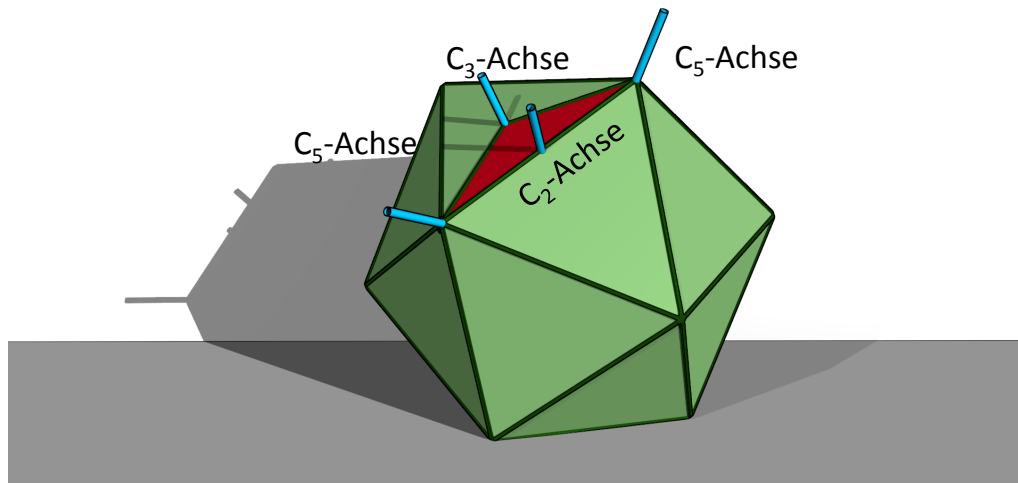


Abb. 13.: Symmetrie des Icosaeders nach Thuman-Commike and Chiu (2000). In blau sind Beispiele für die verschiedenen Symmetrieachsen abgebildet. Zwischen den sechs C₅-Symmetrieachsen spannen sich 20 identische Flächen auf. Jede dieser Flächen lässt sich in drei asymmetrische Einheiten (rot) unterteilen. So lassen sich alle Ansichten des Partikels in dieser Einheit wiederfinden, welche insgesamt 60 Mal vorhanden ist.

Symmetrie zeichnet sich durch sechs C₅-Symmetrieachsen, zehn C₃-Symmetrieachsen und 15 C₂-Symmetrieachsen aus. So ergeben sich 20 Flächen, die wiederum in je drei asymmetrische Einheiten unterteilt werden können. Durch diese hohe Symmetrie kann jede Ansicht 60 Mal in jedem Icosaeder wiedergefunden werden. Der Bereich aus dem die Projektionen gewonnen werden beschränkt sich auf eine solche asymmetrische Einheit was die Anzahl der Referenzen reduziert und die Rechenzeit deutlich herabsetzt. Des Weiteren wird die Größe der Datensatzes so künstlich auf das sechzigfache der tatsächlich selektierten Einzelpartikel erhöht.

3.13. Iterative Verbesserung der Rekonstruktion

Alle vorher genannten Methoden dienen der Verbesserung der 3D-Rekonstruktion und werden iterativ eingesetzt (Abb. 14). Hierbei wird von einem schlecht aufgelöstem Startmodell ausgegangen, welches zum Erstellen der ersten Rückprojektionen (Abschnitt 3.12) dient. Diese Projektionen dienen als Grundlage für die Ausrichtung der Einzelbilder des Bildstapels (Abschnitt 3.11) und ordnen diesen die Raumkoordinaten der Referenz mit der größten Korrelation zu. Die Einzelpar-

tikel mit den zugeordneten Koordinaten werden in den 3D-Raum projiziert und so ein neues Modell berechnet, welches aufgrund der besseren Ausrichtung eine höhere Auflösung aufweist. Die nächste Generation an Referenzen, die aus der höher aufgelösten Rekonstruktion gewonnen werden, zeigen mehr Details und erlauben so eine noch präzisere Ausrichtung der Einzelpartikel, was wiederum zu einer noch höheren Auflösung des folgenden Modells führt. Auf diese Weise kann iterativ die Rekonstruktion verbessert werden, bis die maximale Auflösung des Datensatzes erreicht wird.

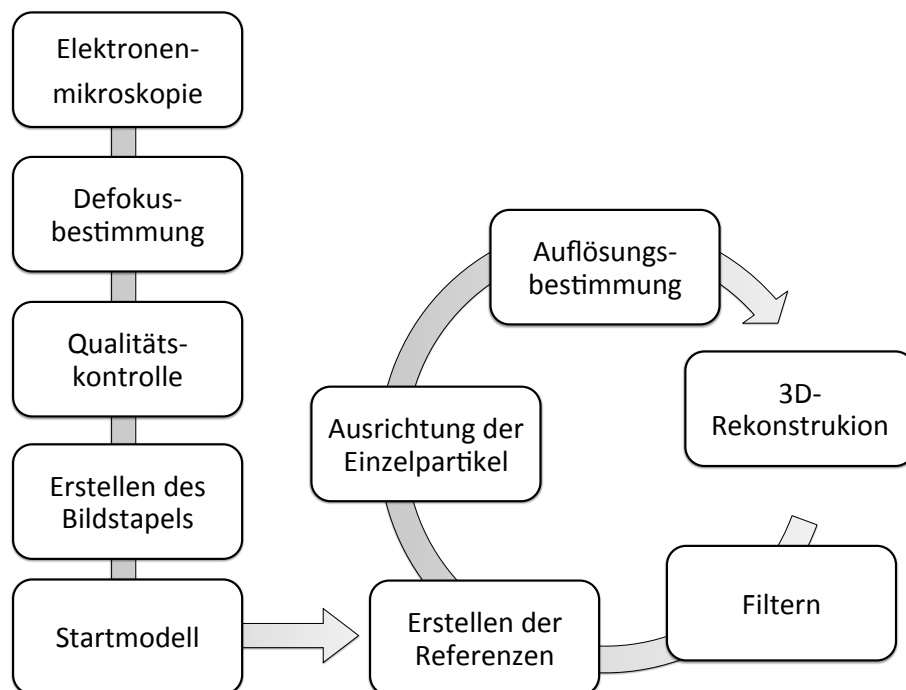


Abb. 14.: Arbeitsschritte der 3D-Elektronenmikroskopie.

3.14. Auflösungsbestimmung

Um die Auflösung der Rekonstruktion zu bestimmen, zur Beurteilung des Rekonstruktionsfortschritts als auch zur Beschreibung des endgültigen Modells, wird die Korrelation verschiedener Raumfrequenzen berechnet. Hierzu wird der Datensatz zufällig in zwei Hälften geteilt und aus jedem Teil eine eigene Rekonstruktion berechnet. Im Fourierraum wird der Kreuzkorrelationskoeffizient zwischen den Schalen der beiden Rekonstruktionen berechnet (van Heel and Schatz, 2005). Im Fourierraum beschreiben die Schalen Raum-Frequenzen und stehen

daher für verschiedene Auflösungsbereiche. Zur Auswertung werden die Fourier-Schalen-Korrelationen (FSC) in einem Graphen gegen die Auflösung der entsprechenden Schale aufgetragen und der Wert bei $y = 0,5$ bzw. $y = 0,143$ abgelesen. Der Schwellenwert von 0,5 ist ein restriktives Kriterium, welches unabhängig von der Art der Berechnung der Rekonstruktion ist (Rosenthal and Henderson, 2003). Wurde während der Berechnung ein *overfitting* verhindert, ist das 0,143 Kriterium ein gutes Maß für die Auflösung der Rekonstruktion (Scheres and Chen, 2012)

3.15. Erstellen des Startmodells mit Sparx

Wie beschrieben wird für die iterative Verbesserung ein Startmodell benötigt von dem aus die Projektionen für den ersten Verbesserungszyklus gewonnen werden. Als Startmodell für die Kryo-Aufnahmen wurde eine 3D-Rekonstruktion aus einem negativ kontrastierter Datensatz des BgAChBP1 in BisTris-Puffer angefertigt. Die Verfeinerung der 3D-Rekonstruktion wurde mit dem Modul `sxali3d.py` aus dem Programmpaket Sparx (Hohn et al., 2007) ausgeführt. Nach jeder Iteration wurde automatisch die *Userfunction* aufgerufen, die vom jeweiligen Benutzer individuell programmiert werden kann. Diese Funktion, die Sparx zu Verfügung stellt, hat den Vorteil, dass für jedes Projekt ein an das Problem angepasstes Skript erstellt werden kann. Die Skriptsprache ist für die *Userfunction* ist Python. In dieser Arbeit wurde die *Userfunction* dazu verwendet, die 3D-Rekonstruktion vor dem Erstellen der Rückprojektion auf die berechnete Auflösung zu filtern (`ref_ali3d`) um so ein *Overfitting* zu verhindern.

3.16. 3D-Rekonstruktion mit FREALIGN

Zur iterativen Verbesserung der Kryo-3D-Rekonstruktionen wurde in dieser Arbeit hauptsächlich die frei erhältliche Software FREALIGN (Grigorieff, 2007) verwendet. Das Programm konzentriert sich ausschließlich auf die Verbesserung von bereits bestehenden Startmodellen. In dieser Arbeit wurde die 3D-Rekonstruktion des negativ kontrastierten Datensatzes (Abschnitt 3.15) als Startrekonstruktion verwendet. Die hier verwendeten Version FREALIGN_v9.08 wird über ein Skript bedient, welches vom Anwender auf das jeweilige Problem angepasst werden kann. FREALIGN wurde in dieser Arbeit als Software für das Refinement der 3D-Rekonstruktion benutzt.

Aufgrund des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist es für das menschliche Auge oftmals unmöglich zwischen einem fehlerhaften und einem intakten Proteinmolekül auf den Aufnahmen zu unterscheiden. Des Weiteren können z. B. Kontamination im Eis fälschlicherweise als Protein selektiert worden sein. Diese Faktoren begrenzen bei der 3D-Rekonstruktion die Auflösung. Des Weiteren können Proteine in ein und demselben Datensatz in unterschiedlichen Konformationen vorliegen, wie z. B. in verschiedenen Konformationen (Moeller et al., 2015; Gao et al., 2004). Darum empfiehlt es sich vor dem eigentlichen Refinement den Datensatz zu reinigen.

Der Aufreinigungsschritt wurde in dieser Arbeit mit `FREALIGN` ausgeführt. Wie schon in Abschnitt 3.11 beschrieben, werden beim Refinement die Orientierung der Einzelpartikel anhand der Projektionen der Rekonstruktion bestimmt. Wie gut dabei der Partikel mit der Referenz übereinstimmt, wird über den *phase residual*-Wert ausgedrückt, welche `FREALIGN`, neben anderen Parametern, nach jeder Iteration in einer Datei ausgibt. Das Skript `parfile.py` von Herrn [REDACTED] berechnet die Normalverteilung dieser Werte und erlaubt die Ausgabe einer Liste mit Bildnummern, deren *phase residual*-Wert weiter als $n\sigma$ vom Mittelwert abweicht. Diese Bilder können anschließend aus dem Datensatz exkludiert werden. Das $n\sigma$ kann hierbei vom Benutzer frei gewählt werden. Für die Rekonstruktion des BgAChBP1 in BisTris-Puffer wurden Werte zwischen $n = 1$ bis $n = 3$ gewählt.

3.17. Flexibles Fitten mit Coot

Um die 3D-Struktur eines Proteins umfassend interpretieren zu können, ist die Lage der Aminosäuren entscheidend. In den meisten Fällen ist die Auflösung der mittels 3D-EM berechneten Struktur nicht hoch genug um die Lage der Aminosäuren und deren Seitenketten *de novo* zu bestimmen. Die Entwicklung der letzten Jahre hat jedoch zu immer mehr Strukturen geführt, deren atomarer Aufbau so bestimmt werden konnte (Ludtke et al., 2008). Gibt die erreichte Auflösung ein *de novo* Modellieren nicht her, aber lassen sich jedoch Details, wie die Seitenketten der größeren Aminosäuren erkennen, ist es möglich ein Homologiemodell als Grundlage zu nehmen und dieses flexibel in die 3D-Rekonstruktion einzupassen. In dieser Arbeit wurde für das flexible Einpassen der Aminosäuren das Programm `Coot` (Emsley et al., 2010) verwendet. Diese Software besitzt eine grafische Oberfläche, in dem sämtliche Arbeitsschritte ausgeführt wurden. Für das Einpassen

des Homologiemodells in die Dichtekarte wurden verschiedene Module aus dem Reiter „Model/Fit/Refine“ verwendet. Insbesondere wurde hier das *real-space refine*-Modul eingesetzt, welches das atomare Modell im Rahmen der erlaubten Geometrie an der Dichtekarte ausrichtet. Dabei wurden als Qualitätskontrolle verschiedene Module zur Validierung der Software herangezogen. Es wurde darauf geachtet möglichst viele Fehler im Ramachandran Plot, in der Geometrie und bei den Rotameren zu eliminieren. Diese Module besitzen alle eine graphische Oberfläche mit einem Farbcode. Der Fehler für jede einzelne Aminosäure wird in Rot angezeigt und sollte während des Refinements in den fehlerfreien, grünen Bereich verschoben werden.

4. Ligandenbindung

Die Ligandenbindung spielt eine entscheidende Rolle in allen Bereichen der Biologie. Ohne die spezifische Bindung von Substraten oder Co-Faktoren an biologische Makromoleküle wäre kein Leben möglich. Diese Reaktionen zu verstehen und zu beschreiben steht seit jeher im Interesse von Biologen und Chemikern. Reale Daten zu Bindungsaffinitäten, Bindungskonstanten und weiteren Parametern können über verschiedenste Messverfahren gewonnen werden. Über Fluoreszenzmessungen können z. B. die Bindungskonstante und die Stöchiometrie (Thordarson, 2011) ermittelt werden. Dank der enormen Entwicklung von Rechenleistung und Speicherkapazitäten rücken auch bioinformatische Betrachtungen immer mehr in den Fokus. Aufgrund der heutigen Möglichkeiten können chemische Reaktionen *in silico* simuliert werden. Diese Simulationen erweitern das Verständnis über Biomoleküle und können herangezogen werden um Voraussagen über das zu untersuchende System zu machen. Je nach Fragestellung können hier verschiedene Ansätze mit spezifischen Algorithmen herangezogen werden.

4.1. Trp-Fluoreszenz

Unter den Biopolymeren besitzen Proteine eine einzigartige intrinsische Fluoreszenz. Die drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind die verantwortlichen Fluorophore. Wobei Tryptophan (Trp,W) hier das stärkste Signal emittiert (Lakowicz, 2006a). Das Absorptions- bzw. Emissionsspektrum dieser Aminosäure wird in Abbildung 15 gezeigt. Der Wellenlängenbereich, in dem

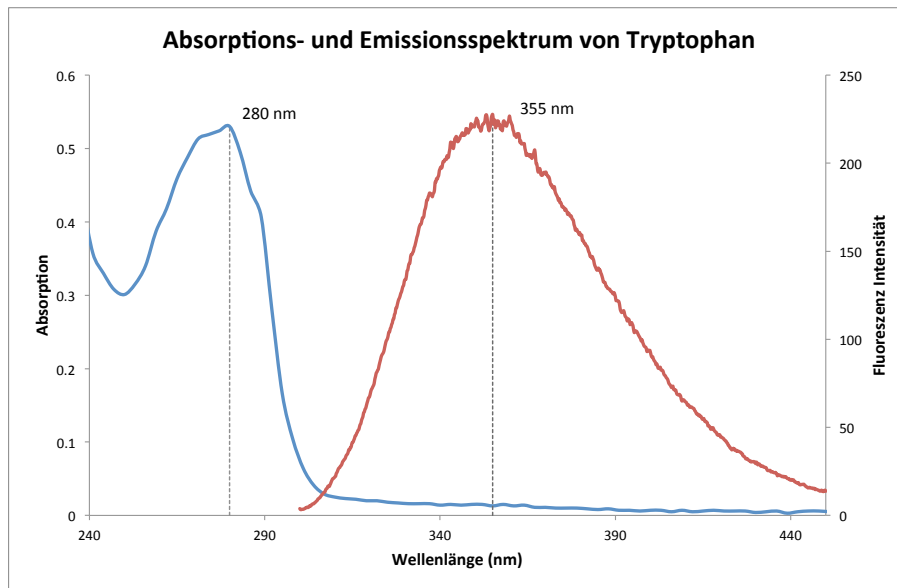


Abb. 15.: Absorptions- und Emissionsspektrum von Tryptophan in H_2O . Das Absorptionsspektrum (blau) zeigt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Maximum des Fluoreszenzspektrum (rot) liegt hier bei 355 nm.

eine Fluoreszenz emittiert wird, erstreckt sich von ca. 308 nm bis ca. 355 nm. In zahlreichen Publikationen wurden durch diese intrinsische Fluoreszenz Proteine charakterisiert. Es werden dort z. B die Änderung der Fluoreszenzintensität, der Lage der Maxima oder die Form der Kurve untersucht (Vivian and Callis, 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften ist es möglich Konformationsänderungen, Assemblierungen oder Ligandenbindung spektroskopisch zu untersuchen. Hier kann sich zu Nutze gemacht werden, dass die Fluoreszenz des Tryptophans stark von der lokalen Umgebung beeinflusst wird. Die Bindung eines Liganden kann die chemische Umgebung des Tryptophans verändern und so zu einer Änderung der Intensität der Fluoreszenz führen (Vivian and Callis, 2001). Des Weiteren ändert sich auch die emittierte Wellenlänge je nach Polarität der Umgebung. So wird ein bathochromer Effekt beobachtet, wenn das Indol-Ringsystem in polarerer Umgebung vorliegt, da der angeregte Zustand stabilisiert werden kann (Lakowicz, 2006b). Ist die Umgebung zunehmend apolar kann hingegen eine hypsochrome Verschiebung gemessen werden. Diese Effekte sind auch bei einer Bindung von Liganden gezeigt worden (Vivian and Callis, 2001). Hier spielt die räumliche Ausrichtung einer Ladung zum Indol des Tryptophans eine Rolle. Befindet sich eine positive Ladung in der Nähe zu dem Benzolring bzw. eine negative Ladung in der Nähe des Pyrrols,

wird der angeregte Zustand stabilisiert, was zu einer Verschiebung der Fluoreszenz hin zu längeren Wellenlängen zur Folge hat (Vivian and Callis, 2001).

So kann zur Untersuchung der Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes, die Änderung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration gemessen werden.

Bevor die Trp-Fluoreszenz jedoch zur Bestimmung der Ligandenbindung eingesetzt werden kann, müssen Effekte ausgeschlossen werden, die einen Einfluss auf die gemessenen Fluoreszenz haben, ohne jedoch von einer Interaktion mit dem Protein zu stammen. Hier ist besonders der *inner-filter*-Effekt zu nennen (van de Weert, 2010). Dieser Effekt tritt auf, wenn eine Komponente des Systems (in diesem Fall der Ligand) eine Absorption bei der Anregungswellenlänge oder der emittierten Wellenlänge des Proteins aufweist. So wird eine Absenkung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration gemessen, die jedoch nicht auf eine tatsächliche Wechselwirkung mit dem Protein zurück zu führen ist. Um sicherzugehen, dass die gemessene Änderung des Fluoreszenzsignals durch eine Interaktion des Liganden mit dem Protein induziert wird, wurden die Liganden Acetylcholin und Nikotin zunächst gegen Tryptophan titriert. Alle hier gemessenen Signaländerungen können auf oben genannte Effekte zurückgeführt werden, da keine Wechselwirkung zwischen Nikotin bzw. Acetylcholin und Tryptophan anzunehmen ist.

Die Fluoreszenzmessungen wurden am Institut für Biophysik (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] unter Mithilfe von Prof. Dr. Nadja Hellmann durchgeführt. Hierzu wurde das Gerät F-4500 Fluorescence Spectrophotometer der Firma Hitachi High-Technologies Corporation (Tokio, Japan) verwendet.

Es wurde eine 10 $\mu\text{mol/l}$ Tryptophan-Lösung vorgelegt und mit dem entsprechenden Liganden titriert. Zu Beginn und nach den einzelnen Titrationschritten wurde die Fluoreszenz für 60 s bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Angeregt wurde die Probe dabei bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Messwerte der Intensität für jede Messung wurden gemittelt um den Verdünnungsfaktor, der durch die Titration des Liganden entstanden ist, korrigiert.

$$Intensität_{(korrigiert)} = \frac{Intensität_{(gemessen)}}{Verdünnungsfaktor} \quad (3)$$

Für eine Vergleichbarkeit zwischen den Messungen wurden die Mittelwerte nach folgender Formel normiert.

$$Intensität_{(norm)} = \frac{f}{f_0} \quad (4)$$

Wobei f der Intensität des Messwertes entspricht und f_0 der Intensität der reinen Proteinprobe. Ist hier keine Signaländerung detektierbar, kann eine Änderung der Signalintensität bei der Titration des Proteins auf eine Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand zurückgeführt werden.

Für die Messung der Bindungseigenschaften wurden 100 μ /l Protein vorgelegt. Gemessen wurden hier BgAChBP1, BgAChBP1-F92Y und BgAChBP2-C71F. Die Konzentration der Proteinlösung lag dabei um die 3 μ mol/l und wurde mit dem Nanodrop ND-1000 (Erlangen) vor jeder Messung genau bestimmt. Zu der Lösung wurden anschließend die Liganden titriert und nach jedem Schritt ein *time scan* durchgeführt. Hierzu wurde die Extinktion bei der konstanten Wellenlänge von 340 nm für 60 s gemessen. Die Anregungswellenlänge lag bei 280 nm. Eine solche Messung ist exemplarisch in 16 abgebildet. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der Intensität gegen die jeweilige Liganden Konzentration aufgetragen. Des Weiteren wurden Spektren der Titrationsschritte aufgenommen um eine Verschiebung der Kurvenmaxima zu untersuchen. Dabei wurde die Intensität der Extinktion zwischen 300 nm - 450 nm gemessen (Abb. 17). Auf diese Weise wurden folgende Liganden gemessen: Nikotin, BisTris, GABA, Glycin.

Um verschiedene Messungen vergleichen zu können, mussten die Mittelwerte normiert werden. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$Intensität_{(norm)} = \frac{f-f_{max}}{f_0-f_{max}} \quad (5)$$

Um die Dissoziationskonstante und die Stöchiometrie zu berechnen, wird durch die Messpunkte eine Ausgleichskurve (Gleichung (6)) gelegt.

$$f(x) = f_{max} - df \cdot \frac{\frac{(n \cdot P_0 + L_0 + K_D)}{2} - \sqrt{\frac{(n \cdot P_0 + L_0 + K_D)^2}{4} - n \cdot P_0 \cdot L_0}}{P_0} \quad (6)$$

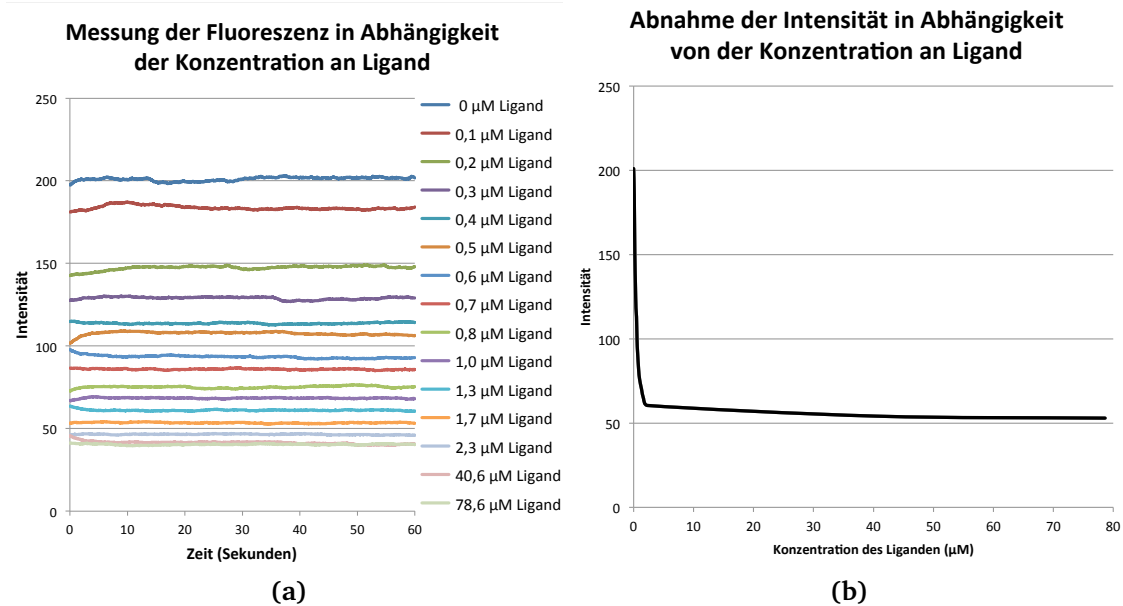


Abb. 16.: Beispiel für einen Time Scan. (a) Messung des Fluoreszenzsignals über einen Zeitraum von 60 s. Die Intensität der Fluoreszenz ist abhängig von der zuge-setzten Ligandenkonzentration; (b) Auftragung der Mittelwerte des Fluoreszenz-signals gegen die Konzentration des Liganden. Die Intensität des Signals sinkt, bis eine Sättigung erreicht ist.

So ist es möglich aus der gemessenen Fluoreszenz (f), die Abhängig ist von der Konzentration des Liganden (L_0), die Dissoziationskonstante (K_D) und die Stöchiometrie (n) zu berechnen. Des Weiteren gehen die Konzentration des Proteins (P_0), die maximale Fluoreszenz (f_{max}) und die Amplitude (df) ein.

Der Ligand Acetylcholin wurde indirekt bestimmt. Hierzu wurde die Proteinlösung zunächst mit $5 \mu/l$ Nikotin versetzt. Anschließend wird mit Acetylcholin titriert und die Intensität bei Wellenlängen zwischen 300 nm 450 nm gemessen. Die Anregungswellen lag auch hier bei 280 nm. Die Regressionskurve wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$f(x) = f_{max} - df \cdot (0,5 \cdot n \cdot P_0 + L_0^I + k) - \sqrt{0,25 \cdot (n \cdot P_0 + L_0^I + k)^2 - n \cdot P_0 \cdot L_0^I} \quad (7)$$

wobei für k gilt:

$$k = K_D^I \cdot \left(1 + \frac{L_0^{II}}{K_D^{II}}\right) \quad (8)$$

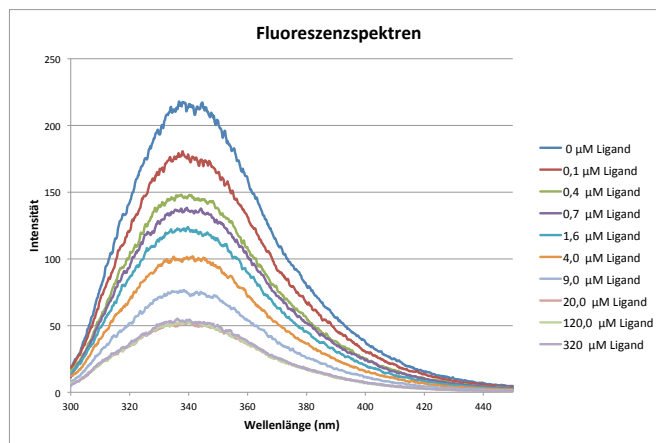


Abb. 17.: Das intrinsische Fluoreszenzsignal des Proteins ändert sich in Abhängigkeit des zugegebenen Liganden, bis es in einen Sättigungsbereich läuft.

L^I und K_D^I stehen hier für die Konzentration und die Dissoziationskonstante des Nikotins, der hier als erster Ligand zum Protein (P_0) gegeben wird. Der zweite Ligand, in diesem Fall das Acetylcholin, ist mit L^{II} für die Konzentration und K_D^{II} für die gesuchte Dissoziationskonstante notiert.

4.2. Protein-Ligand-Docking

Das Protein-Ligand-Docking ist eine *in silico*-Methode, um die Position eines Liganden in einer Bindungstasche eines Proteins zu simulieren. Üblicherweise ist die Struktur des Rezeptormoleküls (Protein) bekannt. In dieser Arbeit diente das flexibel eingepasste Homologiemodell (Kapitel 3.17) als Protein. Die Struktur wurde anhand der 3D Dichtekarte modelliert, dessen Auflösung keine Informationen über den Protonierungszustand der titrierbaren Aminosäuren geben kann. Das Programm „H++“³ ist ein freier open-source Webserver, der automatisch den Protonierungszustand des Systems aufgrund des angegebenen pH-Werts berechnet und die fehlenden Protonen in der Strukturdatei ergänzt (Anandkrishnan et al., 2012; Gordon et al., 2005). Als pH-Wert wurde hier 7,5 angegeben, entsprechend

³<http://biophysics.cs.vt.edu/>

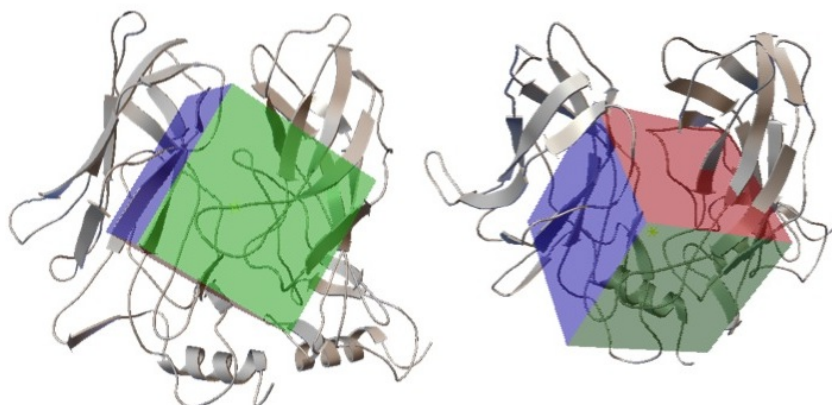


Abb. 18.: Lage der Box innerhalb des Dimers. Die Box wurde ins Zentrum der Bindungstasche gelegt. Innerhalb dieses Bereiches wurde das Docking ausgeführt.

des pH-Werts der Probe für die Trp-Fluoreszenzmessungen. Als Liganden wurden Nikotin, Acetylcholin, BisTris und GABA simuliert. Diese Moleküle wurde *in vitro* mittels Trp-Fluoreszenz gemessen. Die Koordinatendateien der Moleküle wurden aus der Webdatenbank „ZINC“⁴ geladen. Die fehlenden Wasserstoffe wurden den Liganden mit dem Modul „Add Hydrogens“ der Software Chimera hinzugefügt. Das Protein-Ligand-Docking wurde anschließend mit den zwei Softwarepaketen Autodock4 (Morris and Huey, 2009) und Autodock Vina (Trott and Olson, 2010) durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob sich die Programme dafür eignen ein System wie das des *BgAChBP* zu berechnen. Hierzu wurde das bekannte System *LsAChBP* mit Nikotin (PDB-ID: 1UW6) als Modell verwendet. Hier ist die Kristallstruktur inkl. Lage des Liganden bekannt. Die Situation im Molekül soll mit beiden Programmen rekonstruiert werden. Hierzu wurde der Ligand zunächst mit Chimera aus der Proteinstruktur entfernt. Anschließend wurden die beiden Komponenten wie das Modell des *BgAChBP* mit den genannten Liganden behandelt.

Um die pdb-Strukturen für das Protein-Ligand-Docking vorzubereiten und anschließend zu berechnen wurde ein Python Skript (vgl. Anhang) ausgeführt. Im ersten Schritt wurde zunächst der Bereich definiert, der während des Dockings betrachtet werden sollte. Hierzu wurde in den Bereich der Bindungstasche eine Box mit einer Kantenlänge von 24 nm eingesetzt. Der Mittelpunkt der Box sollte dabei möglichst im Zentrum der Bindungstasche zu liegen kommen. Um diese Koordinaten zu erhalten, wurde die Mitte auf der gedachten Linie zwischen den

⁴<http://zinc.docking.org/>

Aminosäuren C188 im Loop C und D103 auf der gegenüberliegenden Seite der Tasche als Koordinaten eingesetzt. In Abb. 18 sind die Lage und die Ausmaße dieser Box visualisiert.

