

Ektopische Expression schwer exprimierbarer nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in Zelllinien

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
vorgelegt von

Anja Höffle
geb. in Landau

Mainz, 2001

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1996 bis Juni 2000 am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des Fachbereichs Medizin unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. A. Maelicke angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
1 Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren	1
1.1 Eigenschaften von nACh-Rezeptoren	2
1.2 Expression neuronaler nACh-Rezeptoren im Gehirn und anderen Geweben	6
1.3 Funktion von nACh-Rezeptoren im Gehirn	8
1.4 Pathologische Veränderungen im Zusammenhang mit $\alpha 6$ und $\alpha 7$ tragenden nACh-Rezeptoren	10
1.5 Heterologe Expression neuronaler nACh-Rezeptoren	13
2 Aufgabenstellung	15
3 Durchführung	16
II Material und Methoden	19
1 Geräte und Materialien	19
1.1 Geräte	19
1.2 Chemikalien und Reagenzien	19
1.3 Enzyme	20
1.4 Antikörper	20
1.5 Oligonukleotide	21
1.6 Bakterienstämme	22
1.7 Plasmidvektoren	22
1.8 DNA-Konstrukte	23
1.9 DNA-Längenstandards	23
1.10 Zelllinien	23
1.11 Puffer und Kulturmedien	24
2 Molekularbiologische Methoden	25
2.1 Klonierung spezifischer DNA-Fragmente	25
2.1.1 DNA-Amplifikation mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.1.2 DNA-Spaltung durch Endonukleasen	25
2.1.3 Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren	26
2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.1.5 Ligation von DNA	27
2.1.6 Herstellung kompetenter Bakterien	27
2.1.7 Transformation von kompetenten Bakterien	28
2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparation	29
2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA durch Maxipräparation	29
2.1.10 Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese	30
2.2 Hybridisierung von Ribonukleinsäuren, Northern-Blot Analysen	30
2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA	30
2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	31
2.2.3 Northern-Blot-Transfer	32
2.2.4 Herstellung einer spezifischen Sonde mittels PCR	32
2.2.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	33
2.2.6 Hybridisierung von Northern-Blot-Membranen mit radioaktiven Sonden	34
2.3 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	34
2.3.1 Herstellung von cDNA (copy DNA)	34
2.3.2 Nachweis spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR	35
3 Zellbiologische Methoden	36
3.1 Kultivierung der Zelllinien	36
3.1.1 Kultur von Zellen in Kulturgefäßen	36
3.1.2 Kultur von Zellen auf Deckgläschen	36
3.2 Transiente Transfektion	37
3.3 Stabile Transfektion	37
3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	38

3.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	38
3.6 Färbung mit FITC-markiertem α -Bungarotoxin (α -Btx)	39
4 Proteinbiochemische Methoden	40
4.1 Western-Blot-Analysen	40
4.1.1 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
4.1.2 Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen	41
4.1.3 Immunfärbung der Protein-Membran und ,enhanced' Chemilumineszenz (ECL)-Nachweis	42
4.2 Proteinextraktion aus Säugerzellen	42
4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	43
4.4 Blau-native-Gelelektrophorese nach Schägger	44
4.4.1 Probenvorbereitung	44
4.4.2 Blau-native-Gelelektrophorese 1. Dimension	44
4.4.3 Blau-native-Gelelektrophorese 2. Dimension	45
4.5 Biotinylierung von Proteinen in der Plasmamembran von HEK-293/ α 1-Zellen und anschließende Präzipitation mit Agarose-gekoppeltem Streptavidin	46
5 Calcium- und Natrium-Imaging-Messungen	47
5.1 Eigenschaften Ca^{2+} - oder Na^{+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffen	47
5.2 Durchführung der Calcium- und Natrium-Imaging-Messungen	48
6 Elektrophysiologische Messungen	49
III Ergebnisse	50
1 Etablierung eines Testmodells zur Untersuchung nACh-Rezeptoren auf der Basis EGFP-gekoppelter Proteine	50
1.1 Klonierung der nAChR-Untereinheiten in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N3	50
1.2 Expression EGFP-gekoppelter α 3 β 4 nACh-Rezeptoren in HEK-293/ α 1-Zellen	53
1.3 Calcium-Imaging sowie elektrophysiologische Untersuchungen EGFP-gekoppelter nACh-Rezeptoren am Beispiel des humanen α 3 β 4 nACh-Rezeptors	56
2 Ektopische Expression des α 7 nACh-Rezeptors	61
2.1 Stabile Expression des α 7 nACh-Rezeptors der Ratte in HEK-293/ α 1-Zellen	61
2.2 Screening der klonalen Zelllinien $R\alpha$ 7L ⁺ mittels Calcium-Imaging	62
2.3 Nachweis von α 7 nACh-Rezeptoren in den klonalen Zelllinien $R\alpha$ 7L ⁺ durch Bindung von α -Bungarotoxin	64
2.4 Charakterisierung der Expression von α 7 nACh-Rezeptoren in den klonalen Zelllinien $R\alpha$ 7L ⁺ auf RNA-Ebene	66
2.5 Nachweis des α 7 nAChR-Proteins in den klonalen Zelllinien $R\alpha$ 7L ⁺	69
2.6 Untersuchung der Assemblierung der α 7 nAChR-Untereinheit in den klonalen Zelllinien $R\alpha$ 7L ⁺	72
2.7 Lokalisation der α 7 nAChR-Untereinheit in HEK-293/ α 1-Zellen	73
2.8 Neue Ansätze zur Expression von α 7 nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran von HEK-293/ α 1-Zellen	77
2.9 Versuche zur Expression des α 7 nACh-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien	80
2.9.1 Vergleich der Transfektionseffizienz in den Zelllinien HEK-293/ α 1, S2, QT6, GH4C1 sowie PCC7-Mz1	81
2.9.2 Transiente Expression des α 7 nACh-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien	82
3 Ektopische Expression der humanen α 6 nAChR-Untereinheit als funktioneller Rezeptor	87
3.1 Transiente Expression der humanen α 6 nAChR-Untereinheit in HEK-293/ α 1-Zellen	87
3.2 Stabile Expression von α 6 β 4 nACh-Rezeptoren und EGFP-gekoppelten α 6 β 4 nACh-Rezeptoren in HEK-293/ α 1-Zellen	90

3.3. Nachweis der stabilen Expression von nACh-Rezeptoren in den klonalen Zelllinien H α 6 β 4L ⁺ und H α 6 β 4(G)L ⁺	91
3.3.1. Screening der klonalen Zelllinien H α 6 β 4(G)L ⁺	91
3.3.2. Screening der klonalen Zelllinien H α 6 β 4L ⁺	92
3.4 Calcium-Imaging-Analysen an stabil α 6 β 4 nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK 293/ α 1-Zellen	94
3.5. Versuche zur funktionellen Expression von α 6 β 4 nACh-Rezeptoren in HEK-293/ α 1-Zellen	96
3.5.1 Calcium-Imaging-Analysen an transient exprimierten α 6 β 4 nACh-Rezeptoren	96
3.5.2 Temperaturabhängigkeit der transienten Expression von α 6 β 4 nACh-Rezeptoren	97
3.5.3. Calcium-Imaging-Analysen an den klonalen Zelllinien H α 6 β 4L ⁺ /1-6 unter optimierten Expressionsbedingungen	99
3.6. Charakterisierung der klonalen Zelllinie H α 6 β 4L ⁺ /1 mittels Calcium-Imaging	102
3.7 Einfluß der Expressionsbedingungen auf die Expression von nACh-Rezeptoren	104
3.7.1 Nachweis funktioneller nACh-Rezeptoren unter verschiedenen Expressionsbedingungen	104
3.7.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis von nACh-Rezeptoren unter verschiedenen Expressionsbedingungen	109
3.8 Elektrophysiologische Charakterisierung humaner α 6 β 4 nACh-Rezeptoren	111
IV Diskussion	115
1 Untersuchungen zur funktionellen Expression nACh-Rezeptoren durch Fusion mit EGFP	115
2 Ektopische Expression von α 7 nACh-Rezeptoren	117
2.1 Ektopische Expression von α 7 nACh-Rezeptoren in HEK-293/ α 1-Zellen	117
2.2 Neue Ansätze zur funktionellen Expression von α 7 nACh-Rezeptoren	120
3 Ektopische Expression humaner α 6 enthaltender nACh-Rezeptoren in HEK-293/ α 1-Zellen	124
3.1 Untersuchungen zur Membranständigkeit α 6 enthaltender nACh-Rezeptoren	124
3.2 Funktionelle Expression humaner α 6 β 4 nACh-Rezeptoren	124
3.3 Pharmakologische Eigenschaften humaner α 6 β 4 nACh-Rezeptoren	126
4 Ausblick	127
V Zusammenfassung	129
VI Literaturverzeichnis	131

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
Ak	Antikörper
APS	Ammonium-Persulfat
α -Btx	α -Bungarotoxin
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BBS	BES buffered saline
bp	Basenpaare
cDNA	kodierender Strang der Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
Cyt	Cytisin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Natrium-Salz der N,N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Epi	Epibatidin
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
GAP-DH	Glyceral-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
H	Mensch
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
HEK	Human embryonic kidney
kDa	Kilodalton
L ⁺	L-Typ Calcium-Kanal
M	Molar (mol/l)
Mec	Mecamylamin
min	Minute
MLA	Methyllycaconitin
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MT	Metallothionein

nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
Nik	Nikotin
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCC7-MZ1	PCC7-S-AzaR1 Klon 1009 MZ1
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphat buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Meerrettich-Peroxidase
PVDF	Polyvinyliden fluorid
RA	all-trans Retinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
R	Ratte
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymersase Kettenreaktion
s	Sekunde
S2	Schneider 2-Zellen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus-40
TE	Tris/EDTA
TEB	Tris/EDTA/Borsäure
TEMED	N, N, N', N'-tetramethyl-ethylen-diamin
TR	Texas-Rot
U	Einheit
V	Volt

I Einleitung

Die Altersstruktur der Bevölkerung hat sich seit Beginn des 20. Jahrhunderts stark verändert. So vervierfachte sich die Zahl der 65-jährigen in Deutschland auf nun knapp 13 Mio., die Zahl der über 80-jährigen hat sich sogar elffach erhöht. Diese Entwicklung wird sich in der Zukunft fortsetzen, so daß aufgrund einer gesteigerten Lebenserwartung der Anteil an alten Menschen in der Gesamtbevölkerung kontinuierlich zunimmt. Verschiedene Statistiken und Studien konnten zeigen, daß mit zunehmendem Alter auch das Risiko für den Ausbruch von neurodegenerativen Erkrankungen stetig zunimmt. So steigt die Anzahl der an Demenz leidenden Menschen in Deutschland von 1,2 % bei den 60-jährigen auf bis zu 35 % bei den über 90-jährigen, wobei zwei Drittel dieser Demenzpatienten an der Alzheimer'schen Krankheit leiden. Da Demenzerkrankungen durch eine schwerwiegende Beeinträchtigung der geistigen Leistungsfähigkeit gekennzeichnet sind, können solche Patienten ab einem bestimmten Stadium nicht mehr ihr tägliches Leben alleine bewältigen und sind somit als Schwerstpflegefälle mit enormen sozialen Problemen und hohen finanziellen Kosten für die Familie und die Gesellschaft einzustufen. Aus der stetig ansteigenden Anzahl an betroffenen Menschen erschließt sich die wachsende sozioökonomische Bedeutung der Entwicklung sowohl einer Prävention als auch einer Therapie dieser Erkrankungen.

In den letzten Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen Änderungen der Struktur sowie der Expressionsstärke neuronaler nikotinischer Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) und dem Ausbruch von schwerwiegenden neurodegenerativen Erkrankungen festgestellt. Vor diesem Hintergrund wird eine genaue Kenntnis der strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Rezeptoren immer wichtiger, um die Entwicklung von selektiv wirkenden Substanzen für eine Therapie dieser Erkrankungen zu beschleunigen. Der $\alpha 7$ sowie $\alpha 6$ tragende nAChR sind viel versprechende Ansatzpunkte für eine solche Therapie, da eine veränderte Expression dieser Rezeptoren bei der Entstehung verschiedener nAChR-assoziiierter Erkrankungen beobachtet wurde. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der ektopischen Expression des neuronalen $\alpha 6$ und $\alpha 7$ nACh-Rezeptors, um das Wissen über die Pharmakologie dieser Rezeptoren zu erweitern.

1 Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Bei Vertebraten kommen nACh-Rezeptoren in neuro-neuronalen Synapsen des zentralen und peripheren Nervensystems (neuronale nAChR) sowie an der neuromuskulären Endplatte (muskuläre nAChR) vor.

Diese Rezeptoren sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die zusammen mit den GABA_A-, Glycin- und 5-Hydroxy-Tryptamin-3-Rezeptoren zu einer Gen-Superfamilie homologer Rezeptoren zusammengefaßt werden (Karlin und Akabas, 1995). Während der muskuläre Typ

des nAChR nur an postsynaptischen Membranen lokalisiert ist, können nACh-Rezeptoren im Gehirn auch prä-, peri- und extrasynaptisch exprimiert werden, wo sie die Reizweiterleitung auf verschiedene Weise beeinflussen (Lindstrom, 1997).

1.1 Eigenschaften von nACh-Rezeptoren

Strukturelle Eigenschaften. Biochemische Untersuchungen an nACh-Rezeptoren aus dem elektrischen Organ des Zitterrochen (*Torpedo californica*) (Galzi und Changeux, 1995) sowie an neuronalen nACh-Rezeptoren des Hühnchens (*Gallus gallus*) (Anand et al., 1991) zeigen, daß sowohl neuronale nACh-Rezeptoren als auch der muskuläre nACh-Rezeptor aus fünf membrandurchspannenden Untereinheiten aufgebaut sind. Jede Untereinheit verfügt N-terminal über eine große hydrophile extrazelluläre Domäne gefolgt von vier hydrophoben Regionen (TM1-TM4, 19 –27 Aminosäuren), die membrandurchspannende α -Helices bilden und durch hydrophile Bereiche verbunden sind. Dabei ist der hydrophile Bereich zwischen TM3 und TM4 am längsten und zeigt eine sehr geringen Homologie zwischen den verschiedenen Untereinheiten (Abb. I.1). Der C-terminale Bereich einer jeden Untereinheit ist ca. 20 Aminosäuren lang und extrazellulär lokalisiert. Die große, N-terminale, hydrophile Domäne beinhaltet eine oder mehrere Glycosylierungsstellen und ist zum synaptischen Spalt hin orientiert, wo sie eine entscheidende Rolle bei der Ligandenbindung spielt. Der große hydrophile Bereich zwischen den Transmembrandomänen TM3 und TM4 ist zum Cytoplasma hin orientiert und weist Konsensussequenzen für Phosphorylierungen auf (Galzi und Changeux, 1995). Die Phosphorylierung einer nAChR-Untereinheit durch Proteinkinase A oder Proteinkinase C bewirkt eine Desensibilisierung des nACh-Rezeptors (Hunganir und Greengard, 1990).

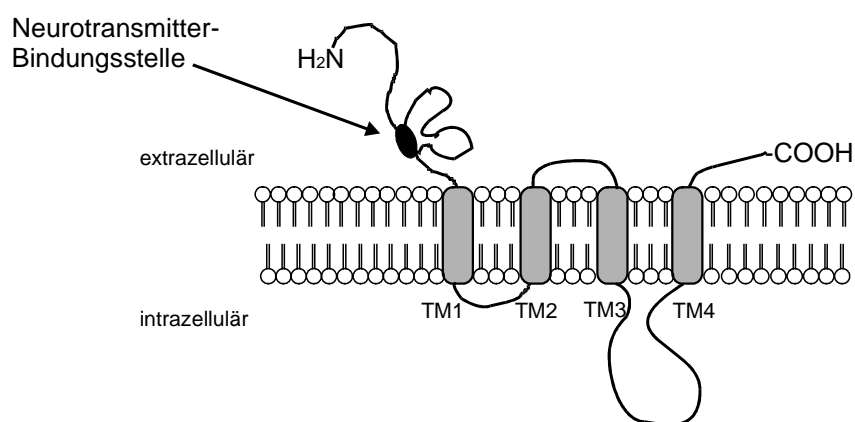


Abb.I.1 Transmembrantopologie einer nAChR-Untereinheit

Jede nAChR-Untereinheit setzt sich zusammen aus der N-terminalen hydrophilen extrazellulären Domäne mit der Neurotransmitter-Bindungsstelle, vier hydrophoben Transmembrandomänen (TM1-TM4), einer intrazellulären hydrophilen Domäne und einem kurzen extrazellulären C-terminalen Bereich.

In der Plasmamembran sind fünf nAChR-Untereinheiten symmetrisch zueinander angeordnet, so daß in ihrer Mitte ein Ionenkanal entsteht, an dessen Auskleidung die TM2-Region einer jeden Untereinheit maßgeblich beteiligt ist (Revah et al., 1990; Imoto et al., 1986). Die Kationenselektivität dieses Kanals wird von drei Ringen aus den negativ geladenen Aminosäuren Glutamat und Aspartat bestimmt (Imoto et al., 1988).

Neuronale nACh-Rezeptoren setzen sich nur aus α -Untereinheiten oder aus α - und β -Untereinheiten zu einem pentameren Transmembranprotein zusammen (Cooper et al., 1991; Anand et al., 1991; Whiting et al., 1991) (Abb. I.2). Für die α - und β -Untereinheiten existieren mehrere Isoformen, die von verschiedenen Genen kodiert werden. So wurden bisher acht neuronale humane α -Untereinheiten ($\alpha 2$ - $\alpha 9$) und drei neuronale β -Untereinheiten ($\beta 2$ - $\beta 4$) kloniert (Groot Kormelink und Luyten, 1997). Dabei bildet die nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ funktionelle homomere Rezeptoren.

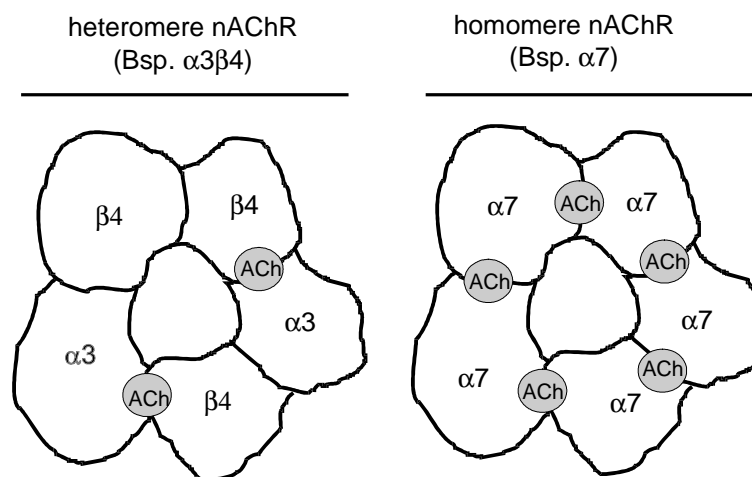


Abb. I.2: Schematische Darstellung der pentameren Struktur heteromerer und homomerer nACh-Rezeptoren

Neuronale nACh-Rezeptoren setzen sich aus α -Untereinheiten oder aus α - und β -Untereinheiten zusammen, wobei die α -Untereinheiten heteromerer Rezeptoren zwei verschiedene Isoformen sein können. Die beiden Neurotransmitter-Bindungsstellen (ACh) heteromerer nACh-Rezeptoren liegen jeweils an der Grenzfläche zwischen den α - und der β -Untereinheiten. Homomere nACh-Rezeptoren weisen fünf Neurotransmitter-Bindungsstellen an den Grenzflächen zwischen den α -Untereinheiten auf.

Bindung von Liganden. Neuronale nACh-Rezeptoren sind allosterisch regulierte Moleküle, an die sich eine Reihe von strukturell unterschiedlichen Substanzen anlagern können. Entsprechend ihrer Wirkung werden diese Substanzen als Agonisten, Antagonisten oder allosterische Liganden mit aktivierendem oder inhibierendem Einfluß bezeichnet.

Für Acetylcholin und andere nikotinische Agonisten konnte gezeigt werden, daß für die Aktivierung eines neuronalen heteromeren nAChR die Bindung von zwei Molekülen des Liganden notwendig ist (Abb. I.2)., wobei die beiden Bindungsstellen positiv kooperativ

interagieren. Die an der Bindung der Agonisten beteiligten Aminosäuren konnten dabei für neuronale nACh-Rezeptoren an der Grenzfläche der α und β -Untereinheiten lokalisiert werden (Galzi und Changeux, 1995; Corringer et al., 1995; Curtis et al., 2000) (Abb. I.3). Homomere nAChR, wie der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor weisen fünf Bindungsstellen für Acetylcholin jeweils an den Grenzflächen der α -Untereinheiten auf (Wang et al., 1996) (Abb. I.2). Kompetitive Antagonisten, wie z.B. Methyllycaconitin (MLA), konkurrieren mit Agonisten um die gleiche Bindungsstelle und inaktivieren auf diese Weise den Rezeptor.

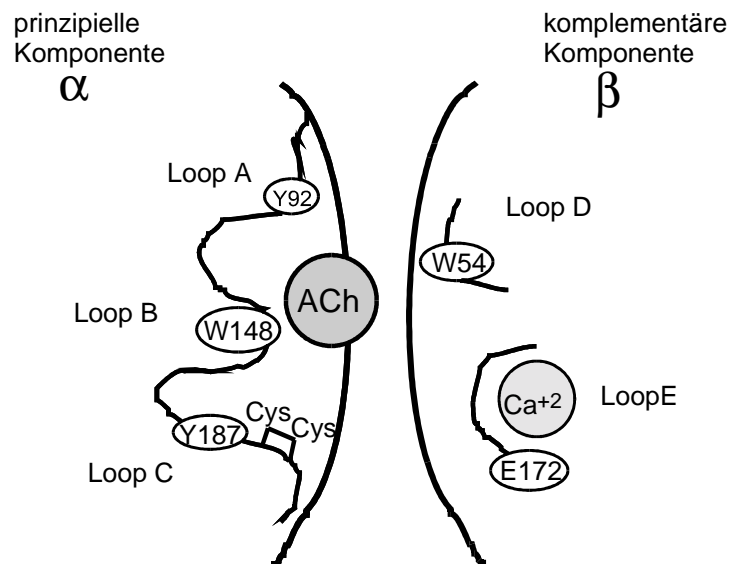


Abb. I.3 Die Acetylcholin-Bindungsstelle

Die Acetylcholin (ACh) -Bindungsstelle liegt bei heteromeren nAChR an der Grenzfläche zwischen den α - und den β -Untereinheit. Die entsprechenden Aminosäuren sind mit den an der Acetylcholin-Bindung beteiligten Proteinstrukturen (Loop A-E) schematisch dargestellt. Die Numerierung der Aminosäuren entspricht der Sequenz von $\alpha 7$ nAChR des Hühnchens (nach Curtis et al., 2000).

Am neuronalen nACh-Rezeptor binden verschiedene Substanzen auch in einiger Entfernung von der Acetylcholin-Bindungsstelle und modulieren dadurch die Funktion des Rezeptors. So wurde eine Bindungsstelle für allosterisch potenzierend wirkende Liganden (APL), wie die Acetylcholinesterase-Inhibitoren Physostigmin oder Galanthamin, im N-terminalen Bereich der α -Untereinheit des Rezeptorproteins rund um die Aminosäure Lys-125 lokalisiert (Schrattenholz et al., 1993; Abb. I.4). Diese Substanzen erleichtern die Bindung von Acetylcholin und erhöhen somit den Agonisten-induzierten Ionenstrom durch den Kanal, wobei der maximal induzierbare Strom konstant bleibt. (Pereira et al., 1993 ; Storch et al., 1995 ; Maelicke et al., 2000).

Eine andere Gruppe von Substanzen, die negativen allosterischen Liganden, inhibieren den nACh-Rezeptor, indem sie sich außerhalb der Neurotransmitter-Bindungsstelle an den nACh-Rezeptor anlagern. Direkte Kanalblocker, wie z.B. Lokalanästhetika, dringen in den aktivierten nAChR-Kanal ein (Neher und Steinbach, 1978), wo sie mit Aminosäuren in der TM2-Region in Wechselwirkung treten (Hucho ,1986; Giraudat, 1987). Infolgedessen wird der Rezeptor aufgrund einer sterischen Blockade des Rezeptorkanals durch den gebundenen

Liganden inhibiert. Andere nicht-kompetitive Antagonisten, wie z.B. Steroide und die Arachidonsäure, inaktivieren den nACh-Rezeptor, indem sie sich im Grenzbereich zwischen Rezeptorprotein und Lipidmembran anlagern (Quick M., 1987; Valera et al., 1992). Die Bindung von Liganden an diesen Stellen erleichtert die Desensibilisierung des Rezeptors (Abb. I.4).

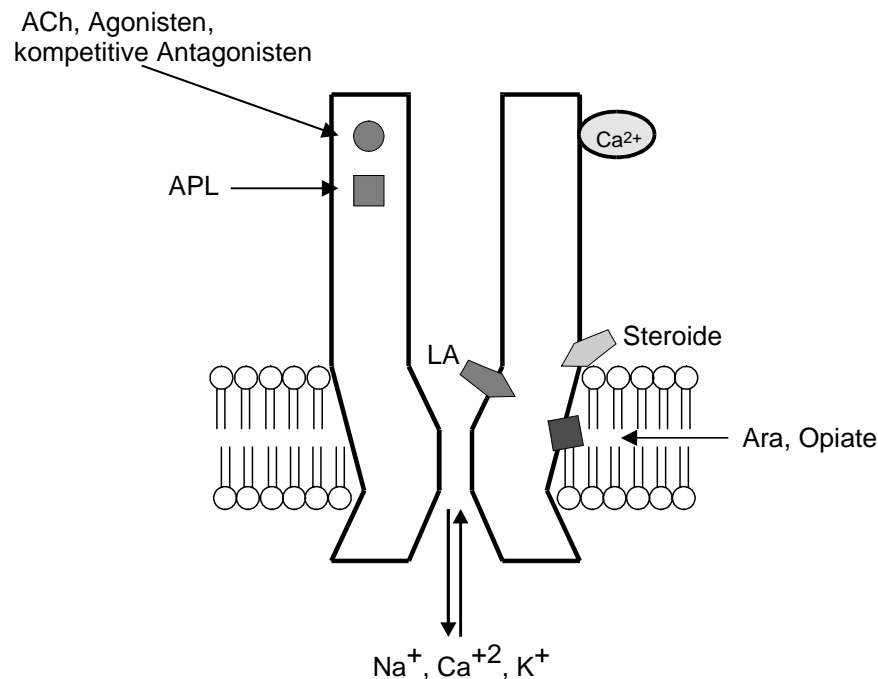


Abb. I.4: Regulation der Aktivität des nACh-Rezeptors durch verschiedene Liganden

Der nACh-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter nicht-spezifischer Kationenkanal. Allosterisch potenzierend wirkende Liganden (APL) erhöhen die Sensitivität des Rezeptors gegenüber Acetylcholin (ACh), Lokalanästhetika (LA) induzieren eine spannungsabhängige Blockade des nAChR-Kanals; Steroide und Arachidonsäure (Ara) erleichtern die Desensibilisierung des nACh-Rezeptors; Extrazelluläre Calcium-Ionen (Ca^{2+}) wirken allosterisch potenzierend auf den nACh-Rezeptor (nach Maelicke et al., 1995b).

Pharmakokinetische Eigenschaften. Die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten zur Zusammensetzung von neuronalen nAChR aus den bisher elf isolierten humanen α - und β -nAChR-Untereinheiten ($\alpha 2$ - $\alpha 9$ und $\beta 2$ - $\beta 4$) führt zur Ausbildung von Rezeptoren, die sich hinsichtlich ihrer pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften untereinander und vom muskulären nACh-Rezeptor unterscheiden. So sind neuronale nACh-Rezeptoren stärker permeabel für Calcium-Ionen (durchschnittlicher Calciumanteil am Gesamtstrom: 4 %) im Gegensatz zu Rezeptoren an der motorischen Endplatte (Calciumanteil am Gesamtstrom: 2 %) (Mulle et al., 1993; Vernino et al., 1994). Die größte Calcium-Permeabilität besitzt der homooligomere $\alpha 7$ nACh-Rezeptor, bei dem der Calcium-Anteil am Gesamtstrom durch den Kanal ca. 20 % beträgt (Seguela et al., 1993).

Das Schlangengift α -Bungarotoxin (α -Btx) der Giftnatter *Bungarus multicinctus* wirkt als kompetitiver Antagonist bei nACh-Rezeptoren des Muskels sowie bei den homooligomeren neuronalen nACh-Rezeptoren $\alpha 7$, $\alpha 8$ und $\alpha 9$ (Schoepfer et al., 1990), blockiert jedoch heteromere, neuronale nACh-Rezeptoren gar nicht oder nur in sehr hoher Konzentration (Heinemann et al., 1986). Das Alkaloid Methyllycaconitin (MLA) aus dem Rittersporn *Consolida sp.* wirkt inhibierend sowohl auf homomere als auch heteromere nAChR-Subtypen, wobei erhebliche Unterschiede in der für die vollständige Blockierung benötigten Konzentration bestehen. Der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor weist im Vergleich zu anderen nACh-Rezeptoren eine hohe Sensitivität gegenüber MLA auf ($IC_{50} = 1-2$ nM; Vijayaraghavan et al., 1992).

Des Weiteren unterscheiden sich die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken der verschiedenen neuronalen nACh-Rezeptoren (Albuquerque und Alkonon, 1993). Der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor zeichnet sich in dieser Hinsicht gegenüber anderen nACh-Rezeptoren durch ein schnelles Einsetzen des Ionenstroms sowie durch eine schnelle Desensibilisierung des Rezeptors aus, d.h. nach Aktivierung geht der Rezeptorkanal sehr schnell in den geschlossenen, nicht-aktivierbaren Zustand mit einer hohen Agonistenaffinität über. Es wurde nachgewiesen, daß der homomere $\alpha 7$ nACh-Rezeptor der Ratte nach Stimulation mit 100 μ M Acetylcholin bereits nach 1 ms desensibilisiert, während dies z.B. bei dem heteromeren $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptor der Ratte erst nach 20 ms geschieht (Role, 1992).

1.2 Expression neuronaler nACh-Rezeptoren im Gehirn und anderen Geweben

Durch Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Liganden (^{125}I α -Btx, 3H Nikotin, 3H -Epibatidin) konnte die Expression von nACh-Rezeptoren in postmortalen Gehirnen sichtbar gemacht werden. Für diese Studien wurden vorwiegend Gehirne von Nagern und Hühnchen verwendet. Eine Transkription der einzelnen für $\alpha 2$ - $\alpha 9$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ kodierenden Gene in den unterschiedlichen Gehirnstrukturen wurde anhand von insitu-Hybridisierungen lokalisiert.

Neuronale nACh-Rezeptoren kommen in weiten Bereichen des Gehirns vor (Tab. I.1). Im ZNS von Vertebraten sind der $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptor zusammen mit dem $\alpha 7$ nACh-Rezeptor die am häufigsten verbreiteten nACh-Rezeptoren (Duvoisin et al., 1989; Wada et al., 1989; Seguela et al., 1993). Die Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors ist im Hippocampus, im Hypothalamus, im Isocortex sowie im *Bulbus olfaktorius* am höchsten (Seguela et al., 1993). Im Gegensatz dazu beschränkt sich die Expression der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit auf sehr distinkte Gehirnstrukturen. So konnte diese Untereinheit in wenigen catecholaminergen Nuclei, wie dem *Locus coeruleus*, dem ventralen, tegmental Bereich und der *Substantia nigra* lokalisiert werden (Le Novere et al., 1996). Zwei nAChR-Untereinheiten wurden bisher nur in bestimmten Spezies oder Geweben erfolgreich nachgewiesen: Der $\alpha 8$ nACh-Rezeptor konnte bisher lediglich im ZNS von Vögeln, nicht aber von Säugern nachgewiesen werden

(Gerzanich et al., 1994), wohingegen der $\alpha 9$ nACh-Rezeptor nur in spezifischen endokrinen bzw. sensorischen Organen von Vertebraten lokalisiert werden konnte (Elgoyhen et al., 1994). Im peripheren Nervensystem ist der $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptor der am häufigsten exprimierte Rezeptor (Couturier et al., 1990; Deneris et al., 1991).

Tab. I.1: Vorkommen der mRNA einzelner nAChR-Untereinheiten im Gehirn der Ratte
(nach Lena und Changeux, 1998)

	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha 7$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$
Telencephalon									
Olfactory bulb	+	++	+	++	-	++	++	-	+
Isocortex									
Layer II-III	-	-	+	+	-	+	++	-	-
Layer IV	-	+	+	+	-	+	++	-	-
Layer V	-	-	++	+	-	++	++	-	-
Layer VI	-	-	++	++	-	++	++	-	-
Hippocampal formation	(+)	(+)	+	+	-	+++	++	-	-
Striatum	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Septum	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Hypothalamus	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Supraoptic n.	-	-	+	-	-	+++	+	-	-
Diencephalon									
Pineal gland	-	+++	-	+	-	-	+	-	+++
Habenula	-	+++	++	+	(+)	(+)	++	++	+++
Thalamus	-	+	+++	-	+	-	+++	+	-
Mesencephalon									
DA nuclei	-	(+)	++	++	+++	(+)	+	+++	-
Mesenc V nucleus	-	-	+	-	+	-	++	+++	-
Interpenduncular nucleus	++	+	+	++	+	(+)	++	+	+
Rhombencephalon									
Vestibular nuclei	-	-	+	+	-	++	+	-	-
Cerebellum	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Locus coeruleus	-	(+)	-	-	+++	-	++	+++	(+)
Motor nuclei	-	+	+	+	-	-	++	-	-
NTS	-	++	(+)	+	-	-	++	-	++
Area postrema	-	++	++	+	-	-	++	-	+

Der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor wird außer im Gehirn auch in Muskelzellen während der embryonalen Entwicklung sowie im denervierten Muskel der Ratte exprimiert. Aufgrund seiner hohen Calcium-Permeabilität könnte dieser Rezeptor dort bei der Innervierung des Muskels sowie bei der Stabilisierung der muskulären Endplatte eine entscheidende Rolle spielen (Fischer et al., 1999).

1.3 Funktion von nACh-Rezeptoren im Gehirn

Neuronale nACh-Rezeptoren sind an neuro-neuronalen Synapsen an der Umwandlung des ankommenden elektrischen Signals in ein chemisches Signal beteiligt. Das Prinzip der Signalübertragung an den Synapsen besteht darin, daß ein elektrisches Signal in Form eines Aktionspotentials an einem präsynaptischen Nervenzellende die Ausschüttung eines Botenstoffes (Neurotransmitter) auslöst und somit in ein chemisches Signal übergeht. Der Botenstoff diffundiert durch den Spalt zwischen zwei Nervenzellen und aktiviert seinen spezifischen Rezeptor in der Membran der postsynaptischen Nervenzelle. Im Falle des Neurotransmitters Acetylcholin werden neuronale nACh-Rezeptoren aktiviert. Nach der Aktivierung des Kationen-selektiven nACh-Rezeptors wird ein Ionenstrom aus vorwiegend Natriumionen durch die Membran erzeugt, was zu einem positiveren lokalen Membranpotential (Depolarisation) an der postsynaptischen Membran führt. Durch die Depolarisation werden spannungsgesteuerte Ionenkanäle aktiviert, welche die Membranpotential-Änderung zusätzlich verstärken. Somit ist das chemische Signal wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die lokalen Membranpotentialänderungen werden am Axonhügel einer Nervenzelle integriert und bei Überschreiten eines Schwellenpotentials über das Axon auf die nächste Zelle weitergeleitet.

Neben dieser klassischen Aufgabe der postsynaptischen excitatorischen Reizweiterleitung können neuronale nACh-Rezeptoren auch modulierend die Wirkung anderer Neurotransmittersysteme beeinflussen. In verschiedenen Gehirnbereichen des Cortex, des Hippocampus sowie des Cerebellums wurden nACh-Rezeptoren auch in der präsynaptischen Membran lokalisiert (Wonnacott, 1997). Nach Aktivierung dieser Rezeptoren wird durch das Öffnen des Ionenkanals die intrazelluläre Ionenzusammensetzung verändert, was die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter (Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin, 5-HT₃, GABA und Glutamat) aus Zellvesikeln erleichtert (Abb. I.5). Dadurch werden nicht nur aktivierend wirkende, kationenselektive Ionenkanäle wie Glutamat- und nACh-Rezeptoren stimuliert, sondern auch anionenselektive Ionenkanäle wie GABA_A-Rezeptoren aktiviert. Diese hyperpolarisieren aufgrund ihrer Anionenselektivität die Plasmamembran und hemmen im Gegensatz zu kationenselektiven Ionenkanäle die postsynaptische Zelle. Hier zeigt sich somit die Verflechtung der cholinergen Transmission mit verschiedenen Neurotransmittersystemen. Alle diese Transmitter spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Verhaltens, was die Bedeutung des Einflusses der nACh-Rezeptoren auf die Neurotransmission hervorhebt.

Dem $\alpha 7$ nACh-Rezeptor kommt aufgrund seiner vergleichsweise hohen Calcium-Permeabilität sowie seiner einzigartigen pharmakologischen Eigenschaften innerhalb der cholinergen Neurotransmission eine besondere Bedeutung zu. Bei der Ausschüttung der Neurotransmitter spielen Calcium-Ionen für die Verschmelzung der Vesikel mit der präsynaptischen Membran eine entscheidende Rolle. Durch Blockade des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in hippocampalen

Neuronen mittels MLA konnte eine Beteiligung dieses Rezeptors sowohl an der Freisetzung von GABA (Racliff et al., 1999) als auch von Glutamat (Alkondon et al., 1996; Gray et al., 1996) eindeutig nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu allen anderen neuronalen nACh-Rezeptoren wird der homomere $\alpha 7$ nACh-Rezeptor durch Cholin, dem enzymatischen Spaltprodukt des Neurotransmitters Acetylcholin, aktiviert ($EC_{50}(\text{Cholin}) = 1 \text{ mM}$; Albuquerque et al., 1997; Abb. I.5). Aufgrund seiner Sensitivität für Cholin kann der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor auch noch nach Spaltung des klassischen cholinergen Neurotransmitters Acetylcholin chemisch aktiviert werden. Diese Aktivierung wird erst durch Wiederaufnahme von Cholin in die Zelle beendet, einem im Vergleich zur enzymatischen Spaltung des Neurotransmitters Acetylcholin sehr viel langsameren Prozeß. Nach der Spaltung von Acetylcholin, das eine schnelle Signaltransmission vermittelt, steigt die Konzentration des Abbauproduktes Cholin - im Rahmen der Diffusions- und Wiederaufnahmeprozesse - im synaptischen Spalt an und kann über eine Aktivierung präsynaptischer $\alpha 7$ nACh-Rezeptors die Freisetzung von Acetylcholin und verschiedener anderer Neurotransmitter erhöhen (Abb. I.5). Die erneute Freisetzung von Acetylcholin kann sowohl die postsynaptische excitatorische cholinerge Transmission als auch über die Aktivierung präsynaptischer nACh-Rezeptoren die Freisetzung der verschiedenen Neurotransmitter verstärken (Abb. I.5). Bei wiederholter Aktivierung der Synapse würde es aufgrund des positiven Rückkopplungsmechanismus zu einer Erhöhung der Acetylcholinausschüttung und damit zu einer Verstärkung der synaptischen Aktivität kommen (Albuquerque et al., 1997).

Auf die gleiche Art und Weise würde es nach der Cholin-induzierten Freisetzung von Glutamat zusammen mit Acetylcholin über die Aktivierung postsynaptischer Glutamat-Rezeptoren zu einer Verstärkung der glutamatergen Neurotransmission kommen (Abb. I.5). Das cholinerge System könnte so zu einer Erhöhung der synaptischen Aktivität in Form eines Langzeitpotenzierungseffektes (LTP) führen (Albuquerque et al., 1997), einem Mechanismus der in engem Zusammenhang mit Gedächtnisleistungen und Lernprozessen des Gehirns steht.

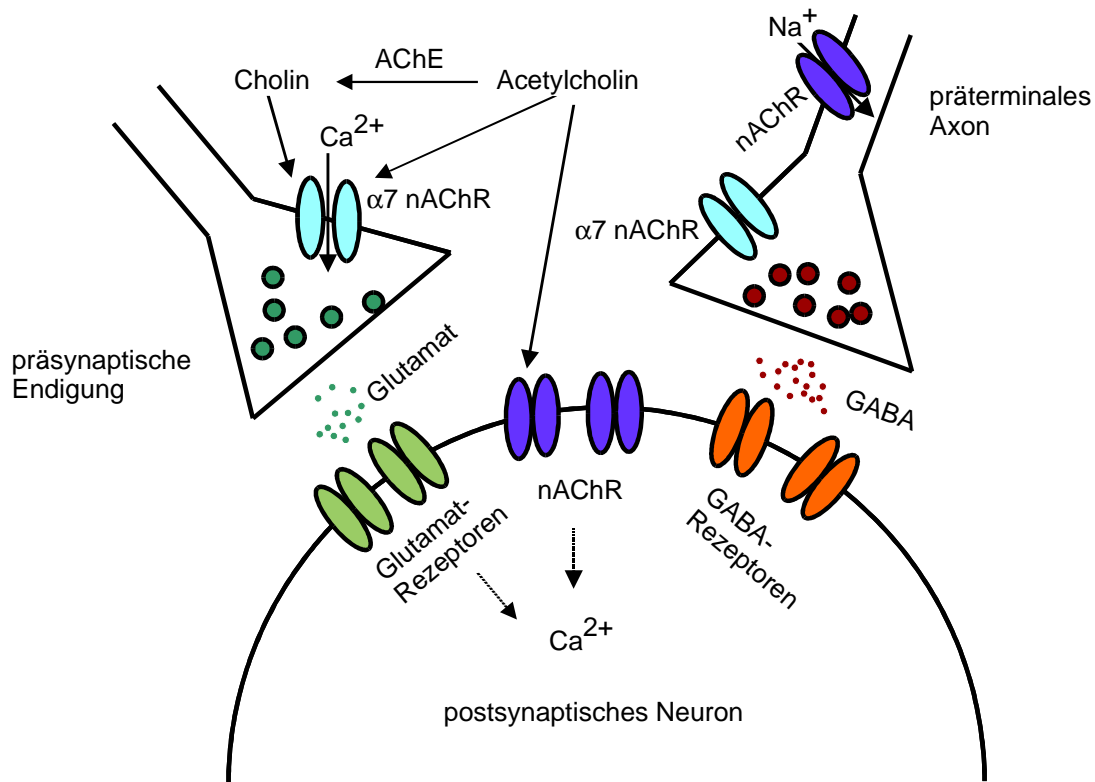


Abb. I.5: Modell für die Modulation der synaptischen Aktivität durch neuronale nACh-Rezeptoren

Während an den präsynaptischen Nervenendigungen die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter durch nACh-Rezeptoren mit einer hohen Calciumpermeabilität (Bsp. $\alpha 7$ nAChR) begünstigt wird, vermitteln verschiedene in die postsynaptische Membran integrierte nAChR-Subtypen die excitatorische Reizweiterleitung. (nach Albuquerque et al., 1997)

Der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor entfaltet jedoch seine Wirkung nicht nur an neuro-neuronalen Synapsen in vielfacher Hinsicht. Aufgrund der hohen Calcium-Permeabilität besitzt der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor die Fähigkeit, in eine Reihe Calcium-abhängiger metabotroper Reaktionen der Zelle, wie Regulation der Genaktivität oder Proteinbiosynthese, einzugreifen. In vielfältigen Funktionen dieses Rezeptors während der Entwicklung des ZNS spiegelt sich dieses Potential wieder. So wird der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor mit dem programmierten Zelltod oder der synaptischen Bahnung in Verbindung gebracht (detailliertere Betrachtungen siehe Broide R. und Leslie F. 1999).

1.4 Pathologische Veränderungen im Zusammenhang mit $\alpha 6$ - und $\alpha 7$ -tragenden nACh-Rezeptoren

Parkinson'sche Krankheit. Die Parkinson'sche Krankheit (Morbus Parkinson) ist gekennzeichnet durch einen Verlust dopaminerger Neuronen, was zur Störung von gerichteten

Bewegungsabläufen führt (Lloyd et al., 1975). Zur Zeit werden Parkinson-Patienten mit L-Dopa, einer Vorstufe in der Synthese des Neurotransmitters Dopamin, behandelt, um das Defizit in der dopaminergen Neurotransmission auszugleichen. Durch die Therapie mit L-Dopa kann der Krankheitsverlauf jedoch nicht gestoppt, sondern nur verlangsamt werden. Als Nebenwirkung der Behandlung ist die Entstehung von Psychosen beschrieben (Coleman, 1992).

Bei Parkinson-Patienten wurde auch ein 50 %-iger Verlust an hochaffinen Nikotin-Bindungsstellen im Gehirn festgestellt (Whitehouse et al., 1988; Lang et al., 1993). Ein möglicher Therapieansatz für die Krankheit wäre somit ein spezifischer Agonist oder allosterisch potenzierender Ligand für einen in den betroffenen Gehirnbereichen exprimierten nACh-Rezeptor, um das Defizit der cholinergen Neurotransmission durch eine Aktivierung der verbleibenden nACh-Rezeptoren schon bei einer niedrigen Agonisten-Konzentration auszugleichen. Durch die Aktivierung präsynaptisch lokalisierter nACh-Rezeptoren könnte auf diesem Weg auch die Freisetzung des Neurotransmitters Dopamin erleichtert werden, was die bei der Parkinson'schen Krankheit gestörte dopaminerge Neurotransmission verbessern würde.

Anhand von in situ Hybridisierungen (LeNovere et al., 1996) und immunohistochemischen Untersuchungen (Göldner et al., 1997) konnte in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* eine starke Expression insbesondere der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit nachgewiesen werden. In vivo Experimente an Ratten zeigten deutlich, daß eine Inhibition der $\alpha 6$ nACh-Rezeptoren die Beweglichkeit der Tiere einschränkt (Le Novere et al., 1999). Das distinkte Expressionsmuster der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit in einem Gehirnbereich, der während des Krankheitsverlaufs der Parkinson'schen Erkrankung degeneriert, machen $\alpha 6$ nACh-Rezeptoren zu einem Ziel für die Entwicklung einer Therapie der Parkinson'schen Erkrankung.

Schizophrenie. Schizophrenie ist eine sich chronisch verschlechternde heterogene Psychose, die durch Halluzinationen, abnorme Verhaltensweisen und apathische Zustände gekennzeichnet ist (Arnold und Trojanowski, 1996). Eine Beteiligung von nACh-Rezeptoren an diesem Krankheitsbild wurde erstmals aus der geringeren Anzahl an Bindungsstellen für die radioaktiv markierten nikotinischen Liganden ^{125}I - α -Btx und ^3H -Cytisin in Gehirnen von Schizophrenie-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen geschlossen (Freedman et al., 1995). Eine Reihe von späteren Studien deuten auf eine Korrelation zwischen dem Ausbruch dieser Krankheit und Veränderungen des $\alpha 7$ nAChR-Gens hin. So konnte bei einigen Schizophrenie Patienten ein Dinukleotid-Polymorphismus auf Chromosom 15, im Bereich des $\alpha 7$ nACh-Rezeptor Locus, identifiziert werden (Freedman et al., 1997). Des Weiteren wurde im frontalen Cortex des Gehirns bei schizophrenen Menschen nach deren Tod eine geringere Expression des $\alpha 7$ nAChR-Proteins im Vergleich zu gesunden Personen nachgewiesen (Guan et al., 1999).

Tourette Syndrom. Das Tourette-Syndrom ist eine hyperkinetische, motorische Störung, die durch motorische Zuckungen, Hyperaktivität, Angstzustände und Phobien gekennzeichnet ist. In der klassischen Medizin werden diese Krankheitssymptome mit Neuroleptika wie

Haloperidol behandelt, was jedoch nur in einigen Fällen Linderung verschafft und von starken Nebenwirkungen wie Sedation des Patienten begleitet ist. Es konnte gezeigt werden, daß eine Nikotingabe über einen begrenzten Zeitraum zu einer Verbesserung des Krankheitszustandes führt. Die positive Wirkung des Nikotins wird auf eine Desensibilisierung bzw. Inaktivierung von $\alpha 7$ und $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren zurückgeführt (Olale et al., 1997). Sollte sich durch weitere Experimente bestätigen lassen, daß Patienten durch Verminderung der Aktivität der nACh-Rezeptoren therapiert werden können, so wäre die Entwicklung eines spezifischen Antagonisten oder allosterisch inhibierend wirkenden Liganden als Medikament für diese Patienten sehr hilfreich.

Alzheimer'sche Demenz. Die Alzheimer'sche Demenz ist eine neurodegenerative Erkrankung des Gehirns, die gekennzeichnet ist durch ein vermindertes Gedächtnis- sowie Lernvermögen, Angst und Depression. Der progressiv fortschreitende Verlauf der Erkrankung führt in späten Stadien zu starken Persönlichkeitsveränderungen, die bis hin zum Verlust des Bewußtseins der eigenen Persönlichkeit führen. Als spezifische neuropathologische Veränderungen treten extrazelluläre Plaques und intrazelluläre Fibrillen auf, die nach dem Tod der Patienten auch zur eindeutigen Diagnose der Krankheit dienen. Die Plaques entstehen durch Ablagerung des Amyloid- β -Proteins in extrazellulären Gehirnbereichen (Glenner et al., 1984) aufgrund einer Störung im Processing des Amyloid-Vorläuferproteins. Im ungestörten Stoffwechsel wird dieses glykosylierte Transmembran-Protein innerhalb der Transmembran-Domäne in ein lösliches, sekretorisches Protein gespalten, dessen Funktion bisher noch unbekannt ist. Die intrazellulären Fibrillen bestehen aus Filamenten aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein tau (Delacourte und Defossez, 1986). Das normalerweise in Axonen lokalisierte tau-Protein kommt in den Fibrillen in einer hyperphosphorylierten Form vor (Grundke-Iqbal et al., 1986). Im Zusammenhang mit dem Ausbruch der Alzheimer'schen Demenz ist eine Verminderung der Anzahl an hochaffinen Nikotin-Bindungsstellen in Cortex und Hippocampus der Alzheimer-Patienten zu beobachten, wovon hauptsächlich der $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptor betroffen ist (Warpman und Nordberg, 1995). In der klassischen Therapie der Alzheimer'schen Krankheit werden deshalb Acetylcholinesterase-Inhibitoren, wie Tacrin, Donepezil und Rivastigmin, eingesetzt, um das Defizit in der cholinergen Neurotransmission durch eine Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt auszugleichen. Der therapeutische Erfolg dieser Substanzen ist jedoch beschränkt (Nordberg und Svensson, 1998) und keine von ihnen kann den progressiven Verlauf der Krankheit stoppen (Flicker, 1999). Außerdem sind erhebliche Nebenwirkungen mit der klassischen Therapie verbunden, da durch die erhöhte Acetylcholin-Konzentration auch die muscarinischen Acetylcholin-Rezeptoren verstärkt aktiviert werden. Ein neuer Weg für die Behandlung dieser Krankheit ist deshalb der Einsatz von allosterisch potenzierend wirkenden Liganden (APL) als Medikament (1.1, Liganden neuronaler nAChR; Maelicke et al., 1996). Da diese Substanzen die Aktivität der nACh-Rezeptoren erhöhen, ohne selbst in die verschiedenen Prozesse der Neurotransmission involviert zu sein, rufen sie auch keine kompensatorischen Reaktionen, wie die

Desensibilisierung oder Verminderung der Expression des Rezeptors, hervor. Ein spezifischer nicht-kompetitiver Agonist des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors wäre aus folgenden Gründen in der Alzheimer-Therapie sehr hilfreich: Für diesen Rezeptor konnten neuroprotektive Eigenschaften sowie nach seiner Aktivierung eine verminderte Toxizität des β -Amyloid-Proteins nachgewiesen werden. (Kihara et al., 1997; Svensson und Nordberg, 1998). Weiterhin könnte durch die Aktivierung präsynaptischer $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren die Ausschüttung von Acetylcholin erhöht und somit der Verlust an $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren mittels einer gesteigerten Aktivierung der verbleibenden nACh-Rezeptoren ausgeglichen werden. Da der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor die Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter moduliert (siehe Kap. I.1.3), könnten durch seine Aktivierung Defizite in verschiedenen Neurotransmittersystemen positiv beeinflusst werden.

1.5 Heterologe Expression neuronaler nACh-Rezeptoren

Angesichts der Vielzahl verschiedener nAChR-Untereinheiten stellt sich die Frage, in welcher Kombination und Stöchiometrie diese Untereinheiten einen funktionellen Rezeptor ausbilden. Des weiteren ist es wichtig, die pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften der verschiedenen funktionellen Rezeptoren zu charakterisieren, um deren spezielle Funktionen *in vivo* zu erkennen. Da natürliche Systeme, wie z.B. Nervenzellen, die verschiedenen nAChR-Untereinheiten und die daraus gebildeten Rezeptoren zwar in unterschiedlichen Mengen aber gleichzeitig exprimieren, werden zur Charakterisierung der verschiedenen nACh-Rezeptoren heterologe Expressionssysteme benötigt, die eine definierte Kombination an Rezeptor-Untereinheiten funktionell exprimieren. Diese Expressionssysteme ermöglichen auch erst die Entwicklung spezifischer Liganden für einen bestimmten Rezeptor, die in den oben beschriebenen Therapiemöglichkeiten eingesetzt werden können.

Die meisten pharmakologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen verschiedener nACh-Rezeptoren wurden in heterologen Systemen, insbesondere den Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus laevis*, mit transient exprimierten Rezeptoren durchgeführt. Nach der Injektion von cRNA oder cDNA bestimmter nAChR-Untereinheiten exprimieren diese Oocyten den entsprechenden nACh-Rezeptor funktionell und in hoher Ausbeute in ihrer Plasmamembran (Seguela et al., 1993; Gerzanich et al., 1997). In Oocyten exprimierte Rezeptoren weisen jedoch z.T. im Vergleich zu in Primärkulturen exprimierten Rezeptoren abweichende pharmakologische und elektrophysiologische Eigenschaften auf, was auf andere posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein könnte (Role et al., 1992). Die Größe der Oocyten beeinträchtigt außerdem eine schnelle und gleichzeitige Applikation von Agonisten an alle Rezeptoren in der Plasmamembran, was eine gleichzeitige Aktivierung dieser Rezeptoren und damit elektrophysiologische Messungen erschwert (Costa et al., 1994).

Um eine veränderte posttranslationale Modifikation zu vermeiden, wurden verschiedene Säugerzelllinien (COS-Zellen, 3T3-Fibroblasten) als Expressionssystem für nACh-Rezeptoren verwendet (Claudio et al., 1987; Claudio et al., 1989, Gu et al., 1990). Nach einer Transfektion unterscheiden sich die einzelnen Zellen hinsichtlich der aufgenommenen DNA-Menge und der Expressionsstärke der transfizierten nACh-Rezeptoren. Da der transfizierte Expressionsvektor sich nicht in der Zelle repliziert, wird die transfizierte DNA bei der Zellteilung nur einem Teil der Tochterzellen weitergegeben. Nach einer Transfektion nimmt deshalb der Anteil an transfizierten Zellen in einer Zellpopulation stetig ab. Transiente Transfektionen müssen deshalb ständig unter hohem Zeit- und Arbeitsaufwand erneut durchgeführt werden. Unter diesen Bedingungen erweist sich die Charakterisierung eines Rezeptors mittels elektrophysiologischer Messungen als sehr arbeitsintensiv. Bei stabilen Transfektionen wird eine Selektion positiv transfizierter Zellen unter Antibiotika-Druck durchgeführt. Klonale Zelllinien bieten den Vorteil einer homogenen Population aus Zellen mit identischen genetischen und biochemischen Eigenschaften. Aufgrund der Unsterblichkeit von Zelllinien steht mit stabilen Zellklonen eine unbegrenzte Menge des Rezeptors für verschiedene Experimente zur Verfügung (Lukas, 1998).

Stabile Expressionen wurde bisher für den nACh-Rezeptor aus dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* (Claudio et al., 1987), den muskulären nACh-Rezeptor der Maus (Forsayeth et al., 1990; Sine und Claudio, 1991) und folgende neuronale, heteromere nACh-Rezeptoren durchgeführt: $\alpha 4\beta 2$ (Whiting et al, 1991; Buisson et al., 1996; Samochocki et al., 2000), $\alpha 3\beta 4$ (Stetzer et al., 1996; Staudermann et al., 1998), $\alpha 2\beta 4$ sowie $\alpha 4\beta 4$ (Staudermann et al., 1998).

