

Heterologe Expression einer funktionellen Domäne des nikotinischen Acetylcholinrezeptors

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Cornelia Toepfer
aus Berlin

2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chemie - Biochemie des Fachbereichs Biologie/Chemie/Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Hucho angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Hucho Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie der Freien Universität Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Reutter Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Ort und Tag der Disputation: Berlin, 12. September 2002

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung	1
1.1 Synaptische Signaltransduktion	1
1.2 Struktur des nikotinischen Acetylcholinrezeptors	2
1.3 Bisher bekannte Teilstrukturen von anderen Ionenkanälen	10
1.4 Aufgabenstellung: Untersuchung der Struktur einer Proteindomäne	15
2 Ergebnisse.....	16
2.1 Nachweis der erfolgreichen Expression der intrazellulären Domäne	16
2.2 Expression in Insektenzellen.....	16
2.2.1 Baculovirus-Expression (pFastBac-Vektor).....	16
2.2.2 Baculovirus-Expression (pBSV-8His-Vektor).....	21
2.2.3 Transfektion von Sf9-Zellen.....	22
2.3 Expression in Escherichia coli	24
2.3.1 Expression der delta-Schleife	25
2.3.2 Expression der alpha7-Schleife	25
2.4 Expression in zellfreien Systemen	32
2.4.1 Rapid Translation System™ (Roche).....	32
2.4.2 Cell-Free Protein Biosynthesis™ (RiNA GmbH).....	36
3 Diskussion der Ergebnisse	39
3.1 Expression in Sf9-Insektenzellen.....	39
3.2 Expression in E. coli	41
3.3 In vitro-Expression.....	44
3.4 Ausblick	46
4 Zusammenfassung	49
5 Summary	51
6 Material und Methoden	53
6.1 Methoden zur Proteinbestimmung	53
6.1.1 Bestimmung nach Bradford.....	53
6.1.2 Bestimmung nach der BCA-Methode	53
6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
6.3 Western Blot.....	55
6.3.1 Elektroblothing nach dem Semi-dry-Verfahren	55
6.3.2 Proteinfärbung auf der Blotmembran	55
6.3.3 Immunfärbung eines Western Blots	56
6.4 Molekularbiologische Methoden	58
6.4.1 Agarose-Gelelektrophorese	58
6.4.2 Anzucht von Bakterien	58
6.4.3 Herstellung kompetenter E. coli	59
6.4.4 E. coli-Transformation.....	59

6.4.5	Analytische Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	60
6.4.6	Präparative Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	61
6.4.7	DNA-Elution aus Agarosegelen	61
6.4.8	DNA-Konzentrationsbestimmung	61
6.4.9	Restriktionsverdau	62
6.4.10	Ligation von DNA-Fragmenten	62
6.4.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	63
6.4.12	DNA-Sequenzierung	64
6.5	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	64
6.6	Zellkultur von Sf9-Insektzellen	66
6.6.1	Anzucht und Pflege der Insektzellen	67
6.6.1.1	Auftauen von Insektzellen	67
6.6.1.2	Monolayer-Kultur	67
6.6.1.3	Suspensionkultur	68
6.6.1.4	Bestimmung der Viabilität	68
6.6.1.5	Anlegen von Zellkonserven	68
6.6.2	Transfektion der Sf9-Zellen mit Baculoviren	69
6.6.2.1	Herstellung der Baculovirus-DNA	69
6.6.2.2	Herstellung kompetenter DH10BAC- <i>E. coli</i>	69
6.6.2.3	Transformation des pFastBac-Plasmides in DH10BAC- <i>E. coli</i>	70
6.6.2.4	Isolation der Bacmid-DNA	71
6.6.2.5	Transfektion der Insektzellen	72
6.6.2.6	Amplifikation rekombinanter Baculoviren	72
6.6.2.7	Bestimmung des Virustiters	73
6.6.2.8	Expression durch rekombinante Baculoviren	74
6.6.3	Transiente Transfektion der Sf9-Zellen	75
6.6.4	Stabile Transfektion der Sf9-Zellen	75
6.7	Indirekte Immunfluoreszenz von transfizierten Zellen	76
6.8	Membranpräparation aus transfizierten Zellen	77
6.9	Reinigung von exprimierten Proteinen	78
6.9.1	Ni-NTA-Chromatographie	78
6.9.2	Gluthation-Sepharose-Chromatographie	79
6.10	In vitro-Expression	80
6.10.1	System der Firma Roche	80
6.10.2	System der Firma RiNA	81
6.11	Massenspektrometrische Analyse von Peptiden	81
6.12	Peptidsequenzierung nach Edman	82
6.13	Materialien	82
7	Literaturverzeichnis	84
8	Anhang	90
8.1	Vektorkarten und verwendete Sequenzen	90
8.1.1	Vektorkarten	90
8.1.1.1	Expression in Sf9-Zellen durch Baculoviren	90
8.1.1.2	Expression in Sf9-Zellen durch Transfektion	92
8.1.1.3	Expression in <i>E. coli</i> (mit His6-Tag)	93

8.1.1.4	Expression in E. coli (GST-Fusionsprotein)	95
8.1.1.5	Expression In vitro im RTS-System™	96
8.1.2	Sequenzen der exprimierten Fusionsproteine.....	97
8.1.2.1	alpha-Schleife in pFastBac1-GST	97
8.1.2.2	beta-Schleife in pFastBac1-GST	97
8.1.2.3	gamma-Schleife in pFastBac1-GST.....	97
8.1.2.4	delta-Schleife in pFastBac1-GST.....	98
8.1.2.5	delta-Schleife in pBSV-8His.....	98
8.1.2.6	delta-Schleife in pMIB/V5-His.....	98
8.1.2.7	alpha7-Schleife in pGEX-4T-1	99
8.1.2.8	delta-Schleife (komplett) in pET-15b	100
8.1.2.9	delta-Schleife (-7N) in pET-28a.....	100
8.1.2.10	delta-Schleife (-10C) in pET-28a.....	100
8.2	MALDI-Komplettspektrum	101
8.3	MALDI-PSD-Spektrum	102
8.4	Abkürzungen und Einheiten.....	104
8.5	Eigene Veröffentlichungen	107
8.6	Lebenslauf	108
8.7	Danksagung.....	109