Während des Dockings wurde der Ligand zufällig an einer Stelle in dieser Box platziert und solange in der Box verschoben, bis ein Energieminimum gefunden wurde. Dieser Prozess wurde 256 mal pro Docking-Vorgang wiederholt. Jedes Docking erhielt somit 256 Ergebnisse.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden in Cluster zusammengefasst. Strukturen die einen $\text{RMSD} = 1,0 \text{ nm}$ (Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (*root mean square deviation*) (RMSD)) aufwiesen wurden hierbei in einem Cluster zusammengefasst. Als Ergebnis für ein Docking wurde der Cluster mit den meisten Mitgliedern betrachtet.

C. Ergebnisse

1. 3D-Elektronenmikroskopie des Dodekaeders

1.1. Rekombinante Expression des *BgAChBP1*

Für die praktischen Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, musste eine ausreichende Menge Protein vorhanden sein. Hierzu wurde das *BgAChBP1* nach dem Protokoll, welches in den Arbeiten von Frau [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] und Frau Dr. Kristiane Rusitzka beschrieben wurde, rekombinant exprimiert (Abb. 19). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proteinprobe zeigen sowohl Pentamere als auch Dodekaeder.

1.2. Gelfiltrations-Chromatographie

Nach dem zur Abspaltung des His-Tag erforderlichen TEV-Verdau lagen in der Probe neben dem *BgAChBP1* noch die TEV-Protease und der His-Tag vor. Um Dodekaeder von den Pentameren und der TEV-Protease abzutrennen, wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie durchgeführt (Abb. 20). Es wurden drei getrennte Gipfel erhalten. Abb. 20 zeigt EM-Aufnahmen des ersten und zweiten Gipfels. Im ersten Gipfel (I) lag das Protein als Dodekaeder vor (Abb. 20 (b)). Der zweite Gipfel (II) enthielt Pentamere (Abb. 20 (c)). Im dritten Gipfel waren elektronenmikroskopisch keine Proteinstrukturen zu erkennen, obwohl das UV-Spektrum proteintypisch war. Es dürfte sich hierbei um Monomere des *BgAChBP1* (25 kDa) oder die TEV-Protease (25 kDa) handeln.

1.3. Thermofluor-Methode zur Optimierung des Puffers

Die Stabilität des rekombinanten *BgAChBP1* in verschiedenen Puffern wurde von Dr. Ashwin Chari am MPI in Göttingen mit der Thermofluor-Methode untersucht.

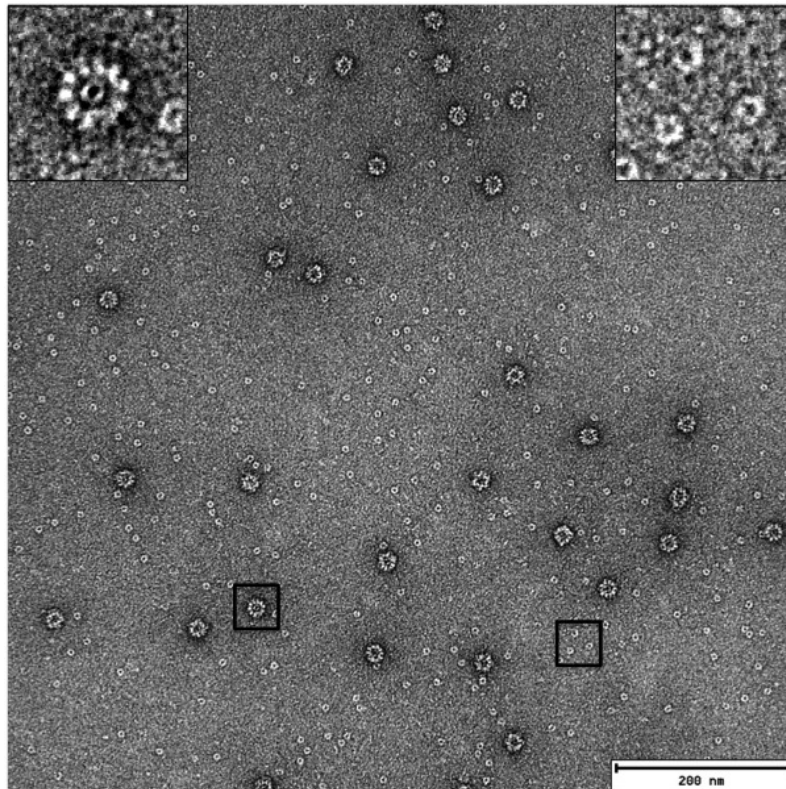


Abb. 19.: Elektronenmikroskopie des rekombinanten *BgAChBP1*. Die Probe wurde für die Aufnahme negativ kontrastiert. Es sind pentamere und dodekaedrische Strukturen sichtbar.

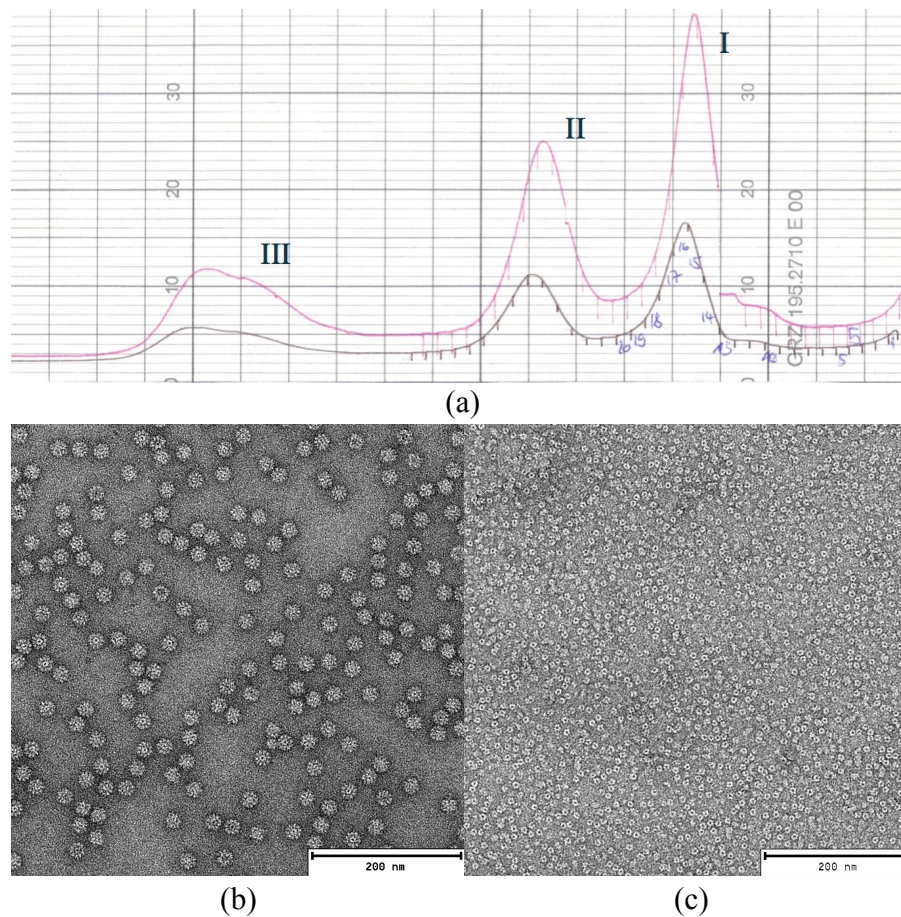


Abb. 20.: Trennung der *BgAChBP1* Fraktionen mittels Größenausschluss-Chromatographie. (a) Elutionsprofil des *BgAChBP1* (b) EM-Aufnahmen des Gipfel I. Hier lag das Protein als Dodekaeder vor. (c) EM-Aufnahme des Gipfel II. Das Protein lag hier als Pentamer vor.

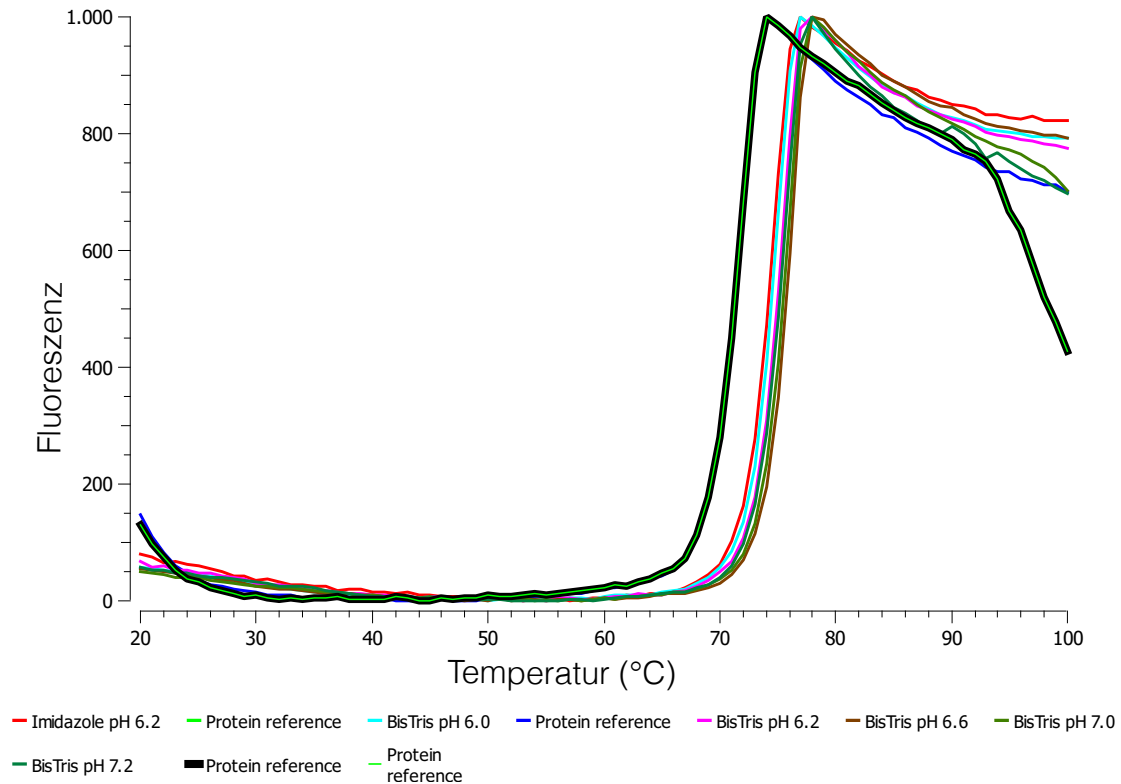


Abb. 21.: Fluoreszenzspektrum des Farbstoffs SYPRO Orange im Thermofluorassay. Mit zunehmender Temperatur denaturiert das *BgAChBP1* und bindet das SYPRO Orange, welches durch diese Wechselwirkung ein Fluoreszenzsignal aussendet. Je weiter der Wendepunkt der Kurve nach rechts verschoben ist, desto stabiler ist das Protein im jeweiligen Puffer. Als Referenz diente hier der Tris-Puffer, pH 7,5.

Die Methode wurde wie in Kapitel B2.2 „Thermofluor zur Validierung geeigneter Pufferbedingungen“ auf Seite 16 beschrieben ausgeführt. Eine vollständige Liste aller Puffersubstanzen, Additive und pH-Bedingungen finden sich im Anhang. In Abb. 21 sind übersichtshalber nur die Bedingungen aufgetragen, die den stabilisierendsten Effekt auf das *BgAChBP1* ausübten. Die Stabilisierung ist durch eine Verschiebung der Schmelztemperatur (T_m) hin zu höheren Temperaturen zu erkennen.

In Tabelle 1 sind die Schmelztemperaturen des *BgAChBP1* bei verschiedenen Pufferbedingungen aufgelistet. Es ist zu erkennen, dass BisTris in fast allen Puffern vorliegt, die das *BgAChBP1* stabilisieren. Aufgrund dieser Daten wurde für die 3D-

Tab. 1.: Schmelztemperaturen (T_m) des BgAChBP1 bei verschiedenen Pufferbedingungen (Thermofluor).

T_m (°C)	Puffersubstanz	pH
73	Tris (Referenz)	7,5
75	BisTris	6,0
76	BisTris	6,2
76	BisTris	7,0
76	Imidazol	6,2
77	BisTris	6,6
77	BisTris	7,2

Rekonstruktion des Dodekaeders als Probenpuffer ein 100 mmol/L BisTris-Puffer (pH = 6,5) gewählt.

1.4. Stabilisierung der Dodekaeder mit der GraFix-Methode

Mittels der am MPI in Göttingen entwickelten GraFix-Methode (Kastner et al., 2008) sollte die Struktur des Dodekaeders stabilisiert und weiter aufgereinigt werden. Die Fixierung wurde wie in Kapitel B2.3.2 „GraFix“ auf Seite 19 beschrieben von Dr. Ashwin Chari durchgeführt. Nach der Fixierung wurden die Aliquots der erhaltenen Fraktionen des Dichtegradienten auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und mit Amidoblack gefärbt. Wie in Abb. 22 zu sehen, konnte in den Fraktionen 18 - 22 Protein nachgewiesen werden. Für die Strukturaufklärung am Elektronenmikroskop (EM) wurden die Fraktionen 18 und 19 verwendet, da hier scheinbar die höchste Konzentration an Protein vorlag.

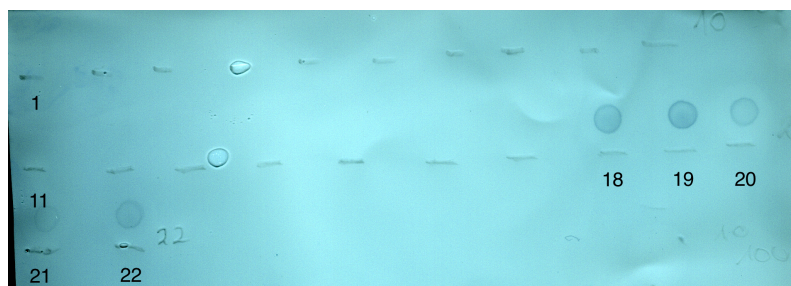


Abb. 22.: Die verschiedenen Fraktionen aus dem Dichtegradienten nach der GraFix-Fixierung wurden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und mit Amidoblack behandelt. In den Fraktionen 18–22 zeigte die Färbung Protein an.

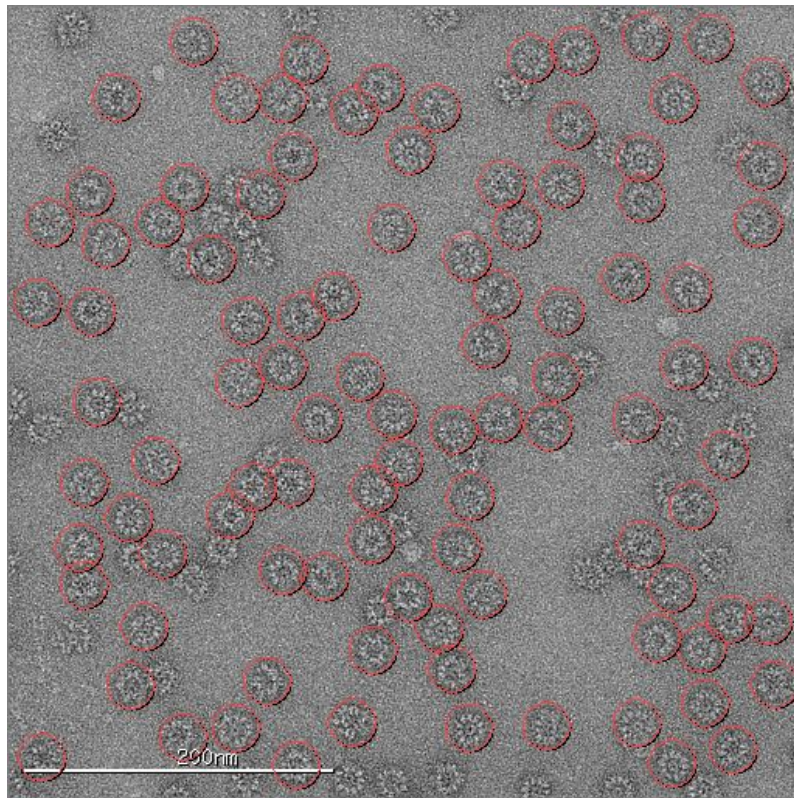


Abb. 23.: Elektronenmikroskopische Aufnahme des negativ kontrastierten *BgAChBP1* in BisTris-Puffer. Partikel die automatisch selektiert wurden, sind mit roten Kreisen markiert.

1.5. Negativkontrastierung des *BgAChBP1* in BisTris-Puffer

Als Startmodell für die hochauflösende 3D-Rekonstruktion des Dodekaeders wurde eine niedrig aufgelöste 3D-Rekonstruktion aus EM-Bildern erstellt, die von einer negativ kontrastierten Probe stammten. Der Datensatz wurde von [REDACTED] [REDACTED] am MPI in Göttingen aufgenommen. Das *BgAChBP1* lag hierzu in einem 100 mmol/L BisTris-Puffer (pH 6,5) vor (Abb. 23). Aus 59 solcher EM-Aufnahmen wurden mit dem Programm `Appion` 5 446 Partikel selektiert. Mit dem `Sparx` Modul `sxali3d.py` wurde die 3D-Rekonstruktion berechnet, die nach dem 0,5-Kriterium eine Auflösung von 12,4 Å erreichte. Aufgrund von Vorkenntnissen (Saur et al., 2012) wurde mit ikosaedrischer Symmetrie (`-sym=icos`) gerechnet (Tab. 2). Der *BgAChBP1*-Dodekaeder setzt sich aus zwölf Pentameren zusammen. Sie bestehen ihrerseits aus fünf Monomeren (Untereinheiten), die ringförmig um eine zentrale Pore angeordnet sind. In Abb. 24 sind die Umriss der fünf Monomere jedes Pentamers trotz der geringen Auflösung gut zu erkennen.

Tab. 2.: 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP1* aus negativ kontrastierter Probe.

Elektronenmikroskop	CM 400
Beschleunigungsspannung	160 kV
Vergrößerung	118 800x
Ångström pro Pixel	2,5
Anzahl der Bilder	59
Anzahl der extrahierten Partikel	5 446
Software zur Rekonstruktion	Sparx
Symmetrie	Ikosaeder (I)
Finale Auflösung	12,4 Å

Insbesondere der charakteristische Loop C deutet sich bereits an.

Bei einem Blick auf eine der zwölf dreizähligen Symmetrieachsen (Abb. 24b) ist eine Verbindung zwischen drei Pentameren zu erkennen. Durch diese Anordnung der Pentamere ergibt sich in der Mitte des Proteins ein Hohlraum mit einem Durchmesser von ca. 11 nm. Für den kompletten Dodekaeder wurde in *Chimera* ein Durchmesser von ca. 23 nm gemessen.

Die 12,4 Å-Rekonstruktion wurde als Startmodell für das Refinement der Rekonstruktionen aus kryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen verwendet.

1.6. Kryo-3D-EM des *BgAChBP1* in BisTris-Puffer

Am MPI in Göttingen wurden von dem *BgAChBP1* in BisTris-Puffer (100 mmol/L) insgesamt 1 719 elektronenmikroskopische Bilder aufgenommen. Nach der Qualitätskontrolle verblieben 541 Bilder im Datensatz, von denen insgesamt 75 128 Einzelpartikel extrahiert werden konnten. Die verworfenen Aufnahmen zeigt entweder eine zu starke Drift, eine zu geringe Auflösung oder den Kohlefilm des Objektträgers. Zur Berechnung der 3D-Struktur des *BgAChBP1* wurde als Startmodell die 12,4 Å-Rekonstruktion aus dem Datensatz der negativ kontrastierten Probe (vgl. Kapitel 1.5) genutzt. Durch iterative Verbesserung mit dem Programm *FREALIGN* konnte eine hochaufgelöste Rekonstruktion des *BgAChBP1* erstellt werden. Über die Korrelation der Raumfrequenzen (FSC) konnte eine Auflösung von 3,7 Å nach dem 0,143-Kriterium erreicht werden (Abb. 25). Mit dem Programm *bfactor*¹

¹http://grigoriefflab.janelia.org/grigorieff/download_b.html

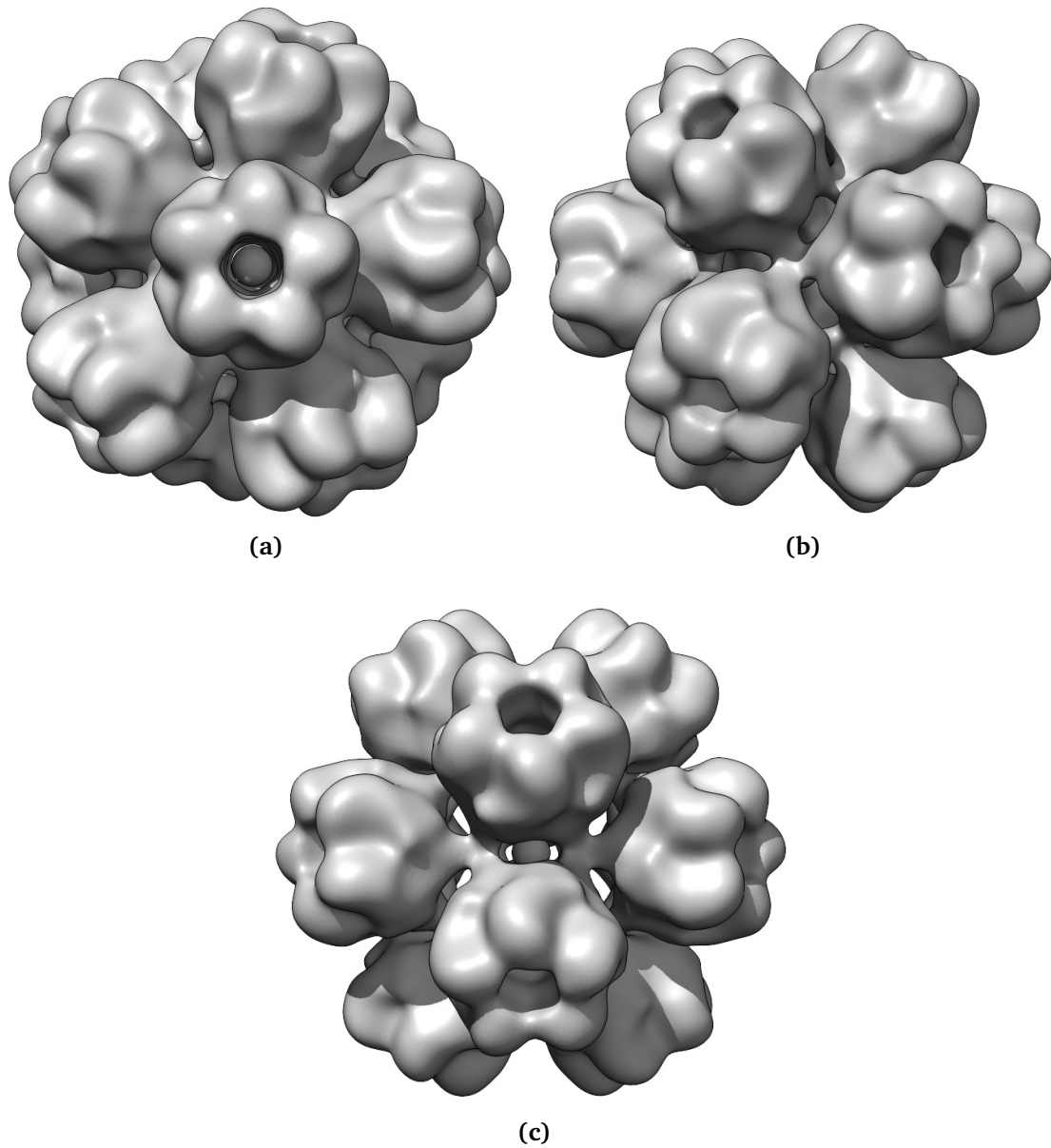


Abb. 24.: 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP1* in BisTris-Puffer. (a) Ansicht entlang der C5-Symmetrieachse. (b) Ansicht entlang der C3-Symmetrieachse. (c) Ansicht entlang der C2-Symmetrieachse. EM-Bilder aus negativ kontrastierter Proteinprobe. Auflösung lag bei 12,4 Å.

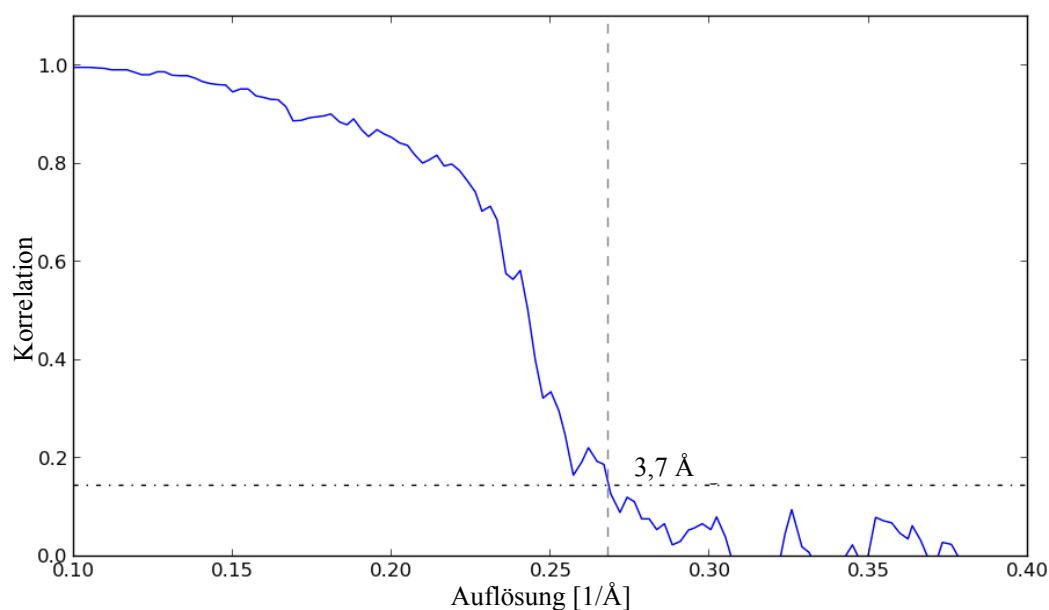


Abb. 25.: FSC der 3,7 Å-Rekonstruktion des BgAChBP1 in BisTris-Puffer. Aufgrund des verwendeten Verfahrens war hier das 0,143-Kriterium mit einer Auflösung von 3,7 Å ausschlaggebend.

wurde ein *b factor* von -290 \AA^2 appliziert. In Abbildung 26 ist die 3D-Rekonstruktion des BgAChBP1 gezeigt. Sie wird im Weiteren als 3,7 Å-Rekonstruktion bezeichnet. Es sind die Ansichten entlang der drei Typen von Symmetrieachsen abgebildet, einer C5-Achse (Abb. 26a), einer C3-Achse (Abb. 26b) und einer C2-Achse (Abb. 26c). Es lassen sich zwölf Pentamere erkennen, die einen Dodekaeder bilden. Für die Pentamere wurde eine Höhe von ca. 6,0 nm und einem Durchmesser von ca. 6,7 nm gemessen. In der Mitte des Pentamers bilden die Monomere einen Kanal, der einen Durchmesser von ca. 2,3 nm aufweist.

Die mittels FSC bestimmte Auflösung spiegelt sich in gut sichtbaren Strukturdetails wieder. Das von unserer Gruppe publizierte Homologiemodell des BgAChBP1 (PDB-ID: 4AOD; Saur et al. 2012) passte sich gut in die 3,7 Å-Rekonstruktion ein (Abb. 26d).

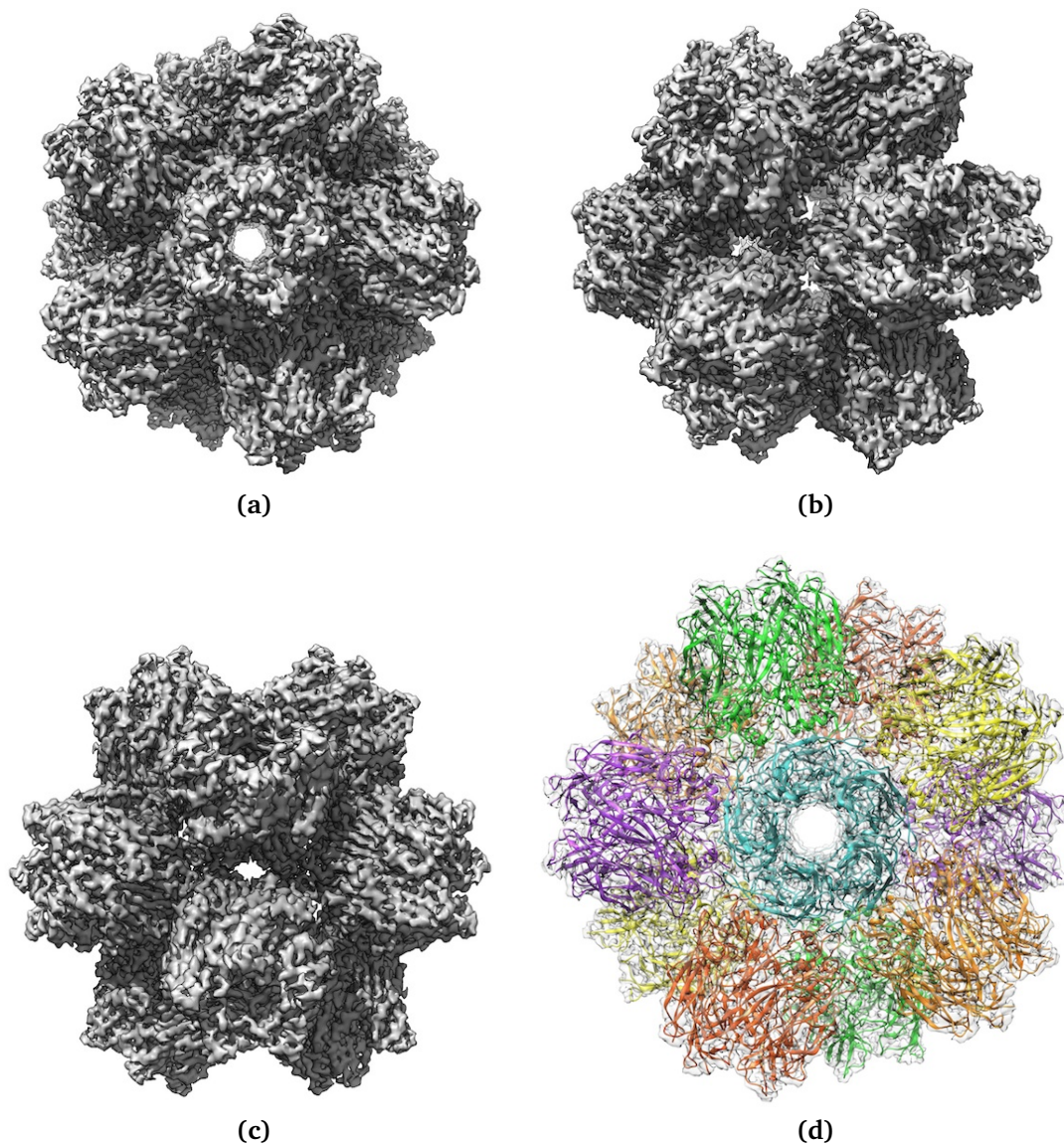


Abb. 26.: 3,7 Å-Rekonstruktion des BgAChBP1 in BisTris-Puffer. (a) Blick entlang einer C5-Symmetrieachse. (b) Blick entlang einer C3-Symmetrieachse. (c) Blick entlang einer C2-Symmetrieachse. (d) Publiziertes Homologiemodell des Dodekaeders (PDB-ID: 4AOD; Saur et al. 2012), eingepasst in die 3,7 Å-Rekonstruktion.