In dem Zeitraum, in dem diese Arbeit angefertigt wurde, ließ sich der homomere $\alpha 7$ nACh-Rezeptor bisher nur in einigen wenigen Fällen funktionell in Zelllinien exprimieren. Dabei wurde die neuronale Zelllinie SH-SY5Y mit einer endogenen Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors (Puchacz et al., 1994) oder die nicht-neuronalen Zelllinien HEK-293 (Gopalakrishnan et al., 1995), GH4C1 (Quik et al., 1996) und QT6 (Kassner und Berg, 1997) für die Transfektion mit dem $\alpha 7$ nAChR-Gen verwendet. Bei vielen Versuchen scheiterte jedoch die funktionelle heterologe Expression des homomeren $\alpha 7$ nACh-Rezeptors. In den transfizierten Zellen fand zwar eine Translation des $\alpha 7$ nAChR-Proteins statt, die Bindung von α -Bungarotoxin an den Rezeptor war jedoch nicht nachweisbar. Dieses Problem ließ sich weder mit Hilfe expressionssteigernder Methoden, wie Erhöhung des cAMP-Spiegels oder Steigerung der Prolyl-Isomerase-Aktivität, noch unter Verwendung unterschiedlichster Zelllinien neuronalen und nicht-neuronalen Ursprungs (HEK-293, CHO, COS-7, NIE-115, NCB-20, Neuro-2A oder NG108-15) lösen (Cooper und Milar, 1997).

Die Expression $\alpha 6$ enthaltender nACh-Rezeptoren wurde bisher lediglich transient durchgeführt. So assemblierte die $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit des Hühnchens zusammen mit der humanen $\beta 4$ nAChR-Untereinheit in Oocyten zu einem funktionellen Rezeptor. In dem gleichen Expressionssystem scheiterte der Versuch, homomere oder heteromere $\alpha 6$

enthaltende nACh-Rezeptor ausschließlich aus Untereinheiten des Hühnchens zu exprimieren (Gerzanich et al., 1997). Erste wenige Daten hinsichtlich der Funktionalität von $\alpha 6\beta 2$ sowie $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren des Hühnchens wurden dann anhand transienter Transfektionen von BOSC23-Zellen gemessen (Fucile et al., 1998). In der neuesten Veröffentlichung auf dem Gebiet der $\alpha 6$ nAChR-Expression wird beschrieben, daß humane $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren ineffizient und humane $\alpha 6\beta 2$ nACh-Rezeptoren überhaupt nicht als funktionelle Rezeptoren in Oocyten assemblieren. Erst eine Koexpression der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit mit zwei weiteren Untereinheiten führte in diesen Experimenten zur Ausbildung funktioneller Kanäle ($\alpha 6\beta 4\beta 3$ nAChR, $\alpha 6\alpha 3\beta 2$ nAChR und $\alpha 6\alpha 4\beta 2$ nAChR, Kuryatov et al., 2000).

2 Aufgabenstellung

Neuronale $\alpha 6$ - bzw. $\alpha 7$ -tragende nACh-Rezeptoren stellen mögliche Zielstrukturen für neue Therapieansätze gegen neurodegenerative Erkrankungen dar (Kap. I.1.4). Für die Entwicklung neuer Medikamente, die möglichst spezifisch die Funktion eines nAChR-Subtyps beeinflussen sollten, muß zunächst eine große Anzahl an Substanzen auf ihre Wirkung auf den Rezeptor getestet werden. Ein solches Screening mit hohem Durchsatz wird klassischerweise mittels Bindungsstudien durchgeführt, in denen die Bindung einer Substanz an das Rezeptormolekül nachgewiesen wird. Die spezifische Wirkung einer Substanz auf die Funktionalität eines Rezeptors erschließt sich jedoch erst eindeutig anhand von Funktionalitätsanalysen, die für die Untersuchung vieler Substanzen in einer möglichst kurzen Zeit automatisiert werden müssen. Um die große Anzahl an Experimenten unter standardisierten Versuchsbedingungen durchführen zu können, wird eine stabile Expression des jeweiligen nAChR-Subtyps in einer Säugerzelllinie benötigt, da die Rezeptoren nur in dieser Form in genügender Menge und funktionell zur Verfügung stehen.

Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, $\alpha 6$ - und $\alpha 7$ -tragende nACh-Rezeptoren funktionell in einem Zellsystem ektopisch zu exprimieren. Das Expressionssystem sollte dabei so konzipiert werden, daß es sich später auch zur Testung einer großen Anzahl von Substanzen auf der Basis automatisierter Calcium-Imaging-Analysen eignet. Da die funktionelle Expression homomerer $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren sich im Laufe dieser Arbeit als schwierig erwies (siehe auch Quik et al., 1996, Cooper und Milar 1997), war es interessant, nach einer optimierten Transfektion die Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit auf ihrem Weg vom RNA-Molekül bis zur Assemblierung des funktionellen Rezeptors zu verfolgen. Auf der Basis der dabei charakterisierten Schwierigkeiten war nach Lösungsmöglichkeiten für eine funktionelle Expression des Rezeptors zu suchen.

Im Hinblick auf $\alpha 6$ -tragende nACh-Rezeptoren stellte sich die Frage, in welcher Form die humane $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit grundsätzlich funktionelle nACh-Rezeptoren ausbildet. In diesem Zusammenhang war sowohl die Expression funktioneller homomerer $\alpha 6$ nACh-

Rezeptoren als auch eine Assemblierung der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit mit einer der drei bekannten β nAChR-Untereinheiten ($\beta 2$ - $\beta 4$ nAChR) zu einem funktionellen Rezeptor denkbar. Nach transienter Transfektion verschiedener Kombinationen an nAChR-Untereinheiten war zunächst deren Lokalisation innerhalb der Zelle zu analysieren. Die Herstellung einer klonalen Zelllinie, die humane $\alpha 6$ -tragende nACh-Rezeptoren stabil funktionell exprimiert, sollte anschließend die pharmakologische und elektrophysiologische Charakterisierung dieser Rezeptoren ermöglichen und gleichzeitig ein Testsystem für das automatisierte Screening einer großen Zahl von Substanzen bereitstellen.

3 Durchführung

Die funktionelle Expression ionotroper Rezeptoren, wie z.B. der nACh-Rezeptor, kann anhand elektrophysiologischer oder Calcium-Imaging-Untersuchungen charakterisiert werden. Die patch-clamp-Methode ermöglicht die Messung des Agonisten-induzierten Ionenstroms durch Ionenkanäle, wobei das Verfahren äußerst arbeitsintensiv und zeitaufwendig ist. Eine Automatisierung des Verfahrens für die Untersuchung einer großen Anzahl von Substanzen ist nicht möglich. Eine Alternative, den Ionenstrom zu messen, stellt das Calcium-Imaging dar. Hierbei wird der Agonisten-induzierte Einstrom von Calcium-Ionen über die Bindung an einen Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fura-2, Fluo-3) gemessen (Kramer und Gräwe, 1994). Calcium-Imaging kann in Verbindung mit einem Fluoreszenzmikroskop so durchgeführt werden, daß, im Gegensatz zur patch-clamp-Methode, eine große Anzahl von Zellen (entsprechend dem Kameraausschnitt) gleichzeitig mit Einzellaufklärung erfasst werden. Unter Verwendung des FLIPR-Systems (Fluorometric Imaging Plate Reader) ist eine simultane Messung von 96 Loch bzw. 384 Loch Mikrotiterplatten möglich.

Da der Calcium-Anteil am Gesamt-Kationeneinstrom nach Aktivierung neuronaler nACh-Rezeptoren durchschnittlich nur 4 % beträgt (Vernino et al., 1994), wurde in unserem Labor von Dr. Eva Stetzer (1997) ein Expressionssystem etabliert, in dem nACh-Rezeptoren und spannungsgesteuerte L-Typ Calcium-Kanäle gemeinsam ektopisch exprimiert werden. In diesem Expressionssystem bewirkt eine ausreichende Depolarisation der Plasmamembran durch die Aktivierung der nACh-Rezeptoren die Öffnung spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle und somit einen massiven Calcium-Einstrom für mehrere Sekunden. Dadurch war es gelungen, die Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration nach der Aktivierung von nACh-Rezeptoren signifikant zu erhöhen und infolgedessen den Einsatz der Calcium-Imaging-Methode zum Nachweis dieser Rezeptoren zu erleichtern (Dissertation Stetzer E., 1997). Als Zellsystem für die Expression wurde dabei eine HEK-293-Zelllinie verwendet, die bereits stabil mit dem spannungsabhängigen $L\alpha 1_{IC-b}$ -Typ Calcium-Kanal transfiziert ist (Kleppisch et al., 1994). Diese Zelllinie wird im folgenden als HEK-293/ $\alpha 1$ bezeichnet. Dieses

Zellmodell mit spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen bildet im Rahmen dieser Arbeit die Basis zur Expression $\alpha 6$ - und $\alpha 7$ -tragender nACh-Rezeptoren.

Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich, daß zelltypspezifische Faktoren für die Schwierigkeiten bei der heterologen Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors verantwortlich sein könnten (Cooper und Milar, 1997). Deshalb war es denkbar, daß sich andere Zelllinien als die HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinie für eine funktionelle Expression dieses Rezeptors besser eignen. Dazu wurden die Wachtel-Zelllinie QT6 und die Hypophysen-Zelllinie GH4C1 ausgewählt, in denen bereits in der Literatur die erfolgreiche Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors beschrieben wurde (Quik et al., 1996; Kassner und Berg, 1997). Die neurale Zelllinie PCC7-Mz1 wurde ebenfalls für die Expression dieses Rezeptors eingesetzt, da diese Zellen endogen $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren exprimieren (Dissertation Xia S., 1998; Dissertation Pohl K., 2000) und somit über die notwendige Maschinerie für eine funktionelle Expression dieses Rezeptors verfügen sollten. Des weiteren wurde die Insektenzelllinie S2 aus *Drosophila melanogaster* in Verbindung mit einem induzierbaren Expressionsplasmid hinsichtlich einer funktionellen $\alpha 7$ nAChR-Expression untersucht.

Bei einer funktionellen ektopischen Expression von nACh-Rezeptoren werden diese Rezeptoren in der Plasmamembran der Zellen exprimiert. Für die $\alpha 6$ und $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit gibt es jedoch keine kommerziell erhältlichen Antikörper, um die Expression dieser Untereinheiten in heterologen Zellsystemen mittels Immunfluoreszenzanalysen verfolgen zu können. Deshalb wurde die cDNA der Untereinheiten mit einem Reporter gen verknüpft. Mit dem **green fluorescent protein** (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* steht ein Reportersystem zur Verfügung, das die Expression des zu untersuchenden Proteins anhand einer grünen Fluoreszenz sichtbar macht (Shimomura et al., 1962; Morin und Hastings, 1971). In dieser Arbeit wurde die GFP-Variante EGFP (**enhanced green fluorescent protein**) verwendet, die eine 35mal stärkere Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp auszeichnet (Cormack et al., 1996). Das Fluoreszenzprotein wurde an den extrazellulären C-Terminus der jeweiligen nAChR-Untereinheit fusioniert. Hierdurch sollte die Bindung eines Liganden im N-terminalen Bereich der Untereinheit durch die Fusion möglichst ungestört bleiben.

Zur Herstellung der Fusionsproteine war die Sequenz der jeweiligen nAChR-Untereinheit stromaufwärts der EGFP-Sequenz in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N3 (Invitrogen) zu klonieren, wobei das Leseraster unbedingt beibehalten werden mußte, um eine korrekte Translation des EGFPs zu gewährleisten. Dazu waren zunächst mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geeignete Restriktionsschnittstellen am 3'- und am 5'-Ende der cDNA der nAChR-Untereinheit einzuführen. Dieses erfolgte durch die Wahl von Primern, die an ihrem stromaufwärts gelegenen Ende die Erkennungssequenz einer geeigneten Endonuklease beinhalten.

Nach transienter Transfektion in Zellen war anhand der grünen Fluoreszenz der Fusionsproteine die Expression der jeweiligen nAChR-Untereinheit mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops direkt zu verfolgen. Der C-Terminus einer nAChR-Untereinheit, an den EGFP

fusioniert wurde, ist extrazellulär lokalisiert. Bei korrekter Faltung und Assemblierung der Rezeptoruntereinheit in der Plasmamembran, befindet sich somit auch das C-terminal fusionierte EGFP im extrazellulären Bereich und kann durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit einem GFP-spezifischen Antiserum ohne Permeabilisierung der Plasmamembran an Zellen nachgewiesen werden.

Die Leistungsfähigkeit dieses Systems zum Nachweis oligomerer Ionenkanäle sollte zunächst am Beispiel des bereits in der Vergangenheit mehrfach heterolog exprimierten $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors (Stetzer et al., 1996; Staudermann et al., 1998) überprüft werden. Aufgrund der nachgewiesenen Funktionalität dieses nACh-Rezeptors war nach der Transfektion eine Expression beider Untereinheiten in der Plasmamembran von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen zu erwarten. Des Weiteren war am Beispiel des humanen $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors der Einfluß des fusionierten EGFP-Proteins auf die Funktionalität von nACh-Rezeptoren zu untersuchen. Für diese Analysen wurden chimäre $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren transient ektopisch exprimiert, die EGFP jeweils an den α - bzw. den β -Untereinheiten oder an allen Untereinheiten gleichzeitig trugen. Die pharmakologischen Eigenschaften des $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors und der fluoreszierenden, chimären $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren waren anschließend anhand von Calcium-Imaging- sowie patch-clamp-Untersuchungen zu vergleichen.

Zur Charakterisierung der Schwierigkeiten bei der heterologen Expression des homomeren $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen war der Weg dieses Rezeptors innerhalb der Zelle von der Transkription der mRNA bis zur Assemblierung des oligomeren Rezeptors zu verfolgen. Dabei war die Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit auf der Ebene der Transkription mittels Northern-Blot und RT-PCR-Analysen nachzuweisen. Um Mutationen innerhalb der transkribierten mRNA ausschließen zu können, sollte das Produkt einer für den $\alpha 7$ nACh-Rezeptor spezifischen RT-PCR kloniert und anschließend sequenziert werden. Anschließend erschien es sinnvoll, das in den Zellen translatierte $\alpha 7$ nAChR-Protein in einem Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper zu charakterisieren und mit dem aus dem Gehirn von Ratten isolierten Referenzprotein zu vergleichen. Um eine ausreichende Menge des Rezeptors für diese Experimente bereitzustellen und die Ergebnisse der verschiedenen Analysemethoden miteinander vergleichen zu können, wurde der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor der Ratte stabil in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimiert.

Für die humane $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit war zunächst mittels transients Transfektion von EGFP-gekoppelten nAChR-Untereinheiten zu klären, ob diese Untereinheit alleine oder in Kombination mit einer der drei bekannten humanen β nAChR-Untereinheiten ($\beta 2$ - $\beta 4$) in der Plasmamembran von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimiert wird. Anschließend sollten stabile klonale Zelllinien der plasmamembranständig exprimierten $\alpha 6$ nACh-Rezeptoren etabliert werden, um diese pharmakologisch charakterisieren zu können und ein geeignetes Testsystem für das Screening vieler Substanzen an diesem nAChR-Subtyp mittels Calcium-Imaging bereitzustellen.

II Material und Methoden

1 Geräte und Materialien

1.1 Geräte

Fluoreszenzmikroskopie:

Invertmikroskop D	Zeiss, Oberkochen
IM 35 mit 100 W Lampe	Zeiss, Oberkochen
Axiophot Mikroskop mit HBO 50 W Lampe und MC 63 Fotozubehör	Zeiss, Oberkochen

Fluoreszenzfiltersätze:

Grün: BP 596/FT 580/LP 590	Zeiss, Oberkochen
Multiband: TBP 400, 495, 570/FT 410, 505, 585/TLP 460, 530, 610	Zeiss, Oberkochen

PCR:

Thermocycler Gene Amp™ PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
---	---------------------------

Fura-2 Calcium-Imaging:

Mikroskop Axiovert 135 TV	Zeiss, Oberkochen
Xenon Lampe XBO 75W	Hamamatsu, Herrsching
Kamera CCD C3077	Hamamatsu, Herrsching
Bildverstärker DVS-3000	Hamamatsu, Herrsching
Filterwechsler Lambda 10	Hamamatsu, Herrsching
Color video copy processor	Mitsubishi

Elektrophysiologische Meßanlage:

EPC-7 patch clamp system	List Electronics, Darmstadt
--------------------------	-----------------------------

1.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität eingesetzt und von folgenden Firmen bezogen: Baker, Niederlande; Boehringer, Mannheim; Fluka, Neu-Ulm; Merck, Darmstadt; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen sowie Roth, Heidelberg.

- Radioaktiv markierte Chemikalien

$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (3000 Ci/mM)

NEN DuPont

- Chemikalien für die Zellkultur

Die auf Mykoplasmen- und Keimfreiheit getesteten Chemikalien wurde von folgenden Firmen bezogen:

DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium)	Gibco BRL, Eggenstein
Fibronektin	Calbiochem/USA
Fötales Kälberserum	Boehringer, Mannheim
Genitacin (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
Puromycin	Gibco BRL, Eggenstein

- Chemikalien für elektrophysiologische und Calcium-Imaging-Experimente

Acetylcholinbromid	Sigma, Deisenhofen
Atropinsulfat	Sigma, Deisenhofen
Cytisin	Sigma, Deisenhofen
Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2 AM)	Molecular Probes, Niederlande
Hexamethoniumbromid	Fluka, Neu-Ulm
Mecamylamin	RBI, Köln
Methyllycaconithin (MLA)	RBI, Köln
(-)-Nikotinditartrat	Research Biochemicals Int., Natrick
Nitrendipin	Research Biochemicals Int., Natrick

1.3 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme sowie die DNA-modifizierenden Enzyme wurden von den Firmen Boehringer, Mannheim; Gibco BRL, Eggenstein; Pharmacia, Freiburg und MBI Fermentas/St. Leon-Roth bezogen und entsprechend den Angaben der Hersteller verwendet.

1.4 Antikörper

Zur Untersuchung der EGFP-gekoppelten nAChR-Untereinheiten wurde als Erstantikörper der polyklonale aus Kaninchen gewonnene GFP-Antikörper der Firma Mobitec/Göttingen verwendet. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:500 in Immunfluoreszenzfärbungen bzw. 1:2000 in Western-Blot-Analysen eingesetzt.

Als Zweitantikörper dienten anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege, die entweder für Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas-Rot (TR) (Dianova/Hamburg) oder für Western-Blot-Analysen mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (POD) gekoppelt waren (Dako/Hamburg). Der TR-gekoppelte Antikörper wurde

1:200 und der POD-gekoppelte Antikörper 1:2000 in den entsprechenden Analysen eingesetzt.

Für den Nachweis des exprimierten $\alpha 7$ nAChR-Proteins mittels Western-Blots wurde ein polyklonaler anti- $\alpha 7$ -Erstantikörper verwendet, der aus der Ziege gewonnen worden war (Santa Cruz/Heidelberg) und 1:500 in den Analysen verdünnt wurde. Anschließend wurde ein POD-gekoppelter anti-Ziege-Antikörper als Zweitantikörper in einer Verdünnung 1:2000 verwendet (Dako/Hamburg).

1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech/Ebersberg synthetisiert, um die cDNA verschiedener nAChR-Untereinheiten aus dem Menschen und der Ratte mit Hilfe der PCR zu amplifizieren und anschließend in einen geeigneten Expressionsvektor zu klonieren. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind fett markiert.

nAChR-Untereinheit	Strang	Sequenz	Schnittstelle
<i>Human</i> $\alpha 3$	5'	GCCAACATATA AAGCTT ATGGCTCTGGCCGTCTCGCT	HindIII
	3'	GCACTTGATAG GTACCT GCATCTTCCCTGGCCATCA	KpnI
<i>Human</i> $\alpha 5$	5'	GCAAATATATA AAGCTT ATGGCGGCGGGGGTCAGG	HindIII
	3'	GCAGCGGAC CGGTACC CTTATTTGCATTTCCAATAT	KpnI
<i>Human</i> $\alpha 6$	5'	GCAGATATAT GAGCTC ATGCTGACCAGCAAGGGGC	SacI
	3'	GCACTTGATAG GTACC AGATTTTCTGTGTGTTCC	KpnI
<i>Human</i> $\alpha 7$	5'	GCAAAAAAAAA AGGATCC ATGCGCTGCTCGCCGGGAGG	BamHI
	3'	GCAAAAATA AGGATCCC GCAAAGTCTTTGGACACGG	BamHI
<i>Human</i> $\beta 3$	5'	GCCACCGTCGA AAGCTT ATGCTCCCAGATTTTATGCT	HindIII
	3'	GTCCGTTCA AGGTACC ATGGTAACTATGTAGCCACA	KpnI
<i>Human</i> $\beta 4$	5'	GCAAAAATATA AAGCTT ATGAGGCGCGCGCCTTCCCTG GT	HindIII
	3'	CATCTTGATAG GTACC GTCACGCTGGGCAGCGTAGG	KpnI
<i>Ratte</i> $\alpha 7$	5'	GCAAAAATATA AAGCTT ATGTGCGGCGGGCGGGGAGG	HindIII
	3'	CTACTTGATAG GTACC AGCAAAGTCTTTGGACACAG	KpnI
<i>Ratte</i> $\alpha 3$	5'	CTATCGGGTCA AAGCTT ATGGGTGTTGTGCTGCTCCC	HindIII
	3'	GACAGTGCAC GGTACC TGTGCATCTCTGGCCATCA	KpnI
<i>GAP-DH</i>	5'	CATCACCATCTTCCAGGAGCG	keine
	3'	GGTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	keine

1.6 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden folgende *E. coli* Bakterienstämme verwendet:

- C600 (Appleyard, 1954; Raleigh et al., 1988)

Genotyp: F⁻; e14-(McrA⁻; thr-1; leuB6; thi-1; lacY1; supE44; rfbD1; fhuA21; EcoK^rm⁺; McrBC⁺)

- XL1-Blue (Stratagene/Heidelberg)

Genotyp: recA1; endA1;gyrA96; thi-1; hsdR17; supE44; relA1; lac; [F'proAB; lacIq; ZΔAM15; TN10 (tet^r)]

- Top 10F['] (Invitrogen/Niederlande)

Genotyp: mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC);Φ80lacZΔM15; DlacX74; recA1; deoR; araD139; Δ(ara-leu)7697; galU; galK; rpsL; (Ste^R); end A1; nupG

1.7 Plasmidvektoren

- pCDNA3[®]:

Dieser eukaryotische Expressionsvektor stellt eine weiterentwickelte Form von pCDNA1Neo dar (Invitrogen/Niederlande). Der Vektor steht unter der Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV) Promotors. Aufgrund eines BGH (bovine growth hormone)-Polyadenylierungssignals wird das eingeführte Gen mit einem PolyA-Schwanz versehen. Außerdem weist der Vektor ein Neomycinresistenzgen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors zur Selektion transfizierter, eukaryotischer Zellen mittels Genitacin und ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion transformierter Bakterien auf.

- pBTKpac:

Dieser eukaryotische Expressionsvektor enthält ein Puromycinresistenzgen unter der Kontrolle des Thymidin-Kinase (TK)-Promotors. Bei der Herstellung stabiler Zelllinien wurde zur Vermittlung einer zusätzlichen Antibiotikaresistenz dieser Vektor kotransfiziert.

- pEGFP N-3:

Die Besonderheit dieses eukaryotischen Expressionsvektors besteht darin, daß er mit dem EGFP-Gen (enhanced green fluorescent protein) ein grün fluoreszierendes Reportersystem aufweist. Im Vergleich zu dem aus der Qualle *Aequorea victoria* isolierten Wildtyp-GFP enthält das EGFP mehrere Mutationen. Durch den Austausch von Phenylalanin-64 gegen Leucin sowie von Serin-65 gegen Thyrosin konnte die Fluoreszenzstärke bis um das 35-fache verstärkt werden. (Cormack et al., 1996 ; Yang,T.T. et al. 1996)

Die multiple Klonierungsstelle des Vektors befindet sich auf der 3'-Seite der für EGFP kodierenden Sequenz, weshalb EGFP in dem exprimierten Fusionsprotein C-terminal angelagert wird. Der Vektor steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und enthält stromabwärts eine SV40-Polyadenylierungsstelle. Weiterhin vermittelt ein Neomycingen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors transfizierten eukaryotischen Zellen eine Resistenz gegen-

über dem Antibiotikum Genitacin. Das enthaltene Kanamycingen ermöglicht eine Selektion von transformierten Bakterien.

Bei der Klonierung eines Gens in die multiple Klonierungsstelle des Vektors darf das Leseraster zwischen dem einklonierten Gen und der EGFP-Sequenz nicht verändert werden. Andernfalls würde das Reporterprotein EGFP nicht in der korrekten Aminosäuresequenz translatiert werden. Deshalb ist der Vektor kommerziell in drei Leseraster-Varianten erhältlich (Invitrogen/Niederlande), wobei die N3-Version verwendet wurde.

- pCR[®]2.1-TOPO[®]:

Dieser prokaryotische Vektor wurde zur direkten Klonierung von PCR-Fragmenten verwendet. Das enthaltene Kanamycingen sowie das Ampicillingen ermöglichen eine Selektion von untransformierten Bakterien (Invitrogen /Niederlande).

1.8 DNA-Konstrukte

Die verwendeten cDNAs der humanen nAChR-Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 7$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ in dem eukaryotischen Expressionsvektor pCDNA3 (Invitrogen/Niederlande) wurden unserem Labor freundlicherweise von der Firma Janssen (Belgien) zur Verfügung gestellt (Groot Kormelink und Luyten, 1997). In dem gleichen Expressionsvektor waren die cDNAs der nAChR-Untereinheiten $\alpha 3$ (PCA48E; Boulter et al., 1987), $\alpha 7$ (Seguela et al., 1993) und $\beta 4$ (ZPC13; Duvoisin et al., 1989) aus der Ratte in unserer Arbeitsgruppe bereits vorhanden.

1.9 DNA-Längenstandards

- 1kb-Leiter (MBI Fermentas/St. Leon-Roth) mit folgenden DNA-Fragmenten (Länge in Basenpaaren):

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

- λ -Sty1/pBr322-AluI- Marker mit folgenden DNA-Fragmenten (Länge in Basenpaaren):

19332, 7743, 6223, 4254, 3472, 2690, 1882, 1489, 908, 659, 521, 403, 281, 100

1.10 Zelllinien

- GH4C1:

Die Zelllinie GH4C1 wurde aus der Zelllinie GH3 entwickelt (Tashijan, 1968). Diese ist eine Karzinom-Zelllinie aus der Hypophyse der Ratte, die durch die Sekretion von Wachstumshormonen gekennzeichnet ist (ATCC-Nr.: CCL-82.2).

- HEK-293:

HEK-293 ist eine humane Embryokarzinom-Zelllinie aus der Niere. Die Zellen sind mit dem Adenovirus 5 transformiert (Graham et al., 1977). ATCC-Nr.: CRL 1573 (American Tissue Type Collection)

- HEK-293/ α 1:

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um HEK-293-Zellen, die bereits stabil mit dem spannungsgesteuerten Calcium-Kanal $L\alpha_{1C-b}$ transfiziert waren (Kleppisch et al., 1994). Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Franz Hoffmann, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU München, zur Verfügung gestellt.

- PCC7-Mz1:

Bei der Embryonalkarzinomzelllinie PCC7-Mz1 handelt es sich um einen Subklon der PCC7-AzaR1-Zellen (Klon 1009). Die PCC7-AzaR1-Zellen sind wiederum ein Subklon der PCC7-S-Zellen, welche spontan aus dem vestikulären Tumor des rekombinanten Inzuchtmäusestammes 129xC57B1/6J hervorgegangen sind (Pfeiffer et al., 1981; Paulin et al., 1982; Lang et al., 1989)

- QT6:

Die Zelllinie QT6 ist eine Fibrosarcom-Zelllinie aus *Coturnix coturnix japonica* (Moscovici C. et al., 1977; ATCC-Nr.: CRL-1708).

1.11 Puffer und Kulturmedien

Name	Zusammensetzung
LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l bidest. Wasser; pH 7,4 mit NaOH einstellen; für Platten 15 g Agar pro l Medium zusetzen; autoklavieren
SOC-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 186 g KCl, 2 g $MgCl_2$, 3,6 g Glucose in 1 l bidest. Wasser
10 x PBS (phosphate buffered saline)	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4
10 x MOPS (3-Morpholino-propansulfonsäure)	250 mM 3-(N-morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 50 mM NaOAc, 10 mM NaN,N,N',N' -Ethyldiamintetraacetat (EDTA); pH 7,0 mit NaOH eingestellt; Lagerung bei 4°C
20 x SSC (saline sodium citrate)	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat; pH 7,0 mit NaOH eingestellt
10 x TBE (Tris, Borsäure, EDTA)	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 9 mM EDTA; ergibt pH 8,4
TE (Tris, EDTA)	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0

2 Molekularbiologische Methoden

2.1 Klonierung spezifischer DNA-Fragmente

Zur Klonierung von spezifischen DNA-Fragmenten müssen diese zunächst über geeignete Restriktionsschnittstellen in bakterielle Vektoren eingebracht werden. Nachdem die Aufnahmebereitschaft der Bakterien entsprechend erhöht wurde (kompetente Zellen), können die Vektoren in die kompetenten Bakterien eingebracht, dort vermehrt und schließlich auch wieder isoliert werden.

2.1.1 DNA-Amplifikation mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die cDNAs verschiedener nAChR-Untereinheiten aus der Ratte bzw. dem Mensch amplifiziert. Für ihre spätere Klonierung wurden gleichzeitig durch gezielte stille Mutationen Restriktionsschnittstellen stromaufwärts bzw. stromabwärts von der amplifizierten cDNA eingeführt.

Die PCR-Reaktionsansätze besaßen jeweils ein Volumen von 50 µl, wobei die cDNA in 30 Zyklen amplifiziert wurde.

PCR-Ansatz	1 µl	cDNA Matrize (20-100 ng)
	2 µl	Primer-Mix (5'- und 3'-Primer jeweils 25 pmol/µl)
	5 µl	10x HF cDNA PCR Puffer (Clontech/Palo Alto)
	5 µl	dNTP-Mix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP jeweils 2 mM)
	1 µl	HF cDNA Polymerase-Mix (Clontech/Palo Alto)
	x µl	H ₂ O
	50 µl	Endvolumen

PCR-Programm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	1 min	
94°C	20 s	30
68°C	4 min	
68°C	4 min	
4°C	bis zur Entnahme	

2.1.2 DNA-Spaltung durch Endonukleasen

Restriktionsenzyme erkennen spezifische Basensequenzen der DNA und hydrolysieren spezifisch die Phosphodiesterbindung zwischen 2 Nukleotiden, die entweder innerhalb der

Erkennungsequenz oder in definiertem Abstand dazu liegen. Bei der Hydrolyse entstehen DNA-Fragmente mit glatten oder überhängenden Enden.

Die Temperatur- und Pufferbedingungen im Restriktionsansatz wurden dabei entsprechend den Angaben des Herstellers für jedes Enzym eingestellt. Das Volumen wurde so gewählt, daß der Volumenanteil des eingesetzten Enzyms nicht 10 % des Gesamtvolumens überstieg. Ein Restriktionsansatz mit einem Volumen von 10 µl enthielt 100-500 ng DNA, 1 µl 10x Restriktionspuffer sowie durchschnittlich 2 Einheiten (U) Enzym und wurde bei der empfohlenen Temperatur 1 h inkubiert. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde im Anschluß durch die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 0,7 %-igen Agarosegel überprüft.

Für präparative Restriktionen von 1-10 µg DNA wurde die erforderliche Enzymmenge nach folgender Formel berechnet:

$$U(\text{Enzym}) = X \mu\text{g DNA} \frac{\text{Anzahl der Schnittstellen im Plasmid} \times \text{MG von } \lambda}{\text{Anzahl der Schnittstellen auf } \lambda \times \text{MG des Plasmids}}$$

2.1.3 Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren

Wenn ein Vektor zur Klonierung nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, so wurde der linearisierte Vektor an beiden Enden mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um seine Rezirkularisierung bei der anschließenden Ligationsreaktion zu verhindern.

Zu dem hitzeinaktivierten Restriktionsansatz wurden 50 mM Tris/HCl pH 9,5 hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. (Sambrook et al., 1989). Die Reaktion wurde gestoppt, indem der Restriktionsansatz direkt auf ein Agarosegel aufgetragen wurde. Aus diesem wurden anschließend die Vektor-DNA-Fragmente isoliert.

Restriktionsansatz: 5 µg geschnittener Vektor (in 50 µl Restriktionsansatz)
 6,5 µl 500 mM Tris/HCl pH 9,5
 3 µl alkalische Phosphatase (1U/µl)
 x µl H₂O
 65 µl Endvolumen

2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Nucleo-Spin[®]-Kit (Machery-Nagel/Düren) verwendet. Das Prinzip dieser DNA-Isolation beruht darauf, daß die Agarose in Lösung gebracht wird, und die freigesetzten Nukleinsäuren unter Hydrolyse-

bedingungen quantitativ an die Säulenmatrix binden. Die Elution der DNA erfolgt mit einer Lösung geringer Salz-Konzentration.

Zur Isolierung des gewünschten DNA-Fragments wurde die entsprechende Bande aus einem 0,7 %-igen Agarosegel auf dem UV-Tisch ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen, mit 300 µl NT1-Puffer pro 100 mg Gel versetzt und 10 min bei 50°C inkubiert, um die Gelmatrix zu schmelzen, wobei der Ansatz im Abstand von 2-3 min gründlich gemischt wurde. Anschließend wurden die gelösten Bestandteile auf eine Nucleo-Spin[®]-Säule aufgetragen. Nach einer Zentrifugation von 1 min bei 6000 g in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C, wurde der Durchfluß verworfen, die Säule mit 700 µl NT3-Puffer beladen und bei maximaler Geschwindigkeit 1 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde dieser Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt. Die Säulenmatrix wurde nun durch eine Zentrifugation der leeren Säule bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min getrocknet. Anschließend konnte die vom Gel und den Ethidiumbromid-Anteilen gereinigte DNA mit 50 µl H₂O bei einer Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit für 1 min von der Säulenmatrix abgelöst werden. Die Ausbeute der DNA-Isolierung wurde auf einem Agarosegel kontrolliert und betrug 50-80 % der eingesetzten DNA-Menge.

2.1.5 Ligation von DNA

- 5x Ligasepuffer: 250 mM Tris/HCl pH 7,6; 25 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 5 mM ATP; 25 % (w/v) PEG 8000
- T4-DNA-Ligase: 1 U/µl in 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 60 mM KCl; 50 % Glycerol; 20 mM Tris/HCl; pH 7,5

Die Ligation von geschnittenen, aus Agarosegelen aufgereinigten DNA-Fragmenten und dem entsprechend geschnittenen Vektor erfolgte in einem Gesamtvolumen von 15 µl. In einem Ligationsansatz wurden 50-100 ng DNA-Fragment sowie 25-50 ng Vektor mit 1U T4-Ligase (Pharmacia/Freiburg) in 1 x Ligase-Puffer bei 12°C über Nacht inkubiert. Als Kontrolle für die Rezirkularisierung des Vektors wurde ein Ansatz ohne DNA-Fragment mitgeführt.

2.1.6 Herstellung kompetenter Bakterien

E. coli-Bakterien wurden durch Behandlung mit zweiwertigen Ionen (Ca²⁺, Rb²⁺, Mn²⁺) aufnahmefähig für DNA gemacht (Hanahan, 1983).

- TFB I-Puffer: 30 mM Na⁺-Acetat; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl₂; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerol; pH 5,8
- TFB II-Puffer: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl₂; 15 % (v/v) Glycerol; pH 7,0

Zunächst wurde *E. coli* rekloniert, indem aus einer Einzelkolonie eine 5 ml Übernachtskultur angeimpft wurde. Diese Übernachtskultur wurde in 500 ml LB-Medium überimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD₅₉₅) von 0,45-0,55 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde nach dem Abkühlen auf Eis in einem sterilen Röhrchen in dem auf 4°C abgekühlten SS34-Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Das abzentrifugierte Bakterienpellet wurde vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen in 15 ml eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis, wurde die Bakteriensuspension bei 3000 Upm 10 min im SS34-Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde vorsichtig in 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer aufgenommen. Je 200 µl dieser Bakterienlösung wurden auf Eis aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei - 80°C gelagert.

2.1.7 Transformation von kompetenten Bakterien

Transformationen wurden sowohl mit den selbst kompetent induzierten *E. coli* C600 bzw. XL1-Blue sowie mit den ultrakompetenten, kommerziell erworbenen Top 10F'-Bakterien (Invitrogen/Niederlande) durchgeführt.

- Transformation von *E. coli* C600 bzw. XL1-Blue:

Zu dem Aliquot an kompetenten Bakterienzellen von 100 µl wurde der vorgekühlte Ligationssatz bzw. bei einer Retransformation 50 ng DNA pipetiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Erwärmung auf 42°C für 2 min (Hitzeschock) wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien für weitere 45 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf festen LB-Nährböden ausgestrichen. Die Nährböden enthielten das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin: 50 µg/ml Medium; Kanamycin: 30 µg/ml Medium), gegen das erfolgreich transformierte Bakterien resistent sein sollten.

- Transformation von Top 10F' (Invitrogen/Niederlande)

Bevor zu der Bakteriensuspension von 50 µl der Ligationssatz gegeben wurde, erfolgte eine Zugabe von β-Mercaptoethanol (0,1 mM). Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis, wurde das Gemisch für 0,5 min auf 42°C im Wasserbad erwärmt (Hitzeschock). Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor die Bakterien in 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert wurden. Die trans-

formierten Bakterien wurden auf LB-Platten ausgestrichen, welche jeweils die oben aufgeführten Antibiotika-Konzentrationen enthielten.

2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparation

Um eine qualitative Aussage über die von Bakterien aufgenommene DNA treffen zu können, muß diese aus den Bakterien isoliert werden. Die Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gewonnen.

- Puffer 1: 50 mM Glucose; 50 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
- Puffer 2: 1 % SDS; 0,2 M NaOH (frisch angesetzt)
- Puffer 3: 3 M K⁺-Acetat, pH 5,5

Dazu wurde eine Einzelkolonie von einem festen Nährboden mit einem sterilen Zahnstocher in eine 3 ml-Flüssigkultur überimpft, die wiederum mit dem selektionierenden Antibiotikum versetzt war. Nach einer Wachstumsphase über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C und bei 200 Upm wurden die Bakterien in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C bei 6000 Upm 3 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Puffer 1 mittels Vortexen gut resuspendiert und mit 200 µl Puffer 2 versetzt. Eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur führte zur Lyse der Bakterienzellen. Durch Zugabe von 150 µl eiskaltem Puffer 3 wurde der Ansatz neutralisiert. Die chromosomale DNA und Proteine wurden denaturiert und ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung blieb. Das Bakterienlysate wurde für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Der entstehende weiße flockige Niederschlag wurde anschließend bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C 15 min abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene Plasmid-DNA mit dem 2,5-fachen Volumen an 100 %-igem Ethanol gefällt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde das Plasmid-DNA-Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde nun in einem Volumen von 30-50 µl TE oder H₂O gelöst und anschließend bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA durch Maxipräparation

Für die Transfektion eukaryotischer Zellen muß die DNA in sehr reiner Form vorliegen, da bakterielle Proteine zum Absterben der Zellen führen können. Darüber hinaus werden in solchen Transfektions-Experimenten größere Mengen hochkonzentrierter DNA benötigt, weshalb die zu transfizierenden Expressionsvektoren in Maxipräparationen hergestellt

wurden. Dazu wurde der Qiagen-Maxi-Kit (Qiagen/Hilden) verwendet, dessen Prinzip auf der modifizierten alkalischen Lyse und einer sich anschließenden Anionenaustauscherchromatographie beruht.

Von den mit dem zu präparierenden Plasmid transformierten Bakterien, die auf einer Antibiotika-enthaltenden LB-Platte gewachsen waren, wurde eine Einzelkolonie gepickt und in eine 3 ml-Flüssigkultur mit selektionierendem Antibiotikum überimpft. Diese Vorkultur wurde über Tag bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend in 300 ml LB-Antibiotikum-Medium überimpft. Diese Wachstumskultur wurde über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden in der Sorvall-Zentrifuge bei 6000 Upm für 15 min abzentrifugiert. Aus dem Bakterienpellet wurde mittels Qiagen-Maxi-Kit nach den Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. Die gewonnene DNA wurde noch einmal in 0,1 Volumen NaCl und 2,5 Volumen 100 %-igem Ethanol umgefällt und konnte nach dem Trocknen im Vakuum abschließend in 100-500 µl TE gelöst werden. Die enthaltene DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, wobei einer optischen Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm 50 ng/µl doppelsträngiger DNA entspricht.

2.1.10 Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese

- 3x Probenpuffer: 20 % Ficoll 400; 0,075 % Bromphenolblau oder Xylencyanol in 3x TBE

Geschnittene DNA wurde sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke in Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden ein Anteil von 0,7-1,2 % Agarose in TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Vor dem Gießen in eine Schale wurde dem Gemisch Ethidiumbromid (0,08 µg/ml) zugesetzt. Die gleiche Etidiumbromidkonzentration war im TBE-Laufpuffer enthalten. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 3x Probenpuffer versetzt und anschließend gemäß ihrer Größe bei 200 V im elektrischen Spannungsfeld aufgetrennt. Im Anschluß wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter der UV-Lampe ($\lambda=254$ nm) sichtbar gemacht und gegebenenfalls fotografiert. Zur Beurteilung der Länge der DNA-Fragmente wurden 10 µl Längensstandard (Kap. II.1.9) zeitgleich mitgeführt.

2.2 Hybridisierung von Ribonukleinsäuren, Northern-Blot Analysen

2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde der „RNeasy Total RNA Kit“ (Qiagen/Hilden) verwendet. Bei dieser RNA-Präparationsmethode wird die RNA nach der Zelllyse unter stark denaturierenden Bedingungen mit RNase-inaktivierender Wirkung

gebracht und anschließend an eine Silica-Membran gebunden. Aufgrund des Hochsalzpuffer-systems bindet nur die RNA spezifisch an die Säulenmatrix, während andere Bestandteile durch verschiedene Waschschriffe entfernt werden können. Die reine RNA konnte abschließend mit RNase-freiem H₂O eluiert werden. Die maximale Bindekapazität der Membran betrug 100 µg RNA.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Zellen von ein bis zwei 56 cm²-Schalen eingesetzt. Nach dem Entfernen des Kulturmediums wurde der adhärenle Zellrasen zuerst zweimal mit je 5 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen. Die Zellen jeder Schale wurden mit 600 µl Lysispuffer RLT versetzt, der 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml Puffer enthielt. Die Zellen wurden nun mit einem Gummispatel abgelöst. Zur Homogenisierung der Zellen und zum Scheren von genomischer DNA wurde das Zelllysat viermal mit einer Spritze durch eine Kanüle aufgezogen. Das Gemisch jeder Schale wurde mit 600 µl 70%-igem Ethanol versetzt. Von diesem Ansatz wurden jeweils 600 µl auf eine Säule appliziert und in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C bei 10000 Upm 15 s zentrifugiert. Dabei bindet die RNA spezifisch an die Membran und der Durchfluß konnte deshalb verworfen werden. Nachdem das gesamte Zelllysat auf die Membran aufgebracht worden war, folgte der erste Waschschriff mit 700 µl Waschpuffer RW1. Nach einer Zentrifugation von 15 s bei 10000 Upm wurde der Durchfluß erneut verworfen und die Säule in ein neues, steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Membran wurde nun mit 500 µl Waschpuffer RPE unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Im letzten Waschschriff wurden die auf die Säule aufgetragenen 500 µl Waschpuffer RPE 2 min bei 14000 Upm zentrifugiert, wobei die Membran vollständig von dem im RPE-Puffer enthaltenen Ethanol befreit werden sollte. Die reine RNA konnte nun durch zweimal 25 µl DEPC-H₂O in ein neues, steriles Reaktionsgefäß eluiert werden. Dazu wurde jeweils 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Die Konzentration der präparierten RNA wurde photometrisch bestimmt, wobei eine OD von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer RNA-Konzentration von 30 µg/ml entspricht.

2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

- 1,2 %-iges Formaldehyd-Gel: 0,6 g Agarose; 36 ml H₂O; 5 ml 10x MOPS; 9 ml 37 % Formaldehyd
- 2x Probenpuffer: 1x MOPS; 50 % Formamid; 1,8 M Formaldehyd; 3,5 % Ficoll 400, 0,025 % Bromphenolblau

Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1,2 %-igen Agarosegelen, denen Formaldehyd als denaturierendes Agens zur Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen zugesetzt wurde. Bei der Herstellung des Gels wurde die Agarose zunächst mit H₂O aufgekocht. Nachdem das Gemisch auf ca. 60°C abgekühlt war, wurden MOPS und der leichtflüchtige Formaldehyd

direkt vor dem Gießen des Gels zugesetzt. Die RNA-Proben wurden mit einem Volumen Probenpuffer versetzt, 15 min auf 56°C erwärmt und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (1mg/ml) wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 100 V im elektrischen Spannungsfeld mit 1x MOPS als Laufpuffer aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese auf dem UV-Tisch photographiert.

2.2.3 Northern-Blot-Transfer

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA mittels Kapillarblot auf eine Nylon-Membran transferiert.

Über eine mit Transferpuffer 20x SSC gefüllte Schale wurde eine Glasplatte gelegt. Darüber wurde ein mit Transferpuffer befeuchtetes 3MM-Papier so positioniert, daß seine Enden jeweils in die Pufferkammer eintauchten. Nacheinander wurde auf dem 3MM-Papier das jeweils mit Transferpuffer befeuchtete Gel und die auf die Gelgröße zugeschnittene Nylon-Membran (Hybond N⁺/Amersham) platziert. Vier weitere Lagen 3MM-Papier folgten der Membran. Anschließend wurden mehrere Lagen saugfähiges Filterpapier aufgelegt. Um die Diffusion der RNA zu erleichtern, wurde der Aufbau mit Gewichten beschwert. Durch die entstehenden Kapillarkräfte wurde die RNA aus dem Gel auf die Membran übertragen. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach einem kurzen Waschschrift mit 2x SSC wurde die Membran im Ofen für 4 hn bei 80°C erhitzt, um die RNA-Moleküle auf der Membran zu immobilisieren. Die Position der 18 S und 28 S RNA wurde als Längenstandard verwendet.

2.2.4 Herstellung einer spezifischen Sonde mittels PCR

Die verschiedenen nAChR-Untereinheiten weisen untereinander die geringste Homologie in ihrem cytoplasmatischen Loop auf. Deshalb wurde ein 266 bp-Fragment aus diesem Bereich des $\alpha 7$ nAChR mittels PCR amplifiziert und in Northern-Blot-Analysen als spezifische Sonde verwendet. Als Hybridisierungskontrolle wurde ein für das Stoffwechsellenzym Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) spezifisches PCR-Amplifikat mit einer Länge von 900 bp mitgeführt.

PCR-Ansatz:	5 μ l	cDNA Matrize (2,5 ng α 7/pCDNA1Neo oder 5 μ l Rerverse-Transkriptase-Reaktion von HEK-293/ α 1)
	1 μ l	Primer-Mix (5'- und 3'-Primer jeweils 25 pmol/ μ l)
	5 μ l	10x PCR Puffer (Pharmacia/Freiburg)
	1 μ l	dNTP-Mix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP jeweils 2,5 mM)
	0,5 μ l	Taq-Polymerase (Pharmacia/Freiburg)
	x μ l	H ₂ O
	50 μ l	Endvolumen

PCR-Programm:

Amplifikation von α 7 nAChR			Amplifikation von GAP-DH		
Temperatur	Zeit	Zyklen	Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	5 min		94°C	4 min	
94°C	1 min	30	94°C	0,5 min	30
61°C	0,5 min		58°C	1 min	
72°C	1 min		72°C	1 min	
72°C	7 min		72°C	7 min	
4°C	bis zur Entnahme		4°C	bis zur Entnahme	

Alle Sonden wurden mit Hilfe des Nucleo-Spin[®]-Kit (Machery-Nagel/Düren) elektrophoretisch (Kap. II.2.1.4) gereinigt und bis zu ihrer Verwendung bei – 4°C aufbewahrt.

2.2.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die Markierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels 'primer-extension'-Reaktion (Feinberg und Vogelstein, 1983) an Hexanukleotiden mit einer statistischen Sequenz durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Pharmacia/Freiburg) in Anwesenheit von α ³²P-dCTP.

- 5x Klenow-Puffer: 250 mM Tris/HCl, pH 7,5; 25 mM MgCl₂
- Stop-Puffer: 0,2 M EDTA; 5 % Glycerin; 1 % Dextranblau
- Säulenmaterial: 1 g Sepadex-G75 in 15 ml TE, autoklavieren

30-50 ng gereinigtes DNA-Fragment wurde mit 3 μ g statistischen Hexanukleotiden in einem Gesamtvolumen von 8,5 μ l 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend schnell auf Eis für 5 min abgekühlt. Nach Zugabe von 4 μ l 5x Klenow-Puffer, 1 μ l Nukeotid-Mix (dATP, dGTP und dTTP jeweils 2 mM), 1 μ l 0,1 M DTT sowie 5 μ l 3,3 μ M α ³²P-dCTP wurde die enzymatische Verlängerung der Primer durch Zugabe von 5 U Klenow-Fragment gestartet und für 1 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde nun durch Zugabe von 20 μ l Stop-Puffer beendet. Nicht eingebaute Mononukleotide wurden mittels Säulenchromatographie

(Sephadex G75) in einer Pasteurpipette abgetrennt. Die spezifische Aktivität der markierten Proben betrug ca. 50×10^8 cpm/ μ g DNA.

2.2.6 Hybridisierung von Northern-Blot-Membranen mit radioaktiven Sonden

- Hybridisierungspuffer: 50 % Formamid; 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 2,5 mM EDTA; 4 % SDS; 373 mM NaCl

Zunächst wurde die Membran mit der immobilisierten RNA mit 10 ml Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Diesem Puffer wurden 250 μ g/ml denaturierte Heringssperma-DNA frisch zugesetzt, um unspezifische Bindungsstellen für DNA auf der Membran abzusättigen. Die Vorhybridisierung wurde mindestens 4 h durchgeführt. Anschließend wurde die radioaktiv markierte denaturierte Probe in mit Heringssperma-DNA versetztem Hybridisierungspuffer (250 μ g/ml) bis zu einer Aktivität von 1×10^7 cpm/ml verdünnt und über Nacht mit der Membran bei 42°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Nach dem Entfernen der radioaktiven Probe wurde die Membran zweimal 10 min mit 2x SSC bei Raumtemperatur und einmal 30 min mit 0,5x SSC bei 60°C gewaschen. Der Nachweis der gebundenen DNA-Sonde auf der getrockneten Membran erfolgte durch Autoradiographie eines Röntgenfilms (Kodak X-OMAT AR).

2.3 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß die Expression eines Gens auf RNA-Ebene durch PCR nachgewiesen wird. Dazu muß zunächst die in einer Zelle vorhandene RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, um anschließend nachzuweisende DNA-Fragmente mittels spezifischer Primer zu amplifizieren und damit zu identifizieren.

2.3.1 Herstellung von cDNA (copy DNA)

- 5x Reverse Transkriptase-Puffer: 375 mM KCl; 15 mM MgSO₄; 250 mM Tris/HCl, pH 8,3
- Superscript-Reverse Transkriptase: 200 U/ μ l
- DTT: 0,1 M in bidest. H₂O
- dNTP-Mix: dGTP, dCTP, dATP und dTTP jeweils 10 mM

Zur Synthese des cDNA-Erststrangs wurde Gesamt-RNA eingesetzt, die wie unter Kap. II.2.2.1 beschrieben, präpariert wurde. Pro Reaktion wurden 2 μ g RNA mit 0,5 μ g Oligo-dT (15-mere, Pharmacia/Freiburg) versetzt. Oligo-dT bindet an Poly-A-Sequenzen, weshalb in

der sich anschließenden Reversen Transkription bevorzugt reife mRNA, die am 3'-Ende durch einen Poly-A-Schwanz gekennzeichnet ist, in cDNA übersetzt wird. Nach dem Erhitzen für 10 min auf 70°C, wurde der Ansatz rasch auf Eis für 5 min abgekühlt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die Erststrangsynthese wurde in 20 µl Gesamtvolumen in Gegenwart von 1x Reverse Transkriptase-Puffer, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP-Mix und 200 U Reverse Transkriptase 1 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion 10 min bei 75°C hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde mit bidest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt und bei -4°C aufbewahrt.

2.3.2 Nachweis spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation von cDNA der nAChR-Untereinheiten verwendet. Dadurch konnte die Expression der nAChR-Untereinheiten auf RNA-Ebene in den klonalen Zelllinien nachgewiesen werden.

Die PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Als Matrizen-DNA dienten 5 µl der entsprechenden cDNA. Diese wurde mit 35 µl bidest. H₂O verdünnt und auf Eis mit 1x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, jeweils 25 pmol der beiden Primer, 0,05 mM dNTP-Mix sowie 5 U Taq-Polymerase (Pharmacia/Freiburg) versetzt. Die Sequenzen der verwendeten Desoxyoligonukleotid-Primer sind in Kapitel II.1.5 beschrieben. Nachdem der Ansatz für 10 min bei 94°C inkubiert worden war, erfolgte die Amplifikation im 'Gene Amp PCR System 2400' Thermocycler, wobei folgende Programme gewählt wurden:

Primer	Denaturierung	Anlagerung	Synthese	Zyklen
<i>Human α6</i>	94°C; 4min	60°C; 0,5 min	72°C; 2 min	35
<i>Human β4</i>	94°C; 4min	68°C; 0,5 min	72°C; 2 min	25
<i>GAP-DH</i>	94°C; 4min	58°C; 1 min	72°C; 1 min	32

Im Anschluß an die Amplifikation wurde der Ansatz für 7 min bei 72°C gehalten, bevor er auf 4°C abgekühlt wurde. Die PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht mittels Ethidiumbromid (254 nm) sichtbar gemacht.

3 Zellbiologische Methoden

3.1 Kultivierung der Zelllinien

3.1.1 Kultur von Zellen in Kulturgefäßen

- RA Stock-Lösung: 1 mg/ml in DMSO, gelagert bei - 80°C. Die Lösung wurde vor Gebrauch mit H₂O auf die Endkonzentration 0,1 µM verdünnt.
- dbcAMP Stock-Lösung: 100 mM in H₂O, gelagert bei - 20°C.

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 15 % FCS unter 10 % CO₂ bei 37°C kultiviert. Bei einzelnen Experimenten wurde die Wachstumstemperatur 24 h vor den Messungen auf 25°C bzw. 30°C reduziert, um die Expression der transfizierten Proteine zu begünstigen. Bei der Kultivierung der QT6-Fibroblasten wurden dem Kulturmedium 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Zur Selektion von Zellen ohne spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle, wurde dem Medium für HEK-293/α1-Zellen Geneticin in einer Konzentration von 0,75 µg/ml zugegeben.

Die Zelllinien wurden alle 2-3 Tage von ihrer Wachstumsfläche mechanisch abgelöst und in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 in ein neues Kulturgefäß überführt, um sie in exponentiellem Wachstum zu halten. PCC7-Mz1-Zellen wurden nach dem Ablösen in einer Zelldichte von 0,5-1x10⁴ Zellen/cm² in ein neues Kulturgefäß überführt. Für die Differenzierung der Zellen wurde das Kulturmedium einen Tag nach dem Ausplattieren der Zellen auf Deckgläschen durch Kulturmedium mit 0,1 µM all-trans Retinsäure (RA) ersetzt. Am folgenden Tag erfolgte ein weiterer Mediumwechsel, woraufhin die Zellen in DMEM mit 15 % FCS, 0,1 µM RA und 1 mM Di-buturyl-cAMP (dbcAMP) kultiviert wurden.

3.1.2 Kultur von Zellen auf Deckgläschen

Um Zellen in immunohistochemischen, elektrophysiologischen und Calcium-Imaging-Untersuchungen einsetzen zu können, wurden diese auf Deckgläschen aus Glas kultiviert. Da die Zellen nur bedingt auf Glasflächen adhäreren, mußten die Deckgläschen vor dem Aussäen der Zellen mit dem Zelladhäsionsmolekül Fibronectin beschichtet werden. Dafür wurden die Deckgläschen mit 0,5 ml einer Fibronectin-Lösung (10 µg/ml) überschichtet und eine h bei 37°C inkubiert. Nach dem Entfernen von überschüssigem Fibronectin durch zweimaliges Waschen mit 1x PBS konnten die Zellen aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Ausnahme: PCC7-Mz1) auf den Deckgläschen kultiviert werden.

Die PCC7-Mz1-Zellen wurden in einer Dichte von 2x10⁴ Zellen/cm² auf Laminin-beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Zur Laminin-Beschichtung wurden die Glasdeckgläschen mit

4 µg/ml Laminin in 1x PBS für 1 h bei 37°C überschichtet. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Deckgläschen zweimal mit 1x PBS gewaschen.

3.2 Transiente Transfektion

Transiente Transfektionen erfolgten nach der Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode (Graham und Van der EB, 1973; Chen und Okayama, 1987).

- Zusammensetzung der Transfektionslösung/Deckgläschen:

1 µg DNA wurden in 45 µl H₂O aufgenommen und mit 50 µl 2x BBS sowie 5 µl 2,5 M CaCl₂ versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz direkt auf die Zellen gegeben. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch sterilisiert.

- 2x BBS: 50 mM BES; 280 mM NaCl; 1,5 mM NaH₂PO₄; pH 6,95

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion 30-50 % konfluent aus der Kulturflasche auf Fibronectin-beschichteten Deckgläschen (Vorbereitung 3.1.2) in einer 24-Loch-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden zu einem bis zu 70 % konfluenten Zellrasen 100 µl Transfektionslösung pro ml Medium tropfenweise pipettiert. Die Zellen wurden unter normalen Kulturbedingungen für weitere 24 h mit der Transfektionslösung inkubiert. Danach wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt, um die Transfektionslösung zu entfernen und für weitere 24-48 h bei 37°C inkubiert.

