

**Heterologe Expression und strukturelle
Charakterisierung der intrazellulären Domäne der
 δ -Untereinheit des nikotinischen
Acetylcholinrezeptors**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl.-Biochem. Denise Kottwitz
am Institut für Chemie-Biochemie
Berlin, 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ferdinand Hucho (AG Neurochemie) am Institut für Chemie-Biochemie des Fachbereiches Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho, FB Biologie, Chemie, Pharmazie
2. Gutachter: PD Dr. Shiao Li Oei, FB Biologie, Chemie, Pharmazie

Datum und Ort der Disputation: 14.09.2005 Berlin

Für Andreas

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Der nikotinische Acetylcholinrezeptor.....	2
1.1.1	Vorkommen und Aufbau	2
1.1.2	Funktion	3
1.2	Struktur des nAChR.....	5
1.2.1	Sekundärstrukturvorhersagen.....	5
1.2.2	Die Struktur des Acetylcholinbindeproteins	6
1.2.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des nAChR.....	9
1.3	Die intrazelluläre Domäne	15
1.3.1	Rezeptoraufbau durch Assoziation der Untereinheiten	16
1.3.2	Rezeptortransport an die Zelloberfläche	16
1.3.3	Die intrazelluläre Domäne als Phosphorylierungstarget	17
1.3.4	Rezeptorinteraktion mit dem Cytoskelett.....	18
1.3.5	Rezeptoraktivität und Desensitivierung	20
1.3.6	Intrazelluläre Signalkaskaden	21
1.4	Ziele der Arbeit.....	22
2	ERGEBNISSE.....	24
2.1	Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolls für die intrazelluläre Domäne der δ-Untereinheit des nAChR von <i>Rattus norvegicus</i> und <i>Torpedo californica</i>.....	24
2.1.1	Strep-Fusionsproteine	24
2.1.1.1	Klonierung.....	25
2.1.1.2	Expression	26
2.1.1.3	Zellaufschluss und Proteinisolierung.....	26
2.1.2	Hexahistidin-Fusionsproteine	27
2.1.2.1	Klonierung.....	27
2.1.2.2	Testexpression in <i>Escherichia coli</i>	28
2.1.2.3	Proteinexpression nach Blackwell et al. (1991).....	29
2.1.2.4	Proteinisolierung und Reinigung unter denaturierenden Bedingungen	30
2.1.2.5	Rückfaltung	31
2.1.2.6	Identifizierung mit MALDI-TOF	34
2.1.2.7	Abspaltung des Hexahistidintags von His-RID_Thr	35
2.1.3	Intein-Fusionsproteine	36
2.1.3.1	Klonierung.....	37
2.1.3.2	Expression und Reinigung.....	37
2.1.4	GST-Fusionsproteine	39
2.1.4.1	Klonierung.....	39
2.1.4.2	Expression	40
2.1.4.3	Reinigung des GST-Fusionsproteins und Entfernung von GST	40
2.1.5	MBP-Fusionsproteine	42
2.1.5.1	Klonierung.....	42
2.1.5.2	Expression	43
2.1.6	SUMO-Fusionsproteine	44
2.1.6.1	Klonierung.....	44
2.1.6.2	Expression und Reinigung.....	45
2.1.6.3	Abspaltung von SUMO und Stabilisierung	45
2.1.7	Expression in Säugetierzelllinien.....	47

