

3 Diskussion der Ergebnisse

3.1 Expression in Sf9-Insektenzellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten intrazelluläre Domänen verschiedener Untereinheiten des AChR heterolog exprimiert werden. Schwierigkeiten bei der Expression unter nativen Bedingungen machten es erforderlich, das Methodenspektrum über die Insektenzell-Expression hinaus zu erweitern.

Insektenzellen wurden zuerst als Wirtsorganismus ausgewählt, weil in diesen eukaryontischen Zellen Proteine mit ihren posttranslationalen Modifikationen hergestellt werden können. Das Vorhandensein dieser Modifikationen sollte eine native Faltung des hergestellten Proteins erleichtern. Das Ziel war, aus der Zellkultur ohne Verwendung von Detergentien eine große Menge der gewünschten intrazellulären Domänen der α -, β -, γ - und δ -Untereinheiten herstellen und aufreinigen zu können. Dazu wurde das schon teilweise etablierte Baculovirus-Expressionssystem für Sf9-Zellen weiter ausgebaut. Mit Hilfe der Baculoviren können DNA-Sequenzen in die Zellen eingeschleust und unter dem Viruspromotor in hoher Konzentration in das entsprechende Protein translatiert werden. Insektenzellen lassen sich bei entsprechender Laborausstattung schnell in großen Mengen heranziehen, und es ist eine Vielzahl an entsprechenden Medien und Vektoren erhältlich.

Das System muss für jedes Protein optimiert werden, was durch die Amplifikationen der Viren mehrere Monate in Anspruch nehmen kann. Zunächst mussten die entsprechenden DNA-Sequenzen für die verschiedenen intrazellulären Schleifen ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ aus *Torpedo californica*) in den Vektor pFastBac eingebracht werden. Dann folgten zahlreiche Amplifikations- und Selektionsschritte, bevor die erste Expression gestartet werden konnte. Auch mit größter Sorgfalt bei der Selektion der rekombinanten Baculoviren ist es nicht immer möglich, die Vermehrung des Wildtypvirus während der Amplifikationen auszuschließen. Der rekombinante Virus vermehrt sich durch die insertierte DNA langsamer als der Wildtyp, im Fall der Verunreinigung der rekombinant hergestellten Viren nimmt deren Konzentration über die Amplifikationen immer mehr ab.

Nicht alle Proteine können über das Baculovirus-System hergestellt werden, denn bei hoher Expression ist die Gefahr der Aggregation der Proteine sehr groß. Die Zellen hatten zwar teilweise große Mengen des intrazellulären Schleifen-Proteins exprimiert, es jedoch scheinbar in Aggregaten „gelagert“, die nur schwer aufzuschließen

waren. Bei einem lytischen Expressionssystem wie der Baculovirus-Expression müssen die Zellen für jeden Expressionsversuch neu herangezogen, infiziert und geerntet werden, um das Protein reinigen zu können. Unter den zu dieser Zeit herrschenden Bedingungen (es war zunächst noch kein Zelllabor für die Arbeit mit den Zellen vorhanden) war es schwierig, für jede Expression Zellen in demselben Wachstumsstadium heranzuziehen. Dadurch ist es anfangs unmöglich gewesen, die Ergebnisse der Expressionen zu reproduzieren.