3.3 Stabile Transfektion

HEK-293/α1-Zellen wurden bis zu 50 % konfluent aus der Kulturflasche auf Fibronectin-beschichtete Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm ausgesät. Für die Transfektion der Zellen wurden 3 µg DNA in 300 µl Transfektionslösung mit der in Kap.II.3.2 beschriebenen Zusammensetzung eingesetzt. Die HEK293/α1-Zellen weisen aufgrund ihrer stabilen Transfektion mit spannungsgesteuerten Lα_{1C-b}-Typ Calcium-Kanälen bereits eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin auf. Da die zu exprimierenden nAChR-Gene ebenfalls in Vektoren vorlagen, die ein Geneticinresistenzgen besitzen, wurden die transfizierten klonalen Zelllinien mittels einer zusätzlich kotransfizierten Puromycin-resistenz selektioniert. Die DNA des zu exprimierenden Gens wurde dem Transfektionsansatz im dreifachen Überschuß im Vergleich zu dem Puromycinresistenzvektor pBTKpac zugesetzt. Infolgedessen sollten Puromycin-resistente Zellen auch die zu exprimierende DNA aufgenommen haben. Bei gleichzeitiger Transfektion von verschiedenen nAChR-Untereinheiten wurden die jeweiligen Expressionsvektoren im Mengenverhältnis 1:1 eingesetzt.

Aufgrund der kombinierten Transfektion der Zellen mit Expressionsvektor und Resistenzvektor sollten transfizierte Zellen sowohl gegen Geneticin als auch gegen Puromycin resistent sein. Zur Selektion transfizierter Zellen wurden dem Kulturmedium nach der Transfektion für zwei Wochen 750 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin und 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin zugesetzt. Nach dem Absterben untransfizierter Zellen wachsen resistente Zellen zu kreisrunden klonalen Zelllinien, die mittels Klonierungsringen isoliert und unter Anwesenheit beider Antibiotika vermehrt wurden.

Nach dieser Vorgehensweise wurden HEK-293/ α 1-Zellen mit H α 3/pCDNA3 in Kombination mit H β 4/pCDNA3 bzw. in Kombination mit H β 4/pEGFP transfiziert. Durch eine Selektion mit Geneticin und Puromycin konnten jeweils klonale HEK-293/ α 1-Zelllinien isoliert werden, die den humanen α 3 β 4 nACh-Rezeptor oder den EGFP-gekoppelten humanen α 3 β 4 nACh-Rezeptor stabil exprimieren. Im weiteren werden diese klonalen Zelllinien als H α 3 β 4L^{+/1} und H α 3 β 4(G)L^{+/1} bezeichnet.

3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese von ihrer Wachstumsfläche mechanisch abgelöst und bei 1000 Upm in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in mit 10 % DMSO versetztem Kulturmedium vorsichtig resuspendiert und in Einfrierampullen zunächst für zwei Tage bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Beim Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden die Ampullen zunächst in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut. Das DMSO in der Lösung wurde durch langsame Zugabe von 5 ml frischem, 37°C warmem Kulturmedium verdünnt und durch anschließende Zentrifugation für 10 min bei 1000 Upm in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C entfernt. Das Zellpellet wurde in frischem, 37°C warmem Kulturmedium resuspendiert und in einem sterilen Kulturgefäß in Kultur genommen.

3.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

- AK-Verdünnungspuffer: 10 % FCS; 0,02 NaN_3 in 1x PBS
- Eindeckmittel: 10 mg p-Phenyldiamin, 1 g Evanol, 3 ml Glycerin, 7 ml 1x PBS mit NaOH auf pH 8 eingestellt (lichtempfindlich)

Für Fluoreszenzanalysen wurden auf Glasdeckgläschen kultivierte Zellen verwendet (Vorbereitung siehe Kap. II.3.1.2). Die Färbungen wurden immer bei Raumtemperatur unter nicht-sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach dem Fixieren der Zellstruktur für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) wurden die Zellen dreimal je 5 min in 1x PBS gewaschen. Um

intrazellulär lokalisierte Moleküle nachweisen zu können, wurden die Zellen 10 min mit 0,1 % Triton (in AK-Verdünnungspuffer) permeabilisiert. Als Erst-Antikörper wurde der polyklonale GFP-Antikörper im Verhältnis 1:500 mit AK-Verdünnungspuffer versetzt. Die Zellen eines Deckgläschens wurden mit 50 μ l dieses verdünnten Antikörpers in einer feuchten Kammer 1 h inkubiert. Nicht-gebundener Antikörper wurde anschließend durch drei Waschschriffe von je 5 min mit 1x PBS entfernt. Der Texas-Rot-gekoppelte Zweit-Antikörper wurde dann in der in Kapitel II.1.4 aufgeführten Konzentration in AK-Verdünnungspuffer angesetzt. Die Deckgläschen wurden mit je 50 μ l dieser Lösung überschichtet und lichtgeschützt in einer feuchten Kammer für 1 h inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschriffe von je 5 min mit 1x PBS und das Aufbringen auf Objektträger. Hierfür wurde pro Deckglas ein Tropfen Eindeckmittel auf einen Objektträger aufgetragen. Darauf wurde das Deckglas mit der Zellschicht nach unten gelegt. Nach dem Entfernen von überschüssigem Eindeckmittel mit einem Tuch wurde das Präparat mit Nagellack verschlossen, um es vor dem Austrocknen zu schützen. Die Objekte wurden dann direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet oder bei -20°C gelagert.

3.6 Färbung mit FITC-markiertem α -Bungarotoxin (α -Btx)

Für die Bindungsanalysen wurden auf Deckgläschen kultivierte Zellen verwendet (Vorbereitung siehe Kap. II.3.1.2). Die Bindung von α -Btx konnte anhand der grünen Fluoreszenz des FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierten α -Btx sichtbar gemacht werden. Um Reste des Kulturmediums zu entfernen, wurden die Zellen dreimal 5 min mit 1x PBS gewaschen. Auf eine Fixierung der Zellen wurde verzichtet. Das FITC-markierte α -Btx wurde 1:200 in Verdünnungspuffer (Zusammensetzung siehe Kap. II.3.5) verdünnt und anschließend auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden 30 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nicht-gebundenes FITC-markiertes α -Btx wurde anschließend durch Waschen der Zellen mit 1x PBS entfernt. Darauf folgte eine Fixierung der Zellen mit 2 % PFA für 20 min. Überschüssiges PFA wurde durch drei weitere Waschschriffe von je 5 min mit 1x PBS entfernt, bevor die Zellen auf Objektträgern in Eindeckmittel (Zusammensetzung siehe Kap. II.3.5) eingebettet werden konnten. Das Austrocknen der Präparate wurde durch Abdichten der Ränder mit Nagellack verhindert. Die Objekte wurden dann direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet oder bei -20°C gelagert.

4 Proteinbiochemische Methoden

4.1 Western-Blot-Analysen

4.1.1 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In denaturierenden SDS-PAGE werden Proteine im elektrischen Spannungsfeld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, wobei die Proteine durch die Anlagerung des negativ geladenen Detergenses Natriumdodecylsulfat (SDS) eine stark negative Ladung erhalten und deren Eigenladung somit überdeckt wird. Es wurde eine vertikale Plattenelektrophorese nach der Methode von Laemmli (1970) angewendet. Die Trenngel waren 5,5 cm hoch, 7,5 cm breit und 1,5 mm dick. Über das Trenngel wurde ein Sammelgel von 2,5 cm Höhe gegossen, in das ein Trogformer zur Ausbildung von 21 Taschen mit einem Volumen von je 60 µl einpolymerisiert wurde.

- 4x Trenngelpuffer: 0,4 % SDS; 1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
- 4x Sammelgelpuffer: 0,4 % SDS; 0,5 M Tris/HCl; pH 6,8
- Acrylamidlösung (30%): 29,2 % Acrylamid; 0,8 % N,N'-Methylen-bis-acrylamid
- 5x Elektrodenpuffer: 960 mM Glycin; 0,5 % SDS; 125 mM Tris/HCl, pH 8,3
- 2x reduzierender Probenpuffer: 4 % SDS; 1,5 M β-Mercaptoethanol; 20 % Glycerin; 0,04 % Bromphenolblau; 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8

Pipettierschema zur Gelherstellung:

Stammlösungen	Sammelgel 4 %	Trenngel 10 %
Acrylamidlösung (30 %)	1,0 ml	4,0 ml
4x Sammelgelpuffer	1,88 ml	-
4x Trenngelpuffer	-	3,0 ml
bidest. H ₂ O	4,62 ml	5,0 ml
Ammonium-Persulfat (APS) (10 %)	120 µl	96 µl
N, N, N', N'-tetramethyl-ethylen-diamin (TEMED) (99 %)	3,0 µl	9,6 µl

Die Komponenten des Trenngels wurden entsprechend dem Pipettierschema gemischt, zwischen zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen und mit Ethanol überschichtet. Die Überschichtung mit Ethanol gewährleistete sowohl eine glatte Trenngeloberfläche als auch ein gleichmäßiges Auspolymerisieren des Gels, indem das Abfangen von Radikalen im Gel durch Luftsauerstoff verhindert wurde. Nachdem die Gelmatrix nach ca. 25 min vollständig auspolymerisiert war, wurde die Ethanolschicht gründlich mit Wasser entfernt. Das

Sammelgel wurde entsprechend dem Pipettierschema hergestellt und auf das Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde sofort der Trogformer eingesetzt. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min wurde der Trogformer aus dem Sammelgel entfernt, die Taschen mit Wasser gründlich gespült und das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt.

Die Proben wurden vor dem Auftrag mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V für ca. 90 min. Nach der Proteinauftrennung wurden die Gele für einen Proteintransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran eingesetzt. Um das relative Molekulargewicht detektierter Proteinbanden bestimmen zu können, wurde ein Proteinstandardmarker mitgeführt. Die Markerproteine waren vorgefärbt, damit der Proteintransfer auf die Membran aufgrund des direkt sichtbaren Proteinstandards kontrolliert werden konnte.

- 'Low Range' SDS-PAGE-Standard: (Angaben in Klammern: Molekulargewicht in kDa der Referenzproteine) Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel (102 kDa); Albumin aus Rinderserum (78 kDa); Ovalbumin aus Hühnereiweiß (50 kDa); Carboanhydrase aus Rindererythrocyten (35 kDa); Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (28 kDa) und Lysozym aus Hühnereiweiß (20 kDa).

4.1.2 Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen

- Bjerrum-Schäfer-Nielsen Transferpuffer: 39 mM Glycin; 20 % Methanol; 1,3 mM SDS; 48 mM Tris/HCl, pH 9,2

Die Proteine wurden von dem SDS-Gel auf Polyvinylidendifluorid-(PVDF)Membranen (Immobilon-P, 0,45 µm Porenvolumen, Millipore, Eschborn) mit hoher Bindekapazität (30-40 µg/cm²) nach dem Prinzip des 'Semi-Dry-Blottings' transferiert. Eine PVDF-Membran und 12 Filterpapiere (Gel-blotting papers GB003, Schleicher und Schuell, Dassel) wurden in der Größe des zu transferierenden Gels zurechtgeschnitten. Die Membran mußte aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität zunächst mit Methanol benetzt werden. Nachdem das überschüssige Methanol mit bidest. H₂O entfernt worden war, wurde die Membran 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Filterpapiere und das Gel wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt.

Auf die Kathodenseite der Semi-Dry-Blot-Apparatur wurden nacheinander 6 Filterpapiere, das Gel, die Membran und 6 weitere Filterpapiere platziert. Bei der Anordnung wurden Luftblasen und überschüssiger Transferpuffer durch leichtes Walzen mit einem Glasstab entfernt und auf eine genaue Ausrichtung geachtet, um den Aufbau eines homogenen elektrischen

Feldes zu gewährleisten. Nach dem Anfeuchten mit Transferpuffer wurde die Blot-Apparatur durch Auflegen der Anode als Deckel vervollständigt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von $0,7 \text{ mA/cm}^2$ Gel für 120 min. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 1x PBS gewaschen, um eventuell vorhandene Gelreste zu entfernen.

4.1.3 Immunfärbung der Protein-Membran und ‚enhanced‘ Chemilumineszenz (ECL)-Nachweis

- Blockierungslösung: 1x PBS; 0,1 % Triton X-100; 5 % Milchpulver
- Antikörperverdünnungslösung: 1x PBS; 0,1 % Triton X-100; 1 % Milchpulver
- Waschlösung 1: 1x PBS; 0,1 % Triton X-100; 1 % Milchpulver
- Waschlösung 2: 1x PBS; 0,1 % Triton X-100
- Luminol-Lösung: 2,5 mM Luminol; 0,4 mM p-Coumarsiure; 100 mM Tris/HCl, pH 8,5
- H_2O_2 -Lösung: 5,4 mM H_2O_2 ; 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

Nach dem Proteintransfer wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch mindestens einstündige Inkubation der Membran mit Blockierungspuffer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Schütteltisch. Der $\alpha 7$ -Antikörper wurde dabei 1:500 und der GFP-Antikörper wurde 1:2000 in Verdünnungspuffer angesetzt. Freier bzw. unspezifisch gebundener Antikörper wurde am nächsten Morgen entfernt, indem die Membran mindestens fünfmal mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur für 10 min gewaschen wurde. Der jeweilige Spezies-spezifische sekundäre Antikörper wurde 1:2000 in Verdünnungspuffer angesetzt und mit der Membran für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Darauf folgten wiederum fünf Waschschrirte von jeweils 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit Waschlösung 2, um das Milchpulver und unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Für die Detektion wurden 10 ml Luminol-Lösung sowie 10 ml H_2O_2 -Lösung gemischt und die Membran für 1 min darin inkubiert. Die Membran wurde anschließend zwischen zwei Folien gelegt, entsprechend der Signalstärke zwischen 1 und 30 min ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt.

4.2 Proteinextraktion aus Säugerzellen

- Homogenisationspuffer: 10 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 0,32 M Sucrose, pH 7,2
- Verdünnungspuffer: 1x PBS; 1 mM MgCl_2

Zur Proteinextraktion wurden HEK-293/ α 1-Zellen und davon hergestellte klonale Zelllinie verwendet, die auf Schalen mit einer Wachstumsfläche von 145 cm² gewachsen waren. Nach dem Entfernen des Mediumüberstandes wurden die adhärenen Zellen zweimal mit je 5 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit weiteren 5 ml eiskaltem 1x PBS von der Schale abgelöst und bei 1000 Upm, 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Homogenisationspuffer, dem frisch 5 μ M des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugesetzt worden war, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch 50-faches Auf- und Abbewegen eines Handhomogenisators aufgeschlossen. Anschließend wurden nicht-aufgeschlossene Zellen und Zellreste mit Hilfe einer niedertourigen Zentrifugation (15 min, 4°C, 4000 Upm, A24.24 Rotor; Kontron, Eching) entfernt. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und mit Verdünnungspuffer aufgefüllt. In der sich anschließenden Ultrazentrifugation (1 h, 4°C, 34000 Upm, Ti-75-Rotor, Kontron, Eching) sedimentierten die Membranen als weißes Pellet. Der klare Überstand enthielt die cytoplasmatischen Bestandteile der Zellen. Das Membranpellet wurde in 50-100 μ l Verdünnungspuffer resuspendiert und in Aliquots von 100 μ g Protein bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung erfolgte mittels 'BCA(Bicinchonimic Acid)-Detection-Assay'(Pierce/Bruchsal). Diese Methode beruht auf der Reduktion von zweiwertigen Kupferionen in der Substratlösung durch die Reaktion mit den Aminogruppen der Proteine zu einwertigen Kupferionen. Das 'BCA detection reagent' bildet mit den einwertigen Kupferionen einen lilafarbigem Komplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm quantifiziert werden kann. Die gemessene Extinktion ist proportional der vorhandenen Proteinmenge.

- Lösung A: Na_2CO_3 ; NaHCO_3 ; Natriumtartrat und 'BCA detection reagent' in 0,1 M NaOH
- Lösung B: 4 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

Vor jeder Bestimmung wurde die Substratlösung im Verhältnis 1:50 durch Mischen von Lösung A und Lösung B frisch angesetzt. In einer 96-Loch-Platte wurden 200 μ l dieser Substratlösung mit 10 μ l Zellextrakt versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Als Leerwert wurden 10 μ l Lysispuffer anstatt des Zellextraktes eingesetzt. Eine Konzentrationsreihe von Rinderserumalbumin diente zur genauen Quantifizierung als Standard. Je 10 μ l Rinderserumalbumin-Probe mit den Konzentrationen 2,1, 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 mg/ml wurden mit 200 μ l Substratlösung versetzt und entsprechend den Zellextrakten behandelt. Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Extinktion des entstandenen Farbkomplexes

wurde in einem Fluoreszenzreader bei 540 nm bestimmt und diente als Maß für die in der Lösung enthaltene Proteinkonzentration.

4.4 Blau-native-Gelelektrophorese nach Schägger

Die Blau-native Gelelektrophorese nach Schägger et al. (1994) ist eine zweidimensionale Gelelektrophorese, in der während der 1. Dimension in einem nativen Gradientengel die Proteinkomplexe aufgetrennt werden. Der Farbstoff Serva-blau G vermittelt dabei den Proteinen eine einheitlich starke negative Ladung, ohne sie dabei zu denaturieren. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dann hinsichtlich ihrer Größe. In einem denaturierenden SDS-Tricin-Gel während der 2. Dimension der Elektrophorese werden die Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten getrennt.

4.4.1 Probenvorbereitung

- Homogenisationspuffer: 83 mM Saccharose; 10 mM NaMOPS, pH 7,2; 20 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 0,5 mM EDTA; Inhibitorcocktail (Boehringer, Mannheim)
- Probenpuffer: 1 M Aminocaprinsäure; 25 mM Imidazol, pH 7,0; 20 µM PMSF; 0,5 mM EDTA

10 mg tiefgefrorene Zellen wurden in 500 µl Homogenisationspuffer resuspendiert und durch 15-maliges Auf- und Abbewegen eines Glasstabes bei 2000 Upm aufgeschlossen. Anschließend wurden die nicht-aufgeschlossenen Zellen und Zellreste in einer niedertourigen Zentrifugation abgetrennt (15 min, 600 g, 4°C, A24.24 Rotor; Kontron, Eching). Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und mit Puffer (10 mM NaMOPS) aufgefüllt. In der sich anschließenden hochtourigen Zentrifugation (30 min, 100000 g, 4°C, Ti-75-Rotor, Kontron, Eching) sedimentierten die Membranen. Das Membranpellet wurde in 20 µl Probenpuffer gut resuspendiert und in Aliquots zu 100 µg Protein bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.4.2 Blau-native-Gelelektrophorese 1. Dimension

- Kathodenpuffer: 50 mM Tricin; 7,5 mM Imidazol, pH 7,0 (bei 4°C); 0,02 % oder 0,002 % Serva Blau G
- Anodenpuffer: 25 mM Imidazol, pH 7,0 (bei 4°C)
- 5x-Gelpuffer: 125 mM Imidazol; 2,5 M Aminocaprinsäure, pH 7,0

Pipettierschema zur Gelherstellung:

Stammlösungen	Sammelgel	Gradientengel	
	4 %	7 %	16,5 %
Acrylamidlösung (30 %)	0,8 ml	5,4 ml	11 ml
5x Gelpuffer	1,2 ml	4,6 ml	4 ml
Glycerin	-	-	4,0 g
APS (10 %)	50 µl	130 µl	93 µl
TEMED (99 %)	5 µl	13 µl	9,3 µl
Gesamtvolumen	6,0 ml	23 ml	20 ml

Die Komponenten der beiden Gradientengellösungen wurden entsprechend dem Pipettierschema gemischt, mit Hilfe eines Gradientenmischers ein 7-16,5 %-iges Gradientengel zwischen zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen und mit H₂O überschichtet. Nachdem die Gelmatrix nach ca. 25 min vollständig auspolymerisiert war, wurde das Wasser entfernt. Das Sammelgel wurde entsprechend dem Pipettierschema hergestellt und auf das Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde sofort der Trogformer eingesetzt. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min wurde der Trogformer aus dem Sammelgel entfernt, die Taschen mit Wasser gründlich gespült und das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt.

Die Proben wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Durch Zugabe von Triton X-100 (10 %) bis zu einer Endkonzentration von 4 % wurden die Proteine während einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis aus den Membranen herausgelöst. Die restlichen Membranbestandteile konnten anschließend durch eine Zentrifugation (15 min, 20800 g, 4°C) abgetrennt werden. Der Überstand wurde mit der Hälfte des Volumens, das an Triton X-100 (10 %) verwendet wurde, mit 5 % Serva-blau G versetzt und auf das Gradientengel der 1. Dimension der Blau-nativen-Gelelektrophorese aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70-80 V über Nacht bei 4°C.

4.4.3 Blau-native-Gelelektrophorese 2. Dimension

- Anodenpuffer: 0,1 M Tris, pH 8,9
- Kathodenpuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin; 0,1 % SDS; pH ca. 8,25
- 3x Gelpuffer: 3,0 M Tris; 0,3 % SDS; pH 8,45

Pipettierschema zur Gelherstellung:

Tricin-SDS-Gel (10 %)		natives Gel (10 %), mit dem der Gel-streifen aus dem Gel der 1. Dimension einpolymerisiert wird	
Stammlösungen		Stammlösungen	
Acrylamidlösung (30 %)	20 ml	Acrylamidlösung (30 %)	8 ml
3x Gelpuffer	20 ml	5x Gelpuffer (1. Dimension)	4,8 ml
Glycerin	6 g	-	-
APS (10 %)	333 µl	APS (10 %)	112 µl
TEMED (99 %)	33 µl	TEMED (99 %)	12 µl
Gesamtvolumen	60 ml	Gesamtvolumen	24 ml

Nach der Proteinauftrennung im nativen Gel der 1. Dimension wurde ein 0,5-1 cm breiter Gelstreifen entsprechend einer Probenspur ausgeschnitten und auf einer Glasplatte mit einer Lösung aus 1 % SDS und 1 % β -Mercaptoethanol für 2 h getränkt. Nach dem Entfernen überschüssiger Lösung wurde der Gelstreifen in den oberen Bereich der Glasplatte gelegt und mit einer zweiten Glasplatte zusammengeklammert. Anschließend wurde zwischen die beiden Glasplatten die Tricin-SDS-Gellösung bis 2 cm unter den Rand des Streifens gefüllt und mit H₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren der Gelmatrix wurde das H₂O entfernt und der Gelstreifen in 10 %-iges natives Gel einpolymerisiert, wobei diese Gelmatrix nicht über den Gelstreifen hinausragen sollte. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte über Nacht bei einer konstanten Spannung von 80 V bei Raumtemperatur.

Das Gel wurde anschließend entweder fixiert und gefärbt oder einer Western-Blot-Analyse unterzogen (siehe Kap. II.4.1.2; Kap. II.4.1.3).

4.5 Biotinylierung von Proteinen in der Plasmamembran von HEK-293/ α 1-Zellen und anschließende Präzipitation mit Agarose-gekoppeltem Streptavidin

- Biotin-Stammlösung: D-Biotinoyl-e-Aminocaprinsäure-N-Hydroxy-succinimidester; 10 mg/ml in DMSO
- Biotinylierungspuffer: 50 mM Natriumborat, pH 8,0; 150 mM NaCl
- Stoplösung: 1 M NH₄Cl
- Lysepuffer: 50 mM Natriumborat, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 % Nonidet P-40, 0,1 mg/ml PMSF
- Verdünnungspuffer: 50 mM Tris, pH7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Nonidet. P-40; 0,1 mg/ml PMSF
- Waschpuffer 1: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Nonidet. P-40
- Waschpuffer 2: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,1 % Nonidet. P-40

- Waschpuffer 3: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- Probenpuffer: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS, 2 % β -Mercaptoethanol; 10 % Glycerin; 6 M Harnstoff; 1 mg/100 ml Bromphenolblau

In der Plasmamembran integrierte Proteine mit einer extrazellulären Domäne können durch Biotinylierung markiert werden. Der aktivierte Biotinester reagiert dabei unter milden Bedingungen mit Aminogruppen basischer Aminosäuren und kann nicht durch die Zellmembran ins Zellinnere gelangen. Dazu wurden die HEK-293/ α 1-Zellen von drei 135 cm²-Kulturschalen mit eiskaltem 1x PBS abgelöst und anschließend zweimal gewaschen. Die abzentrifugierten Zellen (250 g, 5 min, Sorvall-Kühlzentrifuge, SS34-Rotor) wurden dann in 5 ml Biotinylierungspuffer resuspendiert und mit 50 μ l Biotin-Stammlösung versetzt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 250 μ l Stop-Lösung hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 15 min wurden die Zellen abzentrifugiert (250 g, 5 min, Sorvall-Kühlzentrifuge, SS34-Rotor) und anschließend mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Lysispuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Behandlung mit Ultraschall für 30 s wurde das Lysat zentrifugiert (10000 g, 15 min, 4°C, Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C). Der Überstand konnte nach diesem Schritt bei – 80°C eingefroren werden oder er wurde sofort in der Präzipitation mit Streptavidin eingesetzt. Hierfür wurde er mit dem gleichen Volumen an Verdünnungspuffer versetzt und anschließend mit Protein-A-Agarose für 1 h präinkubiert. Dieser wie auch die folgenden Schritte wurden unter leichtem Schütteln bei 4°C durchgeführt. Die Protein-A-Agarose wurde abzentrifugiert (20 s, 10000 g, 4°C, Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C) und der Überstand für 3 h mit Agarose-gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Nach mehreren Waschschritten, 2x mit Waschpuffer 1, 2x mit Waschpuffer 2 sowie 1x mit Waschpuffer 3 für jeweils 20 min, wurden die Präzipitate abzentrifugiert (20 s, 10000 g) und mit 50 μ l Probenpuffer versetzt. Nach einer Inkubation bei 95°C für 10 min wurden die Agarosekügelchen durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand in SDS-PAGE eingesetzt.

5 Calcium- und Natrium-Imaging-Messungen

In Calcium- oder Natrium-Imaging-Messungen werden Änderungen der intrazellulären Calcium- oder Natrium-Konzentration mit Hilfe eines für das jeweilige Ion sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs analysiert.

5.1 Eigenschaften Ca²⁺- oder Na⁺-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffen

Für Calcium-Imaging-Analysen stehen die Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2, Fluo-3 und Fluo-4 zur Verfügung. Der Farbstoff Fura-2 eignet sich zur Bestimmung intrazellulärer Calcium-Konzentrationen, da dieser bei Chelatisierung mit Calcium ein Emissionsmaximum (E_{510nm}) bei verschiedenen Anregungswellenlängen aufweist. Die freie

Form des Farbstoff weist ein Emissionsmaximum ($E_{510\text{nm}}$) bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm auf, wohingegen dieses bei der Calcium-gebundenen Form bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm erreicht wird. Bei der Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration werden mit Farbstoff-beladene Zellen mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm bestrahlt und die jeweilige Extinktion bei 510 nm mit einer CCD-Kamera bestimmt. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den beiden Anregungswellenlängen (Ratio 340/380) stellt ein Maß für die intrazelluläre Calcium-Konzentration dar. Bei niedrigen Calcium-Konzentrationen liegt in der Zelle vorwiegend die freie Form des Fluoreszenzfarbstoffs mit einem Emissionsmaximum bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm vor, der Ratio 340/380-Wert ist somit relativ klein. Im Gegensatz dazu berechnet sich bei hohen Calcium-Konzentrationen ein großer Ratio 340/380-Wert (Kramer und Gräwe, 1994).

Als Alternative für Fura-2 stehen die Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-3 und Fluo-4 für Calcium-Imaging-Messungen zur Verfügung. Im Gegensatz zu Fura-2 besitzen Fluo-3 und Fluo-4 eine Anregungs- und Extinktionswellenlänge im sichtbaren Bereich des Lichts. Die Höhe der Extinktion bei 510 nm nach einer Anregung bei einer Wellenlänge von 480 nm dient direkt als Maß für die intrazellulären Calcium-Konzentration.

Der Na^+ -sensitive Fluoreszenzfarbstoff SFBI (Sodium fluorescent binding indicator) ermöglicht eine Analyse der intrazellulären Natrium-Konzentration. Analog zu dem Farbstoff Fura-2 dient auch bei dem Na^+ -sensitive Farbstoff SFBI das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 510 nm nach einer Anregung bei den beiden Wellenlängen 340 nm und 380 nm (Ratio 340/380) als Maß für die intrazelluläre Natrium-Konzentration.

5.2 Durchführung der Calcium- und Natrium-Imaging-Messungen

- Ringer-Lösung: 130 mM NaCl; 5 mM KCl; 2,5 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 5 mM Glucose; 20 mM HEPES; pH 7,4
- Locke's-Puffer: 140 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 3,6 mM NaHCO_3 ; 1,3 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 5,6 mM Glucose; 10 mM HEPES, pH 7,4

Für die Imaging-Messungen müssen die Zellen zunächst mit dem jeweiligen Farbstoff beladen werden. Da die Farbstoffmoleküle aufgrund ihrer Ladung die Plasmamembran nicht frei passieren können, werden die Farbstoffe als Acetoxymethylester in die Zelle transportiert. Nach der Diffusion ins Zellinnere spalten zelleigene Esterasen die Farbstoffe in ihre geladene Form, woraufhin diese die Zelle nicht mehr verlassen können. Zur Beladung wurden die Zellen für 1h bei 37°C mit einem der drei Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe ($4\ \mu\text{M}$) in Ringerlösung oder mit dem Na^+ -sensitiven Farbstoff SFBI ($10\ \mu\text{M}$) inkubiert. Bei der Beladung mit dem Na^+ -sensitiven Farbstoff SFBI wurde der Farbstofflösung 0,04 % der Detergenz Pluronic F zugesetzt, um die homogene Beladung der Zellen zu verbessern. Anschließend wurde die Lösung auf den beladenen Zellen durch den jeweiligen Puffer ohne

Farbstoff ersetzt und für eine weitere Stunde im Dunkeln inkubiert, um die Spaltung der Farbstoffester in der Zelle zu gewährleisten.

Nach der Beladung wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen in einem ausgestanzten Petrischälchen befestigt und mit 1 ml des jeweiligen Puffers überschichtet. Während der Messungen wurden die verschiedenen Agonisten kurzzeitig in einem Volumen von 5 ml auf die Zellen appliziert, wobei der Überstand kontinuierlich abgesaugt wurde und somit das Volumen über den Zellen von 1 ml konstant gehalten wurde. Nach Agonistenzugabe wurden die Zellen für 10 min mit Ringer-Lösung gewaschen, um die Stimulation zu beenden. Die Fluoreszenzaufnahmen nach einer Anregung der Zellen wurden von einer CCD-Kamera in Intervallen zwischen 2-15 s festgehalten, wobei das Hamamatsu-Software-Programm Argus50/Ca für die nachfolgende Auswertung verwendet wurde. Durch das Programm wurde die Konzentration von Calcium oder Natrium für ausgewählte Zellen sowohl zu verschiedenen Meßzeitpunkt als Falschfarben (Blau entspricht niedrigen und weiß hohen Ratio-Werten) in einem Bild als auch in seinem zeitlichen Verlauf als Graph dargestellt.

6 Elektrophysiologische Messungen

Extrazelluläre Badlösung: 140 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,0 mM MgCl₂; 1,8 mM CaCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM Glucose; pH 7,3, ~ 300 mOsm

Intrazelluläre Pipettenlösung: 140 mM CsCl; 1 mM MgCl₂; 11 mM EDTA; 10 mM HEPES; pH 7,3 eingestellt mit CsOH, ~ 300 mOsm

Die hochsensible patch-clamp Technik (Hamill et al. 1981) wurde eingesetzt, um die in Zellen exprimierten nACh-Rezeptoren pharmakologisch zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden mehrere Ganzzelleableitungen in Zusammenarbeit mit Dr. Marek Samochocki und Dr. Martin Radina durchgeführt.

Die verwendeten Mikroelektroden wurden aus Borosilikat-Glas (1,6 mm) mit Hilfe eines Elektrodenpullers (L/M 3P-A, List Elektronik, Darmstadt) gezogen. Nach dem Befüllen mit intrazellulärer Pipettenlösung wiesen die polierten Meßelektroden einen Widerstand von ca. 8 MΩ auf. Die pharmakologischen Substanzen wurden in der extrazellulären Badlösung gelöst und mit Hilfe der U-tube-reversed-flow-Technik (Fenwick et al., 1982) in geringem Abstand auf die Zellen appliziert. Der große Vorteil einer Applikation über das U-Tube-System besteht darin, daß nach dem Ende der Applikation die Substanzlösung wieder vollständig abgesaugt wird, wodurch ein Konzentrationsanstieg der applizierten Substanz vermieden werden kann. Infolgedessen findet eine schnelle Regeneration der zu untersuchenden Rezeptoren statt, wodurch der Zeitabstand zwischen zwei Applikationen relativ kurz gewählt werden kann. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Membranpotential der Zellen wurde bei - 70 mV konstant gehalten. Zur Aufnahme und Analyse der Daten wurde die Software pClamp (Version 6.0) verwendet.

III Ergebnisse

1 Etablierung eines Testmodells zur Untersuchung von nACh-Rezeptoren auf der Basis EGFP-gekoppelter Proteine

In unserem Labor wurde erstmalig der $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptor funktionell ektopisch in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimiert (Stetzer et al., 1996). Da Schwierigkeiten bei der ektopischen Expression anderer nAChR-Subtypen - insbesondere des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors - auftraten, war es Ziel dieser Arbeit, in den transfizierten Zellen die Expression der nAChR-Untereinheiten von der Transkription der nAChR mRNA bis zur Assemblierung des nACh-Rezeptors zu verfolgen.

Für die Lokalisation der exprimierten nAChR-Proteine wurde das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) als Reportersystem gewählt, wobei die Funktionalität des jeweiligen nACh-Rezeptors durch die EGFP-Fusion möglichst nicht gestört werden sollte. Diese Methode bietet den Vorteil, daß nach der Transfektion aufgrund der Fluoreszenz des Fusionsproteins direkt auf die Expression des nachzuweisenden Proteins geschlossen werden kann. Darüber hinaus lassen sich die fluoreszierenden chimären nACh-Rezeptoren sowohl in Immunfluoreszenzanalysen als auch in Western-Blots mittels eines GFP-Antiserums lokalisieren.

Am Beispiel des $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors war zunächst zu untersuchen, unter welchen Bedingungen EGFP-gekoppelte nAChR-Untereinheiten in der Zelle lokalisiert werden können und ob eine EGFP-Fusion die pharmakologischen Eigenschaften des nACh-Rezeptors verändert. Der $\alpha 3\beta 4$ nAChR-Subtyp wurde zur Etablierung einer EGFP-Fusion ausgewählt, da dieser nACh-Rezeptor schon mehrfach funktionell in HEK-293-Zellen exprimiert wurde (Stetzer et al., 1996; Staudermann et al., 1998; Wong et al., 1995; Xiao et al., 1998).

Das EGFP wurde an den extrazellulären C-Terminus der nAChR-Untereinheiten fusioniert. Dadurch dürfte die Ausbildung der Bindungstasche für kompetitive Liganden im N-terminalen Bereich der nAChR-Untereinheit am wenigsten gestört werden. Zur Herstellung der Fusionsproteine wurden die Sequenzen der nAChR-Untereinheiten in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N3, der stromabwärts von der multiplen Klonierungsstelle das EGFP-Gen aufweist, kloniert.

1.1 Klonierung der nAChR-Untereinheiten in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N3

Für die Klonierung der nAChR-Untereinheiten in den Expressionsvektor pEGFP-N3 war es zunächst notwendig, geeignete Schnittstellen von Endonukleasen am 5'- bzw. 3'-Ende der Sequenz der jeweiligen Untereinheit mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) einzufügen. Dazu wurden Primer ausgewählt, die jeweils im 5'-Bereich eine Erkennungssequenz für eine

hydrolysierende Endonuklease und im 3'-Bereich eine mit der DNA-Matrize hybridisierenden Sequenz enthielten. Da die EGFP-Fusion C-terminal an das nAChR-Protein erfolgen sollte, mußte die cDNA der nAChR-Untereinheiten jeweils stromaufwärts zur EGFP-Sequenz in den Polylinker-Bereich des Expressionsvektors pEGFP-N3 inkloniert werden. Dabei war zu berücksichtigen, daß das Leseraster zwischen der Sequenz der nAChR-Untereinheit und der EGFP-Sequenz nicht verändert wird. Andernfalls würde das Reporterprotein in einer nicht korrekten Aminosäuresequenz exprimiert. Zu diesem Zweck wurde die Restriktionsstelle der Endonuklease im stromabwärts gelegenen Primer entsprechend gewählt. In dem PCR-Produkt durfte nur der kodierende Bereich der nAChR-Untereinheit mit dem Start-Kodon und ohne das Stop-Kodon enthalten sein, da ansonsten das stromabwärts gelegene Fluoreszenzprotein überhaupt nicht translatiert werden könnte.

Die PCR-Reaktion zur Amplifikation der nAChR-Untereinheiten wurde nach dem im Kapitel II.2.1.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. In Tabelle III.1 sind die eingefügten Restriktionsschnittstellen der Endonukleasen sowie die Amplifikatlängen der erhaltenen PCR-Produkte zusammengefaßt.

Tab. III.1: Länge der nAChR-Untereinheiten, denen mittels PCR jeweils am 5'- sowie am 3'-Ende eine Erkennungssequenz für Endonukleasen eingefügt wurden.

Die Amplifikatlänge entspricht der Länge der kodierenden Sequenz der jeweiligen nAChR-Untereinheit, die mittels PCR amplifiziert wurde. Die Erkennungssequenzen für die Endonukleasen waren im 5'-Bereich der verwendeten Primern enthalten.

PCR-Produkt	Eingefügte Schnittstelle		Amplifikatlänge
	5'-Ende	3'-Ende	
Human α 3	Hind III	KpnI	1509 bp
Human α 5	Hind III	KpnI	1404 bp
Human α 6	SacI	KpnI	1482 bp
Human α 7	BamHI	BamHI	1506 bp
Human β 3	HindIII	KpnI	1374 bp
Human β 4	HindIII	KpnI	1494 bp
Ratte α 3	HindIII	KpnI	1497 bp
Ratte α 7	HindIII	KpnI	1505 bp

Die mittels PCR amplifizierten nAChR-Untereinheiten wurden in den Expressionsvektor pEGFP-N3 kloniert. Mit Ausnahme der cDNA der humanen α 7 nAChR-Untereinheit wurden am 5'- und am 3'-Ende der cDNAs Erkennungssequenzen für zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme hinzugefügt, was eine gerichtete Klonierung ermöglichte. Da die amplifizierte cDNA der humanen α 7 nAChR-Untereinheit an beiden Seiten die gleiche Erkennungssequenz aufwies, konnte diese Sequenz in zwei Orientierungen in den

Expressionsvektor inserieren. Mit Hilfe asymmetrischer Hydrolysen wurde das pEGFP-N3-Konstrukt mit der in der richtigen Orientierung integrierten cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit identifiziert.

In Abb. III.1 ist das Ergebnis der Klonierungen der nAChR-Untereinheiten in den Expressionsvektor pEGFP-N3 nach der Hydrolyse mit verschiedenen Endonukleasen dargestellt. Im Agarosegel ist jeweils eine Bande von 4700 bp zu sehen, was der Länge des Expressionsvektors (pEGFP-N3) entspricht. Außerdem ist jeweils eine Bande mit der Länge der klonierten nAChR-Sequenz (Abb. III.1) zu erkennen. Somit konnten alle gewünschten nAChR-Sequenzen erfolgreich in den Expressionsvektor pEGFP-N3 kloniert werden. Durch Sequenzierung wurden Mutationen in den eingefügten nAChR-Sequenzen ausgeschlossen.

Für die Expression in der Zelllinie S2 aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurden die cDNAs der EGFP-gekoppelten nAChR-Untereinheiten mit Endonukleasen aus dem Expressionsvektor pEGFP-N3 herausgeschnitten und in den induzierbaren Expressionsvektor pMT/V5-His umkloniert.

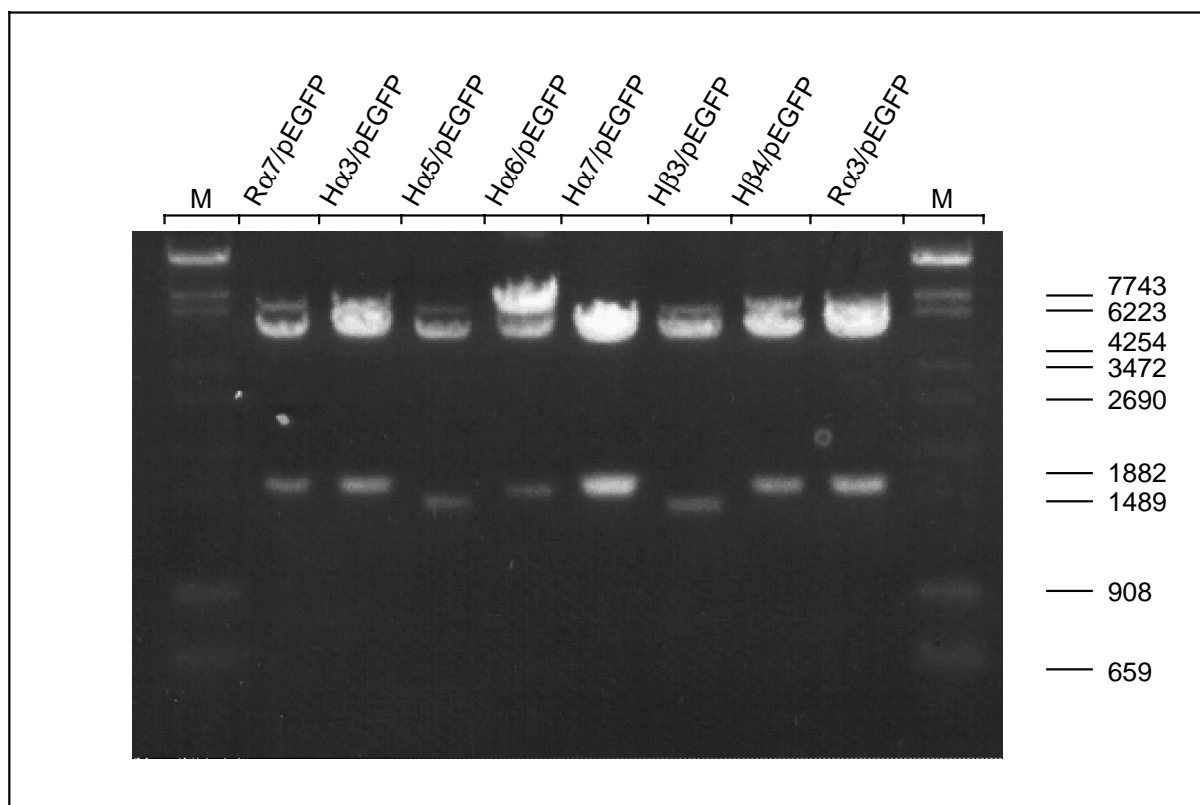


Abb. III.1: Elektrophoretische Auftrennung der klonierten nAChR-Untereinheiten nach der Hydrolyse mit verschiedenen Endonukleasen

Die obere Bande mit einer Länge von 4700 bp entspricht dem Expressionsvektor pEGFP-N3. Die untere Bande weist die Länge der jeweils klonierten nAChR-Untereinheit auf (vgl. Tab. III.1). Die Hydrolyse wurde mit den gleichen Endonukleasen durchgeführt, die zur Klonierung in den Vektor verwendet wurde (Tab. III.1). In den mit M gekennzeichneten Spuren wurde als Längenstandard der λ -Sty1/pBr322-AluI-Marker aufgetrennt.

1.2 Expression EGFP-gekoppelter $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

Anhand der Expression EGFP-gekoppelter $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren waren die Versuchsbedingungen zu etablieren, unter denen EGFP als Reporter für die Expression von nAChR-Untereinheiten geeignet ist. Dazu wurde die Expression fluoreszierender $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren durch Immunfluoreszenzanalysen sowie deren pharmakologische Eigenschaften mittels Calcium-Imaging und patch-clamp-Analysen untersucht. Für diese Experimente wurden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen als Expressionssystem verwendet. Da HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren funktionell exprimieren (Stetzer et al., 1996), war eine plasmamembranständige Expression dieses heteromeren nACh-Rezeptors in diesen Zellen zu erwarten.

Die humanen $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren wurden transient in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimiert, wobei die $\alpha 3$ -Untereinheiten, die $\beta 4$ -Untereinheiten oder alle Untereinheiten des nACh-Rezeptors C-terminal mit EGFP fusioniert waren. Die Expression der Fusionsproteine konnte 48 h nach der Transfektion anhand der grünen Fluoreszenz des fusionierten EGFPs im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

Zur Lokalisation der Rezeptoren in den transfizierten Zellen waren indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit einem GFP-Antiserum in Kombination mit einem Texas-Rot-gekoppelten Zweitantikörper durchzuführen. Der C-Terminus einer nAChR-Untereinheit ist nach korrekter Assemblierung des Rezeptors in der Plasmamembran extrazellulär lokalisiert. Da EGFP C-terminal mit den nAChR-Untereinheiten fusioniert war, sollte dieses bei plasmamembranständigen nACh-Rezeptoren ebenfalls extrazellulär vorliegen und somit von dem GFP-Antiserum ohne Permeabilisierung der Zellen erkannt werden. Intrazellulär exprimierte EGFP-Fusionsproteine hingegen werden von dem GFP-Antikörper erst nach Behandlung der Zellen mit dem Detergens Triton X-100 lokalisiert.

Nach der Transfektion von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mit der EGFP-gekoppelten cDNA der humanen $\beta 4$ nAChR-Untereinheit war die Expression des $\beta 4$ nAChR-Proteins deutlich anhand der grünen Fluoreszenz von EGFP deutlich sichtbar (Abb. III.2). Das EGFP-Epitop des $\beta 4$ nAChR-Fusionsproteins konnte jedoch bei den intakten Zellen von dem GFP-Antiserum nicht erkannt werden (Abb. III.2), was auf eine intrazelluläre Expression der $\beta 4$ nAChR-Untereinheit hinweist. Um sicherzustellen, daß das GFP-Antiserum sein Epitop grundsätzlich erkennt, wurden die Plasmamembran der transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen vor der indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit dem Detergens Triton X-100 permeabilisiert. In diesem Fall kann das Antiserum in die Zellen eindringen und erkennt das EGFP-Epitop an der intrazellulär exprimierten $\beta 4$ -nAChR-Untereinheit, die rote Fluoreszenz des sekundären Antikörpers ist dann deutlich sichtbar (Abb. III.2). Somit war eine intrazelluläre Expression der $\beta 4$ nAChR-Untereinheit in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen eindeutig nachgewiesen.

Das gleiche Ergebnis wurde bei Transfektionen von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen nur mit der EGFP-gekoppelten cDNA der $\alpha 3$ nAChR-Untereinheit beobachtet, was ebenfalls bei der

$\alpha 3$ nAChR-Untereinheit ohne weitere nAChR-Untereinheit auf eine intrazelluläre Expression schließen läßt.

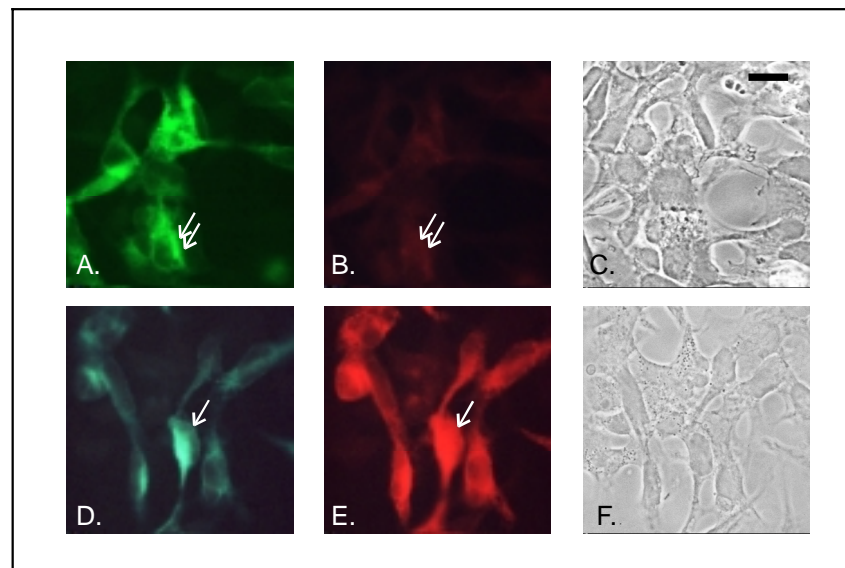


Abb. III.2: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung an transient die EGFP-gekoppelte $\beta 4$ nAChR-Untereinheit exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen wurden transient mit der EGFP-gekoppelten cDNA der $\beta 4$ nAChR-Untereinheit transfiziert. Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen mit 4 % PFA fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit dem GFP-Antiserum unterzogen, wobei ein Teil der Zellen vor der Inkubation mit dem GFP-Antikörper mit Triton X-100 (0,1 %) gelöchert wurden (D. – F.). Es ist jeweils die grüne Fluoreszenz des $\beta 4$ nAChR-Fusionsproteins (A., D.), das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzanalysen mit dem GFP-Antiserum (B., E.) sowie der Phasenkontrast (C., F.) der transfizierten Zellen dargestellt.

Anhand der grünen Fluoreszenz ist die Expression des EGFP-fusionierten $\beta 4$ nAChR-Proteins deutlich sichtbar (A., D.). Das GFP-Antiserum erkennt sein Epitop nicht auf der extrazellulären Seite (B.), sondern erst nach dem Löchern der Plasmamembran mit Triton X-100 im Zellinneren der transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen (E.). Die $\beta 4$ nAChR-Untereinheit wird somit ohne weitere nAChR-Untereinheit intrazellulär exprimiert. Die Pfeile in A. und B. bzw. in D. und E. kennzeichnen jeweils die gleiche Zelle in der Darstellung mit der EGFP-Eigenfluoreszenz und nach der Immunfluoreszenzfärbung mit dem GFP-Antiserum. Der Balken in C. entspricht 25 μm .

Ein ganz anderes Bild ergibt sich, wenn die HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen gleichzeitig mit den cDNAs der humanen nAChR-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 4$ transient transfiziert wurden. Abbildung III.3 zeigt ein typisches Fluoreszenzbild einer Koexpression der $\alpha 3$ nAChR-Untereinheit mit der EGFP-gekoppelten $\beta 4$ nAChR-Untereinheit. Die deutlich sichtbare leuchtend grüne Fluoreszenz weist auf eine starke Expression des $\beta 4$ nAChR-Proteins hin, wobei die Expressionshöhe in den verschiedenen Zellen variiert. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen bei transienten Transfektionen, da die Zellen jeweils unterschiedlich viel DNA aufnehmen und anschließend keine Selektion positiver Transfektanten stattfindet. Nach einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit dem GFP-Antiserum erkennt der GFP-Antikörper sein Epitop auf der extrazellulären Seite bei grün fluoreszierenden Zellen ohne vorherige Behandlung mit Triton X-100, was an der deutlich sichtbaren roten Fluoreszenz erkennbar ist (Abb. III.3 B.). Bei einer Koexpression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 4$ konnte somit eine membranständige Expression der EGFP-gekoppelten $\beta 4$ nAChR-Untereinheit an der

Zelloberfläche von HEK-293/ α 1-Zellen nachgewiesen werden. Nach transienter Kotransfektion mit den cDNAs der α 3- und β 4-Untereinheit erkennt der GFP-Antikörper bei einigen grün fluoreszierenden Zellen sein Epitop jedoch nicht extrazellulär. Da nach einer transienten Transfektion höchstwahrscheinlich nicht alle Zellen die kotransfizierten cDNAs gleichermaßen aufgenommen haben, exprimieren möglicherweise diese Zellen die α 3 nAChR-Untereinheit nicht, woraufhin die fluoreszierende β 4 nAChR-Untereinheit intrazellulär exprimiert wird (siehe oben und Abb. III.2). Wenn bei Koexpressionen anstatt der β 4- die α 3-Untereinheit des nACh-Rezeptors mit EGFP fusioniert war, erkannte der GFP-Antikörper sein Epitop ebenfalls auf der extrazellulären Seite der transfizierten Zellen, was auf eine plasmamembranständige Expression der α 3 nAChR-Untereinheit hinweist (Abb. III.3 E.). Eine Koexpression der nAChR-Untereinheiten α 3 und β 4 ist somit notwendig, damit beiden Untereinheiten in der Plasmamembran von HEK-293/ α 1-Zellen exprimiert werden.

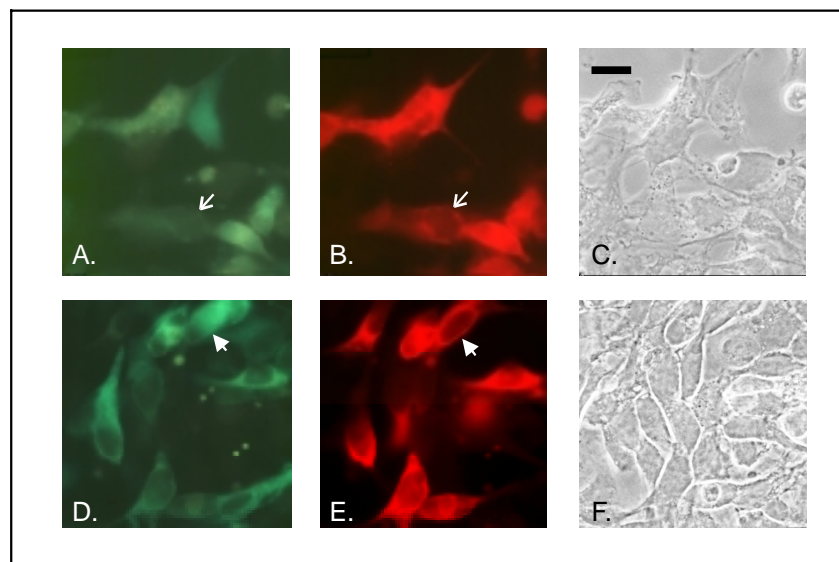


Abb III.3: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von HEK-293/ α 1-Zellen, die transient mit EGFP-gekoppelten nAChR-Untereinheiten transfiziert waren.

HEK-293/ α 1-Zellen wurden transient mit den cDNAs der nAChR-Untereinheiten α 3 und β 4 kotransfiziert, wobei eine der beiden transfizierten cDNAs jeweils mit EGFP fusioniert war (A.-C.: EGFP-Fusion an α 3-Untereinheit; D.-F.: EGFP-Fusion β 4-Untereinheit). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse mit dem GFP-Antiserum unterzogen. Die Darstellungen zeigen die grüne Fluoreszenz des jeweiligen Fusionsproteins (A., D.), das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit dem GFP-Antiserum (B., E.) sowie die Phasenkontraste (C., F.) der transfizierten Zellen. In beiden Transfektionsansätzen ist die Expression des grün fluoreszierenden nAChR-Fusionsproteins deutlich zu erkennen (A.: α 3(G); D.: β 4(G)). In den Immunfluoreszenzfärbungen erkennt der GFP-Antikörper sein Epitop an der EGFP-gekoppelten nAChR-Untereinheit auf der extrazellulären Seite der Zellen, was bei Koexpressionen der nAChR-Untereinheiten α 3 und β 4 auf eine Lokalisation beider Untereinheiten in der Plasmamembran der HEK-293/ α 1-Zellen schließen läßt. Pfeile deuten auf Zellen mit plasmamembranständiger Expression. Der Balken in C. entspricht 25 μ m.

Durch eine EGFP-Fusion an die nAChR-Untereinheiten konnte damit erfolgreich zwischen der plasmamembranständigen Expression des $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors und der intrazellulären Expression der $\beta 4$ nAChR-Untereinheit oder $\alpha 3$ nAChR-Untereinheit in Abwesenheit weiterer nAChR-Untereinheiten unterschieden werden. Das fusionierte EGFP ist somit als Reporter für eine Lokalisation der nAChR-Untereinheiten geeignet.

1.3 Calcium-Imaging sowie elektrophysiologische Untersuchungen EGFP-gekoppelter nACh-Rezeptoren am Beispiel des humanen $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors

Die Funktionalität EGFP-gekoppelter nACh-Rezeptoren wurde am Beispiel des $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors durch Calcium-Imaging- und elektrophysiologische Messungen untersucht.

Für die Expression der EGFP-gekoppelten nACh-Rezeptoren wurden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen verwendet, da bei ausreichender Depolarisation der Plasmamembran durch Agonisten-induzierte Stimulation der nACh-Rezeptoren die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle den nAChR-vermittelten Calcium-Einstrom verstärken und somit den Einsatz der Calcium-Imaging-Methode zum Nachweis von nACh-Rezeptoren erleichtert (siehe I.3; Stetzer et al., 1996). Die Expressionshöhe der $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran (siehe III.1.2) sollte ausreichen, um über eine Depolarisation der Plasmamembran die Calcium-Kanäle in den Zellen zu aktivieren.