Tab. 3.: Kryo-EM Datensatz des BgAChBP1 in BisTris-Puffer.

Elektronenmikroskop	Titan Krios
Beschleunigungsspannung	300 kV
Vergrößerung	112 100 x
Ångström pro Pixel	1,25
Anzahl der Bilder	541
Anzahl der extrahierten Partikel	75 128
Software zur Rekonstruktion	Frealign
Symmetrie	Ikosaeder (I)
Finale Auflösung	3,7 Å

1.7. Kryo-3D-EM des BgAChBP1 in Anwesenheit von Nikotin

Neben der 3,7 Å-Rekonstruktion des BgAChBP1 in BisTris-Puffer wurde mit unseren Proben am MPI in Göttingen ein zweiter Kryo-Datensatz des BgAChBP1 erstellt. Nikotin ist ein gut untersuchter Ligand für die Klasse der Acetylcholin-Bindeproteine (siehe Einleitung). Aus diesem Grund wurde dem 200 mmol/L Puffer Nikotin zugesetzt. Das Rezept für den Puffer findet sich in Anhang.

Es wurden insgesamt 2 482 elektronenmikroskopische Bilder aufgenommen, von denen 2 234 Aufnahmen für die weitere Berechnung verwenden wurden. Die verworfenen Aufnahmen zeigten eine Drift bzw. einen starken Astigmatismus. Von den verbliebenen Bildern (Abb. 27) wurden mit dem Programm `Appion` 38 220 Einzelpartikel selektiert (Tab 4) Die 12,4 Å-Rekonstruktion des negativ kontrastierten BgAChBP1 wurde auch hier als Startmodell verwendet. Das Refinement wurde mit dem Programm `FREALIGN` durchgeführt. Die Auflösung wurde während des Refinements verbessert, indem Einzelpartikel, die eine geringe Übereinstimmung mit der Referenz gezeigt haben, von der Rekonstruktion ausgeschlossen wurden. Diese Einschränkung kann über den `thresh_reconst`-Parameter eingestellt werden. Bei dem gewählten Wert von 23.0 gingen 21 773 Partikel in die finale 3D-Rekonstruktion ein. Über die FSC wurde eine Auflösung von 4,6 Å erreicht (Abb. 28). Diese 3D-Rekonstruktion wird im Folgenden als 4,6 Å-Rekonstruktion bezeichnet.

In Abb. 29 sind verschiedene Ansichten der 4,6 Å-Rekonstruktion dargestellt. Das von unserer Gruppe publizierte Homologiemodell (PDB-ID: 4AOD, Saur et al. 2012) lässt sich gut in die Rekonstruktion einpassen (Abb. 29d).

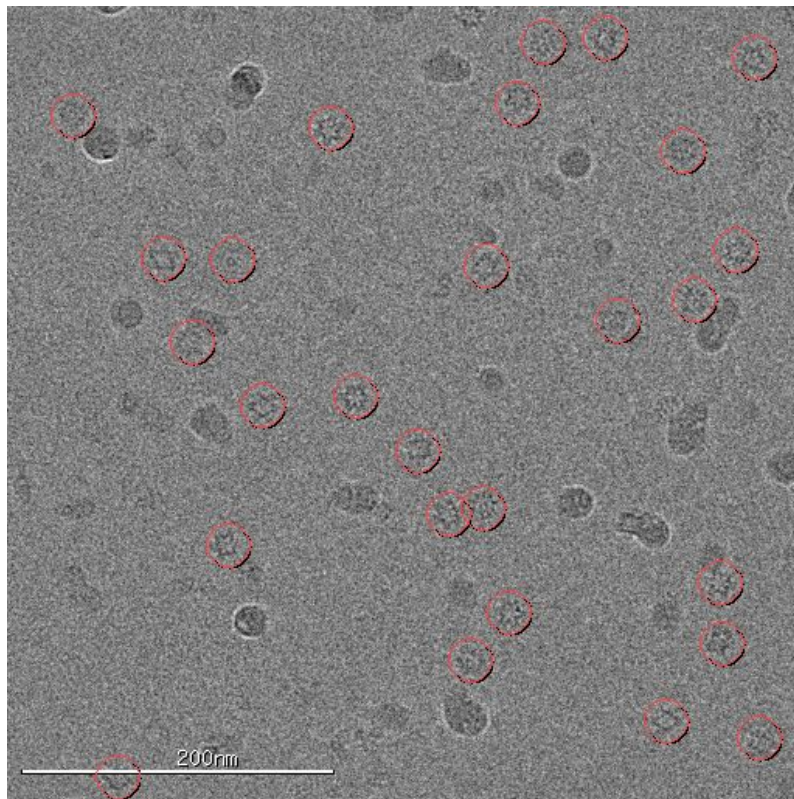


Abb. 27.: Kryo-elektronenmikroskopische Aufnahme des *BgAChBP1* in Anwesenheit von Nikotin. Partikel, die automatisch selektiert wurden, sind mit roten Kreisen markiert.

Tab. 4.: Kryo-EM Datensatz des *BgAChBP1* in Anwesenheit von Nikotin.

Elektronenmikroskop	Titan Krios
Beschleunigungsspannung	300 kV
Vergößerung	112 100 x
Ångström pro Pixel	1,25
Anzahl der extrahierten Bilder	2 234
Anzahl der Partikel	38 220
Software zur Rekonstruktion	Frealign
Symmetrie	Ikosaeder (I)
Finale Auflösung	4,6 Å

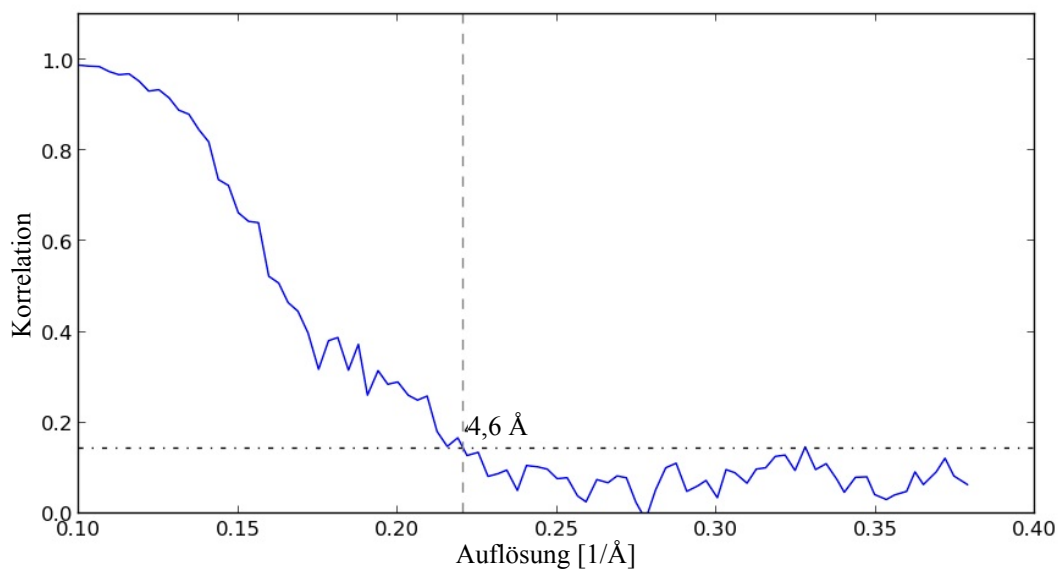


Abb. 28.: FSC der 4,6 Å-Rekonstruktion des *BgAChBP1* in BisTris-Puffer. Aufgrund des verwendeten Verfahrens war hier das 0,143-Kriterium mit einer Auflösung von 4,6 Å ausschlaggebend.

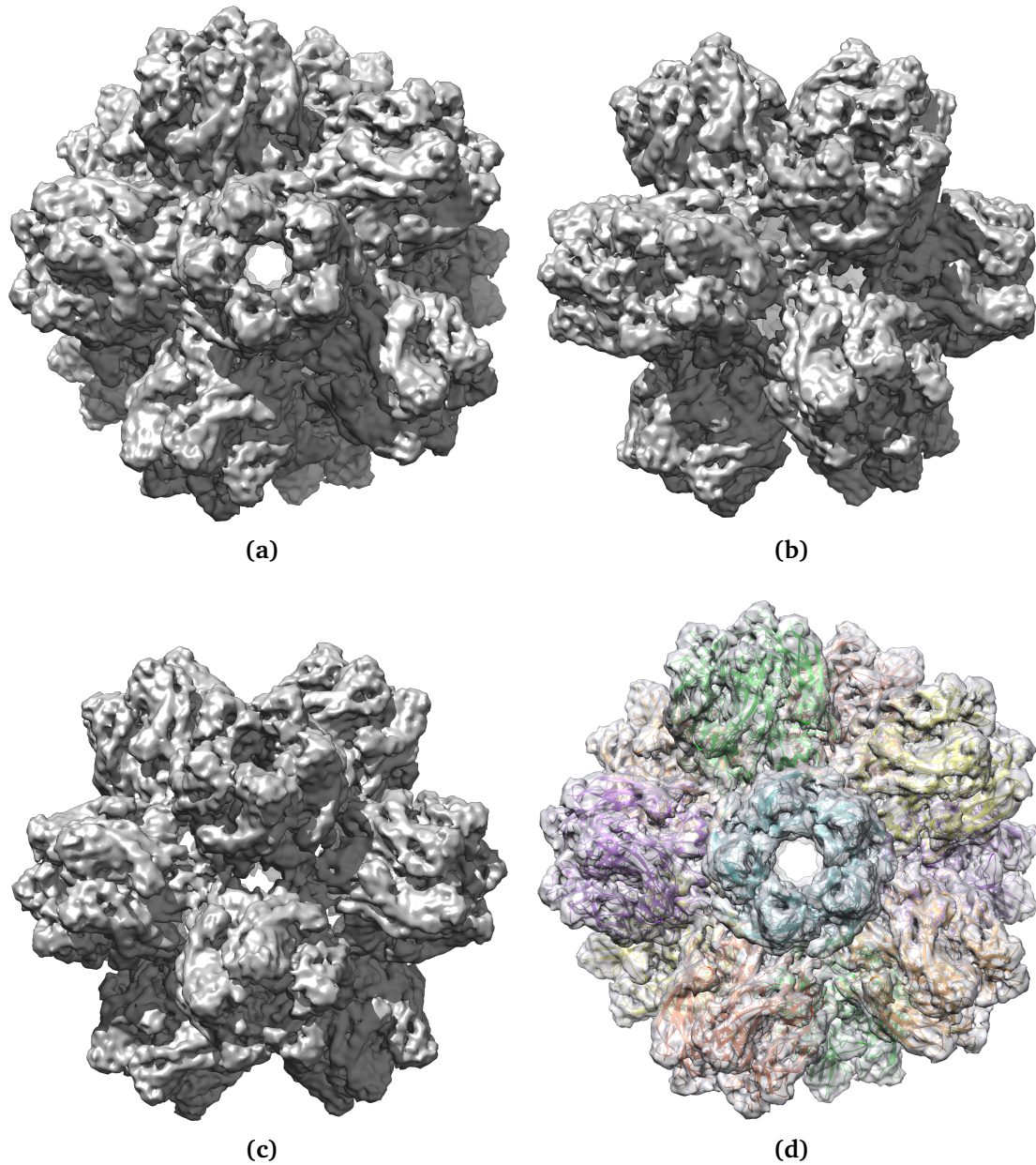


Abb. 29.: 4,6 Å-Rekonstruktion des *BgAChBP1* in Nikotin haltigem Puffer. (a) Blick entlang einer C5-Symmetrieachse. (b) Blick entlang einer C3-Symmetrieachse. (c) Blick entlang einer C2-Symmetrieachse. (d) Publiziertes Homologiemodell des Dodekaeders (PDB-ID: 4AOD; Saur et al. 2012), eingepasst in die 3,7 Å-Rekonstruktion.

2. Homologiemodell der 3,7 Å-Rekonstruktion

2.1. Flexibles Fitting eines pseudo atomaren Homologiemodells in die 3D-Rekonstruktionen

Bereits die 12,4 Å-Rekonstruktion erlaubte ein stabiles Fitting des publizierten pseudoatomaren Homologiemodells (PDB-ID: 4AOD, Saur et al. 2012).

Bei der 3,7 Å-Rekonstruktion konnte ich die Untereinheit nach dem stabilen Fitting mit dem Programm `Coot` flexibel einpassen. Abb. 30 zeigt einen Vergleich zwischen dem publizierten Homologiemodell und dem flexibel eingepassten Homologiemodell einer einzelnen Untereinheit. Nach dem flexiblen Einpassen, verläuft das C α -Rückgrat nun innerhalb der Dichtekarte. Abweichungen sind in dem Loop und im N-terminalen Bereich sichtbar. Die Aminosäure S1 ist nun nicht mehr zur Außenseite des Pentamers ausgerichtet, sondern kommt in der Nähe des benachbarten Pentamers zu liegen und zeigt ins Innere (Abb. 31a). Des Weiteren wurde die Lage des Loop L3 um 5 Å verschoben (Abb. 31b). Bei den Loops L4 und L9 hat sich das Modell nur minimal verändert und erzielt so eine bessere Übereinstimmung mit der Dichtekarte.

In den Bereichen der β -Faltblätter weisen die beiden pseudo-atomaren Modelle eine hohe Übereinstimmung auf. Die größte Verschiebung ist im Bereich des Loops L3 zu beobachten. Dieser Loop bildet auf der C3-Symmetrieachse wahrscheinlich eine Kontaktstelle zwischen drei Pentameren.

Beide pseudo atomaren Modelle wurden mit Hilfe des `Chimera` Moduls `Fit in Map` in die Dichtekarte eingepasst. Zur Berechnung der Korrelationswerte wurde ebenfalls dieses Modul verwendet. Hierzu wurde für die Dichtekarte ein massenkorrelierter Schwellenwert gewählt und für die Modelle eine Dichtekarte mit einer Auflösung von 3,7 Å generiert. Für das publizierte Homologiemodell 4AOD betrug die Korrelation 0,77, für das neue flexibel eingepasste Modell dagegen 0,86.

2.2. Strukturdetails der 3,7 Å-Rekonstruktion

Um die Strukturdetails der 3,7 Å-Rekonstruktion des *BgAChBP1* interpretieren zu können, wurde das flexibel eingepasste Homologiemodell herangezogen. In den Abbildungen 32 und 33 sind Beispiele für verschiedene Sekundärstrukturen gezeigt.

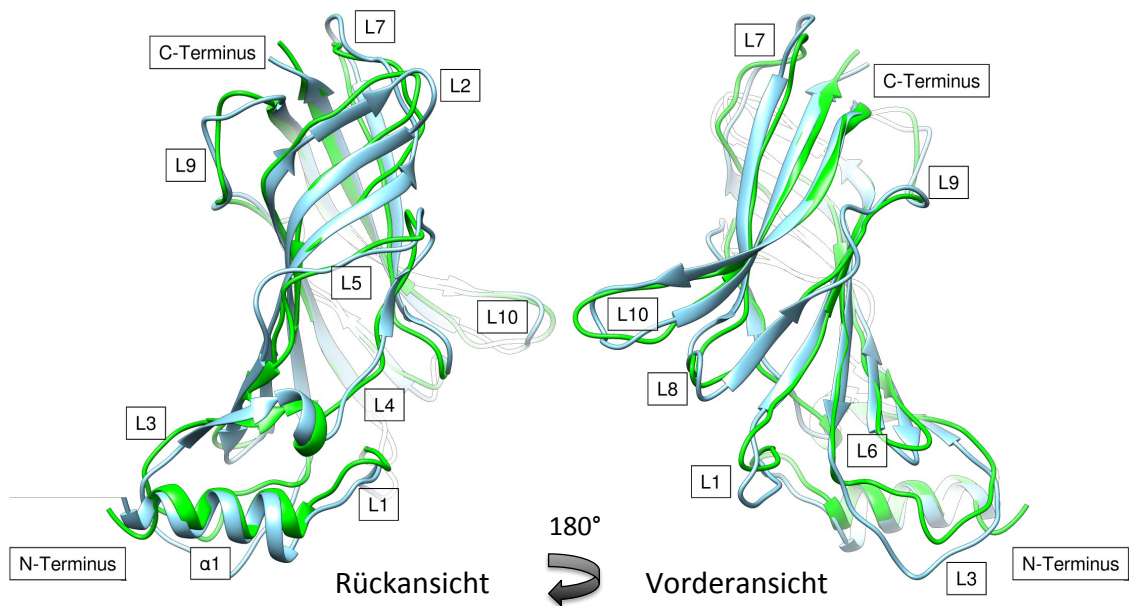


Abb. 30.: Vergleich des publizierten Homologiemodells (blau, 4AOD) und des mit Coot flexibel in die 3,7 Å-Rekonstruktion eingepassten Homologiemodells einer BgAChBP1-Untereinheit (grün). Beide Strukturen zeigen eine hohe Übereinstimmung bei den Sekundärstrukturen, aber Abweichungen beim Verlauf der verbindenden Loops.

Exemplarisch sind hier die Faltblätter $\beta 1$, $\beta 2$, und $\beta 5$ abgebildet (Abb. 32a). Bei einem hohen Schwellenwert sind die β -Faltblätter deutlich voneinander getrennt. In der Detailansicht des Faltblatts $\beta 5$ (Abb. 32b) ist die typische Zickzackform des Rückgrats eines β -Faltblatts zu erkennen. Darüber hinaus deuten sich die Seitenketten der Aminosäuren als Massen entlang des Rückgrats an. Auch die N-Terminale α -Helix $\alpha 1$ ist gut aufgelöst (Abb. 33). Die Aminosäuren 7 - 16 kommen in diesem Bereich der Dichtekarte zu liegen und zeigen nach dem flexiblen Einpassen in die Dichtekarte eine Helix.

Neben den Sekundärstrukturen lässt sich auch die Lage verschiedener Aminosäureseitenketten erkennen (Abb. 34). Hierbei handelt es sich überwiegend um die sterisch anspruchsvollen aromatischen Aminosäuren Tryptophan (Abb. 34a), Tyrosin und Phenylalanin (Abb. 34b). Die Massen, in denen die Seitenketten zu liegen kommen, heben sich bei geringem Schwellenwert deutlich von der Masse des Rückgrats ab. Im Falle des Tryptophans ist die Orientierung des Indol-Ringsystems gut zu erkennen.

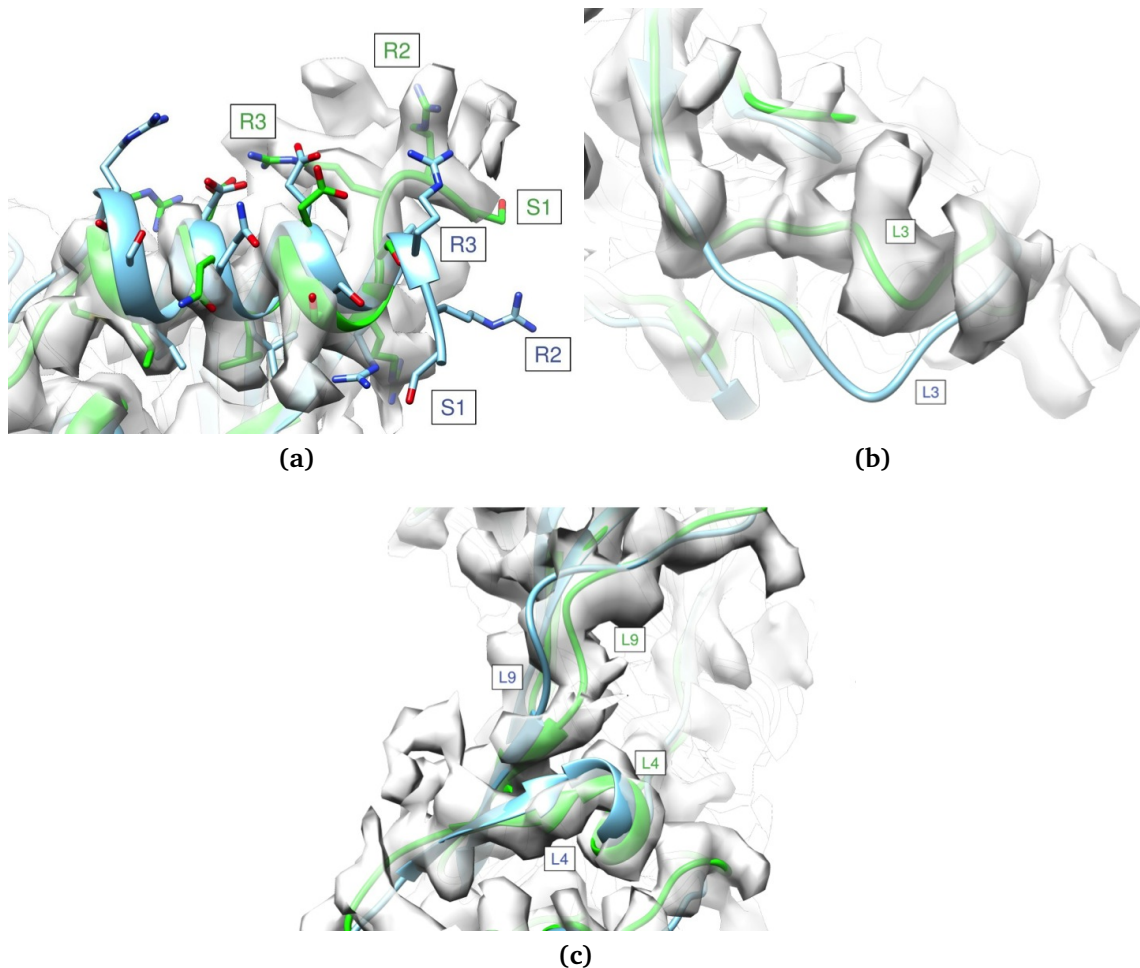


Abb. 31.: Details einer der 60 Untereinheiten der 3,7 Å-Rekonstruktion mit dem publizierten pseudo-atomaren Modell 4AOD- (blau) und dem mit `COOT` flexibel eingepassten Modell (grün). (a) Im Bereich des N-Terminus war die größte Veränderung erforderlich. (b) Der Loop L3 liegt nach dem flexiblen Einpassen innerhalb der Dichtekarte. (c) Nach geringfügiger Korrektur passen sich die Loops L9 und L4 gut in die Dichtekarte ein.

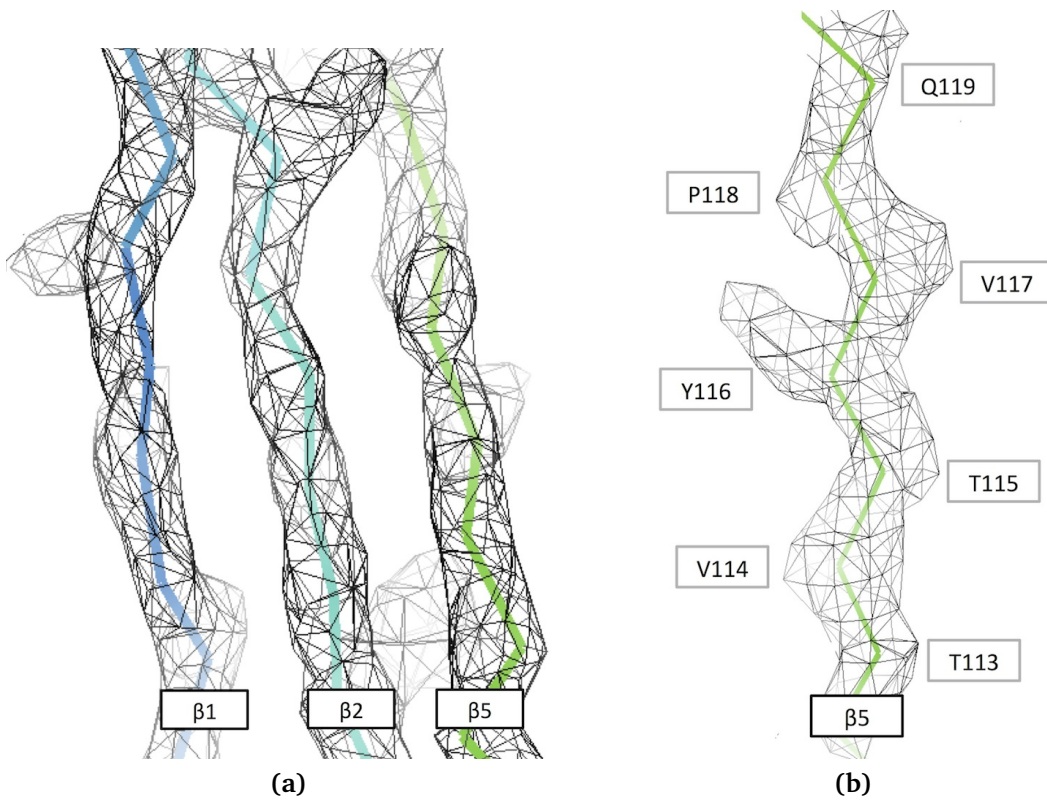


Abb. 32.: (a) Detailaufnahme der drei β -Faltblätter $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$; bei hohem Schwellenwert liegen die β -Faltblätter klar getrennt vor. (b) Faltblatt $\beta 5$ um 90° gedreht.

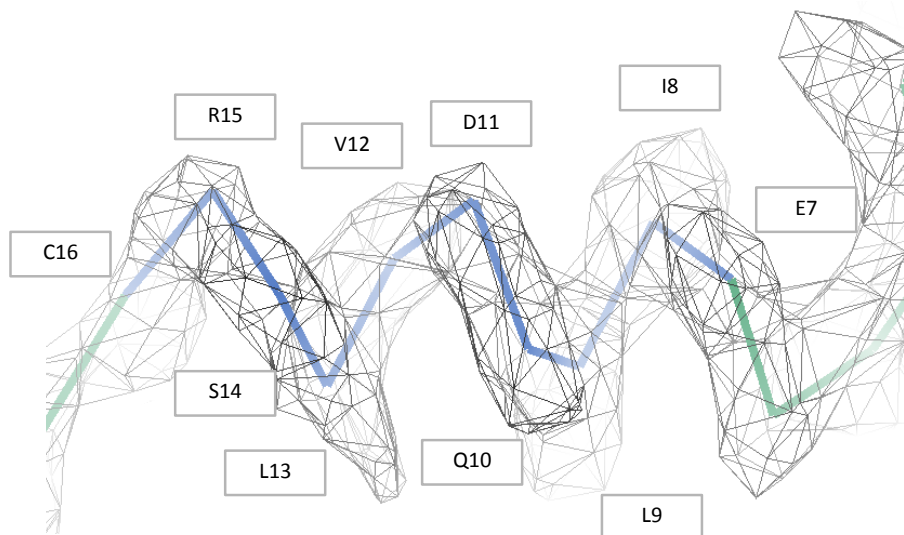


Abb. 33.: Detailansicht der N-terminalen α -Helix des *BgAChBP1*.

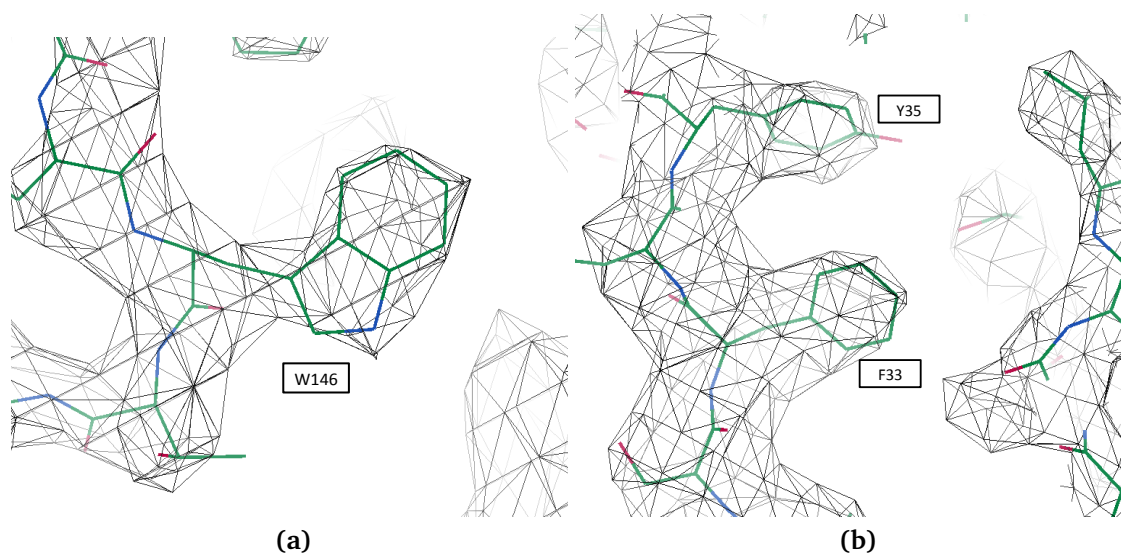


Abb. 34.: Einige der aromatischen Seitenketten des *BgAChBP1*. (a) und (b) zeigen, dass die Seitenketten W146, F33 und Y35 in der Dichtekarte gut aufgelöst sind und sich gut einpassen lassen.

Als Besonderheit postulierte (Saur et al., 2012) für das *BgAChBP1* einen Disulfidbrücke C16 - C64, welche bei keinem anderen sequenzierten AChBP vorhanden ist. Die 3,7 Å-Rekonstruktion des *BgAChBP1* zeigt zwischen den Loops L1 und L3 tatsächlich eine Brücke, an deren Enden die Aminosäuren C16 und C64 liegen (Abb. 35).

Charakteristisch für die AChBP ist die Assemblierung von fünf identischen Monomeren zu einem Pentamer (Brejc et al. 2001). Im Bereich des Interfaces zwischen je zwei Monomeren befindet sich die Ligandenbindungstasche. Beim *BgAChBP1* sind die aromatischen Aminosäuren F92, W146, Y186 und Y193 (Monomer A) und W55 (Monomer B) im Bereich der Bindungstasche zu einer Halbkugel angeordnet (Abb. 36). In deren Zentrum ist bei der 3,7 Å-Rekonstruktion eine Masse in der Dichtekarte sichtbar, die keine der Aminosäureseitenketten zugeordnet werden konnte. Die Dimensionen könnten jedoch einem BisTris-Molekül entsprechen oder einem Saccharosemolekül aus dem Dichtegradienten.

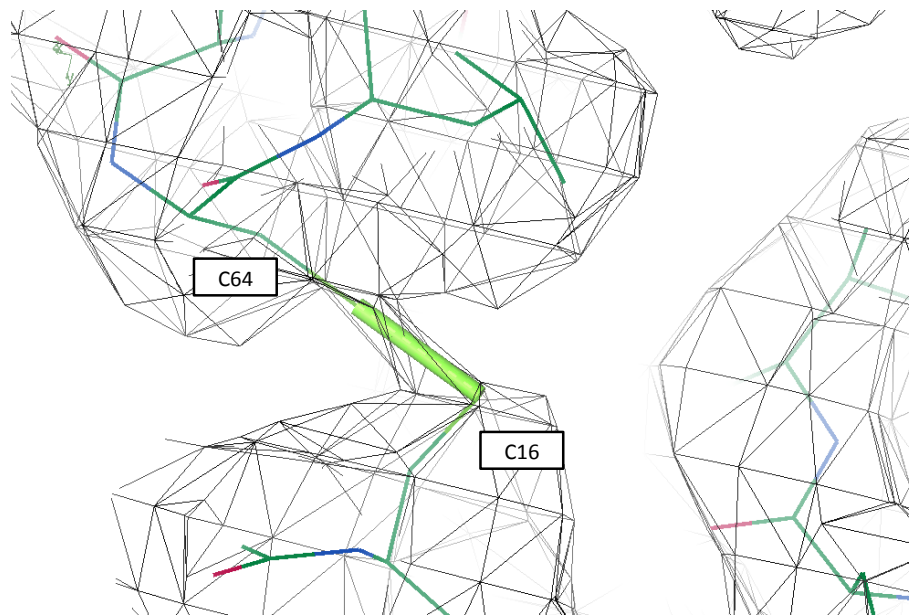


Abb. 35.: Detailansicht der Disulfidbrücke C16 - C64 des *BgAChBP1*. Bisher wurden bei keinem anderen AChBP in diesem Sequenzbereich Cysteine gefunden.

