

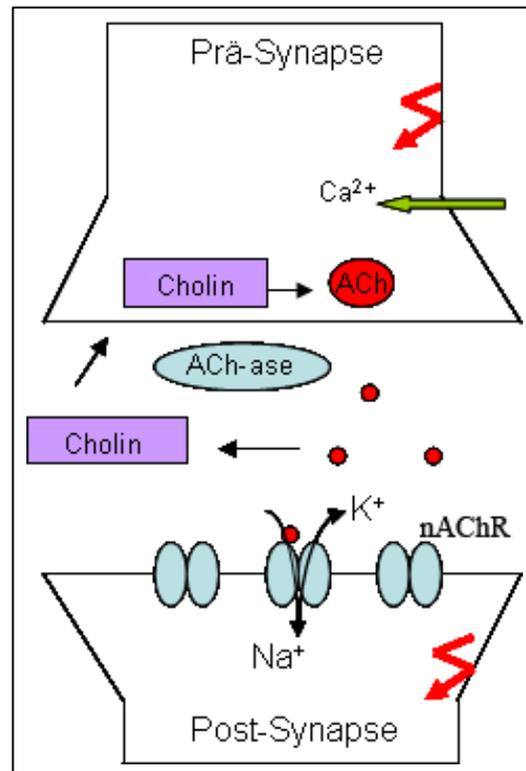
1 Einleitung

Die Aufnahme von Informationen aus der Umwelt, ihre Weiterleitung im Körper, ihre Verarbeitung und Beantwortung erfüllen Lebewesen mit Hilfe des Nervensystems durch elektrische Signale, die entweder lokal wirken oder entlang der Nervenfasern fortgeleitet werden. Diese Aufgabe erfüllt das Nervensystem mit Hilfe von elektrischen Signalen, die entweder lokal wirken oder entlang der Nervenfasern fortgeleitet werden. Die Weiterleitung erfolgt in Form von Aktionspotentialen. Dies ist eine vorübergehende Depolarisation der Plasmamembran, die sich entlang der Nervenfaser ausbreitet. Die Verbindung der einzelnen Nervenzellen erfolgt durch elektrische oder chemische Synapsen. Bei elektrischen Synapsen liegen spezielle Ionenkanäle in der prä- und postsynaptischen Zellmembran, die so genannten *gap junctions*, als Verbindungskanäle zwischen dem Cytoplasma der beiden Zellen. Bei chemischen Synapsen existiert keine cytoplasmatische Verbindung zwischen den Zellen, stattdessen sind die Neuronen durch einen schmalen Zwischenraum, den synaptischen Spalt voneinander getrennt. Als Reaktion auf ein Aktionspotential kommt es in der präsynaptischen Zelle zu einem Calciumeinstrom, wodurch die Freisetzung von Vesikeln mit Neurotransmittern in den synaptischen Spalt erfolgt (siehe Abbildung 1.1).

In der postsynaptischen Membran befinden sich Rezeptoren, die als ligandengesteuerte Ionenkanäle bezeichnet werden. Ein typischer Vertreter ist der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR). Er gehört zu der Gruppe der Cys-loop Rezeptoren, die ein Paar über eine Disulfidbrücke verbundene Cysteinreste in ihrer N-terminalen Domäne aufweisen, welche typischerweise durch 13 Aminosäurereste getrennt sind (siehe Abbildung 1.2). Andere Neurotransmitterrezeptoren dieser Familie sind der Glycinrezeptor, der GABA_A-Rezeptor und der 5-HT₃-Serotonin-Rezeptor (Hucho und Weise, 2001). Die Rezeptoren dieser Familie bilden aus ihren Untereinheiten Pentamere, die eine zentrale Pore umschließen. Die von der präsynaptischen Zelle ausgeschütteten Transmittermoleküle diffundieren durch den synaptischen Spalt, binden an die Rezeptoren in der postsynaptischen Zellmembran und bewirken damit das Öffnen (oder Schließen) der Ionenkanäle, wodurch sich die Membranleitfähigkeit und das Potential der postsynaptischen Zelle verändern.

Abbildung 1.1
Weiterleitung eines Aktionspotentials an einer chemischen Synapse durch Acetylcholin

Als Reaktion auf ein Aktionspotential kommt es zu einem Calciumeinstrom (Ca^{2+}) in der präsynaptischen Zelle, der zur Freisetzung von Acetylcholinhaltigen Vesikeln führt. Acetylcholin (ACh) diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an die Acetylcholinrezeptoren in der postsynaptischen Membran. Dadurch öffnet sich der Ionenkanal. Durch einen Einstrom von Natriumionen (Na^+) und einen Ausstrom von Kaliumionen (K^+) erfolgt eine Depolarisation an der postsynaptischen Membran. Acetylcholin wird von der Acetylcholinesterase abgebaut.



1.1 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor

1.1.1 Vorkommen und Aufbau

Der nAChR kommt an der neuromuskulären Endplatte (der synaptischen Verbindung einer Nerven- und einer Muskelzelle) und in postsynaptischen Membranen des zentralen Nervensystems von Vertebraten vor. Der Rezeptor der neuromuskulären Synapse, auch als peripherer nAChR bezeichnet, ist aus 5 Untereinheiten (α_1 , β_1 , γ , δ und ϵ) aufgebaut, die ein Heteropentamer bilden: zwei α -Untereinheiten mit identischer Aminosäuresequenz (52 kDa), und drei homologe Untereinheiten β (56 kDa), γ (61 kDa) und δ (64 kDa), wobei γ in der adulten Form durch die ϵ -Untereinheit ersetzt wird (siehe Abbildung 1.2). Für neuronale nAChRs sind 12 Untereinheiten bekannt (α_2 - α_{10} , β_2 - β_4). Die meisten dieser Rezeptoren existieren als Heteropentamere (z.B. $2\alpha_4\beta_2$), wobei einige auch als Homopentamere (z.B. α_7) vorkommen (Leonard und Bertrand, 2001).

Jede Untereinheit weist die gleiche Membrantopologie auf. Sie besteht aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne, 4 Transmembranhelices (M1-M4) und einer cytoplasmatischen Domäne, welche die M3 und M4 Helix verbindet. Die Transmembranhelices M2 der fünf Untereinheiten bilden die Pore des Rezeptors (siehe Abbildung 1.2).

Ein peripherer nikotinischer Acetylcholinrezeptor kommt in hohen Konzentrationen in den elektrischen Geweben von Zitteraalen (*Electrophorus electricus*) und von Zitterrochen (*Torpedo californica* und *marmorata*) vor. Aus den Membranen kann der Rezeptor unproblematisch isoliert werden und steht somit zur biochemischen Charakterisierung zur Verfügung.

1.1.2 Funktion

Die N-terminale extrazelluläre Domäne des nAChR enthält 2 Ligandenbindungsstellen zwischen den α -Untereinheiten und ihren benachbarten Untereinheiten γ bzw. δ (Blount und Merlie, 1989; Sine und Claudio, 1991), (siehe Abbildung 1.2). Acetylcholin wird in Folge eines Aktionspotentials aus dem präsynaptischen Neuron ausgeschüttet, diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an den Rezeptor. Dadurch wird eine Konformationsänderung ausgelöst, die zur Öffnung des Rezeptors führt (Adams et al., 1975; Lester et al., 1975). Der folgende Kationeneinstrom bewirkt eine Depolarisation der postsynaptischen Zelle und somit die Weiterleitung des elektrischen Signals (siehe Abbildung 1.1).

Der nAChR wird durch die Bindung weiterer Liganden moduliert. Die erste Gruppe sind die Agonisten. Diese binden an die gleiche Stelle wie Acetylcholin und lösen die gleiche Antwort aus. Der bekannteste Agonist für den nAChR ist Nikotin. Antagonisten sind Substanzen, die die Rezeptoraktivierung blockieren. Man unterscheidet hier die kompetitiven Antagonisten, die mit vergleichbarer Affinität wie der physiologische Ligand die Bindungsstelle besetzen. Viele natürliche Gifte sind Antagonisten für ligandengesteuerte Ionenkanäle, für den nAChR z.B. α -Neurotoxine aus Schlangengift. Die andere Gruppe von Antagonisten bezeichnet man als nicht-kompetitive Inhibitoren. Sie binden häufig in der Kanalpore, so dass sie den Ionenfluss sterisch blockieren. Die Gruppe der Agonisten und Antagonisten waren essentielle Helfer in der Aufklärung der Ligandenbindungsdomäne (Kao et al., 1984, Middleton und Cohen, 1991) und der Identifizierung von Aminosäureresten der porenbildenden M2 Helix (Hucho et al., 1986, Oberthür et al., 1986).