Für die Calcium-Imaging-Analysen wurden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mit den cDNAs der humanen nAChR-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 4$ transient transfiziert, wobei keine [$\alpha 3\beta 4$], jeweils eine [$\alpha 3\beta 4(G)$ bzw. $\alpha 3(G)\beta 4$] oder beide kotransfizierten cDNAs [$\alpha 3(G)\beta 4(G)$] C-terminal mit der EGFP-Sequenz fusioniert waren. Die Zellen wurden 48 – 60 h nach der Transfektion in Calcium-Imaging-Messungen eingesetzt.

Bei HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mit einer transienten Expression von EGFP-gekoppelten $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren konnte nach einer Stimulation mit 100 μM Nikotin ein Calcium-Einstrom mittels Calcium-Imaging nachgewiesen werden, unabhängig an welcher Untereinheit EGFP fusioniert vorlag (Abb. III.4). Dieser Nikotin-induzierte Calcium-Einstrom ließ sich durch den nikotinischen Antagonisten Mecamylamin vollständig blockieren (Abb. III.5). Damit war eine funktionelle Expression für EGFP-gekoppelter $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren eindeutig nachgewiesen.

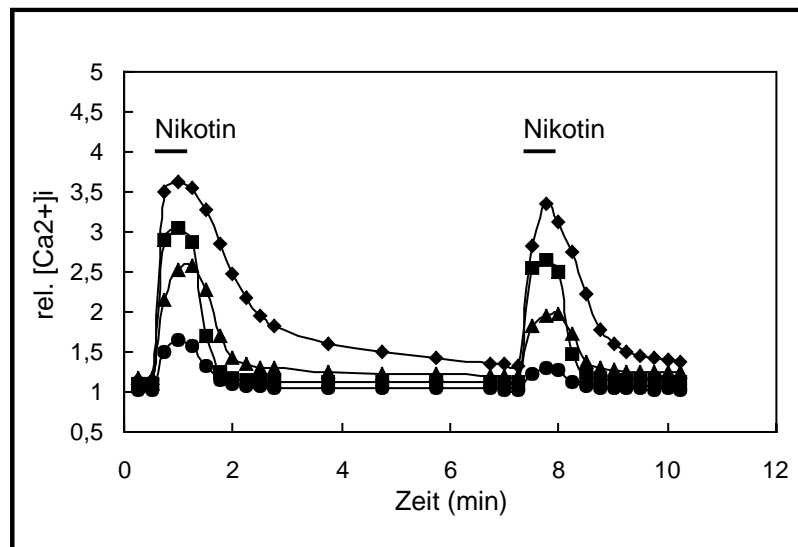


Abb. III.4: Nachweis des Nikotin-induzierten Calcium-Einstroms in HEK-293/ α 1-Zellen, die transient α 3 β 4 bzw. EGFP-gekoppelte α 3 β 4 nACh-Rezeptoren exprimieren

HEK-293/ α 1-Zellen wurden transient mit den cDNAs der humanen nAChR-Untereinheiten α 3 und β 4 kotransfiziert, wobei keine (α 3 β 4, \blacklozenge), beide (α 3(G) β 4(G), \bullet) oder eine der beiden kotransfizierten cDNAs (α 3(G) β 4, \blacktriangle bzw. α 3 β 4(G), \blacksquare) C-terminal mit EGFP fusioniert waren. Nach der Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 wurden diese transfizierten Zellen mittels Calcium-Imaging untersucht. Eine Stimulation mit Nikotin (100 μ M) fñhrt, unabhãngig an welcher Untereinheit EGFP fusioniert war, zu einem Calcium-Einstrom, was eine funktionelle Expression EGFP-gekoppelter α 3 β 4 nACh-Rezeptoren beweist. Die Balken kennzeichnen den Zeitraum der Nikotin-Applikation.

Die Stãrke des Calcium-Einstroms nach Nikotin-Stimulation der α 3 β 4 nACh-Rezeptoren ist jedoch davon abhãngig, an welcher Untereinheit EGFP fusioniert wurde (Abb. III.4 und Abb. III.5). Im Vergleich zu α 3 β 4 nACh-Rezeptoren ohne fusioniertem EGFP wurde nach einer EGFP-Fusion an beide Untereinheiten eine 4-fach und nach einer EGFP-Fusion an die Liganden-bindende α -Untereinheit eine 2-fach geringere Ãnderung der intrazellulãren Calcium-Konzentration gemessen. Der an der β -Untereinheit EGFP-gekoppelte α 3 β 4 nACh-Rezeptor zeigte im Rahmen der Meßgenauigkeit nach Nikotin-Stimulation einen zum unfusionierten α 3 β 4 nACh-Rezeptor vergleichbaren Calcium-Einstrom (Abb. III.4 und Abb. III.5). Die funktionelle Expression von α 3 β 4 nACh-Rezeptoren und EGFP-gekoppelter α 3 β 4 nACh-Rezeptoren ist somit nicht identisch. Da fñr die α 3 β 4 nAChR-Expressionen HEK-293/ α 1-Zellen verwendet wurden, die spannungsgesteuerte Calcium-Kanãle stabil exprimieren, war nun die Beteiligung dieser Ionenkanãle an dem Nikotin-induzierten Calcium-Einstrom zu klãren.

Nach jeder Transfektion von HEK-293/ α 1-Zellen fñhrte eine Depolarisation der Plasmamembran durch Erhõhung der extrazellulãren Kaliumkonzentration auf 60 mM zu einem Calcium-Einstrom vergleichbarer Hõhe, was die Expression von spannungsgesteuerten Calcium-Kanãlen in den transfizierten Zellen beweist (Abb. III.5). Der Calcium-Einstrom nach Nikotin-Stimulation der α 3 β 4 oder EGFP-gekoppelten α 3 β 4 nACh-Rezeptoren konnte durch 1 μ M Nitrendipin, einem in dieser Konzentration spezifischen Inhibitor von L-Typ

Calciumkanälen, teilweise blockiert werden. Dadurch kann eine Beteiligung dieser Ionenkanäle an dem Nikotin-induzierten Calcium-Einstrom eindeutig nachgewiesen werden. (Abb. III.5). Die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle verstärken somit nach der Aktivierung der $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren unabhängig von einer EGFP-Fusion den Calcium-Einstrom in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen.

Da Nitrendipin bei einer Konzentration von 1 μM keine Wirkung auf nACh-Rezeptoren zeigt, muß der durch Nitrendipin nicht blockierte Anteil des Nikotin-induzierten Calcium-Einstroms durch die $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren direkt vermittelt werden. Die Stärke des $\alpha 3\beta 4$ nACh-vermittelten Calcium-Einstroms wird durch eine EGFP-Fusion an den Rezeptor unterschiedlich stark verändert (Abb. III.5). Während nach einer EGFP-Fusion an die strukturellen β -Untereinheiten eine zum $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptor ohne EGFP-Fusion vergleichbare Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration gemessen wurde, ist der Nikotin-induzierte Calcium-Einstrom durch den nAChR-Kanal nach einer EGFP-Fusion an die ligandenbindende α -Untereinheiten oder an alle Untereinheiten des Rezeptors deutlich verringert (Abb. III.5). Mögliche Erklärungen hierfür sind, daß die Bindung von Liganden oder der Ionenstrom durch den nACh-Rezeptor durch die EGFP-Fusion an die α -Untereinheit bzw. an alle Untereinheiten sterisch stärker beeinträchtigt wird. In Calcium-Imaging-Untersuchungen wird nach der Aktivierung des nACh-Rezeptors, der hauptsächlich für Natrium-Ionen durchlässig ist, nur der Calcium-Einstrom nachgewiesen. Die Calcium-Imaging-Experimente lassen somit keine Unterscheidung zu, ob sich aufgrund der EGFP-Fusion der gesamte Ionenstrom oder nur der daran beteiligte Anteil an Calcium-Ionen durch den nAChR-Kanal verringert.

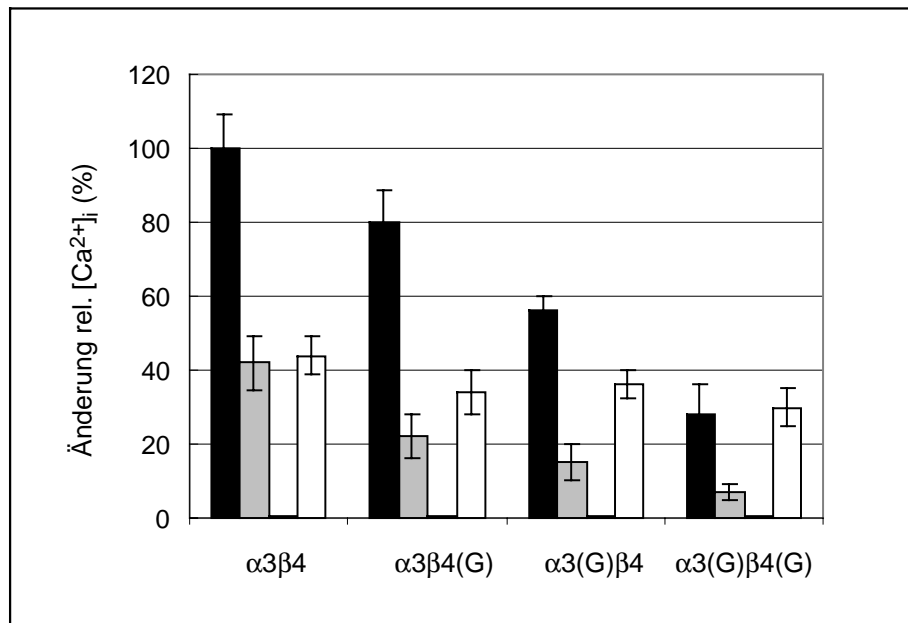


Abb. III.5: Pharmakologische Untersuchung des Nikotin-induzierten Calcium-Einstroms in HEK-293/α1-Zellen, die transient α3β4 nACh-Rezeptoren oder EGFP-gekoppelten α3β4 nACh-Rezeptoren exprimieren

HEK-293/α1-Zellen wurden transient mit den cDNAs der humanen nAChR-Untereinheiten α3 und β4 transfiziert, wobei in den unabhängigen Kofunktionsen keine [α3β4], beide [α3(G)β4(G)] oder eine der beiden [α3(G)β4, bzw. α3β4(G)] transfizierten cDNAs C-terminal mit EGFP fusioniert waren. 48 h nach der Transfektion diese Zellen mit Fura-2 beladen und mittels Calcium-Imaging untersucht.

Bei allen Transfektanten führte eine Depolarisation der Plasmamembran (extrazelluläre Lösung mit 60 mM K⁺) zu einem Calcium-Einstrom, was die funktionelle Expression spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle in den transfizierten Zellen beweist (□). Eine Stimulation mit 100 μM Nikotin (■) führte bei HEK-293/α1-Zellen, die α3β4 nACh-Rezeptoren oder EGFP-gekoppelte α3β4 nACh-Rezeptoren exprimierten, zu einem Calcium-Einstrom. Dieser konnte jeweils vollständig durch den nikotinischen Antagonisten Mecamylamin (100 μM, ▒) blockiert werden, womit eine funktionelle Expression auch für EGFP-gekoppelte α3β4 nACh-Rezeptoren nachgewiesen war. Eine teilweise Blockade durch Nitrendipin (1 μM, □) beweist auch eine Beteiligung der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle am Nikotin-induzierten Calcium-Einstrom.

Um nach Aktivierung der nACh-Rezeptoren den Gesamtstrom an Ionen durch die Membran zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Radina aus unserem Labor elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Da nach transienten Transfektionen von HEK-293/α1-Zellen sich in nahezu allen Zellen die Expression funktioneller α3β4 nACh-Rezeptoren mittels Calcium-Imaging nachweisen ließ, wurden für die elektrophysiologischen Messungen HEK-293/α1-Zellen transient mit den cDNAs der nAChR-Untereinheiten α3 und β4 transfiziert, wobei keine, beide oder nur eine der cDNAs mit EGFP fusioniert waren.

Nach Applikation von 100 μM Nikotin konnten in Ganzzelleableitungen konzentrationsabhängige Ströme durch die Plasmamembran gemessen werden, unabhängig davon ob und an welche Untereinheit EGFP fusioniert vorlag (Abb. III.6). Die elektrophysiologischen Messungen bestätigen somit eine funktionelle Expression EGFP-gekoppelter α3β4 nACh-Rezeptoren in HEK-293/α1-Zellen. Anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven für Nikotin wurden die EC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten der verschiedenen nACh-Rezeptoren bestimmt (Abb. III.6). Die EC₅₀-Werte für Nikotin bei α3β4 nACh-Rezeptoren ohne EGFP-Fusion und mit

EGFP-Fusion an allen Untereinheiten [$\alpha 3(G)\beta 4(G)$: $EC_{50}(\text{Nik}) = 37,6 \pm 1,5 \mu\text{M}$ bzw. $\alpha 3\beta 4$: $EC_{50}(\text{Nik}) = 39,9 \pm 3,1 \mu\text{M}$] waren vergleichbar. Im Gegensatz dazu wurde für $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren mit fusioniertem EGFP entweder nur an den α - oder nur an den β -Untereinheiten ein etwa halb so großer EC_{50} -Wert für Nikotin gemessen [Abb. III.6; $\alpha 3(G)\beta 4$: $EC_{50}(\text{Nik}) = 13,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$; $\alpha 3\beta 4(G)$: $EC_{50}(\text{Nik}) = 12,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$]. Somit weisen $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren nach einer EGFP-Fusion an einigen ihrer fünf Untereinheiten eine höhere Sensitivität gegenüber Nikotin auf, was auf eine sterische Veränderung dieser nACh-Rezeptors hinweist. Für $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren und EGFP-gekoppelte $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren wurden jeweils Hill-Koeffizienten größer oder gleich eins berechnet (Abb. III.6). Bei der Aktivierung des nACh-Rezeptors ist somit die Bindung des zweiten Nikotin-Moleküls an den Rezeptor erleichtert.

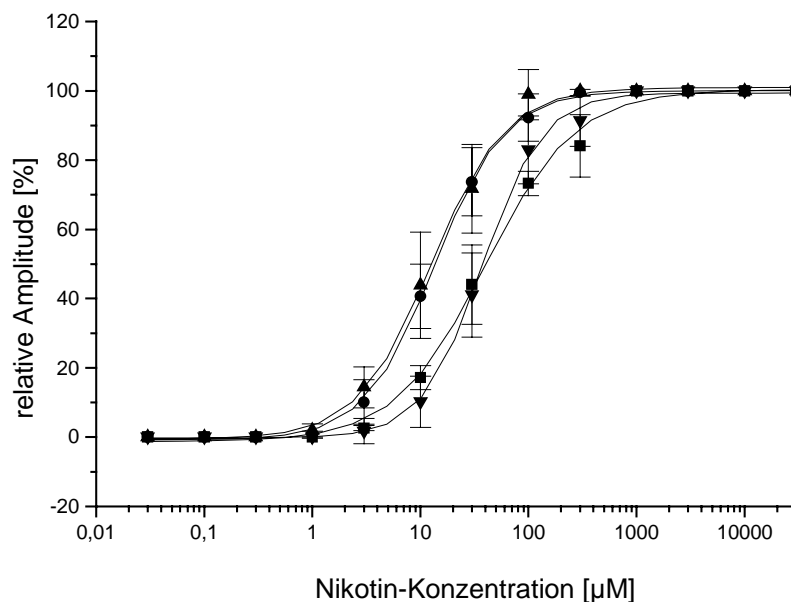


Abb. III.6: Ganzzellaufleitungen an HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen, die transient $\alpha 3\beta 4$ oder EGFP-gekoppelte $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimieren

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen wurden transient mit der cDNA der humanen nAChR-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 4$ transfiziert, wobei keine [$\alpha 3\beta 4$], beide [$\alpha 3(G)\beta 4(G)$] oder eine der beiden [$\alpha 3(G)\beta 4$ bzw. $\alpha 3\beta 4(G)$] kotransfizierten cDNAs C-terminal mit EGFP fusioniert waren. 48 h nach der Transfektion wurden diese Zellen in elektrophysiologischen Experimenten untersucht. Unabhängig von einer EGFP-Fusion wurden in den Ganzzellaufleitungen konzentrationsabhängige Ionenströme durch die Plasmamembran gemessen, womit die funktionelle Expression EGFP-gekoppelter nACh-Rezeptoren eindeutig bestätigt war.

Anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden für Nikotin EC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten der verschiedenen $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren ermittelt. Dabei sind die durchschnittlichen Werte aus fünf unabhängigen Meßpunkten dargestellt und die durchgezogene Linie wurde nach der Hill-Gleichung berechnet. Daraus ergaben sich folgende EC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten für Nikotin: (■) $\alpha 3\beta 4$ $EC_{50}=39,9 \pm 3,1 \mu\text{M}$, $n_H=1,0 \pm 0,1$; (●) $\alpha 3(G)\beta 4$ $EC_{50}=13,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$, $n_H=1,3 \pm 0,1$; (▲) $\alpha 3\beta 4(G)$ $EC_{50}=12,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$, $n_H=1,3 \pm 0,1$; (▼) $\alpha 3(G)\beta 4(G)$ $EC_{50}=37,6 \pm 1,5 \mu\text{M}$, $n_H=1,6 \pm 0,1$

(Messungen in Zusammenarbeit mit Dr. M. Radina aus unserem Labor durchgeführt)

Die elektrophysiologischen Daten zeigen zusammen mit den durchgeführten Calcium-Imaging-Experimenten, daß EGFP-gekoppelte nACh-Rezeptoren durch Nikotin aktiviert sowie durch typische nikotinische Antagonisten blockiert werden, was auf eine funktionelle Expression dieser Rezeptoren in der Plasmamembran von HEK-293/ α 1-Zellen schließen läßt. Da bei α 3 β 4 nACh-Rezeptoren nach der EGFP-Fusion ein verminderter Nikotin-induzierter Calcium-Einstrom mittels Calcium-Imaging sowie eine veränderte Sensitivität gegenüber Nikotin in elektrophysiologischen Untersuchungen gemessen wurde, sollte für eine detaillierte pharmakologische und elektrophysiologische Charakterisierung immer nACh-Rezeptoren ohne EGFP-Fusion verwendet werden.

2 Ektopische Expression des α 7 nACh-Rezeptors

Für die ektopische Expression des homomeren α 7 nACh-Rezeptors wurde die humane Säugerzelllinie HEK-293/ α 1 ausgewählt, die sich gut transfizieren läßt. Außerdem exprimieren diese Zellen endogen keine nACh-Rezeptoren, so daß bei Messungen alle gelieferten Signale dem exprimierten Rezeptortyp eindeutig zugeordnet werden können (Wong et al., 1995). In HEK-293/ α 1-Zellen sind darüber hinaus bereits stabile funktionelle Expressionen von α 3 β 4 nACh-Rezeptoren in unserem Labor erfolgreich durchgeführt worden (Stetzer et al., 1996). Die stabil in den Zellen exprimierten spannungsabhängigen Calcium-Kanäle sollten später den Einsatz des effizienten Calcium-Imagings zum Screening klonaler Zelllinien erleichtern (siehe Kap. I.3).

2.1 Stabile Expression des α 7 nACh-Rezeptors der Ratte in HEK-293/ α 1-Zellen

Der α 7 nACh-Rezeptor wurde stabil in HEK-293/ α 1-Zellen exprimiert, um eine ausreichende Menge dieses Rezeptors für eine Reihe von Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen zur Verfügung zu haben. Die cDNA der α 7 nAChR-Untereinheit lag in dem eukaryotischen Expressionsvektor pCDNA1Neo kloniert vor (Seguela et al., 1993), der über ein Resistenzgen für das Antibiotikum Geneticin verfügt. Da HEK-293/ α 1-Zellen aufgrund ihrer stabilen Transfektion mit dem spannungsgesteuerten L1 α 1C-b Calcium-Kanal bereits über eine Resistenz gegenüber Geneticin verfügen (Kleppisch et al., 1994), wurde zur Selektion positiver Transfektanten das Puromycinresistenz-Expressionsplasmid kotransfiziert. Für die Transfektion wurde der Expressionsvektor für die nAChR-Untereinheit in doppelter Menge im Verhältnis zum Puromycinresistenz-Expressionsplasmid eingesetzt. Dabei ist davon auszugehen, daß die Puromycin-resistenten Zellen das im Überschuß eingesetzte Expressionsplasmid der nAChR-Untereinheit aufgenommen haben. Die transfizierten Zellen wurden anschließend in Gegenwart der Antibiotika Geneticin und Puromycin kultiviert, um gleichzeitig

auf die Expression der nAChR-Untereinheit und der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle zu selektieren. Nach einem Zeitraum von drei Wochen in Gegenwart der Antibiotika waren viele Zellen abgestorben und einige bereits zu kreisrunden klonalen Zelllinien herangewachsen. Insgesamt wurden 130 doppeltresistente klonale Zelllinien mittels Klonierungsringen isoliert und in Gegenwart von Geneticin und Puromycin innerhalb von vier bis sechs Wochen expandiert. Diese klonalen Zelllinien werden im folgenden als $R\alpha 7L^+/1-130$ bezeichnet. Dabei steht R für Ratte, $\alpha 7$ für den $\alpha 7$ nACh-Rezeptor und L^+ für den in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimierten L-Typ Calcium-Kanal.

2.2 Screening der klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+$ mittels Calcium-Imaging

Calcium-Imaging-Messungen in Verbindung mit einem Fluoreszenzmikroskop weisen für das Screening klonaler Zelllinien den entscheidenden Vorteil auf, innerhalb kürzester Zeit eine Vielzahl transfizierter Zellen mit Einzelzellauflösung auf die Expression funktioneller Rezeptoren hin untersuchen zu können. Die Calcium-Imaging-Methode bewährte sich bereits zum Nachweis von $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren (siehe Kap. III.1.3; Stetzer et al., 1996), wobei dieser nAChR-Subtyp nur einen Anteil von 4 % Calcium-Ionen am Gesamtstrom aufweist (Vernino et al., 1994). Aufgrund der hohen Calcium-Permeabilität des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors (20 % Calcium-Ionen am Gesamtstrom; Seguela et al., 1993) sollte dieser nAChR-Subtyp mittels Calcium-Imaging schon anhand der nAChR-vermittelten Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration nachweisbar sein.

Für die Messungen wurden die Zellen der isolierten klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+/1-130$ auf Fibronectin-beschichtete Deckgläschen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C für 48-72 h kultiviert. Nach der Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 wurden diese Zellen in Calcium-Imaging-Messungen untersucht.

Eine Applikation von Nikotin in den Konzentrationen 10 μ M, 50 μ M bzw. 100 μ M oder von 50 μ M Acetylcholin in Gegenwart von 1 μ M Atropin bewirkte jedoch bei keiner der 130 getesteten klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+/1-130$ einen Calcium-Einstrom (Abb. III.7). Atropin diente in diesen Experimenten als Antagonist von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren, die in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen konstitutiv exprimiert werden und durch Acetylcholin ebenfalls aktiviert werden. Es stellte sich nun die Frage, ob in den isolierten klonalen Zelllinien die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle als Verstärker des nAChR-vermittelten Calcium-Einstroms fehlten. Nach Depolarisation der Plasmamembran durch eine Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration auf 60 mM war in 80 % der klonalen Zelllinien, wie bei der klonalen Zelllinie $R\alpha 7L^+/99$ (Abb. III.7), eine starke Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zu beobachten, was eine Expression von spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen in diesen Zellen beweist. Ein fehlender Verstärkereffekt durch die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle ist somit nicht die Ursache für das negative Ergebnis der

Calcium-Imaging-Analysen. Möglicherweise wird eine zu geringe Anzahl an $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren funktionell in den klonalen Zelllinien exprimiert, um die Plasmamembran für eine Aktivierung der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle ausreichend zu depolarisieren.

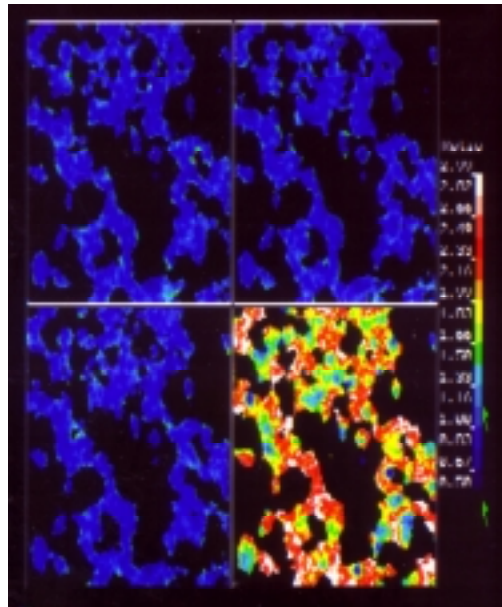


Abb. III.7: Untersuchung der klonalen Zelllinie R α 7L⁺/99 mittels Calcium-Imaging

Die klonale Zelllinie R α 7L⁺/99 wurden für 3-4 Tage auf Fibronectin-beschichteten Deckgläschen kultiviert. Nach der Beladung mit Fura-2 konnten diese Zellen mittels Calcium-Imaging untersucht werden. Die Höhe der intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde, wie in Kap. II.5.2 beschrieben, bestimmt und anschließend als Falschfarben dargestellt, wobei blau einer niedrigen und rot einer hohen Konzentration entspricht. Das Intervall zwischen zwei Meßpunkten betrug 10 s, wobei die Applikation von Nikotin und Depolarisationspuffer jeweils für 20 s erfolgte. Das Bild zeigt die Zellen vor der Messung (oben links), während der Stimulation mit Nikotin (100 μ M) (oben rechts), zwischen den Applikationen (unten links) sowie während der Depolarisation der Plasmamembran (extrazelluläre Kalium-Konzentration auf 60 mM; unten rechts).

Nach Stimulation mit Nikotin war kein Calcium-Einstrom in die Zellen nachweisbar. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulärer Puffer mit 60 mM K⁺) eine starke Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration, was die Expression spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle beweist.

Um auch eine geringere Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration nachweisen zu können, wurden die Versuchsbedingungen während den Calcium-Imaging-Messungen variiert. Zunächst wurde die Calcium-Konzentration in der extrazellulären Lösung während der Messung von 2,5 mM auf bis zu 10 mM erhöht, um den Calcium-Einstrom nach Aktivierung der nACh-Rezeptoren aufgrund des erhöhten Calcium-Konzentrationsgradienten über die Plasmamembran zu verstärken. Des weiteren wurden die Intervalle zwischen den einzelnen Messpunkten von 15 s auf 2 s verkürzt, womit nach Aktivierung des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors ein Abklingen des Calcium-Signals vor dem nächsten Meßpunkt verhindert werden sollte. Dabei war bei einem Meßintervall von 2 s die höchst mögliche zeitliche Auflösung unter den apparativen Voraussetzungen erreicht. Außerdem wurde versucht, die Aktivierung der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle zu erleichtern. Da die in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen stabil exprimierten L α 1_{IC-b}-Typ Calcium-Kanäle sich erst bei einem Membranpotential von -20 mV

öffnen (Tsien et al., 1991; Kleppisch et al., 1994), wurde das Membranpotential der Plasmamembran während der Messung durch eine Erhöhung der Kalium-Konzentration in der extrazellulären Pufferlösung von 5 mM auf 15 mM vordepolarisiert. Infolgedessen sollte eine geringfügige Erhöhung des Membranpotentials nach der Nikotin-induzierten Aktivierung der nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran ausreichen, um die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle in der Plasmamembran zu aktivieren und somit den Calcium-Einstrom in die Zellen über die Detektionsgrenze zu verstärken. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den erfolglosen Nachweis des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors mittels Calcium-Imaging wäre, daß funktionell exprimierte $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren nach Applikation nikotinischer Agonisten zu schnell desensibilisiert (nach 1 ms; Role; 1992), um die Plasmamembran für eine Aktivierung der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle ausreichend zu depolarisieren. Durch eine Verkürzung der Applikationszeit sollte eine Desensibilisierung des Rezeptors aufgrund eines langen Kontakts mit dem Agonisten vermieden werden. Dazu wurden die Zellen auf dem Deckgläschen mit einem Flüssigkeitsfilm überzogen. Nach der Zugabe einiger Tropfen des Agonisten wurde der Agonist durch Zugabe von Puffer schnellst möglich verdünnt und schließlich innerhalb von ca. 5 s vollständig entfernt. Leider konnten auch nach Variation der Meßbedingungen kein Nikotin-induzierter Calcium-Einstrom in die klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+/1-130$ mittels Calcium-Imaging nachgewiesen werden. Calcium-Imaging-Experimente könnten unter den apparativen Voraussetzungen aufgrund ihrer begrenzten Zeitauflösung und der langen Applikationszeit der pharmakologischen Substanzen grundsätzlich für einen Nachweis des sehr schnell desensibilisierenden $\alpha 7$ nACh-Rezeptors nicht geeignet sein. Deshalb erschien es im folgenden sinnvoll, die Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren anhand der Bindung von FITC-markiertem α -Bungarotoxin (α -Btx) zu untersuchen.

2.3 Nachweis von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in den klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+$ durch Bindung von α -Bungarotoxin

Der $\alpha 7$ nAChR-Subtyp zeichnet sich pharmakologisch gegenüber heteromeren neuronalen nACh-Rezeptoren durch seine hohe Bindungsaffinität zu α -Bungarotoxin (α -Btx) aus ($K_d = 0,7$ nM; Zhang et al., 1994). Die Anlagerung von α -Btx kann nur an eine korrekt gefaltete Bindungstasche des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors erfolgen, was auch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren C189 und C190 voraussetzt (Testai et al., 2000). Die Bildung dieser Disulfidbrücke ist für die gesamte Konformation und Assemblierung des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors von entscheidender Bedeutung und läßt daher auf eine korrekte Etablierung des Rezeptors in der Plasmamembran schließen (Gelman und Prives, 1996). Die Bindung von α -Btx wurde in dieser Arbeit anhand der grünen Fluoreszenz von FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markiertem α -Btx mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops verfolgt.

Der chimäre $\alpha 7/5HT_3$ -Rezeptor enthält die ersten 201 Aminosäuren des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors mit der Acetylcholin-Bindungsdomäne, weshalb dieser Rezeptor ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität zu α -Btx aufweist. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits anhand der Bindung von FITC-markiertem α -Btx die membranständige Expression funktioneller chimären $\alpha 7/5HT_3$ -Rezeptoren an der Zelloberfläche von HEK-293-Zellen erfolgreich nachgewiesen werden (Diplomarbeit A. Fehrenbacher, 2000). Infolgedessen sollte diese Methode auch zum Nachweis funktionell exprimierter $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen geeignet sein.

Für den Bindungsnachweis wurden verschiedene klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+$ auf Fibronektin-beschichteten Deckgläsern ausgesät und für 48 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Als Positivkontrolle wurden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen transient mit der cDNA der chimären $\alpha 7/5HT_3$ -Untereinheit transfiziert, wofür mir das $\alpha 7/5HT_3$ -Konstrukt in dem Expressionsvektor pCDNA4TO von A. Fehrenbacher aus unserem Labor freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Bei transient in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimierten $\alpha 7/5HT_3$ -Rezeptoren konnte anhand einer starken grünen Fluoreszenz die erfolgreiche Bindung des FITC-markierten α -Btx bestätigt werden (Abb. III.8 C.). Da das Peptid α -Btx aufgrund seiner Größe (Molekulargewicht: ca. 8000 Da) in Zellen mit einer intakten Plasmamembran nicht eindringt, konnte geschlossen werden, daß die α -Btx-bindenden $\alpha 7/5HT_3$ -Rezeptoren in der Plasmamembran der transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimiert werden.

Im Gegensatz dazu konnte bei verschiedenen mit der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit stabil transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinien, wie bei der klonalen Zelllinie $R\alpha 7L^+/99$ (Abb. III.8 A.), keine Bindung von α -Btx nachgewiesen werden, was eine membranständige Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren an der Zelloberfläche dieser HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen ausschließt.

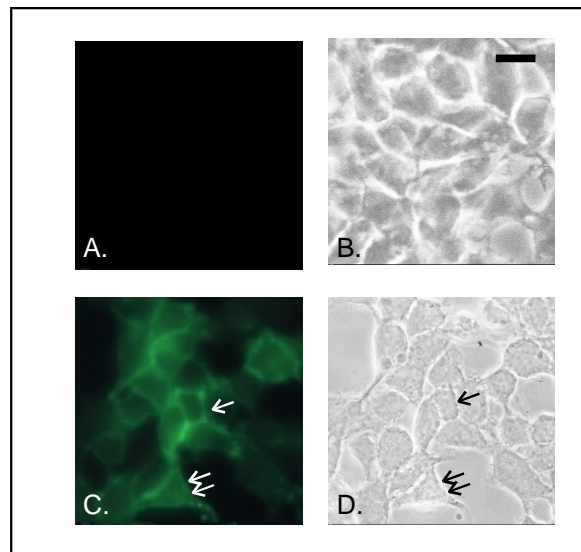


Abb. III.8: Bindung von α -Btx an heterolog in HEK-293/ α 1-Zellen exprimierte Rezeptoren

Für den Nachweis der Bindung von α -Btx wurden Zellen der klonalen Zelllinie $R\alpha 7L^+/99$ (A., B.) für 48 h auf Deckgläschen kultiviert und als Positivkontrolle HEK-293/ α 1-Zellen transient mit der cDNA der chimären $\alpha 7/5HT_3$ -Untereinheit (C., D.) transfiziert. An diesen Zellen wurden Bindungsanalysen mit FITC-markiertem α -Btx, wie in Kapitel II.3.6 beschrieben, durchgeführt.

Anhand der grünen Fluoreszenz konnte die Expression der chimären $\alpha 7/5HT_3$ -Rezeptoren an der Zelloberfläche von HEK-293/ α 1-Zellen bestätigt werden. Die Pfeile zeigen auf Zellen mit plasmamembranständiger Expression von $\alpha 7/5HT_3$ -Rezeptoren. Im Gegensatz dazu war keine Bindung von FITC-markiertem α -Btx an die klonalen Zelllinie $R\alpha 7L^+/99$ zu erkennen, was eine funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran dieser Zellen ausschließt. Links ist die Fluoreszenz nach der Inkubation der Zellen mit FITC-markiertem α -Btx und rechts der entsprechende Phasenkontrast dargestellt. Der Balken in B. entspricht 25 μ m.

Da durch Calcium-Imaging-Untersuchungen und Bindungsanalysen mit FITC-markiertem α -Btx keine funktionell exprimierten $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in den klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+/99$ nachweisbar waren, stellte sich nun die Frage, ob diese Zellen während der Transfektion den Expressionsvektor der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit aufgenommen haben. Des Weiteren war zu klären, ob grundsätzlich in den isolierten Zelllinien $R\alpha 7L^+$ eine Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit auf RNA- und Protein-Ebene stattfindet. Diese Fragen sollten im folgenden durch Northern-Blot- und Western-Blot-Analysen geklärt werden.

2.4 Charakterisierung der Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in den klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+$ auf RNA-Ebene

In den klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+$ war zunächst die Transkription einer für die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit kodierenden mRNA mittels Northern-Blot-Analysen nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus 15 von diesen Zelllinien sowie aus untransfizierten HEK-293/ α 1-Zellen isoliert, in einem Agarose-Gel aufgetrennt und mittels Kapillarkraft auf eine Nylonmembran transferiert. Um die Qualität der isolierten RNA und des durchgeführten Northern-Blots zu überprüfen, wurde die auf der Membran immobilisierte RNA zunächst mit

einer für das ubiquitäre Stoffwechsellenzym Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) spezifischen Sonde inkubiert. Dabei konnte sowohl in den verschiedenen klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+$ als auch in den untransfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen eine Bande vergleichbarer Intensität und mit einer Größe von 1,4 kb nachgewiesen werden (Abb. III.9), was den Einsatz unterschiedlicher Probenmengen und eine Degradation der verwendeten RNA ausschließt.

Nach dem Entfernen der GAP-DH-spezifischen Sonde durch Inkubation mit heißer SDS-Lösung (0,5 Gewichts-%) wurde der gleiche Northern-Blot zum Nachweis der Transkription einer für die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit kodierenden mRNA eingesetzt. Dabei diente ein radioaktiv-markiertes 265 bp-Fragment aus dem cytoplasmatischen Loop der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit als Sonde. Da die verschiedenen nAChR-Untereinheiten im Bereich des cytoplasmatischen Loops die geringste Homologie aufweisen, sollte die verwendete Sonde für die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit spezifisch sein. Untransfizierte HEK-293-Zellen exprimieren keine nACh-Rezeptoren (Wong et al., 1995). Da die $\alpha 7$ -spezifische Sonde nicht mit der aus untransfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen isolierten RNA hybridisierte (Abb. III.9), konnte eine unspezifische Anlagerung dieser Sonde an konstitutiv in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen transkribierte mRNAs ausgeschlossen werden.

Mit der $\alpha 7$ -Sonde war bei 7 von 15 getesteten klonalen Zelllinien keine Hybridisierung der isolierten RNA zu beobachten (z.B. klonale Zelllinie $R\alpha 7L^+/35$, Abb. III.9). In diesen Zellen wird offensichtlich die mRNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit nicht exprimiert. Ihre Fähigkeit in Gegenwart der Antibiotika dennoch wachsen zu können, müssen diese klonalen Zelllinien entweder spontan oder aufgrund der erfolgreichen Transfektion nur mit dem Puromycin-Resistenzvektor erworben haben (eine Geneticin-Resistenz besaßen bereits die zur Generierung der klonalen Zelllinien verwendeten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen, siehe Kap. II.3.3.).

In 8 der 15 getesteten klonalen Zelllinien konnte eine Bande von 2,3 kb nachgewiesen werden, die in ihrer Länge der transfizierten cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit mit dem SV40-Polyadenylierungssignal des Vektors entspricht (Abb. III.9), was die Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit auf RNA-Ebene in den klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+/66, 72, 78, 99, 101, 110, 115$ eindeutig beweist. Aufgrund der Hybridisierungsintensität der Sonde konnte auf eine stärkere Transkription der für die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit kodierenden mRNA in den fünf klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+/66, 72, 78, 91, 99$ geschlossen werden (Abb. III.9). Mögliche Erklärungen hierfür wären, daß in diesen Zelllinien mehrere der transfizierten Expressionsplasmide für die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit durch heterologe Rekombination ins Genom integrierten oder die Integration an einer Region mit hoher Genaktivität stattfand.

Durch Northern-Blot-Analysen kann die Transkription einer mRNA nachgewiesen werden. Um auch Mutationen von wenigen Basen innerhalb der RNA-Sequenz ausschließen zu können, muß das Produkt einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit spezifischen Primern kloniert und sequenziert werden.

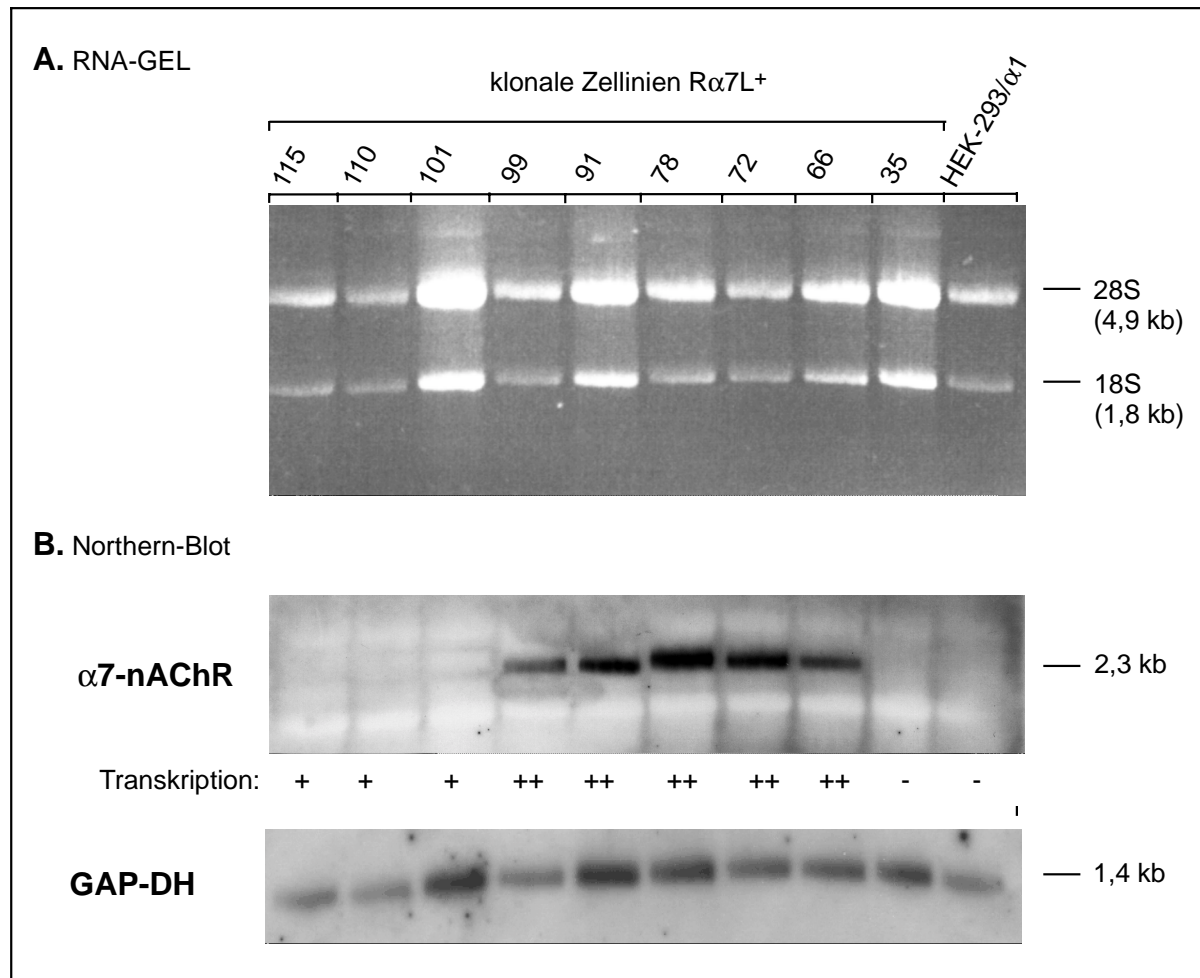


Abb. III.9: Nachweis einer Transkription der für die α 7 nAChR-Untereinheit kodierenden mRNA in den klonalen Zelllinien R α 7L⁺ mittels Northern-Blot

Die Transkription einer für die α 7 nAChR-Untereinheit kodierenden mRNA wurde in 15 klonalen Zelllinien R α 7L⁺ mittels Northern-Blot untersucht (Durchführung siehe Kap. II.2.2.). Als Längenstandard dienten dabei die beiden im Gel deutlich sichtbaren Banden der ribosomalen RNA.

Die aus untransfizierten HEK-293/ α 1-Zellen isolierte RNA hybridisierte nicht mit der α 7-Sonde, weshalb eine unspezifische Anlagerung dieser Sonde auszuschließen war. Anhand der 2,3 kb großen Bande konnte in 8 der klonalen Zelllinien (R α 7L⁺/66, 72, 78, 91, 99, 101, 110, 115) die Transkription der für die α 7 nAChR-Untereinheit kodierenden mRNA nachgewiesen werden. Obwohl von jeder klonalen Zelllinie 2 μ g Gesamt-RNA eingesetzt wurde, war bei 5 der klonalen Zelllinien (R α 7L⁺/99, 91, 78, 76, 66) eine stärkere Hybridisierung der Sonde sichtbar, was auf eine stärkere Transkription der mRNA der α 7 nAChR-Untereinheit schließen läßt. Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnte in den transfizierten und in den untransfizierten HEK-293/ α 1-Zellen eine vergleichbare Transkription des ubiquitären Stoffwechsellzyms GAP-DH nachgewiesen werden, womit der Einsatz vergleichbarer Probenmengen und einer nicht-degradierten RNA sicher gestellt werden konnte.

Die Isoform-Spezifität und die Vollständigkeit des im Northern-Blot nachgewiesenen α 7-Transkripts wurde beispielhaft an der klonalen Zelllinie Ra7L⁺/99 mittels RT-PCR genauer untersucht. Nach der Reversen-Transkription der RNA in cDNA wurden für die anschließende PCR-Reaktion zwei Primer verwendet, die an komplementäre Sequenz stromauf- bzw. stromabwärts der kodierenden Region der DNA-Sequenz der α 7 nAChR-Untereinheit hybridisieren, so daß eine Amplifikation des vollständigen kodierenden Bereichs des α 7 nAChR-Gens inklusive Start- und Stop-Kodon von 1,5 kb erfolgen konnte.

Abbildung III.10 zeigt das Ergebnis dieser RT-PCR-Analyse. In dem Gel wurde nur eine Bande mit einer Länge von 1,5 kb nachgewiesen (Abb. III.10), was der Länge der kodierenden Region des $\alpha 7$ nAChR Gens entspricht. Da keine Nebenprodukte bei der RT-PCR auftraten, konnten Splice-Varianten im kodierenden Bereich des $\alpha 7$ nAChR-Gens aufgrund von Insertionen oder Deletionen ausgeschlossen werden. Die in der RT-PCR amplifizierte Bande wurde aus dem Agarose-Gel isoliert und in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert. Durch Sequenzierung der klonierten Sequenz konnte Mutationen im kodierenden Bereich der mRNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit vollständig ausgeschlossen werden.

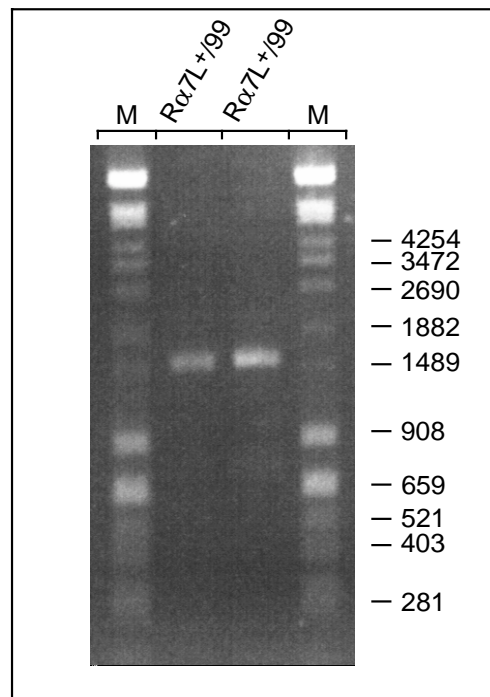


Abb. III.10: Charakterisierung der klonalen Zelllinie R $\alpha 7$ L⁺/99 mittels RT-PCR

In einer Reversen Transkriptase-Reaktion (RT) wurde zunächst die Gesamt-RNA aus der klonalen Zelllinie R $\alpha 7$ L⁺/99, wie in Kapitel II.2.2.1 beschrieben, in cDNA übersetzt. In der anschließenden PCR-Reaktion mit Primern, die stromaufwärts bzw. stromabwärts des kodierenden Bereichs der $\alpha 7$ nAChR DNA-Sequenz hybridisieren, wurde anschließend nur ein Transkript mit der für den kodierenden Bereich des $\alpha 7$ nAChR-Gens erwarteten Länge von 1,5 kb amplifiziert. Durch Klonierung und anschließende Sequenzierung des $\alpha 7$ Transkripts konnten auch Mutationen im kodierenden Bereich der mRNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit ausgeschlossen werden. Als Längenstandard wurde in den mit (M) gekennzeichneten Spuren der l-Sty1/pBr322-AluI-Marker mitgeführt.

2.5 Nachweis des $\alpha 7$ nAChR-Proteins in den klonalen Zelllinien R $\alpha 7$ L⁺

Da in den klonalen Zelllinien R $\alpha 7$ L⁺/72, 78, 91, 99, 110, 115 eine für die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit kodierende mRNA mittels Northern-Blot nachgewiesen wurde (Kap.III.2.4), stellte sich die Frage, inwiefern die Translation eines $\alpha 7$ nAChR-Proteins in den Zellen stattfindet. Falls die Translation der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit nachgewiesen werden kann, war weiterhin

zu klären, ob das ektopisch in HEK-293/ α 1-Zellen und das in natürlichem Gewebe exprimierte α 7 nAChR-Protein identisch sind.

Für den Western-Blot wurden die Plasmamembranen der im Northern-Blot-positiven klonalen Zelllinien R α 7L⁺ sowie untransfizierter HEK-293/ α 1-Zellen, wie in Kapitel II.4.2. beschrieben, isoliert. Als Vergleich für im Rattengehirn exprimiertes α 7 nAChR-Protein wurde eine Präparation von Hippocampus und Cortex-Gewebe mitgeführt, die mir freundlicherweise von Frau Dr. S. Xia aus unserem Labor zur Verfügung gestellt wurde. Zum Nachweis des α 7 nAChR-Proteins in den Western-Blot-Analysen diente ein polyklonales α 7-Antiserum (Santa Cruz), das 19 Aminosäuren im cytoplasmatischen Loop der α 7 nAChR-Untereinheit als Epitop erkennt. Aufgrund der geringen Homologie der verschiedenen nAChR-Untereinheiten in diesem Rezeptorbereich sollte das verwendete Antiserum isoformspezifisch sein. In untransfizierten HEK-293/ α 1-Zellen, die keine nACh-Rezeptoren exprimieren (Wong et al., 1995), erkannte der verwendete Antikörper sein Epitop nicht (Abb. III.11 A.), womit eine unspezifische Anlagerung des Antikörpers an zelleigene Proteine der HEK-293/ α 1-Zelllinie ausgeschlossen werden konnte.

In den einzelnen Membranfraktionen der im Northern-Blot-positiven klonalen Zelllinien R α 7L⁺ erkennt das α 7-Antiserum ein Protein, dessen relatives Molekulargewicht durch einen Vergleich mit dem mitgeführten Proteinmarkerstandard mit 60 kDa bestimmt wurde (Abb. III.11 A.).

Als Kontrolle wurde das α 7-Antiserum mit dem bei der Antikörperherstellung zur Immunisierung verwendeten Peptid abgesättigt. In Western-Blot-Analysen erkannte der Antikörper-Peptid-Komplex das α 7 nAChR-Protein in dem aufgetrennten Membranextrakt nicht mehr (Abb. III.11 B.), was ein eindeutiger Nachweis für die spezifische Erkennungsreaktion des verwendeten α 7-Antikörpers ist.

Anhand der Intensität der Antikörperreaktion war in den klonalen Zelllinien R α 7L⁺/72, 78, 91, 99 eine höhere Menge an α 7 nAChR-Protein zu erkennen (Abb. III.11 A.), was der im Northern-Blot nachgewiesenen Transkriptionshöhe der α 7-mRNA in der jeweiligen klonalen Zelllinie entspricht (Abb. III.9).

In der Rattenhirnpräparation aus Hippocampus und Cortex wurden zwei Proteine mittels Western-Blot nachgewiesen, deren relatives Molekulargewicht durch einen Vergleich mit dem mitgeführten Proteinstandard mit 55 kDa und 95 kDa bestimmt wurde. Aufgrund der nachgewiesenen Spezifität des verwendeten α 7-Antiserums handelt es sich bei diesen beiden Proteinen vermutlich trotz der denaturierenden Bedingungen im Gel um das Monomer (55 kDa) und das Dimer (95 kDa) des α 7 nAChR-Proteins.

Im Vergleich zu heterolog in den Zelllinien exprimiertem α 7 nAChR-Protein weist das aus dem Gehirn von Ratten isolierte monomere α 7 nAChR-Protein ein signifikant kleineres Molekulargewicht auf. Das Wanderungsverhalten glycosylierter Proteinen, wie z.B. nACh-Rezeptoren, im Gel wird stark durch deren posttranslationale Modifikation beeinflusst, weshalb eine exakte Molekulargewichts-Bestimmung dieser Proteine mittels SDS-PAGE

nicht möglich ist. Somit könnte die geringere Mobilität im SDS-Gel auf ein verändertes Glycosylierungsmuster des heterolog in HEK-293/ α 1-Zellen exprimierten α 7 nAChR-Proteins hinweisen. Dies müßte durch Abspaltung der Oligosaccharid-Seitenketten mit Endoglycosidasen eindeutig nachgewiesen werden. Da die Funktionalität des α 7 nACh-Rezeptors durch das Glycosylierungsmuster beeinflusst wird, könnte dies auch die Ursache für die fehlgeschlagene Expression funktioneller α 7 nACh-Rezeptoren sein. Es galt nun im folgenden die Frage zu klären, ob das α 7 nAChR-Protein in den klonalen Zelllinien $R\alpha$ 7L⁺ zu einem oligomeren Rezeptor assembliert.

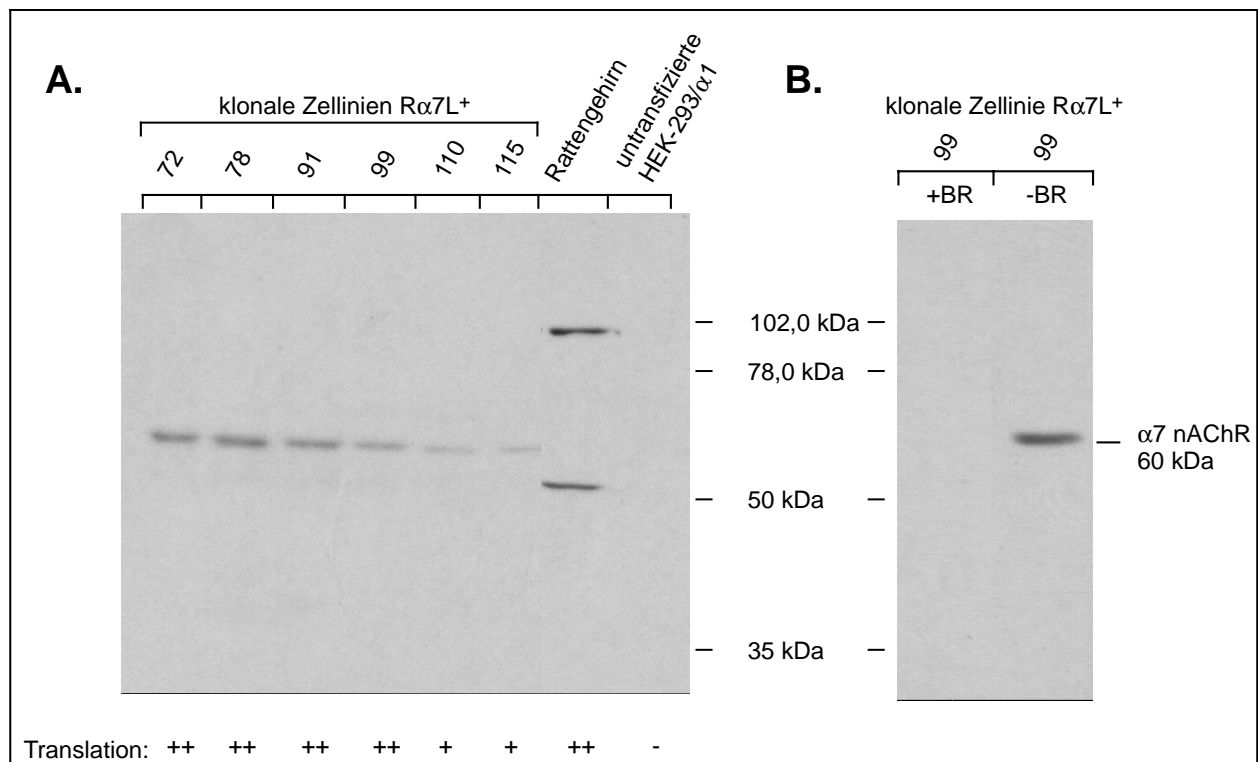


Abb. III.11: Western-Blot-Analysen zum Nachweis des α 7 nAChR-Proteins in klonalen Zelllinien $R\alpha$ 7L⁺

- A.:** In den im Northern-Blot-positiven klonalen Zelllinien $R\alpha$ 7L⁺ konnte anhand von Western-Blot-Analysen mit dem α 7-Antiserum die Translation des α 7 nAChR-Proteins mit einem relativen Molekulargewicht von 60 kDa detektiert werden, wohingegen untransfizierte HEK-293/ α 1-Zellen keine nachweisbare endogene Expression von α 7 nACh-Rezeptoren aufweisen. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen zeigte das aus dem Gehirn von Ratten isolierte α 7 nAChR-Protein eine deutlich höhere Mobilität im Gel, weshalb für dieses Protein ein relatives Molekulargewicht von nur 55 kDa ermittelt wurde. Trotz denaturierender Bedingungen im Gel konnte in der Rattenhirnpräparation eine zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht von 95 kDa nachgewiesen werden. Aufgrund der Spezifität des α 7-Antiserums dürfte es sich hierbei um das dimere α 7 nAChR-Protein handeln. Das relative Molekulargewicht der nachgewiesenen Proteine wurde durch einen Vergleich mit dem in Kapitel II.4.1.1 beschriebenen Proteinmarkerstandard bestimmt.
- B.:** Durch die Absättigung des α 7 Antiserum mit dem Peptid, das bei der Antikörperherstellung zur Immunisierung verwendet wurde, konnte die Erkennung des α 7 nAChR-Proteins durch den Antikörper im Western-Blot verhindert werden, was auf eine spezifische Reaktion des Antikörpers mit seinem Epitop schließen läßt.