2.3. Strukturdetails der 4,6 Å-Rekonstruktion

Als pseudo atomares Modell für die 4,6 Å-Rekonstruktion wurde das flexibel eingepasste Homologiemodell der 3,7 Å-Rekonstruktion eingesetzt und starr eingepasst. In Abb. 37 sind die β -Faltblätter $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ abgebildet. Sie liegen auch bei sehr hohem Schwellenwert nur unvollständig getrennt vor. Im Vergleich zu den Sekundärstrukturen in 32a sind hier keine hochaufgelösten Details zu sehen. Über die Ausrichtung der Seitenketten kann daher auf Basis der 4,6 Å-Rekonstruktion keine sichere Aussage getroffen werden.

Die Helix $\alpha 1$ ist in Abbildung 38 gezeigt. Das pseudo atomare Modell passt sich von den Dimensionen her gut in die Masse der 3D-Rekonstruktion ein. Details, wie etwa der Verlauf der Windungen, sind hier jedoch bei keinem Schwellenwert erkennbar.

Die Bindungstasche im Interface zwischen zwei Monomeren ist gut aufgelöst. Der Loop C, welcher die Bindungstasche nach außen abschließt, grenzt bei hohem Schwellenwert deutlich einen dahinter liegenden Hohlraum ab. In Abb. 39 ist exemplarisch eine Bindungstasche abgebildet. Eine zusätzliche freie Masse wie bei der 3,7 Å-Rekonstruktion (Abb. 36) ist in dieser 3D-Rekonstruktion nicht zu finden. Andererseits ist zwischen den Aminosäuren W146 und Y193 (Monomer A) eine verbindende Struktur zu sehen. Dabei könnte es sich um ein Nikotin-Molekül aus dem Puffer handeln.

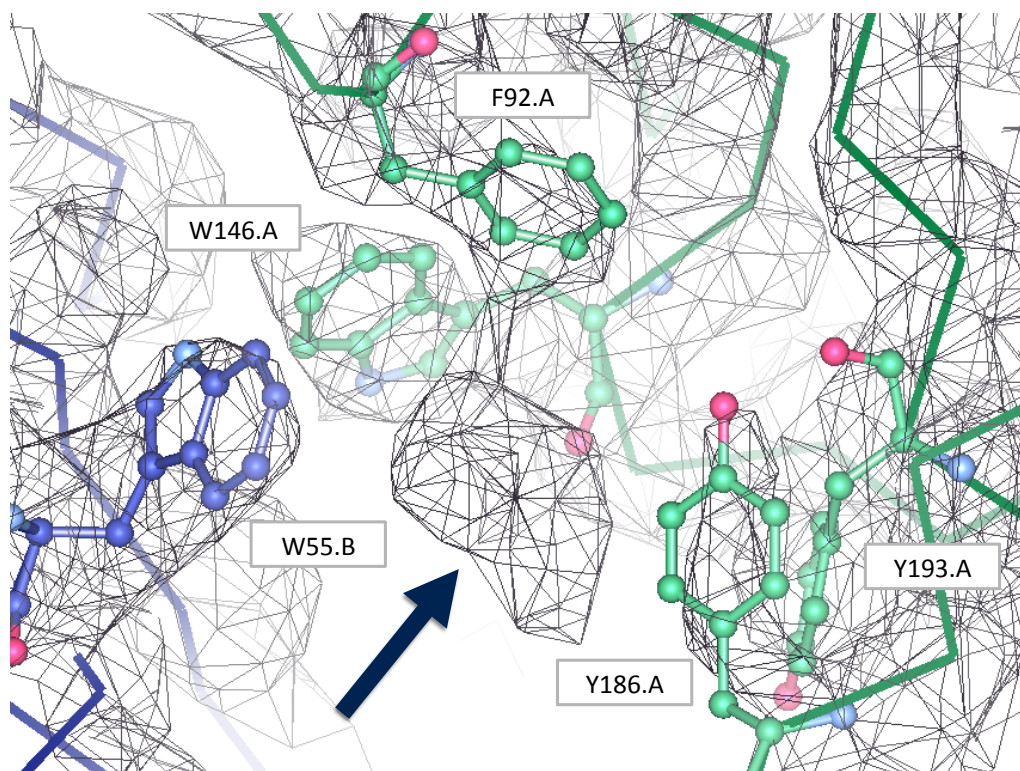


Abb. 36.: Nahansicht der Bindungstasche des *BgAChBP1*. Die aromatischen Aminosäuren, die wie eine Halbkugel in der Bindungstasche angeordnet sind, sind hier im „Stick and Ball“-Modus hervorgehoben. Die beiden Monomere welche die Bindungstasche bilden sind grün (A) bzw. blau (B) dargestellt. Im Zentrum der Tasche ist eine Masse zu erkennen, die keiner der Aminosäure zugeordnet ist (Pfeil). Es handelt sich daher wahrscheinlich um ein BisTris-Molekül aus dem Puffer.

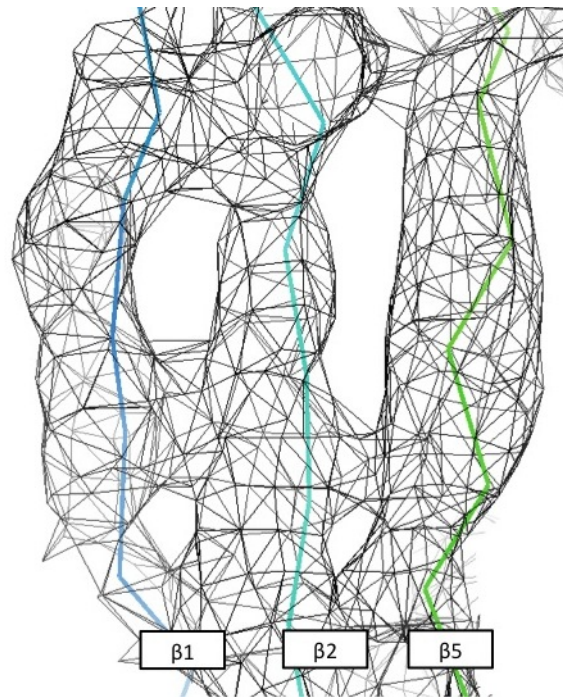


Abb. 37.: Detailansicht der β -Faltblätter β_1 , β_2 und β_5 der 4,6 Å-Rekonstruktion; auch bei hohem Schwellenwert liegen die Falblätter nur unvollständig getrennt vor.

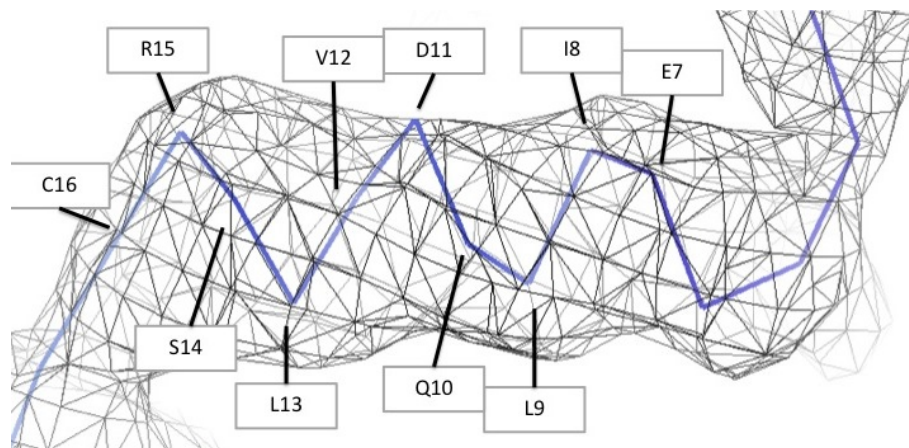


Abb. 38.: Detailansicht der α -Helix des BgAChBP1 mit Nikotin. Die Windungen der Helix sind bei in diesem Modell nicht aufgelöst.

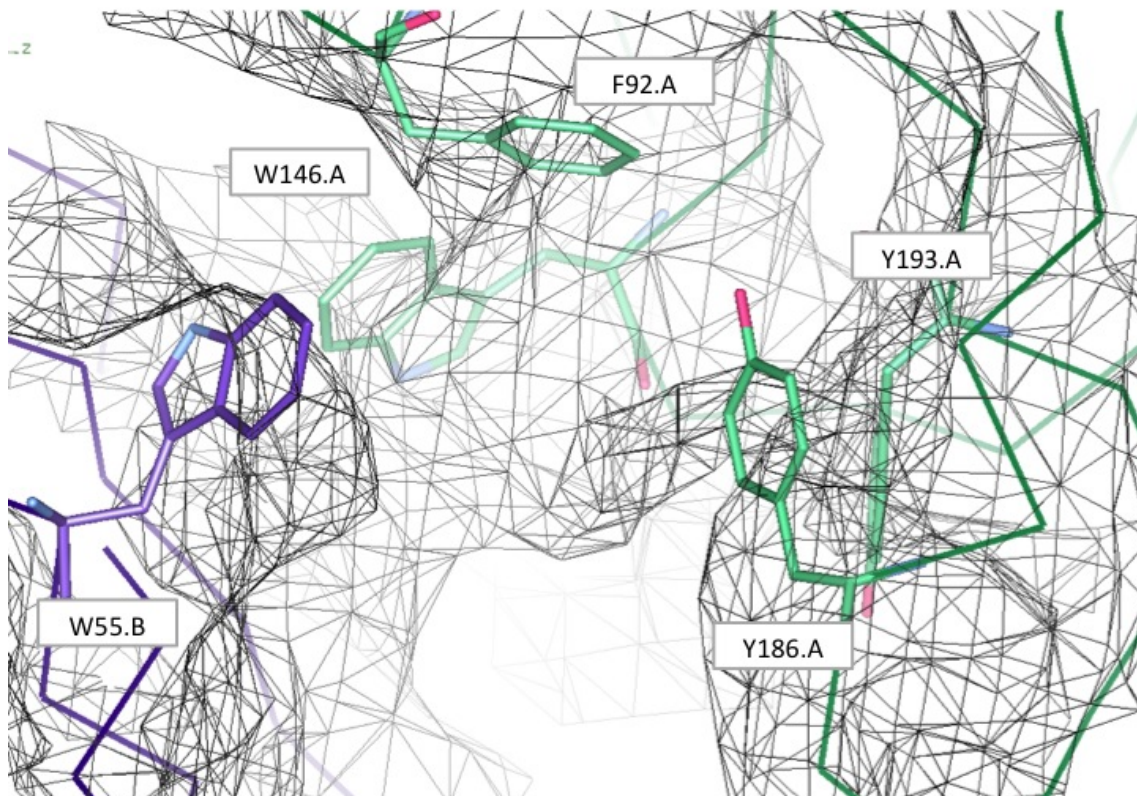


Abb. 39.: Bindungstasche des 4,6 Å-Rekonstruktion . Die aromatischen Aminosäuren, die wie eine Halbkugel in der Bindungstasche angeordnet sind, sind hervorgehoben. Die beiden Monomere, welche die Bindungstasche bilden sind in grün (A) und blau (B) dargestellt. Die leere Masse im Zentrum ist - wohl aufgrund der schlechten Auflösung - mit mehreren Aminosäuren verbunden und repräsentiert möglicherweise ein gebundenes Nikotin-Molekül aus dem Puffer.

3. Herstellung der Mutante BgAChBP1-F92Y

Bei der Überlagerung der 3D-Strukturen des BgAChBP1-Homologiemodells (vgl. Kapitel 2.1) mit den bisher kristallisierten Acetylcholin-Bindeproteinen fällt auf, dass die aromatischen Aminosäuren in der Bindungstasche größtenteils konserviert sind (Tab. 5). Die Aminosäure 92 des BgAChBP1 ist jedoch ein Phenylalanin, wohingegen andere AChBPs an dieser Stelle ein Tyrosin haben. Nach Sine et al. (1994) ist die aromatische Hydroxylgruppe an dieser Stelle der Bindungstasche essenziell für die Bindung der Liganden. Hierzu wurde eine Mutation des Tyrosins zu Phenylalanin durchgeführt. Auch Celie et al. (2004) beschreiben, dass das Tyrosin an dieser Position die Liganden nicht über das aromatischen System, sondern über die Hydroxylgruppe bindet.

Um den Einfluss des F92 des BgAChBP1 auf die Bindungseigenschaften zu un-

Tab. 5.: Aromatische Aminosäuren in der Bindungstasche verschiedener AChBP sind größtenteils konserviert. Anstatt der Aminosäure F92 des BgAChBP1 steht sonst ein Tyrosin.

<i>Biomphalaria glabrata</i>	W55	F92	W146	Y186	Y193
<i>Lymnaea stagnalis</i>	W53	Y89	W143	Y185	Y192
<i>Aplysia californica</i>	Y55	Y93	W147	Y188	Y195
<i>Bulinus truncatus</i>	W51	Y88	W142	Y184	Y191

tersuchen, wurde eine Mutation des Phenylalanins zu Tyrosin (BgAChBP1-F92Y) durchgeführt. Nach den in Abschnitt B.1.1.1 beschriebenen Kriterien wurde der folgende Primer erstellt (Abb. 40). Die Eigenschaften des Primers sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Aminosäurereposition		87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97
BgAChBP1	DNA	5'- CCA	GAC	ATA	TTC	CTT	TTT	GAC	TCA	GTT	GGC	GCC -3'
	Aminosäure	P	D	I	F	L	F	D	S	V	G	A
BgAChBP1-F92Y	forward primer	5'- CA	GAC	ATA	TTC	CTT	TAT	GAC	TCA	GTT	GGC	GC -3'
	Aminosäure		D	I	F	L	Y	D	S	V	G	
	reverse primer	3'- GT	CTG	TAT	AAG	GAA	ATA	CTG	AGT	CAA	CCG	CG -5'

Abb. 40.: Primer für die Mutation des BgAChBP1-Y92F.

Der Erfolg der Mutation wurde mittels Sequenzierung untersucht. In Abb. 41 ist der Ausschnitt der Sequenz gezeigt, der die Mutation F92 - Y92 trägt.

Tab. 6.: Eigenschaften des Mutageneseprimers für die Mutation *BgAChBP1-F92Y*.

Länge	31
GC Gehalt	45,2 %
Schmelztemperatur	60,5°C
Molekulargewicht	9461,2 g/mol

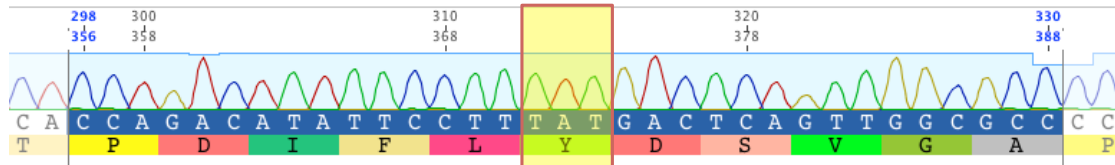


Abb. 41.: Ausschnitt aus der Sequenz des *BgAChBP1-F92Y* nach Sequenzierung.

Die Expression von *BgAChBP1-F92Y* wurde nach dem Protokoll, welches in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde, durchgeführt. Die Quartärstruktur des rekombinanten Proteins wurde elektronenmikroskopisch überprüft (Abb. 42). In der Probe wurden wie beim Wildtyp sowohl Dodekaeder als auch Pentamere gefunden. Dabei war elektronenmikroskopisch kein Unterschied zwischen dem *BgAChBP1* (Abb. 19) und dem *BgAChBP1-F92Y* zu erkennen.

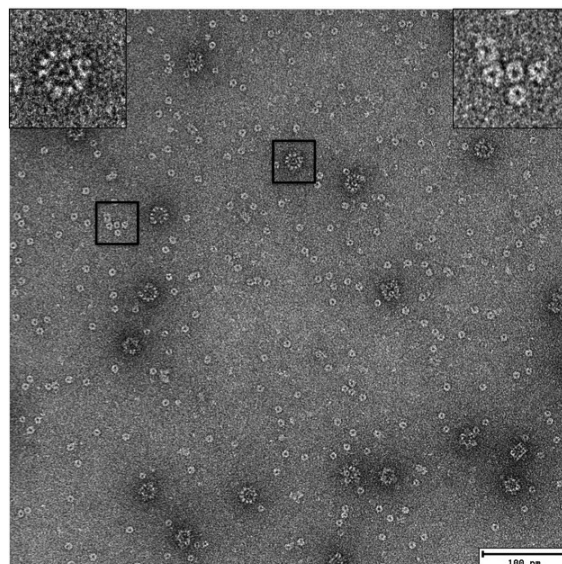


Abb. 42.: Elektronenmikroskopie des *BgAChBP1-F92Y*. Die Probe zeigt Dodekaeder (Vergrößerung links) und Pentamere (Vergrößerung rechts).

4. Ligandenbindung von **BgAChBP1** und **BgAChBP1-F92Y**

Mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde die Interaktion des BgAChBP mit niedermolekularen Liganden untersucht. Dazu wurde die Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Proteins in Abhängigkeit verschiedener Ligandenkonzentrationen ausgewertet. Hier wurden die Liganden Acetylcholin, Nikotin, GABA, Glycin und BisTris untersucht.

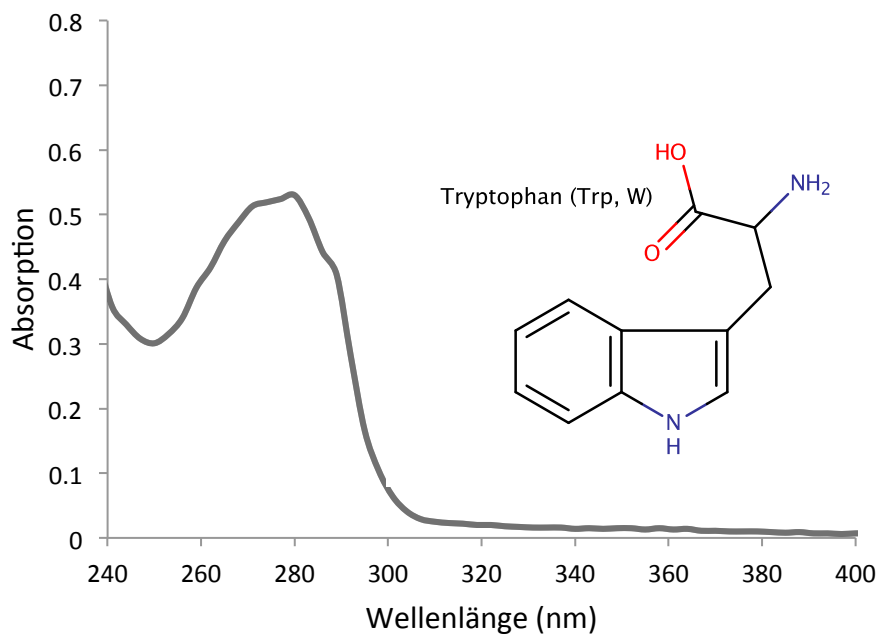
4.1. Inner-Filter Effekt

Zunächst sollten Effekte ausgeschlossen werden, die in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration direkt zu einer Änderung Fluoreszenzsignals des Tryptophans führen, ohne dabei von einer Interaktion des Liganden mit dem Protein induziert worden zu sein. In Abb. 43 sind die Absorptionsspektren von Tryptophan und Nikotin dargestellt. Tryptophan zeigt eine maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. Nikotin weist ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Hier sollte vorsorglich ein *inner-filter*-Effekt ausgeschlossen werden, bei dem die Signalländerung durch die bloße Konzentrationserhöhung des Liganden hervorgerufen wird und nicht durch eine Interaktion des Liganden mit dem Protein.

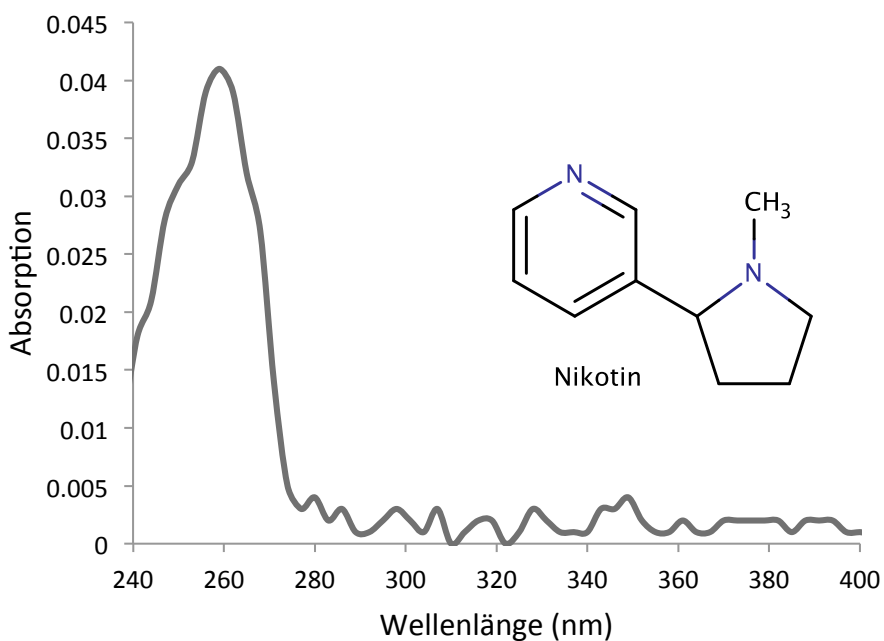
Abb. 44 zeigt die normierte Fluoreszenzintensität des Tryptophans bei 430 nm in Abhängigkeit der Nikotinkonzentration. Es wurden ein Konzentrationsbereich des Nikotins zwischen 0 $\mu\text{mol/l}$ und 326 $\mu\text{mol/l}$ aufgenommen. Über den kompletten Bereich blieb das Fluoreszenzsignal konstant, es wurde keine Abnahme des Signals durch eine Erhöhung der Nikotinkonzentration beobachtet. So kann ausgeschlossen werden, dass Nikotin in dem gemessenen Konzentrationsbereich einen *inner-filter*-Effekt aufweist.

4.2. Titration von **BgAChBP1** mit Nikotin

Nach der Gelfiltrations-Chromatographie (vgl. 1.2) wurde je ein Gipfel für die Dodekaeder bzw. Pentamerfraktion erhalten (siehe Abb. 20). Durch das notwendige Aufkonzentrieren wurde aus der Pentamerfraktion durch Assemblierung ein Dodekaeder/Pentamer-Gemisch. Die Zusammensetzung des Gemisches hing von dem Grad der Konzentration ab.



(a)



(b)

Abb. 43.: Absorptionsspektren von Tryptophan und Nikotin. (a) Tryptophan zeigt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. (b) Das Maximum der Absorption von Nikotin liegt etwas unterhalb bei 260 nm.

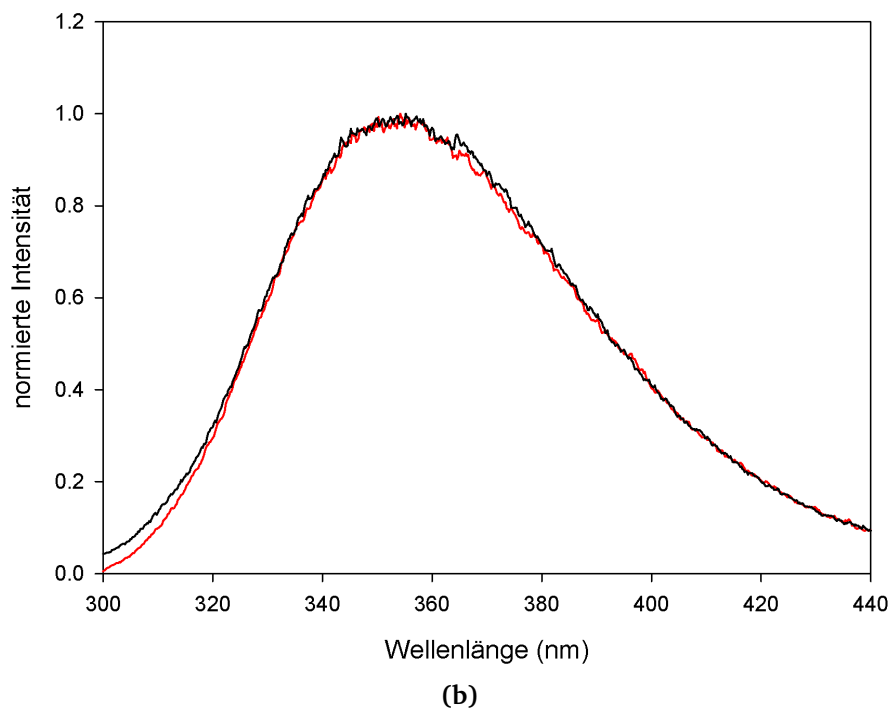
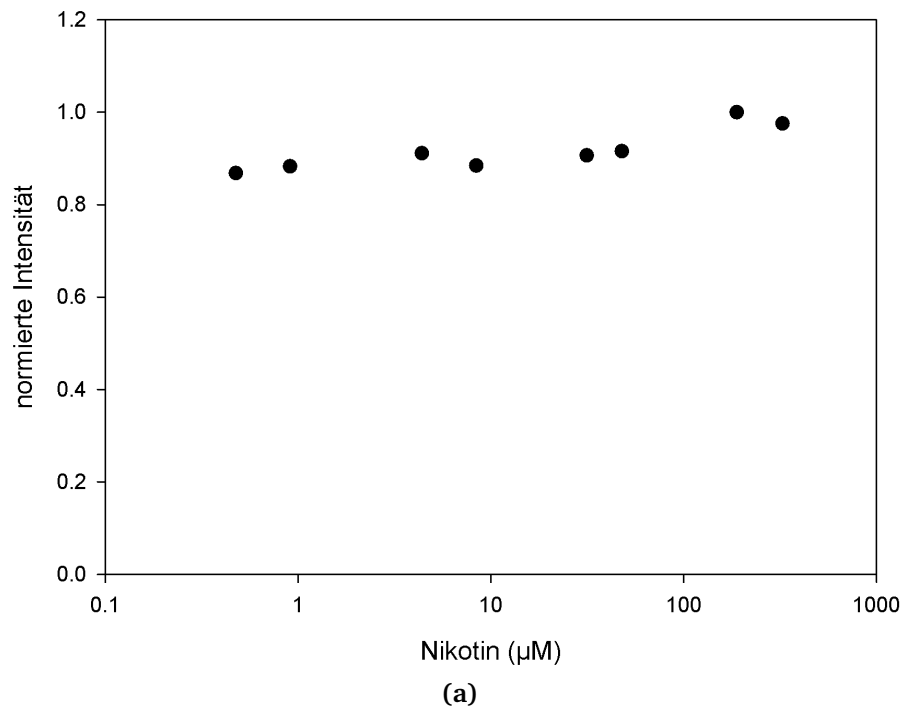


Abb. 44.: Titration von Tryptophan mit Nikotin. (a) Fluoreszenzsignal ($\lambda = 340$ nm) von Tryptophan bei Titration mit Nikotin. (b) Fluoreszenzspektrum von Tryptophan vor und nach Titration mit Nikotin. Rot: Tryptophan; schwarz: Tryptophan + $920 \mu\text{M}$ Nikotin. Eine Erhöhung der Nikotinkonzentration führte weder zu einem Signalverlust noch zu einer Verschiebung des Maximums der Fluoreszenz.

Zunächst wurde untersucht ob die Quartärstruktur einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Nikotins hat. Hierzu wurden die Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit der Nikotinkonzentration für die Pentamer/Dodekaeder-Fraktion und die reine Dodekaederfraktion des *BgAChBP1* gemessen (Abb. 45).

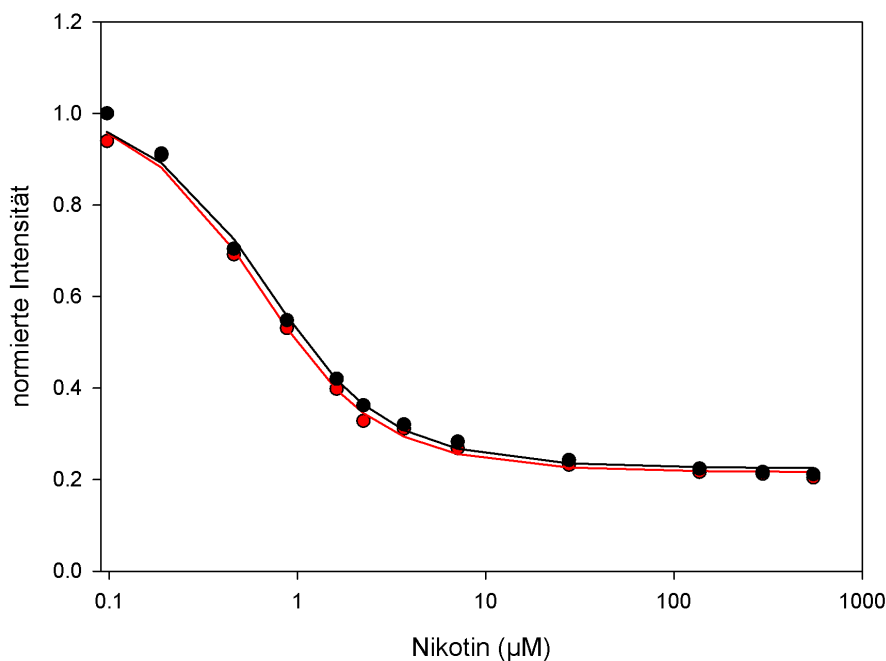


Abb. 45.: Titration der verschiedenen Assemblierungsformen, rot: Dodekaeder; schwarz: Pentamere + Dodekaeder. Die beiden Kurven zeigen eine hohe Übereinstimmung, was auf gleiche Bindungseigenschaften hindeutet.

Mit Hilfe der Regressionsgleichung (vgl. Formel 6 auf Seite 39) konnte aus den Messwerten die Dissoziationskonstante (K_D) und die Stöchiometrie (n) ermittelt werden. In Tab. 7 sind diese berechneten Werte zusammengefasst. Abb. 45 und

Tab. 7.: Titration der beiden Assemblierungsformen des *BgAChBP1* mit Nikotin.

	R^2	Dissoziations- konstante (μM)	Stöchiometrie (Nikotin pro aktivem Zentrum)
Dodekaeder	0,99	$0,33 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,05$
Pentamere + Dodekaeder	0,98	$0,36 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,06$

Tab. 7 zeigen, dass zwischen den beiden Fraktionen Dodekaeder und Pentamere + Dodekaeder kein messbarer Unterschied in der Tryptophanfluoreszenz besteht. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) beschreibt die Qualität eines Fits. Der Wert für R^2 liegt

zwischen 0 (unbrauchbares Modell) und 1,0 (perfektes Modell). Die Bestimmung der Variablen mittels nichtlinearer Regression ist ein iterativer Prozess. Die Variablen für die Dissoziationskonstante und die Stöchiometrie werden hierbei variabel gehalten, sind jedoch voneinander abhängig. Das heißt, dass sich die Dissoziationskonstante verändert, wenn sich die Stöchiometrie verändert.