2.2	Biophysikalische Charakterisierung der intrazellulären Domäne der δ-Untereinheit des nAChR	50
2.2.1	Charakterisierung der Hexahistidin-Fusionsproteine in Lösung	50
2.2.1.1	Gelfiltration	50
2.2.1.2	Dynamische Lichtstreuung	50
2.2.1.3	Analytische Ultrazentrifugation	52
2.2.2	CD Spektroskopie	58
2.2.3	NMR Spektroskopie	59
2.2.4	Strukturvorhersagen	62
2.2.5	Limitierte Proteolyse	62
2.3	Einfluss der Phosphorylierung auf die Struktur der intrazellulären Domäne des nAChR	64
2.3.1	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von His-TID	64
2.3.2	Serin-Aspartat Mutanten zur Simulation der Phosphorylierung	65
2.4	Einfluss der Termini der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte auf Faltung und Stabilität der heterolog exprimierten Proteine	68
2.4.1	Charakterisierung der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte mit verkürztem C-Terminus ..	68
2.4.2	Charakterisierung der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte mit verlängerten Termini	69
2.4.2.1	Charakterisierung der Hexahistidin-Fusionsproteine mit verlängerten Termini	70
2.4.2.2	Charakterisierung der Intein-Fusionsproteine mit verlängerten Termini	72
3	DISKUSSION	74
3.1	Wahl des Expressionssystems	74
3.2	Expression in <i>Escherichia coli</i>	75
3.2.1	Die Häufigkeit der verwendeten Aminosäure-Codons ist Organismus-spezifisch	75
3.2.2	Die Wahl des Promotors ist entscheidend	76
3.2.3	Die Akkumulation von überexprimierten Proteinen in <i>inclusion bodies</i>	77
3.3	Expression und Reinigung von Fusionsproteinen	78
3.3.1	Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR erlauben die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen	79
3.3.2	Fusion der intrazellulären Domäne des nAChR mit GST, MBP und SUMO erhöhen die Löslichkeit	80
3.4	Abspaltung des Affinitätstags in Fusionsproteinen	81
3.4.1	Aminosäuresequenz-spezifische Proteasen	82
3.4.2	Selbstspaltende Inteine	83
3.4.3	Tertiärstruktur-spezifische Proteasen	84
3.5	Rückfaltung rekombinanter Proteine	85
3.5.1	Rückfaltung durch Dialyse	86
3.5.2	Rückfaltung durch Gelfiltration	86
3.5.3	Rückfaltung mittels Affinitätschromatographie	87
3.5.4	Rückfaltung durch Verdünnungsexperimente	88
3.5.5	Rückfaltung in Gegenwart von Faltungshelfern	88
3.6	Strukturelle Charakterisierung der intrazellulären Domäne der δ-Untereinheit des nAChR	89
3.6.1	Strukturvorhersagen der intrazellulären Domäne des nAChR	89
3.6.2	Die Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte und <i>Torpedo</i> liegen als Monomer vor	91
3.6.2.1	Gelfiltration	91
3.6.2.2	Dynamische Lichtstreuung	91
3.6.2.3	Analytische Ultrazentrifugation	92
3.6.3	Die Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte und <i>Torpedo</i> sind vorwiegend unstrukturiert	93
3.6.3.1	CD-Spektroskopie	93
3.6.3.2	NMR-Spektroskopie	93
3.6.3.3	Limitierte Proteolyse	94

3.7	Interaktionen der intrazellulären Domäne im nAChR	95
3.7.1	Phosphorylierung	95
3.7.2	Einfluss des N- und C-Terminus	96
3.7.3	Interaktion des intrazellulären Domäne des nAChR mit der Zellmembran	98
3.7.4	Interaktion mit anderen Untereinheiten	98
3.7.5	Interaktion mit anderen Proteinen	99
4	ZUSAMMENFASSUNG	102
5	SUMMARY	104
6	MATERIAL UND METHODEN.....	106
6.1	Bakterienstämme	106
6.1.1	Klonierungszellstämme	107
6.1.2	Expressionszellstämme	107
6.2	Plasmide und Oligonukleotide	107
6.2.1	Oligonukleotide	108
a)	Sequenzierprimer	108
b)	PCR Primer	109
c)	Mutagenese-Primer	110
6.3	Chemikalien und Enzyme	110
6.3.1	Chemikalien	110
6.3.2	Kits und Marker	111
6.3.3	Enzyme	111
6.3.4	Antikörper	112
6.3.4.1	Primäre Antikörper	112
6.3.4.2	Sekundäre Antikörper	112
6.4	Geräte und sonstige Materialien.....	112
6.4.1	Zentrifugen	112
6.4.2	Autoklav, Brutschrank, Schüttler	112
6.4.3	Elektrophorese- und Westernblotzubehör	113
6.4.4	Ultraschall, Heizblock, Wasserbad	113
6.4.5	Spektrometer	113
6.4.6	FPLC, Säulen und Säulenmaterialien	113
6.4.7	Dialyse, Konzentrierung, Filter	113
6.4.8	Thermocycler und UV-Detektion von DNA-Gelen	114
6.4.9	pH-Elektrode	114
6.4.10	Sonstiges	114
6.5	Puffer und Lösungen	114
6.5.1	Molekularbiologie	114
6.5.2	Zellbiologie	114
6.5.3	Proteinbiochemie	115
6.5.3.1	SDS-Gele	115
6.5.3.2	Western-Blot	115
6.5.3.3	Tryptischer Verdau von Proteinen für MALDI-MS	116
6.5.3.4	Sonstiges	116
6.5.4	Proteincharakterisierung	116
6.5.4.1	Hexahistidin-Fusionsproteine	116
6.5.4.2	Strep-Fusionsproteine	116
6.5.4.3	Intein-Fusionsproteine	116
6.5.4.4	GST-Fusionsproteine	117
6.5.4.5	MBP-Fusionsproteine	117
6.5.4.6	SUMO-Fusionsproteine	117