2.6 Untersuchung der Assemblierung der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in den klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+$

Neuronale nACh-Rezeptoren sind oligomere Moleküle, die sich aus fünf Untereinheiten zusammensetzen (Galzi und Changeux, 1995). Da in einigen klonalen $R\alpha 7L^+$ -Zelllinien eine Translation des $\alpha 7$ nAChR-Proteins mittels Western-Blot nachgewiesen werden konnte (Kap. III.2.5), war die Frage nach dem Assemblierungszustand der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen zu klären. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Ludwig aus unserem Labor eine Blau-native-Gelelektrophorese nach Schägger (1994) exemplarisch an der klonalen Zelllinie $R\alpha 7L^+/99$ durchgeführt. In dieser zwei-dimensionalen Gelelektrophorese werden die Proteine für das Gel in der 1. Dimension mit Serva Blau G versetzt. Dieser Farbstoff umgibt die Proteinkomplexe einheitlich mit einer starken negativen Ladung, ohne die Proteine dabei zu denaturieren, so daß diese in einem nativen Gradientengel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Ein Gelstreifen mit den aufgetrennten Proteinkomplexen wurde aus dem nativen Gel der 1. Dimension herausgeschnitten und in ein denaturierendes SDS/Tricin-Gel einpolymerisiert. Die Proteinkomplexe konnten nun unter denaturierenden Bedingungen in ihre einzelnen Untereinheiten aufgetrennt werden (2. Dimension). Als Referenz diente in dem Gel der 2. Dimension eine mitgeführte Membranpräparation der klonalen Zelllinie $R\alpha 7L^+/99$. Aus den in Kapitel III.2.5 beschriebenen Western-Blot-Analysen war bekannt, daß das $\alpha 7$ -Antiserum in dieser unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennten Membranpräparation das $\alpha 7$ nAChR-Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 60 kDa erkennt.

In einem Western-Blot des zweidimensionalen Gels der Blau-nativen-Gelelektrophorese erkannte das $\alpha 7$ Antiserum eine Bande, die in der 2. Dimension der Elektrophorese die gleiche Mobilität wie das als Referenz mitgeführte $\alpha 7$ nAChR-Protein aufweist (Abb. III.12). Aufgrund der spezifischen Reaktion des verwendeten $\alpha 7$ -Antiserums (Kap. III.2.5) muß der identifizierte Proteinkomplex das $\alpha 7$ nAChR-Protein enthalten. In der 1. Dimension konnte dem identifizierten Proteinkomplex ein Molekulargewicht von mehr als 200 kDa zugeordnet werden. Als Proteinmarkerstandard diente dabei die Cytochrom-C-Oxidase des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes (200 kDa), die aufgrund ihrer eindeutigen Untereinheitenstruktur in einem analog hergestellten und Coomassie-gefärbten zweidimensionalen Gel identifiziert werden konnte. Da zur Molekulargewichtsbestimmung in dem Gel der 1. Dimension unter den methodischen Voraussetzungen nur ein Referenzprotein zur Verfügung stand, konnte das Molekulargewicht des oligomeren $\alpha 7$ nACh-Rezeptor nicht exakter bestimmt werden. Da ein Molekulargewicht von mehr als 200 kDa nachgewiesen wurde, müssen die in den klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+$ exprimierten nACh-Rezeptoren aus mehr als drei monomeren Untereinheiten (relatives Molekulargewicht: 60 kDa) bestehen. Monomere, Dimere oder Trimere der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 60, 120

oder 180 kDa konnte mittels Blau-nativer-Gelelektrophorese in der klonalen Zelllinie R α 7L⁺/99 nicht nachgewiesen werden.

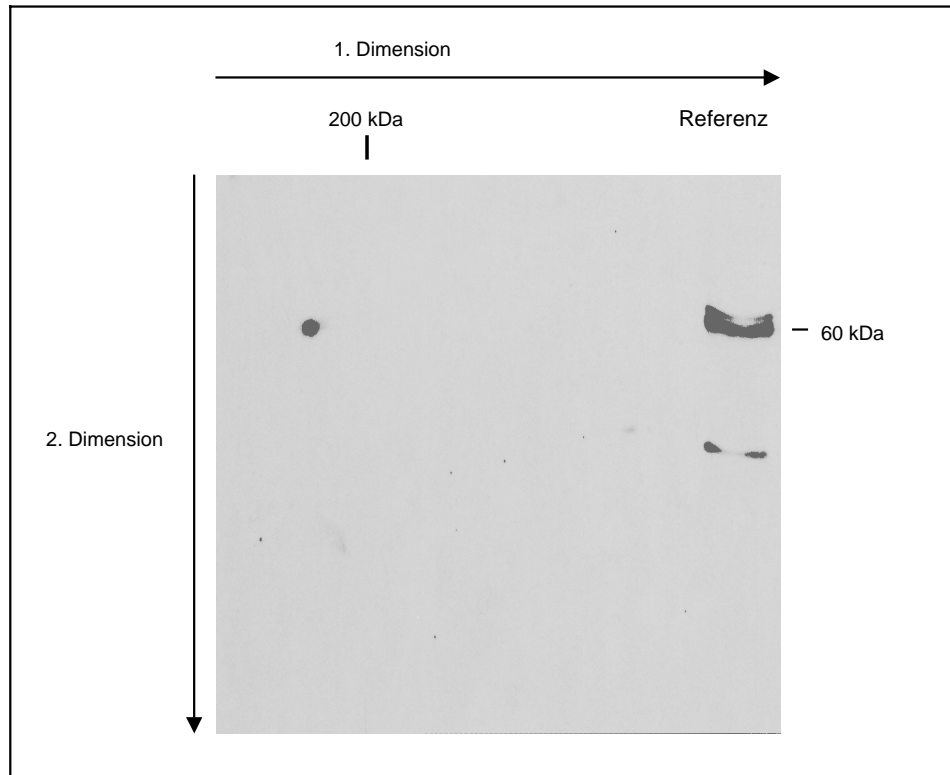


Abb. III.12: Untersuchung zur Assemblierung des α 7 nAChR-Proteins in der klonalen Zelllinie R α 7L⁺/99 mittels Blau-nativer-Gelelektrophorese

Eine Blau-native Gelelektrophorese nach Schagger wurde mit Membranextrakt der klonalen Zelllinie R α 7L⁺/99 durchgeführt. In dieser zweidimensionalen Gelelektrophorese werden die Protein-Komplexe in der 1. Dimension in einem nativen Gradientengel nach ihrer Größe aufgetrennt, um in der 2. Dimension in einem SDS-Tricin-Gel in ihre Untereinheiten aufgespalten zu werden. In dem denaturierenden Gel diente das α 7-nAChR-Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 60 kDa (SDS-PAGE, Abb. III.11), während in dem nativen Gel der 1. Dimension die Cytochrom-C-oxidase der Zelle mit einem Molekulargewicht von 200 kDa als Proteinmarkerstandard verwendet wurde. Die Cytochrom-C-oxidase konnte in einem analog angefertigten und anschließend Coomassie-gefärbten zweidimensionalen Gel aufgrund ihrer charakteristischen Untereinheitenstruktur identifiziert werden. Der Western-Blot mit einem spezifischen α 7-Antiserum zeigte, daß das α 7 nAChR-Protein in den Zellen in Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von mehr als 200 kDa eingebaut wird.

2.7 Lokalisation der α 7 nAChR-Untereinheit in HEK-293/ α 1-Zellen

Durch Bindungsanalysen mit FITC-markiertem α -Btx konnte bereits gezeigt werden, daß keine funktionellen α 7 nACh-Rezeptoren an der Zelloberfläche von HEK-293/ α 1-Zellen exprimiert werden (Kap. III.2.3). Da α 7 nACh-Rezeptoren mit einer inkorrekten Tertiärstruktur im Bereich der Bindungstasche für kompetitive Liganden α -Btx nicht binden können, werden diese Rezeptoren bei Bindungsanalysen mit FITC-markiertem α -Btx nicht erfaßt.

Infolgedessen war zu untersuchen, ob das $\alpha 7$ nAChR-Protein grundsätzlich nicht in der Plasmamembran von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimiert wird.

Die Lokalisation des $\alpha 7$ nAChR-Proteins in den klonalen HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinien wurde beispielhaft an der Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99 untersucht, in der die Translation der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit mittels Western-Blot bereits nachgewiesen war (Kap. III.2.5).

Für die Lokalisation der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit wurden die Proteine in der Plasmamembran der intakten Zellen, wie in Kapitel II.4.5 beschrieben, zunächst mit Biotin markiert und anschließend mit Streptavidin präzipitiert. In Western-Blot-Analysen mit dem $\alpha 7$ -Antiserum waren die isolierten Plasmamembranproteine hinsichtlich der Expression der $\alpha 7$ nAChR-Proteins zu untersuchen. Dabei konnte die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit nicht in der Fraktion der aus der Plasmamembran der Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99 isolierten Proteine nachgewiesen werden (Abb. III.13), was auf eine intrazelluläre Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in diesen Zellen schließen läßt.

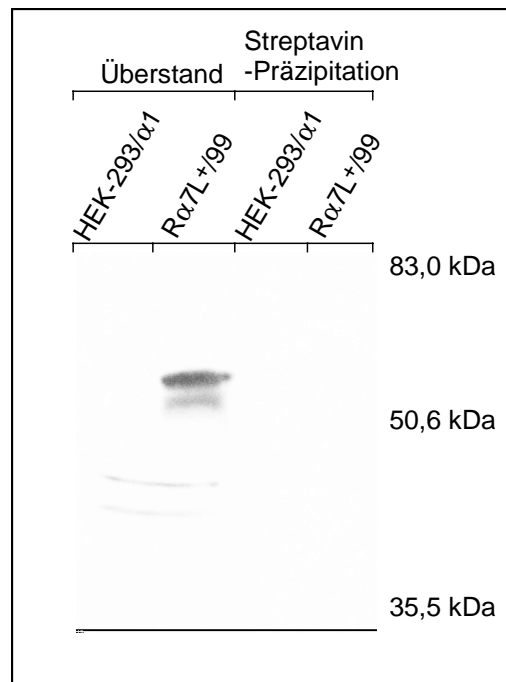


Abb. III.13: Untersuchung der aus der Plasmamembran der klonalen Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99 isolierten Proteine mittels Western-Blot

Die Proteine aus der Plasmamembran der klonalen Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99 wurden, wie in Kap. II.4.5 beschrieben, mit Biotin markiert und anschließend durch eine Präzipitation mit Streptavidin isoliert. In einem Western-Blot mit dem $\alpha 7$ -Antiserum konnte die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit nicht in der Fraktion der aus der Plasmamembran isolierten Proteine nachgewiesen werden (P). Da die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit mit einem relativen Molekulargewicht von 60 kDa im Überstand der Streptavidin-Präzipitation detektiert wurde (Überstand), konnte geschlossen werden, daß der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor in der klonalen Zelllinie R $\alpha 7L^+$ intrazellulär exprimiert wird. In untransfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen war das $\alpha 7$ nAChR-Protein nicht nachweisbar. Als relativer Größenvergleich wurde der in Kap. II.4.1.1 beschriebene Proteinmarkerstandard im SDS-Gel mitgeführt.

Da bei der Generierung der klonalen Zelllinien $R\alpha 7L^+$ möglicherweise zufällig auf Zellen mit einer intrazellulären Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren selektiert wurde, war auch die Lokalisation transient exprimierter $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenzanalysen mit dem GFP-Antiserum an transient mit der EGFP-gekoppelten cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit der Ratte transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen durchgeführt. Diese Methode wurde bereits in dieser Arbeit zur Lokalisation der membranständigen Expression funktionell heterolog exprimierbarer $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren an der Zelloberfläche von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen angewendet (Kap. III.1.2). In Abb. III.14 ist das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse mit dem GFP-Antiserum an HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen, die transient die EGFP-gekoppelte $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit der Ratte exprimieren, dargestellt. In den Zellen ist anhand der grünen Fluoreszenz die Expression des $\alpha 7$ -Fusionsproteins deutlich sichtbar (Abb. III.14 A.). Aufgrund des Ausbleibens der roten Fluoreszenz nach der indirekten Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich jedoch, daß das GFP-Antiserum sein Epitop nicht auf der extrazellulären Seite der Zellen erkennt (Abb. III.14 B.). Erst nach einer Behandlung der Zellen mit Triton X-100 kann der GFP-Antikörper in die Zellen eindringen und das grün fluoreszierende $\alpha 7$ -Fusionsprotein erkennen, was auf eine intrazelluläre Lokalisation der transient exprimierten $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit der Ratte schließen läßt. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen wurde die Lokalisation des humanen $\alpha 7$ nAChR-Proteins in transient transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen untersucht. In diesen Immunfluoreszenzanalysen erkannte das GFP-Antiserum sein Epitop auf dem humanen $\alpha 7$ -Fusionsprotein nicht an der Zelloberfläche der transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen (Abb. 14 E.), womit eine plasmamembranständige Expression humaner $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren ebenfalls auszuschließen war.

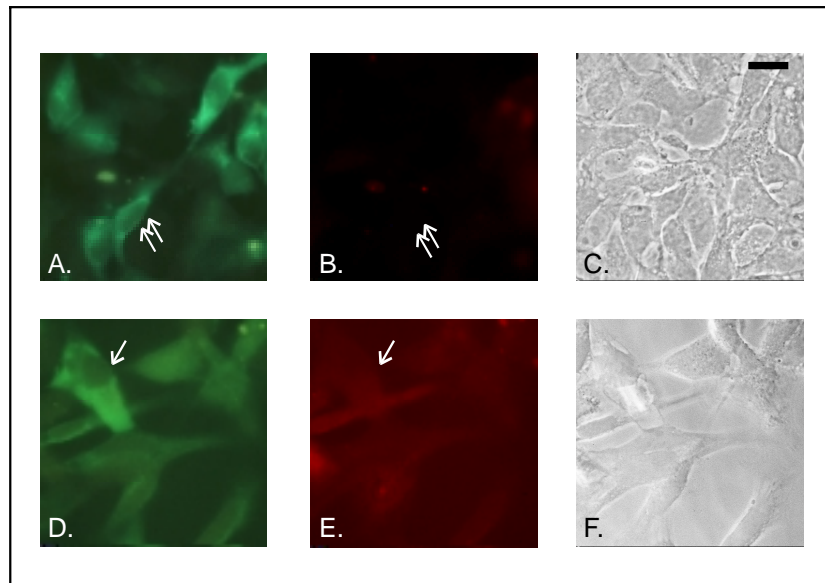


Abb. III.14: Lokalisation der EGFP-gekoppelten $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzanalysen

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen wurden mit der EGFP-gekoppelten cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit der Ratte (A., B., C.) oder des Menschen (D., E., F.) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden 48 – 60 h später mit 4 % PFA fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit dem GFP-Antiserum untersucht. Es ist jeweils die Eigenfluoreszenz der Fusionsproteine (A., D.), die indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit dem GFP-Antiserum (B., E.) und der Phasenkontrast (C., F.) der transfizierten Zellen dargestellt.

Die Expression der EGFP-gekoppelten nAChR-Untereinheit war anhand der leuchtend grünen Fluoreszenz bei beiden Transfektionen deutlich zu erkennen (A., D.). In den indirekten Immunfluoreszenzfärbungen erkennt das GFP-Antiserum jedoch sein Epitop auf der extrazellulären Seite der transfizierten Zellen nicht (B., E.). Für die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit sowohl der Ratte als auch des Menschen konnte somit eine Expression in der Plasmamembran nicht nachgewiesen werden. Bei beiden Transfektionen zeigen die Pfeile auf Zellen mit einer intrazellulären Expression des $\alpha 7$ -Fusionsproteins. Der Balken in C. entspricht 25 μM .

Durch die Immunfluoreszenzanalysen wurde eine intrazelluläre Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit nachgewiesen, unabhängig aus welcher Spezies diese isoliert wurde, so daß die fehlgeschlagene Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen auf einen fehlenden Transport zur Plasmamembran zurückgeführt werden konnte. Um eine funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren zu erreichen, wurden im folgende neue Expressionsansätze hinsichtlich der plasmamembranständigen Expression dieser Rezeptoren getestet.

2.8 Neue Ansätze zur Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

Für die heterologe Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen konnte bisher die Transkription einer korrekten $\alpha 7$ nAChR-mRNA (Kap. III.2.4) als auch die Translation des $\alpha 7$ nAChR-Proteins (Kap. III.2.5) sichergestellt werden. Weiterhin ließ sich eine Assemblierung der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheiten zu oligomeren Proteinkomplexen aus mindestens vier Untereinheiten nachweisen (Kap. III.2.6). Die exprimierten $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren werden jedoch unter den in unserem Labor etablierten Standardbedingungen nur im Zellinneren exprimiert (Kap. III.2.7). Für eine erfolgreiche Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen sollten nun Möglichkeiten gefunden werden, den Transport der $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in die Plasmamembran zu erreichen.

Koexpression von Calnexin. Die Expression des muskulären nACh-Rezeptors in der Plasmamembran von HEK-293-Zellen konnte von Chang und seinen Mitarbeitern (1997) durch eine Kotransfektion mit Calnexin verdoppelt werden. Calnexin ist ein im Endoplasmatischen Reticulum exprimiertes Transmembranprotein, das die Faltung und die Assemblierung von oligomeren Glycoproteinen erleichtert (Vassilakos et al., 1996; Herbert et al., 1996). Bei einer Überexpression zumindest des muskulären nACh-Rezeptors in HEK-293-Zellen scheint somit die vorhandene Menge an Calnexin ein limitierender Punkt zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb analog die klonale Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99 transient mit der für humanes Calnexin kodierenden cDNA (AC M94859) transfiziert. Diese cDNA wurde mir dafür freundlicherweise von Dr. B. Honore vom Institut für medizinische Biochemie, Universität Aarhus, zur Verfügung gestellt. Für die Transfektion wurde die erhaltene Calnexin cDNA in den Expressionsvektor pCDNA3 umklontiert.

Nach der Überexpression von Calnexin zeigte sich in den Calcium-Imaging-Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 das gleiche Ergebnis wie bei den Zellen der untransfizierten klonalen Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99. Nach Applikation von Nikotin in verschiedenen Konzentrationen (10-100 μM) konnten keine Calcium-Einströme in die Zellen gemessen werden. Im Gegensatz dazu erfolgte nach Depolarisation der Plasmamembran ein starker Calcium-Einstrom in die Zellen, was die Expression spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle in der klonalen Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99 beweist. Um das Öffnen der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle schon bei geringer Depolarisation der Plasmamembran durch nACh-Rezeptoren zu erleichtern, wurde die Plasmamembran durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM auf 10 mM vordepolarisiert. In Calcium-Imaging-Experimenten unter optimierten Meßbedingungen konnte jedoch kein Calcium-Einstrom durch Nikotin-Applikation in die Calnexin-überexprimierende Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99 erzeugt werden, so daß die Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren auch bei einer Calnexin-Überexpression in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen auszu-schließen war.

Temperaturabhängigkeit der Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren. In Folge einer Expressionsphase bei 30°C, ist in der Literatur eine um das fünffache erhöhte Expression von $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren in der Plasmamembran von HEK-293-Zellen beschrieben (Cooper S.T. et al., 1999).

Um die stabile klonale Zelllinie R $\alpha 7L^+/99$ ebenfalls unter den veränderten Kulturbedingungen hinsichtlich der Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren zu testen, wurden Calcium-Imaging-Analysen an der für 30 h bei 30°C kultivierten Zelllinie durchgeführt. Nach Stimulation mit Nikotin (10 oder 100 μM) war kein Calcium-Einstrom mittels Calcium-Imaging mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 nachzuweisen. Auch eine Optimierung der experimentellen Bedingungen der Calcium-Imaging-Methode, wie beim Screening der klonalen Zelllinien bereits beschrieben (Kap. III.2.2), führten nicht zu einem erfolgreichen Nachweis funktionell exprimierter $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in der klonalen Zelllinie R $\alpha 7L^+/99$, so daß eine funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren auch bei tieferen Expressionstemperaturen auszuschließen war.

Nach transients Transfektion der HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mit der EGFP-gekoppelten cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit wurde in analoger Weise die Temperatur während der Kultivierung der Zellen für einen Zeitraum von 30 h auf 30°C erniedrigt. Die transienten HEK-293/ $\alpha 1$ -Transfektanten wurden anschließend in indirekten Immunfluoreszenzanalysen mit dem GFP-Antiserum untersucht.

Nach einer Kultivierung der $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen bei 30°C zeigte sich das gleiche Ergebnis wie bei konstanter Kultivierung unter Standardbedingungen bei 37°C. Die Expression des $\alpha 7$ -Fusionsprotein war anhand der grünen Fluoreszenz auch bei einer Kultivierung der transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen bei 30°C deutlich zu erkennen. Durch indirekte Immunfluoreszenz mit dem GFP-Antiserum ließ sich die EGFP-gekoppelte $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit jedoch nur intrazellulär lokalisieren. Eine Verbesserung des Transports zur Plasmamembran bei einer Expressionstemperatur von 30°C konnte somit für die Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen nicht nachvollzogen werden.

Koexpression anderer nAChR-Untereinheiten. Die heterologe Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in Oocyten zeigte, daß diese Untereinheit zu funktionellen homomeren Rezeptoren assembliert, die in charakteristischer Weise durch α -Btx in nanomolaren Konzentrationen blockiert werden können (Couturier et al., 1990). Später Untersuchungen an sympathischen Neuronen des Hühnchens gaben jedoch auch Hinweise auf eine Assemblierung der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit mit anderen α - (insbesondere $\alpha 5$) sowie β -Untereinheiten des nACh-Rezeptors zu funktionellen, heteromeren Kanälen (Yu and Role, 1998 a, b). Des weiteren könnten andere nAChR-Untereinheiten als Faltungshelfer für die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit dienen und somit die Assemblierung und den Transport von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren zur Plasmamembran erleichtern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb folgende Kombinationen an cDNAs der nAChR-Untereinheiten transient in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen transfiziert:

- H α 7/pEGFP + H β 2/pCDNA3
- H α 7/pEGFP + H β 3/pCDNA3
- H α 7/pEGFP + H β 4/pCDNA3
- H α 7/pEGFP + H α 5/pCDNA3
- H α 7/pEGFP + H α 5/pCDNA3 + H β 2/pCDNA3
- H α 7/pEGFP + H α 5/pCDNA3 + H β 4/pCDNA3

Da bei jeder dieser Transfektionen die α 7 nAChR-Untereinheit C-terminal mit dem EGFP-Protein fusioniert war, konnte anschließend die Expression des Fusionsproteins anhand seiner Fluoreszenz sowie die Lokalisation der α 7 nAChR-Untereinheit durch indirekte Immunfluoreszenz mit dem GFP-Antiserum analysiert werden. In Vorexperimenten wurde sicher gestellt, daß die α 5, β 2, β 3 und β 4 nAChR-Untereinheiten weder alleine noch in Kombination miteinander in der Plasmamembran von HEK-293/ α 1-Zellen exprimiert werden.

Die Expression der α 7 nAChR-Untereinheit zusammen mit anderen nAChR-Untereinheiten unterschied sich in keinerlei Hinsicht von der Expression der α 7 nAChR-Untereinheit alleine in HEK-293/ α 1-Zellen. Anhand der grünen Fluoreszenz war die Expression des α 7 nAChR-Fusionsproteins auch in Gegenwart anderer nAChR-Untereinheiten deutlich zu erkennen. Dennoch ließ sich die EGFP-gekoppelte α 7 nAChR-Untereinheit nicht mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem GFP-Antiserum in der Plasmamembran der HEK-293/ α 1-Zellen lokalisieren, so daß ein Transport zur Plasmamembran auch in Gegenwart weiterer nAChR-Untereinheiten nicht erzielt wurde.

Expression von α 7 nACh-Rezeptoren in Gegenwart nikotinischer Antagonisten.

Homomere α 7 nACh-Rezeptoren zeichnen sich gegenüber heteromeren nACh-Rezeptoren insbesondere durch ihre hohe Calcium-Permeabilität aus (Seguela et al., 1993). Bei der Kultivierung α 7 nACh-Rezeptoren exprimierender Zellen würde eine Aktivierung der α 7 nACh-Rezeptoren durch eine Komponente des Kulturmediums zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führen. Ein solcher Bestandteil von Kulturmedien könnte Cholin sein (DMEM-Medium (Gibco): 28,6 μ M; FCS: unbekannt), dessen agonistische Wirkung auf α 7 nACh-Rezeptoren bereits nachgewiesen wurde ($EC_{50}(\text{Cholin}) = 1 \text{ mM}$; Albuquerque et al., 1997). Da eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration über einen längeren Zeitraum zum Tod einer Zelle führt (Calpham, 1995), würden Zellen sicherlich absterben, die dauerhaft aktivierte α 7 nACh-Rezeptoren in ihrer Plasmamembran überexprimieren. Infolgedessen würden für Immunfluoreszenzanalysen und bei der Selektion von klonalen Zelllinien nur Zellen überleben, die α 7 nACh-Rezeptoren nicht-funktionell in der Plasmamembran oder intrazellulär exprimieren.

Aus diesem Grund wurden transiente Transfektionen von HEK-293/ α 1-Zellen mit der cDNA der α 7 nAChR-Untereinheit in Gegenwart der nikotinischen Antagonisten Hexamethonium (100 μ M) bzw. MLA (100 nM) durchgeführt, um einer Dauerstimulation der in den Zellen überexprimierten α 7 nACh-Rezeptoren vorzubeugen. Die Antagonisten wurden jeweils in Konzentrationen oberhalb ihres IC_{50} -Werts eingesetzt, wodurch eine vollständige Blockierung

der an der Zelloberfläche exprimierten $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren gewährleistet war. Die Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in Gegenwart nikotinischer Antagonisten wurde anhand von Bindungsanalysen mit FITC-markiertem α -Btx untersucht. Vor der Inkubation mit fluoreszierendem α -Btx wurden die transfizierten Zellen in mehreren Waschschrritten mit 1xPBS gewaschen, um aus dem Kulturmedium gebundene MLA- oder Hexamethonium-Moleküle von den Rezeptoren vollständig zu entfernen. Während der Waschschrritte konnten die an der Zelloberfläche exprimierten $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren aus dem desensibilisierten in den aktivierbaren Zustand übergehen, womit eine Bindung von α -Btx an diese Rezeptoren erst möglich war.

Nach transienten Transfektionen von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mit cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in Gegenwart der nikotinischen Antagonisten konnte keine Bindung von FITC-markiertem α -Btx nachgewiesen werden, was eine plasmamembranständige Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren auch unter dem Einfluß der Antagonisten ausschließt.

Die klonale Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99 zeigte ebenfalls keine Bindung von FITC-markiertem α -Btx nach einer Kultivierung für 72 h mit Hexamethonium (100 μ M) bzw. MLA (100 nM). Eine Kultivierung mit nikotinischen Antagonisten bewirkte somit auch in der klonalen Zelllinie R $\alpha 7L^+$ eine funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren. Eine cytotoxische Wirkung des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors aufgrund einer Daueraktivierung des Rezeptors konnte somit nicht für die fehlgeschlagenen Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen verantwortlich sein.

Auf der Basis der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, daß in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen trotz einer ausreichend starken Translation das $\alpha 7$ nAChR-Protein nicht in die Plasmamembran der Zellen transportiert wird, sondern vielmehr im Inneren der Zellen verbleibt. Dieses Ergebnis spricht möglicherweise dafür, daß die Säugerzelllinie HEK-293/ $\alpha 1$ nicht über die entsprechende zelluläre Maschinerie verfügt, die für eine funktionelle Modifikation und für eine Etablierung des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in der Plasmamembran notwendig ist. Es wurden deshalb Zelllinien aus anderen Geweben hinsichtlich ihrer Fähigkeit einer funktionellen Expression des homomeren $\alpha 7$ nACh-Rezeptors untersucht.

2.9 Versuche zur Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien

Um auszuschließen, daß HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen zufällig wichtige zelluläre Voraussetzungen für eine erfolgreiche Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren fehlen, wurden die Zelllinien S2, QT6, GH4C1, und PCC7-Mz1 hinsichtlich der Expression dieses nAChR-Subtyps untersucht. Mit der S2-Zelllinie aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und Expressionsvektor pMT/V5-His (Invitrogen) stand ein Expressionssystem zur Verfügung, in dem eine zeitlich kontrollierte Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren möglich war. Somit konnten cytotoxische

Effekte, die aufgrund der Überexpression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors entstehen könnten, kurzen Zeitraum von ca. 12-18 h begrenzt werden.

Die Embryonalkarzinomzelllinie PCC7-Mz1 aus der Maus ist eine neurale Zelllinie, deren Stammzellen nach Induktion mit all-trans Retinsäure (RA) in Neurone, Fibroblasten, Astrogliazellen sowie Endothelzellen differenzieren. Im Gegensatz zu den übrigen ausgewählten Zelllinien exprimiert diese Zelllinie endogen $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren, weshalb die zellulären Voraussetzungen für die Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren vorhanden sein sollten. Zwar können funktionell exprimierte $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren erst ab Tag 6 des Differenzierungsverlaufs in PCC7-Mz1-Zellen mittels Calcium-Imaging und patch-clamp-Analysen nachgewiesen werden (Dissertation S. Xia), die zellulären Voraussetzungen für eine funktionelle Expression dieses nAChR-Subtyps könnten jedoch konstitutiv und somit auch schon in den Stammzellen vorhanden sein.

Während diese Arbeit entstand wurde in der Literatur von der Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in QT6-Fibroblasten aus der Wachtel (Kassner und Berg, 1997) sowie in GH4C1-Zellen, einer Karzinomzelllinie aus der Hypophyse der Ratte (Quik et al., 1996), berichtet. Deshalb wurden diese Zelllinien auch in dieser Arbeit für die Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors ausgewählt.

2.9.1 Vergleich der Transfektionseffizienz in den Zelllinien HEK-293/ $\alpha 1$, S2, QT6, GH4C1 sowie PCC7-Mz1

Für die beabsichtigten Transfektionen der verschiedenen Zelllinien (S2, QT6, GH4C1, PCC7-Mz1 und HEK-293/ $\alpha 1$) war es zunächst notwendig, eine ausreichend hohe Transfektionseffizienz mittels Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode sowie eine Expression der verwendeten Vektoren in diesen Zellen sicherzustellen.

Dazu wurden die jeweiligen Zelllinien auf Deckgläschen ausgesät und mit der EGFP-Sequenz unter der Kontrolle des Metallothionein-Promotors bei S2-Zellen bzw. des CMV-Promotors bei allen übrigen Zelllinien transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion konnte anhand der grünen Fluoreszenz bestimmt werden, wie viele Zellen die transfizierte DNA tatsächlich aufgenommen hatten und nun EGFP exprimierten.

Bei allen getesteten Zelllinien erwies sich die Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode als geeignet, DNA in die Zellen einzubringen (Abb. III.15). Des Weiteren konnte in den verschiedenen Zelllinien anhand der Expression von EGFP die Aktivität des verwendeten Promotors nachgewiesen werden. So ließen sich maximale Transfektionseffizienzen von 70 - 80 % in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen, von ca. 40 % in QT6-Zellen sowie von ca. 30 % in PCC7-Mz1-Stammzellen ermitteln. In den transient transfizierten S2-Zellen war die Expression von EGFP unter der Kontrolle des Metallothionein-Promotors durch Zugabe von CuSO_4 induzierbar. Während nur 5 % der nicht-induzierten Zellen EGFP exprimierten, war in 60 % der

induzierten S2-Zellen eine EGFP-Expression deutlich sichtbar. Somit konnten alle ausgewählten Zelllinien transfiziert werden, wobei HEK-293/ α 1-Zellen mit 80 % die höchste Transfektionseffizienz zeigten (Abb. III.15). Infolgedessen wurde im folgenden die Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode zur Transfektion der verschiedenen Zelllinien verwendet.

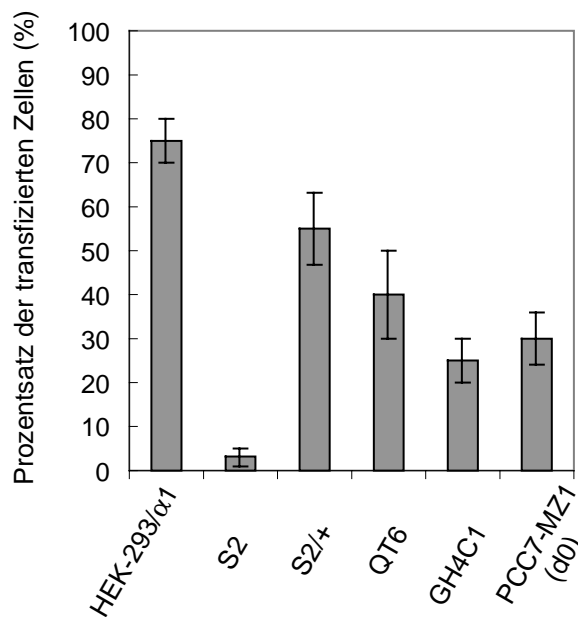


Abb. III.15: Anteil der EGFP exprimierenden Zellen nach einer Transfektion mittels Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode

Die Zelllinien HEK-293/ α 1, S2, QT6, GH4C1 sowie PCC7-Mz1 (Stammzellen) wurden mittels Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode transient mit der für EGFP-kodierenden cDNA transfiziert, wobei die Expression in S2-Zellen unter der Kontrolle des Metallothionein-Promotors durch Zugabe von CuSO_4 über Nacht induziert wurde (S2/+). Diese Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 4 % PFA fixiert. Anschließend konnte anhand der grünen Fluoreszenz das Verhältnis der EGFP-exprimierenden Zellen zur Gesamtzellzahl ermittelt werden. Alle Zelllinien waren mittels Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode transfizierbar, wobei HEK-293/ α 1-Zellen mit 80 % die höchste Transfektionseffizienz aufwiesen.

2.9.2 Transiente Expression des α 7 nACh-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien

Zur Lokalisation der α 7 nAChR-Untereinheit wurden die verschiedenen Zelllinien (S2, PCC7-Mz1, QT6, GH4C1) mit der C-terminal EGFP-gekoppelten cDNA der α 7 nAChR-Untereinheit der Ratte oder des Menschen transient transfiziert und 48 – 60 h später einer indirekten Immunfluoreszenz mit dem GFP-Antiserum unterzogen. Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnten funktionell exprimierte EGFP-gekoppelte α 3 β 4 nACh-Rezeptoren erfolgreich in der Plasmamembran von HEK-293/ α 1-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit dem GFP-Antiserum nachgewiesen werden (Kap. III.1.2), womit sich diese Methode als geeignet für die Lokalisation von nAChR-Untereinheiten erwies.

In Abbildung III.17 ist das typische Expressionsmuster der EGFP-gekoppelten $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in verschiedenen Zelllinien dargestellt. In CuSO_4 -induzierten S2-Zellen, GH4C1-Zellen sowie QT6-Fibroblasten ließ sich die Expression des grün fluoreszierenden $\alpha 7$ -Fusionsproteins nachweisen (Abb. III.17). Dennoch erkennt das GFP-Antiserum die EGFP-gekoppelte $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit nicht an der Zelloberfläche der verschiedenen Zelllinien, was auf eine intrazelluläre Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit schließen läßt. Somit exprimieren S2-, GH4C1- und QT6- Zellen, wie in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen bereits nachgewiesen (Kap. III.2.7), die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit im Zellinneren. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob für die Transfektionen die cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit der Ratte oder des Menschen verwendet wurde.

Nach der Transfektion mit der EGFP-gekoppelten cDNA der humanen $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit war überraschenderweise die grüne Fluoreszenz des $\alpha 7$ -Fusionsproteins in PCC7-Mz1-Stammzellen nicht zu erkennen (Abb. III.17). In diesen Zellen findet somit schon die Translation des $\alpha 7$ nAChR-Proteins nicht statt. Um die Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit auf dem Niveau der Transkription zu überprüfen, wurden PCC7-Mz1-Stammzellen transient mit der cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit transfiziert und in einem Northern-Blot mit der $\alpha 7$ -spezifischen Sonde analysiert. Als Kontrolle wurden ohne DNA transfizierte HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen und PCC7-Mz1-Stammzellen unter den gleichen Versuchsbedingungen mittels Northern-Blot untersucht. Dabei war keine Hybridisierung der $\alpha 7$ -spezifischen Sonde mit der isolierten RNA aus beiden Zelllinien nachweisbar (Abb. III.16), womit eine unspezifische Anlagerung der verwendeten Sonde ausgeschlossen werden konnte.

In transient transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen konnte das $\alpha 7$ nAChR-Transkript als Bande mit einer Länge von 2,3 kb nachgewiesen werden, so daß die im Northern-Blot verwendeten Bedingungen für eine Hybridisierung der $\alpha 7$ -spezifischen Sonde geeignet sein sollten (Abb. III.16).

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde bei transient transfizierten PCC7-Mz1 Stammzellen eine Hybridisierung der $\alpha 7$ -Sonde mit der isolierten RNA von der erwarteten Größe des $\alpha 7$ nAChR-Transkripts bis in den Bereich kleinerer Transkripte nachgewiesen, was möglicherweise auf einen Abbau der $\alpha 7$ nAChR mRNA in PCC7-Mz1-Stammzellen schließen läßt (Abb. III.16). Da die Transkription des ubiquitären Stoffwechsellzyms GAPDH in den gleichen Zellen eindeutig als Transkript mit der Länge von 1,4 kb nachgewiesen wurde (Abb. III.16), ist eine generelle Degradation der verwendeten RNA auszuschließen. Diese Ergebnisse zeigen, daß in PCC7-Mz1-Stammzellen die Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren bereits auf dem Niveau der Translation fehlschlug, da nach erfolgreicher Transfektion der Zellen die transkribierte $\alpha 7$ nAChR-mRNA in kleine Fragmente abgebaut wird.

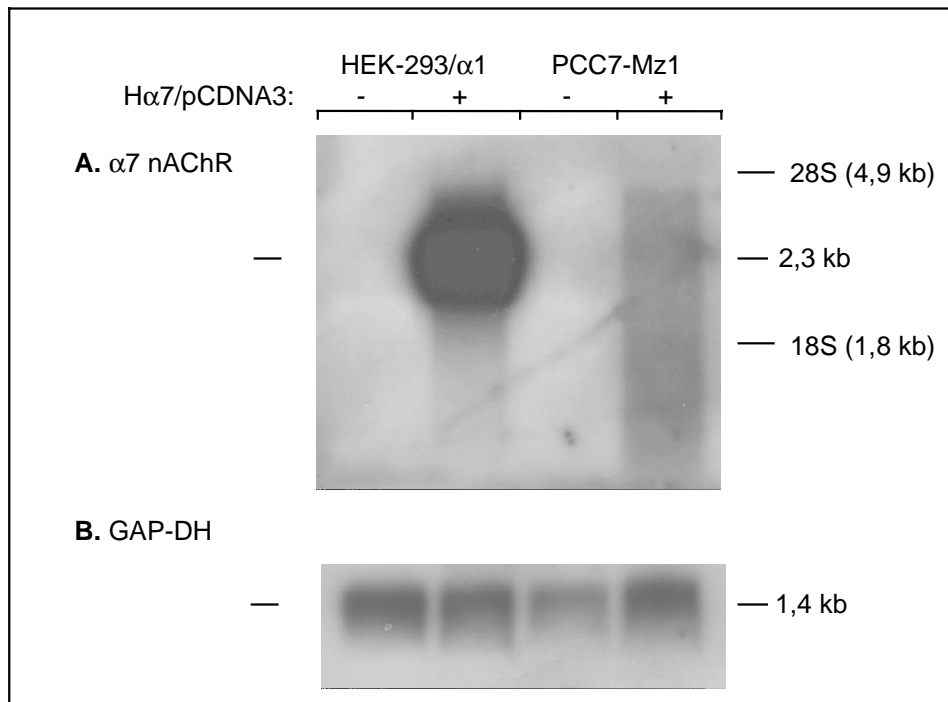


Abb. III.16: Nachweis der Transkription der $\alpha 7$ nAChR-mRNA in transient transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen und PCC7-Mz1-Stammzellen mittels Northern-Blot

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen und PCC7-Mz1-Stammzellen wurden transient mit der cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit (H $\alpha 7$ /pCDNA3) oder ohne DNA transfiziert. Aus diesen Zellen wurde 48 h nach der Transfektion die Gesamt-RNA isoliert und in Northern-Blot-Analysen mit einer $\alpha 7$ -spezifischen Sonde (A.) oder einer GAP-DH-spezifischen Sonde (B.) untersucht. Als Längenstandard wurden die beiden im RNA-Gel deutlich sichtbaren Banden der ribosomalen RNA auf den Northern-Blot übertragen.

In Northern-Blot-Analysen wurde keine Hybridisierung der $\alpha 7$ -spezifischen Sonde mit der RNA aus ohne DNA transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen bzw. PCC7-Mz1-Stammzellen nachgewiesen, was eine unspezifische Anlagerung der verwendeten Sonde ausschließt. Anhand einer 2,3 kb großen Bande ließ sich in transient transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen die Transkription einer $\alpha 7$ nAChR-mRNA sicherstellen. Die durchgeführten Northern-Blots sind somit für den Nachweis der $\alpha 7$ nAChR-Transkription geeignet. Unter den gleichen Versuchsbedingungen hybridisierte die $\alpha 7$ -spezifische Sonde mit der RNA aus transient transfizierten PCC7-Mz1 Stammzellen von der erwarteten Größe des $\alpha 7$ nAChR-Transkripts bis in den Bereich kleinerer Transkripte, was möglicherweise auf einen Abbau der $\alpha 7$ nAChR mRNA in PCC7-Mz1-Stammzellen schließen läßt. Die Transkription des Stoffwechsellenzym GAP-DH wurde als eindeutige Bande nachgewiesen, was eine allgemeine Degradation der verwendeten RNA ausschließt.

Aus Arbeiten von S. Xia in unserem Arbeitskreis ist bekannt, daß funktionelle $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren erst in differenzierten PCC7-Mz1-Zellen (d6) exprimiert werden (Dissertation S. Xia, 1998). Hingegen ließ sich die $\alpha 7$ nAChR-mRNA bereits an Tag 3 nach Induktion der neuronalen Differenzierung in PCC7-Mz1-Zellen durch quantitative PCR nachweisen (Dissertation K. Pohl). Die endogene Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in der Zelllinie PCC7-Mz1 ist somit vom neuronalen Differenzierungsgrad der Zellen abhängig. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit PCC7-Mz1-Zellen durch RA-Zugabe differenziert und gleichzeitig mit der GFP-gekoppelten cDNA der humanen $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit transient transfiziert. Die Expression des $\alpha 7$ -Fusionsproteins wurde 64 h nach der Transfektion, an Tag 4 der Zeldifferenzierung, in indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit dem GFP-Antiserum analysiert.

In Abbildung III.17 ist ein typisches Expressionsmuster der EGFP-gekoppelten $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in differenzierten PCC7-Mz1-Zellen (Tag 4) dargestellt. Im Gegensatz zu PCC7-Mz1-Stammzellen ist das grün fluoreszierende $\alpha 7$ -Fusionsproteins in den transfizierten PCC7-Mz1-Zellen an Tag 4 der Differenzierung deutlich sichtbar. Dennoch erkannte das GFP-Antiserum sein Epitop an derEGFP-gekoppelten $\alpha 7$ -Untereinheit nicht an der Zelloberfläche der transfizierten, differenzierten PCC7-Mz1-Zellen (Tag 4), was eine Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran der Zellen ausschließt. Es wäre jedoch denkbar, daß der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor noch zu einem späteren Zeitpunkt der Zelldifferenzierung in die Plasmamembran der Zellen transportiert wird. Da nach transienten Transfektionen die Expressionshöhe des transfizierten Gens jedoch nur in einem Zeitraum von ca. 72 h für Analysen ausreichend ist, sollte dies anhand einer stabil mit der cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit transfizierten PCC7-Mz1-Zellen überprüft werden. Nach einer stabilen Transfektion könnte die Überexpression von EGFP-gekoppelten $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren zu jedem beliebigen Zeitpunkt der neuronalen Differenzierung untersucht werden.

In den ausgewählten Zellsystemen schlug somit die heterologe Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren fehl. Hierfür wurde als Ursache ein fehlender Transport der exprimierten $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren von intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran nachgewiesen. In weiteren Experimenten müssen die Ursachen für die intrazelluläre Expression der $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren geklärt werden.

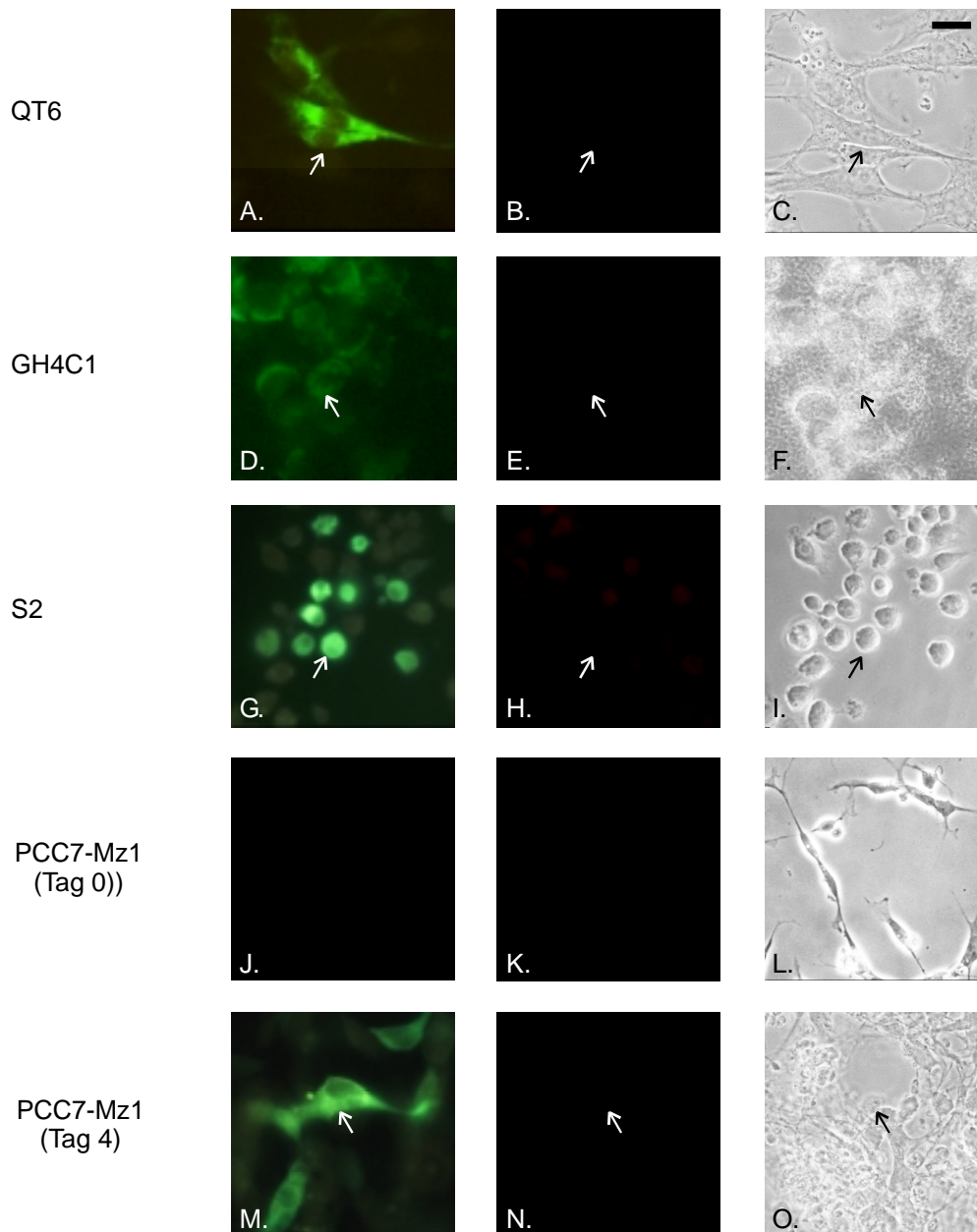


Abb. III.17: Transiente Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in QT6-, GH4C1-, S2- und PCC7-Mz1-Zellen

Die Zelllinien QT6 (A.-C.), GH4C1 (D.-F.), S2 (G.-I.) und PCC7-Mz1 (J.-O.) wurden mit H $\alpha 7$ /pEGFP transient transfiziert. Gleichzeitig mit der Transfektion wurde die neurale Differenzierung bei einigen PCC7-Mz1-Zellen durch RA-Zugabe induziert (M.-O.). In S2-Zellen wurde der verwendete Metallothionein-Promotor 20 h vor der Immunfluoreszenzanalyse durch Zugabe von CuSO₄ induziert. Es ist jeweils die grüne Fluoreszenz des $\alpha 7$ -Fusionsproteins (linkes Bild.), das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzanalysen mit dem GFP-Antiserum (mittleres Bild) sowie der Phasenkontrast (rechtes Bild) der transfizierten Zellen dargestellt. Die Expression des $\alpha 7$ -Fusionsproteins war in den Zelllinien QT6, GH4C1 sowie S2 anhand der grünen Fluoreszenz deutlich zu erkennen. In indirekten Immunfluoreszenzfärbungen mit dem GFP-Antiserum konnte das exprimierte $\alpha 7$ -Fusionsprotein allerdings nicht in der Plasmamembran lokalisiert werden. Die Überexpression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in PCC7-Mz1-Zellen wurde vom Differenzierungsgrad der Zellen beeinflusst. Während in PCC7-Mz1-Stammzellen (Tag 0) bereits die Translation der EGFP-gekoppelten $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit fehlschlug (J.), konnte das $\alpha 7$ -Fusionsprotein in differenzierten PCC7-Mz1-Zellen (Tag 4) nachgewiesen werden (M.). Dennoch ließ sich auch in den differenzierten Zellen die EGFP-gekoppelte $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit mit dem GFP-Antikörper nur intrazellulär lokalisieren. Die Pfeile kennzeichnen Zellen mit intrazellulärer Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit. Der Balken in C. entspricht 25 μ m.

3 Ektopische Expression der humanen $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit als funktioneller Rezeptor

Auf RNA-Ebene wurde im Gehirn der Ratte eine auf wenige Bereiche begrenzte Expression der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit nachgewiesen. So wurde die $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit in der *Substantia nigra* zusammen mit den nAChR-Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 3$, im *Locus coeruleus* zusammen mit den nAChR-Untereinheiten $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ kolokalisiert (Tab. I.1; Le Novere et al., 1996). Die heterologe Expression von $\alpha 6$ enthaltenden nACh-Rezeptoren wurde bisher nur transient durchgeführt. In der Literatur sind erste Daten über eine funktionelle transiente Expression von heteromeren $\alpha 6\beta 2$ und $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren des Hühnchens in BOSC23-Zellen beschrieben (Fucile S. et al., 1998). Des Weiteren wurde in transienten Experimenten mit Frosch-Oocyten nachgewiesen, daß die humane $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit mit der humanen $\beta 2$ nAChR-Untereinheit überhaupt nicht und mit der humanen $\beta 4$ nAChR-Untereinheit nur ineffizient assembliert (Kuryatov et al., 2000).

In einer Säugerzelllinie wurden bislang humane $\alpha 6$ enthaltende nACh-Rezeptoren noch nicht funktionell exprimiert. In eigenen Versuchen war deshalb zunächst zu untersuchen, ob die humane $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit alleine bzw. in Kombination mit einer bekannten β nAChR-Untereinheit ($\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$) membranständige Rezeptoren an der Zelloberfläche von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen ausbildet.

3.1 Transiente Expression der humanen $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen wurden transient mit der cDNA der humanen $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit alleine oder in Kombination mit der cDNA der humanen $\beta 2$, $\beta 3$ oder $\beta 4$ nAChR-Untereinheit transfiziert, wobei jeweils die cDNA einer Untereinheit C-terminal mit der EGFP-Sequenz fusioniert war. Diese Zellen wurden 30 h nach der Transfektion einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit dem GFP-Antiserum unterzogen. In Abbildung III.18 sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen dieser Transfektionsansätze zusammengefaßt. Nach jeder Transfektion waren leuchtend grün fluoreszierende Zellen sichtbar, was auf eine starke Expression der jeweils EGFP-fusionierten Untereinheit [$\alpha 6$ (A.-I.), $\beta 4$ (J.-L.) und $\beta 3$ (M.-O.)] hinweist. Die grüne Fluoreszenz war jeweils in ca. 70 % der HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen zu beobachten, was für transiente Transfektionen aufgrund der unterschiedlichen DNA-Aufnahme durch die einzelnen Zellen gut ist. Nach der Transfektion der EGFP-gekoppelten $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit in Abwesenheit einer weiteren nAChR-Untereinheit (Abb. III.18 B.) oder in Kombination mit der $\beta 2$ nAChR-Untereinheit (Abb. III.18 E.) konnte der GFP-Antikörper sein Epitop auf der extrazellulären Seite der transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen nicht erkennen, was die funktionelle Expression homomerer $\alpha 6$ nACh-Rezeptoren bzw. heteromerer $\alpha 6\beta 2$ nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran dieser Zellen ausschließt. Das

gleiche Ergebnis ergab sich bei der Transfektion der EGFP-gekoppelten $\beta 3$ nAChR-Untereinheit mit der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit (Abb. III.18 N.). Die $\beta 3$ nAChR-Untereinheit wird somit in Gegenwart der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit im Zellinneren exprimiert, weshalb eine membranständige Expression von $\alpha 6\beta 3$ nACh-Rezeptoren an der Zelloberfläche von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen nicht möglich war.

Nach der Kotransfektion von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mit den cDNAs der nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ erkannte das GFP-Antiserum sein Epitop auf der extrazellulären Seite der transfizierten Zellen. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, welche der beiden transfizierten cDNAs mit EGFP fusioniert war (Abb. III.18 G.-L.). Weder die $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit (Abb. III.18 B.) noch die $\beta 4$ nAChR-Untereinheit (Kap. III.1.2) wird in Abwesenheit einer weiteren Untereinheit des nACh-Rezeptors in die Plasmamembran von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen transportiert. Infolgedessen ergibt sich aus den beiden Immunfluoreszenzfärbungen in Abbildung III.18 H. und K., daß in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen bei einer Koexpression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ beide Untereinheiten in die Plasmamembran lokalisiert sind.

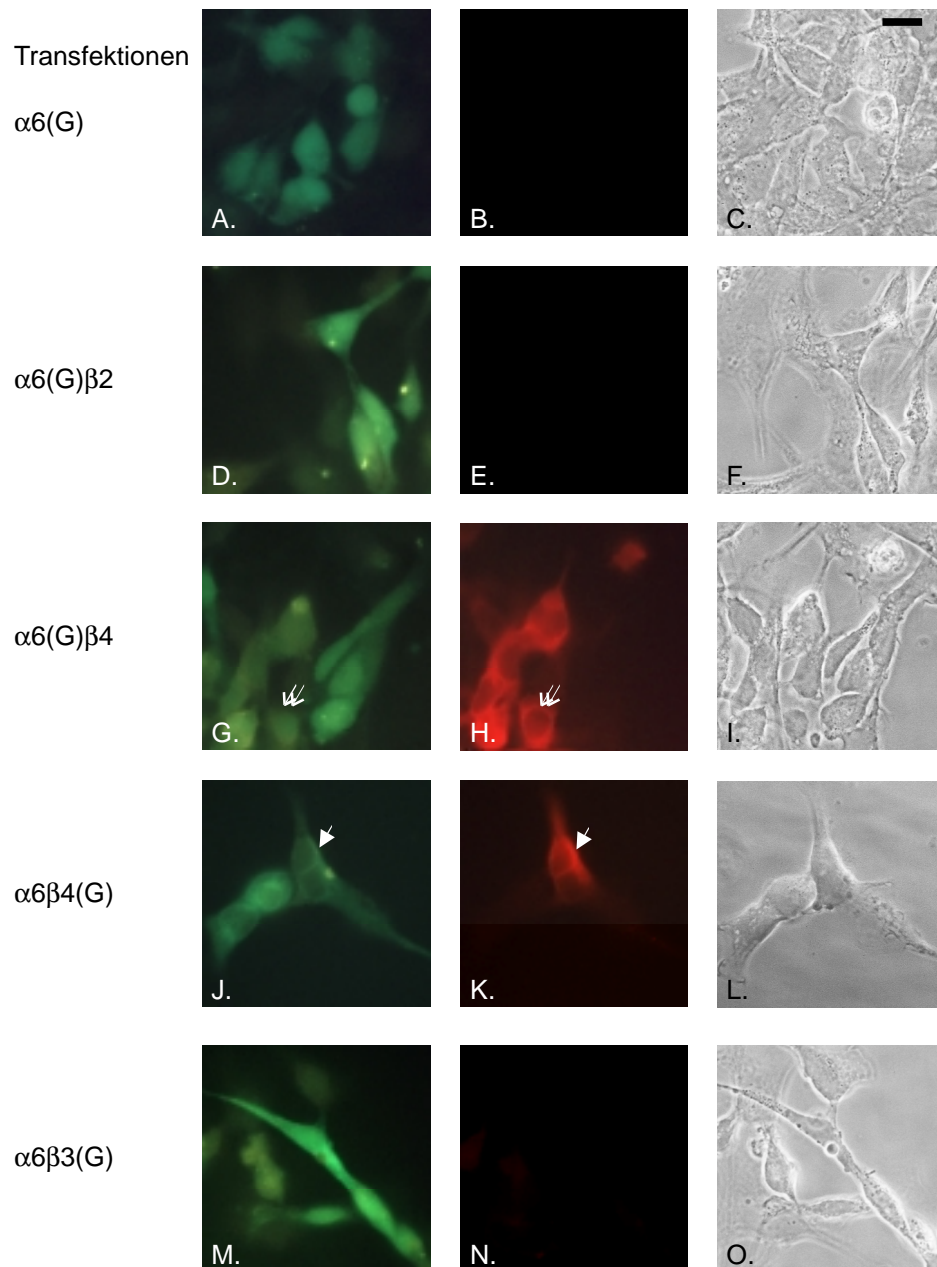


Abb. III.18: Transiente Expression der humanen $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen wurden mit der cDNA der humanen $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit alleine (A.-C.) oder in Kombination mit einer der bekannten β nAChR-Untereinheiten [$\beta 2$ (D.-F.), $\beta 3$ (M.-O.) oder $\beta 4$ (G.-L.)] transient transfiziert. Bei den verschiedenen Koftransfektionen war jeweils die mit (G) gekennzeichnete Untereinheit C-terminal mit EGFP fusioniert. Nach einer Expressionszeit von 48 h wurden die transienten Transfektanten einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit dem GFP-Antiserum, wie in Kap. II.3.5 beschrieben, unterzogen. Für jeden Transfektionsansatz ist die EGFP-Eigenfluoreszenz (links), das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzanalyse (Mitte) sowie der Phasenkontrast (rechts) dargestellt.