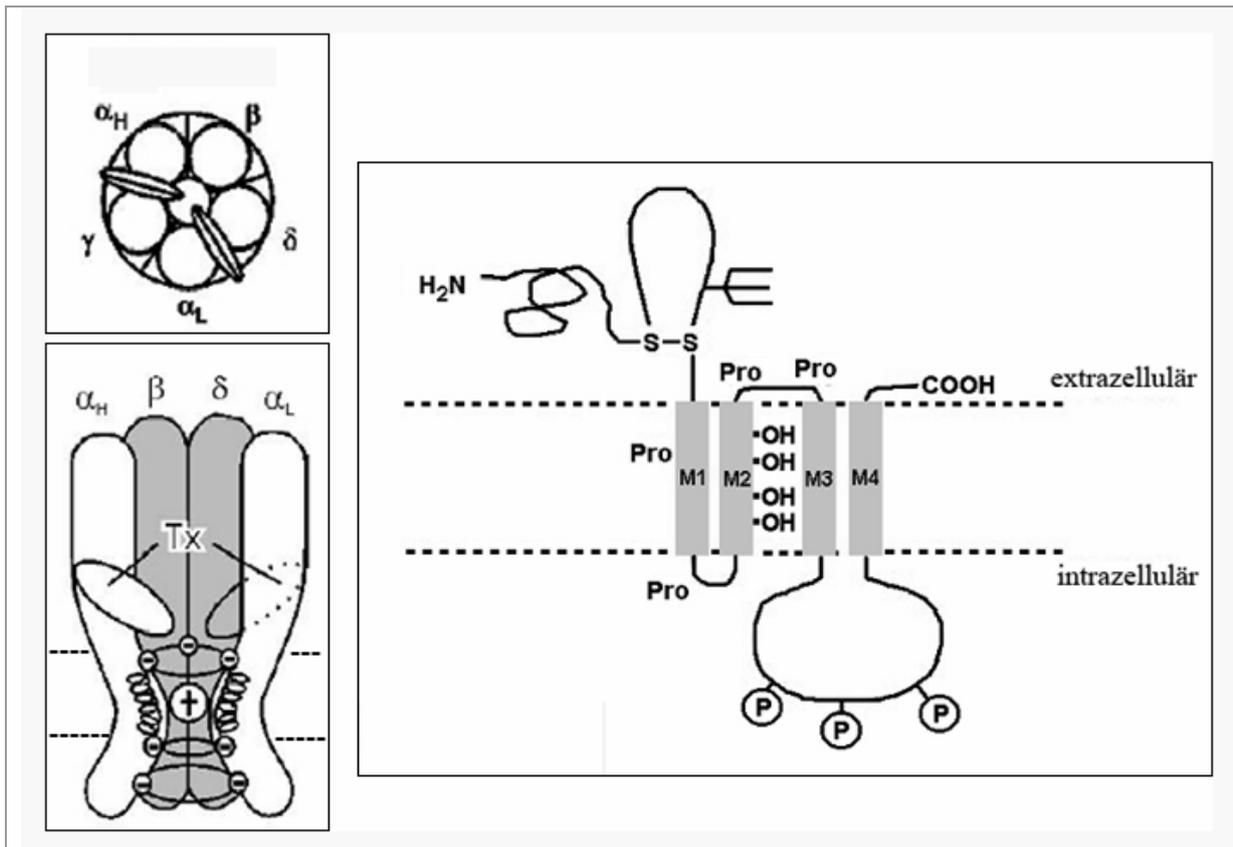


Abbildung 1.2

Aufbau und Membrantopologie des nikotinischen Acetylcholinrezeptors

Die linke Darstellung zeigt die Anordnung der fünf Rezeptoruntereinheiten um die Membranpore. Die obere Abbildung entspricht der Aufsicht vom synaptischen Spalt. Die Ligandenbindungsstellen an der Kontaktfläche der α - γ - bzw. der α - δ -Untereinheit sind gekennzeichnet, sie weisen eine unterschiedliche Affinität z.B. zu α -Neurotoxinen auf und sind mit α_H (high affinity) bzw. α_L (low affinity) markiert.

Die untere Abbildung zeigt einen Längsschnitt durch den Rezeptor. Eine Verengung nahe der cytoplasmatischen Seite wird als Tor des Rezeptors definiert. Negative Ladungen, die den Selektivitätsfilter darstellen sind gezeigt. Die Ellipse stellt die Toxinbindungsstelle von α -Neurotoxin (Tx) dar.

In der rechten Abbildung ist die Membrantopologie dargestellt. Jede Untereinheit besitzt eine große extrazelluläre N-terminale Ligandenbindungsdomäne, 4 Transmembrandomänen, eine große (M3-M4) intrazelluläre Schleife und ein kurzer extrazellulärer C-Terminus. Gekennzeichnet sind in der extrazellulären Domäne die Glykosylierungsstelle (Dreizack) und die konservierte Disulfidbrücke, die charakteristisch für die Cys-loop Rezeptoren ist. Die Lage der Proline (Pro) und hydroxygruppenhaltigen Seitenketten der kanalbildenden Transmembranhelix M2 ist gezeigt. In der intrazellulären Domäne sind identifizierte Phosphorylierungsstellen gekennzeichnet (Abbildung nach Hucho und Weise, 2001).

1.2 Struktur des nAChR

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist es noch nicht gelungen eine Kristallstruktur des nAChR zu lösen. Da es sich bei dem Rezeptor um ein integrales Membranprotein handelt, beruht die gescheiterte Kristallisation vor allem auf den hydrophoben Eigenschaften der Transmembrandomäne und der damit einhergehenden komplexen Rezeptorpräparation in Gegenwart von Detergenzien. Auch von den homologen Proteinen dieser Rezeptorfamilie gibt es keine hochaufgelöste Struktur. Die beste strukturelle Charakterisierung des nikotinischen AChR wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nigel Unwin erreicht (Unwin, 2005). Viele Arbeiten beschäftigen sich zusätzlich mit der Charakterisierung einzelner Domänen und Teilsequenzen, z.B. der Membranhelix M2 (Hung et al., 2005; Opella et al., 1999) oder der extrazellulären Domäne (Psaridi-Linardaki et al., 2002, Avramopoulou et al., 2004). Ein entscheidender Durchbruch gelang 2001 durch die Identifizierung eines löslichen Acetylcholinbindeproteins (AChBP) aus der Schnecke *Lymnaea stagnalis*, das homolog zur N-terminalen Ligandenbindungsdomäne des nAChR ist und deren Kristallstruktur erfolgreich gelöst werden konnte (Smit et al., 2001; Brejc et al., 2001).

1.2.1 Sekundärstrukturvorhersagen

Da es von keinem Rezeptor der Gruppe der Cys-loop-Rezeptoren der ligandengesteuerten Ionenkanäle eine Kristallstruktur gibt, sind Hinweise zu Sekundärstrukturelementen durch Homologiestudien nicht möglich. Daher muss auf so genannte *third-generation* Algorithmen für die Sekundärstrukturvorhersage zurückgegriffen werden. Diese basieren auf Daten von cytoplasmatischen Proteinen mit bekannter 3D-Struktur und vergleichen Aminosäuresequenzen anhand statistischer Informationen bezüglich ihres Vorkommens in bestimmten Sekundärstrukturelementen und anhand physikalisch-chemischer Eigenschaften. Unterstützt wird diese Aussage durch Analyse der Evolution bestimmter Proteinmotive (Rost und Sander, 2000).

Umfangreiche Sekundärstrukturvorhersagen zum nAChR wurden von Le Novère et al. (1999) mit verschiedenen *third-generation* Algorithmen durchgeführt. Hierbei wurde ein Sekundärstrukturmodell mit neun α -Helices (24,2 % der Reste, durchschnittlicher Länge 13,9 Aminosäuren) und 17 β -Faltblättern (22,5% der Reste, durchschnittliche Länge 6,6 Aminosäuren) aufgestellt (siehe Abbildung 1.3). In diesem Modell besteht die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne hauptsächlich aus β -Faltblättern mit lediglich 2 α -Helices am N-terminalen Ende. Die Transmembrandomänen werden sowohl als α -Helices als auch als β -Faltblatt-Strukturen postuliert. Für die intrazelluläre Domäne wurde das Vorhandensein von

drei α -Helices (Helix H_F, Helix H_G und Helix H_H) vorhergesagt. Die Helices H_F und H_G sind als amphipatisch vorhergesagt, so dass eine Seite dem Lösungsmittel ausgesetzt, die andere verdeckt ist: entweder durch Assoziation untereinander, mit den Helices anderer Untereinheiten oder einer dritten Komponente. Die weiteren Regionen der intrazellulären Domäne sind in diesem Modell ohne reguläre Sekundärstruktur.

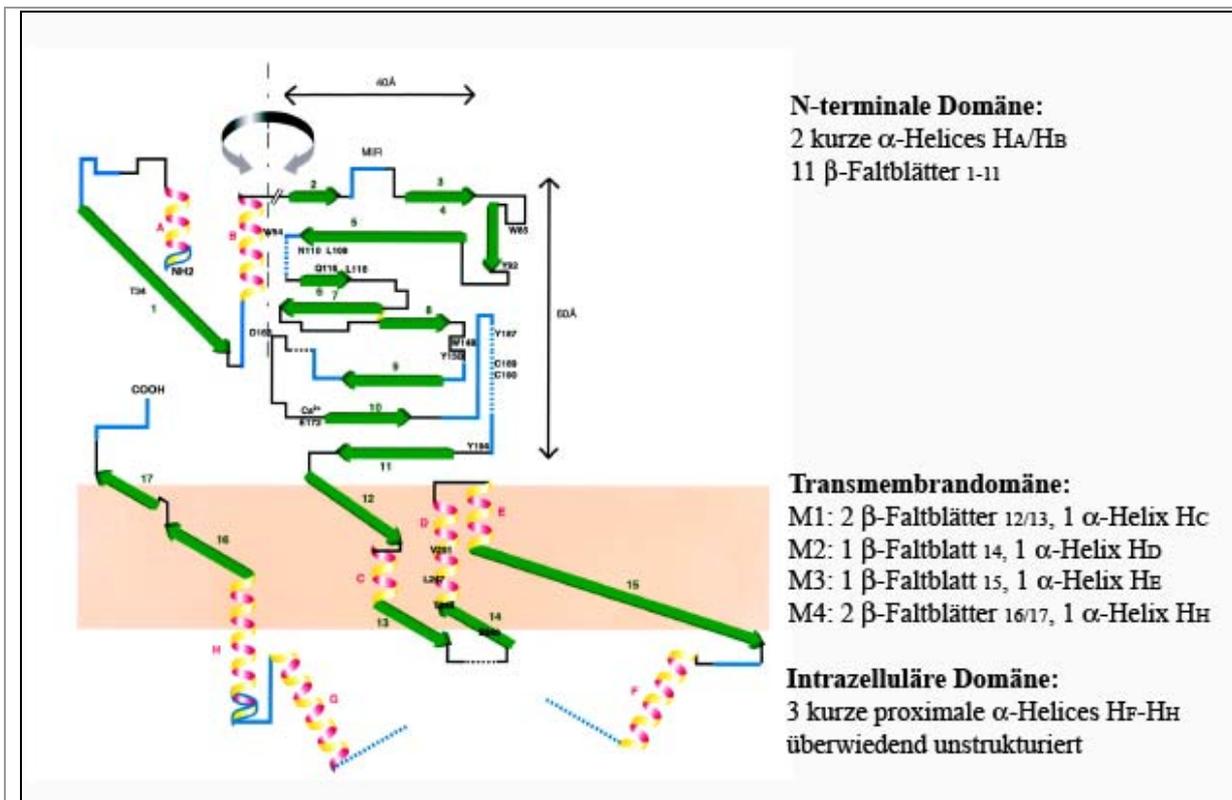


Abbildung 1.3

Sekundärstrukturmodell einer Untereinheit des nAChR

Die Ansicht ist vom Poreninnern des Rezeptors. α -Helices und β -Faltblätter sind im selben Maßstab dargestellt, unstrukturierte Bereiche in der Länge angepasst. Der graue Pfeil deutet auf eine Drehung der beiden Bereiche der extrazellulären Domäne zueinander. Die blau dargestellten Bereiche sind dem Lösungsmittel zugewandt. Die durch Affinitätsmarkierungen identifizierte Aminosäurereste sind eingezeichnet. In der Darstellung sind die Sekundärstrukturelemente in der Reihenfolge der Primärstruktur angeordnet, was nicht einem 3D Modell entspricht (Abbildung aus Le Novère et al., 1999).