In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele für erfolgreiche Proteinexpressionen mit Hilfe des Baculovirus-Systems. Die Anwendungen gehen sogar bis zur Expression ganzer Rezeptormoleküle, wie zum Beispiel dem Androgen-Rezeptor.^[56] In der Arbeitsgruppe von J. T. Dalton wurde dieser Rezeptor in großer Menge von den Insektenzellen hergestellt, allerdings war der Hauptteil des Proteins unlöslich und nicht funktionell. Erst durch aufwendige Renaturierungs-Prozeduren mit Hilfe des Liganden und DTT konnten erfolgreiche Bindungsstudien mit den exprimierten Proteinen durchgeführt werden. Einen ähnlichen Ansatz wie in der vorliegenden Arbeit verfolgte die Arbeitsgruppe von H. W. Klein. Die intrazelluläre Domäne der β -Untereinheit des Insulin-like Growth Faktor-Rezeptors I (IGF-1 R) wurde in Baculovirus-infizierten Insektenzellen mit einer Ausbeute von bis zu 5 mg/l Zellkultur hergestellt.^[57] Diese Domäne hat Autophosphorylierungs-Eigenschaften, die auch bei dem renaturierten rekombinanten Protein gezeigt werden konnten. Auch in einer anderen Arbeit wurden 6 mg/l Zellkultur der rekombinanten Folylpoly- γ -Glutamat-Synthetase aus Insektenzellen isoliert, allerdings gab es hier Probleme mit den nach der Infektion schnell absterbenden Zellen.^[58] Bei der Aufarbeitung des Proteins war die Anwesenheit von Protease-Inhibitoren und DTT notwendig. Das gereinigte Enzym aggregierte nach etwa einer Woche auch bei Aufbewahrung bei 0 °C und präzipitierte selbst aus Lösungen von nur 0,1 mg/ml. Erst die Zugabe von 50 % Glycerol und Octylglucosid stabilisierte das Enzym so weit, dass die Lösungen über einige Monate aufbewahrt werden konnten. In einer anderen Arbeit wird von geringerer Expressionsrate in Suspensionskultur im Vergleich zur Monolayer berichtet.^[59] Es zeigen sich also selbst bei erfolgreich durchgeführten Expressionen Schwierigkeiten mit der Löslichkeit der rekombinanten Proteine, bei der Reinigung und Stabilisierung muss je nach Protein die Prozedur teilweise aufwendig optimiert werden. Nicht erfolgreiche Expressionsversuche lassen sich erwartungsgemäß in der einschlägigen Literatur nicht finden.

Um die beschriebenen Probleme zu umgehen, wurde statt der Baculovirus-Infektion die direkte Transfektion der Insektenzellen mit der rekombinanten DNA etabliert. Dazu wurde ein Vektor verwendet, der neben einem His₆-Tag und einem V5-Tag zur besseren Detektion und zur Reinigung des exprimierten Proteins auch für eine Signalsequenz zum Export des Proteins in das Zellkulturmedium kodiert. In den transient transfizierten Zellen wurde das δ -Schleifenprotein produziert, allerdings nicht wie gewünscht aus den Zellen in das Kulturmedium ausgeschleust. Das Protein konnte in den Zellen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz zwar eindeutig nachgewiesen, allerdings nicht in nachweisbaren Mengen isoliert werden. Die Expressionsraten bei transfizierten Zellen sind geringer als nach der Baculovirus-Infektion. Die direkte Transfektion hat aber den Vorteil, dass das Verfahren nicht lytisch und insofern gut kontrollierbar und reproduzierbar ist. Mit Hilfe einer variablen DNA-Menge, die zur Transfektion eingesetzt wird, kann die Transfektionsrate und damit schließlich auch die Expression des gewünschten Proteins reguliert werden.

Durch Selektion der transfizierten Zellen mit Blasticidin konnte eine stabil transfizierte Zelllinie etabliert werden, die reproduzierbar das δ -Schleifenprotein mit einem His₆- und einem V5-Tag exprimiert. Allerdings war auch bei den stabil transfizierten Zellen kein Export des Proteins in das Medium zu detektieren. Die Zellen wachsen aber gut und lassen sich auch nach Lagerung in flüssigem Stickstoff ohne Probleme wieder rekultivieren.

Nach einigen Reinigungsversuchen aus den stabil transfizierten Zellen wurden mehrere Mikrogramm des exprimierten Proteins erhalten, die allerdings nicht in reiner Form isoliert werden konnten. Durch die Reinigung über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie wurden auch andere Histidin-reiche Proteine der Insektenzellen angereichert. Nach den anschließenden Dialyseversuchen war allerdings das gesamte exprimierte Protein nicht mehr nachweisbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die intrazellulären Domänen, die untereinander leicht zu Aggregation neigen, auch an Gefäßwänden oder Dialysemembranen haften bleiben.

3.2 Expression in *E. coli*

Um größere Mengen des rekombinanten Proteins zu isolieren, wurde parallel der Ansatz verfolgt, die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit in Bakterien zu exprimieren. *E. coli*-Bakterien wachsen sehr schnell, die Nährmedien sind einfach herzu-

stellen und daher relativ preisgünstig, und fremde DNA kann leicht in die Bakterien eingeschleust werden. Deshalb sollte es einfacher sein, eine ausreichende Menge Protein mit Hilfe der Bakterien herzustellen.