Nach jeder Transfektion ist die Expression des grün fluoreszierenden EGFP- Fusionsproteins zu erkennen (A., D., G., J., M.). In den indirekten Immunfluoreszenzfärbungen erkennt das GFP-Antiserum jedoch nur bei einer Koexpression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ sein Epitop auf der extrazellulären Seite der transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen (H., K.), was auf eine plasmamembranständige Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren schließen lässt. Die humane $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit (B.) und $\beta 4$ nAChR-Untereinheit (Kap. III.1.2) werden ohne weitere nAChR-Untereinheit intrazellulär exprimiert. Koexpressionen der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit mit der $\beta 2$ - oder $\beta 3$ -Untereinheit führten ebenfalls nur zu einer intrazellulären Expression des jeweiligen Rezeptors (E., N.). Die Pfeile zeigen auf Zellen mit einer membranständigen Expression. Der Balken in C. entspricht 25 μm .

3.2 Stabile Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren und EGFP-gekoppelten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, konnte eine membranständige Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren an der Zelloberfläche transfizierter HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen nachgewiesen werden (Kap. III.3.1). Die Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften eines transient exprimierten Rezeptors kann sehr zeit- und arbeitsaufwendig sein, da die einzelnen Zellen sich in der Expressionshöhe des transfizierten Gens unterscheiden. Um unter standardisierten Bedingungen mit einer höheren Reproduzierbarkeit unterschiedliche Analysen durchführen zu können, war eine klonale HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinie mit einer stabilen Expression funktioneller $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren herzustellen. Als Kontrolle wurde analog eine klonale HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinie mit einer stabilen Expression EGFP-gekoppelter $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren etabliert, um die Effizienz der durchgeführten Transfektion und des Selektionsprozesses verfolgen zu können.

Bei Generierung stabil $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierender Zelllinien lagen beide nAChR-Untereinheiten in den Expressionsvektor pcDNA3 vor. Für die stabile Expression EGFP-gekoppelter $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren wurden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mit der cDNA der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit im Expressionsvektor pcDNA3 und mit der cDNA der $\beta 4$ nAChR-Untereinheit im Expressionsvektor pEGFP-N3 transfiziert. Die verwendeten Expressionsvektoren verfügen beide zur Selektion positiver Transfektanten über ein Genitocinresistenzgen. Da HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen, wie bereits erwähnt, aufgrund ihrer stabilen Transfektion mit L-Typ Calcium-Kanälen bereits eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum aufweisen (Kleppisch et al., 1994), wurde bei den stabilen Transfektionen jeweils zusätzlich ein Puromycinresistenzgen mit dem Vektor pBTKpac kotransfiziert. Die stabilen Transfektionen wurden, wie in Kapitel II.3.3 beschrieben, durchgeführt. Nach einem Zeitraum von drei Wochen in Gegenwart von Genitocin und Puromycin konnten 54 doppel-resistente klonale Zelllinien für den $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor ohne EGFP-Fusion isoliert werden, die im folgenden als $H\alpha 6\beta 4L^+/1-24$ bezeichnet werden. Des Weiteren wurden 24 Antibiotika-resistente klonale Zelllinien, im folgenden $H\alpha 6\beta 4(G)L^+/1-24$ genannt, für den an der β -Untereinheit EGFP-gekoppelten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor erhalten. Diese wurden expandiert und anschließend hinsichtlich ihrer Expression von nACh-Rezeptoren getestet.

3.3 Nachweis der stabilen Expression von nACh-Rezeptoren in den klonalen Zelllinien $H\alpha6\beta4L^+$ und $H\alpha6\beta4(G)L^+$

3.3.1 Screening der klonalen Zelllinien $H\alpha6\beta4(G)L^+$

Die Antibiotika-resistente klonale Zelllinien $H\alpha6\beta4(G)L^+/1-24$ wurden auf Deckgläschen ausplattiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich der Expression der grün fluoreszierenden EGFP-gekoppelten $\beta4$ nAChR-Untereinheit untersucht. Dabei zeigten 18 der 24 isolierten klonalen Zelllinien keinerlei Fluoreszenz, was eine Expression der EGFP-gekoppelte $\beta4$ nAChR-Untereinheit in diesen Zellen ausschließt.

In den verbleibenden sechs klonalen Zelllinien war die grüne Fluoreszenz der EGFP-gekoppelten $\beta4$ nAChR-Untereinheit unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich zu erkennen, wobei das Fusionsprotein nur in der klonalen Zelllinie $H\alpha6\beta4(G)L^+/1$ über einen längeren Zeitraum von 20 Zellpassagen in allen Zellen stabil exprimiert wurde. In indirekte Immunfluoreszenzfärbungen erkannte der GFP-Antikörper sein Epitop auf der extrazellulären Seite dieser Zelllinie, was auf eine plasmamembranständige Expression der $\beta4$ nAChR-Untereinheit schließen läßt. Neben Immunfluoreszenzanalysen wurde die Membranständigkeit anhand von Biotinylierungsexperimenten abgesichert. Durch Biotinylierung und anschließende Präzipitation mit Agarose-gekoppeltem Streptavidin konnte die EGFP-gekoppelte $\beta4$ nAChR-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 90 kDa anhand eines Western-Blots mit dem GFP-Antiserum in der Fraktion der Plasmamembran-lokalisierten Proteine nachgewiesen werden (Abb. III.19 B.).

Da die $\beta4$ nAChR-Untereinheit ohne weitere nAChR-Untereinheiten in HEK-293/ $\alpha1$ -Zellen intrazellulär exprimiert wird (Kap. III.1.2), muß diese klonale Zelllinie mit einer membranständigen Expression der $\beta4$ nAChR-Untereinheit auch die $\alpha6$ nAChR-Untereinheit in ihrer Plasmamembran exprimieren. Das Vorhandensein beider Untereinheiten wurde durch RT-PCR-Analysen zusätzlich bestätigt (Abb. III.19 A.).

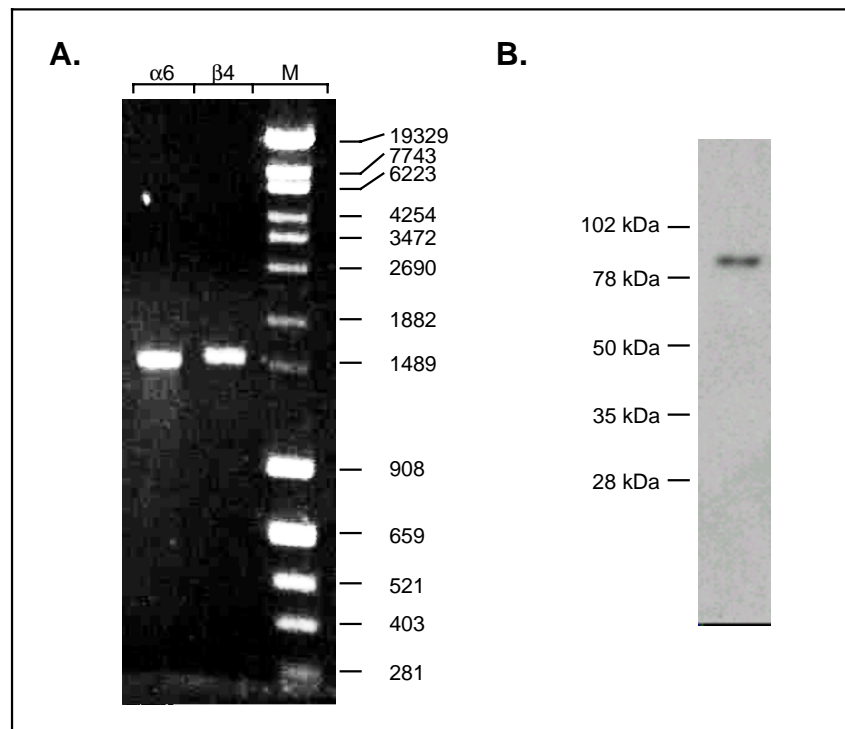


Abb III.19: Charakterisierung der nAChR-Expression in der klonalen Zelllinie H α 6 β 4(G)L^{+/1}

- A: In den Zellen der Zelllinie H α 6 β 4(G)L^{+/1} konnte durch eine RT-PCR mit Isoform-spezifischen Primern die Expression der nAChR-Untereinheiten α 6 und β 4 anhand eines 1,5 kb-Amplifikats nachgewiesen werden. Als Längenstandard diente dabei ein λ -Styl1/pBr322-AluI-Marker, der in einer Spur (M) zeitgleich aufgetrennt wurde.
- B: Durch Biotinylierung und anschließende Präzipitation mit Agarose-gekoppeltem Streptavidin konnte gezeigt werden, daß α 6 β 4 nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran der klonalen Zelllinie H α 6 β 4(G)L^{+/1} exprimiert werden. Zur relativen Molekulargewichtsbestimmung diente der in Kap. II.4.1.1 beschriebene Proteinmarkerstandard.

3.3.2 Screening der klonalen Zelllinien H α 6 β 4L⁺

33 der 54 doppelt-resistenten klonalen Zelllinien H α 6 β 4L⁺, die mit den cDNAs der nAChR-Untereinheiten α 6 und β 4 transfiziert worden waren (Kap. III.3.2), wurden auf RNA-Ebene mittels RT-PCR hinsichtlich ihrer Expression an nAChR-Untereinheiten untersucht. Die RT-PCR-Analysen wurden wie in Kapitel II.2.3 beschrieben durchgeführt. In der PCR wurden isoform-spezifische Primer verwendet, die jeweils die kodierende Region der Gene von ca. 1,5 kb amplifizieren.

Das ubiquitäre Stoffwechsel-Enzym GAP-DH konnte als Standard für eine vergleichbare RNA-Isolation bzw. RT-Reaktionen in allen klonalen Zelllinien gleichermaßen nachgewiesen werden (Abb. III.20). Bei untransfizierten HEK-293/ α 1-Zellen, die keine nACh-Rezeptoren exprimieren (Wong et al., 1995), war in den RT-PCR-Analysen mit den α 6- bzw. β 4-spezifischen Primern keine Bande zu erkennen, was eine unspezifische Anlagerung der verwendeten Primer unter den gewählten Versuchsbedingungen ausschließt (Abb. III.20). Die RT-PCR-Analysen sind unter den etablierten Bedingungen somit zum Nachweis heterolog exprimierter α 6- und β 4-Untereinheiten in HEK-293/ α 1-Zellen geeignet.

In insgesamt 5 der 33 getesteten klonalen Zelllinien $H\alpha 6\beta 4L^+$ konnte weder die Expression der $\alpha 6$ - noch der $\beta 4$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Ihre Fähigkeit in Gegenwart von Puromycin wachsen zu können, müssen diese Zellen spontan oder durch die Aufnahme ausschließlich des Puromycinresistenz-Expressionsvektors erworben haben. Gegenüber Geneticin waren bereits die zur Transfektion verwendeten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen resistent.

12 der verbleibenden klonalen Zelllinien wiesen nur die $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit (z.B. $H\alpha 6\beta 4L^+/7$, Abb. III.20), sechs nur die $\beta 4$ nAChR-Untereinheit (z.B. $H\alpha 6\beta 4L^+/21$, Abb. III.20) auf. Diese Zellen können unter Antibiotikadruck wachsen, da sie gleichzeitig den Expressionsvektor mit der nAChR-Untereinheit und den Puromycinresistenz-Expressionsvektor aufgenommen haben.

Die RT-PCR-Analyse von 10 der 33 klonalen Zelllinien bestätigte die Expression sowohl der $\alpha 6$ - als auch der $\beta 4$ -Untereinheit in den Zellen. Die Länge der amplifizierten Produkte entsprach der erwarteten Länge für die kodierende Region des jeweiligen nAChR-Gens von 1,5 kb. Die Identität der amplifizierten PCR-Produkte als nAChR-Untereinheit $\alpha 6$ oder $\beta 4$ wurde anhand von Restriktionsanalysen mit Endonukleasen überprüft.

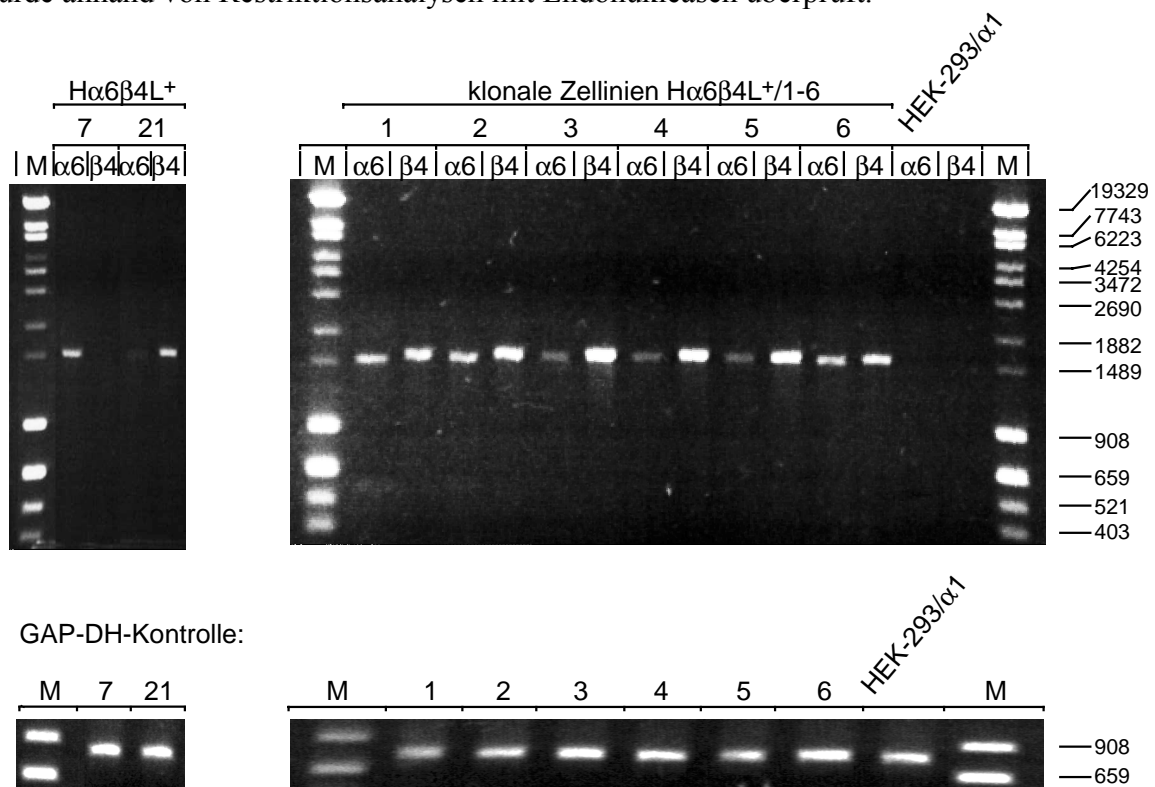


Abb. III.20: RT-PCR-Analysen an den klonalen Zelllinien $H\alpha 6\beta 4L^+$

Durch RT-PCR-Analysen wurde die Expression der nAChR-Untereinheit $\alpha 6$ sowie $\beta 4$ in den klonalen Zelllinien $H\alpha 6\beta 4L^+$ untersucht. Dabei wurde in der PCR-Reaktion mit Isoform-spezifischen Primern jeweils ein 1,5 kb-Fragment amplifiziert. Als Längenstandard diente ein λ -Sty1/pBr322-AluI-Marker, der im Gel mitgeführt wurde (Spur M). Das ubiquitäre Stoffwechsel-Enzym GAP-DH konnte als Kontrolle in allen Zelllinien als 900 bp-Amplifikat gleichermaßen nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Expression der nAChR-Untereinheiten unterschieden sich diese klonalen Zelllinien. Beispielsweise konnte für die Zelllinien $H\alpha 6\beta 4L^+/7$ nur die Expression der $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit bzw. für die klonale Zelllinie $H\alpha 6\beta 4L^+/21$ nur die Expression der $\beta 4$ nAChR-Untereinheit detektiert werden. Die sechs Zelllinien $H\alpha 6\beta 4L^+/1-6$ exprimieren sowohl die $\alpha 6$ - als auch die $\beta 4$ -Untereinheit.

Da über einen Zeitraum von 20 Passagen 4 der 10 klonalen Zelllinien entweder eine oder beide nAChR-Untereinheiten verloren, wurden nur die verbleibenden sechs klonalen Zelllinien ($H\alpha 6\beta 4L^+/1-6$) weiterführenden Funktionsanalysen unterzogen, die im folgenden Kapitel beschrieben werden.

3.4 Calcium-Imaging-Analysen an stabil $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK 293/ $\alpha 1$ -Zellen

Nachdem die Transkription der nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ in sechs klonalen HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinien ($H\alpha 6\beta 4L^+/1-6$) erfolgreich mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte, war nun zu klären, ob diese beiden Untereinheiten funktionelle nAChR-Kanäle ausbilden. Zu diesem Zweck wurden diese Zelllinien auf Fibronektin-beschichteten Deckgläschen ausgesät, 48 - 60 h später mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen und anschließend mittels Calcium-Imaging analysiert.

Da nach Applikation von 100 μM Nikotin keine Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration in den klonalen Zelllinien $H\alpha 6\beta 4L^+/1-6$ detektiert werden konnte, wurden die Meßbedingungen, wie in Tabelle III.2 zusammengefaßt, variiert.

Tab. III.2: Variation der Versuchsbedingungen in Calcium-Imaging-Analysen an stabil die nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinien

Versuche	Farbstoff	Agonisten (eingesetzte Konzentrationen)	$[Ca^{2+}]_a$	$[K^+]_a$	Ca^{2+} -Einstrom
1	Fura-2	Nikotin (300 μM , 100 μM , 10 μM)	2,5 mM	5 mM	-
2		Acetylcholin (100 μM , 10 μM) + Atropin (1 μM)			-
3		Epibatidin (1 μM , 500 nM, 100 nM, 50 nM)			-
4		Epibatidin (500 nM, 100 nM, 50 nM)	5 mM	5 mM	-
5			2,5 mM	15 mM	-
6	Fluo-3		2,5 mM	5 mM	-
7	Fluo-4				-

In den folgenden Experimenten wurden jeweils die sechs klonalen Zelllinien $H\alpha 6\beta 4L^+/1-6$ eingesetzt. Es zeigte sich, daß eine Applikation der nikotinischen Agonisten Nikotin (Versuchsmethode 1), Acetylcholin (Versuchsmethode 2) oder Epibatidin (Versuchsmethode 3) nicht zur Aktivierung von nACh-Rezeptoren in den sechs untersuchten Zelllinien führte. Ebenso wenig wie eine Steigerung des Calciumgradienten an der Plasmamembran durch eine

Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration von 2,5 mM auf 5 mM eine Stimulation von nACh-Rezeptoren in diesen Zellen durch Epibatidin bewirkte (Versuchsmethode 4). Des Weiteren ermöglichte auch eine Vordepolarisation der Plasmamembran bei einer extrazellulären Kalium-Konzentration von 15 mM (physiologische Konzentration: 5 mM K^+) keinen Epibatidin-induzierten Calcium-Einstrom bei den untersuchten Zelllinien (Versuchsmethode 5). Für eine Detektion von geringen Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration wurden die sechs klonalen Zelllinien mit den Calcium-sensitiven Farbstoffen Fluo-3 und Fluo-4 beladen, eine Applikation von Epibatidin löste jedoch auch dann keinen meßbaren Anstieg der Calcium-Konzentration aus (Versuchsmethoden 6 und 7).

Bei den durchgeführten Calcium-Imaging-Messungen konnte eine Expression der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle in den sechs klonalen Zelllinien $H\alpha6\beta4L^+/1-6$ durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration auf 60 mM nachgewiesen werden. Somit kann das Ausbleiben eines Calcium-Einstroms bei diesen Zellen nach Applikation nikotinischer Agonisten nicht auf einen fehlenden Verstärkereffekt durch die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle zurückgeführt werden. Vielmehr werden keine oder zu wenig $\alpha6\beta4$ nACh-Rezeptoren durch die applizierten Agonisten aktiviert, um die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle über eine Depolarisation der Plasmamembran zu stimulieren.

Da nach Aktivierung des nACh-Rezeptors hauptsächlich Natrium-Ionen durch den Ionenkanal ins Zellinnere fließen, wurde auch die Änderung der intrazellulären Natrium-Konzentration mittels Natrium-Imaging analysiert. Epibatidin-induzierte Natrium-Einströme konnten jedoch bei keiner der sechs klonalen Zelllinien $H\alpha6\beta4L^+/1-6$ detektiert werden.

Durch Immunfluoreszenzanalysen und Biotinylierungsexperimente konnte eine plasmamembranständige Expression von EGFP-gekoppelten $\alpha6\beta4$ nACh-Rezeptoren in der Zelllinie $H\alpha6\beta4(G)L^+/1$ eindeutig nachgewiesen werden (Kap. III.3.3.1). Deshalb wurde diese Zelllinie für Funktionalitätsanalysen mittels Calcium-Imaging mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 (Versuchsmethode 1-3) und Natrium-Imaging herangezogen. Nach Applikation von Nikotin oder Epibatidin war kein Calcium- oder Natrium-Einstrom in die Zellen der klonalen Zelllinie $H\alpha6\beta4(G)L^+/1$ nachweisbar. Eine Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulär 60 mM K^+) induzierte jedoch ebenfalls keinen Calcium-Einstrom bei dieser klonalen Zelllinie, was in diesen Zellen einen Verlust der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle beweist. Bei der Zelllinie $H\alpha6\beta4(G)L^+/1$ könnte somit das Ausbleiben eines Calcium-Einstroms nach Applikation nikotinischer Agonisten auf den fehlenden Verstärkereffekt durch die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle zurückgeführt werden. Der Nachweis funktionell exprimierter $\alpha6\beta4$ nACh-Rezeptoren war unabhängig von einer EGFP-Fusion in den isolierten klonalen Zelllinien zunächst unter den gewählten Expressionsparametern erfolglos. Im folgenden wurden deshalb neue Ansätze für die funktionelle Expression von $\alpha6\beta4$ nACh-Rezeptoren gesucht.

3.5 Versuche zur funktionellen Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

Da trotz der Plasmamembranständigkeit die Funktionalität der $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in klonalen Zelllinien bisher nicht nachgewiesen werden konnte, waren anhand transients Transfektionsansätze die Expressionsbedingungen für eine funktionelle Expression dieses nAChR-Subtyps zu optimieren.

3.5.1 Calcium-Imaging-Analysen an transient exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen wurden in mehreren unabhängigen Kotransfektionen mit den Expressionsvektoren H $\alpha 6$ /pcDNA3 und H $\beta 4$ /pcDNA3 transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 48 h bei 37°C wurden die transfizierten Zellen mit dem Fura-2 beladen und hinsichtlich der Expression funktioneller $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren mittels Calcium-Imaging untersucht.

Nach Applikation von Epibatidin (500 nM, 100 nM) oder Nikotin (300 μ M, 100 μ M) ließ sich kein Calcium-Einstrom in die transient transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mittels Calcium-Imaging nachweisen (Abb. III.21). Eine Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulär 60 mM K⁺) führte bei diesen transienten Transfektanten zu einem starken Calcium-Einstrom, was die Expression spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle eindeutig beweist (Abb. III.21). Diese Ergebnisse zeigen, daß nach Applikation nikotinischer Agonisten der Calcium-Einstrom durch die in der Plasmamembran exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren (siehe Kap.III.3.1) zu gering ist, um mittels Calcium-Imaging nachgewiesen zu werden. Darüber hinaus reicht die nAChR-induzierte Depolarisation der Plasmamembran nicht aus, um die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle in den Zellen zu aktivieren und auf diese Art und Weise den Epibatidin-induzierten Calcium-Einstrom über die Detektionsgrenze zu verstärken.

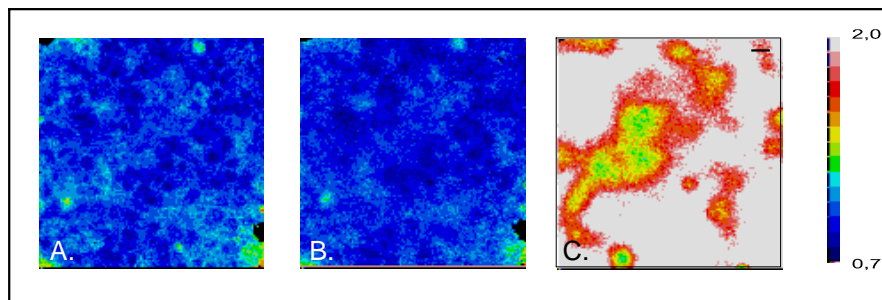


Abb. III.21: Calcium-Imaging an transient exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren H $\alpha 6$ /pcDNA3 und H $\beta 4$ /pcDNA3 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Fura-2 beladen und mittels Calcium-Imaging analysiert. Die Darstellung zeigt die Zellen sind vor der Messung (A.), nach Applikation von 100 nM Epibatidin (B.) sowie nach Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulär 60 mM K⁺; C.). Die Farben entsprechen der relativen intrazellulären Calcium-Konzentration, wobei blau eine niedrige und rot eine hohe Calcium-Konzentration aufzeigt.

Nach Stimulation der transienten Transfektanten mit Epibatidin konnte keine Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration beobachtet werden (B.). Die Expression spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle war anhand des starken Calcium-Einstroms nach Depolarisation der Plasmamembran nachweisbar (C.). Infolgedessen kann das Ausbleiben eines Epibatidin-induzierten Calcium-Einstroms nicht auf einen fehlenden Verstärkereffekt durch die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle zurückgeführt werden. Der Balken in C. entspricht 16 μ m

3.5.2 Temperaturabhängigkeit der transienten Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren

Eine mögliche Erklärung für die erfolglose Epibatidin-Stimulation transient $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierender HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen, könnte eine unzureichende Anzahl an nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran der Zellen sein. Für die Expression des $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptors ist aus der Literatur (Cooper S.T. et al., 1999) bekannt, daß nach der Kultivierung bei tieferer Temperatur die Anzahl an Rezeptoren in der Plasmamembran transfizierter HEK-293-Zellen ansteigt. In eigenen Experimenten wurde deshalb die Expressionstemperatur bei transient $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen variiert.

Nach der Transfektion mit den cDNAs der nAChR-Untereinheit $\alpha 6$ und $\beta 4$ wurden die HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen für weitere 30 h im Brutschrank bei 25°C oder 30°C kultiviert (Standardbedingung: 37°C). Die bei 25°C kultivierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen lösten sich von der Wachstumsfläche ab und starben.

Bei transient $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen, die bei 30°C kultiviert worden waren, führte eine Stimulation mit 100 nM Epibatidin oder 100 μ M Nikotin zu einer deutlichen Zunahme der intrazellulären Calcium-Konzentration (Abb. III.22).

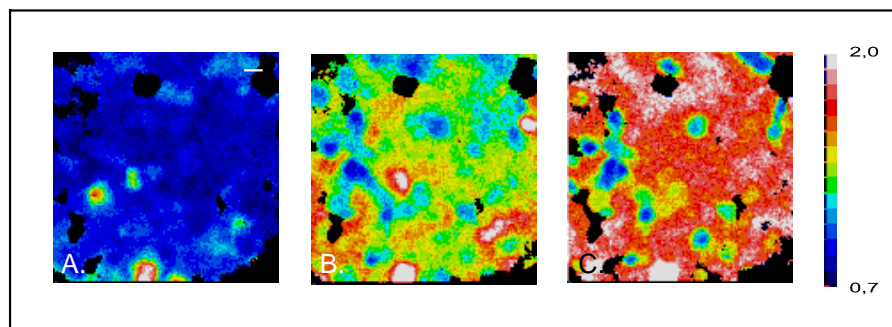


Abb. III.22: Calcium-Imaging an transient $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen, die bei 30°C kultiviert worden waren

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen wurden mit den Expressionsvektoren H $\alpha 6$ /pcDNA3 und H $\beta 4$ /pcDNA3 über Nacht transfiziert. Nach der Kultivierung bei 30°C für 30 h wurden die transfizierten Zellen mit Fura-2 beladen und mittels Calcium-Imaging analysiert. Die Darstellung zeigt die transfizierten Zellen vor der Messung (A.), nach Applikation von 100 nM Epibatidin (B.) sowie nach Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulär 60 mM K^{+} ; C.). Die relative intrazelluläre Calcium-Konzentration ist in Falschfarben wiedergegeben, wobei blau einer niedrigen und rot einer hohen Calcium-Konzentration entspricht.

Die Expression spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle war in den transfizierten Zellen anhand eines starken Calcium-Einstroms nach Depolarisation der Plasmamembran nachweisbar (C.). Des Weiteren konnte in nahezu alle Zellen ein starker Epibatidin-induzierter Calcium-Einstrom detektiert werden (B.), was die funktionelle Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in diesen Zellen beweist. Der Balken in A. entspricht 16 μm .

Da nach dem Entfernen des Agonisten die Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration wieder aufgehoben wurde, muß der Epibatidin-induzierte Calcium-Einstrom von funktionell exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren vermittelt werden. Außerdem ließ sich das Calcium-Signal nach Epibatidin-Stimulation durch den nikotinischen Antagonisten Mecamylamin vollständig blockieren (Abb. III.23), was die Expression funktioneller $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in den transfizierten Zellen beweist. Auf die Aktivierung spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle durch Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulär 60 mM K^{+}) hatte Mecamylamin keinen Einfluß (Abb. III.23). Vielmehr konnte der durch Depolarisation der Plasmamembran hervorgerufene Calcium-Einstrom durch 1 μM Nitrendipin, einem bei dieser Konzentration spezifischen Inhibitor spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle, vollständig blockiert werden (Abb. III.23). Aufgrund der partiellen Blockade von bis zu 70 % durch Nitrendipin mußte auf eine Beteiligung der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle an dem Epibatidin-induzierten Calcium-Signal geschlossen werden (Abb. III.23). Die $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren werden somit erst nach einer Kultivierung der transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen bei 30°C entsprechend exprimiert, um nach ihrer Stimulation die Plasmamembran in ausreichender Höhe zu depolarisieren und somit die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle zu aktivieren. Der durch Nitrendipin nicht blockierte Anteil des Epibatidin-induzierten Calcium-Einstroms von ca. 30 % wird durch die $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren selbst vermittelt (Abb. III.23), da Nitrendipin in der verwendeten Konzentration von 1 μM den nACh-Rezeptor nicht beeinflusst.

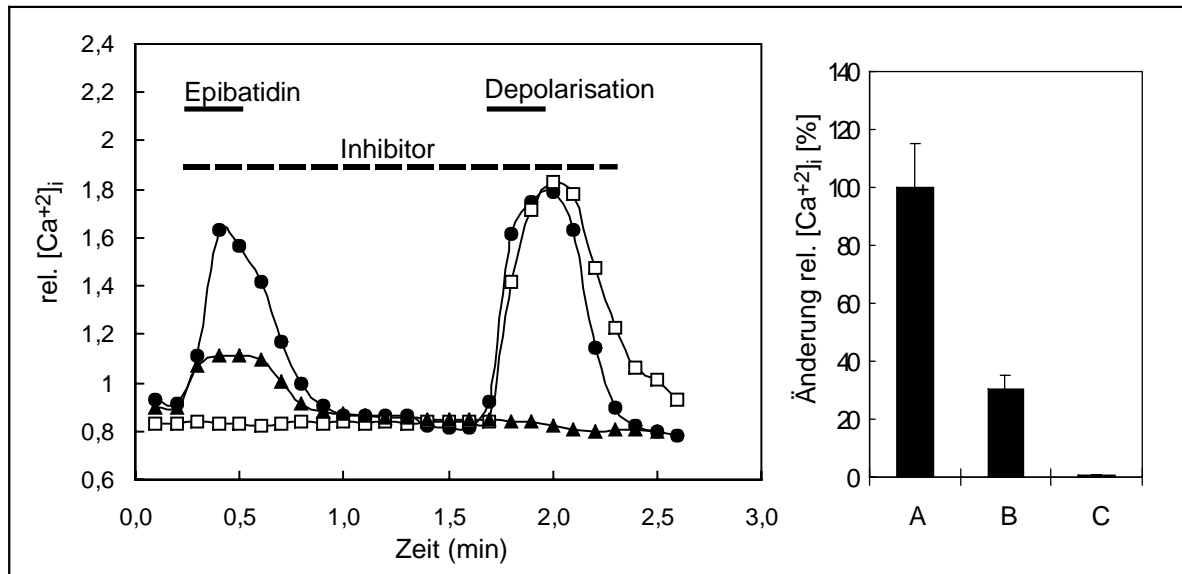


Abb. III.23: Nachweis der am Epibatidin-induzierten Calcium-Einstrom beteiligten Ionenkanäle mittels Calcium-Imaging an transient $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen wurden mit den Expressionsvektoren H $\alpha 6$ /pcDNA3 und H $\beta 4$ /pcDNA3 transfiziert und anschließend über Nacht bei 30°C kultiviert. Die transient transfizierten Zellen wurden mit Fura-2 beladen und mittels Calcium-Imaging analysiert. Die Balken kennzeichnen den Zeitraum der Applikation von pharmakologischen Substanzen oder der Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 60 mM (Depolarisation).

- links: (●) Epibatidin-Stimulation (100 nM) und Depolarisation der Plasmamembran
 (▲) Epibatidin-Stimulation (100 nM) und Depolarisation der Plasmamembran in Gegenwart von Nitrendipin (1 μ M)
 (□) Epibatidin-Stimulation (100 nM) und Depolarisation der Plasmamembran in Gegenwart von Mecamylamin (50 μ M)
- rechts: prozentualer Anteil des Epibatidin-induzierten Calcium-Einstroms ohne Antagonist (A) bzw. in Gegenwart von Nitrendipin (B) oder Mecamylamin (C)

Da eine funktionelle transiente Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen durch Erniedrigung der Expressionstemperatur auf 30°C erreicht wurde, waren im folgenden die stabil $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen unter den gleichen Versuchsbedingungen zu untersuchen.

3.5.3 Calcium-Imaging-Analysen an den klonalen Zelllinien H $\alpha 6\beta 4$ L⁺/1-6 unter optimierten Expressionsbedingungen

Für die Calcium-Imaging-Messungen wurden die klonalen Zelllinien H $\alpha 6\beta 4$ L⁺/1-6 auf Deckgläschen ausgesät und nach dem Anwachsen der Zellen auf der Wachstumsfläche für 30 h bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden die stabil transfizierten Zellen einer Calcium-Imaging-Analyse mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 unterzogen. Überraschenderweise war nach Epibatidin-Applikation keine Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration zu beobachten. Offensichtlich sind neben der Temperatur noch andere Faktoren entscheidend, die zu einer erfolgreichen Expression in den transienten Experimenten geführt hatten.

Ein Vergleich der Expressionsbedingungen nach transienter und stabiler Transfektion zeigte, daß die transient transfizierten Zellen noch Spuren von Transfektionslösung ausgesetzt sein könnten. Nach einem Transfektionszeitraum von 24 h wird zwar das Kulturmedium über den transienten Transfektanten erneuert, dabei werden jedoch die während der Transfektion entstehenden Calciumphosphat-Präzipitate nicht vollständig entfernt.

Um den Einfluß der Transfektionslösung auf die Expression in HEK-293/ α 1-Zellen zu überprüfen, wurden die stabil transfizierten Zelllinien H α 6 β 4L⁺/1-6 auf Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag mit Transfektionslösung in der in Kapitel II.3.2. beschriebenen Zusammensetzung ohne DNA überschichtet. Nach dem Ersetzen des Transfektionsmediums durch frisches Kulturmedium am nächsten Tag wurden die klonalen Zelllinien für ca. 30 h im Brutschrank bei 30°C weiterkultiviert, bevor sie mittels Calcium-Imaging untersucht wurden. Unter diesen optimierten Expressionsbedingungen konnten nach Epibatidin-Stimulation Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration bei den sechs die α 6- und β 4-Untereinheit exprimierenden Zelllinien nachgewiesen werden, womit die stabile Expression funktioneller α 6 β 4 nACh-Rezeptoren bewiesen war. Die Höhe des Epibatidin-induzierten Calcium-Einstroms variierte in den verschiedenen Zelllinien (H α 6 β 4L⁺/1 > 4 > 5 > 6 > 2, 3; Abb. III.24). Nach Epibatidin-Stimulation war in den einzelnen Zellen der klonalen Zelllinie H α 6 β 4L⁺/4 ebenfalls ein unterschiedlich starker Calcium-Einstrom zu beobachten, was auf eine inhomogene Expression der Ionenkanäle in den einzelnen Zellen dieser Zelllinie hinweist.

Bei nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ α 1-Zellen können am Epibatidin-induzierten Calcium-Einstrom spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle beteiligt sein (Kap. III.3.5.2). Als Kontrolle wurde deshalb die Expression dieser Calcium-Kanäle in allen α 6 β 4 nACh-Rezeptoren exprimierenden Zelllinien überprüft. Eine Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulär 60 mM K⁺) bewirkte bei den α 6 β 4 nACh-Rezeptoren exprimierenden Zelllinien H α 6 β 4L⁺/1, 5, und 6 einen höheren Calcium-Einstrom als bei den übrigen untersuchten Zelllinien (H α 6 β 4L⁺/2, 3, 4; Abb. III.24). Offensichtlich exprimieren die stabil transfizierten Zelllinien H α 6 β 4L⁺/2, 3, 4 eine geringere Anzahl spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle in ihrer Plasmamembran. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß bei der Generierung dieser Zelllinien HEK-293/ α 1-Zellen stabil transfiziert wurden, die bereits eine geringere Expression an spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen aufwiesen. Andererseits könnten die schwächer exprimierenden Zelllinien auch während ihrer Kultivierung einige Kopien der Sequenz für spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle durch spontane Deletion verloren haben.

Für das Screening von Wirksubstanzen sind solche Zellsysteme am besten geeignet, die eine möglichst hohe Expression sowohl an nACh-Rezeptoren als auch an spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen in allen Zellen aufweisen. Da die klonale Zelllinie H α 6 β 4L⁺/1 diese Voraussetzungen am besten erfüllt, wurde diese mittels Calcium-Imaging und elektrophysiologischen Untersuchungen weitergehend charakterisiert.

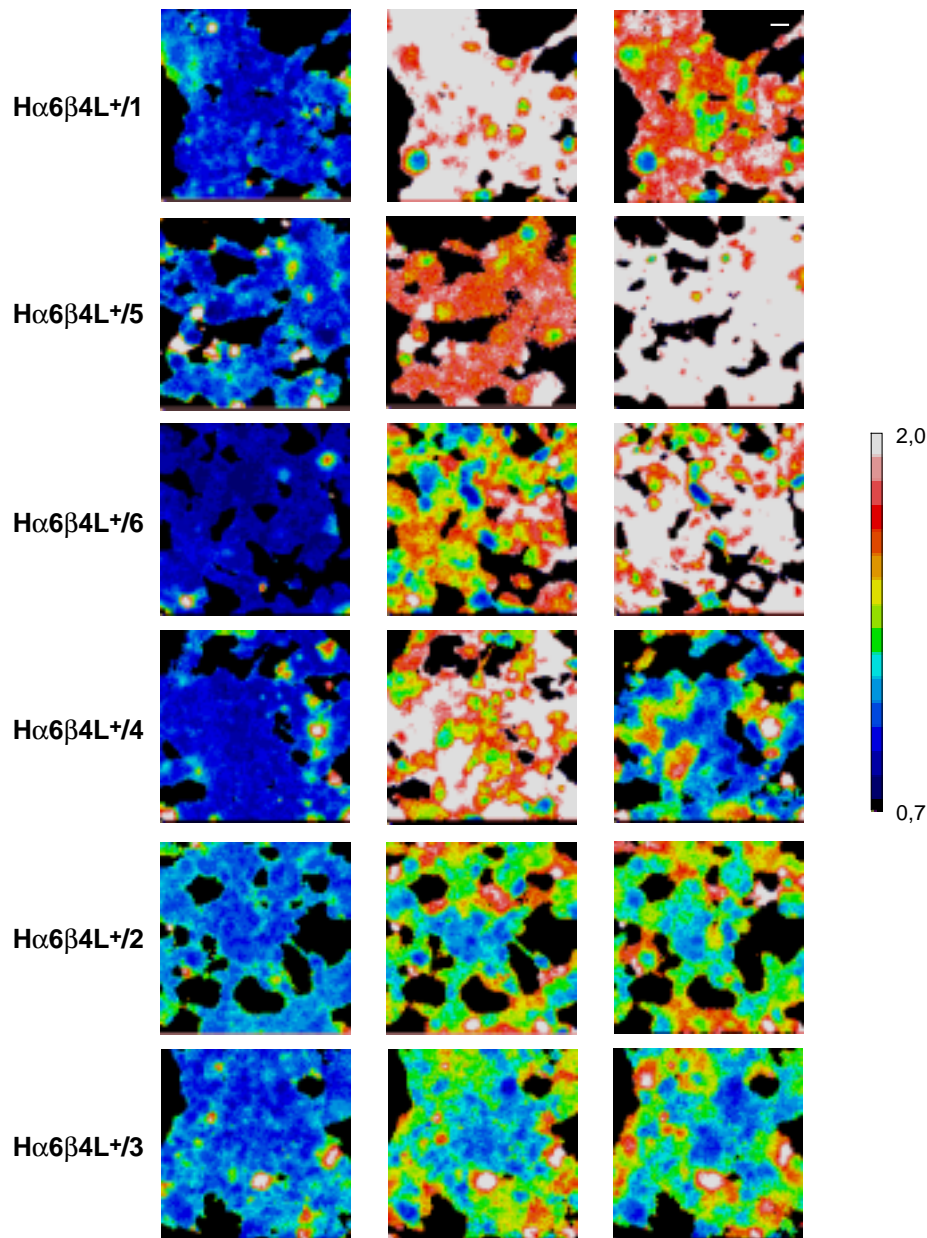


Abb. III.24: Untersuchung der klonalen Zelllinien H α 6 β 4L^{+/1-6} unter optimierten Expressionsbedingungen mittels Calcium-Imaging

Die auf Deckgläschen ausgesäten klonalen Zelllinien wurden über Nacht mit Transfektionslösung inkubiert. Nach dem Ersetzen des Transfektionsmedium durch frisches Kulturmedium erfolgte die weitere Kultivierung für 30 h bei 30°C. Anschließend wurden die Zellen in Calcium-Imaging-Analysen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 eingesetzt. Die Falschfarbendarstellung zeigt die Zelllinien jeweils vor der Messung (linkes Bild), während der Epibatidin-Applikation (500 nM; mittleres Bild) sowie nach Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulär 60 mM K⁺; rechtes Bild). Dabei entspricht blau einer niedrigen und rot einer hohen intrazellulären Calcium-Konzentration. Nach Epibatidin-Stimulation variiert die Höhe des Calcium-Einstroms bei den verschiedenen α 6 β 4 nACh-Rezeptoren exprimierenden Zelllinien (H α 6 β 4L^{+/1} > 4 > 5 > 6 > 2, 3). Die Depolarisation der Plasmamembran bewirkte in den Zelllinien H α 6 β 4L^{+/1}, 5 und 6 einen stärkeren Calcium-Einstrom als bei den übrigen untersuchten Zelllinien, was auf die Expression einer größeren Anzahl spannungsgesteuerter Calcium-Kanälen hinweist. Da die klonale Zelllinie H α 6 β 4L^{+/1} sowohl nACh-Rezeptoren als auch spannungsgesteuerte Calcium-Kanälen in allen Zellen exprimiert, wurden diese stabil transfizierten Zellen für weitere Funktionalitätsanalysen herangezogen. Der Balken im oberen rechten Bild entspricht 16 μ m.

3.6. Charakterisierung der klonalen Zelllinie $\text{H}\alpha 6\beta 4\text{L}^+/1$ mittels Calcium-Imaging

Um sicherzustellen, daß der an der klonalen Zelllinie $\text{H}\alpha 6\beta 4\text{L}^+/1$ gemessene Epibatidin-induzierte Calcium-Einstrom auf funktionelle nACh-Rezeptoren zurückzuführen ist, wurden verschiedene nikotinsche Agonisten und Antagonisten hinsichtlich ihrer Wirkung getestet. Erwartungsgemäß führte eine Stimulation mit Epibatidin bei der Zelllinie $\text{H}\alpha 6\beta 4\text{L}^+/1$ zu einem starken Calcium-Einstrom (Ratioänderung: 1,2; Abb. III.25), der nach dem Entfernen des Agonisten wieder vollständig aufgehoben wurde. In Gegenwart sättigender Konzentrationen der nikotinschen Antagonisten Mecamylamin, Methyllycaconitin (MLA) oder Hexamethonium wird der Epibatidin-induzierte Calcium-Einstrom reversibel blockiert (Abb. III.25), was die funktionelle Expression von nACh-Rezeptoren in dieser klonalen Zelllinie beweist. Das Epibatidin-induzierte Calcium-Signal war bis zu 70 % durch 1 μM Nitrendipin, einen bei dieser Konzentration spezifischen Inhibitor spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle, blockierbar. Somit konnte die Beteiligung dieser Calcium-Kanäle am Epibatidin-induzierten Calcium-Einstrom in $\text{H}\alpha 6\beta 4\text{L}^+/1$ -Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Die restlichen 30 - 40 % des Calcium-Einstroms nach Epibatidin-Stimulation werden durch die $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren selbst vermittelt (Abb. III.25).

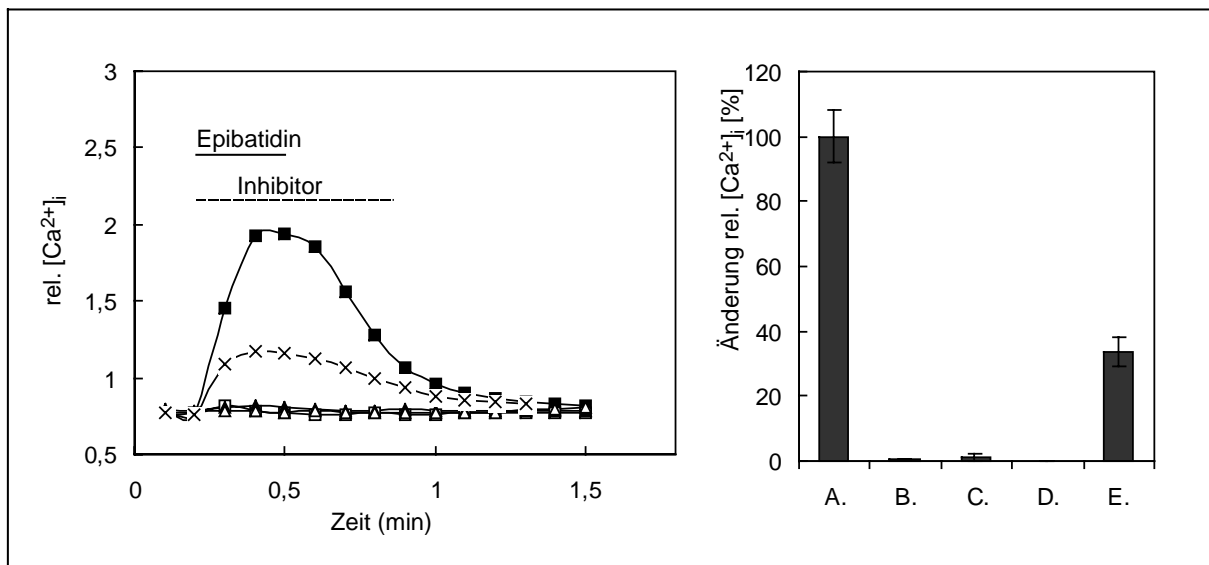


Abb. III.25: Nachweis der pharmakologischen Spezifität der am Epibatidin-induzierten Calcium-Einstrom beteiligten Ionenkanäle mittels Calcium-Imaging an $\text{H}\alpha 6\beta 4\text{L}^+/1$ -Zellen

Die $\text{H}\alpha 6\beta 4\text{L}^+/1$ -Zellen wurden auf Deckgläschen unter den optimierten Expressionsbedingungen (siehe Kap. III.3.5.3) kultiviert. In Calcium-Imaging-Analysen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 wurde anschließend der Calcium-Einstrom nach Epibatidin-Applikation ohne Antagonist (100 nM, A., ■) in Gegenwart von Hexamethonium (50 μM , B., □), Mecamylamin (10 μM , C., ▲), MLA (10 μM , D., Δ) oder Nitrendipin (1 μM , E., x) gemessen. Die Balken kennzeichnen den Zeitraum der Applikation verschiedener pharmakologischer Substanzen. Bei der klonale Zelllinie $\text{H}\alpha 6\beta 4\text{L}^+/1$ konnte der Calcium-Einstrom nach Epibatidin-Stimulation durch typische nikotinsche Antagonisten (Hexamethonium, Mecamylamin, MLA) vollständig blockiert werden, was die Expression funktioneller $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in den Zellen beweist. Aufgrund der teilweisen Blockierbarkeit durch Nitrendipin konnte auch eine Beteiligung spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle am Epibatidin-induzierten Calcium-Einstrom von bis zu 70 % nachgewiesen werden.

Eine maximale Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration in vergleichbarer Höhe konnte gemessen werden, wenn andere nikotinische Agonisten (Acetylcholin, Nikotin oder Cytisin) verwendet wurden. Nach Entfernen des jeweiligen Agonisten wurde der Calcium-Einstrom immer vollständig aufgehoben (Abb. III.26), was die Funktionalität der exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren beweist.

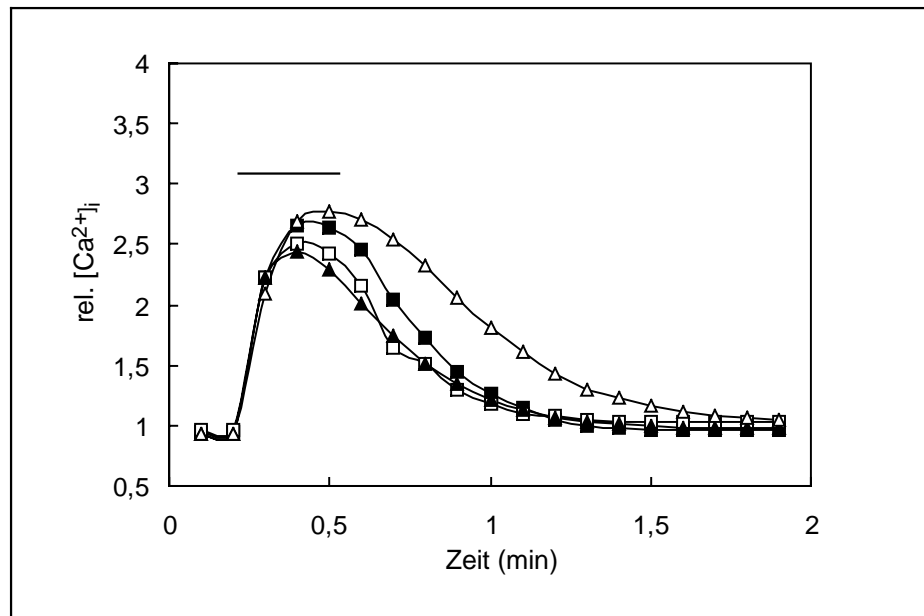


Abb. III.26: Calcium-Imaging-Analysen an $H\alpha 6\beta 4L^+/1$ -Zellen nach Applikation typischer nikotinischer Agonisten

Die $H\alpha 6\beta 4L^+/1$ -Zellen wurden auf Deckgläschen unter den optimierten Expressionsbedingungen (siehe Kap. III.3.5.3) kultiviert und in Calcium-Imaging-Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 eingesetzt. Dabei wurden vergleichbare maximale Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Stimulation mit Epibatidin (100 nM, Δ), Acetylcholin (300 μ M, \blacksquare), Cytisin (300 μ M, \square) sowie Nikotin (300 μ M, \blacktriangle) gemessen. Der Balken kennzeichnet den Zeitraum der Agonisten-Applikation.

Anhand dieser Meßdaten konnte gezeigt werden, daß die klonale Zelllinie $H\alpha 6\beta 4L^+/1$ für Calcium-Imaging-Analysen geeignet ist. Diese Zellen verfügen zum einen über funktionelle $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren sowie über spannungsabhängige $L\alpha 1_{IC-b}$ -Typ Calcium-Kanäle, welche die Primärantwort der nACh-Rezeptoren verstärken. Somit konnte erstmalig ein sensibles Testsystem für den humanen $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor etabliert werden, das sich zum Screening einer großen Anzahl an Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf diesen nAChR-Subtyp eignet. Um diese Zelllinie weitergehend zu charakterisieren, wurde sie elektrophysiologischer Messungen unterzogen, die in Kapitel III.3.8 behandelt werden.

Nach den bisher durchgeführten Analysen bleibt jedoch die Frage offen, welche Effekte zur erfolgreichen Expression funktioneller $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen geführt haben. Tiefergehenden Untersuchungen hierzu werden im folgenden Kapitel beschrieben.

3.7 Einfluß der Expressionsbedingungen auf die Expression von nACh-Rezeptoren

3.7.1 Nachweis funktioneller nACh-Rezeptoren unter verschiedenen Expressionsbedingungen

Bei der klonalen Zelllinie H α 6 β 4L⁺/1 war ein Epibatidin-induzierter Calcium-Einstrom mittels Calcium-Imaging erst nach einer Behandlung mit Transfektionslösung und einer Erniedrigung der Expressionstemperatur auf 30°C meßbar.

Da die in Transfektionen mittels Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode verwendete Transfektionslösung sich aus den Komponenten NaCl, Na₂HPO₄, BES und CaCl₂ zusammensetzt (Kap. II 3.2), stellte sich die Frage, welche der vier Komponenten ausschlaggebend für die positive Wirkung der Transfektionslösung ist. Deshalb wurden H α 6 β 4L⁺/1-Zellen mit den einzelnen Komponenten der Transfektionslösung in getrennten Ansätzen behandelt, wobei jeweils die in transienten Transfektionsansätzen normalerweise verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Substanz eingestellt wurde (Endkonzentration im Transfektionsmedium: NaCl 12,7 mM; Na₂HPO₄ 68,2 μ M; BES 2,3 mM; CaCl₂ 11,4 mM). Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen bei 30°C weiterkultiviert und anschließend in Calcium-Imaging-Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 hinsichtlich der Expression funktioneller nACh-Rezeptoren analysiert.

Nach Kultivierung der klonalen Zelllinie H α 6 β 4L⁺/1 in Gegenwart aller Komponenten gleichzeitig konnte ein Epibatidin-induzierter Calcium-Einstrom bestätigt werden. Im Gegensatz dazu ließ sich durch Applikation von Epibatidin kein Calcium-Einstrom induzieren, wenn die Zellen nur mit einzelnen Komponenten der Transfektionslösung behandelt wurden. Die positive Wirkung der Transfektionslösung auf die Expression in H α 6 β 4L⁺/1-Zellen war somit nicht einem einzigen Bestandteil dieser Lösung unmittelbar zuzuordnen.

Nach den bisherigen Experimenten blieb die Frage offen, ob die Transfektionslösung alleine oder nur in Zusammenhang mit der Temperaturänderung eine funktionelle Expression von α 6 β 4 nACh-Rezeptoren in HEK-293/ α 1-Zellen bewirkt. Da das Calcium-Signal nach Epibatidin-Stimulation bei H α 6 β 4L⁺/1-Zellen von nACh-Rezeptoren in Kombination mit spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen vermittelt wird (Kap. III.3.6), war weiterhin zu klären, welchen der beiden Ionenkanäle die veränderten Kulturbedingungen beeinflussen, um einen mittels Calcium-Imaging meßbaren Calcium-Einstrom zu erzeugen.

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden Calcium-Imaging Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 sowie Ganzzellaufbauten in Zusammenarbeit mit Dr. Marek Samochocki aus unserem Labor durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die klonale Zelllinie H α 6 β 4L⁺/1 auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die an der Wachstumsfläche adhärenen Zellen unter einer der folgenden Expressionsbedingungen weiterkultiviert:

- Ansatz 1: homogene Kultivierung bei 37°C für ca. 42 h
- Ansatz 2: Behandlung mit Transfektionslösung bei 37°C über Nacht und anschließend Kultivierung für 30 h bei 37°C
- Ansatz 3: Kultivierung bei 37°C über Nacht und anschließend für 30 h bei 30°C
- Ansatz 4: Behandlung mit Transfektionslösung bei 37°C über Nacht und anschließend Kultivierung für 30 h bei 30°C

Das Ergebnis der Funktionalitätsanalysen ist in Abbildung III.27 dargestellt.

