

2 Ergebnisse

2.1 Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolls für die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Protokoll für die Expression und Reinigung der cytoplasmatischen Domäne des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) entwickelt werden, so dass ausreichende Mengen für nachfolgende strukturelle Untersuchungen gewonnen werden können. Es wurde die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Torpedo californica* (TID) und *Rattus norvegicus* (RID) in unterschiedlichen Expressionssystemen untersucht.

Die cDNA für die gesamte δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* auf dem Klonierungsvektor pSP65 wurde freundlicherweise von PD Dr. Veit Witzemann, MPI für medizinische Forschung Heidelberg, zur Verfügung gestellt (Witzemann et al., 1990). Die cDNA für die cytoplasmatische Domäne der δ -Untereinheit von *Torpedo californica* lag aus vorhergehenden Arbeiten vor (Toepfer, 2002).

Die intrazelluläre Domäne des nAChR wurde in Form unterschiedlicher Fusionsproteine exprimiert, um eine möglichst effiziente Reinigung zu ermöglichen. Dabei wurde anfangs die Fusion mit kurzen Affinitätstags wie der Streptag oder der Hexahistidintag untersucht. Eine erhöhte Löslichkeit des untersuchten Proteins sollte durch Fusion mit anderen löslichen Proteinen wie MBP-, GST- und SUMO-Protein erreicht werden.

2.1.1 Strep-Fusionsproteine

Das StreptagII ist ein Oktapeptid (WSHPQFEK) und bindet mit hoher Affinität an eine Mutante des Streptavidins, das Strep-Tactin (Schmidt et al., 1996). Die Bindung im Strep-System erfolgt mit hoher Affinität (Wilchek und Bayer, 1990), dadurch sollte auch eine Reinigung schwach exprimierter Proteine (geringer Anteil im Rohextrakt) möglich sein. Die Elution mit Biotinderivaten erfolgt unter milden Bedingungen, so dass das untersuchte Protein in seiner Aktivität nicht beeinflusst werden sollte.

2.1.1.1 Klonierung

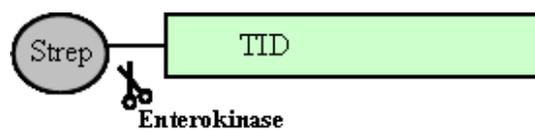
Für die Expression der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte und *Torpedo* als Fusionsprotein mit Streptag erfolgte die Klonierung in unterschiedliche pASK-Vektoren (IBA). Daraus resultierten Konstrukte mit N-terminalem Streptag mit Enterokinaschnittstelle (pASK15) bzw. C-terminaler Streptag ohne Proteasespaltstelle (pASK3) für eine cytoplasmatische Expression. Zusätzlich wurden Fusionsproteine mit N-terminalem Streptag mit Faktor Xa-Schnittstelle und OmpA-Leitsequenz zur periplasmatischen Expression (pASK6) untersucht (siehe Abbildung 2.1). Die cDNAs für die Fusionsproteine mit N-terminalem Streptag mit Enterokinaschnittstelle wurden zusätzlich in den Vektor pET28a kloniert.

Konstrukte für die cytoplasmatische Expression der Strep-Fusionsproteine:

Strep-RID_EK in pASK15 bzw. pET28a:



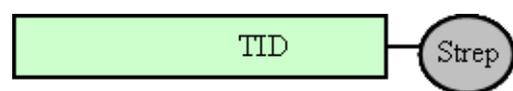
Strep-TID_EK in pASK15 bzw. pET28a:



Strep-RID in pASK3:

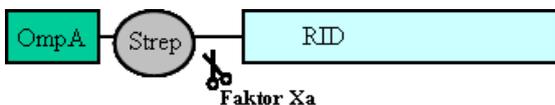


Strep-TID in pASK3:



Konstrukte für die periplasmatische Expression der Strep-Fusionsproteine:

Strep-RID in pASK6:



Strep-TID in pASK6:

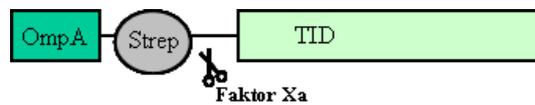


Abbildung 2.1

Strep-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica*

Es wurden Nomenklatur der Fusionsproteine, die Expressionsvektoren und der Expressionszielort genannt. Die Fusionsproteine mit N- bzw. C-terminalem Streptag und den Proteasespaltstellen sind graphisch dargestellt.

2.1.1.2 Expression

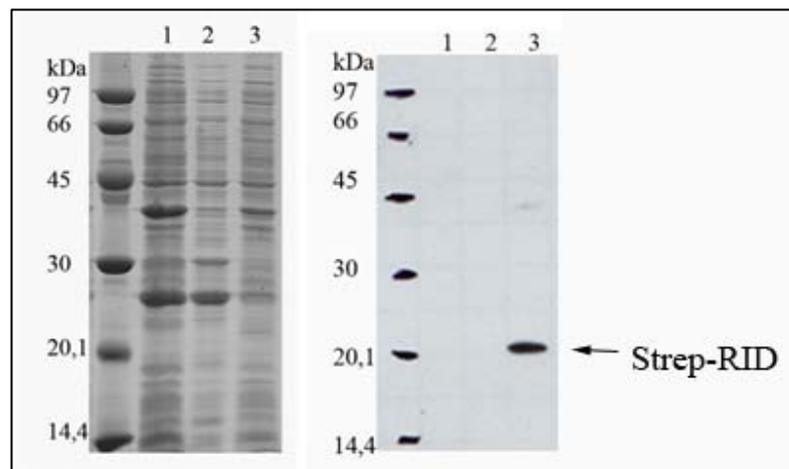
Für einen Expressionstest wurden die Bakterienstämme *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) pLysS und *E. coli* Rosetta(DE3) mit den pASK Vektoren, die für die sechs Strep-Fusionsproteine codieren, transformiert. Die Expression erfolgte nach Induktion mit Anhydrotetrazyklin (AHT). Lediglich in den Stämmen *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* Rosetta(DE3) zeigte sich für alle Konstrukte eine minimale Expression, die nur im Western Blot (anti- δ -loop Antikörper), nicht aber auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel detektiert werden konnte. Ein anschließender Zellaufschluss zeigte, dass die exprimierten Fusionsproteine ausschließlich in der unlöslichen Fraktion vorkommen (siehe Abbildung 2.2). Um die schwache Expressionsrate zu verbessern, wurden die Konstrukte Strep-RID_EK und Strep-TID_EK in den Vektor pET28a mit einem T7-Promotor kloniert. Doch auch hier konnte nur eine schwache, durch Western Blot detektierbare und unlösliche Expression in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* Rosetta(DE3) erreicht werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Abbildung 2.2
Testexpression Strep-RID:

Links: 15 % SDS-PAGE,
Coomassie gefärbt
Rechts: Western Blot mit
anti- δ -loop Antikörper

Die Expression von Strep-RID wurde in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt und die Löslichkeit des Produktes untersucht.

- 1 *E. coli* BL21(DE3) vor Induktion
- 2 Fraktion löslicher Proteine
- 3 Fraktion unlöslicher Proteine



2.1.1.3 Zellaufschluss und Proteinisolierung

Da im Expressionstest nur eine geringe Proteinexpression detektiert werden konnte, sich aber Strep-Fusionsproteine mit hoher Affinität an Strep-Tactin isolieren lassen, wurde die Expression in einem größeren Maßstab durchgeführt. Die Reinigung erfolgte nach einem Zellaufschluss unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie an Strep-Tactin. Dabei konnte jedoch keines der Strep-Fusionsproteine isoliert und angereichert werden.

Die Fusionsproteine Strep-RID_Xa bzw. Strep-TID_Xa sollten periplasmatisch exprimiert werden. Im Periplasma sind nur wenige bakterielle Proteine vorhanden, was die folgende

Reinigung erleichtert. Zudem unterstützt die Zusammensetzung des Periplasmas die korrekte Faltung des Proteins und die Bildung von Disulfidbrücken (Rietsch et al., 1996). Der Zellaufschluss erfolgte in einem glukosehaltigen Puffer, wodurch das Periplasma freigesetzt wird. In dieser Fraktion waren die Strep-Fusionsproteine jedoch nicht zu detektieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Alternativ wurden die Bakterien in Gegenwart von 8M Harnstoff unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen. Da die Reinigung an Strep-Tactin jedoch nicht unter denaturierenden Bedingungen möglich ist, wurde das Zellysat in Harnstoff gegen den Bindungspuffer dialysiert bzw. mittels Gelfiltration renaturiert. Eine Anreicherung mittels Affinitätschromatographie an Strep-Tactin konnte auch hier nicht beobachtet werden, da das jeweilige untersuchte Strep-Fusionsprotein während der Rückfaltung vollständig präzipitierte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR als Strep-Fusionsprotein in *E. coli* konnte nur mit geringer Ausbeute erreicht werden. Eine Isolierung der Fusionsproteine gelang nur unter denaturierenden Bedingungen. Eine Reinigung mittels Strep-System ist jedoch nur unter nativen Bedingungen möglich. Daher erwies sich dieses System als ungeeignet für die Anreicherung der intrazellulären Domäne des nAChR.

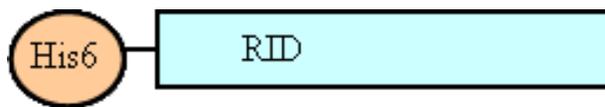
2.1.2 Hexahistidin-Fusionsproteine

Die Reinigung rekombinanter Proteine mit Polyhistidinresten erfolgt mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (Porath et al., 1975), die sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden kann. Dies ist ein deutlicher Vorteil gegenüber dem Strep-System.

2.1.2.1 Klonierung

Die cDNA der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR der Ratte wurde in den Vektor pET28a kloniert. Dieser codiert für ein Fusionsprotein mit N-terminalem Hexahistidintag und Thrombinspaltstelle. Zur Konstruktion eines Fusionsproteins mit N-terminalem Hexahistidintag ohne Proteasespaltstelle erfolgte die Klonierung in den Vektor pET24a. Die cDNA der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Torpedo californica* wurde in unserem Labor von Dr. Viktoria Kukhtina in einen modifizierten Vektor pET11a kloniert (siehe Abbildung 2.3).

His-RID in pET24a:



His-RID_Thr in pET28a:



His-TID in pET11a:

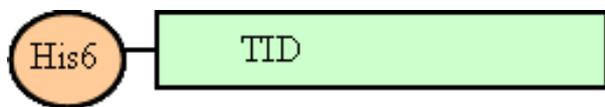


Abbildung 2.3 Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica*

Es wurden Nomenklatur der Fusionsproteine und die Expressionsvektoren genannt. Die Fusionsproteine mit N-terminalem Hexahistidintag sind graphisch dargestellt.

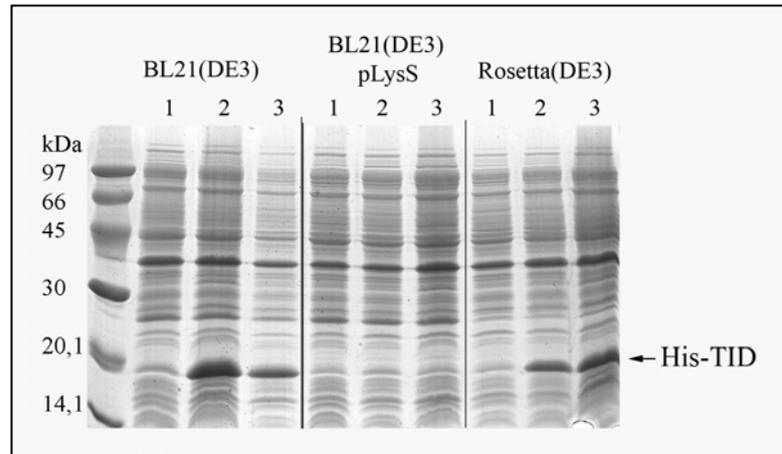
2.1.2.2 Testexpression in *Escherichia coli*

Die Zellstämme *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) pLysS und *E. coli* Rosetta (DE3) wurden mit den drei genannten Expressionsvektoren zur Testexpression transformiert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei verschiedenen Temperaturen, die Induktion der Proteinexpression mit variablen Induktorkonzentrationen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Expression mittels SDS-PAGE, Western Blot und MALDI-MS-Fingerprint analysiert. Eine deutlich erhöhte Expression der Hexahistidin-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* Rosetta(DE3) konnte durch eine Bande bei 18 kDa im SDS-Gel identifiziert werden (siehe Abbildung 2.4). Zusätzlich wurde die Expression durch ein spezifisches Signal im Western Blot mit anti-His6 und anti- δ -loop Antikörpern nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die durch MALDI-MS-Fingerprint identifizierten Peptide konnten eindeutig der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Torpedo* und Ratte zugeordnet werden (Sequenzen siehe Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Abbildung 2.4
Testexpression von His-TID
in verschiedenen Zellstämmen
 15% SDS-PAGE, Coomassie gefärbt

Die unterschiedlichen *E. coli* Bakterienstämme wurden bei 37°C kultiviert, die Proteinexpression von His-TID erfolgte nach Induktion mit 1mM IPTG.