Entsprechend den verfügbaren elektronenmikroskopischen Aufnahmen des AChR (siehe Abb. 4, Seite 4 und Lit. [6]) wird vermutet, dass die intrazellulären Domänen des Rezeptors dicht beieinander liegen und interagieren. In Abb. 4 ist die hohe Elektronendichte auf der intrazellulären Seite des Rezeptors zu erkennen, die eine Art „Korb“ unter der Pore bildet. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die intrazellulären Domänen möglicherweise die Nachbarschaft der anderen Untereinheiten zur korrekten Faltung benötigen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die DNA für die intrazelluläre Domäne des homomeren $\alpha 7$ -Rezeptors (aus Ratte) ebenfalls in Bakterienexpressions-Vektoren eingebracht. Bei Expression der $\alpha 7$ -Domäne sollten eventuell notwendige Interaktionen zwischen mehreren Domänen möglich sein. Bei den anderen Rezeptoruntereinheiten, die normalerweise als Heteropentamer auftreten, wäre das nur durch aufwendige Kotransfektion zu erreichen. In den durchgeführten Experimenten konnte diese Hypothese aber nicht bestätigt werden.

Um die intrazellulären Domänen sinnvoll darstellen zu können, wurden acht verschieden lange Konstrukte der $\alpha 7$ -Schleife und drei verschiedene Konstrukte der δ -Schleife hergestellt. Dabei wurden die Stellen der Aminosäuresequenz, die Enden einer Domäne darstellen könnten, als Endpunkte der Konstrukte gewählt. Dadurch sollte auch die Löslichkeit der exprimierten Proteine verbessert werden, indem eventuell hydrophobe Aminosäuren oder solche, die auf andere Weise mit der Membran interagieren können, an den Enden der Domänen entfernt wurden. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in den Expressionsraten der verschieden langen Konstrukte.

In einer 1996 veröffentlichten Arbeit wurde über die Expression der intrazellulären Schleife des AChR in Bakterien berichtet.^[60] Damals wurden ebenfalls GST-Fusionsproteine mit der $\alpha 7$ -Schleife (Ratte und Huhn) in *E. coli* exprimiert, gereinigt und Phosphorylierungs-Studien durchgeführt. Das Protein wurde zu 95 % in Inclusion bodies gefunden, allerdings wurde nur die lösliche Fraktion des Bakterienlysats zur Isolation des gesuchten Proteins verwendet. Das Fusionsprotein mit einer Masse von 42 kDa ließ sich homogen isolieren, allerdings wurden auch bei Anwesenheit verschiedener Protease-Inhibitoren zahlreiche Degradationsprodukte gefunden. Es

wurden in der Veröffentlichung keine Angaben gemacht, in welcher Konzentration das Protein hergestellt oder gereinigt wurde. Auf einem abgebildeten Western-Blot wurden 2 µg des Fusionsproteins aufgetragen. Mit dem Fusionsprotein wurden Phosphorylierungs-Experimente mit verschiedenen Kinasen durchgeführt. Schließlich wurde eine PKA-Phosphorylierungsstelle am Serin 342 in beiden Proteinen identifiziert.

Bisher wurden keine weiteren Ergebnisse über intrazelluläre Domänen des AChR aus dieser Arbeitsgruppe veröffentlicht. Auch aus anderen Forschungsgruppen ist bisher keine Publikation über die Strukturen der intrazellulären Domänen veröffentlicht worden.

Während meiner Expressionsversuche zeigten sich die verschiedenen Fusionsproteine unlöslich in Aufarbeitungspuffern ohne Detergenz. Bei verschiedenen Reaktionsbedingungen wurden die Proteine zwar meist exprimiert, allerdings nicht in zufriedenstellenden Mengen und in Inclusion bodies aggregiert. Erst die Expression unter sehr „vorsichtigen“ Bedingungen (niedrige Temperatur, niedrige Wachstumsdichte der Bakterien und kurze Expressionszeit) ermöglichte zusammen mit einer milden Lyse (mit 1 % Triton X-100) der Bakterien die Reinigung von löslichem $\alpha 7$ -GST-Fusionsprotein in einer Menge von etwa 30 µg aus einer 50 ml-Schüttelkultur in einer Elutionsfraktion. Dieses Protein wurde mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie eindeutig als das Gesuchte identifiziert. Die Expression erwies sich aber nicht als leicht reproduzierbar. Beim nächsten Versuch nach demselben Protokoll konnte kein Fusionsprotein isoliert werden. Wahrscheinliche Ursache dafür ist, dass bei der Lyse der Bakterien sehr viele Proteine nicht in Lösung gebracht werden konnten, sondern als Aggregate unlöslich blieben.