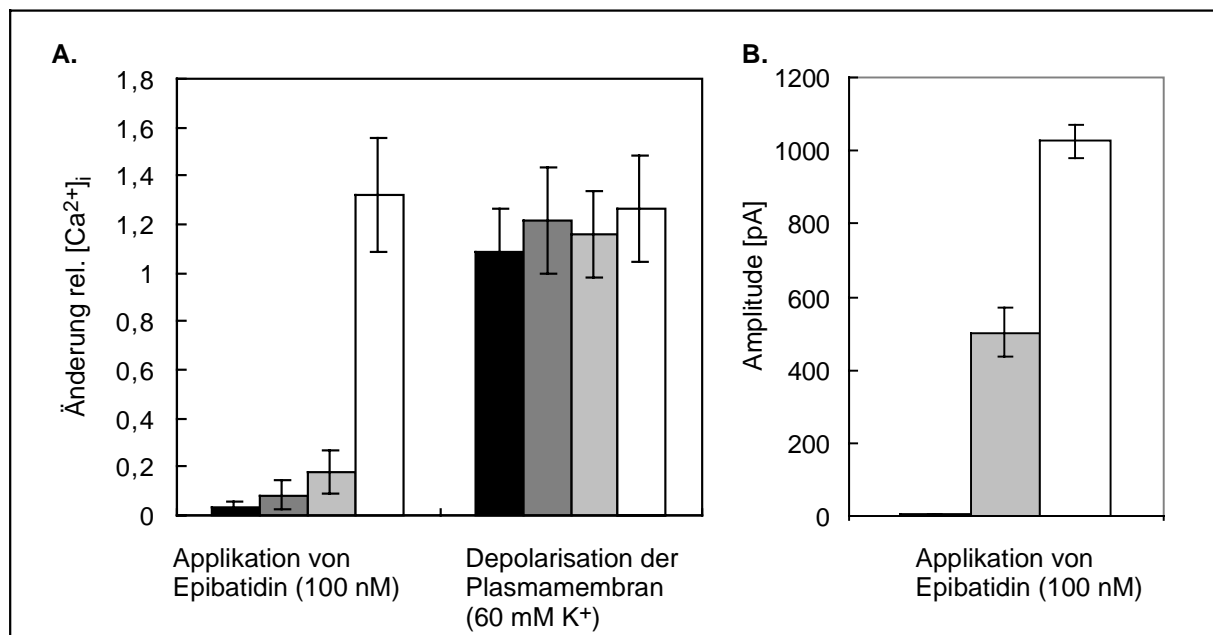


Abb. III.27: Calcium-Imaging-Analysen sowie Ganzzellableitungen an der klonalen Zelllinie H α 6 β 4L^{+/1} unter verschiedenen Expressionsbedingungen

H α 6 β 4L^{+/1}-Zellen wurden auf Deckgläschen ausplattiert und am nächsten Tag unter folgenden Bedingungen weiterkultiviert: für 42 h homogen bei 37°C (Ansatz 1; ■); mit Transfektionslösung über Nacht bei 37°C und anschließend für 30 h bei 37°C (Ansatz 2; ■); für 30 h bei 30°C (Ansatz 3; □) oder mit Transfektionslösung über Nacht bei 37°C und anschließend für 30 h bei 30°C (Ansatz 4; □).

- A.: Calcium-Imaging-Analysen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2. Die Expressionsbedingungen zeigen keine Wirkung auf die Expression oder Funktion spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle (vergleichbares Calcium-Signal nach Depolarisation der Plasmamembran). Im Gegensatz dazu variierte der Calcium-Einstrom nach Epibatidin-Applikation in Abhängigkeit von den Expressionsbedingungen (Höhe des Calcium-Einstroms: Ansatz 1 = Ansatz 2 < Ansatz 3 << Ansatz 4).
- B.: Ganzzellantworten nach Epibatidin-Applikation (100 nM) korrelieren mit den Ergebnissen der Calcium-Imaging-Analysen (Höhe der Ganzzellantwort: Ansatz 1 < Ansatz 3 < Ansatz 4), was den positiven Einfluß der Kulturbedingungen auf die Expression funktioneller α 6 β 4 nACh-Rezeptoren beweist. (In Zusammenarbeit mit Dr. Marek Samochocki aus unserem Labor gemessen)

Unabhängig von den Expressionsbedingungen führte eine Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulär 60 mM K⁺) zu einer vergleichbaren Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration in H α 6 β 4L^{+/1}-Zellen, was auf eine von den Kulturbedingungen unabhängige Expression und Funktion der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle schließen läßt (Abb. III.27).

Allerdings variierte in Abhängigkeit von den Expressionsbedingungen die Höhe des Epibatidin-induzierten Calcium-Einstroms in diese stabil transfizierten HEK-293/ α 1-Zellen (Abb. III.27). So war nach einer homogen Kultivierung bei 37°C, analog zu den in Kapitel III.3.4 beschriebenen Ergebnissen, kein Calcium-Signal nach Epibatidin-Applikation zu beobachten (Ansatz 1, Abb. III.27). Das gleiche Ergebnis wurde mittels Calcium-Imaging nach Epibatidin-Applikation bei H α 6 β 4L⁺/1-Zellen gemessen, die in Gegenwart von Transfektionslösung und bei 37°C kultiviert worden waren (Ansatz 2, Abb. III.27). Unter den in Ansatz 1 und 2 beschriebenen Kulturbedingungen war somit die funktionelle Expression von α 6 β 4 nACh-Rezeptoren in H α 6 β 4L⁺/1-Zellen auszuschließen. Erst eine Erniedrigung der Expressionstemperatur für 30 h auf 30°C ermöglichte bei diesen Zellen den Nachweis eines relativ geringen Epibatidin-induzierten Calcium-Einstroms mittels Calcium-Imaging (durchschnittliche Ratioänderung: 0,2; Ansatz 3; Abb. III.27). Ein siebenfach höheres Calcium-Signal nach Epibatidin-Stimulation (durchschnittliche Ratioänderung: 1,3) war bei H α 6 β 4L⁺/1-Zellen nachweisbar, die sowohl über Nacht mit Transfektionslösung behandelt als auch anschließend für 30 h bei 30°C kultiviert worden waren (Ansatz 4; Abb. III.27). Blockierungsexperimente an diesen Zellen mit einem Inhibitor spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle (1 μ M Nitrendipin) zeigen, daß der Calcium-Einstrom nach Epibatidin-Stimulation bis zu 70 % von diesen Ionenkanälen vermittelt wird (Kap. III.3.6). Unter den in Ansatz 4 beschriebenen, optimierten Expressionsbedingungen wird offensichtlich die Plasmamembran durch die Epibatidin-stimulierten nACh-Rezeptoren in ausreichender Höhe depolarisiert, um die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle in den Zellen zu aktivieren. Die daraus resultierende Verstärkung des nAChR-vermittelten Calcium-Einstroms ermöglicht die Verwendung der klonalen Zelllinie H α 6 β 4L⁺/1 als sensitives Testsystem auf der Basis von Calcium-Imaging-Analysen.

Der von α 6 β 4 nACh-Rezeptoren direkt vermittelte Ionenstrom wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Marek Samochocki elektrophysiologisch gemessen. Bei diesen Ganzzelleableitungen wurde das Membranpotential konstant bei -70 mV gehalten. Da die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle bei diesem Membranpotential in geschlossenem und damit inaktivem Zustand vorliegen, konnte unter diesen meßtechnischen Voraussetzungen der Ionenstrom durch die Epibatidin-aktivierten α 6 β 4 nACh-Rezeptoren untersucht werden. Darüber hinaus wurde in den Ganzzelleableitungen der gesamte Kationen-Einstrom (und nicht nur der Calcium-Einstrom) durch den nACh-Rezeptor erfaßt. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen und die der Calcium-Imaging-Untersuchungen korrelieren. An homogen bei 37°C kultivierten H α 6 β 4L⁺/1-Zellen war nach Epibatidin-Applikation kein Strom durch die Plasmamembran nachweisbar (Ansatz 1; Abb. III.27 B.), was die Expression funktioneller nACh-Rezeptoren unter diesen Kulturbedingungen ausschließt. Im Gegensatz dazu konnten im Anschluß an eine Expressionsphase bei 30°C ein Epibatidin-induzierter Ionenstrom durch die Plasmamembran von 500 pA gemessen werden (Ansatz 3; Abb. III.27 B.). Die erfolgreiche Expression funktioneller α 6 β 4 nACh-Rezeptoren in der Zelllinie H α 6 β 4L⁺/1 konnte

somit nach Erniedrigung der Expressionstemperatur elektrophysiologisch eindeutig bewiesen werden. Da sich unter den gleichen Expressionsbedingungen ein geringer Epibatidin-induzierter Calcium-Einstrom mittels Calcium-Imaging nachweisen ließ (Abb. III.27 A.), war davon auszugehen, daß der Calciumanteil am Ionenstrom durch aktivierte $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren relativ gering ist. Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit Transfektionslösung verdoppelte die elektrophysiologisch gemessene Amplitude des Epibatidin-induzierten Ionenstroms auf 1020 pA (Ansatz 4; Abb. III.27 B.). Die positive Wirkung sowohl der Transfektionsbedingungen als auch der Temperaturerniedrigung auf die funktionelle Expression des $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptors in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen war somit eindeutig bewiesen. Nach diesen Experimenten stellte sich die Frage, ob die Expression anderer nAChR-Subtypen in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen ebenfalls durch die optimierten Kulturbedingungen gesteigert werden kann. Zu diesem Zweck wurde eine $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren stabil exprimierende HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinie, wie in Kap. II.3.3 beschrieben, hergestellt und unter verschiedenen Expressionsbedingungen kultiviert (siehe oben, Ansatz 1-4). Diese Zellen wurden anschließend Calcium-Imaging-Analysen unterzogen.

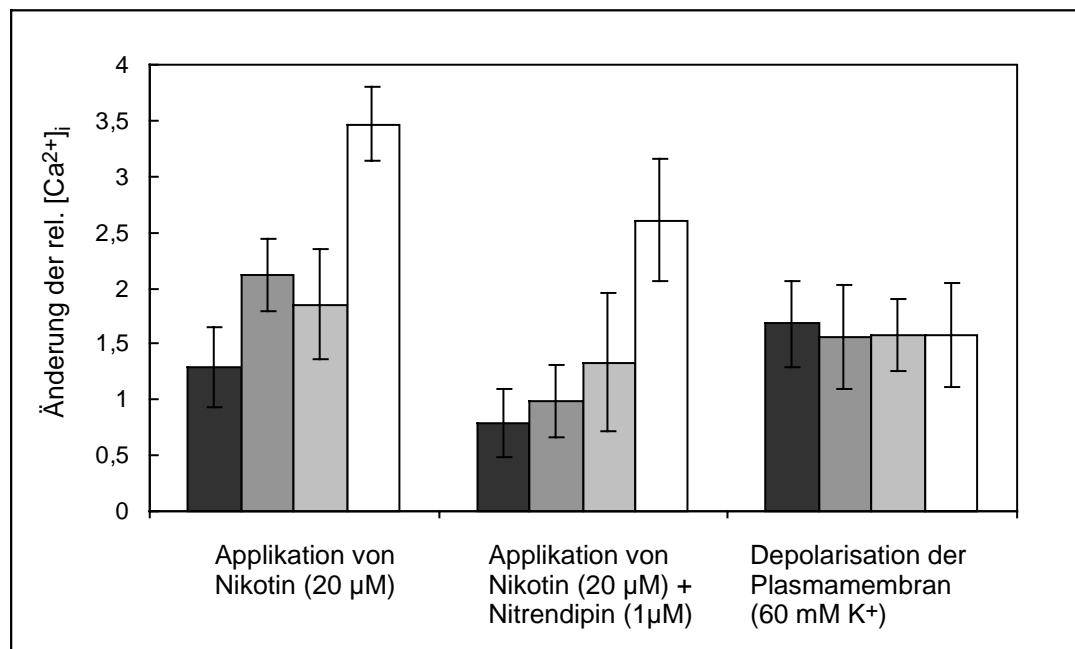


Abb. III.28: Untersuchungen an stabil $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen unter verschiedenen Expressionsbedingungen mittels Calcium-Imaging

Eine stabil humane $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierende HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinie (in Rahmen dieser Arbeit hergestellt; Kap. II.3.3) wurden folgendermaßen kultiviert: homogen bei 37°C (Ansatz 1; ■); mit Transfektionslösung über Nacht bei 37°C und anschließend für 30 h bei 37°C (Ansatz 2; ▣); für 30 h bei 30°C (Ansatz 3; □) oder über Nacht mit Transfektionslösung bei 37°C und anschließend für 30 h bei 30°C (Ansatz 4; □). Der Calcium-Einstrom nach Nikotin-Applikation (20 µM) ohne Antagonist und in Gegenwart von Nitrendipin (1 µM) sowie nach Depolarisation der Plasmamembran (extrazellulär 60 mM K⁺) wurde mittels Calcium-Imaging mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 gemessen.

Die Expressionsbedingungen zeigen keine Wirkung auf die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle (vergleichbares Calcium-Signal nach Depolarisation der Plasmamembran). Im Gegensatz dazu variierte die Höhe des Nikotin-induzierte Calcium-Einstrom in Abhängigkeit von den Expressionsbedingungen (Höhe des Calcium-Einstroms: Ansatz 1 < Ansatz 2 = Ansatz 3 < Ansatz 4). Nach Inhibition der Calcium-Kanäle durch Nitrendipin wurde der von $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren direkt vermittelte Calcium-Einstrom gemessen, der unter den optimierten Expressionsbedingungen (Ansatz 4) am höchsten war. Die funktionelle Expression des $\alpha 3\beta 4$ nAChR-Subtyps kann somit durch Optimierung der Kulturbedingungen gesteigert werden.

Analog zu den Experimenten mit H $\alpha 6\beta 4L^+/1$ -Zellen konnte bei der $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinie bestätigt werden, daß die Funktion und Expression der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle bei den untersuchten Kulturbedingungen unverändert bleibt (vergleichbarer Calcium-Einstrom nach Depolarisation der Plasmamembran). Des weiteren variierte die Höhe des Nikotin-induzierten Calcium-Einstroms bei $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen in Abhängigkeit von den Expressionsbedingungen (Abb. III.28). Dabei wurde nach homogener Kultivierung der Zellen bei 37°C der niedrigste (Ratioänderung: 1,3; Abb. III.28) und unter optimierten Kulturbedingungen (in Gegenwart der Transfektionslösung und bei 30°C) der höchste Calcium-Einstrom nach Nikotin-Stimulation gemessen (Ratioänderung: 3,5; Abb. III.28). Anhand von Blockierungsexperimenten mit Nitrendipin ließ sich auch bei der $\alpha 3\beta 4$ nAChR exprimierenden Zelllinie eine Beteiligung spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle am Nikotin-induzierten Calcium-

Einstrom nachweisen (Abb. III.28). Wie bereits erwähnt, zeigt Nitrendipin bei einer Konzentration von 1 μM keinen Einfluß auf nACh-Rezeptoren. Infolgedessen muß der von Nitrendipin nicht blockierte Anteil am Nikotin-induzierten Calcium-Einstrom durch die $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren direkt vermittelt werden. Dieser nAChR-vermittelte Calcium-Einstrom wird nach einer Kultivierung in Gegenwart von Transfektionslösung und bei 30°C kontinuierlich gesteigert (Abb. III.28), was den positiven Einfluß dieser Expressionsbedingungen auch auf die Expression des $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors beweist. Im Gegensatz zum $\alpha 6\beta 4$ nAChR-Subtyp konnte allerdings der direkt von $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren vermittelte Calcium-Einstrom auch nach einer Kultivierung unter Standardbedingungen (37°C) eindeutig nachgewiesen werden, was möglicherweise auf eine höhere Calcium-Permeabilität oder Expression des $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen schließen läßt.

Anhand dieser Meßdaten konnte gezeigt werden, daß die Agonisten-induzierte Antwort von nAChR-exprimierenden Zellen durch die Behandlung mit Transfektionslösung in Kombination mit einer Temperaturniedrigung gesteigert werden kann. Diese Wirkung könnte einerseits aus einer größeren Anzahl funktioneller nACh-Rezeptoren oder aus einer gesteigerten Ionenleitfähigkeit der einzelnen nAChR-Kanäle unter den veränderten Expressionsbedingungen resultieren. Deshalb wurde, wie im folgenden Kapitel beschrieben, die Expression von nACh-Rezeptoren bei verschiedenen Expressionsbedingungen anhand EGFP-gekoppelter nACh-Rezeptoren näher untersucht.

3.7.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis von nACh-Rezeptoren unter verschiedenen Expressionsbedingungen

Die Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren bei verschiedenen Expressionsbedingungen wurde mit Hilfe der klonalen Zelllinie H $\alpha 6\beta 4$ (G)L⁺/1 untersucht, die stabil die $\alpha 6$ nAChR-Untereinheit sowie die C-terminal EGFP-gekoppelte $\beta 4$ nAChR-Untereinheit exprimiert (Kap. III.3.3.1). Analog wurde eine stabil EGFP-gekoppelte $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierende HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinie (H $\alpha 3\beta 4$ (G)L⁺/1), die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde (Kap. II.3.3), sowohl unter Standardbedingungen bei 37°C als auch unter den optimierten Expressionsbedingungen (in Gegenwart der Transfektionslösung und anschließend bei 30°C) kultiviert. Beide Zelllinien wurden anschließend in Immunfluoreszenz-Analysen mit dem GFP-Antiserum eingesetzt.

Unabhängig von den Expressionsbedingungen war sowohl in der klonalen Zelllinie H $\alpha 6\beta 4$ (G)L⁺/1 als auch in der klonalen Zelllinie H $\alpha 3\beta 4$ (G)L⁺/1 die Expression des grün fluoreszierenden $\beta 4$ -Fusionsproteins deutlich sichtbar (Abb. III.29). Auf der Basis der Intensität der grünen Fluoreszenz wurde auf eine vergleichbare Proteinexpression bei den unter-

suchten Expressionsbedingungen in HEK-293/ α 1-Zellen geschlossen. In indirekten Immunfluoreszenzanalysen mit dem GFP-Antiserum konnten nach homogener Kultivierung der exprimierenden Zellen bei 37°C erwartungsgemäß EGFP-gekoppelte α 6 β 4 und α 3 β 4 nACh-Rezeptoren an der Zelloberfläche der jeweiligen Zelllinie lokalisiert werden (Abb. III.29). Bei einigen grün fluoreszierenden Zellen erkennt der Antikörper das β 4-Fusionsprotein allerdings nicht in der Plasmamembran, was in diesen Zellen auf eine sehr schwache oder gar keine plasmamembranständige Expression von nACh-Rezeptoren hinweist. Nach einer Kultivierung der Zellen in Gegenwart von Transfektionslösung und anschließend bei 30 °C ließ sich in den Immunfluoreszenzfärbungen eine stärkere rote Fluoreszenz nachweisen. Offensichtlich erkennt der GFP-Antikörper unter diesen Expressionsbedingungen sein Epitop häufiger auf der extrazellulären Seite der Zellen, was auf eine stärkere Expression der EGFP-gekoppelten nACh-Rezeptoren α 6 β 4 bzw. α 3 β 4 an der Zelloberfläche der jeweiligen Zelllinie schließen läßt (Abb. III.29). Da die Anzahl an nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran zunimmt und gleichzeitig die exprimierte Proteinmenge konstant bleibt, muß unter den veränderten Expressionsbedingungen (Behandlung mit Transfektionslösung sowie anschließende Erniedrigung der Expressionstemperatur auf 30°C) der Transport der exprimierten nACh-Rezeptoren zur Plasmamembran begünstigt sein, was den Nachweis stärkerer Epibatidin-induzierter Ionenströme in Calcium-Imaging- sowie elektrophysiologischen Untersuchungen erklärt.

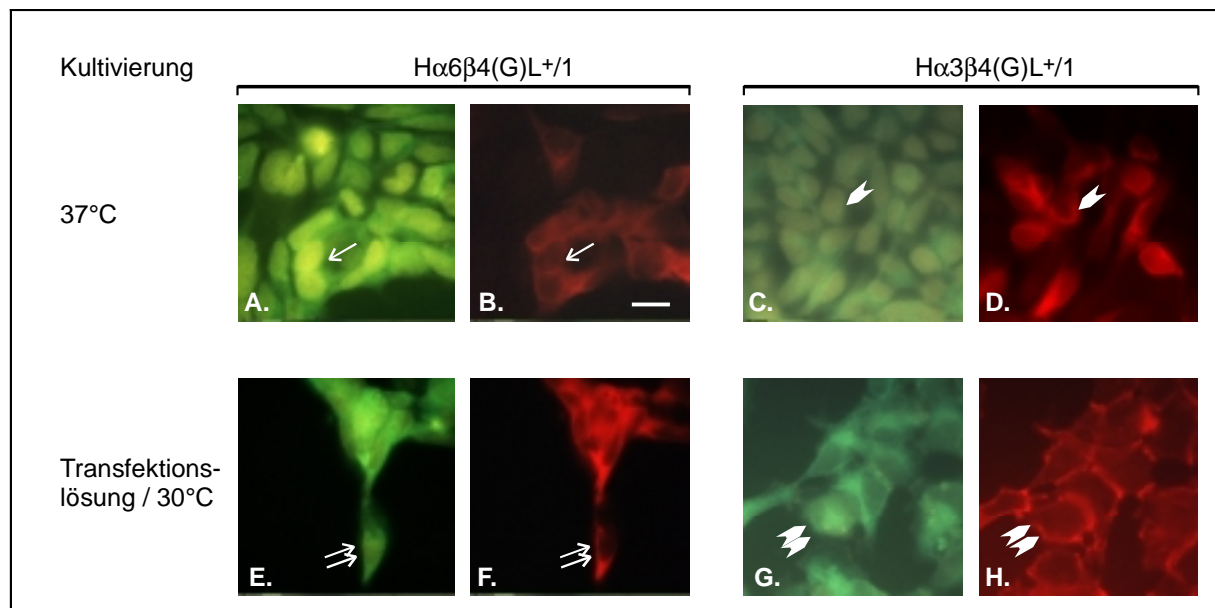


Abb. III.29: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen an stabil die EGFP-gekoppelten nACh-Rezeptoren $\alpha6\beta4$ bzw. $\alpha3\beta4$ exprimierenden HEK-293/ $\alpha1$ -Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen

Die klonalen Zelllinien $H\alpha6\beta4(G)L^{+}/1$ (Kap. III.3.3.1; A., B., E. und F.) sowie $H\alpha3\beta4(G)L^{+}/1$ (C., D., G. und H.) wurden entweder konstant bei 37°C (A.-D.) oder über Nacht mit Transfektionslösung und anschließend für 30 h bei 30°C kultiviert (E.-H.). Die Darstellungen beider Zelllinien zeigen die grüne Fluoreszenz des $\beta4$ -Fusionsproteins (A., C., E. und G.) sowie die rote Fluoreszenz des gebundenen GFP-Antikörpers mit seinem Zweitantikörper (B., D., F. und H.). Unabhängig von den Expressionsbedingungen war eine grüne Fluoreszenz vergleichbarer Intensität in allen Zellen sichtbar, was auf eine konstante Proteinexpression der EGFP-gekoppelten $\beta4$ nAChR-Untereinheit unter diesen Bedingungen schließen läßt. In indirekten Immunfluoreszenzanalysen mit dem GFP-Antiserum ließ sich unter den optimierten Expressionsbedingungen (Kultivierung mit Transfektionslösung und anschließend bei 30°C) eine stärkere Intensität der roten Fluoreszenz sowohl bei $H\alpha6\beta4(G)L^{+}/1$ - als auch bei $H\alpha3\beta4(G)L^{+}/1$ -Zellen nachweisen. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde auf eine größere Anzahl an nACh-Rezeptoren unter optimierten Expressionsbedingungen geschlossen. Die Pfeile zeigen auf Zellen mit einer Expression von $\alpha6\beta4(G)$ (\swarrow) oder $\alpha3\beta4(G)$ nACh-Rezeptoren (\searrow) in der Plasmamembran, wobei die jeweiligen Doppelpfeile eine größere Anzahl an nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran kennzeichnen. Der Balken in B. entspricht 25 μ m.

3.8 Elektrophysiologische Charakterisierung humaner $\alpha6\beta4$ nACh-Rezeptoren

Die elektrophysiologische Charakterisierung der in $H\alpha6\beta4L^{+}/1$ -Zellen exprimierten humanen $\alpha6\beta4$ nACh-Rezeptoren wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Marek Samochocki aus unserem Labor durchgeführt.

Für diese Analysen wurden die Zelllinie $H\alpha6\beta4L^{+}/1$ auf Deckgläschen über Nacht mit Transfektionslösung und anschließend für 30 h bei 30 °C kultiviert.

In Ganzzelleableitungen konnten nach Applikation von Acetylcholin (30 μ M) in Gegenwart von Atropin (1 μ M) Ströme durch die Plasmamembran gemessen werden, die sich durch die spezifischen nikotinischen Antagonisten Mecamylamin sowie MLA reversibel blockieren ließen (Abb. III.30). Anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven wurden für den in den Zellen

exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor IC_{50} -Werte für Mecamylamin von $2,8 \pm 0,2 \mu M$ und MLA von $1,4 \pm 0,1 \mu M$ bestimmt (Abb. III.30).

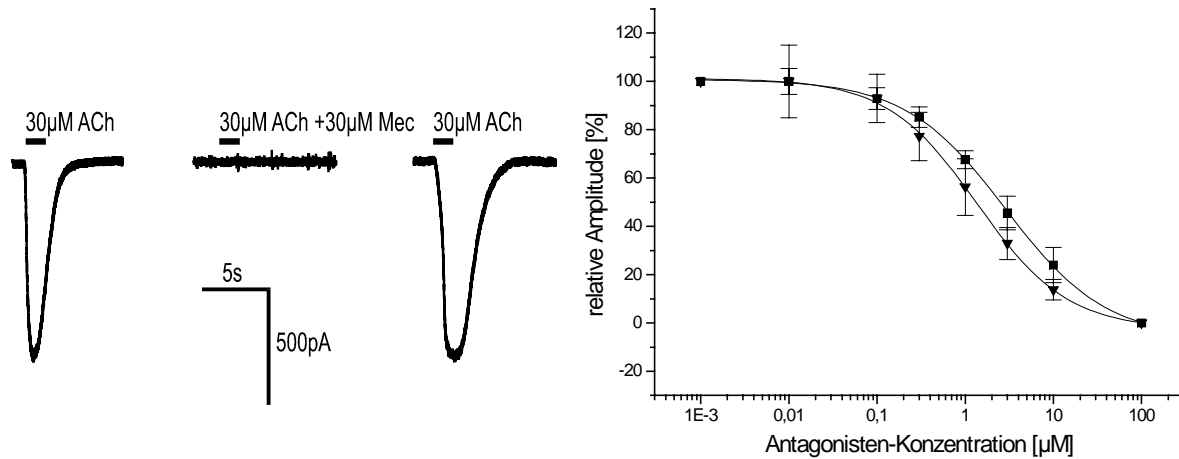


Abb. III.30: Wirkung typischer nikotinischer Antagonisten auf die Acetylcholin-induzierte Ganzzellantwort von $H\alpha 6\beta 4L^+/1$ -Zellen

- A:** Ganzzelleableitung an den Zellen nach Acetylcholin-Stimulation ($30\mu M$) in Abwesenheit (links) und Anwesenheit von Mecamylamin ($30\mu M$, Mitte) sowie nach einer Waschphase von 10 min (rechts). Die Balken kennzeichnen den Zeitraum der Applikation pharmakologischer Substanzen.
- B:** Dosis-Wirkungs-Kurven für typische nAChR-Antagonisten an $H\alpha 6\beta 4L^+/1$ -Zellen, normalisiert jeweils auf die für Acetylcholin gemessene maximale Antwort. Die Meßpunkte stellen die durchschnittlichen Werte dar, die an jeweils 5 Zellen gemessen wurden. Die durchgängige Linie wurde mittels der Hill-Gleichung berechnet. Daraus ergaben sich folgende IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten: (■) Mecamylamin $IC_{50}=2,8 \pm 0,2 \mu M$, $n_H=0,8 \pm 0,1$; (▼) Methyllycaconithin $IC_{50}=1,4 \pm 0,1 \mu M$, $n_H=0,9 \pm 0,1$
(in Zusammenarbeit mit Dr. Marek Samochocki aus unserem Labor gemessen)

Nach Applikation der nikotinischen Agonisten Acetylcholin, Nikotin, Cytisin und Epibatidin wurden jeweils Ionenströme durch die Plasmamembran gemessen, deren maximale Amplitude mit Ausnahme von Cytisin vergleichbar waren. Der maximale Cytisin-induzierte Strom war im Verhältnis dazu nur halb so groß. Cytisin wirkt somit nur als partieller Agonist des humanen $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptors, wohingegen Acetylcholin, Nikotin und Epibatidin volle Agonisten dieses Rezeptors darstellen. Anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven wurden EC_{50} -Werte von $4,7 \pm 0,2$ nM für Epibatidin, von $4,8 \pm 0,5 \mu M$ für Cytisin, von $7,5 \pm 1,1 \mu M$ für Nikotin sowie $9,1 \pm 0,8 \mu M$ für Acetylcholin bestimmt (Abb. III.31), womit die Sensitivität des humanen $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptors gegenüber Epibatidin am höchsten war.

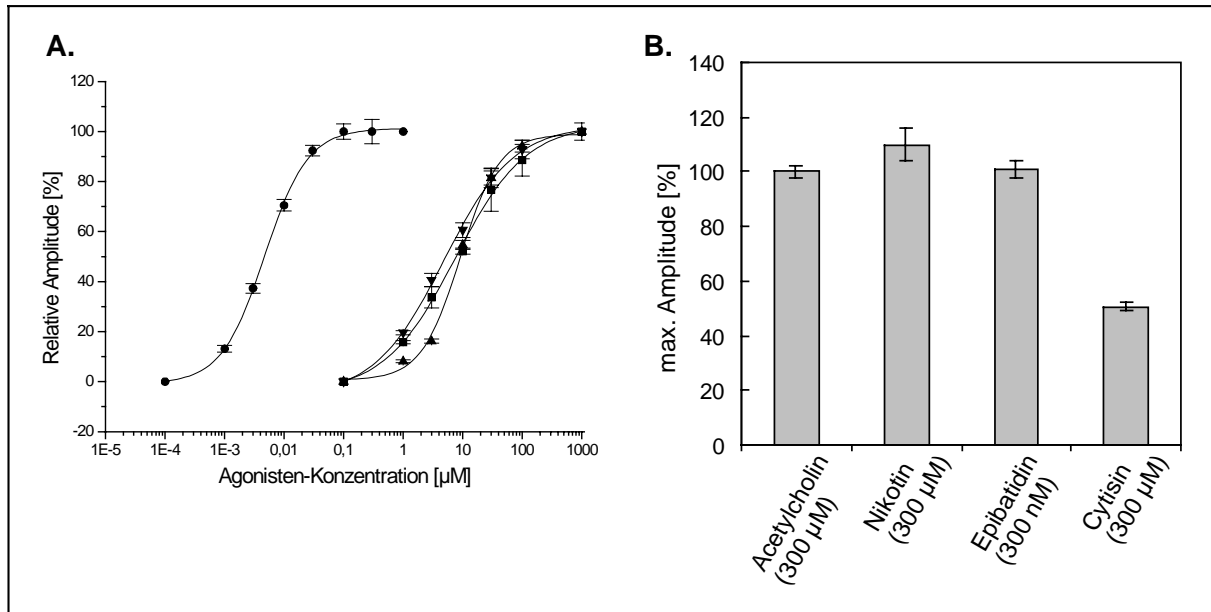


Abb. III.31: Ganzzellantworten der klonalen Zelllinie Hα6β4L⁺/1 auf nikotinsche Agonisten

- A.:** Dosis-Wirkungs-Kurven für typische nikotinsche Agonisten an Hα6β4L⁺/1-Zellen, normalisiert jeweils auf die für den Agonisten gemessene maximale Antwort. Die Meßpunkte stellen die durchschnittlichen Werte dar, die an jeweils 5 Zellen gemessen wurden. Die durchgängige Linie wurde nach der Hill-Gleichung berechnet. Daraus ergaben sich folgende EC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten: (■) Nikotin EC₅₀=7,5±1,1 μM, n_H=0,8±0,1; (●) Epibatidin EC₅₀=4,7±0,2 nM, n_H= 1,2±0,1; (▲) Acetylcholin EC₅₀= 9,1μM±0,8, n_H=1,3±0,2; (▼) Cytisin EC₅₀=4,8±0,5 μM, n_H=0,74±0,1.
- B.:** maximale Stromamplitude nach Applikation von 300 μM Acetylcholin, 300 μM Nikotin, 300 nM Epibatidin und 300 μM Cytisin normalisiert auf den Acetylcholin-induzierten Strom (in Zusammenarbeit mit Dr. Marek Samochocki aus unserem Labor gemessen)

Um den Einfluß von Calcium-Ionen auf die Funktion des humanen α6β4 nACh-Rezeptors zu untersuchen, wurden anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven die EC₅₀-Werte für Acetylcholin sowie die maximale Stromamplitude nach Acetylcholin-Stimulation ohne Calcium in der extrzellulären Lösung sowie bei einer extrazellulären Calcium-Konzentrationen von 2,5 mM bestimmt. In Gegenwart von Calcium (2,5 mM) wurde für Acetylcholin ein geringerer EC₅₀-Wert von 9,2 μM bestimmt (EC₅₀(ACh) = 19,1 μM in Abwesenheit von Calcium), was auf eine höhere Sensitivität des α6β4 nACh-Rezeptors gegenüber Acetylcholin in Gegenwart von Calcium schließen läßt (Abb. III.32). Des weiteren verdoppelte sich die maximal gemessene Stromamplitude nach einer Stimulation mit 1 mM Acetylcholin, wenn in den Ganzzellableitungen anstatt des Calcium-freien Puffers einer Puffer mit 2,5 mM Calcium als extrazelluläre Lösung verwendet wurde. Calcium-Ionen zeigen somit eine potenzierende Wirkung auf den humanen α6β4 nACh-Rezeptor (Abb. III.32).

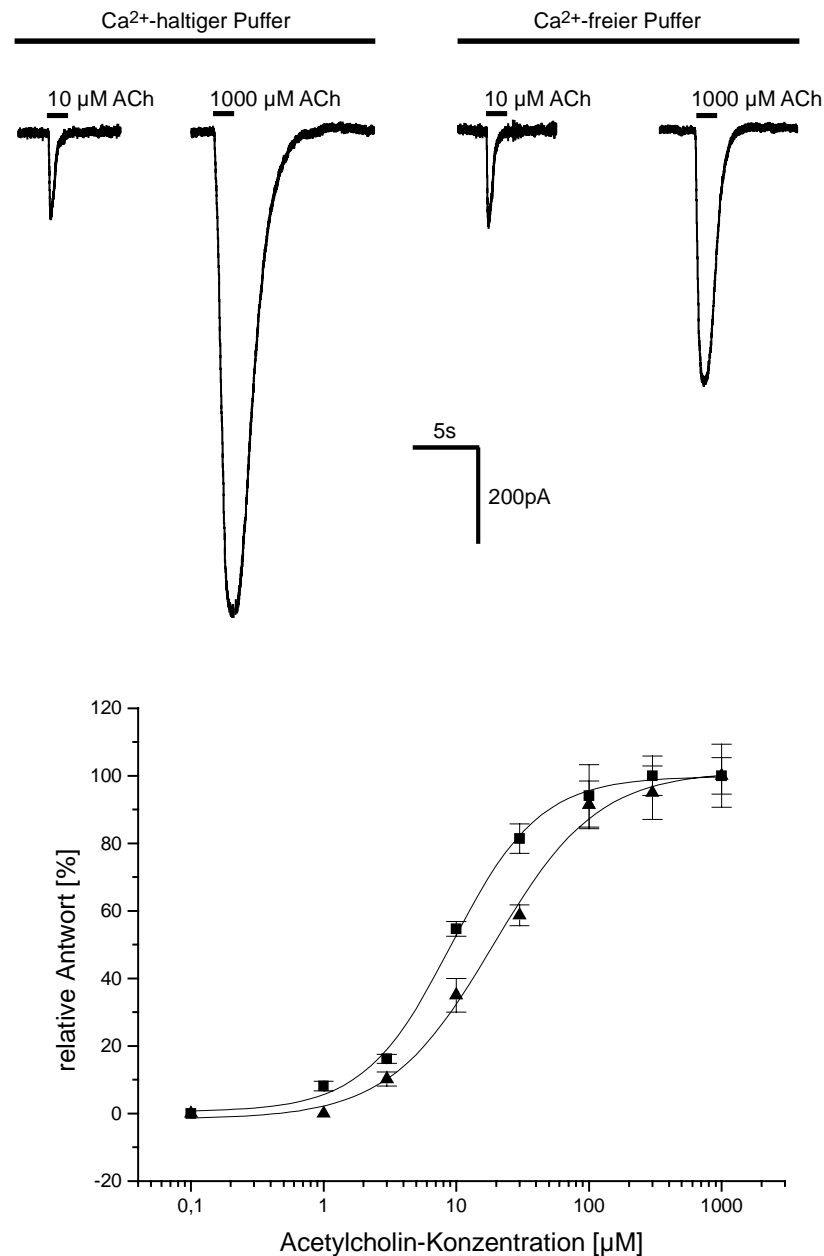


Abb. III.32: Acetylcholin-induzierte Ganzzellantworten an H α 6 β 4L⁺/1-Zellen in Abhängigkeit von der extrazellulären Calcium-Konzentration

Oben: Acetylcholin-induzierte Ganzzellantwort an H α 6 β 4L⁺/1-Zellen (10 μ M, 1000 μ M ACh), wobei als extrazelluläre Lösung ein Puffer mit 2,5 mM Calcium (links) oder ein Calcium-freier Puffer (rechts) verwendet wurde. Die Balken kennzeichnen den Zeitraum der Acetylcholin-Applikation.

Unten: Dosis-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin gemessen an der Zelllinie H α 6 β 4L⁺/1 ohne Calcium in der extrazellulären Lösung (▲) sowie bei einer extrazellulären Calcium-Konzentration von 2,5 mM (■). Die Meßpunkte stellen den Durchschnitt aus den an 5 Zellen gemessenen Werten dar. Die durchgezogene Linie wurde gemäß der Hill-Gleichung berechnet. Daraus ergaben sich folgende EC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten: 2,5 mM Ca²⁺ EC₅₀=9,21 μ M, n_H=1,3; ohne Ca²⁺ EC₅₀=19,1 μ M, n_H=1,14.

(in Zusammenarbeit mit Dr. Marek Samochocki aus unserem Labor gemessen)

Mit diesen elektrophysiologischen Messdaten konnte erstmalig ein heterolog in einer Säugerzelllinie exprimierter humaner α 6 β 4 nACh-Rezeptor pharmakologisch charakterisiert werden.

IV Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden wichtige neuronale nACh-Rezeptoren in HEK-293/ α 1-Zellen ektopisch exprimiert: der α 7 nACh-Rezeptor, einer der häufigsten nACh-Rezeptoren im ZNS, sowie α 6 enthaltende nACh-Rezeptoren, die in sehr begrenzten Gehirnbereichen (*Substantia nigra*, *Locus coeruleus*) vorkommen. In der humanen Karzinomzelllinie HEK-293/ α 1, die über einen L-Typ Calcium-Kanal verfügt, wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits der heteromere α 3 β 4 nACh-Rezeptor der Ratte funktionell exprimiert (Stetzer et al., 1996). Unerwarteterweise erwies sich jedoch die funktionelle Expression von α 7 nACh-Rezeptoren und α 6 enthaltenden nACh-Rezeptoren als schwierig. Deshalb wurde der Weg der Rezeptoren vom transkribierten Gen bis zur membranständigen Expression mit Hilfe verschiedener Methoden verfolgt.

Zur Lokalisation der nAChR-Untereinheiten in transfizierten Zellen wurde ein Nachweis-system auf der Basis EGFP-gekoppelter Proteine etabliert. Dabei wurde am Beispiel des α 3 β 4 nACh-Rezeptors zunächst gezeigt, daß EGFP-gekoppelte nACh-Rezeptoren sich in der Plasmamembran nachweisen lassen und mit Einschränkungen funktionell exprimiert werden.

Bei der heterologen Expression des α 7 nACh-Rezeptors stellte sich heraus, daß die Probleme nicht auf der Ebene der Transfektion, Transkription oder Assemblierung der α 7 nAChR-Untereinheiten liegen. Vielmehr resultiert die problematische Expression von α 7 nACh-Rezeptoren aus dem fehlenden Transport der Rezeptoren zur Plasmamembran.

Im Hinblick auf α 6 enthaltende nACh-Rezeptoren konnten die humanen nAChR-Untereinheiten α 6 und β 4 zusammen in der Plasmamembran von HEK-293/ α 1-Zellen lokalisiert werden, während homomere α 6 sowie die heteromeren nACh-Rezeptoren α 6 β 2 und α 6 β 3 intrazellulär exprimiert wurden. Für die Expression funktioneller α 6 β 4 nACh-Rezeptoren mußten die stabil transfizierten HEK-293/ α 1-Zellen über Nacht in Gegenwart von Transfektionslösung und anschließend für 30 Stunden bei 30°C kultiviert werden.

1 Untersuchungen zur funktionellen Expression nACh-Rezeptoren durch Fusion mit EGFP

Auf DNA-Ebene wurden verschiedene nAChR-Untereinheiten aus der Ratte und dem Menschen mit EGFP gekoppelt, um die Lokalisation der Fusionsproteine in den transfizierten Zellen direkt anhand der grünen Fluoreszenz des Fluoreszenzproteins EGFP verfolgen zu können.

EGFP besitzt eine Masse von 27 kDa, was ungefähr der Hälfte der Masse einer nAChR-Untereinheit entspricht. Infolgedessen mußte befürchtet werden, daß aufgrund der EGFP-Fusion die pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften eines oligomeren Ionenkanals beeinträchtigt würden. Das Problem wurde dadurch reduziert, daß die EGFP-

Fusion am extrazellulären C-Terminus der nAChR-Untereinheiten erfolgte, der nicht in die Ligandenbindung involviert ist. Die Bindung von Acetylcholin und anderen kompetitiven Liganden am ebenfalls extrazellulär lokalisierten, N-terminalen Bereich der nAChR-Untereinheiten (Maelicke, 1988; Changeux, 1990) dürfte somit kaum gestört werden.

Am Beispiel des bereits in der Vergangenheit funktionell in HEK-293-Zellen exprimierten $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors (Stetzer et al., 1996; Staudermann et al., 1998) zeigte sich, daß nach einer EGFP-Fusion das Fluoreszenzprotein als Reporter für eine erfolgreichen Transfektion und Expression von Untereinheiten des nACh-Rezeptors grundsätzlich geeignet ist. Unerwarteterweise war eine direkte Lokalisation der Fusionsproteine in der Plasmamembran anhand ihrer grünen Fluoreszenz nicht möglich, da die Fluoreszenz relativ homogen in den transfizierten Zellen verteilt war. Höchstwahrscheinlich werden aufgrund der Überexpression der EGFP-gekoppelten nAChR-Untereinheiten die grün fluoreszierenden Fusionsproteine sowohl in intrazellulären Kompartimenten (ER, Golgi-Apparat) als auch in der Plasmamembran relativ stark exprimiert, was zu einer starken Fluoreszenz in den verschiedenen Zellkompartimenten gleichermaßen führt und keine lokale Differenzierung erlaubt. Mit dem an den extrazellulären C-Terminus fusionierten EGFP stand jedoch ein Epitop für das GFP-Antiserum zur Verfügung, mit dessen Hilfe die EGFP-gekoppelten nAChR-Untereinheiten indirekt durch Immunfluoreszenzanalysen lokalisiert werden konnten.

Bei EGFP-gekoppelte $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden Zellen konnten nach Nikotin-Stimulation Ionenströme durch die Plasmamembran mittels patch-clamp-Analysen sowie Calcium-Einstrome mittels Calcium-Imaging gemessen werden. Der Nikotin-induzierte Calcium-Einstrom war durch den nikotinischen Antagonisten Mecamylamin vollständig blockierbar, womit die Funktionalität EGFP-gekoppelter $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren eindeutig bewiesen war. Eine Stimulation der nACh-Rezeptoren bewirkte durch Depolarisation der Plasmamembran die Öffnung der in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimierten spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle, wodurch ungefähr eine Verdopplung des nAChR-vermittelten Calcium-Einstroms erreicht wurde. Der Verstärkereffekt der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle erleichterte den Nachweis funktionell exprimierter nACh-Rezeptoren, was einen Vorteil für die Entwicklung von Screeningsystemen auf der Basis des Calcium-Imagings darstellt.

Die $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren und EGFP-gekoppelten $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren zeigten jedoch Unterschiede in ihren pharmakologischen Eigenschaften. So ist die Höhe des Nikotin-induzierten Calcium-Einstroms insbesondere bei EGFP-Fusion an die Liganden-bindenden α -Untereinheit oder an alle Untereinheiten des Rezeptors verringert [Nikotin-induzierter Calcium-Einstrom: $\alpha 3\beta 4 \geq \alpha 3\beta 4(G) > \alpha 3(G)\beta 4 > \alpha 3(G)\beta 4(G)$]. Dieses Ergebnis ließ auf eine verminderte Calcium-Leitfähigkeit oder Aktivierbarkeit EGFP-gekoppelter nACh-Rezeptoren schließen. Der elektrophysiologisch bestimmte EC_{50} -Wert für Nikotin ist bei $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren mit EGFP-Fusion an keiner oder jeder Untereinheit identisch. Mit der gleichen Methode wurde allerdings für nur an einigen Untereinheiten (α - oder β -Untereinheiten) EGFP-gekoppelten $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren ein um die Hälfte geringerer

EC₅₀-Wert für Nikotin berechnet. Die nur an den α - oder β -Untereinheiten EGFP-gekoppelten Rezeptoren zeigten somit eine höhere Sensitivität gegenüber Nikotin, die sich möglicherweise auf eine erleichterte Bindungsreaktion oder Kanalöffnung dieser Rezeptoren zurückführen lassen könnte. Im Hinblick darauf könnte in Zukunft die Anlagerung von Liganden an EGFP-gekoppelte nACh-Rezeptoren mittels Bindungsanalysen näher charakterisiert werden. Die gute Übereinstimmung des für humane $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren ohne EGFP-Fusion in der Literatur (Stauderman et al., 1998) veröffentlichten und des gemessenen EC₅₀(Nikotin)-Werts verdeutlicht die Reproduzierbarkeit der elektrophysiologischen Meßergebnisse dieser Arbeit.

	transiente Expression in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen				stabile Expression in HEK-293-Zellen
Humane nAChR	$\alpha 3(G)/\beta 4(G)$	$\alpha 3(G)/\beta 4$	$\alpha 3/\beta 4(G)$	$\alpha 3/\beta 4$	$\alpha 3/\beta 4$
EC ₅₀ (Nik)	37,6 \pm 1,5 μ M	13,5 \pm 0,3 μ M	12,7 \pm 0,8 μ M	39,9 \pm 3,1 μ M	40,3 μ M
Referenz	Vgl. Ergebnisse III.1.7.3				Staudermann et al., (1998)

Tab. IV.1: Vergleich der elektrophysiologisch bestimmten EC₅₀-Werte für Nikotin von $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren mit und ohne fusioniertem EGFP

Die jeweils EGFP-gekoppelte nAChR-Untereinheit wurde mit (G) gekennzeichnet.

Auf der Basis der durchgeführten Experimente zeigte sich, daß EGFP-gekoppelte nAChR-Untereinheiten sich grundsätzlich zur Lokalisation und für erste Analysen hinsichtlich der funktionellen Expression einer Kombination von nAChR-Untereinheiten eignen. Zur detaillierten pharmakologischen und kinetischen Charakterisierung der Rezeptoren sollte stets auf nACh-Rezeptoren ohne EGFP-Fusion zurückgegriffen werden.

2 Ektopische Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren

2.1 Ektopische Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

Da in unserem Labor und in anderen Arbeitsgruppen bereits eine Reihe neuronaler nACh-Rezeptoren aus Vertebraten erfolgreich in HEK-293-Zellen exprimiert wurden (Wong et al., 1995; Stetzer et al., 1996; Stauderman et al., 1998), erschien es sinnvoll, diese Säugerzelllinie auch für die Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors zu wählen.

Obwohl der homomere $\alpha 7$ nACh-Rezeptor eine hohe Calcium-Permeabilität (20 % Calciumanteil am Gesamtstrom; Seguela, et al., 1993) aufweist und die stabil in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimierten spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle den nAChR-vermittelten Calcium-Einstrom zusätzlich verstärken sollten, konnte nach Applikation verschiedener nikotinischer

Agonisten keine Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration in den 130 mit der cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit der Ratte transfizierten klonalen HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinien gemessen werden. Da die Nachweisbarkeit des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors mittels Calcium-Imaging aufgrund der schnellen Desensibilisierung und der kurzen Kanalöffnungszeiten dieses Rezeptors problematisch sein könnte, wurden zusätzlich Bindungsanalysen mit FITC-markiertem α -Btx durchgeführt. Dabei konnte keine Bindung dieses grün fluoreszierenden Liganden an die intakten Zellen der klonalen $R\alpha 7L^+$ -Zelllinien nachgewiesen werden, so daß die Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen unter den in unserem Labor etablierten Bedingungen (Stetzer et al., 1996) auszuschließen war.

Analyse zur Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit auf RNA-Ebene. Garcia-Guzman und seine Mitarbeiter beobachteten 1995 in chromaffinen Zellen aus dem Rind ein alternatives Splicing der für die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit kodierenden mRNA. Hier lag neben der mRNA mit einer für das vollständige $\alpha 7$ nAChR-Peptid kodierenden Basensequenz eine innerhalb der zweiten Transmembrandomäne (TM2) um 87 Nukleotide verkürzte mRNA vor, die bei einer Expression in Oocyten keine funktionellen Kanäle ausbildete (Garcia-Guzman et al., 1995).

In den stabil transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinien $R\alpha 7L^+$ wurde mittels Northern-Blot nur eine mRNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit mit einer Länge von 2,3 kb nachgewiesen, was eine erfolgreiche Transfektion der Zellen mit der cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit und deren Transkription eindeutig beweist. Somit läßt sich die erfolglose Expression eines funktionellen $\alpha 7$ nACh-Rezeptors nicht auf die Expression einer anderen Splicevariante zurückführen.

Nachweis des $\alpha 7$ nAChR-Proteins. Das heterolog in den HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimierte $\alpha 7$ nAChR-Protein zeigte im SDS-Gel eine geringere Mobilität als das aus dem Gehirn von Ratten isolierte $\alpha 7$ nAChR-Protein. In der SDS-PAGE wird die Eigenladung der Proteine durch die Anlagerung des negativ geladenen Detergenses Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt, woraufhin die Proteine im Spannungsfeld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Klonierung und Sequenzierung des einzigen amplifizierten RT-PCR-Produkts mit $\alpha 7$ -spezifischen Primern konnte zwar bewiesen werden, daß in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen eine mRNA mit der vollständigen Sequenz des kodierenden Bereichs des $\alpha 7$ nAChR-Gens transkribiert wird. Es wäre aber denkbar, daß posttranslational das Signalpeptid der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit mit einer Länge von 22 Aminosäuren (entspricht etwa 2,2 kDa) abgespalten wird. Eine Bestimmung der N-terminalen Sequenz des aus dem Rattengehirn isolierten $\alpha 7$ nAChR-Proteins könnte in Zukunft darüber Klarheit verschaffen.

Das Wanderungsverhalten glycosylierter Proteine im SDS-Gel wird durch die Oligosaccharidseitenketten zusätzlich verlangsamt. Mögliche Erklärungen für die unterschiedliche Mobilität des heterolog bzw. im Gehirn der Ratte exprimierten $\alpha 7$ nAChR-Proteins im SDS-Gel könnten somit auch Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation sein. Nach der Abspaltung aller Oligosaccharidseitenketten durch Endoglycosidasen müßte das im Ratten-

gehirn und das heterolog exprimierte $\alpha 7$ nAChR-Protein das gleiche Laufverhalten im Gel zeigen, was in Zukunft zu überprüfen wäre.

Die Aminosäuresequenz der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit weist drei potentielle N-Glycosylierungsstellen (N 46, N 90 und N 133) in ihrem N-terminalen Bereich auf. Durch die schrittweise Abspaltung von Zuckerresten mit Hilfe von Endoglycosidasen konnte von Chen und seinen Mitarbeitern (1998) gezeigt werden, daß bei einer funktionellen Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in Oocyten die drei potentiellen Glycosylierungsstellen glycosyliert werden. Mit der gleichen Methode ließ sich bei heterolog in COS-Zellen exprimierten $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren ebenfalls die Glycosylierung der drei potentiellen N-Glycosylierungsstellen nachweisen, obwohl in COS-Zellen ähnlich wie in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen eine funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren erfolglos war (Chen et al., 1998). Dabei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Zusammensetzung und die Verknüpfung der Zucker in den Kohlenhydratseitenketten der glycosylierten $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in COS-Zellen und Oocyten unterscheidet.

Analyse der Assemblierung $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren. Eine Assemblierung der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit zu oligomeren Proteinkomplexen aus mindestens vier Untereinheiten konnte in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen (am Beispiel der klonalen Zelllinie R $\alpha 7L^+$ /99) mittels Blau-nativer-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Dabei waren Monomere, Dimere und Trimere der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheiten nicht nachweisbar. Da nur ein Referenzprotein als Längenstandard in der 1. Dimension der Blau-nativen-Gelelektrophorese zur Verfügung stand, konnte die Assemblierung der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheiten zu exakt pentameren Proteinkomplexen jedoch nicht sichergestellt werden.

Lokalisation der $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren. Die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit wurde mit Hilfe von Biotinylierungsexperimenten sowie EGFP-Fusion in den klonalen HEK-293/ $\alpha 1$ -Zelllinien R $\alpha 7L^+$ und in transient transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen intrazellulär lokalisiert. Da das $\alpha 7$ nAChR-Protein mittels Western-Blot-Analysen in der Membranfraktion und nicht in der cytoplasmatischen Fraktion der stabil mit der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit transfizierten Zelllinien nachgewiesen wurde, muß die ektopisch exprimierte $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in intrazellulären Membranen wie dem endoplasmatisches Retikulum (ER) oder Golgi-Apparat von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen integriert sein. Die Probleme bei der Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen kann somit auf einen fehlenden Transport zur Plasmamembran zurückgeführt werden. Eine intrazelluläre Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit wurde in anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Cooper und Milar, 1997; Dineley und Patrick, 2000).

Für die intrazelluläre Expression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in HEK-293-Zellen werden verschiedene Ursachen diskutiert. Durch geschickte Konstruktion einer Reihe von $\alpha 7/5HT_3$ -Chimären wurden von Dineley und Patrick (2000) fünf Aminosäuren in der Transmembranregion TM1 der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit identifiziert (T202, M203, T207, C218 und V219), die den Transport dieser von intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran von COS-

Zellen beeinträchtigen. Auch nach der Mutation dieser Aminosäuren in der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit durch die entsprechenden Aminosäuren des 5HT₃-Rezeptors werden weniger $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren als chimäre $\alpha 7/5HT_3$ -Rezeptoren in der Plasmamembran von COS-Zellen exprimiert, was auf weitere Signale in der Aminosäuresequenz der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit C-terminal von der TM1-Region hinweisen könnte (Dineley und Patrick, 2000). Diese Experimente zeigen, daß bestimmte Aminosäuren in der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit den Transport zur Plasmamembran und damit die ektopische Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren verhindern.

Auch Abweichungen in der Tertiärstruktur der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit werden als Ursachen für eine Lokalisation in den intrazellulären Kompartimenten ER und Golgi-Apparat diskutiert. Für die Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur ist die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen den Cystein-Resten 189 und 190 innerhalb der Bindungstasche für Acetylcholin von entscheidender Bedeutung (Rakhilin et al., 1999). In neuronalen Zellen bewirken möglicherweise bisher nicht identifizierte zelltypische Faktoren (Faltungshelfer, assoziierte Proteine, andere nAChR-Untereinheiten) eine funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren. So wurde der $\alpha 7$ nACh-Rezeptor in der Vergangenheit in den Zelllinien PC12 sowie SH-SY5Y erfolgreich überexprimiert, die endogen $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren exprimieren (Puchacz et al., 1994, Blumenthal et al., 1997; Cooper und Milar, 1997).

2.2 Neue Ansätze zur funktionellen Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein fehlender Transport der exprimierten $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren zur Plasmamembran als Ursache für die erfolglose Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen identifiziert. Eine abweichende posttranslationale Modifikation des $\alpha 7$ nAChR-Proteins in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen konnte ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Infolgedessen wurden folgende Ansätze zum Erreichen einer funktionellen Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen verfolgt:

Koexpression eines Faltungshelfers. Die Expression des muskulären nACh-Rezeptors in der Plasmamembran von HEK-293-Zellen konnte von Chang und seinen Mitarbeitern 1997 durch eine Kotransfektion von Calnexin verdoppelt werden. Calnexin ist ein im ER exprimiertes Transmembranprotein, das die Faltung und die Assemblierung von oligomeren Glycoproteinen erleichtert (Vassilakos et al., 1996; Herbert et al., 1996). Bei einer Überexpression von nACh-Rezeptoren in HEK-293-Zellen scheint somit die vorhandene Menge an Calnexin ein limitierender Punkt für die korrekte Faltung und Assemblierung zu sein.