Ein Pentamer hat maximal fünf Ligandenbindungstaschen, ein Dodekaeder maximal 60 (12 x 5) Bindungstaschen. Die Proben bestehend aus Dodekaedern bzw. Dodekaedern + Pentameren zeigen ein nahezu identisches Bindungsverhalten. Daraus lässt sich schließen, dass die Assemblierungsform hier keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Die zwölf Pentamere im Dodekaeder scheinen also bei der Ligandenbindung nicht funktionell zu kooperieren. Um die Stöchiometrie zu ermitteln, wurden drei Wiederholungsmessungen mit dem BgAChBP1 und Nikotin durchgeführt. Für die Berechnung der Dissoziationskonstante wurde hier die Stöchiometrie konstant gehalten. Dabei wurden Werte gewählt, die ganzzahligen Stöchiometrien für das Pentamer entsprechen. Ist je eine Bindungstasche des Pentamers besetzt gilt $n = 0,2$, da hier 20% des Pentamers belegt sind. Analog gilt $n = 0,4$ für zwei belegte Bindungstaschen, $n = 0,6$ für drei Bindungstaschen, $n = 0,8$ für vier Bindungstaschen und $n = 1$ wenn alle fünf Bindungstaschen eines Pentamers belegt sind.

In Abbildung 46 sind die Messpunkte als schwarze Kreuze eingezeichnet. Des Weiteren sind die Regressionskurven für die verschiedenen Stöchiometrien abgebildet. In der Tabelle 8 sind die dazugehörigen Dissoziationskonstanten aufgezeigt.

Die Regressionskurve, die die Messwerte am besten beschreibt, wurde bei einer

Tab. 8.: Titration von BgAChBP1 mit Nikotin. Dissoziationskonstanten bei konstanter Stöchiometrie.

Stöchiometrie (n)	R^2	Dissoziationskonstante
n = 0,2	0,99	$0,296 \pm 0,021 \mu\text{M}$
n = 0,4	0,98	$0,166 \pm 0,037 \mu\text{M}$
n = 0,6	0,95	$0,088 \pm 0,048 \mu\text{M}$
n = 0,8	0,92	$0,029 \pm 0,052 \mu\text{M}$
n = 1,0	0,89	$0,000 \pm 0,082 \mu\text{M}$

Stöchiometrie von $n = 0,2$ (Beladungsgrad von 20%) gefunden. Diese ist in Abbildung 46 in Rot eingezeichnet. Diese visuelle Interpretation der Regressionskurve wird gestützt durch das Bestimmtheitsmaß (R^2), welches mit $R^2 = 0,99$ für $n = 0,2$ den höchsten Wert aufweist. Von den fünf Bindungstaschen im Pentamer ist also

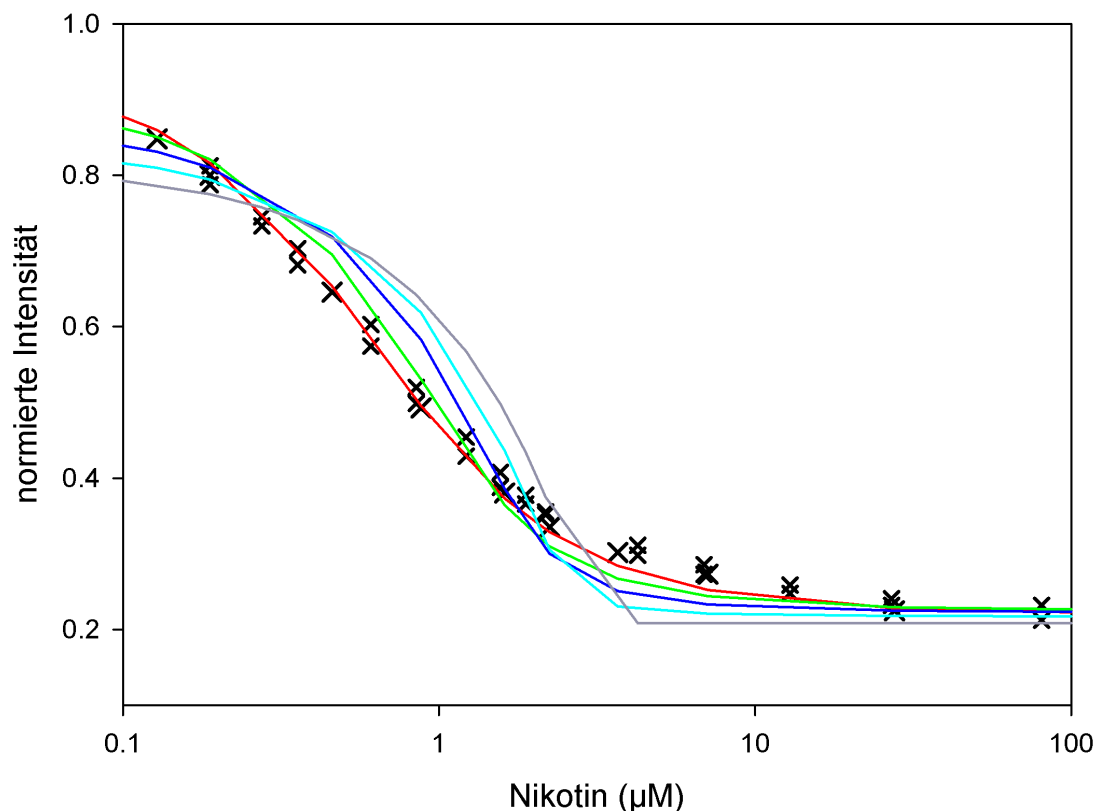


Abb. 46.: Titration von BgAChBP1 mit Nikotin. Verschiedene Regressionskurven in Abhängigkeit konstant gehaltener Stöchiometrien (n). Schwarze Kreuze: Messpunkte; Rot: $n = 0,2$; grün: $n = 0,4$; blau: $n = 0,6$; cyan: $n = 0,8$; grau: $n = 1,0$.

durchschnittlich nur eine besetzt.

Neben der Abnahme des Fluoreszenzsignals konnte eine Verschiebung des Maximums der Fluoreszenz beobachtet werden. Durch die Zugabe von Nikotin wurde eine Blauverschiebung des Spektrums des BgAChBP1 beobachtet; das Spektrum ist demnach zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben (Abb. 47). Das Wellenlängenmaximum (λ_{max}) der Fluoreszenz reagiert sehr sensibel auf die chemische Umgebung des Trp (Vivian and Callis, 2001). Für ein Trp in einer apolaren Umgebung, ohne Wasserstoffbrücken, ist eine Blauverschiebung hin zu kürzeren Wellenlängen typisch. Ist das Trp jedoch in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, findet eine Verschiebung zu längeren Wellenlängen statt (Lakowicz, 2006a). Der Eintrag von Nikotin in die Bindungstasche könnte die chemische Umgebung des Trp beeinflussen. Nikotin mit seinem aromatischen Pyridin kann so für die beobachtete Blauverschiebung verantwortlich sein.

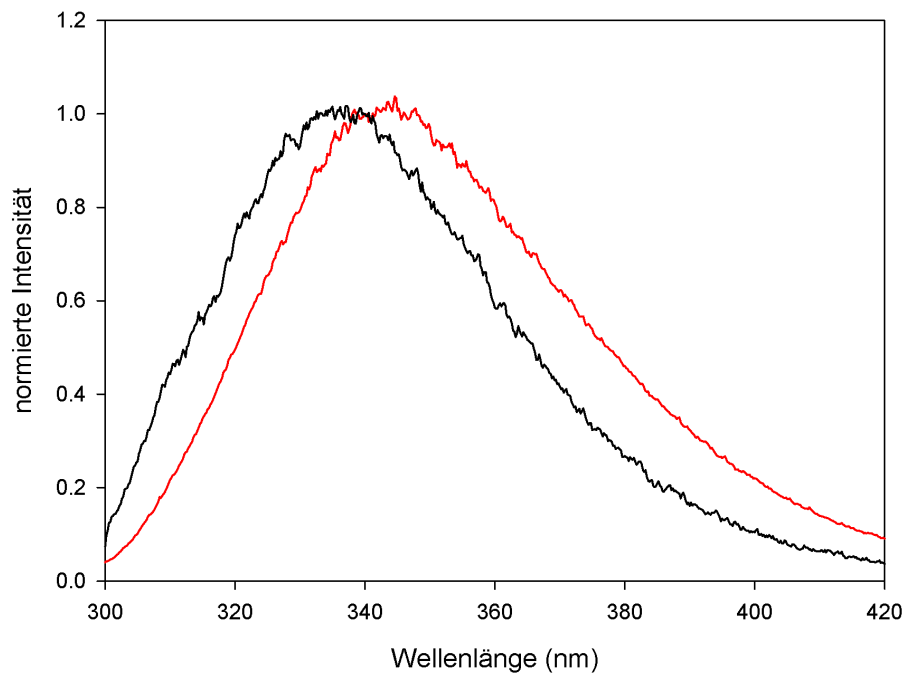


Abb. 47.: Fluoreszenzspektrum von *BgAChBP1* nach Titration mit Nikotin. Rot: ohne Nikotin; mit 150 μM Nikotin.

4.3. Titration der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin

Auch die Titration der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin ergab eine Reduktion des Fluoreszenzsignals. Wie schon beim Wildtyp *BgAChBP1* wurden auch bei der Mutante zunächst die beiden Assemblierungsformen vermessen. Wie schon bei dem Wildtyp beobachtet, wurde aus der Pentamerfraktion eine Mischfraktion aus Pentameren und Dodekaedern. In Abb. 48 sind die Messpunkte der Dodekaederprobe (rot) und der Pentamer/Dodekaederprobe (schwarz) gezeigt.

Aus den Messdaten wurde mittels Regression die Dissoziationskonstante (K_D) und die Stöchiometrie (n) bestimmt. Die errechneten Werte sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die Ergebnisse der beiden Proben liegen in einem vergleichbaren Bereich, was auf gleiche Bindungseigenschaften hindeutet.

In der Abb. 49 sind die ermittelten Regressionskurven mit den konstant gehaltenen Stöchiometrien abgebildet, analog zu Abb. 45 beim Wildtyp. Die rote Kurve ($n = 0,2$) beschreibt die Messwerte am besten. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) untermauert diese Beobachtung. Für $n = 0,2$ weist die Regressionskurve mit $R^2 = 0,98$

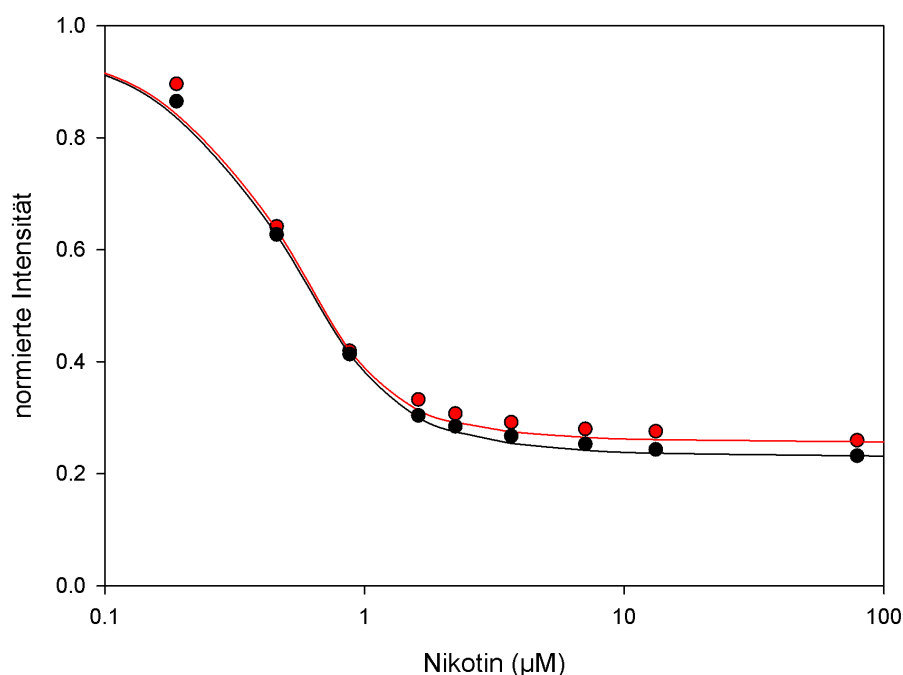


Abb. 48.: Titration der beiden Assemblierungsformen (Rot: Dodekaeder; schwarz: Pentamere + Dodekaeder) des *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin. Beide Kurven zeigen eine gute Übereinstimmung, was auf sehr ähnliche Bindungseigenschaften bezüglich Nikotin hindeutet.

Tab. 9.: Titration von *BgAChBP1-F92Y* in verschiedenen Assemblierungszuständen mit Nikotin.

	R^2	Dissoziationskonstante	Stöchiometrie
Dodekaeder	0,997	$0,072 \pm 0,024 \mu\text{M}$	$0,265 \pm 0,027$
Pentamere	0,999	$0,090 \pm 0,015 \mu\text{M}$	$0,256 \pm 0,016$

den höchsten Wert auf, wie beim Wildtyp. Eine Blauverschiebung des Wellenlängenmaximums wie beim Wildtyp wurde ebenfalls beobachtet.

4.4. Titration mit Acetylcholin

Neben Nikotin wurde auch der namensgebende Ligand Acetylcholin untersucht. Auch hier wurde zunächst die Proteinprobe vorgelegt und die intrinsische Fluoreszenz nach jedem Titrationsschritt mit Acetylcholin gemessen. Die Intensitätsänderung in Abhängigkeit des titrierten Acetylcholins zur Proteinprobe ist in Abb. 51 aufgetragen. Für *BgAChBP1* und die Mutante *BgAChBP1-F92Y* war über den gesamten Konzentrationsbereich keine Signaländerung zu messen. Bindungseigen-

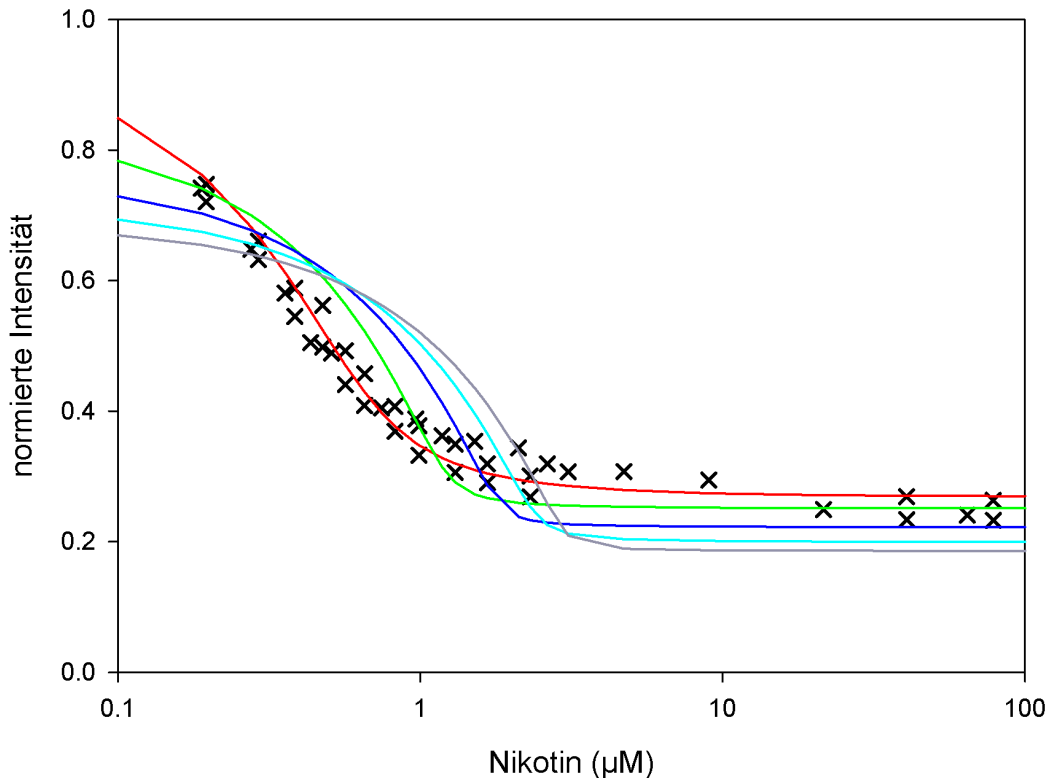


Abb. 49.: Titration von BgAChBP1-F92Y mit Nikotin. Verschiedene Regressionskurven in Abhängigkeit konstant gehaltener Stöchiometrien (n). Schwarze Kreuze: Messpunkte; Rot: n = 0,2; grün: n = 0,4; blau: n = 0,6; cyan: n = 0,8; grau: n = 1,0.

schaften konnten mit diesem Versuchsaufbau nicht ermittelt werden.

Um jedoch eine Idee von den Bindungseigenschaften zu bekommen, wurde die Bindung des Acetylcholin indirekt bestimmt. Hierzu wurde die jeweilige Proteinprobe vorgelegt und mit Nikotin versetzt. Anschließend wurde mit Acetylcholin titriert und die Fluoreszenz gemessen. Für alle so gemessenen Proteinproben zeigte sich eine Änderung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Acetylcholin-Konzentration. Mittels nichtlinearem Fit konnte eine Regressionskurve ermittelt werden, die die Messwerte für das BgAChBP1 und die Mutante BgAChBP1-F92Y beschreiben. So wurde für das BgAChBP1 eine Dissoziationskonstante (K_D) von $K_D = 49,3 \pm 14,5 \mu\text{M}$ erhalten. Aufgrund der Kenntnisse aus der Bindungsmessung von Nikotin wurde hier eine Stöchiometrie (n) von n = 0,2 angenommen. Für die Mutante BgAChBP1-F92Y wurde analog verfahren. Hier konnte mittels nichtlinearer Regression eine Dissoziationskonstante (K_D) von $K_D = 12,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

Tab. 10.: Titration der *BgAChBP1-F92Y* Dodekaederfraktion mit Nikotin. Dissoziationskonstanten bei konstanter Stöchiometrie.

Stöchiometrie (n)	R^2	Dissoziationskonstante
n = 0,2	0,980	$0,060 \pm 0,010 \mu\text{M}$
n = 0,4	0,893	$0,014 \pm 0,021 \mu\text{M}$
n = 0,6	0,789	$0,011 \pm 0,043 \mu\text{M}$
n = 0,8	0,706	$0,019 \pm 0,073 \mu\text{M}$
n = 1,0	0,644	$0,010 \pm 0,095 \mu\text{M}$

4.5. Titration mit BisTris, GABA und Glycin

Darüber hinaus wurden die potentiellen Liganden BisTris, γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin untersucht. Bei den beiden Proteinvarianten, *BgAChBP1* und die Mutante *BgAChBP1-F92Y*, wurden für diese Moleküle keine signifikanten Signaländerungen gemessen. In den Abb. 53 und 54 sind die Ergebnisse dieser Messungen zusammengefasst.

Diese Liganden wurden, analog zum Acetylcholin, mittels Verdrängung mit Nikotin vermessen. Auch hier konnte keine Bindung zum Protein nachgewiesen werden.

4.6. Fluoreszenz zeigt den Alterungseffekt bei der Mutante *BgAChBP1-F92Y*

Während der Fluoreszenzmessungen fiel auf, dass gleiche Proben je nach Alter ein anderes Fluoreszenzverhalten zeigten.

Die Ausgangsfluoreszenz lag bei allen Proben unabhängig vom Alter auf einem vergleichbaren Level. Bei der Zugabe von Nikotin zur Proteinprobe wurde die Fluoreszenz des Trp je nach Alter der Probe verschieden stark reduziert. In Abb. 55 ist dieser Effekt exemplarisch aufgezeigt. Hier wurde der gleiche Versuchsaufbau wie bei der Bestimmung der Bindung mit Acetylcholin verwendet (vgl. Kapitel 4.4). Aufgetragen ist die normierte Intensität. Bei den Messwerten, die als rote Quadrate eingezeichnet sind, handelt es sich um eine Probe, die frisch exprimiert wurde. Die schwarzen Kreise stehen für die gleiche Probe, welche nach einem Monat auf die gleiche Weise vermessen wurde. Die Probe wurde in der Zwischenzeit bei 10°C im Kühlraum gelagert. Es ist zu erkennen, dass bei hohen Acetylcholin-Konzentrationen die Zugabe von Nikotin das Fluoreszenzsignal kaum verringerte.

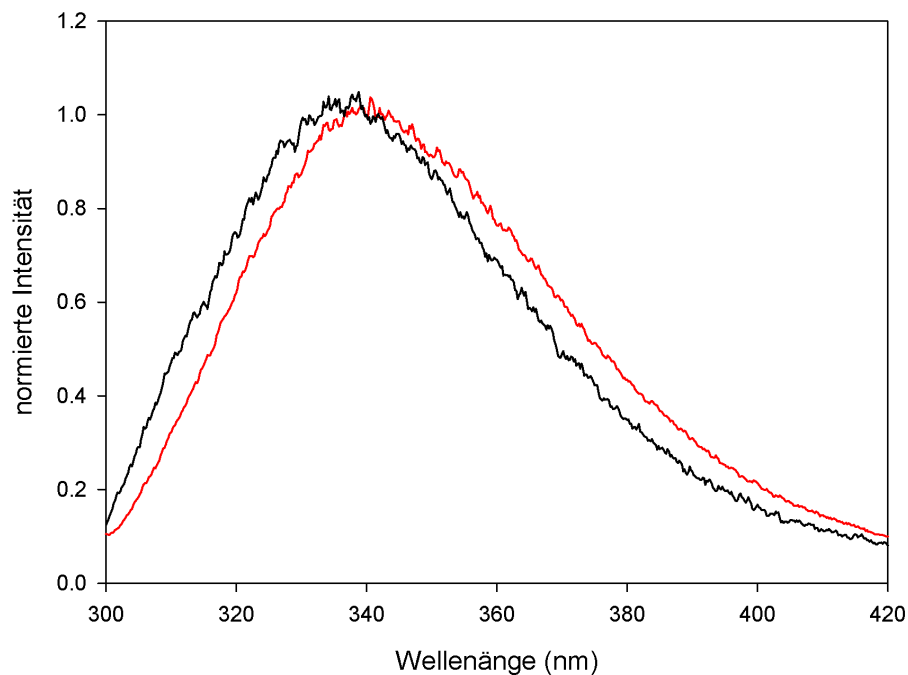


Abb. 50.: Fluoreszenzspektrum der BgAChBP1 Dodekaederfraktion nach Titration mit Nikotin. Rot: ohne Nikotin; mit 150 μ M Nikotin.

Der Fluoreszenzwert näherte sich hier bei beiden Kurven an den Wert 1 an. Im Bereich der niedrigen Acetylcholin-Konzentrationen kann man einen Unterschied zwischen den Proben erkennen. Bei der frischen Probe wurde das Fluoreszenzsignal um ca. 30 % reduziert. Bei der 30 Tage gelagerten Probe konnte lediglich eine Reduktion von ca. 60 % gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil der Dodekaeder in Monomere zerfallen war oder gar denaturiert vorlag. Dieser Zerfall hatte keine Auswertung auf die Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie jedoch auf die Anzahl der Bindungstaschen, die eine Assemblierung zu Pentameren bzw. Dodekaedern voraussetzt.

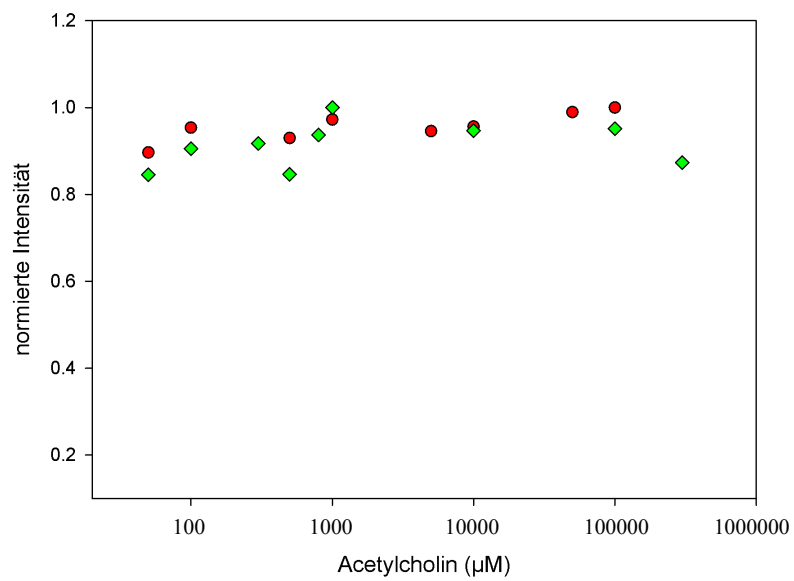


Abb. 51.: Titration des *BgAChBP1* und der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit Acetylcholin; Rot: *BgAChBP1* grün: *BgAChBP1-F92Y*. Bei beiden Proben kann bei steigender Acetylcholinkonzentration keine Änderung der Fluoreszenz gemessen werden.

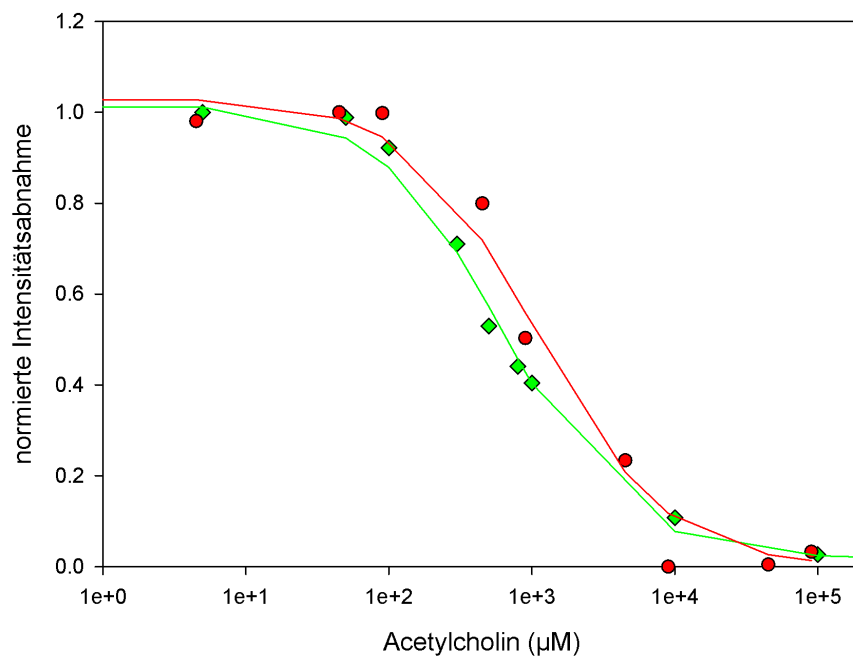


Abb. 52.: Titration des *BgAChBP1* und der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit Acetylcholin und Konkurrenz durch Nikotin; Rote Kreise: *BgAChBP1*, grüne Rauten: *BgAChBP1-F92Y*. Ergebnis der nichtlinearen Regression: Rot: *BgAChBP1*; grün: *BgAChBP1-F92Y*.

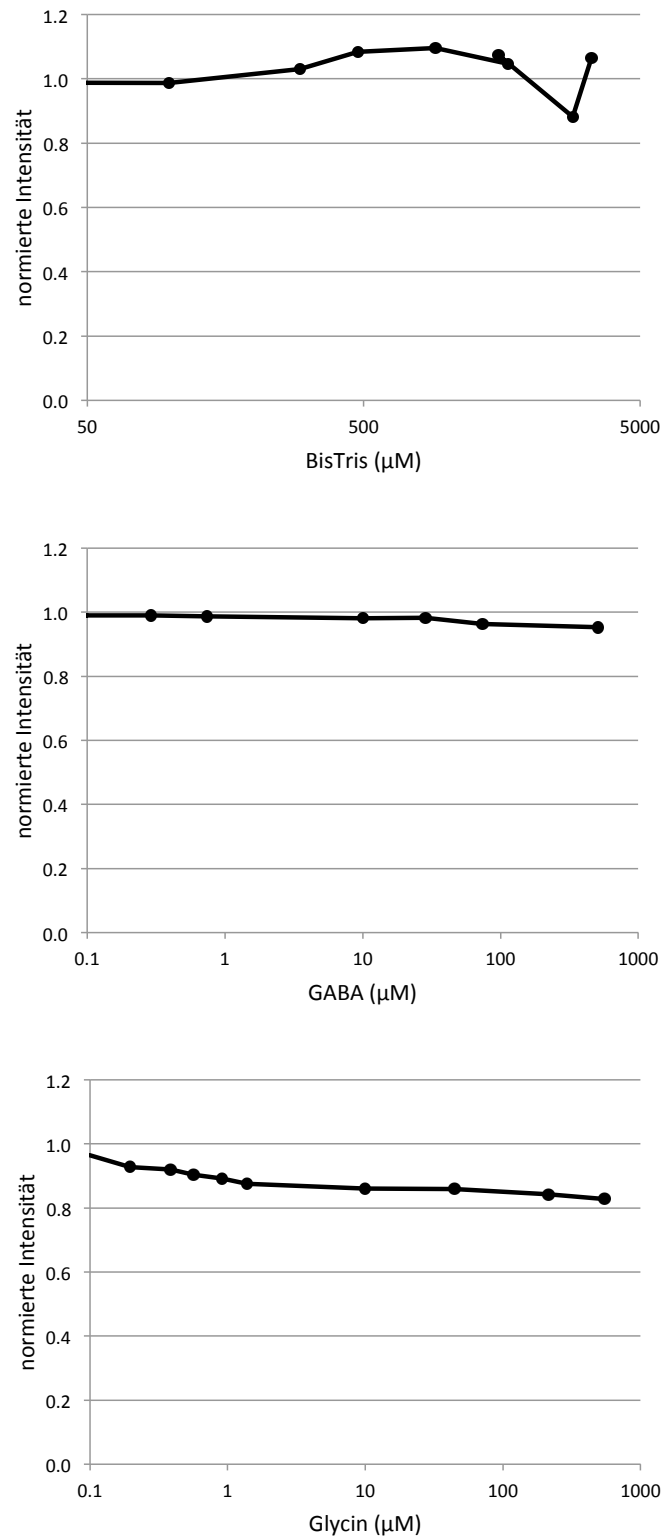


Abb. 53.: Titration von BgAChBP1 mit den Liganden BisTris, GABA und Glycin. Bei keinem dieser Liganden war eine signifikante Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz messbar.