In der Literatur werden zahlreiche Beispiele für erfolgreiche Expressionen in *E. coli* angeführt. Mehrere Milligramm rekombinantes Protein können aus einem Liter Kultur erhalten werden.^[61, 62] Durch die Verwendung von Bakterienstämmen mit der Möglichkeit Disulfidbrücken auszubilden, ist die Expression funktioneller Proteine mit dieser Modifikation durchführbar geworden. Mit Hilfe des Stamms AD494(DE3), dessen Zellen im Zytoplasma Disulfidbrücken bilden können, wurde z. B. ein aktiver Proteaseinhibitor hergestellt.^[62] Bei der zitierten Arbeit wurde auch der Effekt von Expressions-Temperatur und der IPTG-Konzentration untersucht. Bei niedrigerer Temperatur ist zwar die Expression geringer, das hergestellte Protein ist aber zu einem größeren Teil löslich.

Bei Kommunikation mit anderen Wissenschaftlern zeigte sich, dass Fusionsproteine mit GST nicht sinnvoll sind, um schlecht lösliche Proteine in Lösung zu bekommen oder zu halten. Allein ist die Glutathion-S-Transferase zwar ein gut lösliches Protein, aber diese Eigenschaft lässt sich scheinbar doch nicht ohne weiteres auf die daran gekoppelten Proteine übertragen. Aus diesem Grund wurde die Expression der GST-Fusionsproteine in *E. coli* nicht weiter verfolgt. In Zukunft werden Fusionsproteine mit dem Maltose-Binding-Protein (MBP) hergestellt werden, die voraussichtlich besser löslich sind.^[63] Ein Beispiel für die optimierte Expression und Renaturierung eines rekombinanten Proteins aus *E. coli* zeigte die Arbeitsgruppe um J. M. Chirgwin.^[64] Vorher schwierig zu erhaltende Proteine wurden als MBP-Fusionsproteine exprimiert und erfolgreich aus der 8 mol/l Harnstoff-haltigen Lösung zur nativen Struktur renaturiert. Die Zurückfaltung war ohne MBP nur zu 1 % möglich. Es wurden auch Fusionsproteine mit GST hergestellt, die unlöslich blieben. Zur Reinigung und korrekten Faltung von heterolog exprimierten Proteinen wurde auch in einem Review von Nilson et al. der His₆-Tag in Kombination mit MBP favorisiert.^[65]

Auch die Koexpression von Chaperonen zusammen mit den gewünschten Proteinen in Bakterien hat gute Ergebnisse gezeigt.^[66] Ohne die koexprimierten Chaperone GroEL und GroES wurde eine wesentlich geringere Menge lösliches Protein in der Arbeit von Lamark et al. erhalten.^[62] Ebenso kann mit Hilfe von Chaperonen ein denaturiertes Protein in Lösung zurückgefaltet werden.^[67]

3.3 *In vitro*-Expression

Die Expression in *E. coli* hat neben der häufigen Bildung von Inclusion bodies den Nachteil, dass keine posttranslationalen Modifikationen von den Bakterien vorgenommen werden können. Um die Aggregation in Inclusion bodies bei möglichst hoher Expressionsrate umgehen zu können, wurden seit neuerer Zeit auf dem Markt erhältliche zellfreie Expressionssysteme getestet. Diesen Systemen liegt ein *E. coli*-Lysat zugrunde, das zuerst von allen endogenen Nukleotiden und Aminosäuren befreit wird. Noch in der Membran-freien Lösung enthalten sind aber alle Enzyme und vor allem die Ribosomen, die zur Transkription und Translation benötigt werden. Vor der Reaktion wird das Lysat mit Nukleotiden, Aminosäuren und energieliefernden Substanzen in bestimmter Zusammensetzung gemischt und mit der zu exprimierenden DNA versehen. Die Inhaltsstoffe der einzelnen Lösungen wurden nicht bekannt gegeben.

Zellfreie Expressionssysteme haben den Vorteil, dass für lebende Zellen toxische Proteine hergestellt werden können. Antibakterielle Peptide werden schon seit längerer Zeit *in vitro* exprimiert. Dabei werden die ursprünglich eingesetzten Methoden immer weiter verbessert.^{[68],[69]} Auch wurden positive Ergebnisse von Proteinen berichtet, deren Expression in Insektenzellen nicht erfolgreich war.^[70] In diesem Beispiel wurden Virusproteine in aktiver, löslicher Form mit einer Konzentration von 8 µg/100 µl *in vitro* hergestellt. Außerdem können modifizierte Aminosäuren leicht in das Protein eingebaut werden, z. B. radioaktive Markierungen oder ¹³C bzw. ¹⁵N-gelabelte Moleküle zur NMR-Analyse. Auch Chaperone und in Zukunft modifizierende Enzyme wie Proteinkinasen können der Reaktionslösung zugegeben werden. Dann sind sogar posttranslationale Modifikationen der hergestellten Proteine möglich.