Nach der Transfektion der für humanes Calnexin kodierenden cDNA in die klonale Zelllinie R $\alpha 7L^+/99$ konnte in eigenen Versuchen durch Stimulation mit Nikotin in unterschiedlichen Konzentrationen kein Calcium-Einstrom mittels Calcium-Imaging nachgewiesen werden, was eine funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in den Zellen ausschließt. Eine zu

geringe Calnexinmenge ist somit nicht der limitierende Punkt für die funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen.

Temperaturabhängigkeit der Expression. Die membranständige Expression des $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptors der Ratte (Cooper S.T. et al., 1999) an der Zelloberfläche von TSA 201-Zellen wurde durch eine Kultivierung der transfizierten Zellen bei einer Temperatur von 30°C vervierfacht. Es wird angenommen, daß die gesteigerte Rezeptorexpression in der Plasmamembran durch optimierte Faltung und Assemblierung der Proteine zustande kommt.

Dieses Phänomen konnte in der vorliegenden Arbeit für den $\alpha 7$ nACh-Rezeptor nicht bestätigt werden. Zwar ließ sich das EGFP-gekoppelte $\alpha 7$ nAChR-Protein ebenfalls bei 30°C in den HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimieren, doch erfolgte ebenfalls bei der tieferen Temperatur kein Transport zur Plasmamembran der transfizierten Zellen.

Expression in Gegenwart nikotinischer Antagonisten. Ein Grund für die fehlgeschlagene Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen könnte eine cytotoxische Wirkung des Rezeptors sein, die auf die hohe Calcium-Leitfähigkeit des Rezeptors (Seguela et al., 1993) zurückgeführt werden könnte. Eine Aktivierung der $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren während der Kultivierung von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren überexprimierenden Zellen durch einen agonistisch wirkenden Bestandteil des Kulturmediums könnte zu einer Erhöhung der Calcium-Konzentration im Inneren der Zelle und damit möglicherweise zum Zelltod führen. Hierfür kommt insbesondere Cholin in Frage, das im Kulturmedium und möglicherweise auch im zugesetzten Serum enthalten ist und einen typischen Agonisten des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors darstellt (Albuquerque et al., 1997).

Für Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ, die eine vergleichbare Calcium-Leitfähigkeit wie $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren aufweisen, sind ebenfalls Schwierigkeiten bei der heterologen Expression beschrieben. Diese wurden durch eine Kultivierung der transfizierten Zellen in Gegenwart eines NMDA-Antagonisten erfolgreich gelöst (Priestley et al., 1995).

In eigenen Versuchen wurde in analoger Weise die Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen in Gegenwart der nikotinischen Antagonisten Hexamethonium (100 μ M) oder MLA (100 nM) untersucht. Die Antagonisten wurden jeweils in Konzentrationen oberhalb ihres IC₅₀-Werts eingesetzt, um eine vollständigen Blockade von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren zu gewährleisten. Um eine Zersetzung der Antagonisten ausschließen zu können, wurde das Kulturmedium mit den Antagonisten während der Kultivierung im Abstand von 24 Stunden durch frisches, den Antagonisten enthaltendes Kulturmedium ersetzt. Die Bindung von FITC-markiertem α -Btx an die Zelloberfläche von transient oder stabil mit der cDNA der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen konnte allerdings auch in Gegenwart der Antagonisten nicht nachgewiesen werden, was unter diesen Bedingungen die Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren ausschließt. Eine cytotoxische Wirkung des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors ist somit nicht für die erfolglose heterologe Expression dieses Rezeptors in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen verantwortlich.

Koexpression weiterer nAChR-Untereinheiten. Für die erfolgreiche funktionelle Expression $\alpha 7$ enthaltender nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen könnte auch die Gegenwart weiterer, eventuell noch unbekannter nAChR-Untereinheiten erforderlich sein. So konnte in sympathischen Neuronen des Hühnchens die Ausbildung heterooligomerer nACh-Rezeptoren (insbesondere mit der $\alpha 5$ nAChR-Untereinheit; Yu and Role, 1998 a, b) nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit war jedoch keine membranständige Expression der EGFP-gekoppelten $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit an der Zelloberfläche von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen in Kombination mit weiteren nAChR-Untereinheiten ($\alpha 5$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$) nachweisbar. Da in hippocampalen Neuronen der Ratte bisher nur die Expression homomerer $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren nachgewiesen wurde, bildet möglicherweise nur die $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit des Hühnchens heteromere Kanäle aus. Nicht auszuschließen ist, daß bislang nicht identifizierte nAChR-Untereinheiten zur Expression funktioneller $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren des Säugers erforderlich sind.

Expression in anderen Zelllinien als HEK-293. Da der embryonalen Karzinomzelllinie HEK-293/ $\alpha 1$ möglicherweise notwendige Komponenten für die funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren fehlen, wurden Zelllinien aus anderen Geweben zur Expression dieses nACh-Rezeptors eingesetzt. Die S2-Zelllinie aus *Drosophila melanogaster* wurde in Verbindung mit dem durch Kupferionen induzierbaren pMT/V5-His-Vektor (Invitrogen) verwendet, so daß eine mögliche toxische Wirkung der überexprimierten Rezeptoren zeitlich begrenzt werden konnte. Die neurale PCC7-Mz1-Zelllinie aus der Maus wurde aufgrund ihrer endogenen Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren ausgewählt, da diese Zellen über alle Voraussetzungen für die funktionelle Expression dieser nACh-Rezeptoren verfügen müßten. Des weiteren wurden QT6-Fibroblasten aus der Wachtel sowie GH4C1-Zellen, einer Karzinomzelllinie aus der Hypophyse der Ratte, auf ihre Fähigkeit einer plasmamembranständigen Expression $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren getestet, da die erfolgreiche funktionelle Expression des homomeren $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in diesen Zellen beschrieben wurde (Kassner und Berg, 1997; Quik et al., 1996).

Eine erfolgte Expression des EGFP-gekoppelten $\alpha 7$ nAChR-Proteins ließ sich in QT6-Fibroblasten, GH4C1-Zellen sowie S2-Zellen anhand der grünen Fluoreszenz des Fusionsproteins nachweisen. Allerdings war das $\alpha 7$ -Fusionsprotein nicht in der Plasmamembran der transfizierten S2-, QT6- und GH4C1-Zellen lokalisiert. In der Literatur ist eine intrazelluläre Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293-Zellen bestätigt (Cooper und Milar, 1997; Kassner und Berg, 1997). In der Vergangenheit sind jedoch auch funktionelle Expressionen homomerer $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in HEK-293-Zellen (Gopalakrishnan et al., 1995), QT6-Fibroblasten (Kassner und Berg, 1997) und GH4C1-Zellen (Quik et al., 1996) beschrieben worden. Möglicherweise wurden dabei seltene Varianten der jeweiligen Zelllinien verwendet, die zufällig alle Voraussetzungen für eine funktionelle Expression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren erfüllten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche zur Überexpression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in der neuronalen Zelllinie PCC7-Mz1, einem Zellmodell der neuronalen Differenzierung, durchgeführt. Aus anderen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, daß PCC7-Mz1-Zellen in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungszustand endogenen $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren exprimieren. Dabei ließ sich die Transkription der $\alpha 7$ nAChR mRNA bereits an Tag 3 nach Differenzierungsbeginn durch RA-Zugabe mittels RT-PCR nachweisen (Dissertation K. Pohl, 2000), während funktionelle $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren durch Calcium-Imaging und Ganzzellableitungen erst an Tag 6 der Differenzierung nachgewiesen werden konnten (Dissertation S. Xia, 1998).

In eigenen Experimenten war bei transient transfizierten PCC7-Mz1-Stammzellen die Expression des grün fluoreszierenden EGFP-gekoppelten $\alpha 7$ nAChR-Proteins nicht nachweisbar, so daß die Überexpression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in diesen Zellen bereits auf dem Niveau der Translation fehlschlug. Da PCC7-Mz1-Stammzellen sich unter den gleichen Bedingungen (Transfektionsmethode und Expressionsplasmid) mit der für EGFP kodierenden cDNA transfizieren ließen, konnten Transfektionsprobleme als Ursache für die problematische Überexpression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors ausgeschlossen werden. In Northern-Blot-Analysen hybridisierte die spezifische $\alpha 7$ -Sonde mit der aus transfizierten PCC7-Mz1-Stammzellen isolierten RNA von der erwarteten Länge bis zu kleineren Fragmenten. Ein Abbau der $\alpha 7$ nAChR mRNA durch zelleigene RNAsen könnte somit für die erfolglose Überexpression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren in PCC7-Mz1-Stammzellen verantwortlich sein.

Im Gegensatz dazu war das EGFP-gekoppelte $\alpha 7$ nAChR-Protein anhand seiner grünen Fluoreszenz in transfizierten PCC7-Mz1-Zellen an Tag 4 der Differenzierung eindeutig nachweisbar, wobei dieses sich allerdings nicht in der Plasmamembran mittels GFP-Antikörper lokalisieren ließ. Die Überexpression der $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit in der Zelllinie PCC7-Mz1 ist somit vom neuronalen Differenzierungsgrad der Zellen abhängig. Es wäre denkbar, daß zu einem späteren Zeitpunkt der neuronalen Differenzierung in PCC7-Mz1-Zellen auch eine funktionelle Überexpression von $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren möglich ist. Dies sollte anhand stabiler Transfektionen dieser Zelllinie mit der $\alpha 7$ nAChR cDNA in einem induzierbaren Expressionsplasmid überprüft werden. Nach transienten Transfektionen ist die Expressionshöhe des transfizierten Gens nur innerhalb von 72 Stunden für Analysen ausreichend und differenzierte PCC7-Mz1-Zellen lassen sich nur schwer transfizieren. Eine stabil $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren überexprimierende PCC7-Mz1-Zelllinie würde eine Charakterisierung der Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors zu jedem beliebigen Zeitpunkt des neuronalen Differenzierungsprozesses ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit keine funktionelle Expression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors in einer der hier ausgewählten Zelllinien erreicht werden. Offensichtlich benötigt dieser nAChR-Subtyp im Gegensatz zu $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren sehr spezifische Voraussetzungen für seine funktionelle Expression, die in weiteren Experimenten identifiziert und

charakterisiert werden müssen. Da homomere $\alpha 8$ nACh-Rezeptoren bisher ebenfalls nicht funktionell in Säugerzellen exprimiert werden konnten (Cooper und Milar, 1998), scheinen homomere nACh-Rezeptoren im allgemeinen besondere (noch unbekannt) Voraussetzungen für ihre funktionelle Expression zu benötigen.

3 Ektopische Expression humaner $\alpha 6$ enthaltender nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen

3.1 Untersuchungen zur Membranständigkeit $\alpha 6$ enthaltender nACh-Rezeptoren

Auf der Basis EGFP-gekoppelter Proteine konnten die humanen nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ durch indirekter Immunfluoreszenzanalysen in der Plasmamembran von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen lokalisiert werden. Unter den gleichen Versuchsbedingungen ließen sich homomere $\alpha 6$ nACh-Rezeptoren oder die heteromeren nACh-Rezeptoren $\alpha 6\beta 2$ sowie $\alpha 6\beta 3$ nicht in der Plasmamembran dieser Zelllinie nachweisen. Da funktionell exprimierte nACh-Rezeptoren zur Plasmamembran transportiert werden, konnte aufgrund der Immunfluoreszenzanalysen eine funktionelle Expression von homomeren $\alpha 6$ nACh-Rezeptoren oder heteromeren $\alpha 6\beta 2$ sowie $\alpha 6\beta 3$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen ausgeschlossen werden. In der Literatur wird beschrieben, daß diese Rezeptoren sich in Oocyten ebenfalls nicht funktionell exprimieren lassen (Kuryatov et al., 2000).

Eine Assemblierung der $\beta 3$ nAChR-Untereinheit in Oocyten zu funktionellen nACh-Rezeptoren wird in der Literatur nur in Kombination mit zwei weiteren nAChR-Untereinheiten ($\alpha_x\beta_x\beta 3$) beschrieben (Groot-Kormelink et al., 1998). Aufgrund der häufigen Kolo-kalisation der $\alpha 6$ mit der $\beta 3$ nAChR-Untereinheit in natürlichem Gewebe (LeNovere et al., 1996; Vailati et al., 1999 und 2000) wäre es interessant, ob die drei nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$, $\beta 4$ und $\beta 3$ gemeinsam in der Plasmamembran von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimiert werden.

3.2 Funktionelle Expression humaner $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren

Obwohl die humanen nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ sich gemeinsam in der Plasmamembran lokalisieren ließen, konnten funktionell exprimierte $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren unter den in unserem Labor etablierten Bedingungen in transient oder stabil transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen nicht nachgewiesen werden. Um eine funktionelle Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in diesen Zellen zu erreichen, wurde zunächst die Expressionstemperatur von 37°C auf 30°C erniedrigt. Nach einer Expressionsphase bei 30°C bewirkte die Applikation von Epibatidin einen starken Calcium-Einstrom bei transient $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren

exprimierende HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen. Des Weiteren waren bei stabil $\alpha 6\beta 4$ nAChR transfizierten HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen nach Epibatidin-Stimulation Ionenströme elektrophysiologisch nachweisbar, so daß durch die Erniedrigung der Temperatur auf 30°C die Expression funktioneller $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen erreicht wurde. Bei den stabil $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden Zelllinien H $\alpha 6\beta 4L^+$ war allerdings unter den gleichen Expressionsbedingungen nur ein geringer oder kein Epibatidin-induzierter Calcium-Einstrom in Calcium-Imaging-Analysen nachweisbar. Erst eine Kultivierung unter Transfektionsbedingungen nach der Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode und anschließend bei 30°C bewirkte bei stabil exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren einen Epibatidin-induzierten Calcium-Einstrom, dessen Höhe mit den transienten Experimenten vergleichbar war. Offensichtlich wird erst unter diesen Voraussetzungen die Plasmamembran nach Stimulation der $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren ausreichend depolarisiert, um durch Aktivierung der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle den nAChR-vermittelten Calcium-Einstrom zu verstärken und damit den Nachweis der funktionell exprimierten nACh-Rezeptoren mittels Calcium-Imaging zu ermöglichen. Aufgrund dieser Analysen wurde deutlich, daß die Transfektionsbedingungen neben der Temperatur für die Entwicklung eines Screeningsystems für den humanen $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor auf der Basis des Calcium-Imagings entscheidend sind. Erst unter den neuen Expressionsbedingungen wurde mit der klonalen Zelllinie H $\alpha 6\beta 4L^+/1$ analog zur stabilen Expression des $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptors der Ratte in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen (Stetzer et al., 1996) ein Zellsystem etabliert, das die Wirkstoffsuche nach spezifischen Liganden des humanen $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor in relativ kurzer Zeit mittels Calcium-Imaging erlaubt.

Die verbesserte Expression unter den neuen Expressionsbedingungen (Kultivierung unter Transfektionsbedingungen und anschließend bei 30°C) wurde mit Hilfe EGFP-gekoppelter nACh-Rezeptoren näher untersucht. Dabei ließen sich in der Plasmamembran mehr $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren als bei Standardkultivierung der Zellen bei 37°C nachweisen, wobei die exprimierte Proteinmenge unverändert blieb. So konnte die erfolgreiche funktionelle Expression auf einen optimierten Transport zur Plasmamembran zurückgeführt werden. Eine analoge Steigerung der plasmamembranständigen Expression von nACh-Rezeptoren nach Erniedrigung der Temperatur auf 30°C wird in dieser Arbeit für $\alpha 3\beta 4$ nACh-Rezeptoren bestätigt und in der Literatur ebenfalls für $\alpha 4\beta 2$ nACh-Rezeptoren (Cooper et al., 1999) beschrieben. Der Transport zur Plasmamembran von HEK-293-Zellen ist somit bei verschiedenen nAChR-Subtypen temperaturabhängig. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß bei tieferen Temperaturen mehr Zeit für korrekte Faltung sowie Assemblierung verbleibt, wodurch mehr nACh-Rezeptoren in die Plasmamembran exprimiert werden.

Wie bereits erwähnt, war eine Kultivierung unter Transfektionsbedingungen essentiell, um die funktionell exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren mittels Calcium-Imaging nachweisen zu können. Dabei reichte es nicht aus, eine Komponenten der normalerweise verwendeten Transfektionslösung (Endkonzentration im Transfektionsmedium: NaCl 12,7 mM; Na₂HPO₄ 68,2 μ M; BES 2,3 mM; CaCl₂ 11,4 mM) zuzugeben. Die Wirkung der Transfektions-

bedingungen insgesamt kommt vermutlich durch die höhere Calcium-Konzentration während der Transfektion zustande. Mittels Ganzzellaufleitungen an stabil $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren exprimierenden HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen konnten wir eine potenzierende Wirkung von extrazellulärem Calcium auf die Agonist-induzierten Ionenströme zeigen. Dabei war die Stromamplitude nach Nikotin-Stimulation (1 mM) bei einer extrazellulären Calcium-Konzentration von 2,5 mM ungefähr doppelt so hoch als bei Calcium-freiem Puffer (2,5 mM Ca^{2+} : 900 pA; 0 mM Ca^{2+} : 500 pA). In der Literatur wird für extrazelluläre Calcium-Ionen eine potenzierende Wirkung auf native und heterolog exprimierte neuronale nACh-Rezeptoren ebenfalls bestätigt (Mulle et al., 1992; Vernino et al., 1992).

3.3 Pharmakologische Eigenschaften humaner $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren

Mit den an der klonalen Zelllinie H $\alpha 6\beta 4$ L⁺/1 durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen konnte erstmalig der humane $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren stabil in einer Säugerzelllinie exprimiert und pharmakologisch charakterisiert werden. Da die humanen nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ einzeln jeweils intrazellulär in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimiert werden, kann man die gemessenen Daten dem heteromeren $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor eindeutig zuordnen.

Die anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmten EC_{50} -Werte verschiedener nikotinischer Agonisten (Acetylcholin, Nikotin, Cytisin und Epibatidin) stimmen im Rahmen der Meßgenauigkeit für in der Zelllinie und bei in Oocyten exprimierten humanen $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren überein. Die Bindungsaffinität der $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren gegenüber verschiedenen Agonisten ist somit unabhängig davon, in welchem Expressionssystem die Rezeptoren exprimiert wurden. So wirkt Epibatidin als potentester Agonist schon in nanomolaren Konzentrationen, während für die nikotinischen Agonisten Acetylcholin, Nikotin und Cytisin mikromolare Konzentrationen zur Aktivierung der Rezeptoren notwendig sind. Vom Expressionssystem ist es jedoch abhängig, ob Nikotin und Epibatidin als vollständige oder partielle Agonisten des $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptors wirken (Tab. III.2). Der maximal gemessene Ionenstrom nach Applikation von Acetylcholin, Nikotin und Epibatidin war bei stabil in HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren vergleichbar (Kap. III.3.8), wohingegen der maximale Ionenstrom bei in Oocyten exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren nach Applikation von Nikotin oder Epibatidin nur 15 - 45 % des Acetylcholin-induzierten maximalen Ionenstroms erreicht (Kuryatov et al., 2000). Offensichtlich ist die Aktivierbarkeit durch Epibatidin und Nikotin bei in Oocyten exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren vermindert. Da jedoch die anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmten EC_{50} -Werte für Nikotin und Epibatidin übereinstimmen, sollte die Bindung dieser pharmakologischen Substanzen an den $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor unabhängig vom verwendeten Expressionssystem sein. Abweichungen in der Tertiärstruktur könnten die Kopplung der Bindungsreaktion mit der Kanalöffnung bei den in Oocyten exprimierten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren beeinträchtigen.

Da die in HEK-293/ α 1-Zellen stabil exprimierten α 6 β 4 nACh-Rezeptoren durch verschiedene Agonisten gleichermaßen aktiviert werden, kann auf eine vollständig funktionelle Expression von humanen α 6 β 4 nACh-Rezeptoren in der klonalen Zelllinie H α 6 β 4L^{+/1} geschlossen werden.

Tab. 4.2: Die pharmakologischen Eigenschaften von humanen α 6 β 4 nACh-Rezeptoren, die in unterschiedlichen Expressionssystemen exprimiert wurden

Aufgeführt sind die pharmakologischen Eigenschaften humaner α 6 β 4 nACh-Rezeptoren, die in HEK-293/ α 1-Zellen stabil (klonale Zelllinie H α 6 β 4L^{+/1}) oder in Frosch-Oocyten transient exprimiert wurden. Der nach Stimulation mit 300 μ M Acetylcholin gemessene Strom wurde gleich 100 % gesetzt. Mec: Mecamylamin; ACh: Acetylcholin; Nik: Nikotin; Cyt: Cytisin; Epi: Epibatidin; n.b.: nicht bestimmt.

	Frosch-Oocyten	HEK-293/ α 1
EC ₅₀ (Nik)	7,1 \pm 2,6 μ M	8,6 \pm 1,1 μ M
max. Strom	ACh: 100 % Nik/Cyt/Epi: 15 – 40 %	ACh: 100 % Nik: 124 % Cyt: 50,6 % Epi: 101 %
Affinität	Epi >> ACh > Nik \approx Cyt	Epi >> ACh \approx Nik \approx Cyt
IC ₅₀ (Mec)	n.b.	3,0 μ M
Referenz	Kuryatov et al., 2000	III.2.8

4 Ausblick

Da die funktionelle Expression homomerer α 7 nACh-Rezeptoren aufgrund der intrazellulären Expression dieser Rezeptoren in Säugerzellen ein besonderes Problem darstellt, sollte in Zukunft nach Ursachen für den gestörten Transport zur Plasmamembran gesucht werden. In der neuronalen PCC7-Mz1-Zelllinie ist die endogene Expression funktioneller α 7 nACh-Rezeptoren von der neuronalen Differenzierung abhängig. So konnte die funktionelle Expression von α 7 nACh-Rezeptoren ab Tag 6 der Differenzierung nachgewiesen werden. Eine Charakterisierung der Veränderungen im Expressionsmuster zu diesem Zeitpunkt mittels RNA-Differential-Display könnte möglicherweise zur Identifikation entscheidender Faktoren (bisher unbekannte nAChR-Untereinheiten, Faltungshelfer oder assoziierte Proteine) für eine funktionelle Expression von α 7 nACh-Rezeptoren führen. Nach Klonierung dieser Gene könnte deren Wirkung durch transiente Transfektion in die stabil α 7 nACh-Rezeptoren

exprimierenden HEK-293/ α 1-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, überprüft werden

Erste Hinweise in der Literatur zeigen, daß bestimmte Aminosäuren in der Sequenz der α 7 nAChR-Untereinheit für den fehlgeschlagenen Transport zur Plasmamembran der HEK-293/ α 1-Zellen verantwortlich sind. Möglicherweise könnte eine erfolgreiche Expression des α 7 nACh-Rezeptors auch durch einen Austausch von weiteren Aminosäuren im C-terminalen Bereich der α 7 nAChR-Untereinheit durch entsprechende Aminosäuren des plasmamembranständig exprimierten 5HT₃-Rezeptor ermöglicht werden.

Da im Gehirn der Ratte die α 6 nAChR-Untereinheit mit weiteren nAChR-Untereinheiten exprimiert wird (Tab.I.1), werden möglicherweise in vivo auch α 6 β 4 β_x oder α 6 β 4 α_x nACh-Rezeptoren gebildet. Die hergestellte klonale α 6 β 4 nACh-Rezeptoren exprimierende Zelllinie H α 6 β 4L⁺/1 kann dazu eingesetzt werden, die Auswirkungen der Koexpression weiterer nAChR-Untereinheiten auf die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des α 6 β 4 nACh-Rezeptors zu untersuchen. Dabei müßte zunächst geklärt werden, welche weiteren nAChR-Untereinheiten plasmamembranständig gemeinsam mit den nAChR-Untereinheiten α 6 und β 4 exprimiert werden. Durch transiente Expression der entsprechenden EGFP-gekoppelten nAChR-Untereinheit in H α 6 β 4L⁺/1-Zellen sollte diese Frage durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit dem GFP-Antiserum zu beantworten sein.

V Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Versuche zur funktionellen Expression von zwei humanen, schwer ektopisch exprimierbaren nACh-Rezeptoren in HEK-293/ α 1-Zellen durchgeführt: dem homopentameren α 7 nACh-Rezeptor und dem heteropentameren α 6 β 4 nACh-Rezeptor. Die Probleme lagen dabei nicht auf dem Niveau der Transfektion, Transkription oder Translation der Untereinheiten, sondern beim Transport der Rezeptoren zur Plasmamembran.

Um diese Probleme zu analysieren, wurden folgende Methoden angewendet: Die Expression der Rezeptoren auf mRNA- und Protein-Ebene wurde zunächst mittels Northern-Blot, Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Western-Blot sichergestellt. Durch Blau-native-Gelelektrophorese nach Schägger wurde anschließend der Assemblierungszustand der Rezeptoren untersucht. Zur Lokalisation der nAChR-Untereinheiten in den transfizierten Zellen wurde ein Nachweissystem auf der Basis EGFP-gekoppelter Proteine etabliert. Dabei wurde zunächst anhand des ektopisch gut exprimierbaren α 3 β 4 nACh-Rezeptors gezeigt, daß EGFP-gekoppelte nAChR-Untereinheiten grundsätzlich durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit dem GFP-Antiserum in der Plasmamembran lokalisiert werden können. Des weiteren ließ sich die Funktionalität EGFP-gekoppelter nACh-Rezeptoren nachweisen, wobei die pharmakologischen Eigenschaften des α 3 β 4 nACh-Rezeptors durch die EGFP-Fusion beeinflußt wurden. Infolgedessen sollte für die pharmakologische und elektrophysiologische Charakterisierung auf Rezeptoren ohne EGFP-Fusion zurückgegriffen werden. Die Funktionalität von Rezeptoren wurde mittels Bindung von Liganden, Calcium-Imaging und Ganzzelleableitungen untersucht.

Auf der Basis dieser Experimente waren funktionell exprimierte α 7 nACh-Rezeptoren in stabil mit der cDNA der α 7 nAChR-Untereinheit transfizierten HEK-293/ α 1-Zellen nicht nachweisbar, obwohl in diesen Zellen die Transkription einer für die α 7 nAChR-Untereinheit kodierenden mRNA sowie die Translation eines α 7 nAChR-Proteins bewiesen werden konnte. Allerdings zeigte das ektopisch exprimierte im Vergleich zu dem aus Rattengehirn isolierten α 7 nAChR-Protein im SDS-Gel eine geringere Mobilität, was möglicherweise auf eine unterschiedliche posttranslationale Modifikation in HEK-293/ α 1-Zellen schließen läßt. In den stabil transfizierten Zellen war eine Assemblierung der α 7 nAChR-Untereinheit zu Proteinkomplexen aus mindestens vier Untereinheiten nachweisbar. In weiteren Experimenten bleibt die Stöchiometrie der α 7 nACh-Rezeptoren aus exakt fünf Untereinheiten zu überprüfen. Die exprimierten α 7 nACh-Rezeptoren wurden in HEK-293/ α 1-Zellen intrazellulär lokalisiert, so daß die problematische Expression von α 7 nACh-Rezeptoren auf den fehlenden Transport zur Plasmamembran zurückgeführt werden konnte.

Eine membranständige Expression an der Zelloberfläche von HEK-293/ α 1-Zellen konnte durch verbesserte Expressionsbedingungen (Koexpression des Faltungshelfers Calnexin oder weiterer nAChR-Untereinheiten, Erniedrigung der Expressionstemperatur, Expression in Gegenwart nikotinischer Antagonisten) nicht optimiert werden. Auch in anderen Zelllinien mit

neuronaalem oder nicht-neuronaalem Ursprung (QT6, GH4C1, S2 und PCC7-Mz1) konnte die EGFP-gekoppelte $\alpha 7$ nAChR-Untereinheit nur im Zellinneren lokalisiert werden. Eine Charakterisierung der entscheidenden Faktoren für den Transport des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors zur Plasmamembran in endogen $\alpha 7$ nACh-Rezeptoren exprimierenden Zellen könnte in Zukunft eine funktionelle Expression dieses Rezeptors ermöglichen.

Außerdem wurden Versuche zur ektopischen Expression humaner $\alpha 6$ enthaltender nACh-Rezeptoren durchgeführt. Dabei ließen sich heteromere $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren in der Plasmamembran von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen nachweisen, während homomere $\alpha 6$ nACh-Rezeptoren sowie die heteromeren nACh-Rezeptoren $\alpha 6\beta 2$ und $\alpha 6\beta 3$ nur im Zellinneren dieser Zellen lokalisiert wurden. Nach stabiler Transfektion von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen mit den cDNAs der nAChR-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ konnten funktionelle $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren mittels Calcium-Imaging erst nachgewiesen werden, wenn diese Zellen vor den Messungen mit Transfektionslösung behandelt und anschließend bei 30°C kultiviert worden waren. Unter den neuen Expressionsbedingungen war eine erhöhte membranständige Expression von EGFP-gekoppelten $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren an der Zelloberfläche von HEK-293/ $\alpha 1$ -Zellen nachweisbar. So konnte die erfolgreiche funktionelle Expression von $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptoren auf einen optimierten Transport zur Plasmamembran zurückgeführt werden. Die Wirkung der Transfektionslösung kann durch die erhöhte Calcium-Konzentration im Medium nach ihrer Zugabe erklärt werden, da in Ganzzelleableitungen eine potenzierende Wirkung von Calcium-Ionen auf den $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor bewiesen wurde. Mit der Zelllinie H $\alpha 6\beta 4L^+/1$ wurde erstmalig der humane $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptor in einer Säugerzelllinie stabil exprimiert und funktionell charakterisiert. Hiermit konnte ein sehr sensitives Screeningsystem für die Wirkstoffsuche nach spezifischen Liganden des $\alpha 6\beta 4$ nACh-Rezeptors auf der Basis des Calcium-Imagings etabliert werden.

Die während dieser Arbeit etablierten Expressionsbedingungen (Kultivierung mit Transfektionslösung und anschließend bei 30°C) sollten in Zukunft eine funktionelle Expression weiterer bisher schwer exprimierbarer nACh-Rezeptoren in Säugerzellen ermöglichen.

VI Literaturverzeichnis

Albuquerque E.X., Pereira E., F.R., Mike A., Eisenberg H.M., Maelicke A., Alkondon M. (2000) Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: physiological and clinical relevance. *Behav. Brain Res.* **113**: 131-141

Albuquerque E.X., Alkondon M., Pereira E., Castro N., Schratzenholz A., Barbosa C., Bonfante-Cabarcas R., Aracava Y., Eisenberg H., Maelicke A. (1997) Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**: 1117-1136

Alkondon M., Albuquerque E.X. (1993) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. Part I: Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**: 1455-1473

Alkondon M., Rocha E.S., Maelicke A., Albuquerque E.X. (1996) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in olfactory bulb neurons and presynaptic modulation of glutamate release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**: 1460-1471

Anand R., Conroy W.G., Schoepfer R., Whiting P., Lindstrom J. (1991) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **266**: 11192-11198

Arnold S.E., Trojanowski J.Q. (1996) Recent advances in defining the neuropathology of schizophrenia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **92**: 217-231

Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extracting procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids Res.* **7**: 1523-1532

Blumenthal E.M., Conroy W.G., Romano S. J., Kassner P.D., Berg D.K. (1997) Detection of functional nicotinic receptors blocked by α -bungarotoxin on PC12 cells and dependence of their expression on post-translational events. *J. Neurosci.* **17(16)**: 6094-6104

Boulter J., Conolly J., Deneris E.S., Goldman D., Heinemann S., Patrick J. (1987) Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 7763-7767

Broide R., Leslie F. (1999) The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol. Neurobiol.* **20** (1): 1-16

Buisson B., Gopalakrishnan M., Arneric S., Sullivan J., Bertrand D. (1996) Human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor in HEK293 cells: A patch-clamp study. *J. Neurosci.* **16(24)**: 7880-7891

Calpham D.E. (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268

Carey K.L., Richards S.A., Loundsbery K.M., Macara I.G. (1996) Evidence using a green fluorescent protein-glucocorticoid that the RAN7TC4 GTPase mediates an essential function independent of nuclear protein import. *J. Cell Biol.* **133** (5): 985-996

- Chang W., Gelman M.S., Prives J.M. (1997) Calnexin-dependent enhancement of nicotinic acetylcholine receptor assembly and surface expression. *J. Biol. Chem.* **272**: 28925-28932
- Chen C., Okayama H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7(8)**: 2745-2752
- Choli D:W: (1987) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**: 623 - 634
- Clarke P.B. (1995) Nicotinic receptors and cholinergic transmission in the central nervous system. *Ann. NY Acad. Sci.* **757**: 73-83
- Claudio T., Paulson H.L., Green W.N., Ross A.F., Hartman D.S., Hayden D. (1989) Fibroblasts transfected with torpedo acetylcholine receptor β -, γ -, δ -subunit cDNAs express functional receptors when infected with a retroviral α recombinant. *J. Cell Biol.* **108**: 2277 - 2290
- Claudio T., Green W.N., Hautman D.S., Hayden D., Paulson H.L., Sigworth F.J., Sine S.M., Swedlund A. (1987) Genetic reconstitution of functional acetylcholine receptors in mouse fibroblasts. *Science* **238**:1688-1693
- Coleman R. (1992) Current drug therapy for parkinson's disease. *Drugs Aging* **2**:112-124
- Colquhoun D, Odgen D.C. (1986) States of the nicotinic acetylcholine receptor: enumeration, characterization and structure, in: Structure and Functions of the Nicotinic Acetylcholine Receptor (Maelicke, A., ed), pp 197-218, NATO ASI Series H: *Cell Biology*, vol **3**, Springer Presse Berlin
- Colquhoun D., Sakmann B. (1985) Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J. Physiol. (Lond)* **369**: 501-557
- Cooper S.T., Harkness P.C., Baker E.R., Cooper N.S. (1999) Up-regulation of cell-surface $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors by lower temperature and expression of chimeric subunits. *J. Biol. Chem.* **274(38)**: 27145-27152
- Cooper E., Couturier S., Ballivet M. (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal acetylcholine receptor. *Nature* **350**: 235-238
- Cooper S.T, Milar N.S. (1997) Host cell-specific folding and assembly of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit. *J. Neurochem.* **68**: 2140-2151
- Cooper S.T, Milar N.S. (1998) Host cell-specific folding of the neuronal nicotinic receptor $\alpha 8$ subunit. *J. Neurochem.* **70**: 2585-2593
- Cormack B.P., Valdivia R., Falkow S. (1996) FACS-optimized of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38
- Corringer P.J., Galzi J.L., Eisele J.L., Bertrand S., Changeux J.P., Bertrand D. (1995) Identification of a new component of the agonist binding site of the nicotinic alpha 7 homooligomeric receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 11749-11752

- Costa A., Patrick J., Dani J. (1994) Improved technique for studying ion channel expression in *Xenopus* oocytes, including fast perfusion. *Biophys. J.* **67**: 1-7
- Couturier J., Erkman C., Valera S., Rungger D., Bertrand S., Boulter J., Ballivet M., Bertrand D. (1990) $\alpha 3$, $\alpha 5$ and non- $\alpha 3$: three clustered avian genes encoding neuronal acetylcholine receptor-related subunits. *J. Biol. Chem.* **265**: 17560-17567
- Delacourte A., Defossez A. (1986) Alzheimer's disease : Tau proteins, the promoting factors of microtubuli assembly, are major components of paired, helical filaments. *J. Neurol. Sci.* **76**:173-186
- Deneris E.S., Conolly J., Rogers S.W., Duvoisin R. (1991) Pharmacological and functional diversity of the neuronal acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 34-40
- Dineley K.T. und Patrick J. (2000) Amino acid determinants of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor surface expression. *J. Biol. Chem.* **275**: 13974-13985
- Doherty A.J., Coutinho V., Collingridge G.L., Henley J.M. (1999) Rapid internalization and surface expression of a functional, fluorescently tagged G-protein-coupled glutamate receptor. *Biochem. J.* **341**: 415-422
- Duvoisin R.M., Deneris E.S., Patrick J., Heinemann S. (1989) The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor is increased by a novel subunit: $\beta 4$. *Neuron* **3**: 487-496
- Eisele J.L., Bertrand S., Galzi J.L., Devillers-Thiery A., Changeux J.P., Bertrand D. (1993) Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* **366**: 479-483
- Elgoyhen A.B., Johnson D.S., Boulter J., Vetter D.E., Heinemann S. (1994) $\alpha 9$: An acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* **79**: 705-715
- Fehrenbacher A. (2000) Konstruktion und stabile funktionelle Expression von chimären nikotinischen $\alpha 7$ -Acetylcholinrezeptoren in einer Säugerzelllinie. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6
- Fenwick E.M., Marty A., Neher E. (1982) A patch clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol. (Lond.)* **331**: 577-597
- Fischer U., Reinhardt S., Albuquerque E.X., Maelicke A. (1999) Expression of functional alpha7 nicotinic acetylcholine receptor during mammalian muscle development and denervation. *Eur. J. Neurosci.* **11(8)**:2856-2864
- Flicker L. (1999) Acetylcholinesterase inhibitors for alzheimer's disease. *Br. Med. J.* **318**: 615-616

- Forsayeth J.R., Franco A., Rossi A., Lansman J.B., Hall Z.W.b (1990) Expression of functional mouse muscle acetylcholine receptor in CHO-cells. *J. Neurosci.* **10**: 2771-2779
- Freedman R., Coon H., Myles-Woresly M., Orr-Urteger A., Olincy A., Davis A., Polymeropoulos M., Holik J., Hopkins J., Hoff M., Rosenthal J., Waldo M.C., Reimherr F., Wender P., Yaw J., Young D.A., Breese C.R., Adams C., Patterson D., Adler L.E., Kruglyak L., Leonard S., Byerley W.(1997) Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 587-592
- Freedman R., Hall M., Adler L.E., Leonard S. (1995) Evidence in the postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **38**: 22-23
- Fucile S., Matter J., Erkman L., Ragozzino D., Barabino B., Grassi F., Alema S., Ballivet M., Eusebi F. (1998) The neuronal $\alpha 6$ subunit forms functional heteromeric acetylcholine receptors in human transfected cells. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 172-178
- Galzi J.L., Changeux J.P. (1995) Neuronal nicotinic receptors: molecular organisation and regulations. *Neuropharmacology* **34** : 563-582
- Garcia-Guzman M., Sala F., Sala S., Campos-Caro A., Stühmer W., Gutierrez L.M., Criado M. (1995) α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: Molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the $\alpha 7$ subunit. *Eur. J. Neurosci.* **7**: 647-655.
- Gelman M.S. und Prives J.M. (1996) Arrest of the subunit folding and assembly of the nicotinic acetylcholine receptors in cultured muscle cells by dithiothreitol. *J. Biol. Chem.* **271**: 10709-10714
- Gerzanich V., Kuryatov A., Anand R., Lindstrom J. (1997) `Orphan` $\alpha 6$ nicotinic AChR subunit can form a functional heteromeric acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* **51**:320-327
- Gerzanich V., Anand R., Lindstrom J. (1994) Homomers of $\alpha 8$ and $\alpha 7$ subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties. *Mol. Pharmacol.* **45**: 212-220
- Giraudat, 1987J., Dennis M., Heidmann T., Haumont P.-Y., Lederer F., Changeux J.-P. (1987) Structure of the the high affinity site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor:[^3H]chlorpromazine labels homologous residues in the β and δ chains. *Biochemistry* **26**: 2410-2418
- Glenner G.G., Wong C.W., Quaranta V., Eanes E.D. (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl. Pathol.* **2**: 357-369
- Göldner F.M., Dineley K.T., Patrick J.W. (1997) Imunohistochemical localization of the nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 6$ to dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport* **8**: 2739-2742

- Gopalakrishnan M., Buisson B., Touma E., Giordano T., Campbelle J.E., Hu I.C., Donnelly-Roberts D., Arneric S.P., Bertrand D., Sullivan J.P. (1995) Stable expression and pharmacological properties of the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **290**: 237-246
- Graham F.L., Smiley J., Russell W., Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type. *S.J.Gen. Virol.* **36**: 59-74
- Graham F.L., Van der EB A.J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **52**: 456-467
- Gray T., Rajan A.S., Radcliffe K.A., Yakehiro Y., Dani J.A. (1996) Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* **383**: 713-716
- Groot-Kormelink P.J., Luyten W.H.M.L., Colquhoun D., Sivilotti L.G. (1998) A reporter mutation approach shows incorporation of the 'orphan' subunit $\beta 3$ into a functional nicotinic receptor. *J. Biol. Chem.* **273**:15317-15320
- Groot-Kormelink P.J., Luyten W.H.M.L. (1997) Cloning and sequence of full-length cDNAs encoding the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits $\beta 3$ and $\beta 4$ and expression of seven nAChR subunits in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and/or IMR 32. *FEBS Letters* **400**: 309-314
- Guan ZZ., Zhang X., Blennow K., Nordberg A. (1999) Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport* **10(8)**: 1779-1782
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakman B., Sigworth F.J. (1981) Improved patch-clamp-techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100
- Hanahan D. (1985) Techniques for transformation of E. coli. In: Glove, D.M., DNA cloning volume 1. A practical approach. IRL Press, Oxford: 109-135
- Hebert D.N., Foellmer B., Helenius A. (1996) Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO* **15**: 2961-2968
- Heinemann S., Boulter J., Connolly J., Goldman D., Evans K., Treco D., Ballivet M., Patrick J. (1986) In: structure and function of the nicotinic acetylcholine receptor. NATO ASI Series H: *Cell biology*, vol **3**: 359-387 Springer Verlag Berlin
- Htun H., Barsony J., Gould D., Hager G.L. (1996) Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with the green fluorescent protein chimera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4845-4850
- Hucho F. (1986) The nicotinic receptor and its ion channel. *Eur. J. Biochem.* **158**: 211-226
- Hunganir R.L., Greengard P. (1990) Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron* **5**: 555 -567

- Imoto K., Methfessel C., Sakmann B., Mishina M., Mori Y., Konno T. Fukuda K., Kurasaki M., Bujo H., Fujita Y., Numa S. (1986) Location of a delta-subunit region determining the ion transport through the acetylcholine receptor channel. *Nature* **324**: 670-674
- Imoto K., Busch C., Sakmann B., Mishina M., Mori Y., Konno T. Fukuda K., Kurasaki M., Bujo H., Fujita Y., Numa S. (1988) Rings of negatively charged amino acids determining the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* **335**: 645-648
- Karlin A., Akabas M.H. (1995) Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* **15**: 1231-1244
- Kassner P.D., Berg D.K. (1997) Differences in the fate of neuronal acetylcholine receptor protein expressed in neurons and stably transfected cells. *J. Neurobiol.* **33**: 968-982
- Katz B., Thesleff S. (1957) A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end plate. *J. Physiol.* **138**: 63-80
- Kihara T., Shimohama S., Sawada H., Kimur J., Kume T., Kochiyama H., Maeda T., Akaike A. (1997) Nicotinic receptor stimulation protects neurones against β -amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* **42**: 159-163
- Kleppisch T., Pederson K., Strübing C., Bosse-Doenecke E., Flockerzi V., Hoffmann F., Hescheler J. (1994) Double-pulse facilitation of smooth muscle alpha1-subunit Ca^{2+} -channels expressed in CHO-cells. *EMBO* **13**: 2502-2507
- Kramer G, Gräwe W. (1994) Messung von Calcium-Ionen in Cortex-Zellen. *Bio. Tec. Nr.2*: 14-19
- Kuryatov A., Olale J., Cooper C., Choi C., Lindstrom J. (2000) Human $\alpha 6$ nAChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses. *Neuropharmacol.* **39**: 2570-2590
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lang E., Mazauric-Stüker M.L., Maelicke A. (1989) States of developmental commitment of a mouse embryonal carcinoma cell line differentiating along a neuronal pathway. *J. Cell Biol.* **109**: 2481-2493
- Lang K., Wells F., Jenner P., Marsden P. (1993) Altered muscarinic and nicotinic receptor densities in cortical and subcortical regions in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **60**: 197-203
- Lena C., Changeux J.P. (1998) Allosteric nicotinic receptors, human pathologies. *J. Physiol.* **92**: 63-74
- Lena C., Changeux J.P. (1993) Allosteric modulations of the nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Neurosci.* **16**: 181-186

- Le Novere N., Zoli M., Changeux J.P. (1996) Neuronal nicotinic receptor alpha6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **8**: 2428-2449
- Le Novere N., Zoli M., Lena C., Ferrari R., Picciotto M.R., Merlo-Pich E., Changeux J.P. (1999) Involvement of $\alpha 6$ nicotinic receptor subunit in nicotine-elicited locomotion, demonstrated by in vivo antisense oligonucleotide infusion. *Neuroreport* **10**: 2497-2501
- Lindstrom J. (1997) Nicotinic acetylcholine receptors in Health and Disease. *Mol. Neurobiol.* **15**(2): 193-222
- Lloyd G., Davidson L., Hornykiewicz O. (1975) The neurochemistry of Parkinson's disease effect of L-DOPA therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **195**: 453-464
- Lukas R.J. (1998) Cell lines as models for studies of nicotinic acetylcholine receptors. In: Neuronal nicotinic receptors: Pharmacology and therapeutic Opportunities, Wiley-Liss Inc Seite 81 –97
- Maelicke A., Schrattenholz A., Samochocki M., Radina M., Albuquerque E.X. (2000) Allosterically potentiating ligands of nicotinic acetylcholine receptor as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav. Br. Res.* **113**: 199-206
- Maelicke A., Albuquerque E.X. (2000) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* **393**: 165-170
- Maelicke A., Albuquerque E.X. (1996) New approach to drug therapy of Alzheimer's dementia. *DDT* **2**: 53-59
- Maelicke A., Schrattenholz A., Storch A., Schroder B., Gutbrod O., Methfessel C., Weber K.H., Pereira E.F., Alkondon M., Albuquerque E.X. (1995) Noncompetitive agonism at nicotinic acetylcholine receptors: functional significance for CNS signal transduction. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **15**: 333-353
- Maelicke A., Schrattenholz A., Schroeder H. (1995b) Modulatory control by non-competitive agonists of nicotinic cholinergic neurotransmission in the central nervous system. *J. Neurosci.* **7**: 103-114
- Marshall J., Molloy R., Moss G.W.J., Howe J.R., Hughes T.E. (1995) The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* **14**: 211-215
- Morin J.G., Hastings J.W. (1971) Energy transfer in a bioluminescent system. *J. Cell. Physiol.* **77**: 313-318
- Moscovici M.G., Jimenez H., Lai M.M., Hayman M.J., Vogt P.K. (1977) Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail. *Cell* **11**: 95-103
- Mulle C., Lena C., Changeux J.P. (1992) Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* **8**:937-945

- Neher E., Steinbach J.M. (1978) Local anaesthetics transiently blocks currents through single acetylcholine channels. *J. Physiol.* **277**: 153-176
- Nordberg A., Svensson A.L. (1998) Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug saf.* **19**: 465-480
- Ogawa H., Inouye S., Tsuji F.I., Yasuda K., Umesono K. (1996) Localisation, trafficking and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11899-11903
- Olale F., Gerzanich V., Kuryatov A., Wang F., Lindstrom J. (1997) Chronic nicotinic exposure differentially affects the function of human $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**: 675-683
- Paulin D., Jacob H., Jacob F., Weber K., Osborn M. (1982) In vitro differentiation of mouse teratocarcinoma cells monitored by intermediate filament expression. *Differentiation* **22**: 90-99
- Pereira E.F., Reinhardt-Maelicke S., Schratzenholz A., Maelicke A., Albuquerque E.X. (1993) Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**: 1474-1491
- Pfeiffer S.E., Jakob H., Mikoshiba K., Dubois P., Guenet J.L., Nicolas J.F., Gaillard J., Chevance G., Jacob F. (1981) Differentiation of a teratocarcinoma line: preferential development of cholinergic neurons. *J. Cell Biol.* **88**: 57-66
- Pohl K. (2000) Quantitative Untersuchungen zur mRNA-Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren im Verlauf der neuralen Entwicklung der Zelllinie PCC7-Mz1. Dissertation, Gutenberg Universität, Mainz
- Priestley T., Laughton P., Myers J., Le Bourdelles B., Kerby J., Whiting P.J. (1995) Pharmacological properties of recombinant NMDA-receptors comprising NR1, NR2A and NR1, NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol. Pharmacol.* **48**: 841-848
- Prinz H., Maelicke A. (1992) Ligand binding to the membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata*: a complete mathematical analysis. *Biochem.* **31**: 6728-6738
- Puchacz E., Buisson B., Bertrand D., Lukas R.J. (1994) Functional expression of nicotinic acetylcholine receptors containing rat $\alpha 7$ subunits in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *FEBS letters* **354**: 155-159
- Quik M., Choremis J., Lukas R.J., Puchacz E. (1996) Similarity between rat brain nicotinic α -bungarotoxin receptors and stably expressed α -bungarotoxin binding sites. *J. Neurochem.* **67**: 145-154
- Quick M. (1987) Evidence for an involvement of membrane lipids in the control of neuronal nicotinic receptor function using bungarotoxin II-S1. *J. Neurochem.* **48**: 1761-1767
- Racliffe K.A., Fisher J.L., Gray R., Dani J.A. (1999) Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission in hippocampal neurons. *Ann. NY Acad. Sci.* **868**: 591-610

- Rakhilin S., Dridel R.C., Sagher D., McGehee D.S., Vallejo Y., Green W.N. (1999) α -bungarotoxin receptors contain $\alpha 7$ subunits in two different disulfide-bonded conformations. *J. Cell Biol.* **146**: 203-217
- Revah F., Galzi J.-L., Giraudat J., Haumont P.-Y., Lederer F., Changeux J.P. (1990) The noncompetitive blocker [3 H]-chlorpromazine labels three amino acids of the acetylcholine receptor γ subunit: implication for the α -helical organisation of the M2 segments and the structure of the ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4675-4679
- Role L.W. (1992) Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels *Curr. Op. in Neurobiol.* **2**: 254-262
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Spring Harbour Laboratory, New York
- Samochocki M., Zerlin M., Jostock R., Groot-Kromelink P.J., Luyten W.H.M., Albuquerque E.X., Maelicke A. (2000) Galantamine is an allosterically potentiating ligand of the human $\alpha 4/\beta 2$ nAChR. *Acta Neurol. Scand.* **102**: 1-2
- Schägger H., Cramer W.A., von Jagow G. (1994) Analysis of molecular mass and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**: 220-230
- Schoepfer R., Conroy W.G., Whiting P., Gore M., Linstrom J. (1990) Brain α -bungarotoxin binding proteins cDNAs and mAbs reveal subtypes of this branch of ligand-gated ion channel superfamily. *Neuron* **5**: 35-48
- Schrattenholz A., Godovac-Zimmermann J., Schäfer H.J., Albuquerque E.X., Maelicke A. (1993) Photoaffinity labeling of torpedo acetylcholine receptor by physostigmine. *Eur. J. Biochem.* **216**: 671-677
- Seguela P., Wadiche J., Dinley-Miller K., Dani J.A., Patrick J. (1993) Molecular cloning, functional properties and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* **13**: 596-604
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 223-227
- Sine S.M., Claudio T. (1991) Stable expression of the mouse nicotinic acetylcholine receptor in mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **266**: 13679-13689
- Staudermann K., Scott M., Akong M., Velicelebi G., Chavez-Noriega L., Crona J., Johnson E., Elliott K., Gillespie A., Reid R., Adams P., Harpold M., Corey-Naeve J. (1998) Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 4$ stably expressed in HEK-293 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**: 777-789
- Stetzer E., Ebbinghaus U., Storch A., Poteur L., Schrattenholz A., Kramer G., Methfessel C., Maelicke A. (1996) Stable expression in HEK-293 cells of the rat $\alpha 3/\beta 4$ subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS letters* **397**: 39-44

Stetzer E. (1997) Stabile Expression des nikotinischen Acetylcholinrezeptors in einer Säugerzelllinie. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Storch A., Schrattenholz A., Cooper J.C., Abdel Ghani E.M., Gutbrod O., Weber K.H., Rheinhardt S., Lobron Ch., Hermsen B., Soskic V., Pereira E.F.R., Albuquerque E.X., Methfessel Ch., Maelicke A. (1995) Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **290**: 207-219

Svensson A.L., Nordberg a. (1998) Tacrine interacts with an allosteric activator site on alpha4beta2 nAChRs in M10 cells. *Neuroreport* **7**: 2201-2205

Tashjian A.H. (1968) Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrin.* **82**: 342-352

Testai F.D., Venera G.D., Pena C., de Jimenez Bonino M.J. (2000) Histidine 186 of the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit requires the presence of the 192-193 disulfide bridge interact with alpha-bungarotoxin. *Neurochem. Int.* **36**: 27-33

Thomas A.P., Delaville F. (1991) The use of fluorescent indicators for measurement of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells , in: Cellular Calcium, A practical approach, McCormack J.G., Cobbold P.H., eds., 1-54

Tsien R.W., Ellinor P.T., Horne W.A. (1991) Molecular diversity of voltage-dependent calcium-channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 349-354

Vailati S., Hawke W., Bejan A., Barabino B., Longhi R., Balestra B., Moretti M., Clementi F., Gotti C. (1999) Functional $\alpha 6$ -containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Mol. Pharmacol.* **56**: 11-19

Vailati S., Morreti M., Balestra M., McIntosh M., Clementi F., Gotti C. (2000) $\beta 3$ subunit is present in different nicotinic receptor subtypes in chick retina. *Eur. J. Pharmacol.* **393**: 23-30

Valera S., Ballivet M., Bertrand D. (1992) Progesterone modulates a neuronal nicotinic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9949-9953

Vassilakos A., Cohen-Doyle M.F., Peterson P., Jackson M., Williams D. (1996) The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO* **15**: 1495-1506

Vernino S., Rogers M., Ragcliffe A., Dani J.A. (1994) Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* **14 (9)**: 5514-5524

Vernino S., Amardor M., Luetje C.W., Patrick J., Dani J.A. (1992) Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* **8**: 127-134

Vijayaraghavan S., Pugh P.C., Zhang Z., Rathouz M.M., Berg D.K. (1992) Nicotinic receptors that bind α -bungarotoxin on neurons raise intracellular free Ca^{2+} . *Neuron* **8**: 353-362

- Wada E., Wada A., Boulter J., Deneris E., Heinemann S., Patrick J., Swanson L.W. (1989) Distribution of $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\beta 2$ neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in rat. *J. Comp. Neurol.* **284**: 314-335
- Wang F., Gerzanich V., Wells G.B., Anand R., Peng X., Keyser K., Linstrom J. (1996) Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunit with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J. Biol. Chem.* **271**: 17656-17665
- Warpman U., Nordberg A. (1995) Epibatidine and ABT 418 reveal selective losses of alpha4beta2 nicotinic receptors in Alzheimer brains. *Neuroreport* **6**: 2419-2423
- Whitehouse P., Martino A., Marcus K., Zweig R., Singer H., Price D., Kellar K. (1988) Reduction in acetylcholine and nicotinic binding in several degenerative disease. *Arch. Neurol.* **45**: 722-724
- Whiting P.J., Schoepfer R., Lindstrom J., Priestley T. (1991) Structural and pharmacological characterization of the major brain acetylcholine receptor subtype stably expressed in mouse fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* **40**: 463-472
- Wong E.T., Sheldon G.H., Mennerick S.J., Hong S.E., Zorumski C.F., Isenberg K.E., (1995) Pharmacological and physiological properties of a putative ganglionic nicotinic receptor, $\alpha 3\beta 4$ expressed in transfected eukaryotic cells. *Mol. Brain Res.* **28**: 101-109
- Wonnacott S. (1997) Presynaptic nicotinic ACh-receptors. *Trends Neurosci.* **20**: 92-98
- Xia, S. (1998) Expression of glutamate receptor subtypes in an in vitro model of neural development. Dissertation, Johannes Gutenberg Universität, Mainz
- Xiao Y., Meyer E.L., Thompson J.M., Surin A., Wroblewski J., Kellar K.J. (1998) Rat $\alpha 3/\beta 4$ subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor stably expressed in a transfected cell line: Pharmacology of the ligand binding and function. *Mol. Pharmacol.* **54**: 322-333
- Yang, T.T., Cheng L., Kain S.R. (1996) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensibility with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4592-4593
- Yu C.R., Role L.W. (1998 a) Functional contribution of the $\alpha 7$ subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurones. *J. Physiol.* **509**: 651-665
- Yu C.R., Role L.W. (1998 b) Functional contribution of the $\alpha 5$ subunit to neuronal nicotinic channels expressed by chick sympathetic ganglion neurons. *J. Physiol.* **509**: 667-681
- Zhang Z., Vijayaraghavan S., Berg D.K. (1994) Neuronal acetylcholine receptors that bind α -Bungarotoxin with high affinity function as ligand-gated ion channels. *Neuron* **12**: 167-177