4. Ligandenbindung von BgAChBP1 und BgAChBP1-F92Y

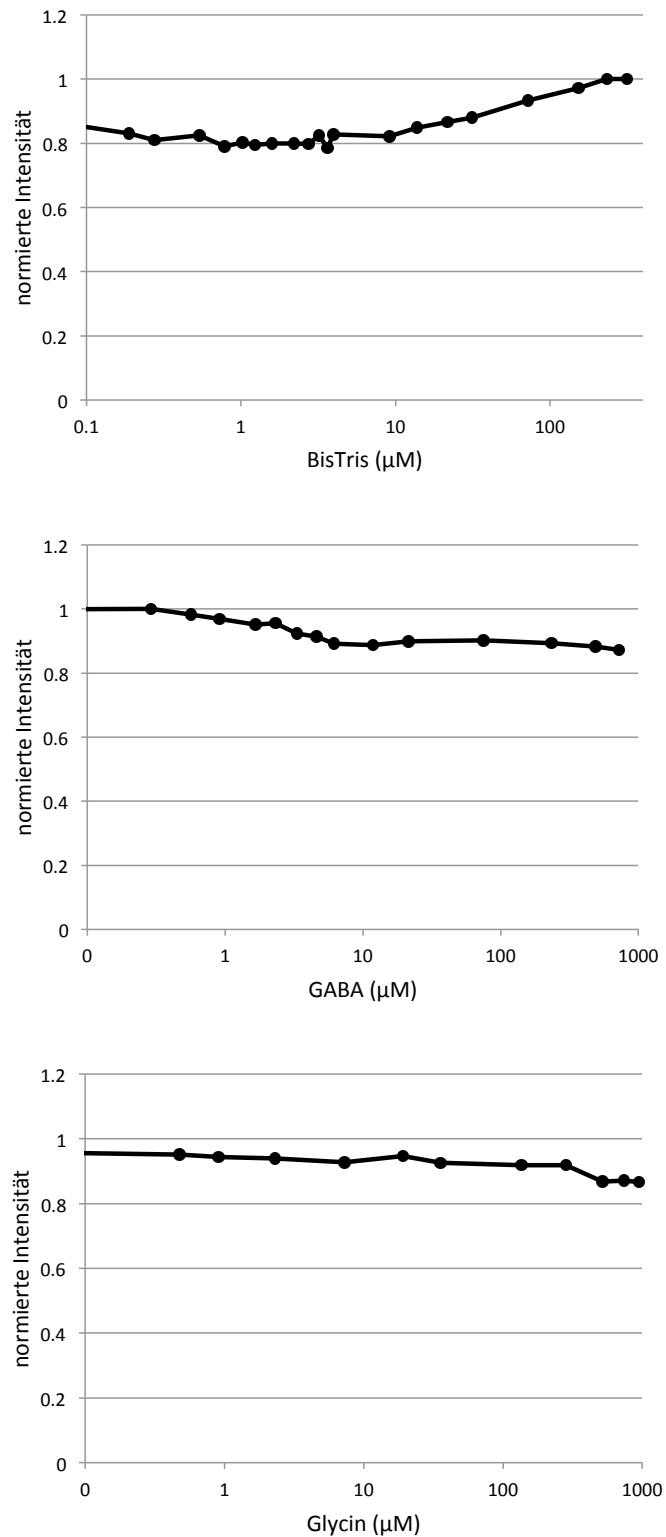


Abb. 54.: Titration von BgAChBP1-F92Y mit den Liganden BisTris, GABA und Glycin. Bei keinem dieser Liganden war eine signifikante Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz messbar.

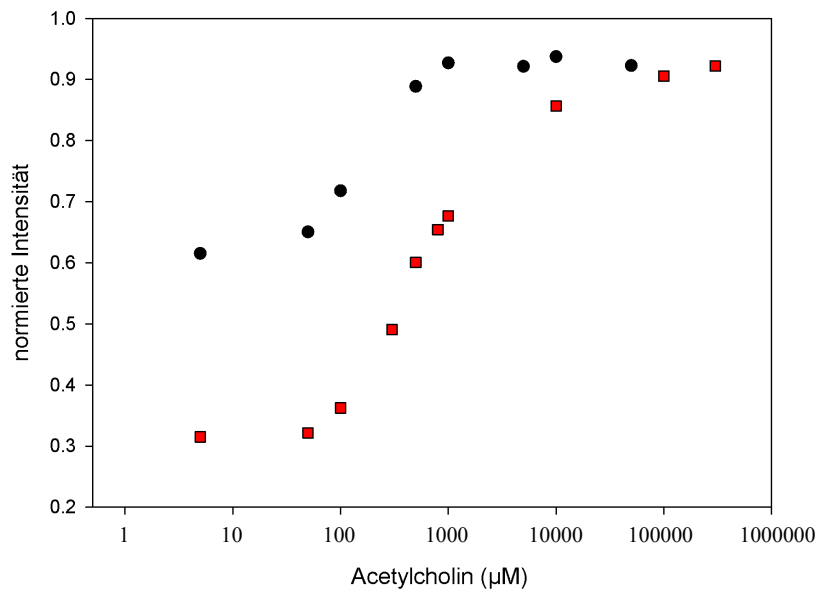


Abb. 55.: Alterungseffekt bei der Mutante *BgAChBP1-F92Y*. Proteinprobe mit verschiedenen Acetylcholin-Konzentrationen wurden vorgelegt und mit Nikotin versetzt (vgl. Kap. 4.4). Bei der frischen Probe (rot) reduzierte sich das Signal zunächst um 30 % und näherte sich anschließend 100 % an. Nach 1 Monat der Lagerung zeigte die Probe (schwarz) nur noch eine Reduktion des Signals um 60 %, nähert sich aber dann analog zur frischen Probe der 100 % an. Dies könnte auf einen Zerfall der Bindungstasche hinweisen.

5. Protein-Ligand-Docking

Nachdem die Bindungseigenschaften von rekombinantem BgAChBP1 *in vitro* untersucht wurden, sollte diese auch *in silico* untersucht werden. In dieser Arbeit wurden dazu die beiden Softwarepakete `Autodock4` (Morris et al., 2009) und `Autodock Vina` (Trott and Olson, 2010) verwendet.

5.1. Vorbereitung des Protein-Ligand-Dockings

Die Grundlage des Protein-Ligand-Dockings bildete das pseudoatomare Modell, welches in Abschnitt 2 „Homologiemodellierung“ (S. 58) als Ergebnis erhalten wurde.

Während des Protein-Ligand-Dockings wurde nur die Bindungstasche berechnet. Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten wurden nicht berücksichtigt, demnach wird hier ein isoliertes Dimer betrachtet.

5.2. Validierung des Protein-Ligand-Dockings mit `Autodock4`

In einem ersten Schritt soll geprüft werden, ob die Software `Autodock4` die Bindungsverhältnisse in einem AChBP wiedergeben kann. Für die Gruppe der BgAChBP ist noch keine Struktur mit Ligand hoch aufgelöst, so dass hier die Kristallstruktur (PDB-ID: 1UW6) eines AChBP von *Lymnaea stagnalis* (Celie et al., 2004) mit Nikotin herangezogen wurde. Es sollte überprüft werden, ob durch die Methode des Protein-Ligand-Dockings das aktive Zentrum passend zur Kristallstruktur rekonstruiert werden kann.

Aus der Kristallstruktur wurde dazu zunächst in `Chimera` ein Dimer aus dem vorhandenen Pentamer ausgeschnitten und der Ligand Nikotin aus der Bindungstasche entfernt. Für die Validierung wurden zwei verschiedene Strukturen angenommen. In dem einen Dimer wurde das Kristallwasser, welches in der Kristallstruktur vorhanden ist (Celie et al., 2004), an seinem Platz belassen, während in der zweiten Struktur dieses Wassermolekül entfernt wurde. Die einzelnen Schritte zur Vorbereitung in `Autodock4` wurden in einem `Python` Skript automatisiert. Für die Varianten mit und ohne Kristallwasser wurde je eine Wiederholungssimulation gestartet.

Während des Dockings wurde der Ligand zufällig in der Box platziert und an einen

Tab. 11.: Ergebnis des Protein-Ligand-Dockings des LsAChBP mit Nikotin zusammengefasst in Cluster (RMSD = 1,0 Å).

Cluster	Anzahl der Ergebnisse in einem Cluster			
	ohne Kristallwasser		mit Kristallwasser	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
0	95	93	181	180
1	69	61	45	46
2	44	56	9	8
3	24	18	5	7
4	10	9	5	4
5	3	5	3	3
6	3	3	2	2
7	2	2	1	1
8	2	2	1	1
9	1	2	1	1
10	1	2	1	1
11	1	1	1	1
12	1	1	1	1
13	0	1	0	0

Punkt mit geringerer Energie verschoben. Die 256 Ergebnisse wurden in Cluster zusammengefasst. Ein Cluster umfasste alle Strukturen, deren Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (*root mean square deviation*) (RMSD) kleiner 1,0 Å betrug. Je größer ein Cluster, desto mehr Strukturen der gleichen räumlichen Ausrichtung sind das Ergebnis eines Dockings. In Tabelle 11 sind für die Struktur mit und ohne Kristallwasser und die jeweiligen Wiederholungsmessungen die Größen der Cluster eingetragen.

Anhand der Wiederholung des Protein-Ligand-Dockings konnte gezeigt werden, dass diese reproduzierbar sind. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Varianten mit und ohne Kristallwasser in der Verteilung der Docking-Ergebnisse auf die Cluster. In Tab. 11 ist zu sehen, dass sich 181 (70 %) Ergebnisse für die Struktur mit Kristallwasser in einem einzigen Cluster befinden. Dieser Cluster ist in Abb. 56 dargestellt. In der linken Abbildung (Abb. 56a) ist der Vergleich zwischen der Lage des Nikotins in der Kristallstruktur und der Lage des Nikotins nach dem Docking in dem größten Cluster abgebildet. Die Überlagerung der beiden Strukturen ergibt einen RMSD-Wert von 1,8 Å. Hierbei kommen die quartären Stickstoffatome an gleicher Stelle zu liegen. Der Pyridin-Ring ist jedoch um 180° verdreht. Für den größten Cluster werden scheinbar keine Wasserstoffbrücken mit dem Pyridin-N1

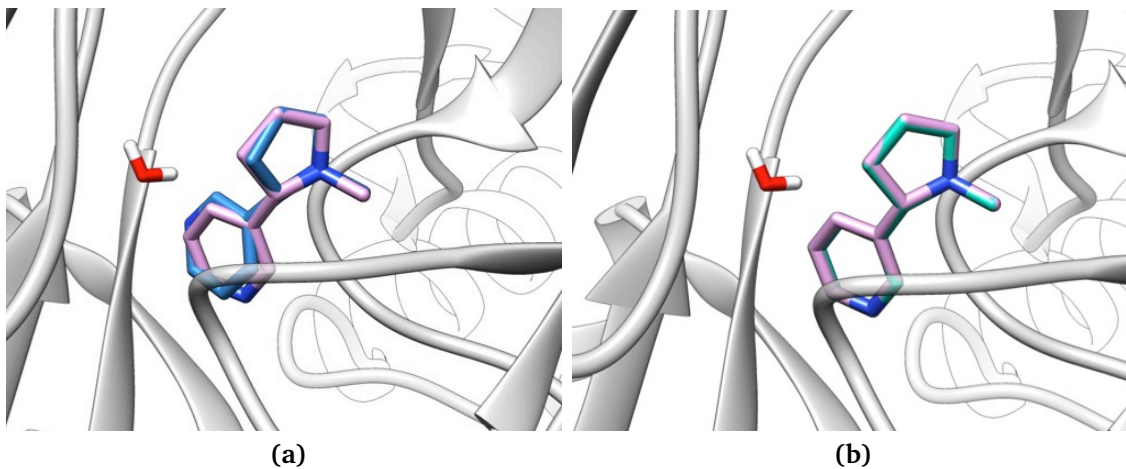


Abb. 56.: Validierung des Dockings mit `Autodock4` anhand des *LsAChBP* mit Nikotin. (a) Lage des originalen Nikotins in der Kristallstruktur mit Kristallwasser (blau) im Vergleich mit dem größten Cluster beim Docking (rosa) (Tab. 11 Versuch 1, Cluster 0); (b) Vergleich der beiden Wiederholungen des Dockings (Tab. 11 rosa: Versuch 1, Cluster 0; grün: Versuch 2, Cluster 0). Die beiden Wiederholungen zeigen identische Ergebnisse, mit einem RMSD von $1,8 \text{ \AA}$ zur originalen Lage.

und dem Kristallwasser erkannt. Das Cluster mit dem besten RMSD-Wert von $0,9 \text{ \AA}$ ist in diesem Fall das zweitgrößte Cluster, in dem lediglich 45 (18%) Ergebnisse zusammengefasst werden können (Tab. 11, Versuch 1, Cluster 1). Hier liegen die Stickstoffatome sowohl des Pyridin-Rings als auch des Pyrrolidin-Rings aufeinander (Abb. 57).

Wurde das Kristallwasser vor dem Docking jedoch aus der Struktur entfernt, finden sich im größten Cluster lediglich 37% der Ergebnisse. In Abb. 59 ist links der Vergleich zwischen der Kristallstruktur und der Lage des größten Clusters des Dockings abgebildet. Die Pyridin-Ringe sind um 180° verdreht, die Pyrrolidin-Ringe haben die gleiche Ausrichtung. Im rechten Teil der Abbildung ist zu sehen, dass die Wiederholung des Dockings zum gleichen Ergebnis führt. Da die Lage des Nikotins in der Kristallstruktur bekannt ist, konnte der Cluster mit der höchsten Übereinstimmung identifiziert werden. Dieser Cluster weist einen RMSD-Wert von $0,8 \text{ \AA}$ auf, beinhaltet jedoch lediglich 10 Ergebnisse (Abb. 59).

Die Lage des Nikotins kann also über das Protein-Ligand-Docking mit `Autodock4` gut rekonstruiert werden. Es scheinen jedoch nicht alle Wechselwirkungen erkannt zu werden. Die Position des quartären Stickstoffatoms wurde beispielsweise sehr gut gefunden. Die Lage des Pyridin-Rings wird über die Wasserstoffbrücke fixiert,

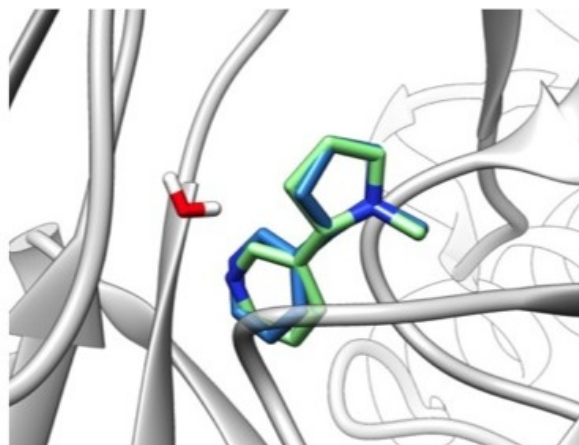


Abb. 57.: Validierung des Dockings mit Autodock4 anhand des *LsAChBP* mit Nikotin. Blau: Lage des Nikotins in der Kristallstruktur mit Kristallwasser; Grün: Lage des Clusters (Tab. 11, Versuch 1, Cluster 1) mit der größten Übereinstimmung (RMSD = 0,9 Å) zur original Lage.

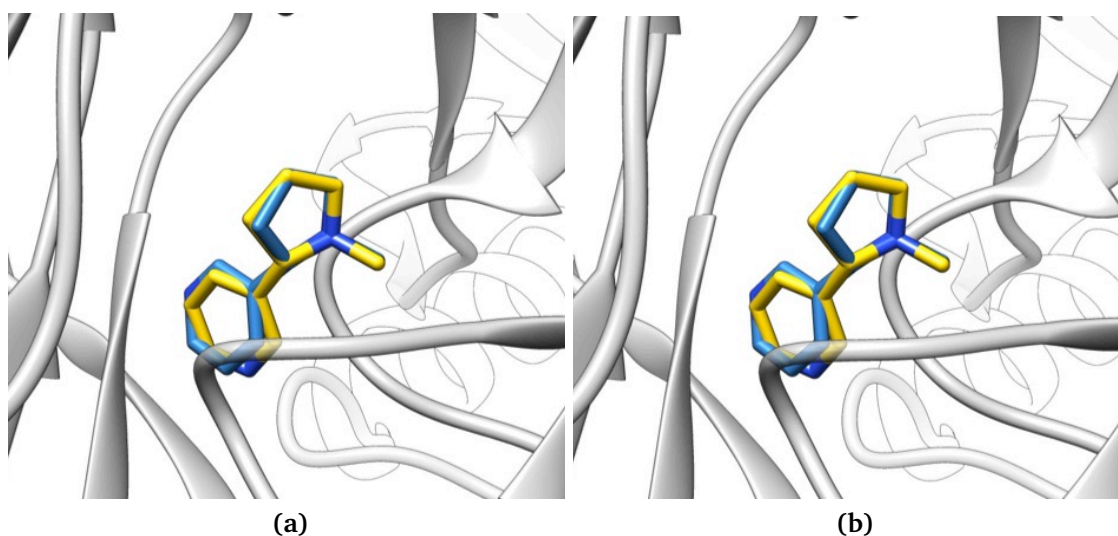


Abb. 58.: Validierung des Dockings mit Autodock4 anhand des *LsAChBP* mit Nikotin. (a) Lage des originalen Nikotins in der Kristallstruktur ohne Kristallwasser (blau) im Vergleich mit dem größten Cluster beim Docking (gelb) (Tab. 11 Versuch 1, Cluster 0); (b) Vergleich der beiden Wiederholungen des Dockings (Tab. 11 gelb: Versuch 1, Cluster 0; grün: Versuch 2, Cluster 0). Die beiden Wiederholungen zeigen identische Ergebnisse, mit einem RMSD von 1,7 Å zur originalen Lage.

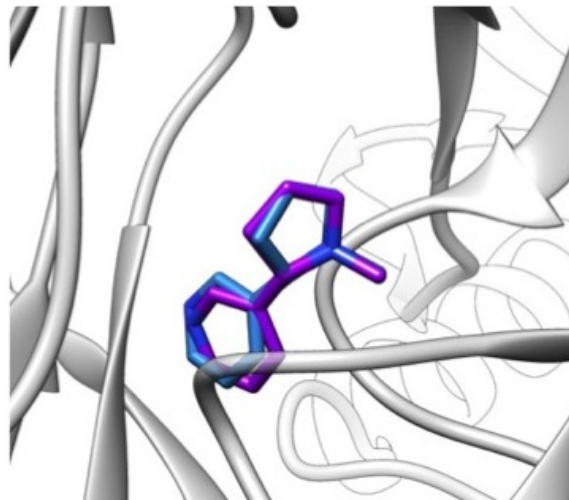


Abb. 59.: Validierung des Dockings mit *Autodock4* anhand des *LsAChBP* mit Nikotin. Blau: Lage des Nikotins in der Kristallstruktur mit Kristallwasser; lila: Lage des Simulations-Clusters (Tab. 11, Versuch 1, Cluster 1) mit der größten Übereinstimmung (RMSD = 0,8 Å) zur Kristallstruktur.

welche sich über ein H₂O-Molekül zu den Aminosäuren L112 und M114 (Celie et al., 2004) aufspannt. *Autodock4* scheint diese Wechselwirkung jedoch nicht zu erkennen. Die korrekte räumliche Ausrichtung des Nikotins tauchte zwar als Ergebnis auf, konnte aber nur mit Hilfe der Referenz als solche identifiziert werden. Es gab keine Möglichkeit, das richtige Ergebnis ohne Referenz zu finden, da andere Ausrichtungen zahlenmäßig überwogen.

5.3. Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* und der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit *Autodock4*

Im Anschluss an die Validierung wurde anhand der Homologiemodelle sowohl mit dem Wildtyp *BgAChBP1* als auch mit der Mutante *BgAChBP1-F92Y* ein Protein-Ligand-Docking durchgeführt.

5.3.1. Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* mit Nikotin

Bei dem Protein-Ligand-Docking des Wildtyps *BgAChBP1* mit Nikotin wurden 256 Ergebnisse erzeugt, die sich in fünf Cluster bündeln ließen (Tab.12). In den größten Cluster fielen 83 Mitgliedern in den nächstgrößeren 82 Mitgliedern. Bei der näheren Betrachtung dieser beiden Gruppen fällt auf, dass beide die gleiche räum-

Tab. 12.: Ergebnis des Protein-Ligand-Dockings des *BgAChBP1* mit Nikotin (Cluster mit $\text{RMSD} = 1,0 \text{ \AA}$).

Cluster	Anzahl Mitglieder
0	83
1	82
2	32
3	32
4	27

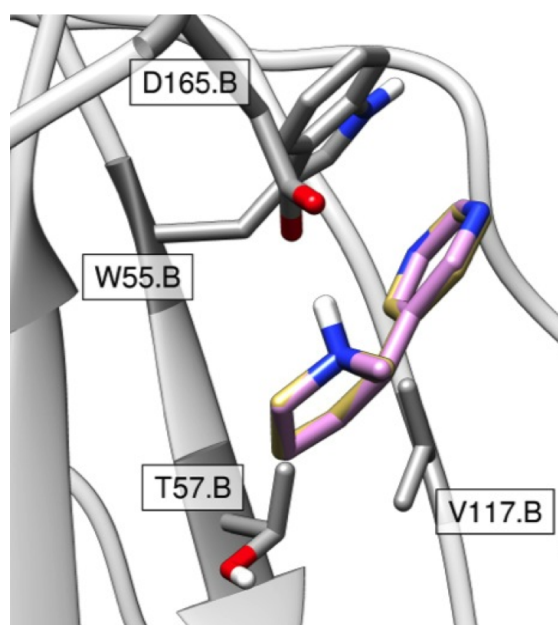


Abb. 60.: Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* mit Nikotin. (a) Gold: Cluster 1 (Tab. 12, 83 Mitglieder); Rosa: Cluster 2 (Tab. 12, 82 Mitglieder). Beide Liganden zeigen die gleiche Lage im Protein.

liche Lage zeigen und sich nur in der Ausrichtung des Pyridin-Rings unterscheiden, die um 180° gegeneinander verdreht sind (Abb. 60).

5.3.2. Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* mit Acetylcholin

Des Weiteren wurde ein Protein-Ligand-Docking mit *BgAChBP1* und Acetylcholin durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Dockings ließen sich in 17 verschiedene Cluster gruppieren (Tab. 13). Auch hier wurden alle Ergebnisse mit einem RMSD kleiner $1,0 \text{ \AA}$ zu einem Cluster zusammengefasst. In Abb. 13 sind sowohl die zwei größten Cluster (a) als auch alle Cluster (b) abgebildet. Es ist zu erkennen, dass alle Strukturen in einem ähnlichen Bereich der Bindungstasche zu liegen kommen.

Tab. 13.: Ergebnis des Protein-Ligand-Dockings des *BgAChBP1* mit Nikotin (Cluster mit RMSD = 1,0 Å).

Cluster	Anzahl Mitglieder
0	80
1	80
2	31
3	24
4	7
5	5
6	4
7	4
8	4
9	4
10	4
11	2
12	2
13	2
14	1
15	1
16	1

Auch die Ausrichtung der Acetylcholin-Moleküle ist vergleichbar. In allen Fällen zeigt dabei das quartäre Stickstoff mit seiner positiven Ladung in die aromatische Tasche, welche von den Aminosäuren W55 und F92 gebildet wird.

5.3.3. Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* mit GABA

Mittels Fluoreszenzmessung konnte keine Bindung zwischen *BgAChBP1* bzw. der Mutante *BgAChBP1-F92Y* und GABA gemessen werden. Dieser Ligand wurde als Negativkontrolle exemplarisch mittels Protein-Ligand-Docking simuliert.

Die 256 Ergebnisse haben sich auf 64 Cluster verteilt. In Abb. 63 sind alle Cluster abgebildet. Ein Teil der Cluster kommt im inneren der Bindungstasche zu liegen, während einige Cluster außerhalb der Tasche vor dem Loop C zu liegen kommen. Die Ergebnisse füllen den Platz in der Box aus, die nicht bereits vom Protein belegt ist. Es fällt jedoch auf, dass alle Carboxyl-Gruppen innerhalb der Bindungstasche auf der gleichen Position zu liegen kommen. Wie schon für das Acetylcholin beobachtet, befindet sich der Sauerstoff in räumlicher Nähe zu den Aminosäuren K142 und Y186.

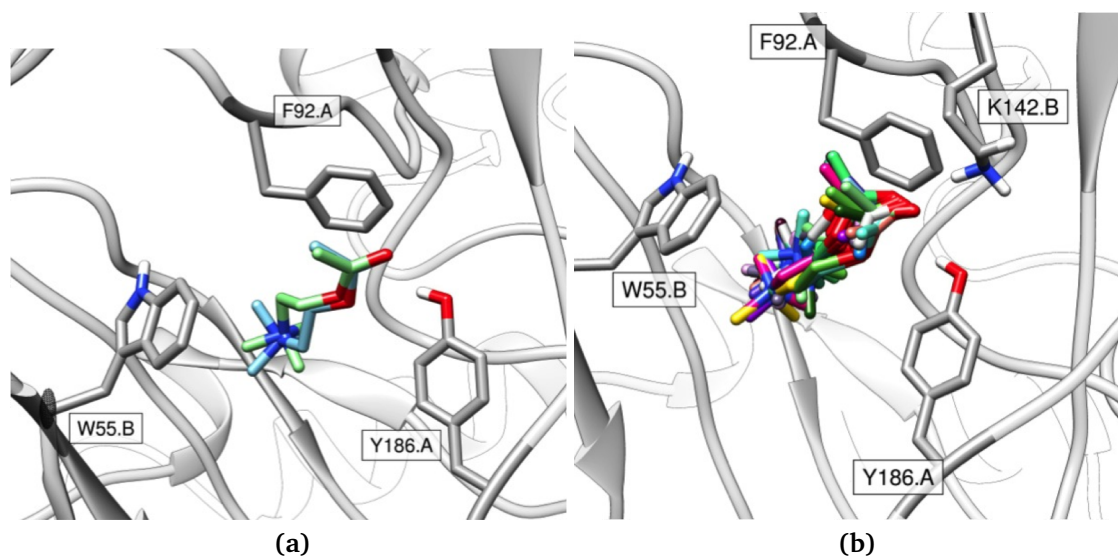


Abb. 61.: Protein-Ligand-Docking des BgAChBP1 mit Acetylcholin. (a) Blau: Cluster 0 (Tab. 13, 80 Mitglieder); Grün: Cluster 1 (Tab. 13, 80 Mitglieder). Beide Liganden zeigen die gleiche Ausrichtung im Protein; (b) Bei der Überlagerung aller Cluster zeigt sich, dass die räumliche Ausrichtung der Acetylcholins im Protein vergleichbar sind.

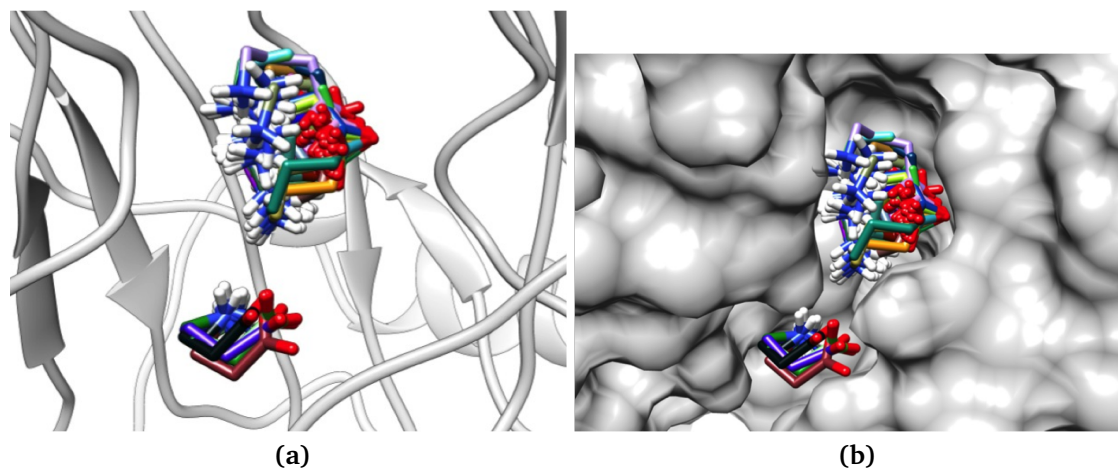


Abb. 62.: Protein-Ligand-Docking des BgAChBP1 mit GABA. Die Cluster verteilen sich innerhalb der Box, welche zur Berechnung gewählt wurde. Allerdings zeigen alle Strukturen innerhalb der Bindungstasche die gleiche Ausrichtung bezüglich der Carboxyl-Gruppe.

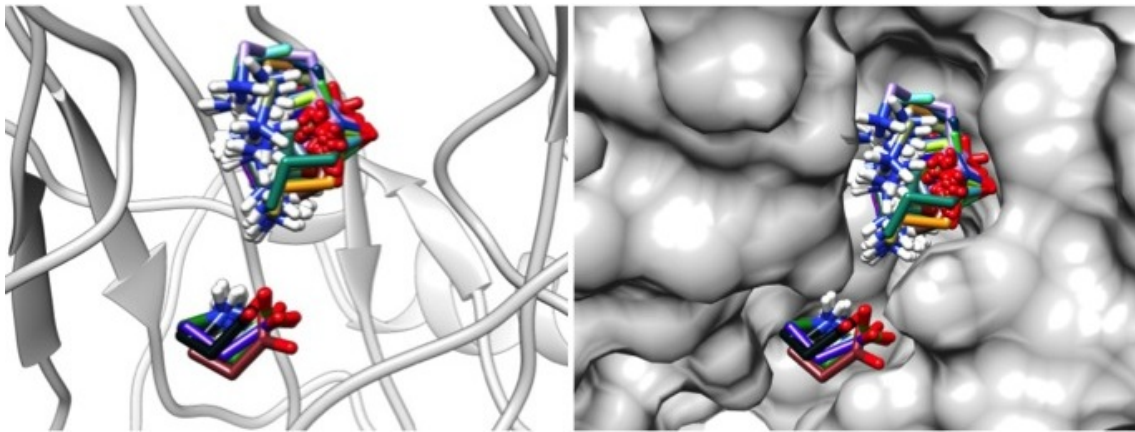


Abb. 63.: Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* mit GABA. Die Cluster verteilen sich innerhalb der Box, welche zur Berechnung gewählt wurde. Allerdings zeigen alle Strukturen innerhalb der Bindungstasche die gleiche Ausrichtung bezüglich der Carboxyl-Gruppe.

Tab. 14.: Ergebnis des Protein-Ligand-Dockings des *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin (Cluster mit RMSD = 1,0 Å).

Cluster	Anzahl Mitglieder
0	250
1	4
2	2

5.3.4. Protein-Ligand-Docking der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin

Für das Protein-Ligand-Docking der Mutante *BgAChBP1-F92Y* ließen sich die 256 Ergebnisse in lediglich drei verschiedene Cluster zusammenfassen (Tab. 14). Die Verteilung innerhalb dieser Cluster war dabei zudem sehr unterschiedlich. Der größte Cluster setzte sich aus 250 Strukturen zusammen, die verbleibenden sechs Ergebnisse bilden die restlichen zwei Cluster. In Abb. 64 sind diese drei Cluster abgebildet. Die blaue und die rosafarbenen Moleküle sind die beiden Cluster mit insgesamt sechs Mitgliedern. Das größte Cluster (grün) liegt an einer anderen Position. Im linken Teil der Abbildung sind die Wechselwirkungen zwischen diesem größtem Cluster und dem *BgAChBP1-F92Y* abgebildet. Der Pyridin-Ring interagiert hier mit den Aminosäuren Y92 und Y186.

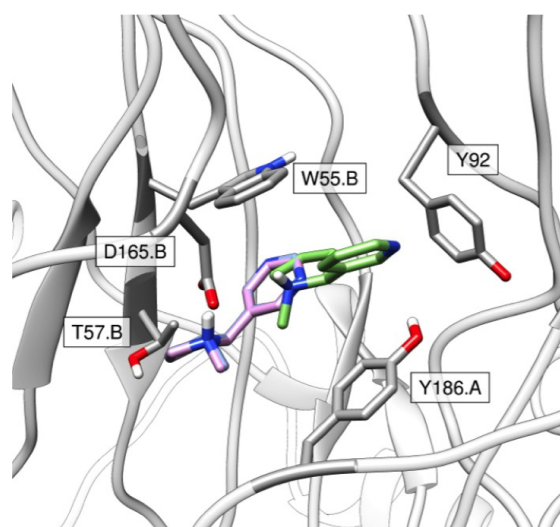


Abb. 64.: Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin. Der größte Cluster (grün, Tab. 14, Cluster 0) kommt an einer anderen Position zu liegen, als die beiden kleinen Cluster (blau, Tab. 14, Cluster 1 und rosa, Tab. 14, Cluster 3).

Tab. 15.: Ergebnis des Protein-Ligand-Dockings des *BgAChBP1* und der Mutante *BgAChBP1-F92Y* zusammengefasst in Cluster (RMSD = 1,0 Å).