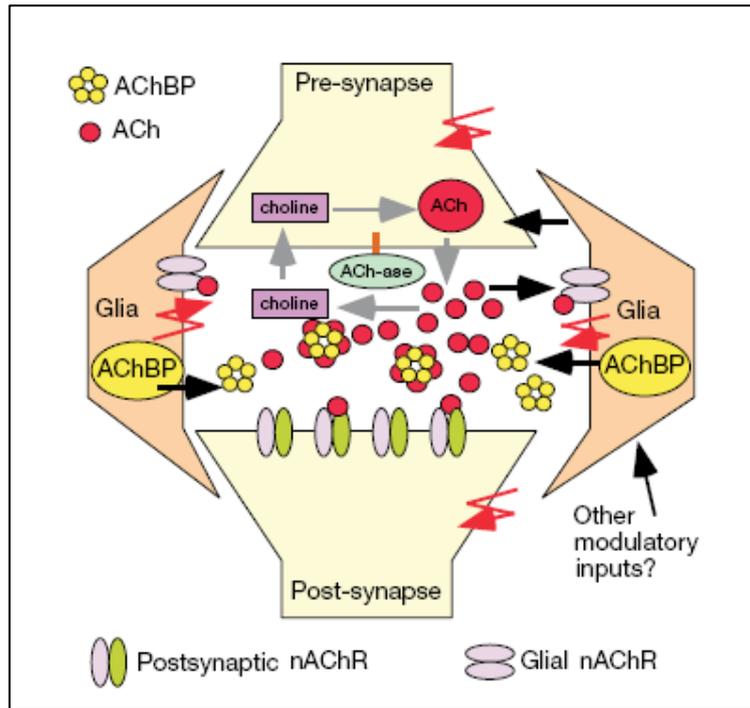
1.2.2 Die Struktur des Acetylcholinbindepoteins

Das Acetylcholinbindepotein (AChBP) konnte aus der Schnecke *Lymnaea stagnalis* isoliert werden. Dort wird es in den synaptischen Spalt sezerniert und reguliert die Neurotransmission durch Acetylcholinbindung (Smit et al., 2001), (siehe Abbildung 1.3).

Abbildung 1.4

Modell der Rolle des AChBP in der Neurotransmission in der Schnecke

Die Freisetzung von Acetylcholin (ACh) aus der präsynaptischen Zelle führt zur Aktivierung postsynaptischer Rezeptoren. Parallel werden nAChRs in den Gliazellen aktiviert, wodurch das Acetylcholinbindeprotein (AChBP) in den synaptischen Spalt freigesetzt wird und hier durch Acetylcholinbindung die cholinerge Übertragung vermindert oder stoppt (Abbildung aus Smit et al., 2001).



Das AChBP besteht aus ein 210 Aminosäuren und es besitzt eine Glykosylierungsstelle (Asn 66). Das rekombinant in Hefe *Pichia pastoris* exprimierte AChBP, dessen Kristallstruktur gelöst wurde (Brejc et al., 2001), bildet stabile Homopentamere, was durch Gelfiltration und analytische Ultrazentrifugation gezeigt werden konnte, und ist vergleichbar mit der N-terminalen Domäne des neuronalen $\alpha 7$ -Subtyp des nikotinischen Acetylcholinrezeptors.

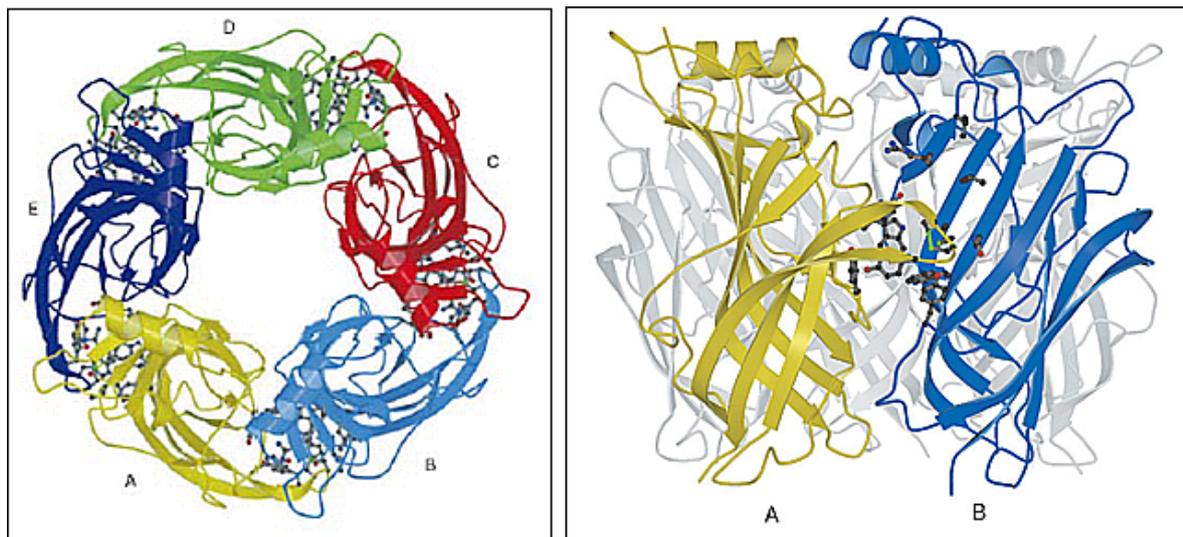


Abbildung 1.5

Kristallstruktur des Acetylcholinbindeproteins (AChBP)

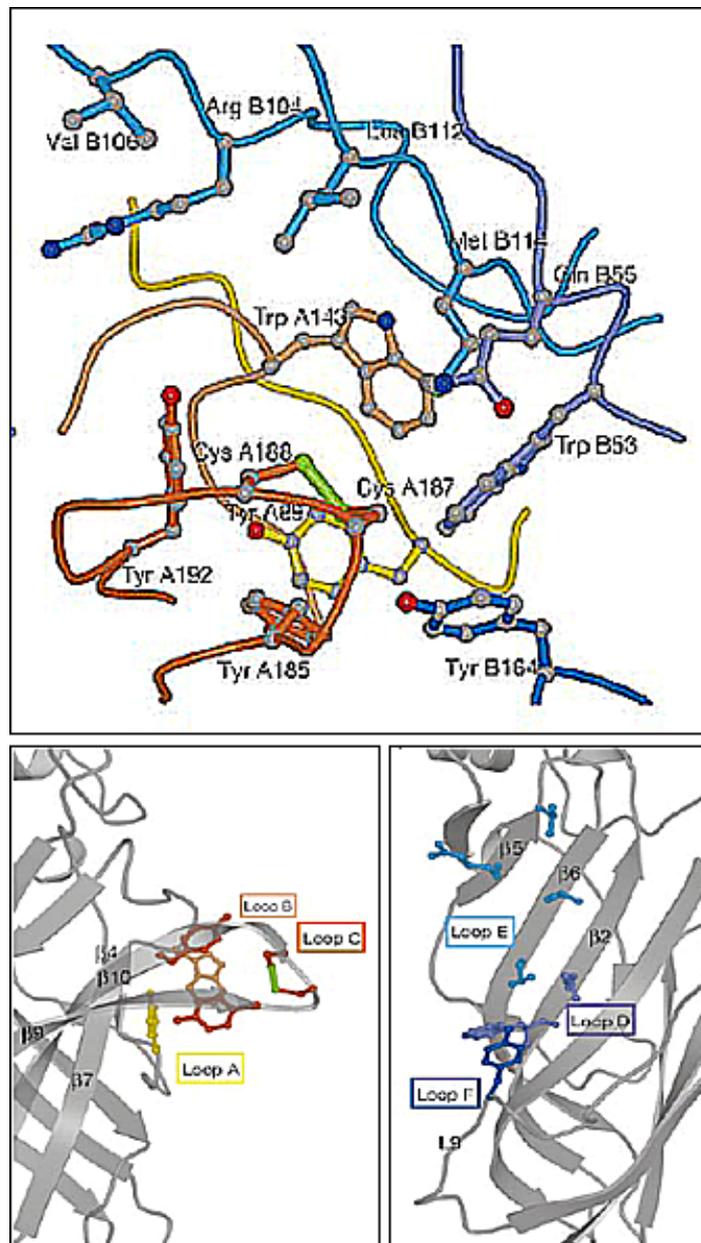
Links: Das in Hefe heterolog exprimierte AChBP bildet ein Homopentamer. An der Kontaktfläche zwischen den Monomeren ist im Kristall ein HEPES-Molekül lokalisiert; dieses entspricht der Bindung eines Agonisten. Rechts: Seitenansicht zwei benachbarter AChBP-Monomere. In der Bindungstasche ist ein HEPES-Molekül fixiert (Abbildung aus Brejc et al., 2001).