- 1 vor Induktion
- 2 4h nach Induktion
- 3 24h nach Induktion



Trotz vielfältiger Variationen konnte keine Bedingung gefunden werden, bei der die Hexahistidin-Fusionsproteine in löslicher Form überexprimiert wurden. Auch in Gegenwart verschiedener Detergenzien während des Zellaufschlusses konnten die Proteine nicht solubilisiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Expression aller Hexahistidin-Fusionsproteine wurde ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies* erreicht.

2.1.2.3 Proteinexpression nach Blackwell et al. (1991)

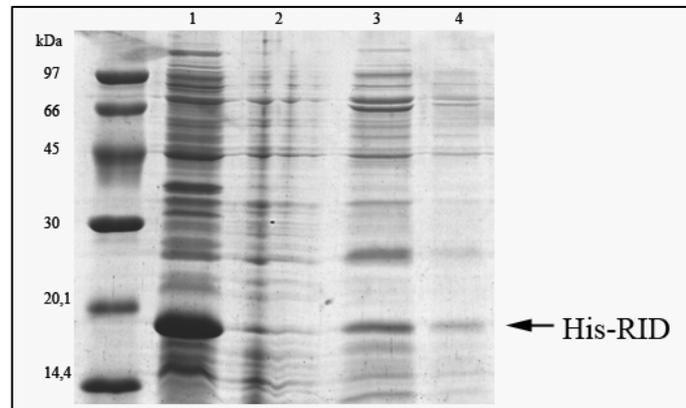
Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Zellanzucht unter osmotischem Stress in Gegenwart von Sorbitol und Glycylbetainen die Bildung von *inclusion bodies* minimiert und die Proteinfaltung verbessert werden konnte (Blackwell et al., 1991). Daher wurde diese Methode für die Expression der Hexahistidin-Fusionsproteine angewendet.

Die Anzucht von *E. coli* Rosetta(DE3) erfolgte in LB-Medium in Gegenwart von Sorbitol und Betaine und die Expression von His-RID und His-TID bei 25°C. Hierbei konnten geringe Mengen der Proteine nach einem Zellaufschluss unter nativen Bedingungen in Lösung gebracht werden. Eine Anreicherung an Nickelagarose des untersuchten Proteins war jedoch nicht erfolgreich. Der Anteil löslich exprimierter Proteine war so gering, dass bakterielle Proteine eine spezifische Bindung an die Nickelagarose behinderten. Zusätzlich schien die Affinität des löslich exprimierten Konstruktes zur Nickelmatrix sehr gering zu sein. Es waren große Verluste im Durchfluss und in den Waschfraktionen in Gegenwart geringer Mengen Imidazol zu beobachten (siehe Abbildung 2.5). Für weitere Reinigungsschritte erwies sich die Proteinlösung als zu instabil.

Abbildung 2.5**Reinigung von His-RID unter nativen Bedingungen**

15 % SDS-PAGE, Coomassie gefärbt
Die Expression von His-RID in *E. coli* Rosetta(DE3) enthielt zu einem kleinen Anteil lösliches Protein, wenn die Zellanzucht in Gegenwart von Sorbitol und Betain bei 25 °C durchgeführt wurde. Allerdings war der Anteil im von löslichem His-RID im Vergleich zu den bakteriellen Verunreinigungen zu gering, um über Affinität an Nickelagarose angereichert zu werden.

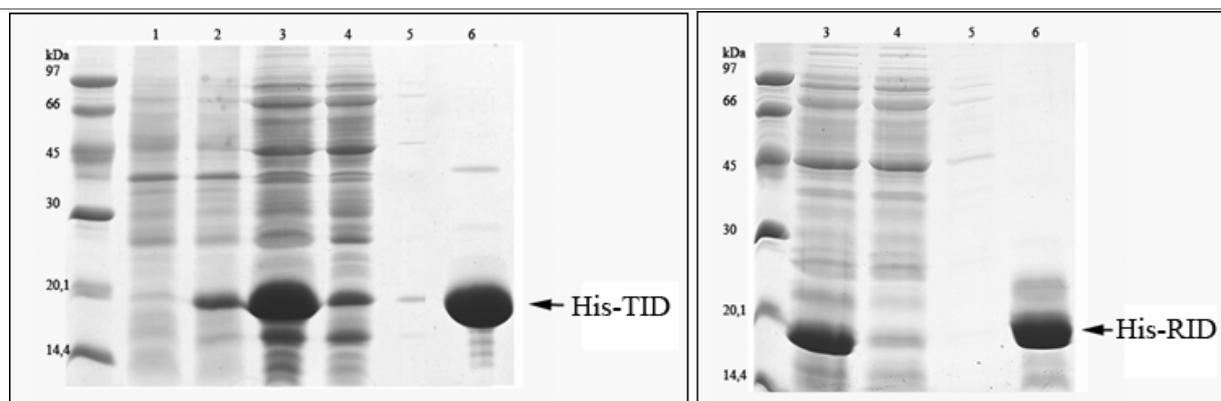
- 1 *E. coli* Rosetta (DE3) nach Induktion
- 2 Durchfluss Nickelagarose
- 3 Waschfraktion mit 10 mM Imidazol
- 4 Elution mit 1 M Imidazol

**2.1.2.4 Proteinisolierung und Reinigung unter denaturierenden Bedingungen**

Da eine Expression und Anreicherung der Hexahistidin-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen nicht möglich war, wurde ein Protokoll für die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Rückfaltung entwickelt.

Nach dem Zellaufschluss in Denaturierungspuffer wurde der Rohextrakt durch Abzentrifugieren der Zelltrümmer gewonnen. Zur Reinigung wurde Nickelagarose mit dem Rohextrakt inkubiert. Die Elution für His-RID erfolgte bei niedrigem pH (pH 4,5) und für His-TID mit 200 mM Imidazol (siehe Abbildung 2.6).

Dabei konnte in mehreren Elutionsfraktionen reines Hexahistidin-Fusionsprotein angereichert werden. Mit diesem Protokoll wurden 200 mg Protein pro Liter LB-Medium gewonnen, welches anschließend jedoch noch renaturiert werden musste.

**Abbildung 2.6****Expression und Reinigung von His-TID (links) und His-RID (rechts) unter denaturierenden Bedingungen**

15 % SDS-PAGE, Coomassie gefärbt

Die Expression erfolgte in *E. coli* Rosetta(DE3) für 4h bei 37 °C.

- 1 *E. coli* Rosetta (DE3) vor Induktion, 2 *E. coli* Rosetta (DE3) 4h nach Induktion

In Gegenwart von 8M Harnstoff konnten die überexprimierten Proteine isoliert und gereinigt werden.

3 Rohextrakt, 4 Durchfluss Ni-NTA, 5 Waschfraktion, 6 Elution

2.1.2.5 Rückfaltung

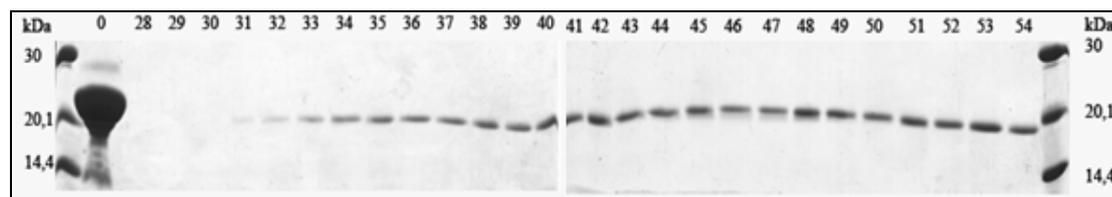
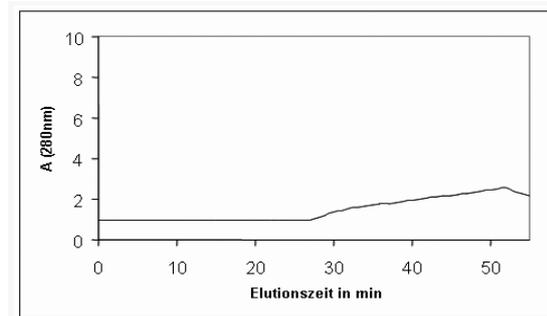
Das gereinigte Protein His-TID konnte durch Gelfiltration (Superdex TM75) in Rückfaltungspuffer renaturiert werden, wobei eine Konzentration von 0,1 mg/ml erreicht wurde (siehe Abbildung 2.7). Diese Lösung war jedoch nur über einige Stunden stabil. Durch Dialyse der Elutionsfraktion der Nickelagarose mit His-TID gegen Rückfaltungspuffer wurde eine Konzentration von 0,2-0,3 mg/ml bei höherer Stabilität (2-3 Tage bei 4°C) erreicht.

Abbildung 2.7

Renaturierung mittels Gelfiltration von His-TID

Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigt einen breiten Peak (Absorption bei 280 nm) zwischen 28 und 54 min.

Die Analyse im SDS-Gel (15 % SDS-PAGE, Coomassie gefärbt) zeigt, dass die Elution von His-TID in den Fraktionen 28 bis 54 erfolgt (0 = Probe vor Gelfiltration).



Die Rückfaltung des Fusionsproteins His-RID erwies sich als äußerst schwierig. Verschiedene Methoden wie Gelfiltration, Dialyse (direkt und schrittweise) und schnelle Verdünnung führten zur vollständigen Präzipitation des Proteins. Dabei wurden Variationen in der Pufferzusammensetzung (Salzkonzentration 10 mM – 1M, ein- und zweiwertige Kationen, Variation des pH-Wertes) und beispielsweise die Gegenwart von Glukose, Arginin und Sulfobetainen (NDSB) bei der Rückfaltung eingesetzt (siehe Tabelle 2-1). Lediglich durch Renaturierung an Nickelagarose durch schrittweises Waschen mit sinkender Harnstoffkonzentration konnte das Protein mit 80 µg/ml eluiert werden. Diese Lösung erwies sich jedoch als sehr instabil, so dass weitere Untersuchungen nicht möglich waren. In Gegenwart von 1% Dodecylmaltosid (DM) konnte His-RID durch Dialyse in Konzentrationen von 0,2-0,3 mg/ml, in einer für 2-3 Tage stabilen Form, renaturiert werden. Erfolgreich war im Weiteren die Verwendung des Lipids Dodecylphosphocholin (DPC). Dieses bildet Mizellen, deren Gegenwart die Renaturierung des Proteins durch Dialyse, Gelfiltration und schnelle Verdünnung erlaubt. Die Konstrukte His-TID und His-RID konnten in DPC-

Mizellen auf 6 mg/ml konzentriert werden. Diese Lösungen waren über mehrere Wochen stabil und daher für NMR-spektroskopische Untersuchungen einsetzbar.

Die Rückfaltung von His-TID war nur in Rückfaltungspuffer (Tris-Puffer) möglich. Die Gegenwart der Detergenzien Dodecylmaltosid und Dodecylphosphocholin erlaubte hingegen Variationen des Puffers, so dass die Konstrukte His-TID und His-RID hier in dem für spektroskopische Methoden geeigneten Phosphatpuffer rückgefaltet wurden.