Protein	Ligand	Anzahl der Cluster
<i>BgAChBP1</i>	Nikotin	5
<i>BgAChBP1</i>	Acetylcholin	17
<i>BgAChBP1</i>	GABA	64
<i>BgAChBP1-F92Y</i>	Nikotin	3

5.3.5. Vergleich der verschiedenen Protein-Ligand-Docking mit Nikotin

Bei dem Vergleich der verschiedenen Liganden (Tab. 15) fällt auf, dass sich die Anzahl der Cluster stark unterscheidet. Für den Liganden Nikotin wurden hier die geringste Anzahl an Clustern gefunden. Dabei spielte es keine Rolle, ob das *BgAChBP1* oder die Mutante *BgAChBP1-F92Y* betrachtet wurden. Bei diesem Liganden konnte auch eine Bindung mittels Trp-Fluoreszenz gemessen werden. Bei der Überlagerung der beiden Ergebnisse zeigt sich jedoch, dass die Nikotinmoleküle an unterschiedlichen Stellen liegen (Abb. 65). In dieser Abbildung ist im Vergleich zudem die Kristallstruktur des *LsAChBP* mit Nikotin gezeigt, welches sich weder mit dem Ergebnis der Isoform 1 noch mit der Mutante deckt.

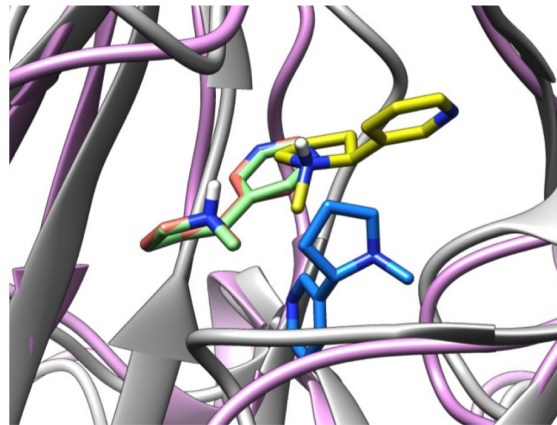


Abb. 65.: Überlagerung der Kristallstruktur des *LsAChBP* (grau) mit Nikotin (blau) und dem *BgAChBP* (rosa) mit dem Ergebnis des Dockings der Isoform 1 (grün/rot) und der Mutante (gelb).

Wie schon für das Softwarepaket *Autodock4* wurde auch für *Autodock Vina* zunächst eine Validierung mit dem *LsAChBP* (PDB-ID: 1UW6) durchgeführt. Auch hier wurde ein Dimer betrachtet, aus welchem zunächst in *Chimera* das Nikotin entfernt wurde. Die zwei Varianten mit und ohne Kristallwasser wurden analog zu der Berechnung in *Autodock4* eingesetzt.

Die beiden Softwarepakete unterscheiden sich in der Ausgabe der Ergebnisse. *Autodock Vina* gibt im Gegensatz zu *Autodock4* die Ergebnisse des Dockings direkt in Cluster aus und nicht als Einzelergebnisse. Aus diesem Grund weicht die Art der Auswertung der Ergebnisse ab. Hier werden die von *Autodock Vina* am besten bewerteten Ergebnisse betrachtet.

Die Ergebnisse mit und ohne Kristallwasser sind in Abb. 66 abgebildet. Die korrekte Lage des Nikotins, gemessen an der Kristallstruktur wird sowohl mit als auch ohne Kristallwasser gefunden. Die Ausrichtung des Pyridin-Rings wie in der Kristallstruktur wurde jedoch nur in der Anwesenheit des H_2O -Moleküls gefunden. Ohne dieses H_2O -Molekül lag der Pyridin-Ring, wie schon in den Simulationen mit *Autodock4*, um 180° verdreht vor.

5.4. Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* und der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit *Autodock Vina*

Analog zu dem Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* und des *BgAChBP1-F92Y* mit verschiedenen Liganden durch das Softwarepaket *Autodock4* wurden diese

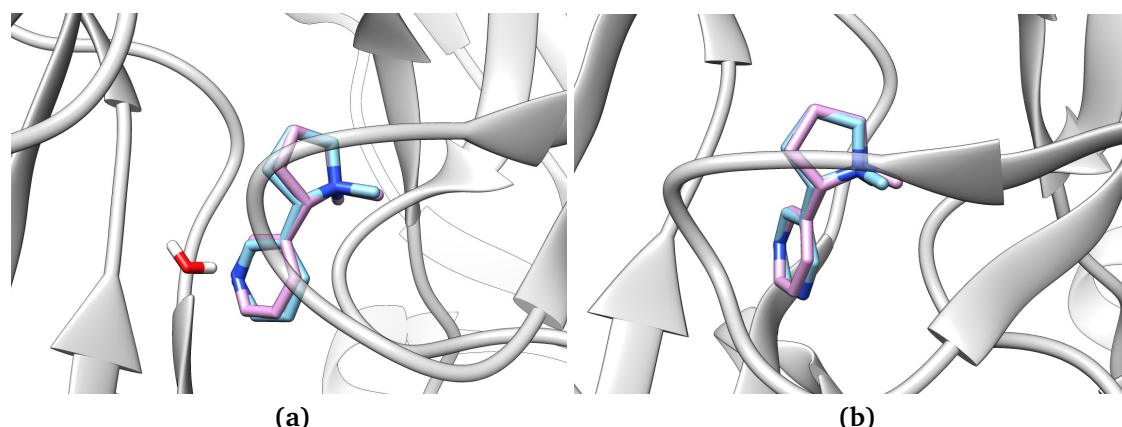


Abb. 66.: Validierung des Protein-Ligand-Dockings des *LsAChBP* mit Nikotin (Autodock Vina). (a) mit Kristallwasser in der Struktur belassen; (b) ohne Kristallwasser. In beiden Fällen wurde die Lage des Nikotins gefunden. Lediglich die Ausrichtung des Pyridin-Rings wurde nur in Anwesenheit des H₂O-Moleküls gefunden.

Simulationen auch in Autodock Vina durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Simulationen verglichen.

5.4.1. Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* mit Nikotin

Zunächst wurden das Protein-Ligand-Docking des Wildtyps *BgAChBP1* mit Nikotin berechnet. In Abb. 67 ist das von Autodock Vina ermittelte Ergebnis dieses Dockings mit dem größten Cluster von Autodock4 verglichen. Die Lage des Nikotins in den größten Clustern der Autodock4 Simulation unterscheidet sich vom besten Ergebnis, welches von Autodock Vina ermittelt wurde. Dieses Ergebnis wurde jedoch auch von Autodock4 gefunden, allerdings als kleiner Cluster mit lediglich 32 Strukturen und wurde nicht als Hauptergebnis betrachtet.

5.4.2. Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* mit Acetylcholin

Beim Vergleich des größten Clusters, welcher für das Docking von *BgAChBP1* mit Acetylcholin aus Autodock4 erhalten wurde, mit der Lage des besten Ergebnisses aus Autodock Vina wird deutlich, dass hier beide Strukturen nicht nur die gleiche Lage, sondern auch die gleiche Ausrichtung der funktionellen Gruppen zeigen (Abb. 68). Beide Stickstoffatome liegen an derselben Position. Auch die Ausrichtung der Ester-Gruppe des Acetylcholins ist vergleichbar.

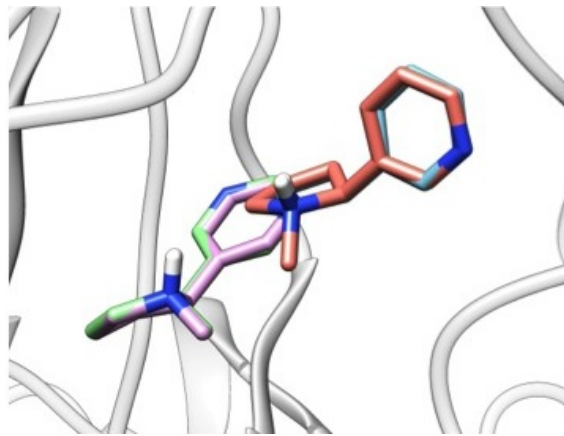


Abb. 67.: Protein-Ligand-Docking des BgAChBP1 mit Nikotin (Autodock Vina und Autodock4). Vergleich der Ergebnisse der beiden Softwarepakete. Rosa und grüne Moleküle sind die größten Cluster, die mit Autodock erhalten wurden. Das beste Ergebnis der Berechnung mit Autodock Vina (blau) liegt an einer anderen Stelle. Genau dieser Cluster wurde auch mit Autodock4 erhalten (rot). Es handelt sich hier allerdings um ein kleines Cluster mit 32 Mitgliedern.

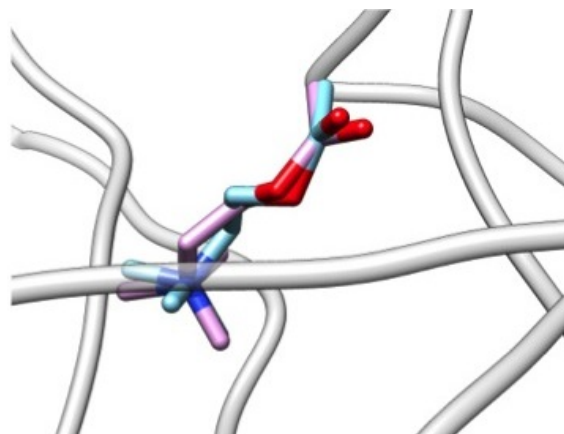


Abb. 68.: Protein-Ligand-Docking des BgAChBP1 mit Acetylcholin (Autodock Vina und Autodock4). Vergleich der Ergebnisse der beiden Softwarepakete. Rosa Molekül sind das größte Cluster, das mit Autodock erhalten wurden. Das beste Ergebnis der Berechnung mit Autodock Vina (blau) zeigt die gleiche Lage. Die beiden Stickstoffatome kommen an der gleichen Position zusammen. Beide Ester-Gruppen haben die gleiche Ausrichtung.

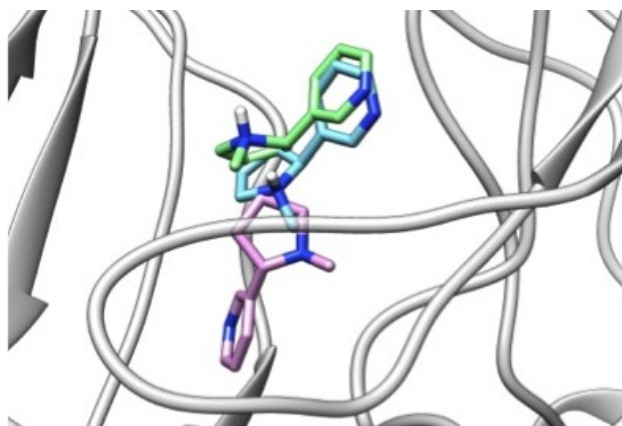


Abb. 69.: Protein-Ligand-Docking des Wildtyps *BgAChBP1* und der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin. Vergleich zwischen der Berechnung mit *BgAChBP1* (grün) und *BgAChBP1-F92Y* (blau). In rosa ist die Lage des Nikotins in der Kristallstruktur des *LsAChBP* abgebildet.

5.4.3. Protein-Ligand-Docking des *BgAChBP1* mit GABA

Für den Liganden GABA konnte beim Protein-Ligand-Docking in *Autodock Vina* erzielt kein eindeutiges Ergebnis werden. Da für diesen Liganden auch mit der Software *Autodock4* eine hohe Anzahl an Clustern mit keiner definierten Lage erhalten wurde, ähneln sich die Ergebnisse beide Programme in diesem Punkt. Der direkte Vergleich zwischen zwei Molekülen entfällt hier aus diesem Grund.

5.4.4. Protein-Ligand-Docking der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin

Um das Bild zu komplementieren, wurde schließlich noch ein Protein-Ligand-Docking der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin durchgeführt. In Abb. 69 ist das Ergebnis der Mutante als blaues Molekül dargestellt. An einer ähnlichen Position kommt auch die Berechnung des *BgAChBP1* (grünes Molekül) zu liegen. Zur Orientierung wurde hier auch das Ergebnis aus der Validierung (*LsAChBP*) abgebildet (rosa Molekül). Das für die Validierung verwendete *LsAChBP* zeigt an der mutierten Stelle von Natur aus ein Tyrosin. Die Lage und die Ausrichtung des Nikotins unterscheidet sich jedoch in der Kristallstruktur des *LsAChBP* von der Lage im *BgAChBP1-F92Y* nach dem Docking.

D. Diskussion

1. 3D-Elektronenmikroskopie des Dodekaeders von *BgAChBP1*

In dieser Arbeit wurde die dreidimensionale Struktur des rekombinanten Acetylcholin-Bindeproteins (AChBP) von *Biomphalaria glabrata* (*BgAChBP1*) untersucht. Das homopentamere AChBP ist bereits für verschiedene Mollusken bekannt. So wurden beispielsweise die Kristallstrukturen von *Lymnaea stagnalis* (Brejc et al., 2001; Smit et al., 2001), *Aplysia californica* (Hansen et al., 2005) und *Bulinus truncatus* (Celie et al., 2005) aufgeklärt. Für diese Proteine wurde eine "Doughnut ähnliche Struktur" (Sixma and Smit, 2003) gefunden, die sich aus fünf Untereinheiten zusammensetzen. Für das *BgAChBP* wurde von Saur et al. (Saur et al., 2012) eine Struktur beschrieben, in der 12 dieser Pentameren zu einem Dodekaeder assembliert vorliegen. In dieser Arbeit wurde die erste Struktur für das native *BgAChBP* gezeigt, welches jedoch glykosyliert vorlag. Diese flexiblen Zuckerreste führen zu einer reduzierten Auflösung der Struktur. Im Folgenden sollte eine hochaufgelöste Rekonstruktion für das rekombinante *BgAChBP1* berechnet werden, welches nicht glykosyliert vorliegt. Hierzu wurden Proben des Proteins in Anwesenheit von Nikotin und in Abwesenheit eines Liganden verwendet. Es konnte eine 4,6 Å-Rekonstruktion für die Probe mit Nikotin und eine 3,7 Å-Rekonstruktion für das *BgAChBP1* in Abwesenheit eines Liganden berechnet werden.

Ein Vergleich zwischen der Rekonstruktion des nativen *BgAChBP* und des rekombinanten *BgAChBP1* zeigt, dass beide Rekonstruktionen annähernd gleiche Größen aufweisen. Ein Pentamer wurde in der nativen Rekonstruktion von Saur et al. (2012) mit einer Höhe und einem Durchmesser von 7 nm - 8 nm angegeben. Die zentrale Pore in jedem Pentamer betrug ca. 2 nm. Diese Abmaße konnten mit der Rekonstruktion des rekombinanten *BgAChBP* bestätigt werden.

Das publizierte Homologiemodell (PDB-ID: 4AOD), welches an der nativen Rekon-

struktions erzeugt wurde, konnte mit einer hohen Übereinstimmung in die 3,7 Å-Rekonstruktion eingepasst werden. Die Übereinstimmung war besonders hoch im Bereich der Sekundärstrukturen. Durch flexibles Fitting des Homologiemodells an der 3,7 Å-Rekonstruktion wurde ein Modell erstellt, das Abweichungen in den Bereichen der Loops zeigt. Insgesamt konnte durch die hohe Auflösung der Rekonstruktion eine Präzisierung des C α -Rückgrats des Homologiemodells erreicht werden. In vielen Bereichen der Rekonstruktion konnten darüber hinaus Aminosäureseitenketten von sterisch anspruchsvollen Aminosäuren aufgelöst werden. Anhand dieser konnte das Homologiemodell weiter verfeinert werden.

Die Lage des Loop C, welcher in der nativen Rekonstruktion nicht vollständig mit Masse bedeckt war, konnte in die 3,7 Å-Rekonstruktion gut eingepasst werden. Hier waren die Massen des Loops darstellbar. In diesem Bereich, der zugleich Teil der Bindungstasche ist, konnten Aminosäureseitenketten aufgelöst werden. Diese Massen wurden beim flexiblen Fitting berücksichtigt. In der geringer aufgelösten nativen Rekonstruktion war dies noch nicht möglich.

Aufgrund der relativ hohen Auflösung der 3,7 Å-Rekonstruktion lässt sich die von Saur et al. (2012) postulierte Disulfidbrücke Saur et al. (2012) zwischen den Aminosäuren C16 und C64 erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Disulfidbrücke das C-terminale Ende der α -Helix an dem Loop 3 desselben Monomers fixiert.

Das Homologiemodell konnte im Bereich der α -Helix genauer eingepasst werden. Wie schon im Loop C waren Aminosäureseitenketten sichtbar, die zum Refinement benutzt werden konnten. Die Kontaktstelle zwischen drei Monomeren zeigt diese hohe Auflösung nicht. Hier konnte das Homologiemodell nicht anhand von Aminosäureseitenketten eingepasst werden. Um eine Aussage über die Wechselwirkungen in der Kontaktstelle zu treffen, wird eine Dichtekarte mit einer höheren Auflösung benötigt.

Die Bindungstasche im Interface zwischen zwei Monomeren ist in der 3D Rekonstruktion gut aufgelöst. Die Lage der sterisch anspruchsvollen, aromatischen Aminosäuren lässt sich gut erkennen. Für die 3,7 Å-Rekonstruktion ist im inneren Bereich der Bindungstasche eine zusätzliche Masse sichtbar. Bei dieser Masse kann es sich um das Puffermolekül BisTris handeln, da bereits Puffermoleküle in der AChBP Bindungstasche gefunden wurden (Brejc et al., 2001). In der Dissertationsarbeit von Dr. Kristiane Rusitzka wurde für die 3D-Rekonstruktion des BgAChBP1 in Abwesenheit von Puffermolekülen, eine ähnliche Masse beschrieben, die jedoch

als Artefakt identifiziert werden konnte. In dieser Struktur wurden noch weitere Artefakte im Bereich der Kamme beschrieben, die in der 3,7 Å-Rekonstruktion jedoch nicht zu finden waren. Die Abwesenheit weiterer Massen in der 3,7 Å-Rekonstruktion legt den Schluss nahe, dass es sich in der Bindungstasche der Struktur in dieser Arbeit um eine Masse handelt, die von einem BisTris-Puffermolekül stammt. Um dies zu verifizieren ist eine erneute Rekonstruktion aus einer frischen Proteinprobe unter anderen Pufferbedingungen nötig.

In dieser Arbeit wurde eine Rekonstruktion angefertigt, in der dem Puffer der Ligand Nikotin zugefügt wurde. Es sollte untersucht werden, ob die Bindung eines Liganden einen Einfluss auf die Struktur des BgAChBP1 zeigte. Für diese Rekonstruktion wurde eine Auflösung von 4,6 Å erhalten. Somit war es nicht möglich ein flexibles Fitting von der gleichen Qualität durchzuführen, wie es bei der 3,7 Å-Rekonstruktion möglich war. Durch das rigide Einpassen des Homologiemodells der 3,7 Å-Rekonstruktion konnte jedoch gezeigt werden, dass keine nachweisbare Strukturänderung stattgefunden hat.

In der 4,6 Å-Rekonstruktion sind die Sekundärstrukturen nicht so gut aufgelöst wie in der 3,7 Å-Rekonstruktion. Die β -Faltblätter sind auch bei einem hohen Schwellenwert nicht einzeln darstellbar. Die Windungen der α -Helix sind nicht definiert. Einzelne Aminosäureseitenketten sind nicht sichtbar. Das $C\alpha$ -Rückgrat des Homologiemodells liegt jedoch innerhalb der Masse. Eine Aussage über die Lage oder Änderungen in der Lage der Aminosäureseitenketten kann nicht gemacht werden. Auch der flexible Loop C zeigt keine Abweichung in der 4,6 Å-Rekonstruktion.

Die Bindungstasche ist gut erkennbar. Der Loop C grenzt hier einen Hohlraum ab. Einzelne Aminosäuren sind aber auch hier nicht erkennbar. Im Bereich der Bindungstasche ist wie schon bei der 3,7 Å-Rekonstruktion eine extra Masse zu erkennen. Diese ist im Vergleich jedoch nicht abgegrenzt, sondern verbindet die Aminosäuren W146 und Y193. Eine Aussage, ob es sich wie bei der 3,7 Å-Rekonstruktion um ein Puffermolekül oder um den Liganden Nikotin handelt, lässt sich anhand der Rekonstruktion nicht treffen. Hierzu müsste eine Rekonstruktion berechnet werden, die eine so hohe Auflösung zeigt, dass die Struktur im inneren der Bindungstasche auflösen kann. Für die 4,6 Å-Rekonstruktion konnten nur knapp die Hälfte der Partikel extrahiert werden. Zudem war die Qualität des Eises und der darin fixierten Partikel minderwertig. Um hier eine höhere Auflösung zu generieren, empfiehlt es sich, neue Aufnahmen unter optimierten Bedingungen durchzuführen.

2. Ligandenbindung von *BgAChBP1* und *BgAChBP1-F92Y*

Die Ligandenbindungseigenschaften des *BgAChBP1* und des *BgAChBP1-F92Y* wurden mittels Trp-Fluoreszenz untersucht. Mit dieser Methode wurden bereits die Bindungseigenschaften zwischen Nikotin bzw. Acetylcholin und AChBPs verschiedener Spezies beleuchtet.

Celie et al. (2004) beschreibt aromatische und hydrophobe Wechselwirkung als hauptsächliche Bindung zwischen den Acetylcholin-Bindeproteinen und deren Liganden. Des Weiteren konnten diese Autoren zeigen, dass Nikotin weitere Wasserstoffbrücken ausbildet, was zu einer höheren Affinität dieses Liganden gegenüber Acetylcholin führt, während das Acetylcholin lediglich hydrophobe und Kation- π -Wechselwirkungen aufweist. Die höhere Affinität des AChBPs von *Lymnaea stagnalis* zu Nikotin wurde von Hansen et al. (2002) mittels Fluoreszenz untersucht. Für diese Spezies wurden eine Dissoziationskonstanten von $K_D = 38$ nM für Nikotin (Hansen et al., 2002) und $K_D = 890$ nM für Acetylcholin (Hansen et al., 2004) gemessen. Das AChBP von *Aplysia californica* weist für Nikotin eine $K_D = 245$ nM auf. Die Dissoziationskonstante für Acetylcholin liegt mit $K_D = 240\,000$ nM drei Zehnerpotenzen über dem Wert von Nikotin (Hansen et al., 2004).

Die höhere Affinität des AChBPs zu Nikotin konnte auch für das *BgAChBP* gemessen werden. Für das *BgAChBP1* wurde für Nikotin eine Dissoziationskonstante von $K_D = 296$ nM und für Acetylcholin eine $K_D = 49\,000$ nM gemessen. Die Mutante zeigt ein ähnliches Bild mit Dissoziationskonstanten für Nikotin von $K_D = 60$ nM und für Acetylcholin von $K_D = 12\,500$ nM (vgl. Tab. 16).

Die Bindungstasche enthält fünf aromatischen Aminosäuren, die in der Familie der Cys-Loop-Rezeptoren hoch konserviert sind Dougherty (2013). Die drei AChBPs sind über vier der aromatischen Aminosäuren konserviert und unterscheiden sich

Tab. 16.: Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten für das AChBP verschiedener Spezies.

	Aminosäuren		$K_{D(\text{Nikotin})}$	$K_{D(\text{Acetylcholin})}$
<i>LsAChBP</i>	W53	Y89	38 nM	89 nM
<i>AcAChBP</i>	Y55	Y93	245 nM	240 000 nM
<i>BgAChBP1</i>	W55	F92	296 nM	49 000 nM
<i>BgAChBP1-F92Y</i>	W55	Y92	60 nM	12 500 nM

jeweils nur in einer Aminosäure (vgl. Tab. 16). Das AChBP von *Lymnaea stagnalis* und *Biomphalaria glabrata* zeigen an der Position 53 bzw. 55 ein Trp wohingegen bei *Aplysia californica* an der entsprechenden Position 55 ein Tyr vorliegt. Der Indolring des Trp weist ein stärker negatives elektrostatisches Potential auf als Tyr oder Phe und ist somit ein attraktiverer Kation-Bindungspartner (Dougherty, 1996). Dies könnte ein Faktor sein, weshalb das AcAChBP in dieser Reihe die niedrigste Affinität zum AChBP aufweist. Xie and Cohen (2001) haben mittels Mutageneseexperimenten gezeigt, dass die Mutation des Trp55, bzw. der jeweils Spezies-spezifischen, analogen Aminosäure, einen starken Effekt auf die Bindung von Acetylcholin hat. Die Kation- π -Wechselwirkung ist in diesem Fall die dominierende Bindung und wurde von Olsen et al. (2014) beschrieben. Der Unterschied ist besonders signifikant für *Lymnaea* und *Aplysia*. Die Affinität von Acetylcholin zu *LsAChBP* ist 270 x höher als zu *AcAChBP*. Die Affinität von *BgAChBP1* liegt zwischen der der anderen beiden Spezies und ist 50 x höher als zu *LsAChBP*. Durch die Mutation des *BgAChBP1* von F92 zu Y92 entsprechen die beschriebenen aromatischen Aminosäuren in der Bindungstasche, denen der Bindungstasche von *Lymnaea*. Die Affinität zum Acetylcholin steigt nach der Mutation um den Faktor 5 an. Es wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass die Affinitäten der Bindung des Acetylcholin zur Mutante ähnlich der des *LsAChBP* sind. Die Bindung von Acetylcholin konnte nicht direkt gemessen werden sondern wurde durch indirekte Titration von Nikotin ermittelt. Diese Änderung im Versuchsaufbau kann ein Grund für die gemessenen Werte sein. Um einen direkten Vergleich erzielen zu können, sollten zudem die verschiedenen Spezies unter den gleichen Bedingungen vermessen werden.

Dieser Effekt der Mutation von *BgAChBP1* zu *BgAChBP1-F92Y* konnte bei der Bindung des Nikotins gefunden werden. Celie et al. (2004) beschreibt hier, dass die Aminosäure W53 (*LsAChBP*) nur beschränkten aromatischen Kontakt zum Nikotin aufweist. Diese Aminosäure spielt für die Bindung daher eine untergeordnete Rolle. Die Affinitäten der verschiedenen Spezies unterscheidet sich für Nikotin um eine Größenordnung und ist damit nicht so signifikant wie es bei Acetylcholin zu beobachten war. Die Mutation an der Stelle 53 bzw. 55 zeigt keinen so großen Einfluss. Celie et al. (2004) hat darüber hinaus gezeigt, dass zwischen dem Y89 (*LsAChBP*) und dem Liganden Nikotin keine aromatische Wechselwirkung stattfindet, die Hydroxylgruppe jedoch einen engen Kontakt aufweist. Sowohl *AcAChBP* und *LsAChBP* zeigen ein Trp an dieser Stelle. Bei dem Wildtyp des *BgAChBP1* fin-

det sich an dieser Stelle jedoch Phe. Die Affinität zu Nikotin ist für das *BgAChBP1* niedriger als die Affinität zu anderen Spezies. Beispielsweise ist die Affinität zum *LsAChBP* fast 8 x höher als zum *BgAChBP1*. Findet jedoch eine Mutation von F92 zu Y92 statt, befindet sich die Affinität eher im Bereich von *LsAChBP*. Nikotin weist zum *LsAChBP* lediglich eine 1,6 x so hohe Affinität auf wie zur Mutanten *BgAChBP1-F92Y* und erfüllt somit die Erwartungen.

Des Weiteren wurde die Bindungseigenschaft der potentiellen Liganden GABA und Glycin untersucht. Diese beiden Moleküle sind die namensgebenden Liganden des GABA-Rezeptors bzw. Glycinrezeptors. Diese Rezeptoren gehören, wie der nikotinische Acetylcholinrezeptor zur Familie der Cys-Loop Rezeptoren. Es konnte hier weder direkt noch indirekt eine Bindung zwischen GABA bzw. Glycin und *BgAChBP1* gemessen werden.

3. Protein-Ligand-Docking von *BgAChBP1* und *BgAChBP1-F92Y*

Mit der Methode der Trp-Fluoreszenz konnten Affinitäten verschiedener Liganden zum *BgAChBP1* und der Mutante *BgAChBP1-F92Y* gemessen werden. Um einen Einblick auf molekularer Ebene zu bekommen, wurde die Bindung mit Hilfe des 3D Modelles simuliert. Hierzu kamen die Programme *Autodock4* und *Autodock Vina* zum Einsatz.

In einem ersten Schritt wurden die beiden Programme validiert, um zu überprüfen inwiefern die errechnete Prognose die ursprüngliche Struktur reproduziert. Hierzu wurde aus der bekannten Struktur des *LsAChBP* (Celie et al. (2004); PDB: 1UW6) das Nikotin zunächst entfernt um dessen Lage anschließend zu reproduzieren. In der Kristallstruktur wurde in der Bindungstasche ein Wassermolekül aufgelöst. Jelesarov and Bosshard (1999) postuliert, dass Kristallwasser im Protein die Komplementarität von komplexen Interfaces erhöht. Ein Kristallwasser in der Bindungstasche der AChBPs konnte in verschiedenen Kristallstrukturen nachgewiesen werden (Hansen et al., 2005; Celie et al., 2005; Olsen et al., 2014). Die Auflösung der 3D-EM Strukturen des *BgAChBP1* war jedoch nicht ausreichend um ein Wassermolekül in der Bindungstasche aufzulösen. Aus diesem Grund wurde die Validierung mit und ohne Kristallwasser ausgeführt.

Mit dem Programm *Autodock4* konnte die Position des Nikotins innerhalb der

Bindungstasche gefunden werden. Für das quartäre Stickstoffatom des Pyrrolidin-Rings konnte die ursprüngliche Position reproduziert werden. Die räumliche Lage des Pyridin-Rings konnte gefunden werden, die genaue Ausrichtung des Stickstoffs war jedoch kein Bestandteil des besten Ergebnisses. Der Pyridin-Ring lag nach dem Docking um 180° rotiert vor. Das Ergebnis des Dockings war sowohl mit als auch ohne Kristallwasser vergleichbar. Die Validierung mit `Autodock4` zeigt, dass das Ergebnis nah an der Referenzstruktur liegt. Lediglich die falsche Lage des Stickstoffs im Pyridin-Ring weist darauf hin, dass nicht alle Wechselwirkungen erkannt werden. Des Weiteren sollte für die Struktur ohne Kristallwasser beachtet werden, dass während des Dockings die Aminosäuren als rigide angenommen werden. Somit liegt eine andere Geometrie in der Bindungstasche vor. An der Stelle des Wassers liegt ein "Loch" vor, welches von den starren Aminosäuren nicht geschlossen werden kann. Für ein aussagekräftiges Ergebnis müssten weitere Strukturen mit verschiedenen Stellungen des Loop C und flexiblen Aminosäuren simuliert werden.

Das Programm `Autodock Vina` lieferte für die Struktur ohne Kristallwasser das gleiche Ergebnis wie das Programm `Autodock4`. Für die Berechnung mit Kristallwasser gibt `Autodock Vina` eine Struktur aus, die sowohl die Lage des quartären Stickstoffs, als auch die Ausrichtung des Stickstoffatoms im Pyridin-Ring aufweist und somit die Kristallstruktur am besten reproduziert. Das Kristallwasser bildet eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Protein und dem Liganden aus. `Autodock Vina` scheint die Wechselwirkungen des *LsAChBP*-Nikotin-Systems besser zu erkennen.

Für alle Validierungsergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass die Ausrichtung der Aminosäuren genau dem Ergebnis entspricht, welches reproduziert werden soll. Eine räumliche Änderung der Aminosäurereste hat eine große Auswirkung auf das Ergebnis. Zudem wird die Bindung von Liganden von einer Änderung der Bindungstasche begleitet (Celie et al., 2004). Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, müsste das System flexibel berechnet werden.