6.6	Molekularbiologische Methoden	117
6.6.1	Agarose-Gelelektrophorese	117
6.6.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	118
6.6.3	Transformation	118
6.6.4	Präparation von Plasmid-DNA	118
6.6.5	Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen	119
6.6.6	Gelextraktion	119
6.6.7	Modifikation von DNA	119
6.6.7.1	Restriktion	119
6.6.7.2	Ligation	119
6.6.7.3	AT Klonierung	119
6.6.7.4	Topo Klonierung	120
6.6.7.5	Mutagenese	120
6.6.8	Polymerase-Kettenreaktion	120
6.6.8.1	PCR mit Linker-Primern	120
6.6.8.2	Kolonie-PCR	121
6.6.9	DNA-Sequenzierung	121
6.6.10	Klonierung der Fusionsproteine für die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR	122
6.7	Anzucht von Bakterien	124
6.7.1	Nährmedien	124
6.7.1.1	LB (Luria-Bertani)-Medium	124
6.7.1.2	SOB- und SOC-Medium	124
6.7.1.3	M9-Minimalmedium	124
6.7.1.4	Antibiotika	124
6.7.2	Übernachtskulturen	125
6.7.3	Dauerkulturen	125
6.7.4	Zellanzucht für prokaryotische Proteinexpression	125
6.7.4.1	Testexpression	125
6.7.4.2	Zellanzucht	125
6.7.4.3	Proteinexpression nach Blackwell et al. (1991)	126
6.7.4.4	Zellanzucht für toxische Proteine (GST-Fusionsproteine)	126
6.7.4.5	Anzucht nach Marley et al. (2001)	126
6.8	Zellbiologische Methoden	126
6.8.1	Zellkultur	126
6.8.2	Transfektion	127
6.8.3	Indirekte Immunfluoreszenz	127
6.8.4	Aufschluss von kultivierten HEK293-Zellen	128
6.9	Proteinreinigung	128
6.9.1	Zellaufschluss der Testexpression	128
6.9.2	Hexahistidin-Fusionsproteine	128
6.9.2.1	Zellaufschluss und Reinigung unter nativen Bedingungen	128
6.9.2.2	Zellaufschluss und Reinigung unter denaturierenden Bedingungen	129
6.9.2.3	Rückfaltung	129
6.9.2.4	Spaltung des Hexahistidin-Fusionsproteins mit Thrombin	130
6.9.2.5	<i>in vitro</i> Phosphorylierung	130
6.9.3	Strep-Fusionsproteine	131
6.9.3.1	Zellaufschluss und Reinigung unter nativen Bedingungen	131
6.9.3.2	Zellaufschluss und Reinigung unter denaturierenden Bedingungen	131
6.9.4	Intein-Fusions-Proteine	131
6.9.4.1	Zellaufschluss	132
6.9.4.2	Reinigung an Chitin/ Inteinspaltung	132
6.9.5	GST-Fusionsproteine	133
6.9.5.1	Zellaufschluss und Reinigung an Glutathion-S-Sepharose	133
6.9.5.2	Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa	133
6.9.6	MBP-Fusionsproteine	133
6.9.6.1	Zellaufschluss und Reinigung an Amylose	133
6.9.6.2	Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa, Enterokinase und Geranase	134

6.9.7	SUMO-Fusionsproteine	134
6.9.7.1	Expression und Zellaufschluss	134
6.9.7.2	Proteinreinigung an Ni-NTA-HP Sepharose	134
6.9.7.3	Abspaltung von SUMO mit SUMO-Protease.....	134
6.10	Proteincharakterisierung	135
6.10.1	Limitierte Proteolyse.....	135
6.10.2	Dynamische Lichtstreuung.....	135
6.10.3	Analytische Ultrazentrifugation	135
6.11	Proteinanalytische Methoden	138
6.11.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	138
6.11.2	Westen Blot.....	139
6.11.3	Proteinbestimmung	139
6.11.3.1	Bradford	139
6.11.3.2	BCA.....	140
6.12	Spektroskopische Methoden	140
6.12.1	UV/VIS Spektroskopie.....	140
6.12.1.1	Bakteriendichte.....	140
6.12.1.2	Proteinkonzentration.....	140
6.12.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	140
6.12.2	Circulardichroismus-Spektroskopie	140
6.12.3	NMR.....	141
6.12.4	Massenfingerprint/MS-Analyse	141
7	LITERATUR	143
8	ANHANG.....	160
8.1	Übersicht der Fusionsproteine.....	160
8.2	Abkürzungen.....	171
8.3	Eigene Veröffentlichungen.....	174
8.4	Lebenslauf	176
8.5	Danksagung.....	177