Von der Firma Roche gibt es das sog. Rapid Translation System™ (RTS), das bis zu 5 mg Proteinausbeute in einer (vorher optimierten) Reaktion verspricht. In diesem System können zunächst im Batch-Verfahren kleine Reaktionsansätze von 50 µl mit verschiedenen DNA-Konstrukten getestet werden. Wenn das gesuchte Protein im kleinen Maßstab exprimiert wird, kann in einer 1 ml-Reaktion eine größere Menge hergestellt werden.

Die Expression war allerdings in meinem Fall nur bei GFP als Positivkontrolle erfolgreich. Alle von mir getesteten DNA-Konstrukte lieferten kein Protein. Die weitere Verbesserung der Reaktionsbedingungen (zum Beispiel die optimale Temperatur und Reaktionsdauer) bis zur erfolgreichen Expression war mir in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht möglich. Es gibt aber noch eine Reihe von Bedingungen, die verändert werden könnten, um das Protein herstellen zu können. Zum Beispiel können verschiedene Substanzen (wie milde Detergentien, Chaperone oder auch Protease-Inhibitoren) der Reaktionslösung zugesetzt werden, um die Expression des Schleifenproteins zu ermöglichen.

Die wichtigste Phase bei der *In vitro*-Expression ist der Start der Translation. Das Ribosom muss an der entsprechenden Bindungsstelle hinter dem Startcodon an der RNA anlagern. Wenn die mRNA in Sekundärstrukturen gefaltet vorliegt, kann diese Anlagerung nicht passieren. Es ist also sehr wichtig, ein DNA-Konstrukt herzustellen, das nach Transkription keine am Start gefaltete mRNA erzeugt.^[69] Um das zu erreichen, existieren eine Reihe von Vektoren, die mit den gewünschten Konstrukten getestet werden können. Von der Firma Roche gibt es demnächst eine weitere

Vereinfachung des Systems, bei der man lineare PCR-Produkte direkt zur Proteinexpression einsetzen kann. Hier können die zur PCR benutzten Primer auf die später erzeugten mRNA-Strukturen hin optimiert werden, ohne dass die anschließende Ligation und Selektion eines Vektorkonstruktes zusätzlich Zeit kostet. In diese Richtung gibt es schon Anwendungen, um möglichst viele Proteine unter identischen Bedingungen auf ihre Eignung z. B. als Antigene oder pharmakologische Zielmoleküle zu testen. Ein Beispiel zeigen Rungpragayphan et al., die eine Bibliothek von Antikörpern mit Hilfe der *In vitro*-Expression von einzelnen DNA-Molekülen erzeugt haben.^[71]

In einem weiteren Ansatz wurde das zellfreie Expressionssystem der RiNA AG mit denselben DNA-Konstrukten für δ - und $\alpha 7$ -Schleife ausprobiert. Diesem System liegt dasselbe Prinzip zugrunde, allerdings werden ein anderer Bakterienstamm zur Herstellung des Bakterienlysats und veränderte Reaktionspuffer verwendet. In den Reaktionen zur Herstellung der δ -Schleife konnte exprimiertes Protein mit Hilfe einer radioaktiven Markierung nachgewiesen werden; es wurde aber kein nachweisbares Protein der $\alpha 7$ -Schleife synthetisiert. Das δ -Schleifenprotein wurde teilweise löslich exprimiert und konnte in einem weiteren Schritt über eine Ni^{2+} -Affinitäts säule isoliert werden. Allerdings wurden in diesem Ansatz insgesamt nur 6 $\mu\text{g/ml}$ Protein hergestellt.

3.4 Ausblick

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sowohl die Expression im zellfreien System als auch mit den stabil transfizierten Insektenzellen weitergeführt werden sollte. Meiner Meinung nach lassen sich mit weiter optimierten Bedingungen über beide Methoden ausreichende Mengen der intrazellulären Domänen zur Strukturuntersuchung herstellen: Die stabil transfizierten Sf9-Zellen lassen sich in großer Menge heranziehen und das produzierte Protein kann mit veränderten Aufschluss- und Reinigungsbedingungen isoliert werden. Dazu sollte zunächst die Vorreinigung des exprimierten Proteins mit Hilfe eines Anionenaustauscher-Chromatographie- oder Gelfiltrations-Schrittes erfolgen. Damit würde ein großer Teil der bei der anschließenden Ni^{2+} -Affinitätschromatographie störenden Proteine bereits entfernt werden. Man sollte auch darauf achten, dass keine Materialien mit der Proteinlösung in Kontakt kommen, die die Adsorption des zu reinigenden Proteins begünstigen. Unter diesen Voraussetzungen sollte eine ausreichende Menge der intrazellulären Domäne

isoliert werden können. Dieses Protein wäre dann eukaryontisch exprimiert und sollte entsprechend phosphoryliert vorliegen.