Tabelle 2-1 Übersicht der Renaturierungsversuche von His-RID

Dialyse

direkt in 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 6,7

ohne Zusatz:	vollständige Proteinaggregation
+ 1% Dodecylmaltosid:	0,2 mg/ml, stabil 2-3 Tage
+ 1% Tween20:	vollständige Proteinaggregation
+ 1% n-Octyl-β-D-thioglycopyranosid:	vollständige Proteinaggregation

direkt in 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 6,5

ohne Zusatz:	vollständige Proteinaggregation
+ 1 % Dodecylmaltosid:	0,3 mg/ml, stabil 2-3 Tage
+ Glycerin(40%,30%,20% bzw. 10%)	vollständige Proteinaggregation
+ Glycerin(40%,30%,20% bzw. 10%)+ 1%Dodecylmaltosid: 0,01 mg/ml	
+ 150 mM Dodecylphosphocholin:	0,2 mg/ml, stabil 2-3 Tage
+ 1 % SDS:	0,3 mg/ml
+ 1% CHAPS:	vollständige Proteinaggregation

schrittweise in 6M, 4M, 2M, 0M Harnstoff (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8.0)

Präzipitation während des Schrittes von 4M nach 2M Harnstoff

Entsalzungssäule (Sephadex 25)

50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 6.7

+ 0,1 % Dodecylmaltosid:	0,1 mg/ml
+ 1 % Dodecylmaltosid:	0,25 mg/ml, konz. 0,3 mg/ml, instabil
+ 0,1% C12E8:	0,04 mg/ml, konz. 0,08 mg/ml, instabil
+ 10% Glycerin:	Proteinelution nur in Gegenwart von Harnstoff
+ 1% n-Nonyl-β-D-glycopyranosid:	Proteinelution nur in Gegenwart von Harnstoff
+ 0,5 M Arginin:	Proteinelution nur in Gegenwart von Harnstoff
+ 0,1 M NDSB-201:	Proteinelution nur in Gegenwart von Harnstoff
+ 1% Tween20:	Proteinelution nur in Gegenwart von Harnstoff
+ 1% CHAPS:	Aggregation während der Elution
+ 1% n-Octyl-β-D-thioglycopyranosid:	Aggregation während der Elution
+ 0,01% SDS:	0,1 mg/ml

Gelfiltration (Superdex TM 75)50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 6.7

ohne Zusatz:	keine Proteinelution
+ 1% Dodecylmaltosid:	0,02 mg/ml, konz. 0,2 mg/ml

10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 6,5

ohne Zusatz:	keine Proteinelution
+Dodecylphosphocholin 60xmolarer Überschuss:	0,1 mg/ml, nachfolgende Konzentrierung möglich

Verdünnung

Verdünnung 1:50, über Nacht 4°C, Konzentrierung auf Microcon

50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 6.7

ohne Zusatz:	vollständige Proteinaggregation
+ 0,1 % Dodecylmaltosid:	0,1 mg/ml
+ 1 % Dodecylmaltosid:	0,1 mg/ml
+ 0,1% C12E8:	0,1 mg/ml
+ 1% C12E8:	0,1 mg/ml
+ 10% Glycerol:	vollständige Proteinaggregation
+ 10% Isopropanol:	vollständige Proteinaggregation
+ 1% Triton X100:	<50 µg/ml
+ 1% CHAPS:	<50 µg/ml
+ 1 M MgSO ₄ :	vollständige Proteinaggregation
+ 2 M NaCl:	vollständige Proteinaggregation
+ 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ :	vollständige Proteinaggregation
+ 1% Igepal:	<50 µg/ml
+ 0,5 M Arginin:	vollständige Proteinaggregation
+ 1M NDSB-201:	<50 µg/ml
+ 1% Tween20:	<50 µg/ml
+ 1% Digitonin:	vollständige Proteinaggregation
+ 1% n-Octyl-β-D-thioglycopyranosid:	<50 µg/ml

10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 6,5

ohne Zusatz:	vollständige Proteinaggregation
--------------	---------------------------------

Verdünnung, Konzentrierung und Pufferaustausch auf Microcon-Filter

+ Dodecylphosphocholin 60xmolarer Überschuss: 6 mg/ml stabil

Rückfaltung an Nickelagarose gebunden

schrittweise waschen mit 6M, 5M, 4M, 3M, 2 M, 1M Harnstoff
(in 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris, pH 8.0)

mit 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 4.5: keine Elution

waschen mit 0M Harnstoff (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8.0)

Elution mit 200 mM Imidazol

ohne Zusatz:	keine Elution
+ 0,1 % Dodecylmaltosid	0,08 mg/ml, instabil
+ 1 % Dodecylmaltosid	0,1 mg/ml, instabil

waschen mit

6M, 5M, 4M, 3M, 2 M, 1M Harnstoff (in 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 6,5)

Elution mit 200 mM Imidazol 2M Harnstoff: 2 mg/ml, Präzipitation direkt

1M Harnstoff: 0,8 mg/ml, Präzipitation direkt

0M Harnstoff: keine Elution

waschen mit

6M, 5M, 4M, 3M, 2 M, 1M Harnstoff (in 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 6.7),

1h Inkubation mit 2M Harnstoff

Elution mit 200 mM Imidazol: 0,08 mg/ml, instabil

Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen eingesetzten Methoden für die Rückfaltung von His-RID, inklusive der Variationen der Pufferzusammensetzung und die Gegenwart von Detergenzien. Die erreichte Proteinkonzentration nach Rückfaltung ist angegeben.

2.1.2.6 Identifizierung mit MALDI-TOF

Nach Renaturierung der Hexahistidin-Fusionsproteine in Gegenwart von Dodecylphosphocholin wurde die Gesamtmasse der Konstrukte mit MALDI-TOF bestimmt (in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Franke und Dr. Chris Weise). Für His-RID wurde eine Masse von 16999,9 Da (Durchschnitt aus 4 Messungen) bestimmt, die der theoretisch ermittelten Masse von 17001,2 Da entspricht. Auch His-TID entspricht mit einer gemessenen Masse von 17552,5 Da (durchschnittlicher Wert von 4 Messungen) der theoretisch ermittelten Masse von 17553,7 Da (siehe Abbildung 2.8). Mit diesen Werten kann man davon ausgehen, dass bei der Renaturierung kein Abbau des Fusionsproteins auftrat, Modifikationen der Proteine sind ebenfalls auszuschließen.

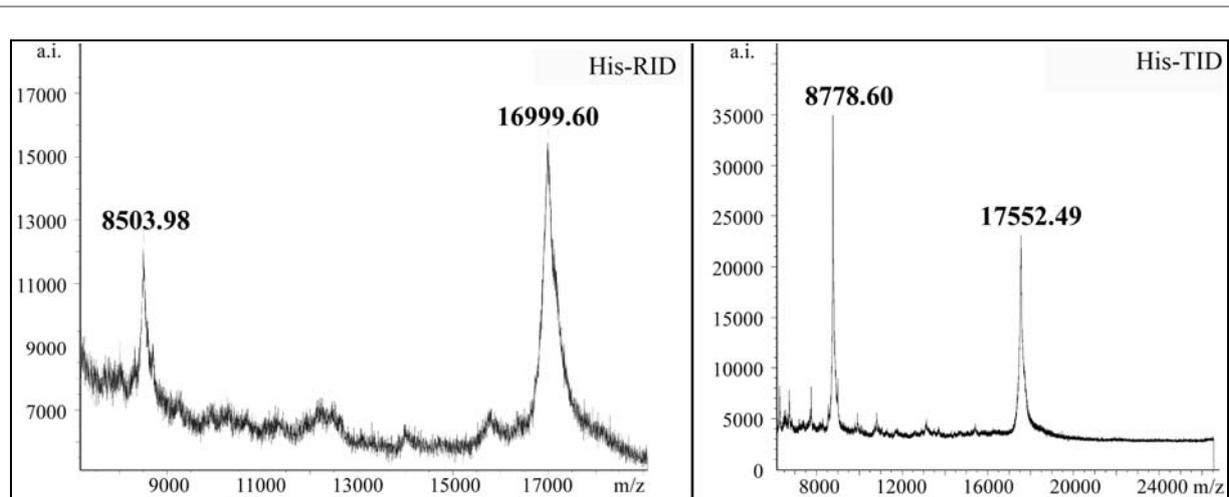


Abbildung 2.8 Gesamtmassenbestimmung mit MALDI-TOF Massenspektrometrie

Gesamtmasse des renaturierten His-RID (links) und His-TID (rechts) in Phosphatpuffer mit DPC. Die gemessenen Massen entsprechen den theoretisch ermittelten Werten.

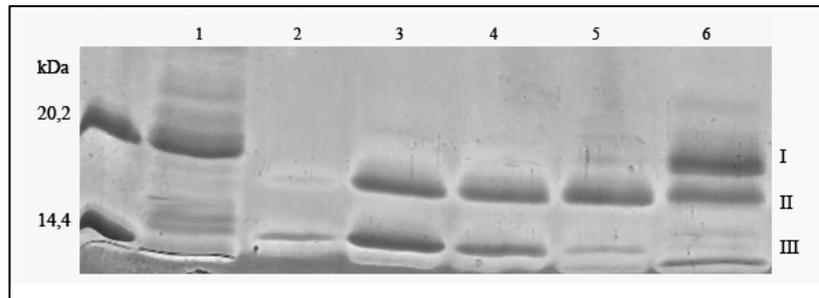
2.1.2.7 Abspaltung des Hexahistidintags von His-RID_Thr

Um die intrazelluläre Domäne des nAChR isoliert zu untersuchen, sollte eine Abspaltung des Hexahistidintags erfolgen. Das mit Harnstoff solubilisierte His-RID_Thr mit Proteasespaltstelle (Thrombin) wurde in Gegenwart von 8 M Harnstoff an die Nickelagarose gebunden. Durch Waschen der Säule mit Spaltungspuffer wurden die Proteine rückgefaltet und die Spaltung mit Thrombin durchgeführt. Die Proteine ließen sich jedoch nicht in nativem Puffer eluieren, sondern erst wieder nach Zugabe von Harnstoff. Die Analyse der Fraktionen im SDS-Gel zeigte neben der Bande, die dem ungespaltenen Fusionsprotein zuzuordnen ist, zwei weitere kleinere Banden. Durch MALDI-MS-Fingerprint konnte gezeigt werden, dass die höher molekulare Bande dem korrekt (in der idealen Aminosäuresequenz) gespaltenen Protein entspricht. Das kleinere Protein entstand durch eine unvorhersehbare Spaltung (eine der idealen Spaltstelle sehr ähnliche Sequenz), (siehe Abbildung 2.9). Die Proteine zeigten unspezifische Interaktionen mit dem Säulenmaterial und ließen sich erst in Gegenwart von Harnstoff eluieren. Es ist somit davon auszugehen, dass der Hexahistidintag nicht die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nAChR beeinflusst, zumindest nicht zu einer Verringerung der Löslichkeit führt. Auf Grund der geringen Größe des Affinitätsanhangs wurde mit dem ungespaltenen Fusionsprotein weitergearbeitet.

Abbildung 2.9
Thrombinspaltung zur Entfernung
des Hexahistidintags von His-RID
 15% SDS-PAGE, Coomassie gefärbt

Das Fusionsprotein wurde an Nickel-agarose gebunden, in Spaltungspuffer mit der Protease Thrombin versetzt und 3h bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen Produkte konnten nur in Gegenwart von Harnstoff eluiert werden.

- 1 vor Spaltung
- 2 Elution nach Spaltung
- 3 - 5 Waschfraktion Harnstoff
- 6 Elution mit Harnstoff



```

1  MGSSHHHHHH  SSGLVPR  GSH  MHFRTTPSTHV  LSEGVKKFFL  ETLPKLLHMS      50
                               ↑ Spaltung A
51  RPEEEDPGPR  ALIRRTSSLG  YISKAEEYFS  LKSRSDLMFE  KQSERHGLAR      100
                               ↑ Spaltung B
101 RLTTARKPPA  SSEQVQQLF  NEMKPAVDGA  NFIVNHMRDQ  NSYNEEKDNW  NQVARTVDR      142
  
```

Die obere Bande I zeigt das ungespaltene Fusionsprotein. In der Sequenz sind die zwei Thrombinspaltstellen mit Pfeilen dargestellt. In Spaltung A nach Arg 17 entstehen zwei Fragmente der Größe 16,4 kDa (Fragment II) und 1,9 kDa. An einer zweiten Position, nach Arg 60, spaltete Thrombin das Protein in zwei Fragmente der Größe 11,5 kDa (Fragment III) und 6,8 kDa. Die spezifische Spaltung an Position B war durch Proteinsequenzanalyse nach einer idealen Thrombinspaltstelle nicht vorhersehbar (Keil, 1992).

Die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR als Hexahistidin-Fusionsprotein in *E. coli* konnte mit hoher Ausbeute erreicht werden. Allerdings gelang die Isolierung nur unter denaturierenden Bedingungen, so dass ein aufwendiges Rückfaltungsprotokoll entwickelt werden musste. Die renaturierten Hexahistidin-Fusionsproteine stehen für eine biophysikalische Charakterisierung, jedoch vorwiegend in Gegenwart von Detergenzien, zur Verfügung.