Die Kristallstruktur wurde mit einer Auflösung von 2,7 Å erhalten. Ein AChBP-Pentamer hat einen Radius von 80 Å und eine Höhe von 62 Å. Jedes Monomer bildet eine N-terminale Helix und ein in sich gedrehtes β -Sandwich mit 10 β -Faltblattsträngen, wobei die zur Pore zeigenden β -Stränge durch eine Disulfidbrücke mit den nach außen zeigenden β -Strängen verbunden sind.

Durch die Struktur des AChBP kann besonders gut die Ligandenbindung untersucht werden. Mittlerweile konnte die Kristallstruktur des AChBP mit HEPES, Nikotin und Carbamylcholin in der Ligandenbindungsstelle aufgeklärt werden (Celie et al., 2004).

Abbildung 1.6
Modell der Ligandenbindungsstelle im nikotinischen Acetylcholinrezeptor

In der oberen Abbildung sind die an der Bindung des Liganden beteiligten Aminosäuren gekennzeichnet. Die untere linke Abbildung zeigt in einem Ausschnitt eines AChBP Monomers die Lage der an der Bindung eines HEPES-Moleküls beteiligten Schleifen A, B und C. Die untere rechte Abbildung zeigt die benachbarte Untereinheit mit den Schleifen D, E und F, die auf β -Faltblattstrukturen lokalisiert sind. Die identifizierten Aminosäuren wurden hier analog der Ligandenbindungsdomäne des nikotinischen Acetylcholinrezeptors bezeichnet. Somit bildet die α 1-Untereinheit die Schleife A (Tyr A89, gelb), Schleife B (Trp A143, dunkel gelb) und Schleife C (Tyr A185, Cys A187, Cys A188, Tyr A192, orange). Die benachbarte γ -Untereinheit ist mit der Schleife D (Trp B53, Gln B55, violett), Schleife E (Arg B104, Val B106, Leu B112, Met B114, hell blau) und Schleife F (Tyr B164, blau) an der Bindung beteiligt (Abbildung aus Brejc et al., 2001).



Die Ligandenbindungsstelle ist durch aromatische und hydrophobe Aminosäuren von zwei benachbarten Untereinheiten und eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten charakterisiert. Auf der einen Untereinheit sind die Aminosäurereste in den Schleifen A, B und C organisiert, in der benachbarten Untereinheit in den Schleifen D, E und F.

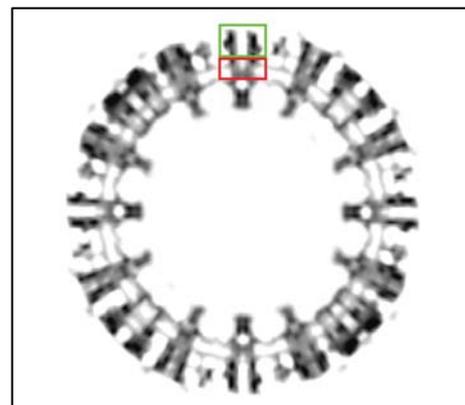
Dieses Modell wurde in vorangehenden Arbeiten durch Affinitätsmarkierungen mit verschiedenen Agonisten und Antagonisten für die Ligandenbindung im nAChR postuliert (Kao et al., 1984, Middleton und Cohen, 1991; Sine, 1993; Cohen et al., 1992). Die Auflösung der Struktur des Acetylcholinbindepoteins beschreibt die Ligandenbindungsstelle auf atomarer Ebene, die mit dem Modell für den nAChR in guter Übereinstimmung steht (siehe Abbildung 1.5, Abbildung 1.9).

1.2.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des nAChR

Grundlage für die Strukturuntersuchung des nAChR mit der Elektronenmikroskopie sind schlauchförmige Kristalle, die aus den Membranen des elektrischen Organs von *Torpedo marmorata*, also in der nativen Lipid/Protein-Rezeptorumgebung, gezüchtet werden (Brisson und Unwin, 1984). Dabei scheint die Bildung dieser Pseudo-3D Kristalle stark von der Zusammensetzung der Membran abzuhängen, denn sie gelingt nur bei Geweben aus Fischen, die im Herbst oder Winter gefangenen wurden. Nach Isolation rezeptorreicher Vesikel aus den Membranen werden Aliquots dieser Suspension in Kristallisationspuffer bei 17 °C gelagert. Sie aggregieren anfangs zu kurzen, ungeordneten Schläuchen. Nach 5-6 Wochen erhält man einheitliche etwa 3 µm lange und 100 nm breite schlauchförmige Kristalle, auf denen die Rezeptoren paarweise in Bändern angeordnet sind (siehe Abbildung 1.7). In den ersten Arbeiten mit diesen Rezeptorkristallen konnte die postulierte Anordnung der Untereinheiten bestätigt (Kubalek et al., 1987) und strukturelle Unterschiede in der Position der δ - und γ - Untereinheit zwischen aktivem und inaktivem Zustand beobachtet werden (Unwin et al., 1988).

Abbildung 1.7
Schlauchförmige Kristalle des nAChR

Gezeigt ist ein Querschnitt durch ein schlauchförmiges Kristall, womit die elektronenmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt werden. Ein Rezeptor mit zentralem Querschnitt ist oben gezeigt. Die N-terminale Ligandenbindungsstelle ist grün markiert, die Form des großen, zentralen Vestibüls ist gut erkennbar. Die Transmembrandomäne ist rot umrahmt (Abbildung aus Miyazawa et al., 2003).



Eine Auflösung des Rezeptors bis 17 Å gelang durch die Analyse von drei verschiedenen Familien von Rezeptorkristallen (Toyoshima und Unwin, 1990). Eine deutliche höhere Auflösung wurde durch die Analyse einer einzelnen Gruppe von Rezeptorkristallen und einer Datenüberlagerung vieler Bilder erreicht (Unwin, 1993). Diese Aufnahmen erlaubten eine Auflösung von 9Å und in der extrazellulären Domäne konnten die Strukturen der Acetylcholinbindungstasche der α -Untereinheit zugeordnet werden. Zusätzlich wurde die kanalformende Membransequenz M2 als durchgehende α -Helix identifiziert und die Position der geladenen Aminosäurereste, die den Selektivitätsfilter bilden, zugeordnet. Mit einer schnellen *sprayfreezing*-Technik gelang es die synaptische Freigabe von Acetylcholin nachzuahmen und den Kanal in seiner geöffneten Form zu untersuchen (Unwin, 1995).

Die Struktur des AChBP erleichterte die Interpretation der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von N. Unwin: Von der extrazellulären Domäne und dem Transmembranbereich des Rezeptors konnte dieser ein Bild mit einer Auflösung von 4,6 Å erhalten (Miyazawa et al., 2003), welches in den aktuellsten Arbeiten (Unwin, 2005) verifiziert und um die Darstellung der intrazellulären Domäne erweitert wurde. Hier wurde ein Modell entwickelt, wie Konformationsänderungen in der Ligandenbindungsdomäne nach Acetylcholinbindung zur Öffnung des Ionenkanals führen.

Die Bilder zeigen den Rezeptor mit einer Gesamtgröße von 160 Å, wobei jede Untereinheit eine ähnliche Größe (30Å x 40 Å x 160 Å) und die gleiche dreidimensionale Faltung hat.

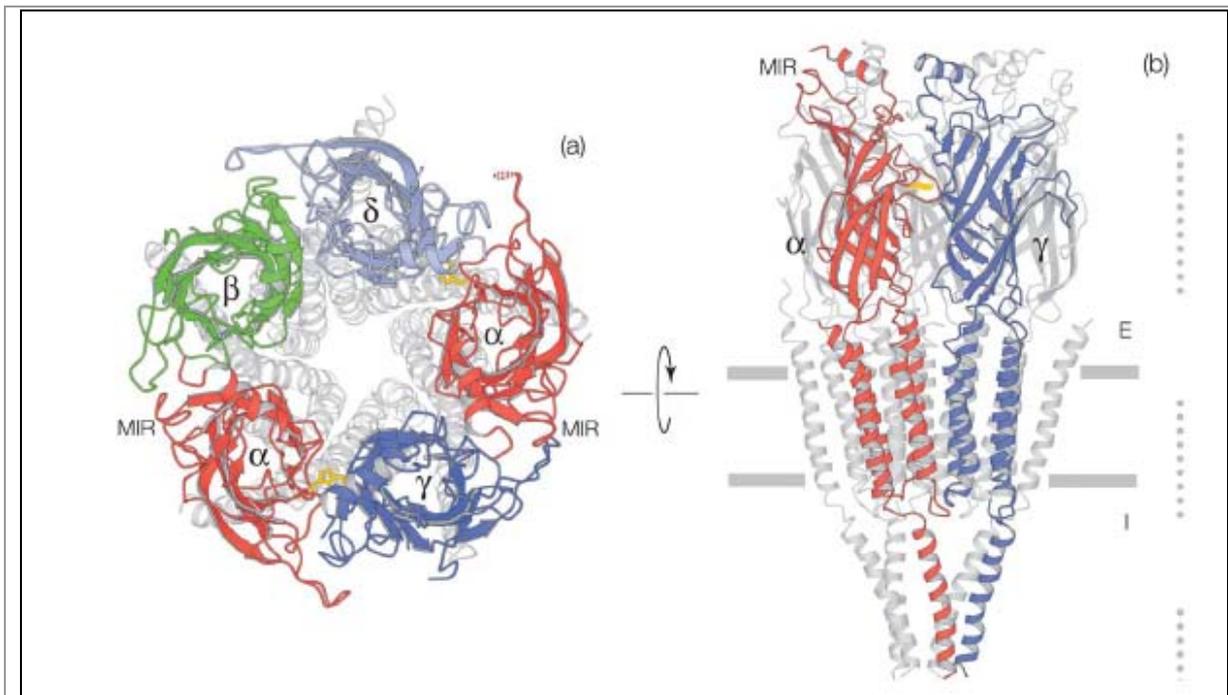


Abbildung 1.8

Modell des nikotinischen Acetylcholinrezeptors nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Die linke Darstellung zeigt die Aufsicht auf den Rezeptor vom synaptischen Spalt aus. Die rechte Abbildung zeigt die Seitenansicht parallel der Membranebene. Die Membran ist als graue Balken dargestellt (E – extrazellulär, I – intrazellulär). Die extrazelluläre Domäne ist dem AChBP ähnlich, mit geringen Unterschieden in der Ligandenbindungsstelle. Die Transmembrandomäne besteht aus vier α -Helices. Von der intrazellulären Domäne wurde eine MA-Helix nahe der Transmembranhelix 4 identifiziert. (Abbildung aus Unwin, 2005).