Bei der *In vitro*-Expression werden ständig Verbesserungen von den betreffenden Firmen entwickelt, die auch bisher schwierig zu exprimierende Proteine für diese Expression zugänglich machen. Auch bei dem in dieser Arbeit getesteten Verfahren gibt es noch eine Reihe von Möglichkeiten, die Bedingungen so weit zu verändern, dass das Protein in ausreichender Menge gereinigt werden kann, wie die erfolgreichen Expressionen in kleinen Konzentrationen zeigen. Zum Beispiel kann bei der Expression durch einen Bakterien-spezifischen Vektor (z. B. die pET-Vektoren, in denen das Konstrukt für die δ -Schleife vorliegt) zur Reaktionslösung IPTG zugegeben werden. Bei der Expression in *E. coli* muss IPTG zur Induktion zugegeben werden, wenn der Vektor das Gen für den lac-Repressor enthält. Dieser Repressor verhindert die vorzeitige Expression des insertierten Gens ohne Vorhandensein des Zuckerdervatives IPTG. Für die weitere Verwendung dieser Vektoren für die *In vitro*-Expression sollte beachtet werden, dass es notwendig sein kann, ebenfalls IPTG hinzu zu geben.

Durch die ständige Optimierung der Reaktionslösungen sollten auch in nächster Zukunft Chaperon-Kombinationen verschiedener Zusammensetzungen erhältlich sein. Über die Zusammensetzung solcher Lösungen geben die Hersteller erwartungsgemäß jetzt noch keine Auskunft. Die oben schon erwähnte Zugabe von Kinasen direkt zur Expressionsreaktion eröffnet weitere Möglichkeiten: Vielleicht ergibt sich eine Verbesserung der Proteinexpression, wenn das hergestellte Protein sofort phosphoryliert werden kann und damit eine native Konformation einnimmt. Durch Kooperationsmöglichkeiten mit der Herstellerfirma ließen sich auch noch nicht auf dem Markt befindliche Neuerungen ausprobieren.

Als weitere neue Methode bietet sich die Expression in der Hefe *Pichia pastoris* an. Es gibt zahlreiche Publikationen über erfolgreich in diesem Hefestamm hergestellte rekombinante Proteine.^[12, 72-76] Dieses System hätte ebenfalls die Vorteile der eukaryontischen Expression mit der möglichen Einführung von posttranslationalen Modifikationen. Hefezellen sind schnell zu vermehren und es ist dadurch leicht, die Eigenschaften des Expressionskonstruktes z. B. an das Löslichkeitsverhalten des zu exprimierenden Proteins anzupassen, indem neue DNA-Konstrukte hergestellt und in kurzer Zeit eingesetzt werden können.

Der Ansatz, einzelne Domänen heterolog zu exprimieren und anschließend ihre Eigenschaften zu untersuchen, ist durch viele erfolgreiche Projekte verifiziert worden. Bisher ist es die beste Möglichkeit, die Struktur von Membranproteinen aufzuklären, da sich diese Proteine aufgrund ihrer komplexen Eigenschaften der Kristallisation entziehen. Die in dieser Arbeit behandelten Rezeptormoleküle benötigen zur nativen Konformation die sie umgebende Membran. Der Acetylcholinrezeptor geht direkt mit Cholesterin eine Wechselwirkung ein. Außerdem besteht der nikotinische Rezeptor aus verschiedenen Untereinheiten, die zusätzlich durch Phosphorylierungen und Glykosylierungen unterschiedlich modifiziert sind. Alle diese Eigenschaften sprechen zusammengenommen gegen eine baldige Kristallisierung des Gesamtmoleküls. Der Weg zur Strukturaufklärung kann also nur über die einzelnen Domänen führen, wobei die Struktur der extrazellulären Domäne weitgehend aufgeklärt ist. Der für das weitere Vorgehen besonders interessante Teil des Rezeptors ist also die intrazelluläre Domäne.