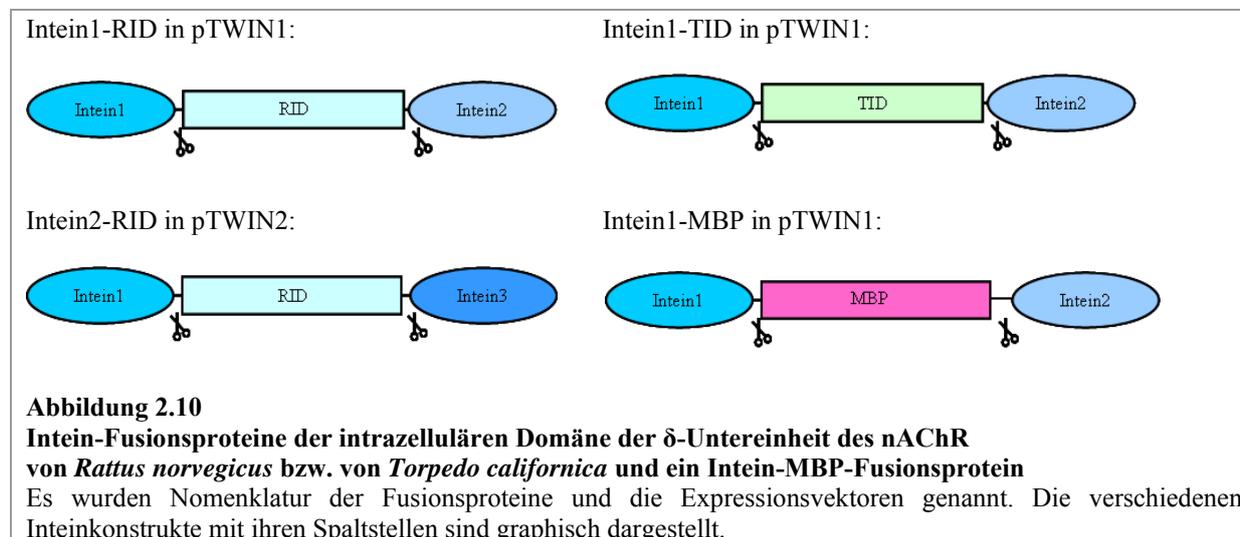
2.1.3 Intein-Fusionsproteine

Proteine aus der Gruppe der selbst-spleißenden Inteine besitzen oft Chitin-Bindungsdomänen (Watanabe et al., 1994; Xu et al., 2000). In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Domäne des nAChR zwischen zwei Inteine fusioniert, wobei mehrere Ziele verfolgt wurden: 1. Fusion mit einem gut strukturierten Partnerprotein zur Erhöhung der Löslichkeit, 2. Entfernung des Fusionsproteins ohne Sequenz-spezifische Proteasen, 3. Verknüpfung von N- und C-Terminus durch inteinvermittelte Proteinligation zur Stabilisierung der intrazellulären

Domäne. Der inteinvermittelte Spaltmechanismus wird in Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** näher erläutert. Ein weiterer Ansatz war die Stabilisierung der intrazellulären Domäne des nAChR durch Modifizierung der Termini, wie an späterer Stelle beschrieben wird (siehe Kapitel 2.4).

2.1.3.1 Klonierung

Die Klonierung der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Torpedo* und Ratte erfolgte in die Vektoren pTWIN1 und pTWIN2. Daraus resultieren Proteine der untersuchten Domäne, die am N- und C-Terminus mit unterschiedlichen Inteinen fusioniert sind (siehe Abbildung 2.10).



2.1.3.2 Expression und Reinigung

Zur Optimierung der Reinigungs- und Spaltungsbedingungen wurde das Referenzprotein Intein1-MBP in *E. coli* ER2566 exprimiert. Das Pellet einer Expressionsanzucht wurde in Inteinpuffer A resuspendiert, die Zellen durch Ultraschallbehandlung lysiert und die Proteine des erhaltenen Rohextrakts an Chitin-Agarose gebunden. Nach mehreren Waschschrritten erfolgte über Nacht die erste pH- und temperaturinduzierte Inteinspaltung. Nach einem Pufferwechsel in Inteinpuffer B erfolgten die zweite Spaltung und die Proteinligation ebenfalls über Nacht. Das gespaltene und teilweise circularisierte MBP wurde eluiert, während die isolierten Inteinstrukturen und ungespaltenen bzw. unvollständig gespaltenen Proteine an Chitin gebunden zurückbleiben (siehe Abbildung 2.11). Die erste Spaltung ist hierbei sehr effizient, etwa 90 % des N-terminalen Inteins wurden abgespalten. Auch die

zweite Spaltung war in etwa 80 % erfolgreich. Vom isolierten MBP wurden etwa 60 % circularisiert, die restlichen Moleküle lagen mit freien Termini in Lösung vor. Polymere, die aus der Ligation von N- und C-Terminus unterschiedlicher Proteine resultieren könnten, wurden nicht beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt).

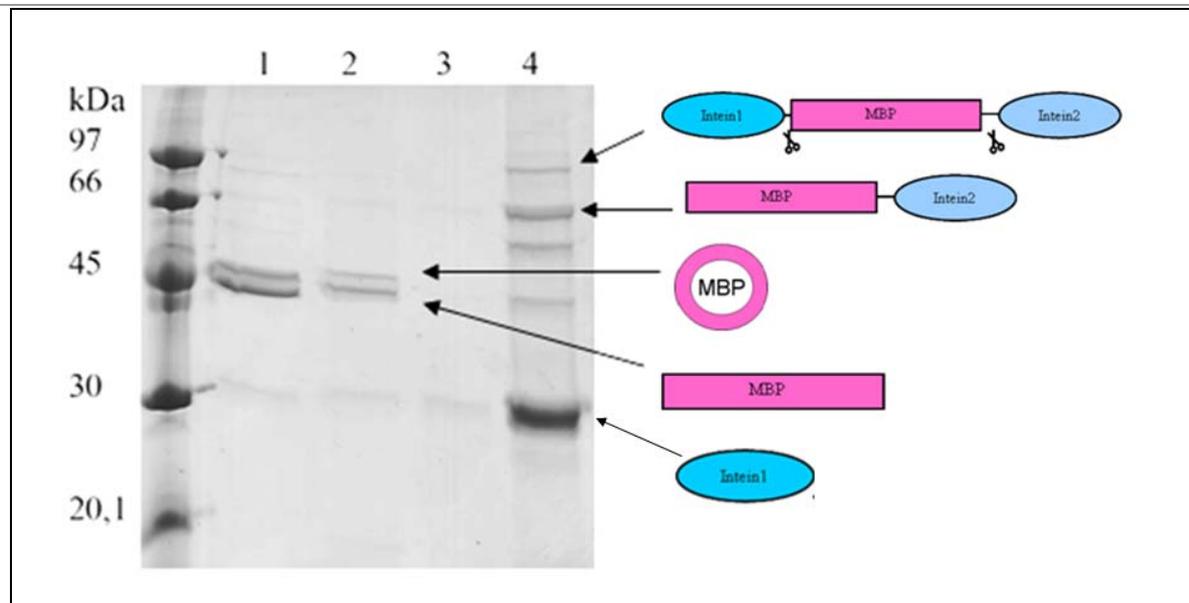


Abbildung 2.11

Inteininduzierte Proteinspaltung und Proteinligation, Reinigung und Spaltung von Intein1-MBP

Das Fusionsprotein wurde an Chitin-Matrix gebunden. Mit Inteinpuffer A für die erste Spaltung wurde 24h induziert. Anschließend wurde mit Inteinpuffer B 24h die zweite Spaltung und die Proteinligation des N- und C-Terminus initiiert. In den Elutionsfraktionen (1-3) wurde zirkuläres und freies MBP identifiziert und am Chitin bleiben ungespaltene, teilweise gespaltene und vollständig gespaltene Inteine (4) gebunden.

Die Intein-Fusionsproteine mit Intein1-TID, Intein1-RID und Intein2-RID konnten in *E. coli* ER2566 in geringem Maße löslich exprimiert werden. Die Anreicherung mittels Affinitätschromatographie erfolgte auf Grund geringer Affinität des Fusionsproteins zu Chitin-Agarose nur mit geringer Effizienz. Die erste Inteinspaltung wurde bei allen Konstrukten nicht beobachtet, auch nicht nach einer längeren Inkubationszeit von 48h (siehe Abbildung 2.12). Eine Initiierung der zweiten Inteinspaltung war somit nicht möglich (siehe Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Vermutlich bildeten sich in Lösung Aggregate, die die Bindung an Chitin-Agarose behindern und den Spaltmechanismus nicht ermöglichen. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass nach längerer Inkubation eine vollständige Proteinpräzipitation des Proteins beobachtet wurde.

Die intrazelluläre Domäne des nAChR als Intein-Fusionsprotein konnte in *E. coli* löslich exprimiert werden. Eine Isolierung der Domäne wurde jedoch nicht erreicht, da die Intein-Spaltungsreaktion nicht erfolgte. Dieses System erwies sich daher als nicht anwendbar für die

Herstellung einer geeigneten Probe für Strukturuntersuchungen der intrazellulären Domäne des nAChR.

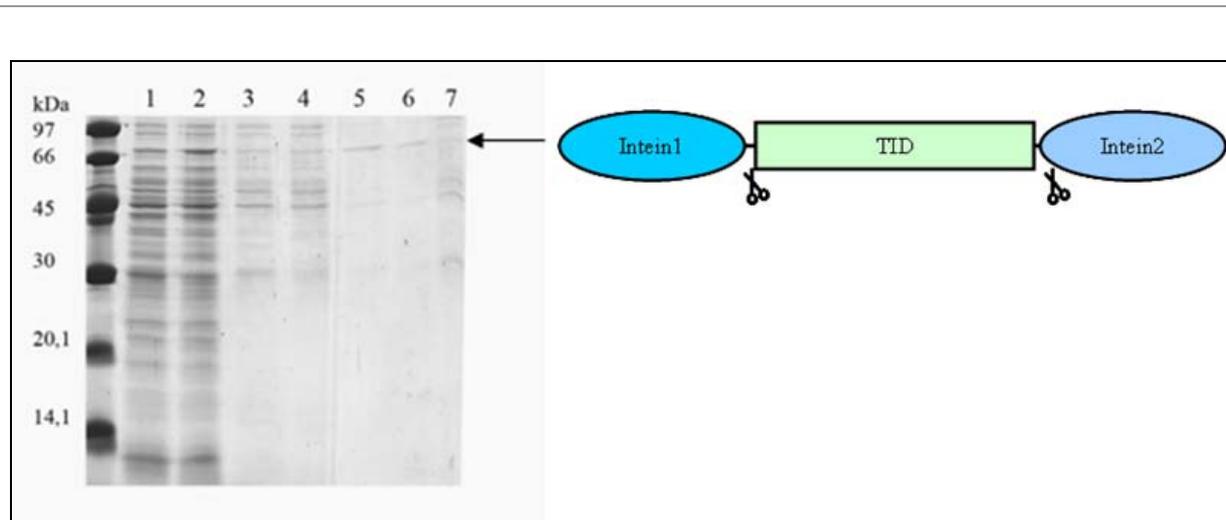


Abbildung 2.12 Reinigung und Spaltung Inteinkonstrukte (Intein1-TID)

Die löslich exprimierte Proteine wurden an Chitin gebunden und die erste pH- und Temperaturinduzierte Spaltung im Inteinpuffer A initiiert. Nach 24h konnte diese Spaltung nicht erreicht werden, eine längere Inkubation war auf Grund der Proteininstabilität nicht möglich.

1 induzierte Zellen, 2 Rohextrakt, 3 Durchfluss, 4 Waschfraktion, 5 Chitin-Matrix vor Spaltung, 6 24h nach Spaltung, 7 Chitin-Matrix nach 3 Tagen

2.1.4 GST-Fusionsproteine

Eine Fusion mit dem 26-kDa Glutathion-S-Transferase (GST) Protein kann helfen die lösliche Expression zu verbessern, das Zielprotein gegen intrazelluläre Proteasen zu schützen und in Lösung zu stabilisieren (Frangioni und Neel, 1993, Nygren et al., 1994). Zusätzlich ist es möglich GST und GST-Fusionsproteine effektiv mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion zu reinigen.

2.1.4.1 Klonierung

Um die Löslichkeit der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Torpedo* und Ratte während der Expression zu erhöhen, wurden GST-Fusionsproteine exprimiert werden. Der Vektor pGEX-5X-1 erlaubt die Expression mit N-terminalem GST und Protease Faktor Xa - Schnittstelle zur Abspaltung des Affinitätsanhangs (siehe Abbildung 2.13).

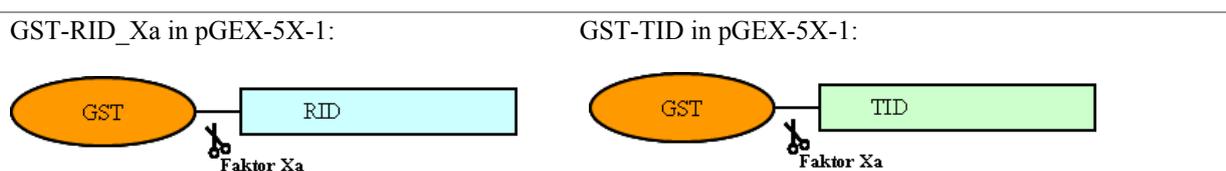


Abbildung 2.13 GST-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR

von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica*

Es wurden Nomenklatur der Fusionsproteine und die Expressionsvektoren genannt. Die Fusionsproteine mit GST am N-Terminus und der Faktor Xa Spaltstelle sind graphisch dargestellt.