Vergleiche des AChBP mit gebundenen Liganden (Celie et al., 2004) und der N-terminalen Ligandenbindungsdomäne des geschlossenen Kanals (Unwin, 2005) zeigten, dass die Acetylcholinbindung mit einer deutlichen Konformationsänderung in der Domäne verbunden ist. In der geschlossenen Kanalform kann man zwei alternative Konformationen unterscheiden: eine charakteristisch für die alpha-Untereinheiten und eine typisch für die nicht-alpha-Untereinheiten.

Nach Acetylcholinbindung umschließen die A-, B- und C-Schleifen in der Ligandenbindungsdomäne den gebundenen Liganden und koordinieren dadurch die relevanten Seitenketten, die eine Drehung im Uhrzeigersinn der B-Schleife und eine in sich verdrehende Verschiebung der C-Schleife erlauben. Die B-Schleife ist mit dem $\beta 1$ - $\beta 2$ loop über die inneren Faltblattstränge verbunden. Die inneren Faltblätter des β -Sandwiches der alpha-Untereinheit werden um 10° im Vergleich zu den anderen Untereinheiten gedreht. Die Drehachse liegt etwa 8-9 Å von der Cys-loop Disulfidbrücke entfernt und verläuft zentral durch die Enden der M1, M3 und M4 Helix.

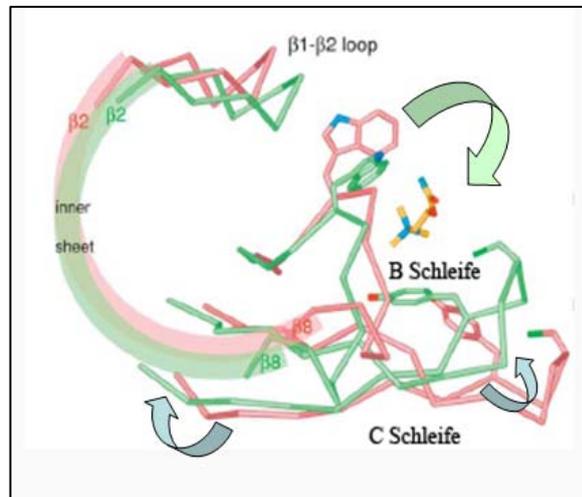
Einige Wechselwirkungen zwischen Aminosäureseitenketten verschiedener Untereinheiten der Ligandenbindungsdomäne wurden einer Stabilisierung der „gespannten“ Konformation

der alpha-Untereinheiten zugeordnet. Hierbei sind auch Salzbrücken wichtig, da diese nur an der Kontaktfläche mit alpha-Untereinheiten vorhanden sind. Eine Auflösung dieser Interaktionen nach Ligandenbindung führt zu der „entspannten“ charakteristischen nicht-alpha-Konformation.

Abbildung 1.9

Modell der Ligandenbindung

Dargestellt ist die Ligandenbindungstasche der alpha-Untereinheit des nAChR vor Ligandenbindung in der „gespannten“ Konformation (rosa) und des AChBP mit gebundenem Carbamylcholin in der „entspannten“ Konformation (grün). Die Drehung der B-Schleife (grüner Pfeil) und der C-Schleife (blauer Pfeil) wird über die inneren Falblätter auf den $\beta 1$ - $\beta 2$ loop für die Öffnung des Ionenkanals übertragen. (Abbildung nach Unwin, 2005).



Die 4 Transmembransequenzen M1-M4 sind vollständig α -helikal und reichen bis zu 10 Å in den extrazellulären Bereich hinein. Die M2-Helices der Untereinheiten bilden eine etwa 20 Å weite Pore, die durch einen wassergefüllten Raum von den anderen ringförmig um den Kanal angeordneten Transmembranhelices getrennt ist (siehe Abbildung 1.10).

Die porenbildene M2 Helix wurde bereits durch Mutationsanalysen und Affinitätsmarkierungen mit nicht-kompetitiven Antagonisten beschrieben. An homologen Positionen der M2 Helix in den 5 Untereinheiten befinden sich negativ geladene bzw. hydrophile Aminosäuren, die sich jeweils zu Ringen anordnen und die Leitfähigkeit des nAChR bestimmen (Hucho et al., 1986; Imoto et al., 1988, 1991; Villarroel und Sakmann, 1992). Mittels SCAM-Experimenten (*substituted cysteine accessibility method*) wurde die Zugänglichkeit der einzelnen Aminosäurereste untersucht und Unterschiede zwischen offenem und geschlossenem Kanalzustand detektiert ((Karlin und Akabas, 1998; Karlin, 2002).

Mit Hilfe dieser Ergebnisse wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen interpretiert und ein Modell für einen Öffnungsmechanismus des Kanals aufgestellt (siehe Abbildung 1.10). Die M2 Helix ist 40 Å lang und anweist etwa in der Mitte der Membran einen Knick an Position α -Leu251 auf. Auf Höhe von α -Ser266 und α -Glu262 bilden diese Reste mit den anderen Untereinheiten Ringe negativ geladener Seitenketten. Ein weiterer Ring an Position α -Glu241 stellt den Eingang der Pore dar. Diese drei Ringe wirken als Selektivitätsfilter und

erlauben eine hohe Kationenkonzentration in der Pore. Als *gate* wird die maximal verengte Region bei α -Leu251 bis α -Val255 charakterisiert. Der Abstand von der Porenachse bis zur Oberfläche der Aminosäuren ist hier etwa 3 Å. Zusätzlich gibt es symmetrische hydrophobe Wechselwirkungen benachbarter Aminosäuren (α -Leu251 mit Ala/Ser bzw. α -Ser252 und α -Phe256 mit Val/Ile). Diese bilden einen hydrophoben Gürtel und bieten durchströmenden Kationen alternative hydrophobe Kontakte, die durch Abstreifen ihrer ersten Hydrathülle das Tor passieren können.

Der Mechanismus, wie die Rotationsbewegungen in der Ligandenbindungsdomäne auf die Transmembranhelix M2 zur Kanalöffnung übertragen werden, ist wegen der geringen Auflösung der Struktur des geöffneten Kanals (Unwin, 1995) noch unklar. Mit den elektronenmikroskopischen Daten wird jedoch vermutet, dass die Übertragung vom β 1- β 2 loop und vom Cys-loop auf die M2-Helix erfolgt. Es kann beobachtet werden, dass in der geschlossenen Kanalform die Flexibilität der M2-Helix durch die Lage des β 1- β 2 loops und Cys-loops eingeschränkt ist. Die Konformationsänderung in der Ligandenbindungsdomäne ermöglicht, durch Auflösen von stabilisierenden Interaktionen der Aminosäureseitenketten in der alpha-Konformation, eine Rotation der M2-Helix. Der Kanal wird geöffnet, da die schwachen hydrophoben Wechselwirkungen aufgebrochen werden und sich alternative hydrophile Kontakte ausbilden, die einen Ionentransport erlauben.

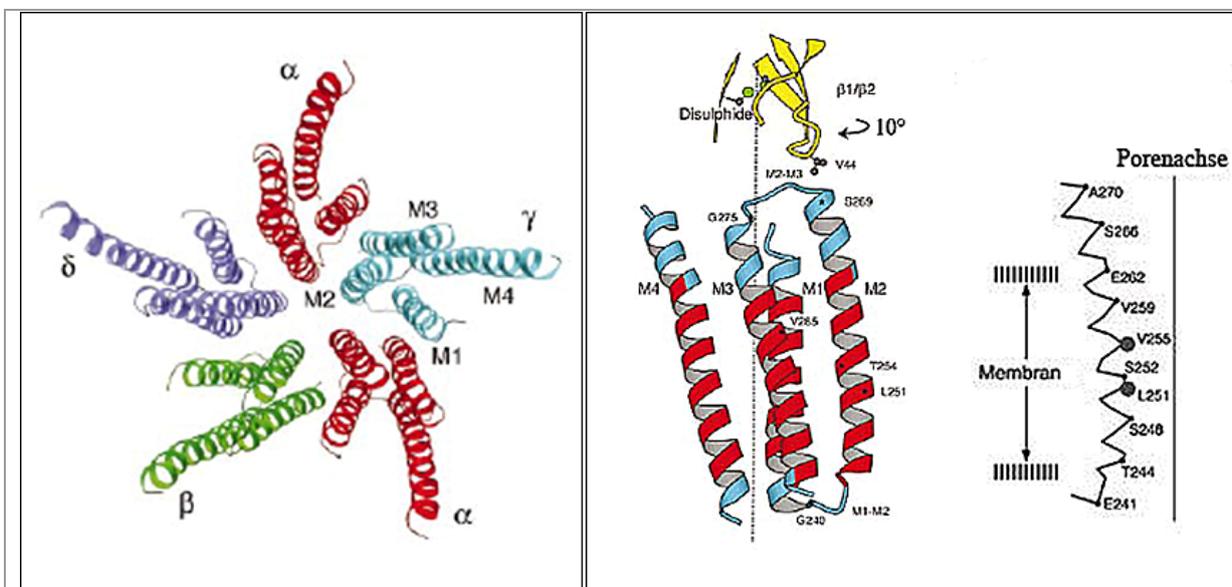


Abbildung 1.10 Transmembrandomäne des nikotinischen Acetylcholinrezeptors

In der linken Abbildung sind die 5 Untereinheiten mit jeweils 4 Transmembranhelices in der Aufsicht vom synaptischen Spalt dargestellt. Sie verzüngen sich zur cytoplasmatischen Seite hin, M2 stellt die porenbildende Helix dar, die frei beweglich von den anderen Helices abgeschirmt ist.