Für das Docking des *BgAChBP1* und der Mutante *BgAChBP1-F92Y* mit Nikotin werden zwei verschiedene Ergebnisse erhalten, die jeweils von der Lage des Nikotins in *LsAChBP* unterscheiden. Die abweichende Lage zur Referenzstruktur (*LsAChBP*) lässt sich dadurch erklären, dass sich bereits die Struktur des Proteins leicht unterscheidet. Das molekulare Modell des *LsAChBP* wurde kristallographisch erhalten, das molekulare Modell der beiden *BgAChBP* Varianten wurde durch einpassen in

das 3D Modell generiert. Bereits geringfügige Abweichungen im Aminosäurerückgrat oder der Ausrichtung der Seitenketten kann zu Änderungen führen. Unterschiede in der Lage des Nikotins konnte auch für die verschiedenen Varianten des *BgAChBP1* beobachtet werden. Für den Liganden Acetylcholin konnte für alle Ergebnisse des Dockings die gleiche Ausrichtung gefunden werden. Das quartäre Stickstoff-Kation liegt in der aromatischen Tasche aus den Aminosäuren W55 und F92. Das gleiche Ergebnis wurde auch mit der Software `Autodock Vina` erzielt.

E. Zusammenfassung

Die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) sind ionotrope Rezeptoren, die als Bestandteil der Synapse an der Nervenregungsübertragung beteiligt sind. Aufgrund ihrer biomedizinischen Relevanz sind sie ein wichtiger Forschungsgegenstand. Viele Untersuchungen wurden an den wasserlöslichen Acetylcholin-Bindeproteinen (AChBP) durchgeführt, welche strukturell und funktionelle Homologe aus der Hämolymphe verschiedener Mollusken und Anneliden sind. Das AChBP ist ein ringförmiges Pentamer mit fünf Ligandenbindungstaschen. Eine Besonderheit zeigt die Struktur des AChBP der Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata*, in dem es einen Dodekaeder aus zwölf Pentameren bildet. In der vorliegenden Arbeit sollten mittels Kryo-3D-Elektronenmikroskopie hochaufgelöste Rekonstruktionen des BgAChBP in Anwesenheit von Nikotin und ohne einen Liganden erstellt werden. Des Weiteren wurden mit den Methoden der Trp-Fluoreszenzmessung und des *in silico*-Dockings die Bindungseigenschaften der Liganden Nikotin, Acetylcholin, BisTris, GABA, Glycin mit der rekombinanten Isoform BgAChBP1 und der durch gerichtete Mutagenese erzeugten Mutante BgAChBP1-F92Y untersucht. Für das rekombinante BgAChBP1 in Anwesenheit des Liganden Nikotin wurde eine 3D-Rekonstruktion mit einer Auflösung von 4,6 Å erreicht. Die 3D-Rekonstruktion des BgAChBP1 in Abwesenheit eines Liganden erreichte dagegen eine Auflösung von 3,7 Å. Hier konnten neben den Sekundärstruktur auch einzelne sterisch anspruchsvolle Aminosäureseitenketten aufgelöst werden. So war es möglich, das Homologiemodell mittels flexiblem Fitting zu präzisieren. Für diese Arbeit konnte vermittels gerichteter Mutagenese die Mutante BgAChBP1-F92Y als funktionelles Protein erzeugt werden. Ein Vergleich der Bindungseigenschaften zeigte, dass die Mutante mit der Aminosäure Y92, sowohl Nikotin als auch Acetylcholin stärker bindet, als der Wildtyp mit der Aminosäure F92. Bei den anderen untersuchten Liganden konnte kein Unterschied beobachtet werden. Die Bindungseigenschaften aller dieser Liganden wurden darüber hinaus *in silico* auf molekularer Ebene betrachtet. Insgesamt bilden die Ergebnisse dieser Arbeit ein solides Fundament für die weitere strukturelle und funktionelle Analyse des BgAChBP1-Dodekaeders.

Literaturverzeichnis

- Aebi, U. and Pollard, T. D. (1987), 'A glow discharge unit to render electron microscope grids and other surfaces hydrophilic.', *Journal of Electron Microscopy Technique* **7**(1), 29–33.
- Amiri, S., Sansom, M. S. P. and Biggin, P. C. (2007), 'Molecular dynamics studies of AChBP with nicotine and carbamylcholine: the role of water in the binding pocket.', *Protein Engineering, Design & Selection* **20**(7), 353–359.
- Anandakrishnan, R., Aguilar, B. and Onufriev, A. V. (2012), 'H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations.', *Nucleic Acids Research* **40**(Web Server issue), 537–541.
- Arias, H. R. (2000), 'Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors', *Neurochemistry International* **36**(7), 595–645.
- Brejc, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A. B. and Sixma, T. K. (2001), 'Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors.', *Nature* **411**(6835), 269–276.
- Brenner, S. and Horne, R. W. (1959), 'A Negative Staining Method for High Resolution Electron Microscopy of Viruses', *Biochimica et Biophysica Acta* **34**, 103–110.
- Celie, P. H. N., Klaassen, R. V., van Rossum-Fikkert, S. E., van Elk, R., van Nie-roop, P., Smit, A. B. and Sixma, T. K. (2005), 'Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors.', *The Journal of Biological Chemistry* **280**(28), 26457–26466.

- Celie, P. H. N., van Rossum-Fikkert, S. E., van Dijk, W. J., Brejc, K., Smit, A. B. and Sixma, T. K. (2004), 'Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures.', *Neuron* **41**(6), 907–914.
- Dellisanti, C. D., Yao, Y., Stroud, J. C., Wang, Z.-Z. and Chen, L. (2007), 'Crystal structure of the extracellular domain of nAChR α 1 bound to α -bungarotoxin at 1.94 Å resolution', *Nature Neuroscience* **10**, 953.
- Dougherty, D. A. (1996), 'Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp.', *Science* **271**(5246), 163–168.
- Dougherty, D. A. (2013), 'The Cation - π Interaction', *Accounts of Chemical Research* **46**(4), 885–893.
- Downing, K. H. and Glaeser, R. M. (2008), 'Restoration of weak phase-contrast images recorded with a high degree of defocus: The "twin image" problem associated with CTF correction', *Ultramicroscopy* **108**(9), 921–928.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. and Schultz, P. (1988), 'Cryo-electron microscopy of vitrified specimens.', *Quarterly Reviews of Biophysics* **21**(2), 129–228.
- Dubochet, J., Adrian, M., Lepault, J. and McDowell, A. (1985), 'Cryo-electron microscopy of vitrified biological specimens', *Trends in Biochemical Sciences* **10**(April), 143–146.
- Dubochet, J. and McDowell, A. W. (1981), 'Vitrification of pure water for electron microscopy', *Journal of Microscopy* **124**(3), 3–4.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. and Cowtan, K. (2010), 'Features and development of Coot', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**(4), 486–501.
- Gao, H., Valle, M., Ehrenberg, M. and Frank, J. (2004), 'Dynamics of EF-G interaction with the ribosome explored by classification of a heterogeneous cryo-EM dataset', *Journal of Structural Biology* **147**(3), 283–290.
- Gomez, J., Hilser, V. J., Xie, D. and Freire, E. (1995), 'The Heat Capacity of Proteins', *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **22**, 404–412.

- Gordon, J. C., Myers, J. B., Folta, T., Shoja, V., Heath, L. S. and Onufriev, A. (2005), 'H++: A server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules', *Nucleic Acids Research* **33**(2), 368–371.
- Grant, T. and Grigorieff, N. (2015), 'Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å reconstruction of rotavirus VP6', *eLife* **4**, 1–19.
- Grigorieff, N. (2007), 'FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures.', *Journal of Structural Biology* **157**(1), 117–125.
- Grimsley, G. R. and Pace, C. N. (2003), 'Spectrophotometric determination of protein concentration.', *Current Protocols in Protein Science* pp. 3.1.1–3.1.9.
- Hansen, S. B., Radic, Z., Talley, T. T., Molles, B. E., Deerinck, T., Tsigelny, I. and Taylor, P. (2002), 'Tryptophan fluorescence reveals conformational changes in the acetylcholine binding protein.', *The Journal of Biological Chemistry* **277**(44), 41299–41302.
- Hansen, S. B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P. and Bourne, Y. (2005), 'Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations.', *The EMBO Journal* **24**(20), 3635–3646.
- Hansen, S. B., Talley, T. T., Radic, Z. and Taylor, P. (2004), 'Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from *Aplysia californica*.', *The Journal of Biological Chemistry* **279**(23), 24197–24202.
- Harris, J. R. (1997), 'Negative Staining and Cryoelectron Microscopy', *BIOS Scientific Publishers* .
- Hohn, M., Tang, G., Goodyear, G., Baldwin, P. R., Huang, Z., Penczek, P. a., Yang, C., Glaeser, R. M., Adams, P. D. and Ludtke, S. J. (2007), 'SPARX, a new environment for Cryo-EM image processing', *Journal of Structural Biology* **157**(1), 47–55.
- Jelesarov, I. J. and Bosshard, H. R. (1999), 'Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition.', *Journal of Molecular Recognition : JMR* **12**(1), 3–18.

- Kastner, B., Fischer, N., Golas, M. M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., Uchtenhagen, H., Urlaub, H., Herzog, F., Peters, J. M., Poerschke, D. and Lu, R. (2008), 'GraFix : sample preparation for single- particle electron cryomicroscopy', *Nature Methods* **5**(1), 53–55.
- Klebe, G. (2009), *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, 2 edn, Spektrum Akademischer Verlag.
- Koob, G. F. (1996), 'Drug addiction: The Yin and Yang of hedonic homeostasis', *Neuron* **16**(5), 893–896.
- Lakowicz, J. R., ed. (2006a), *Protein Fluorescence*, Springer US, Boston, MA, pp. 529–575.
- Lakowicz, J. R., ed. (2006b), *Solvent and Environmental Effects*, Springer US, Boston, MA, pp. 205–235.
- Lander, G. C., Stagg, S. M., Voss, N. R., Cheng, A., Fellmann, D., Yoshioka, C., Irving, C., Mulder, A., Lau, P.-w., Potter, C. S. and Carragher, B. (2010), 'Appion: an integrated, database-driven pipeline to facilitate EM image processing', *Journal of Structural Biology* **166**, 95–102.
- Lieb, B., Dimitrova, K., Kang, H.-S., Braun, S., Gebauer, W., Martin, A., Hanelt, B., Saenz, S. A., Adema, C. M. and Markl, J. (2006), 'Red blood with blue-blood ancestry: Intriguing structure of a snail hemoglobin', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(32), 12011–12016.
- Lindstrom, J. (1997), 'Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease', *Molecular Neurobiology* **15**(2), 193–222.
- Ludtke, S. J., Baker, M. L., Chen, D. H., Song, J. L., Chuang, D. T. and Chiu, W. (2008), 'De Novo Backbone Trace of GroEL from Single Particle Electron Cryomicroscopy', *Structure* **16**(3), 441–448.
- Mindell, J. a. and Grigorieff, N. (2003), 'Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy', *Journal of Structural Biology* **142**(3), 334–347.

- Moeller, A., Lee, S. C., Tao, H., Speir, J. A., Chang, G., Urbatsch, I. L., Potter, C. S., Carragher, B. and Zhang, Q. (2015), 'Distinct Conformational Spectrum of Homologous Multidrug ABC Transporters', *Structure* **23**(3), 450–460.
- Möller, V. (2012), Charakterisierung und Expression zweier multimerer Hämolympheproteine der Schnecke *Biomphalaria glabrata*, PhD thesis.
- Morris, G. M. and Huey, R. (2009), 'AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility', *Journal of Computational Chemistry* **30**(16), 2785–2791.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009), 'Software News and Updates AutoDock4 and AutoDockTools4 : Automated Docking with Selective Receptor Flexibility', *Wiley Periodicals* .
- Murray, J. M. and Ward, R. (1987), 'Principles for the Construction and Operation of a Device for Rapidly Freezing Suspensions for Cryo-Electron Microscopy', *Journal of Electron Microscopy Technique* **5**, 279–284.
- Nagata, K., Aistrup, G. L., Huang, C.-S., Marszalec, W., Song, J.-H., Yeh, J. Z. and Narahashi, T. (1996), 'Potent modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by ethanol', *Neuroscience Letters* **217**(2), 189–193.
- Ohi, M., Li, Y., Cheng, Y. and Walz, T. (2004), 'Negative Staining and Image Classification – Powerful Tools in Modern Electron Microscopy', *Biological Procedures Online* **6**(1), 23–34.
- Olsen, J. A., Balle, T., Gajhede, M., Ahring, P. K. and Kastrup, J. S. (2014), 'Molecular Recognition of the Neurotransmitter Acetylcholine by an Acetylcholine Binding Protein Reveals Determinants of Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors.', *PloS One* **9**(3), e91232.
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P. and Salemme, F. R. (2001), 'High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery', *Journal of Biomolecular Screening* **6**(6), 429–440.

- Penczek, P. A., Zhu, J., Schröder, R. and Frank, J. (1997), 'Three Dimensional Reconstruction with Contrast Transfer Compensation from Defocus Series', *Scanning Microscopy* **11**(518), 147–154.
- Rosenthal, P. B. and Henderson, R. (2003), 'Optimal Determination of Particle Orientation, Absolute Hand, and Contrast Loss in Single-particle Electron Cryo-microscopy', *Journal of Molecular Biology* **333**(4), 721–745.
- Ruskin, R. S., Yu, Z. and Grigorieff, N. (2013), 'Quantitative characterization of electron detectors for transmission electron microscopy.', *Journal of Structural Biology* **184**(3), 385–393.
- Sander, T., Bruun, A. T. and Balle, T. (2010), 'Docking to flexible nicotinic acetylcholine receptors: a validation study using the acetylcholine binding protein.', *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **29**(3), 415–424.
- Saur, M., Moeller, V., Kapetanopoulos, K., Braukmann, S., Gebauer, W., Tenzer, S. and Markl, J. (2012), 'Acetylcholine-binding protein in the hemolymph of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* is a pentagonal dodecahedron (60 subunits).', *PloS One* **7**(8), e43685.
- Saxton, W. O. and Frank, J. (1977), 'Motif detection in quantum noise-limited electron micrographs by cross-correlation.', *Ultramicroscopy* **2**(2-3), 219–227.
- Schapira, M., Abagyan, R. and Totrov, M. (2002), 'Structural model of nicotinic acetylcholine receptor isotypes bound to acetylcholine and nicotine.', *BMC Structural Biology* **2**, 1–8.
- Schatz, M. (1992), Invariante Klassifizierung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von eiseingebetteten biologischen Makromolekülen, PhD thesis, Freie Universität Berlin.
- Scheres, S. H. W. and Chen, S. (2012), 'Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination.', *Nature Methods* **9**(9), 853–854.
- Schuldt, L. and Weiss, M. S. (2010), 'Stabilization of proteins for crystallization – how Thermofluor can help', *Biological Structures* (Newsletter), 3–4.
- Sine, S. M., Quirams, P., Papanikolaous, F., Kreienkampl, H.-j. and Taylor, P. (1994), 'Conserved Tyrosines in the alpha Subunit of the Nicotinic Acetylcholine

- Receptor Stabilize Quaternary Ammonium Groups of Agonists and Curariform Antagonists', *The Journal of Biological Chemistry* **269**(12), 8808–8816.
- Sixma, T. K. and Smit, A. B. (2003), 'Acetylcholine binding protein (AChBP): a secreted glial protein that provides a high-resolution model for the extracellular domain of pentameric ligand-gated ion channels.', *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **32**, 311–334.
- Smit, A. B., Syed, N. I., Schaap, D., van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K. S., Lodder, H., van der Schors, R. C., van Elk, R., Sorgedrager, B., Brejc, K., Sixma, T. K. and Geraerts, W. P. M. (2001), 'A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission', *Nature* **411**(6835), 261–268.
- Stark, H. (2010), 'GraFix: stabilization of fragile macromolecular complexes for single particle cryo-EM.', *Methods in Enzymology* **481**, 109–126.
- Steinlein, O. K., Mulley, J. C., Propping, P., Wallace, R. H., Phillips, H. A., Sutherland, G. R., Scheffer, I. E. and Berkovic, S. F. (1995), 'A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy', *Nature Genetics* **11**, 201.
- Thon, F. (1966), 'Zur Defokussierungsabhängigkeit des Phasenkontrastes bei der elektronenmikroskopischen Abbildung', *Zeitschrift für Naturforschung* **21a**, 476–478.
- Thordarson, P. (2011), 'Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry', *Chemical Society Reviews* **40**(3), 1305–1323.
- Thuman-Commike, P. a. and Chiu, W. (2000), 'Reconstruction principles of icosahedral virus structure determination using electron cryomicroscopy', *Micron* **31**(6), 687–711.
- Trott, O. and Olson, A. J. (2010), 'AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multi-threading', *Journal of Computational Chemistry* **31**(2), 455–461.
- Unwin, N. (2005), 'Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution', *Journal of Molecular Biology* **346**(4), 967–989.

- van de Weert, M. (2010), 'Fluorescence quenching to study protein-ligand binding: common errors.', *Journal of Fluorescence* **20**, 625–629.
- van Heel, M. and Schatz, M. (2005), 'Fourier shell correlation threshold criteria.', *Journal of Structural Biology* **151**(3), 250–262.
- Vivian, J. T. and Callis, P. R. (2001), 'Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins', *Biophysical Journal* **80**, 2093–2109.
- Xie, Y. and Cohen, J. B. (2001), 'Contributions of Torpedo Nicotinic Acetylcholine Receptor Trp-55 and Trp-57 to Agonist and Competitive Antagonist Function', *Journal of Biological Chemistry* **276**(4), 2417–2426.
- Zernike F. (1955), 'How I Discovered Phase Contrast', *Science* **121**(3141), 345–349.
- Zhong, W., Gallivan, J. P., Zhang, Y., Li, L., Lester, H. A. and Dou (1998), 'From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology : A cation – binding site in the nicotinic receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(October), 12088–12093.

Danksagung

Ich danke...

... Prof. Dr. Jürgen Markl für die Bereitstellung des Themas sowie des Labor- und Arbeitsplatzes, die Betreuung im experimentellen Teil und für die kritische Durchsicht und Kommentierung meines Manuskripts.

... Prof. Dr. Dirk Schneider für die Übernahme der zweiten Berichterstattung meiner Arbeit.

... Dr. Frank Depoix für die Einweisung am Elektronenmikroskop sowie viele hilfreiche Tipps und Unterstützung.

... Prof. Dr. Nadja Hellmann für die geduldige Hilfe bei der Trp-Fluoreszenzmessung und deren Auswertung.

... [REDACTED] für die Hilfe bei den Docking-Versuchen.

... [REDACTED], Dr. Ashwin Chari und [REDACTED] vom Institut für Biochemie des Max-Planck Instituts Göttingen für die Optimierung der Pufferbedingungen des *BgAChBP1* und die Kryo-EM-Aufnahmen des *BgAChBP1* mit und ohne Nikotin.

... Dr. Kristiane Rusitzka für die exzellente Zusammenarbeit und die Hilfe bei der rekombinanten Expression und Mutation des *BgAChBP* und eine tolle Zusammenarbeit sowie der gesamten AG Markl für viele interessante Gespräche, Diskussionen und das gute Arbeitsklima.

... meinem Mann Matthias und meinen Eltern Margit und Elmar für die stetige Unterstützung.

Erklärung

Erklärung

Ich versichere hiermit die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Ort, Datum

Sandra Arnold

Copyright

Die Inhalte dieses Werkes sind urheberrechtliches Eigentum des Instituts für Molekulare Physiologie im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Abkürzungen

3D	dreidimensional
ACF	Autokorrelation(<i>auto correlation function</i>)
ACh	Acetylcholin
AChBP	Acetylcholin-Bindeprotein
BgAChBP	Acetylcholin-Bindeprotein von <i>B. glabrata</i>
BgAChBP1	Isoform 1 des Acetylcholin-Bindeprotein von <i>B. glabrata</i>
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
CTF	Kontrast-Transfer-Funktion
ddH₂O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EM	Elektronenmikroskop
<i>f</i>	Intensität des Messwertes
<i>f₀</i>	Intensität der reinen Proteinprobe
<i>f_{max}</i>	maximale Fluoreszenz
FSC	Fourier-Schalen-Korrelation
FWHM	Halbwertsbreite (<i>Full width at half maximum</i>)
GABA	γ -Aminobuttersäure
His-Tag	6x Histidin-Affinitäts-Tag

K_D	Dissoziationskonstante (mol/l)
L_0	Konzentration des Liganden
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MPI	Max-Planck-Institut
MSA	multivariate statistischen Analyse
nAChR	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
OD	optische Dichte
P_0	Konzentration des Proteins
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSF	Punktspreizfunktion (<i>point spread function</i>)
R^2	Bestimmtheitsmaß
RMSD	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (<i>root mean square deviation</i>)
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
TEV	sequenzspezifische Cystein Protease des Tobacco Etch Virus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Liste der Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Aminosäure	Abkürzung
Alanin	Ala A	Arginin	Arg R
Asparagin	Asn N	Asparaginsäure	Asp D
Cystein	Cys C	Glutamin	Gln Q
Glutaminsäure	Glu E	Glycin	Gly G
Histidin	His H	Isoleucin	Ile I
Leucin	Leu L	Lysin	Lys K
Methionin	Met M	Phenylalanin	Phe F
Prolin	Pro P	Serin	Ser S
Threonin	Thr T	Tryptophan	Trp W
Tyrosin	Tyr Y	Valin	Val V

Anhang

Nährmedien und Puffer

Bindepuffer/Waschpuffer für Ni-NTA Säule	20 mM Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaCl 20 mM Imidazol 8 M Harnstoff 1 mM β-Mercaptoethanol pH = 7,4
--	---

Bis-Tris-Puffer	20 mM BisTris 10 mM CaCl ₂ 10 mM MgCl ₂ pH = 6,5
-----------------	---

Chromatographie (Puffer A)	50 mM Tris 5 mM CaCl ₂ 5 mM MgCl ₂ pH = 7,4
----------------------------	--

Chromatographie (Puffer B)	50 mM Tris 5 mM CaCl ₂ 5 mM MgCl ₂ 1 M NaCl pH = 7,4
----------------------------	--

Dialyse Puffer (Tris-Puffer)	20 mM Tris/HCl pH = 7,5
------------------------------	----------------------------

Anhang

Elutionspuffer für Ni-NTA Säule	20 mM Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaCl 0,5 mM Imidazol 8 M Harnstoff 1 mM β-Mercaptoethanol pH = 7,4
Faltungspuffer	0,1 M Tris 0,5 M L-Arginin 0,9 mM ox. Glutathion 2 mM EDTA pH = 8,0
LB-Agar (pro Liter)	20 g Agar-Agar pro Liter LB-Medium
L-Arabinose Lösung	20 % L-Arabinose
LB-Medium (pro Liter)	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt pH = 7,0
Lysis Puffer	3 mM KH ₂ PO ₄ 47 nM K ₂ HPO ₄ 0,4 M NaCl 0,1 M KCl 1,4 M Glycerin 0,2 M Triton X 100 10 mM Imidazol pH = 7,8
Lysozym Lösung	1 g Lysozym (5 %) 19 mL 10 mM Tris pH = 7,5
10x Probenpuffer	10 % Glycerin 0,4 % Bromphenolblau

SOC-Medium (pro Liter)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 mL 1 M KCl 10 mL 1 M MgCl ₂ 20 mL 1 M Glukose pH = 7,0
1x TBE Puffer	0,9 M Tris/Cl 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA
Tris-Puffer	20 mM Tris pH = 7,5
Tris-Salz-Puffer	20mM Tris 10mM CaCl ₂ 10mM MgCl ₂ pH = 7,5

Puffersubstanzen der Thermoflour-Methode

Puffersubstanz	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH
ADA	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4
BisTris	5,8	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2
Hepes	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2
Imidazole	6,2	6,45	6,7	6,95	7,2	7,45	7,7	7,85
MES	5,5	5,7	5,9	6,1	6,3	6,5	6,7	6,9
MMT	5,6	6,0	6,4	6,8	7,2	7,6	8,0	8,4
PCB	5,6	6,0	6,4	6,8	7,2	7,6	8,0	8,4
Phosphate	5,8	6,1	6,4	6,7	7,0	7,3	7,6	7,9
Sodium citrate	5,5	5,75	6,0	6,25	6,5	6,75	7,0	7,25
SPG	5,6	6,0	6,4	6,8	7,2	7,6	8,0	8,4
Tris	7,5	7,7	7,9	8,1	8,3	8,5	8,8	9,0

```

#!/usr/bin/python2.7

import os
from optparse import OptionParser
import sys
import shutil
import operator
import time

##### set Fixed Variables
Path_Modules =
"/apps/prod/autodock/MGLTools/MGLToolsPckgs/AutoDockTools/Utilities24"
npts_x=24
npts_y=24
npts_z=24
spacing=1
ga_num_evals=25000000
ga_pop_size=300
ga_run=256
rmstol=2.0

#### Optionparsing
parser=OptionParser()
parser.add_option("-r", "--receptor",dest="receptor",help="NAME of
Receptorfile",metavar="<receptor.pqr>")
parser.add_option("-l", "--ligand",dest="ligand",help="NAME of one
Ligand",metavar="<ligandname.mol2>")
parser.add_option("-a", "--aminoacid#",dest="aminoacid",help="Center
Gridbox on Center of the given aminoacid",metavar="AtomID")
parser.add_option("-s", "--submit", dest="submit", help="Submit the Job
to the Queue",action="store_true",metavar="default is none")
(options, args) = parser.parse_args()

#### Define the printout if variables are set wrong!
def usage():
    print("No Values given!!!!")
    print("Need at least -r and -l -> check -h")

#### Check if necessary Variables are there
if (options.receptor != None) and ( options.ligand != None):
    pass
else:
    usage()
    sys.exit()

### Set Variables
## General
Receptor_raw = options.receptor
Stem = Receptor_raw.split(".")[0]
Stem_name=Stem+"_s"
Receptor=Stem+".pdb"
Working_dir = os.getcwd()
Ligand = options.ligand
Ligand_name = Ligand.split(".")[0]
## for gpf
Center_Box = options.aminoacid
# get center of grid box
get_Aminoacids_for_center=options.aminoacid
get_center = get_Aminoacids_for_center.split(",")
print(str(get_center[1]))

```

```

print(type(get_center))
gridcenter=None
f = open(Receptor_raw, "r")
grid_x=0
grid_y=0
grid_z=0
for lines in f:
    if "ATOM " and str(get_center[0]) in lines:
        print(lines)
        c = lines.split()
        print("YEAH")
        grid_x = grid_x + float(c[6])
        grid_y = grid_y + float(c[7])
        grid_z = grid_z + float(c[8])
    else:
        pass
if "ATOM " and str(get_center[1]) in lines:
    print(lines)
    c = lines.split()
    print("YEAH")
    grid_x = grid_x + float(c[6])
    grid_y = grid_y + float(c[7])
    grid_z = grid_z + float(c[8])
else:
    pass
#print(grid_x, grid_y, grid_z)
grid_x = (grid_x / 2)
grid_y = (grid_y / 2)
grid_z = (grid_z / 2)
print("grid center is: ")
print(grid_x, grid_y, grid_z)
f.close()

## some output
print("Software used:")
os.system("/apps/prod/autodock/src/autodock/autodock4 --version")
print("#####")
print("Time and date of submitting the Docking: " +
time.strftime("%d/%m/%Y") + " " + time.strftime("%H:%M:%S"))
print("#####")
print("Name of the Receptor is: "+Stem)
print("Name of the Ligand is: "+Ligand_name)
print("Center of the Box is on Atom: %s" % (Center_Box))
print("Dimension of the Box is: %s, %s, %s" % (npts_x, npts_y, npts_z))
print("#####")

#Create necessary Folders
print("#####")
print("Creating Folders")
os.mkdir(Working_dir+"/Receptor")
os.mkdir(Working_dir+"/Ligands")
os.mkdir(Working_dir+"/Docking")
os.mkdir(Working_dir+"/Results")

Rec_dir = Working_dir+"/Receptor/"
Lig_dir = Working_dir+"/Ligands/"
Dock_dir = Working_dir+"/Docking/"

```

```

Res_dir = Working_dir+"/Results/"

##### Preparing Ligand #####
print("#####")
print("Preparing Ligands")
os.chdir(Working_dir+"/Ligands")
for files in os.listdir(Working_dir):
    if files.endswith(".mol2"):
        os.system("/apps/prod/autodock/MGLTools/bin/pythonsh
%s/prepare_ligand4.py -l %s -d %s -v" % (Path_Modules,
Working_dir+"/"+files, "ligand.dic"))
        print("pythonsh %s/prepare_ligand4.py -l %s -d %s -v")

#### Preparing Receptor ####
print("#####")
print("Preparing the Receptor")
os.chdir(Working_dir+"/Receptor")
## Fixing Bugs from h++ File
#fil = open(Working_dir+"/"+Receptor_raw, "r")
#for line in fil:
#    if "ATOM" in line:
#        linelist=line.strip().split()
#        newlist=line[:-5)+"\n"
#        output = open("%s.pqr" % Stem, "a")
#        output.write(newlist)
#fil.close()
#output.close()
## AutoDock

os.system("/apps/prod/autodock/MGLTools/bin/pythonsh
%s/prepare_receptor4.py -r ../%s -A bonds -C -d %s -v" % (Path_Modules,
Stem+".pdbqt", Stem_name+".dic"))
#print("pythonsh %s/prepare_receptor4.py -r %s -A bonds -C -d %s -v")
## Sorting by Atomnumber
#os.system("cp ../%s.pdbqt ." % (Stem))
os.system("cat %s.pdbqt | sort -k 2n > %s.pdbqt" % (Stem, Stem_name))

##### Preparing Grid Parameter File #####
print("#####")
print("Preparing the Grid Parameter File (.gpf)")
os.system("/apps/prod/autodock/MGLTools/bin/pythonsh %s/prepare_gpf4.py -
r %s.pdbqt -l %s/Ligands/%s.pdbqt -p npts='%d,%d,%d' -p spacing='%d' -p
gridcenter='%f,%f,%f' -d %s -n" % (Path_Modules, Stem_name, Working_dir,
Ligand_name, npts_x, npts_y, npts_z, spacing, grid_x, grid_y, grid_z,
Working_dir+"/Ligands/"))

#### Create the Affinity Maps
print("#####")
print("Creating Affinity Maps")
os.system("/apps/prod/autodock/src/autogrid/autogrid4 -p %s.gpf -l
%s.glg" % (Stem_name, Stem_name))

#### Create Docking Parameter File
print("#####")
print("Creating Docking Parameter File (.dpf)")
os.chdir(Working_dir+"/Docking")

```

```

for each in os.listdir(Working_dir+"/Ligands"):
    if each.endswith(".pdbqt"):
        each_name = each.split(".")[0]
        os.mkdir(each_name+"_"+Stem_name)
        shutil.copy(Lig_dir+"/"+each,
Dock_dir+each_name+"_"+Stem_name+"/"+"each)
        os.symlink(Rec_dir+Stem_name+".pdbqt",
Dock_dir+each_name+"_"+Stem_name+"/"+"Stem_name+".pdbqt")
        for all_maps in os.listdir(Rec_dir):
            if "map" in all_maps:
                os.symlink(Rec_dir+all_maps,
Dock_dir+each_name+"_"+Stem_name+"/"+"all_maps)
                os.system("/apps/prod/autodock/MGLTools/bin/pythonsh
%s/prepare_dp4.py -l %s -r %s -o %s -p ga_num_evals=%d -p ga_pop_size=%d
-p ga_run=%d -p rmstol=%f" % (Path_Modules,
Dock_dir+each_name+"_"+Stem_name+"/"+"each,
Dock_dir+each_name+"_"+Stem_name+"/"+"Stem_name+".pdbqt",
Dock_dir+each_name+"_"+Stem_name+"/"+"each_name+"_"+Stem_name+".dpf",
ga_num_evals, ga_pop_size, ga_run, rmstol))

### Submit to Queue
if (options.submit != None):
    print("#####")
    print("Submitted to Queue")
    for each in os.listdir(Dock_dir):
        if each.endswith(Stem_name):
            os.system("%s/submit_neu2.py %s 1" % (Path_Modules, each))
else:
    print("#####")
    print("not submitted")

```