2.1.4.2 Expression

Die GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* Rosetta(DE3) bei unterschiedlicher Dauer und unterschiedlicher Temperatur erfolgreich exprimiert. Bei allen Bedingungen wurden die Fusionsproteine löslich exprimiert. Allerdings waren diese anfällig für proteolytischen Abbau, der sich auch in Gegenwart kommerziell erhältlicher Proteasehemmer nicht minimieren ließ. Bei der Isolierung der GST-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen wurden mehrere Degradationsprodukte beobachtet und es konnte das vollständige Fusionsprotein nicht angereichert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Alternativ erfolgte die Expression in *E. coli* BL21 Codon⁺, der mit dem Plasmid pREP4 transformiert wurde. Dadurch wird ein *lac*-Repressorprotein überexprimiert, das durch Bindung an die Promotorsequenzen die Expression des Fusionsproteins vor Induktion mit IPTG vollständig unterdrückt. Die Bakterien wurden über Nacht bei 25 °C zu hoher Zelldichte angezogen. Anschließend wurde die Proteinexpression für kurze Zeit (30 min) induziert. Die Analyse mittels Western Blot zeigte die Expression des vollständigen Fusionsprotein ohne proteolytische Abbauprodukte (siehe Abbildung 2.14).

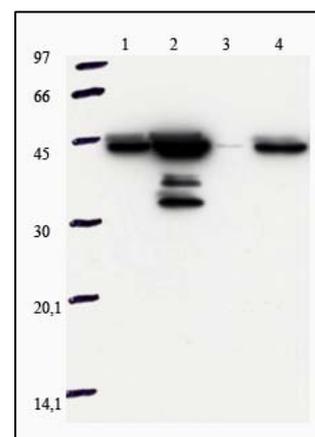
Daher wurden in den folgenden Experimenten die GST-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 Codon⁺ mit pREP4 exprimiert.

Abbildung 2.14**Expression GST-TID_Xa**

Western Blot anti- δ -loop Antikörper

- 1 *E. coli* Rosetta (DE3) vor Induktion
- 2 *E. coli* Rosetta (DE3) 4h nach Induktion
- 3 *E. coli* BL21Codon⁺, pREP4 vor Induktion
- 4 *E. coli* BL21Codon⁺, pREP4 30 min nach Induktion

In *E. coli* Rosetta(DE3) wird schon eine Basisexpression des Zielproteins vor Induktion beobachtet und es entstehen mehrere Degradationsprodukte. Die Gegenwart eines überexprimierten *lac*-Repressorproteins erlaubt die Expression erst nach Induktion, wodurch das untersuchte Protein weniger proteolytisch abgebaut wird.

**2.1.4.3 Reinigung des GST-Fusionsproteins und Entfernung von GST**

Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie an GST-Sepharose. In den Elutionsfraktionen wurde hauptsächlich das vollständige GST-Fusionsprotein angereichert. Zusätzlich wurden wenige Abbauprodukte

des Fusionsproteins und eine Verunreinigung durch ein *E. coli*-Protein von etwa 38 kDa detektiert.

Der Proteaseverdau zur Entfernung von GST erfolgte mit den an der Matrix gebundenen Proteinen mit der Faktor Xa Protease. Nach vollständigem Verdau ließ sich das korrekt gespaltene GST-Protein auf SDS-Gel und durch Western Blot detektieren (siehe Abbildung 2.15). Mit MALDI-MS-Fingerprint wurde der C-Terminus des Fragments (Spaltung nach LIEGR) bestätigt. Die intrazelluläre Domäne konnte jedoch nicht detektiert werden. Vermutlich war das Proteinfragment ohne GST in Lösung zu instabil.

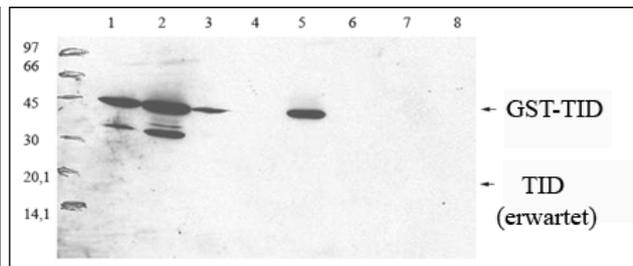
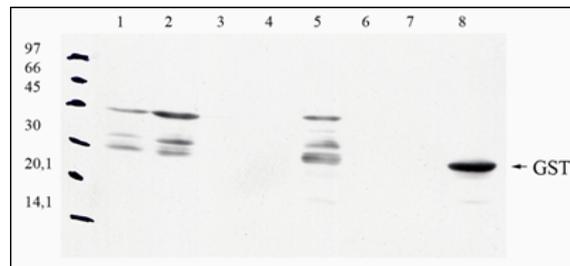
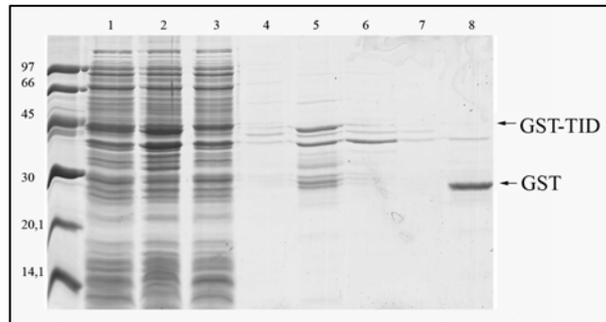
Abbildung 2.15

Reinigung GST-TID_Xa und anschließende Abspaltung von GST mit Faktor Xa

Oben : 15 % SDS-PAGE, Coomassie gefärbt

Unten: Western Blot, links: anti-GST Antikörper, rechts: anti- δ -loop Antikörper

- 1 Rohextrakt
- 2 Durchfluss
- 3 Waschfraktion
- 4 Pufferaustausch
- 5 GST-Sepharose vor Spaltung
- 6 Durchfluss 20 h nach Spaltung
- 7 Waschfraktion 20 h nach Spaltung
- 8 GST-Sepharose 20 h nach Spaltung



Während der Reinigung von GST-TID entstanden durch proteolytischen Abbau einige Degradationsprodukte des Fusionsproteins. Nach Spaltung mit Faktor Xa konnte das korrekt abgespaltene GST an der Matrix gebunden detektiert werden (Bahn 8 mit anti-GST-Antikörper). Jedoch weder im Durchfluss, noch an der Matrix gebunden wurde das freie TID Protein detektiert (erwartet in Bahn 7 mit anti- δ -loop Antikörper).

Die Fusion der intrazellulären Domäne des nAChR mit GST erhöhte stark die Löslichkeit des untersuchten Proteins. Allerdings erwies sich die Lösung der GST-Fusionsproteine als instabil und konnte daher nicht näher untersucht werden. Die Abspaltung von GST resultierte in einem Abbau der intrazellulären Domäne des nAChR, so konnte mit diesem System keine Isolierung für eine biophysikalische Charakterisierung erfolgen.

2.1.5 MBP-Fusionsproteine

Eine Fusion des Zielproteins mit dem 40-kDa großen Maltose-Bindungsprotein (MBP), codiert durch das *malE* Gen von *E. coli* K12 (Duplay et al., 1984), kann ebenfalls zu einer Verbesserung der Löslichkeit von in *E. coli* überexprimierten Fusionsproteinen führen. Dies gilt besonders für die Expression von eukaryotischen Proteinen (Sachdev und Chirgwin, 1999). Die Reinigung erfolgt mittels Affinitätschromatographie an immobilisierter Amylose in physiologischem Puffer, ist jedoch nicht in Gegenwart denaturierender Agenzien möglich.

2.1.5.1 Klonierung

Die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte und *Torpedo* wurde pMAL Vektoren kloniert, welche die cytoplasmatische Expression von MBP-Fusionsproteinen ermöglichen. Die Vektoren erlauben die Generierung von Fusionsproteinen mit N-terminalem MBP und unterschiedlichen Proteasespaltstellen zur Abspaltung des Affinitätstags (siehe Abbildung 2.16).

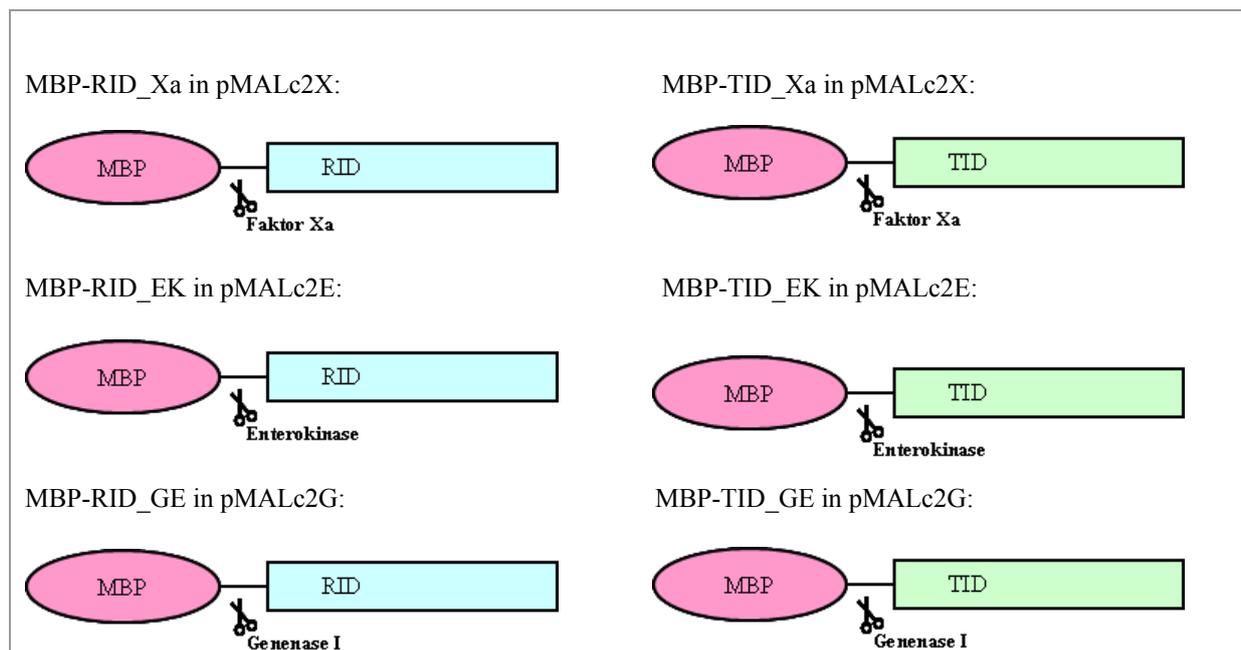


Abbildung 2.16 MBP-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica*

Es wurden Nomenklatur der Fusionsproteine und die Expressionsvektoren genannt. Die Fusionsproteine sind mit MBP und den unterschiedlichen Proteasespaltstellen zur Entfernung von MBP sind graphisch dargestellt.

2.1.5.2 Expression

Die sechs MBP-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) löslich exprimiert. Die Fusionsproteine konnte unter nativen Bedingungen isoliert werden, jedoch traten sehr viele Degradationsprodukte auf. Dies konnte auch nicht durch Variation der Temperatur und Expressionsdauer verhindert werden.

Der Zellaufschluss erfolgte unter nativen Bedingungen. Nach Reinigung mittels Affinitätschromatographie an Amylose konnten die MBP-Fusionsproteine und deren Abbauprodukte eluiert werden (siehe Abbildung 2.17).

Eine wesentlich stabilere Expression konnte in *E. coli* BL21 Codon⁺ pREP4 erreicht werden. Das erhaltene löslich exprimierte Fusionsprotein ließ jedoch nicht an die Amylose-Matrix binden und dadurch anreichern (Ergebnisse nicht gezeigt).