Die rechte Abbildung zeigt die Seitenansicht parallel zur Membranebene. Die Drehung des β 1- β 2-loops in der extrazellulären Domäne nach Ligandenbindung ist angedeutet, die zum Aufdrrehen der M2-Helix und zur Kanalöffnung führt. Schematisch dargestellt ist die M2 Helix, hier ist deutlich ein Knick an Position V255 dargestellt. Diese Region wird als engste Region der Pore und als Tor definiert (Abbildung aus Miyazawa et al., 2003).

Mit dieser Arbeit wurden erstmals Hinweise zur dreidimensionalen Struktur der intrazellulären Domäne erhalten. Nahe bei der M4-Helix konnte eine 26 Aminosäuren lange α -Helix (als MA-Helix bezeichnet) identifiziert werden (siehe Abbildung 1.8). Weitere Elektronendichten konnten bisher nicht aufgelöst werden, es wird vermutet, dass der Rest der intrazellulären Domäne des Rezeptors unstrukturiert vorliegt. Die intrazellulären MA-Helices bilden auf der cytoplasmatischen Seite ein Vestibül in Form eines umgekehrten pentagonalen Kegels, der fünf Fenster ähnlicher Größe hat. Diese Fenster haben eine maximale Breite von ca. 8 Å, was mit dem Durchmesser eines Natrium- oder Kaliumions vergleichbar ist, das von seiner ersten Hydratationshülle umgeben wird. Die schmalen Zwischenräume zwischen den Kontaktflächen der Untereinheiten auf der intrazellulären Seite, stellen mögliche Bahnen für den Ionentransport dar. Die meisten Aminosäureseitenketten sind hier polar oder negativ geladen und folglich selektiv für Kationen. Ähnlich geladene Zwischenräume treten auch auf der extrazellulären Seite der Transmembrandomäne auf, so dass auch hier die Konzentration der Kationen relativ zu den Anionen durch das kationenstabilisierende Milieu erhöht ist. Diese Beobachtungen zeigen zusammen mit den Aminosäureseitenketten der M2-Helix, dass zahlreiche negativ geladene Gruppen in der Transmembrandomäne die Ionenselektivität beeinflussen.

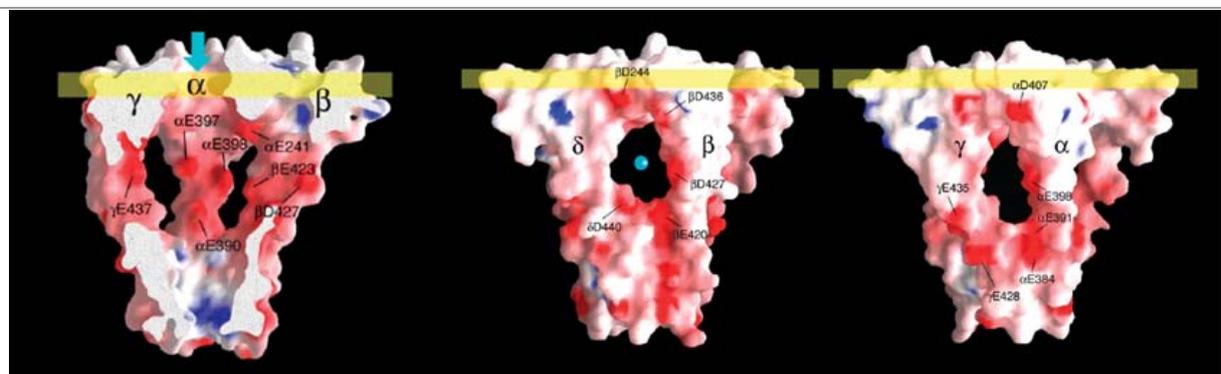


Abbildung 1.11 Intrazelluläre MA-Helices bilden Vestibül mit negativ geladener Oberfläche

In der Abbildung sind die Oberflächenpotentiale des intrazellulären Vestibüls dargestellt. Rote Regionen entsprechen Aminosäuren mit negativ geladenen Resten, blaue Regionen mit positiv geladenen Resten. Überwiegend sind negative Reste identifiziert, die möglicherweise einen Beitrag zur Selektivität des Rezeptors leisten. Die linke Abbildung zeigt einen Querschnitt entlang der Porenachse. Der Eintritt der Kationen durch die Pore ist durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet. Die mittlere und die rechte Darstellung entsprechen der Außenansicht (Abbildung aus Unwin, 2005).

1.3.1 Rezeptoraufbau durch Assoziation der Untereinheiten

In embryonalen Muskeln ist die Stöchiometrie der Untereinheiten $2\alpha\beta\gamma\delta$ (Karlin et al, 1983), wobei γ in der postnatalen Entwicklung durch die ε – Untereinheit ersetzt wird (Takai et al., 1985, Mishina et al., 1986, Gu und Hall, 1988). Die Untereinheiten werden im ER synthetisiert und lagern sich dort als Rezeptor zusammen. Vor dem Zusammenbau unterliegt die α -Untereinheit einer Faltungsreaktion mit der Ausbildung der für den Rezeptor charakteristischen Disulfidbrücke (Smith et al., 1987; Blount and Merlie, 1990). Die N-terminalen Domänen der $\alpha 1$ -, δ - und γ -(bzw. ε)- Untereinheit enthalten die Information für die Initiierung der spezifischen Untereinheitenassoziation, wie durch die Untersuchung von Chimeren gezeigt werden konnte (Yu und Hall, 1991; Verrall und Hall, 1992).

Der Zusammenbau des nAChR geschieht dann in einer definierten Reihenfolge, wobei die gefaltete α -Untereinheit zuerst mit der γ -(bzw. ε -) und der δ -Untereinheit Heterodimere bildet und diese sich dann zum kompletten Rezeptor zusammenschließen (Blount and Merlie, 1989, 1990, Gu et al., 1991, Saedi et al., 1991) oder sich direkt ein $\alpha\beta\gamma$ Trimer bildet (Green und Claudio, 1993). Yu und Hall (1994) untersuchten die Assoziation von $\alpha\beta$ -Chimeren und definierten 17 Aminosäurereste im C-terminalen Bereich der cytoplasmatischen Domäne der α -Untereinheit als essentiell für die finalen Schritte des Rezeptorzusammenbaus. Für Zwischenschritte ist diese Sequenz jedoch entbehrlich.

1.3.2 Rezeptortransport an die Zelloberfläche

Eine detaillierte Analyse des Transportes des nAChR zur Zelloberfläche führten Keller et al. (2001) durch und definierten einen Kontrollmechanismus. So wird der Transport vom ER zum Golgi durch ein Signal zweier benachbarter Basen (Arg313-Lys314) in der cytoplasmatischen Domäne der α -Untereinheit moduliert. Nur wenn dieses Signal mutiert oder maskiert ist, wie durch eine Dimerbildung, kommt es zum korrekten Transport an die Zelloberfläche.

In einer weiteren Arbeit über die Regulation der Acetylcholinrezeptorexpression durch das Ubiquitin-Proteasome-System (Christianson und Green, 2004) wurde ein Sequenzmotiv im Transmembranbereich nahe dem Cytosol oder in der intrazellulären Domäne definiert, welches zur Ubiquitinierung und zum Abbau nicht-assoziiierter Rezeptoruntereinheiten führt.

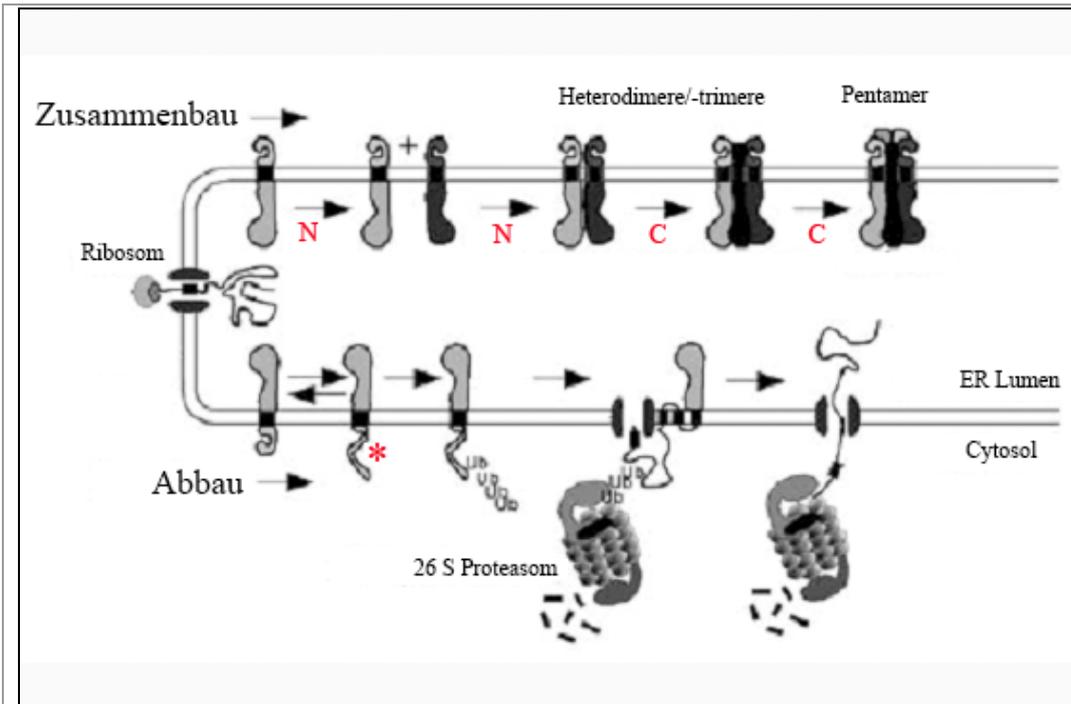


Abbildung 1.13

Modell für den Zusammen- und Abbau der einzelnen Untereinheiten des nAChR im ER

Nur 20-40% der synthetisierten Untereinheiten assoziieren korrekt zum vollständigen Rezeptor. Das Startsignal für die Assoziation der Untereinheiten wurde in der N-terminalen Ligandenbindungsdomäne (N) identifiziert, während für die letzten Schritte des Zusammenbaus Sequenzen in der cytoplasmatischen Domäne (C) essentiell sind. Untereinheiten die nicht oder falsch assoziiert sind, werden vom Ubiquitin-Proteasom-System an einem Sequenzmotiv (*) in der Transmembrandomäne nahe dem Cytosol oder in der cytosolischen Domäne erkannt (Abbildung nach Christianson und Green, 2004).