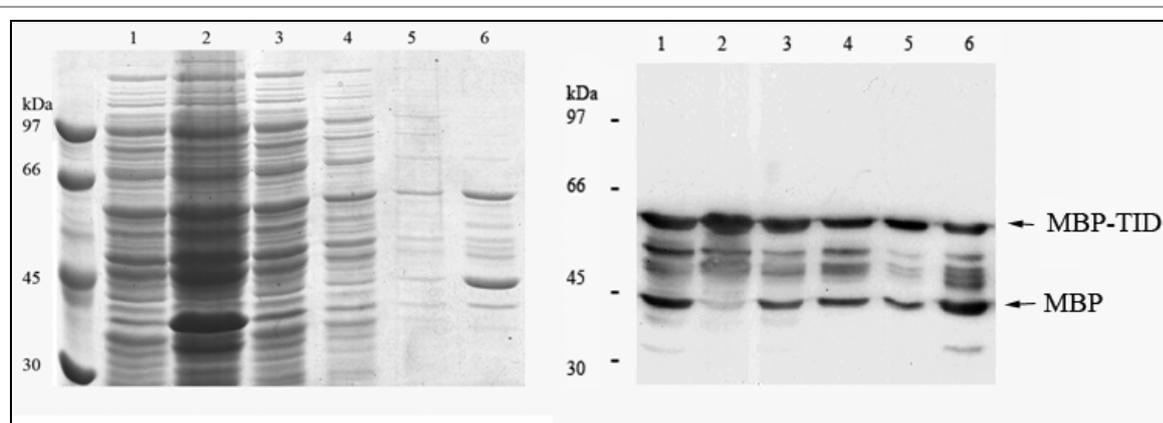


Abbildung 2.17 Reinigung von MBP-TID_EK

Links: 10% SDS-Gel, Coomassie gefärbt, Rechts: Western Blot, anti-MBP-Antikörper

MBP-TID_EK wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und mittels Amylose-Matrix unter nativen Bedingungen gereinigt. In der Elutionsfraktion treten vorrangig zwei Proteine auf (Pfeile), diese entsprechen dem vollständig exprimierten Fusionsprotein (bei 60 kDa) und dem MBP-Protein (45 kDa), was durch MS-Fingerprint bestätigt wurde. Dazwischen sind mehrere Abbauprodukte detektierbar.

1 Rohextrakt, 2 Pellet (unlösliche Proteine), 3 Durchfluss, 4,5 Waschfraktion, 6 Elution mit 10 mM Maltose

Obwohl schon während der Expression Degradationsprodukte beobachtet wurden, wurde versucht das Fusionsprotein von MBP abzuspalten. Dazu wurden die Elutionsfraktionen in Spaltpuffer überführt und mit der entsprechenden Protease inkubiert und anschließend auf einem SDS-Gel und mittels Western Blot analysiert (siehe Abbildung 2.18). Auch hier konnte – vergleichbar mit den GST-Fusionsproteinen, die intrazelluläre Domäne nicht detektiert werden.

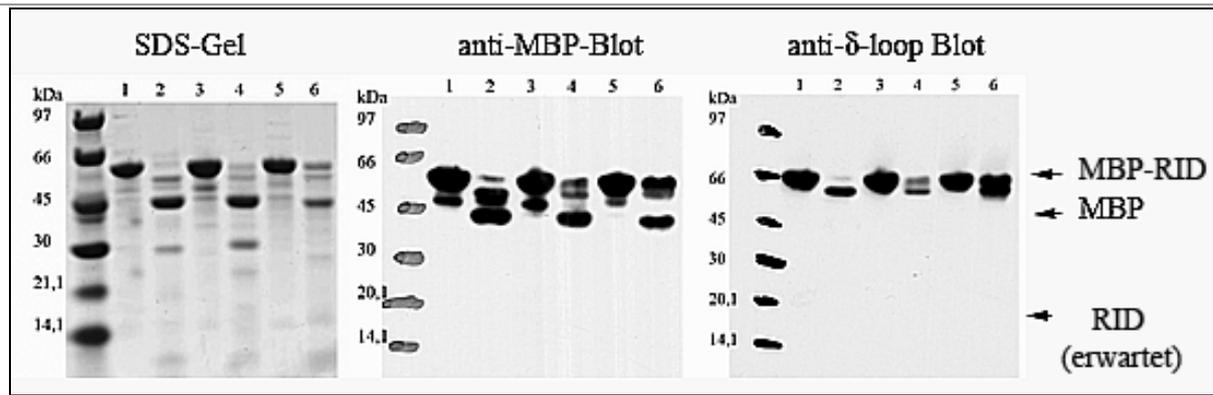


Abbildung 2.18 Abspaltung von MBP mit verschiedenen Proteasen

Links: 4-12% Bis-Tris Criteriongel (Biorad), Coomassie gefärbt,

Mitte: Western Blot, anti-MBP-Antikörper, Rechts: Western Blot, anti- δ -loop Antikörper

Die Abspaltung von MBP erfolgte in Lösung, wobei das abgespaltene MBP im Western Blot (Bahn 2,4,5 bei 45 kDa), nicht aber RID detektiert werden konnte. Eine Optimierung bis zur vollständigen Spaltung wurde auf Grund dieses Ergebnisses nicht durchgeführt.

1 MBP-RID_Xa vor Spaltung, 2 MBP-RID_Xa nach Spaltung mit Faktor Xa

3 MBP-RID_GE vor Spaltung, 4 MBP-RID_GE nach Spaltung mit GenenaseI

5 MBP-RID_EK vor Spaltung, 6 MBP-RID_Xa nach Spaltung mit Enterokinase

2.1.6 SUMO-Fusionsproteine

Das 11 kDa große SUMO-Protein (*small ubiquitin-related modifier*) gehört zu der Gruppe der Ubiquitin-ähnlichen Modifizierer. Als Fusionstag kann es die Expression und die Löslichkeit von Proteinen erhöhen (Malakhov et al., 2004). Für eine Reinigung durch Affinitätschromatographie wurde das Fusionsprotein N-terminal mit einem Hexahistidintag versehen. Ein besonderer Vorteil ist, dass die Abspaltung von SUMO nicht mit Aminosäuresequenz-spezifischen Proteasen erfolgt, sondern mit der SUMO1-Protease, die die Tertiärstruktur von SUMO erkennt.

2.1.6.1 Klonierung

Die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte und *Torpedo* wurde in den Vektor pET-SUMO kloniert. Daraus resultieren Fusionsproteine mit einem N-terminalem Hexahistidintag und einer Fusion mit SUMO (siehe Abbildung 2.19).

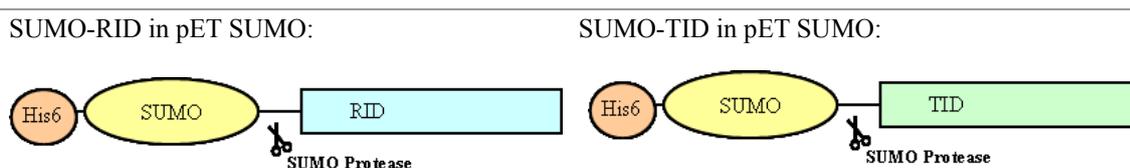


Abbildung 2.19

SUMO-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica*

Es wurden Nomenklatur der Fusionsproteine und die Expressionsvektoren genannt. Die Fusionsproteine sind mit N-terminalem SUMO-Protein und Hexahistidintag und die SUMO-Proteasespaltstelle sind graphisch dargestellt.

2.1.6.2 Expression und Reinigung

Die SUMO-Fusionsproteine konnten in *E. coli* BL21(DE3) erfolgreich überexprimiert werden. Der Zellaufschluss unter nativen Bedingungen führte zu einer Isolierung des Fusionsproteins, jedoch mit sehr geringer Ausbeute. Es wurde vor allem ein Abbauprodukt von 18 kDa identifiziert (siehe Abbildung 2.14, links). Hierbei handelt es sich um SUMO-Fusionsprotein mit etwa 30 N-terminalen Resten von RID. Die Ausbeute wurde deutlich erhöht, wenn dem Aufschlusspuffer 1% Dodecylmaltosid zugesetzt wurden (1-2 mg/ 11 LB-Medium). Nach Bindung von SUMO-RID an Nickelagarose konnte das erhaltene Abbauprodukt mit 200 mM Imidazol von dem vollständigen Fusionsprotein getrennt eluiert werden, welches erst bei 500 mM Imidazol eluiert wurde. Parallel wurde der Zellaufschluss unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Das Fusionsprotein wurde in Gegenwart von Harnstoff an Nickelagarose gebunden und an der Matrix renaturiert. Anschließend wurde wie beim Zellaufschluss unter nativen Bedingungen mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen eluiert. Die Ausbeute an vollständigem Fusionsprotein war hier deutlich größer (15 mg/ 11 LB Medium), (siehe Abbildung 2.14, rechts).

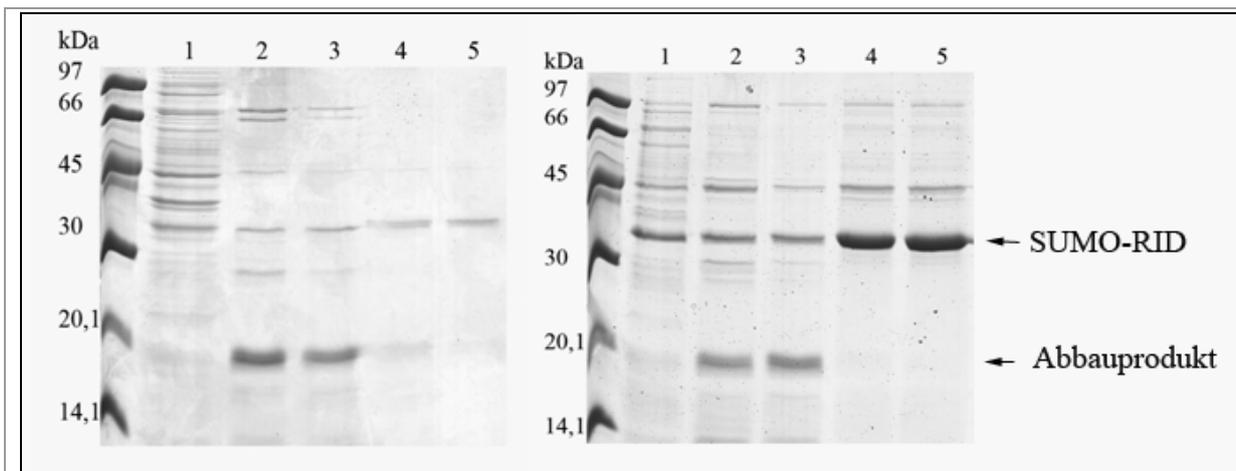


Abbildung 2.20 Reinigung von SUMO-RID

15 % SDS-PAGE, Coomassie gefärbt

Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) für 4h bei 37°C.

Links: nativer Zellaufschluss, Rechts: denaturierender Zellaufschluss und Rückfaltung an der Nickelagarose
1 Rohextrakt; 2,3 Elution mit 200 mM Imidazol; 4,5 Elution mit 500 mM Imidazol

2.1.6.3 Abspaltung von SUMO und Stabilisierung

Die Elutionsfraktionen wurden mit SUMO-Proteasepuffer versetzt und der SUMO-Protease inkubiert. Nach dem Verdau konnte das korrekt gespaltene Protein der intrazellulären Domäne des nAChR durch eine Bande bei 16 kDa auf dem Coomassie gefärbten SDS-Gel und auf dem Western Blot identifiziert (siehe Abbildung 2.21) und durch MALDI-MS-

Fingerprint bestätigt werden. Neben dem erfolgreichen Verdau entstand wieder das spezifische Abbauprodukt bei 18 kDa.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Isolierung der intrazellulären Domäne des nAChR für eine biophysikalische Charakterisierung nicht mehr erfolgen. In dem Ansatz nach der Abspaltung des SUMO-Proteins lagen neben der intrazellulären Domäne des nAChR das vollständige ungespaltene SUMO-Fusionsprotein, das ungespaltene Abbauprodukt und die SUMO-Protease vor. Da diese Proteine alle einen Hexaxahistidintag besitzen, müssten sie sich leicht durch Affinitätschromatographie an Nickelagarose abtrennen lassen. Hier zeigte sich wieder die schon anderweitig beobachtete unspezifische Interaktion der intrazellulären Domäne des nAChR mit dem Säulenmaterial. Während die anderen Proteine durch erneute Elutionsschritte mit Imidazol wieder von der Agarose eluiert werden konnten, blieb die intrazellulären Domäne des nAChR irreversibel (d.h. keine Elution unter nativen Bedingungen) an der Agarose gebunden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Ebenfalls wurde in vorläufigen Experimenten deutlich, dass es bei höheren Proteinkonzentrationen (>0,3 mg/ml) nach Abspaltung des SUMO-Proteins eine vollständige Präzipitation von RID auftritt.

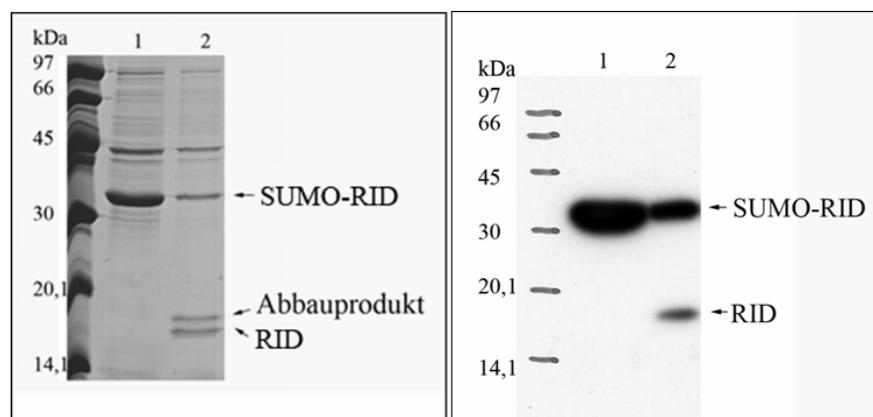
Eine Charakterisierung könnte auch als Fusionsprotein mit SUMO erfolgen. Dafür müsste aber der unspezifische Abbau vermindert werden. Hierfür wurden die Elutionsfraktionen bei unterschiedlichen Bedingungen (Hochsalm, Gegenwart von Zucker und Detergenzien) aufbewahrt. Dabei wurde deutlich, dass nur in Gegenwart von nicht-ionischen Detergenzien wie z.B. Dodecylmaltosid das vollständige Fusionsprotein nicht abgebaut wird (Ergebnisse nicht gezeigt).

Abbildung 2.21

Abspaltung von SUMO vom Fusionsprotein

Links: 15% SDS-Gel,
Coomassie gefärbt
Rechts: Western Blot, anti-
 δ -loop-Antikörper

1 vor Verdau
2 nach Verdau (30°C 1h)



2.1.7 Expression in Säugetierzelllinien

Die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR wurde zusätzlich in Säugetierzelllinien durchgeführt. Eventuell sind für die korrekte Faltung der Domäne posttranslationale Modifikationen und/oder spezielle Chaperone notwendig, die im bakteriellen Expressionssystem nicht geboten werden können.

Für die Expression in eukaryotischen Zellen wurde die cDNA für die cytoplasmatische Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte in den Expressionsvektor pcDNA3.1/CT-GFP-Topo kloniert (siehe Abbildung 2.22)

His-RID in pcDNA 3.1/CT-GFP-Topo:

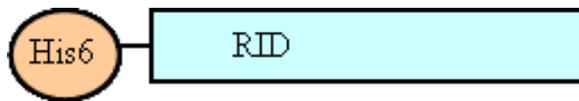


Abbildung 2.22

Hexahistidin-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus*

Es wurde die Nomenklatur des Fusionsproteins und der Expressionsvektor genannt. Das Fusionsprotein mit N-terminalem Hexahistidintag ist graphisch dargestellt. Auf Grund eines in die DNA eingeführten Stopcocons wurde das auf dem Vektor codierte C-terminale GFP nicht exprimiert.

Zur Expression von His-RID erfolgte die Transfektion der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Fraktionen der Proteinisolierung mittels SDS-Gel und Western Blot (anti-His und anti- δ -loop Antikörper) analysiert. Dabei konnte weder die Proteinexpression durch eine Bande entsprechender Größe auf dem SDS-Gel noch durch ein spezifisches Signal auf dem Western Blot detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Gründe, warum His-RID nicht aus transient transfizierten HEK293 Zellen angereichert werden konnte, wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz näher untersucht. Durch Cotransfektion mit dem grünfluoreszierenden Protein GFP sollte zudem die Transfektionseffizienz überprüft werden.

Etwa 40 % der transfizierten Zellen exprimierten GFP, in weniger als 2 % konnte His-RID identifiziert werden. In den wenigen Zellen, die His-RID exprimieren, liegt GFP coexprimiert vor. Meistens weisen diese Zellen abnormale, außergewöhnlich längliche Formen auf (siehe Abbildung 2.23).

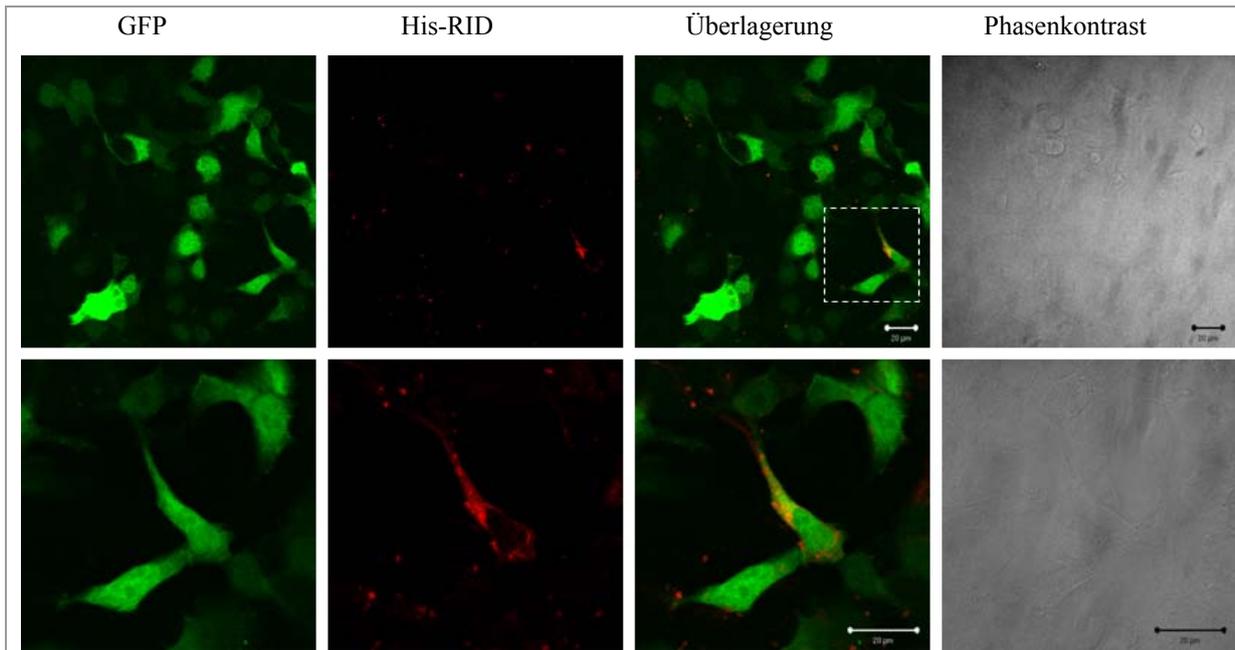


Abbildung 2.23 Coexpression GFP und His-RID in HEK293

In den cotransfizierten Zellen konnte GFP über die Eigenfluoreszenz (grün) direkt detektiert werden. His-RID wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem anti- δ -loop-Antikörper und einem sekundären Antikörper (Alexa 564, rot) identifiziert. Vergleicht man in den oberen Abbildungen die transfizierten Zellen, so wird deutlich, dass in etwa 40 % der Zellen eine Expression von GFP beobachtet werden kann, während in nur etwa 2% der Zellen eine Expression von His-RID auftritt. Die unteren Abbildungen zeigen einen Ausschnitt, in dem die schwache Expression von der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte in einer HEK293 Zelle deutlich wird.

Zusätzlich wurde in einem zweiten Experiment die Coexpression von GFP und His-RID in CHO-K1 Zellen untersucht. In diesen Zellen, die sich durch eine hohe Transfektionseffizienz auszeichnen, wurde eine ähnlich geringe Rate an His-RID exprimierenden Zellen im Vergleich zu den GFP exprimierenden Zellen beobachtet. Zellen mit abnormaler länglicher Form treten hier ebenfalls auf. An Orten, wo Aggregate des Fusionsproteins auftreten, scheint kein GFP vorzukommen (siehe Abbildung 2.24, unten). Weiterhin kann man in verschiedenen Zellen beobachten, wie Membranaggregate entstehen, die letztendlich zum Absterben führen.

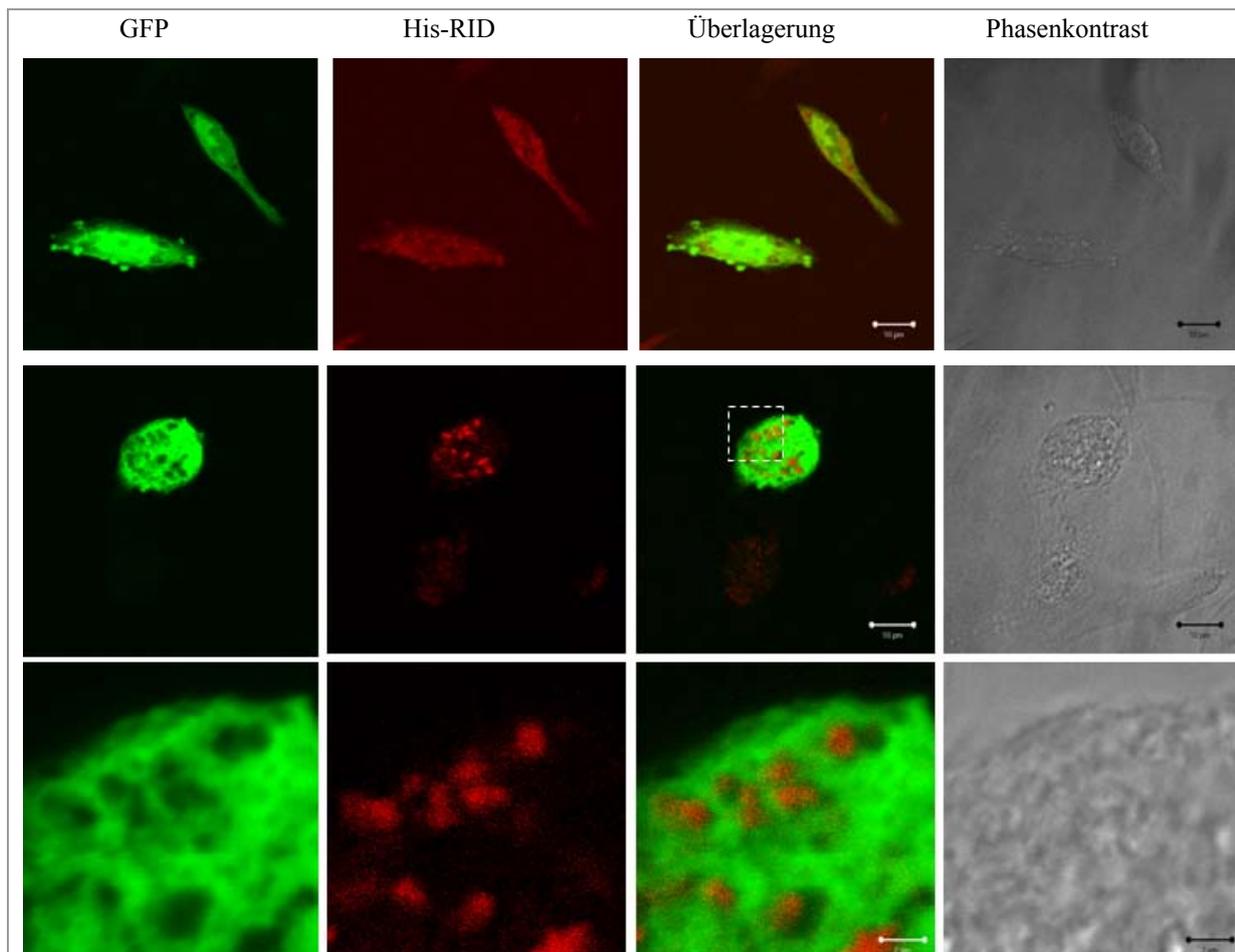


Abbildung 2.24 Coexpression GFP und His-RID in CHO-K1 Zellen

Analog zu den cotransfizierten HEK293 Zellen wurde GFP (grün) direkt und His-RID (rot) indirekt detektiert. In den oberen Abbildungen kann man transfizierten Zellen beobachten, die His-RID exprimieren und deren Zellmembranen aufbrechen, wodurch die Zellen absterben. In den mittleren Abbildungen und als Ausschnitt in den unteren Abbildungen ist eine weitere CHO-K1 Zelle gezeigt, in denen Aggregate von His-RID zu beobachten sind, wo kein GFP lokalisiert ist.

Die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR als Hexahistidin-Fusionsprotein in Säugetierzelllinien führte zu Aggregation der untersuchten Domäne in der Zelle. Diese wirken auf die Zellen toxisch, so dass eine Anreicherung des Proteins nicht erreicht werden konnte.