1.3.3 Die intrazelluläre Domäne als Phosphorylierungstarget

Drei Proteinkinasen wurden für die Phosphorylierung des peripheren nAChR von *Torpedo californica* identifiziert: die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA (Hunganir und Greengard, 1983), die Proteinkinase C PKC (Safran et al., 1987) und eine Tyrosinkinase (Hunganir et al., 1984). Für diese Kinasen gibt es 7 potentielle Phosphorylierungsstellen in der intrazellulären Domäne des nAChR: für PKA an γ S353 und δ S361; für PKC an α S333 und δ S377; und für die tyrosinspezifische Proteinkinase an β Y355, γ Y364 und δ Y372. Die Phosphorylierung an Position δ S362 im nativen Rezeptor konnte identifiziert werden (Schroeder et al., 1991), obwohl die Aminosäuresequenz an dieser Stelle nicht als Phosphorylierungstarget postuliert worden war (siehe Abbildung 1.12).

Auch die intrazellulären Domänen der neuronalen nAChRs sind Phosphorylierungstargets. Die α_4 -Untereinheiten der neuronalen $\alpha_4\beta_2$ Rezeptoren aus Ratte wurden als Substrat für PKC und PKA identifiziert, wobei α_4 -S368 durch beide Kinasen phosphoryliert werden kann (Wecker et al., 2001; Guo und Wecker, 2002).

1.3.4 Rezeptorinteraktion mit dem Cytoskelett

Ein entscheidender Prozess während der Synaptogenese ist die Ansammlung der postsynaptischen Proteine an der sich entwickelnden motorischen Endplatte. Die in den unreifen Myotuben exprimierten nAChR sind diffus entlang der Membran verteilt. Nach Innervierung aggregieren die Rezeptoren in hohen Konzentrationen an der Stelle des Nerv-Muskelkontakts und werden verankert (Fertuck und Salpeter, 1974). Dieser Prozess wird als Clustern bezeichnet und ist essentiell für eine schnelle Signalübertragung und die Auslösung eines postsynaptischen Aktionspotentials.

In diesem Zusammenhang wurde das 43 kDa Protein Rapsyn identifiziert, welches mit dem nAChR in einem Verhältnis von ~1:1 in postsynaptischen Membranen von *Torpedo* und in Muskelzellen assoziiert ist (La Rochelle und Froehner; 1986, 1987). Rapsyn ist essentiell für das Clustern des nAChR an der Zelloberfläche (Froehner et al., 1990, Philips et al., 1991). Rapsyn besitzt eine N-Myristoylierung für eine Verankerung mit der Membran (Musil et al., 1988) und acht Tetratricopeptid-Repeats (TRP) für intra- und intermolekulare Wechselwirkungen (Ramarao und Cohen, 1998). Am C-Terminus von Rapsyn wird eine amphipatische α -Helix oder eine *coiled-coil*-Struktur vermutet (Lupas, 1996, Ramarao und Cohen, 1998). Rapsyn-Mutanten, denen diese Domäne fehlt, können nicht nAChR-Cluster bilden, wenn sie in HEK293 Zellen coexprimiert werden (Ramarao und Cohen, 1998; Ramarao et al., 2001). Durch Coexpression von Rapsyn mit den einzelnen Untereinheiten des nAChR und systematische Mutationen in der intrazellulären Domäne des nAChR konnte gezeigt werden, dass Rapsyn mit jeder einzelnen Untereinheit des nAChR interagiert, so dass beide Proteine miteinander Cluster bilden (Maimone und Merlie, 1993; Yu und Hall, 1994). Eine direkte Interaktion zwischen Rapsyn und dem nAChR mit klassischen biochemischen Methoden konnte noch nicht nachgewiesen werden (Burden et al., 1983, Froehner et al., 1991, Colledge und Froehner, 1998).

Neben Rapsyn wurden weitere Proteine identifiziert, die mit dem nAChR kolokalisieren. Sie beeinflussen ebenfalls die Cytoskelettassoziation und das Clustern des Rezeptors. Agrin, ein Heparinsulfat-Proteoglycan, wurde hier als extrazelluläres Signal für das Clustern des Rezeptors identifiziert (McMahan, 1990), welches die membrandurchspannende muskelspezifische Kinase MuSK aktiviert (Valenzuela et al., 1995; Glass et al., 1996). Dadurch wird eine Signalkaskade unter Beteiligung von Rapsyn ausgelöst, die zur Tyrosinphosphorylierung der β - und der δ -Untereinheit des nAChR und zur Clusterbildung führt (Gillespie et al., 1996, Qu et al., 1997, Borges und Ferns, 2001). Die verantwortlichen Tyrosinkinasen konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Möglicherweise sind

Mitglieder der Familie der Src-Kinasen (Fyn, Fyk und Src) beteiligt (Mohamed et al., 2001), da diese im Komplex mit dem nAChR (Mittaud et al., 2001) und Rapsyn (Mohamed und Swope, 1999) identifiziert wurden und durch Agrin aktiviert werden (Mittaud et al., 2001). Andererseits könnten auch Abl Kinasen den nAChR in dieser Signalkaskade phosphorylieren, da Abl1 und Abl2 in Myotuben für das Agrin-induzierte Clustern des nAChR essentiell sind (Finn et al., 2003). Das Clustern des nAChR wird auch durch Laminin, ein adhäsives Glykoprotein der Basalmembran, über einen Dystroglycan-abhängigen Mechanismus induziert (Sugiyama et al., 1994; Montanaro et al., 1998; Jacobson et al., 2001).

α -Dystroglycan ist ein glycosyliertes Matrixprotein, das posttranslational in zwei Peptide α - und β - Dystroglycan gespalten wird (Ervasti und Campbell, 1991). α -Dystroglycan ist auf der Außenseite der Muskelzelle lokalisiert und bindet β -Dystroglycan, welches die Muskelmembran durchspannt. Auf der intrazellulären Seite ist Rapsyn assoziiert. Noch nicht identifizierte Kinasen führen auch hier zur Phosphorylierung des nAChR (Marangi et al., 2002). Der Laminin-induzierte Signalweg konnte durch die Mutation von Dystroglycan ausgeschaltet werden, so dass nur ein leichtes Clustern durch Agrin-Induktion beobachtet werden konnte (Cote et al., 1999; Jacobson et al., 2001). Die beiden Signalwege sind vermutlich miteinander gekoppelt, so dass die nAChR an der postsynaptischen Membran durch ein Agrin-Signal zu Clustern aggregieren. Die wenigen Cluster lösen die Laminin-Signalkaskade aus, die zur weiteren Aggregation in Clustern führt (Marangi et al., 2001). Dystroglycan bindet auf der intrazellulären Seite weitere Cytoskelettproteine wie Utrophin und Dystrophin (Chung und Campanelli, 1999).

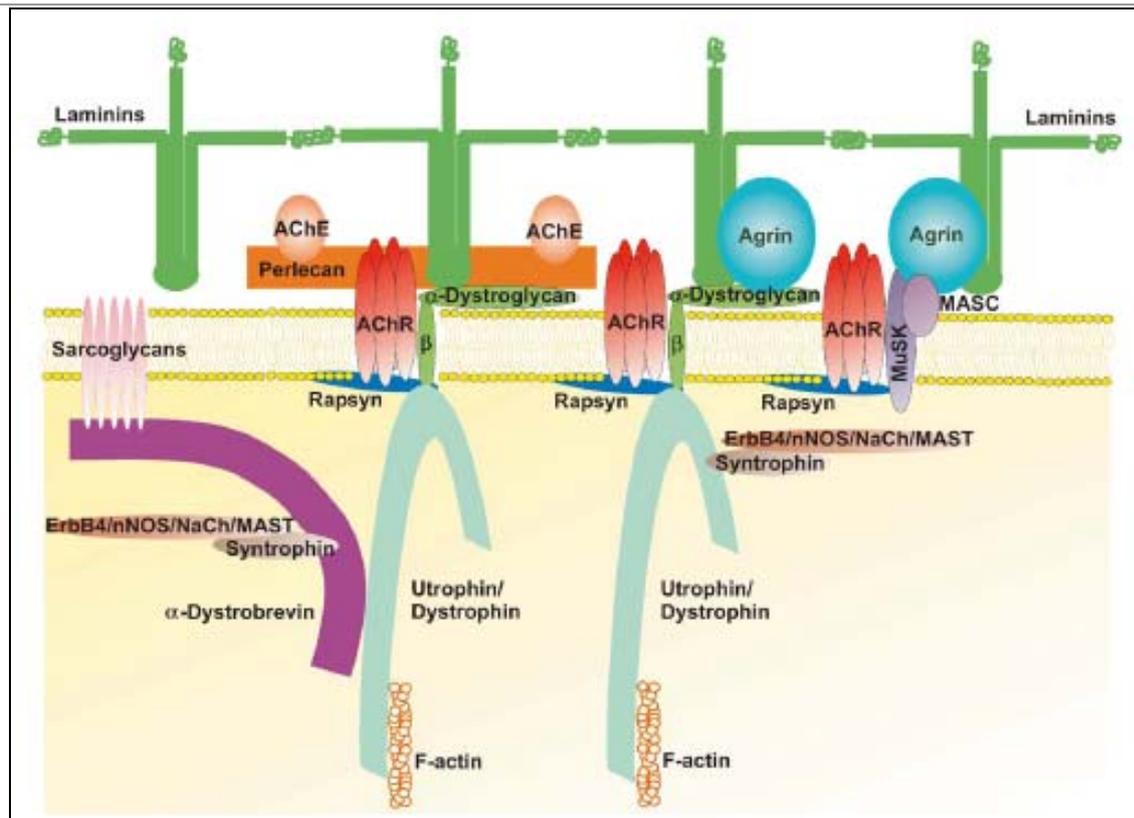


Abbildung 1.14 Modell der Interaktion des nAChR mit dem Cytoskelett

Agrin aktiviert den Rezeptor MuSK, der eventuell mit MASC (myotube associated specific component) mit dem postsynaptischen Proteinkomplex assoziiert ist. MuSK induziert das Clustern des AChR mittels Rapsyn und Tyrosinkinase. Parallel wird das Clustern des nAChR über Laminin und Dystroglycan induziert. Eine mögliche Interaktion des MuSK/Rapsyn/nAChR Komplexes mit dem Dystroglycan/Rapsyn/nAChR-Komplex findet entweder durch Laminin oder Selbstassoziation des Rapsyns statt. α -Dystroglycan bindet für die Lokalisation der Acetylcholinesterase (AChE) Perlecan. β -Dystroglycan bindet Rapsyn und Dystrophin/Utrophin, worüber α -Dystrobrevin, Syntrophin und Aktin interagieren. Mit Syntrophin sind verschiedene Signalmoleküle der neuromuskulären Endplatte assoziiert (Abbildung aus Banks et al., 2003)

1.3.5 Rezeptoraktivität und Desensitivierung

Der Rezeptor kann in drei funktionellen Zuständen existieren (Katz und Thesleff, 1957; Weber et al., 1975). Im Ruhezustand sind die Bindungsstellen nicht besetzt und der Ionenkanal ist geschlossen. Die Bindung von Acetylcholin löst eine Öffnung des Kanals für 1-10 Millisekunden aus, wodurch ein- oder zweiwertige Kationen passieren können (aktiver, offener Zustand). Bei längerer Exposition des Agonisten geht der Rezeptor in einen desensitvierten Zustand über, wobei der Kanal geschlossen, aber nicht aktivierbar ist. Je nach dem wie schnell dieser Zustand erreicht wird, unterscheidet man zwei Prozesse der Desensitivierung: ein schneller (1-10 ms) und ein langsamer (Sekunden bis Minuten) Prozess (Sakmann et al., 1980; Hamill und Sakmann, 1981).

Die Tyrosinphosphorylierung des nAChR steigert dramatisch die schnelle Desensitivierung, während die Dephosphorylierung der endogen phosphorylierten Tyrosinreste den Prozess der Desensitivierung deutlich verlangsamt. Dies wurde mit Messungen der Rezeptoraktivität von

Hopfield et al. (1988) gezeigt. Die PKA-Phosphorylierung der Serinreste in den γ und δ Untereinheiten steigert ebenfalls den Prozess der schnellen Desensitivierung (Huganir et al., 1986).

Im N-terminalen Bereich der cytoplasmatischen Domäne des nAChR gibt es ein Sequenzmotiv RXPXTH(X)₁₄P, das in α_4 , β_2 , β_4 und anderen Untereinheiten des nAChR konserviert ist (Morgado-Valle et al., 2001). Dieses Motiv ist essentiell für die Aktivität $\alpha_4\beta_2$ -nAChRs. Eine vollständige Deletion dieser Sequenz führt zu keiner Rezeptorantwort in Gegenwart von Agonisten. Die Deletion einiger Aminosäuren aus dieser Sequenz führte zu einer geringeren Sensitivität des Rezeptors (Noda et al., 1983, Morgado-Valle et al., 2001). Es ist allerdings nicht klar, ob der beobachtete Einfluss auf die Sensitivität durch Konformationsänderungen im Rezeptor oder veränderte Interaktionen mit den anderen Untereinheiten/ mit anderen Proteinen begründet ist.

1.3.6 Intrazelluläre Signalkaskaden

Mit der cytoplasmatischen Domäne der α_4 -Untereinheit wurde ein Yeast-two-Hybrid Screen durchgeführt (Jeanclos et al., 2001). Hier wurde Interaktion mit dem intrazellulären Regulationsprotein 14-3-3 η identifiziert, welches die Rezeptorexpression beeinflusst und als Chaperon-, Gerüst- bzw. Adaptorprotein bekannt ist (Wang und Shakes, 1996). Zusätzlich konnte als Interaktionspartner das Calcium Sensor Protein „visinin-like“ Protein-1 (Lin et al., 2002) identifiziert werden, welches die Oberflächenexpression und die Sensitivität des Rezeptors nach Agonistenbindung Calcium-abhängig beeinflusst.

Mit Oberflächenplasmonresonanz wurde die Bindung des Adaptorproteins Grb2 mit seiner SH2 Domäne an die Tyrosin-phosphorylierte intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit gezeigt (Colledge und Froehner, 1998). Die physiologische Relevanz dieser Interaktion ist noch ungeklärt.

Die intrazelluläre Domäne des nAChR ist wichtig für die Expression des Rezeptors, seinen korrekten Zusammenbau aus den einzelnen Untereinheiten, den Transport des Rezeptors an die Zelloberfläche und die dortige Lokalisation durch Verknüpfung mit dem Cytoskelett. Mehrere Phosphorylierungsstellen dieser Domäne wurden identifiziert, die mit intrazellulären Signalkaskaden verknüpft sind. Für das globale Verständnis der Interaktionen des nAChR auf der cytoplasmatischen Seite fehlen vor allem Darstellungen der Assoziation von interagierenden Proteinen. Mit der Aufklärung der 3D-Struktur der intrazellulären Domäne ließen sich einige der hier angesprochenen Prozesse auf atomarer Ebene genauer erklären.

1.4 Ziele der Arbeit

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor als einer der bestcharakterisierten ligandengesteuerten Ionenkanäle konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht für eine Röntgenstrukturanalyse kristallisiert werden. Die Charakterisierung einzelner Domänen erlaubt Schritt für Schritt das Verständnis des Rezeptors auf atomarer Ebene. Durch die Kristallstruktur des löslichen Acetylcholinbindepoteins und die elektronenmikroskopische Charakterisierung des Gesamtrezeptors kann man heute die Bindung von Agonisten und Antagonisten in der Ligandenbindungsdomäne genau beschreiben. Auch wie die Transmembranhelices des geschlossenen Rezeptors die Membran durchspannen, konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gezeigt werden. Die Signalweiterleitung, die zur Rezeptoröffnung führt, kann noch nicht detailliert dargestellt werden, da zu wenige Daten über den geöffneten Rezeptor vorhanden sind.

Die intrazelluläre Domäne des nAChR ist strukturell am wenigsten charakterisiert. Sie ist in ihrer Größe und Zusammensetzung sehr variabel, essentiell für die Rezeptorfunktion und ist an intrazellulären Signalwegen beteiligt. Hinweise auf die Struktur an Hand der Elektronenmikroskopie blieben lange ganz aus, neuerdings konnte lediglich eine kurze α -Helix im C-terminalen Bereich der Domäne aufgeklärt werden.

Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung der intrazellulären Domäne des nikotinischen Acetylcholinrezeptors. Dabei sollte die Domäne der δ -Untereinheit von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica* untersucht werden. Die beiden Domänen zu 51,7 % identisch. Die identifizierten Phosphorylierungsstellen befinden sich an konservierten Positionen.

Ratte	1	HFRT P STHVLSEGVK F FLETL P KLLHMSRPEEEDPGP---RALIRRT SS LG Y ISKAE EY
<i>Torpedo</i>	1	HFRT P STHVLSTRVK Q IFLEK L PRILHMSRADESE Q PDWQNDLKLRR S SV G YISKA Q E Y
		***** ** *** * ***** *
		*** ** ***** **
Ratte	58	FSLK S RS D LMFEK Q SERHGLARRLTTARKPPASSEQV--QQELFNEMKPAVDGANFIVNH
<i>Torpedo</i>	61	FNIK S RSELMFEK Q SERHGLVPRVTPRIGFGNNNENIAASDQLHDEIKSGIDSTNYIVK Q
		* **** ***** * *
		* * * * * * * * * *
Ratte	116	MRDQNSYNEEKDNWNQVARTVDR
<i>Torpedo</i>	121	IKEKNAYDEEVGNWNLVGQTIDR
		* * * * * * * * *

Abbildung 1.15

Alignment der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte und *Torpedo*

Im Sequenzvergleich sind die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica* zu 51,7 % identisch (als * gekennzeichnet). Die konservierten Phosphorylierungsstellen sind als fett und unterstrichen markiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Expressionssystems und die Entwicklung einer effizienten Reinigungsstrategie für die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte und *Torpedo californica*.

Da es für die Funktion der untersuchten Domäne keinen biochemischen Aktivitätstest gibt, sollte ein Reinigungsprotokoll unter nativen Bedingungen entwickelt werden, also eine lösliche Expression und eine Reinigung ohne Detergenzien erfolgen. Unter diesen Bedingungen ist am wahrscheinlichsten die Domäne in ihrer nativen Form zu isolieren. Erweisen sich diese Vorgaben als nicht anwendbar, stehen für die Charakterisierung der intrazellulären Domäne nur indirekte Methoden zur Verfügung. Da die Domäne Substrat für verschiedene Proteinkinasen ist, kann die Phosphorylierung *in vitro* Hinweise auf die Funktionalität der exprimierten Proteine geben. Eine weitere Charakterisierung soll mit biophysikalischen Methoden erreicht werden.