2.2 Biophysikalische Charakterisierung der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR

2.2.1 Charakterisierung der Hexahistidin-Fusionsproteine in Lösung

Die Bestimmung des Oligomerisierungszustandes der Hexahistidin-Fusionsproteine wurde durch geringe Löslichkeit und hohe Instabilität der Lösung erschwert. Es wurde versucht, die Proteine frei in Lösung und in Gegenwart der Detergenzien Dodecylmaltosid und Dodecylphosphocholin mittels Gelfiltration, dynamischer Lichtstreuung und analytischer Ultrazentrifugation zu charakterisieren. Dabei wurde das Konstrukt His-TID verwendet, weil dieses auch ohne Detergenzien in Lösung untersucht werden konnte.

2.2.1.1 Gelfiltration

Die Gelfiltration von His-TID in Rückfaltungspuffer erlaubte keine genaue Bestimmung des Aggregatzustandes des untersuchten Proteins, da die Elution des Proteins nur als ein breiter Peak zwischen 28-50 min beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 2.7). Auch in Gegenwart der Detergenzien erfolgte die Elution nur über mehrere Fraktionen. Diese Beobachtung deutet auf mehrere Oligomerisierungszustände von His-TID hin. Da in anderen Experimenten eine unspezifische Interaktion mit dem Säulenmaterial beobachtet wurde, könnte darin auch eine Verbreiterung des Elutionspeaks begründet sein. Mit der Methode der Gelfiltration war demnach keine Bestimmung des Oligomerisierungszustandes der Hexahistidin-Fusionsproteine möglich. Lösliche Aggregate, die ohne Interaktion mit dem Säulenmaterial direkt eluieren, wurden hier nicht beobachtet. Jedoch gibt es wahrscheinlich größere Aggregate (über dem Ausschlussvolumen der Säule), die vom Filter der Säule zurückgehalten werden oder sich direkt auf dem Säulenmaterial ablagern (Watson und Kenney, 1988). Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass regelmäßig eine „Verstopfung“ der Säule zu beobachten war.

2.2.1.2 Dynamische Lichtstreuung

Weiterhin wurde versucht, den Oligomerisierungszustand auf Grund der Partikelgröße mit dynamischer Lichtstreuung zu bestimmen. His-TID in Rückfaltungspuffer war mit 0,2 mg/ml zu gering konzentriert, um auswertbare Signale zu erhalten. Die Messung von His-TID in Gegenwart von DPC ergab schwache Signale, da sie von den Signalen der hohen Konzentration an Detergenz beeinflusst wurden. Als Basiskurve erfolgte eine Messung von

20 mM Dodecylphosphocholin in Phosphatpuffer, hierbei wurde nur eine Art von Teilchen mit dem Durchmesser von 2,2 nm beobachtet.

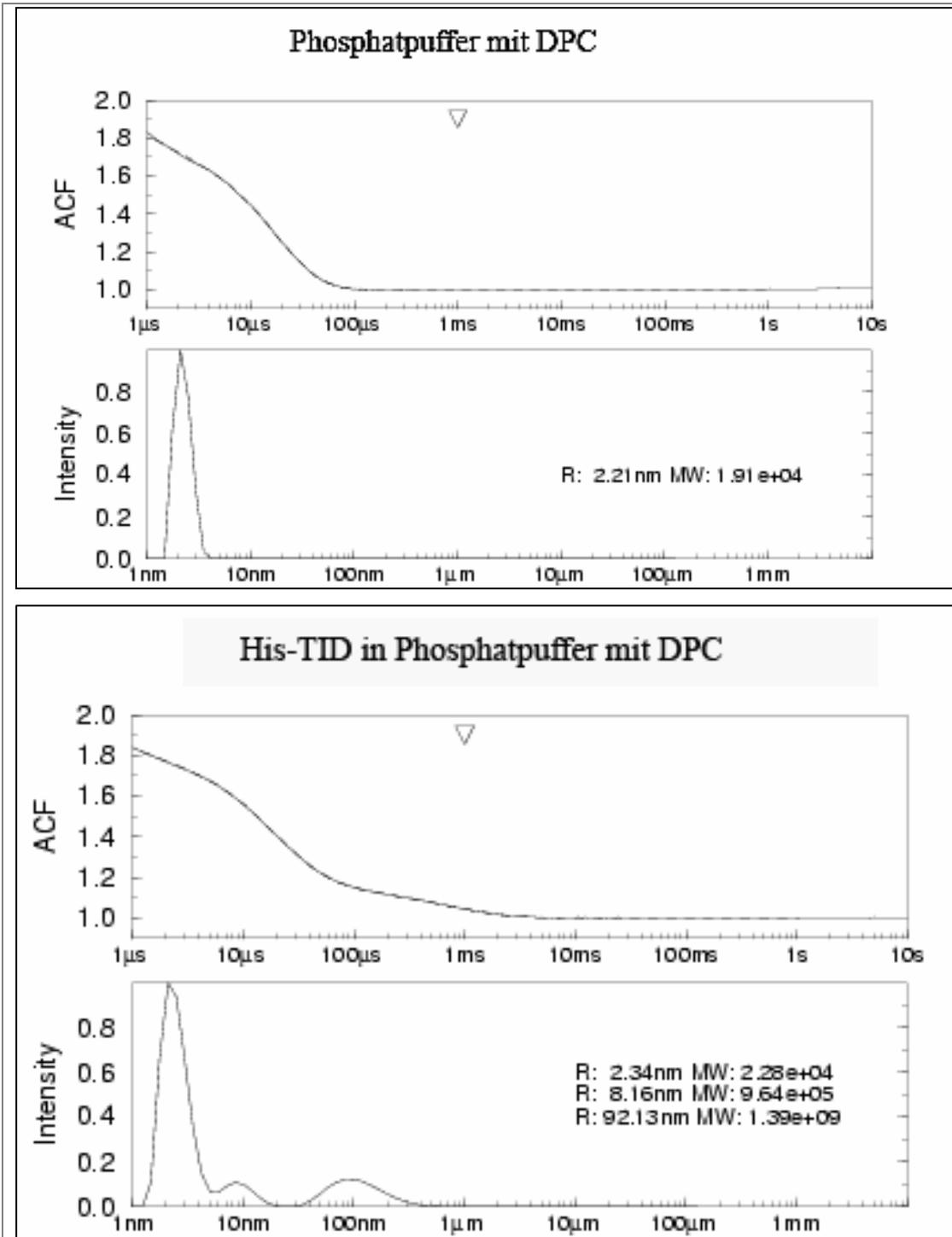


Abbildung 2.25 Dynamische Lichtstreuung von His-TID in Gegenwart von DPC

Die obere Darstellung ist das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuung von 20 mM DPC in Phosphatpuffer, die Werte spiegeln eine ideale Messung wieder. Die Autokorrelationsfunktion (ACF, oberer Graph) ist eine Exponentialfunktion, die bei geringen Zeiten ($1\mu\text{s}$) mit einem Abzissenwert von 2 beginnt und auf die Basislinie herabfällt (Wert 1). Im mittleren Graph zeigt die Radiusverteilung der Teilchen, hier idealerweise ein enger Peak, was einer monodispersen Lösung entspricht. Die untere Abbildung zeigt die Messung von 2 mg/ml His-TID in Phosphatpuffer mit DPC. Die Autokorrelationsfunktion weicht hier von einer idealen Exponentialkurve ab, die Radiusverteilung spiegelt 3 unterschiedlich große Spezies wider.

Für His-TID in Gegenwart von DPC wurden Teilchen unterschiedlicher Größe detektiert (siehe Abbildung 2.25). Eine Spezies mit einem Teilchendurchmesser von 2,3 nm stellt den überwiegenden Anteil der in Lösung befindlichen Teilchen dar (>95%), da mit der dynamischen Lichtstreuung größere Aggregate mit höherer Sensitivität detektiert werden. Es handelt sich hierbei vermutlich um leere DPC-Mizellen. Weitere Spezies wurden mit einem Teilchendurchmesser von 10 nm bzw. 100 nm detektiert. Diese Partikeln entsprechen wahrscheinlich Protein-Detergenz-Komplexen. Die großen Komplexe, vermutlich Aggregate, liegen im Gleichgewicht mit den anderen Teilchen vor, sie ließen sich nicht durch Ultrazentrifugation oder Filtration voneinander trennen (die Messung erfolgte hierbei jeweils 1h nach dem Trennversuch, Ergebnisse nicht gezeigt). Eine genauere Charakterisierung der Protein-Detergenz-Komplexe konnte nicht erfolgen. Daher wurde eine analytische Ultrazentrifugation durchgeführt.

2.2.1.3 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation wurde am FMP Berlin in Zusammenarbeit mit Holger Strauss durchgeführt.

Der Oligomerisierungszustand von His-TID in Rückfaltungspuffer ohne Detergenzien sollte bestimmt werden. Problematisch erwies sich erneut die geringe Konzentration des Proteins in Lösung, so dass nur sehr schwache Signale erhalten wurden, aus denen keine Analyse erfolgen konnte.

Durch den deutlich stabilisierenden Effekt von Dodecylphosphocholin konnte mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation der Protein-Detergenz-Komplex näher charakterisiert werden. Im Vordergrund standen dabei die Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von His-TID und der Dispersität der Lösung, d.h. wie viele unterschiedliche Partikelspezies vorhanden sind.

Mit einem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wurde His-TID in Phosphatpuffer mit Dodecylphosphocholin analysiert, in dem gegen Wasser als Referenz die Sedimentation aller in Lösung befindlichen Partikel durch Messung der Absorption bei 290 nm und Interferenz (Unterschiede im Brechungsindex zwischen Proteinlösung und reinem Lösungsmittel) bestimmt wurden. Einen Überblick über den Sedimentationsverlauf gibt Abbildung 2.26.

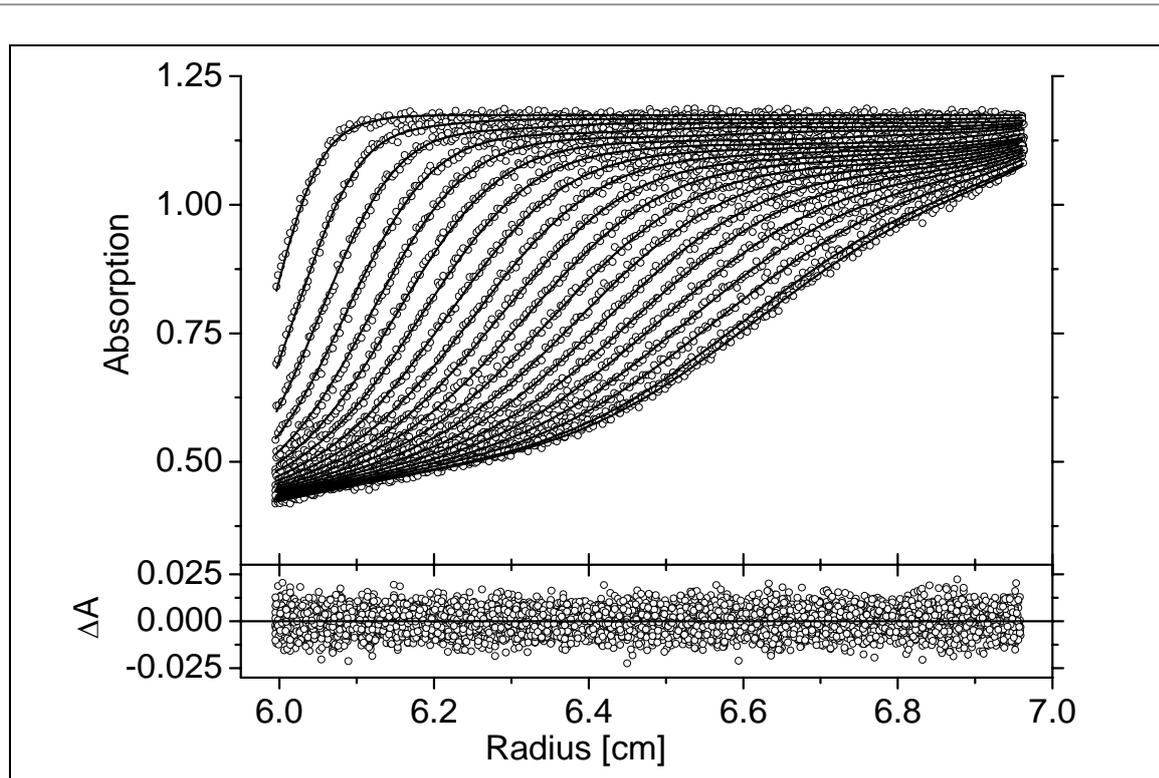


Abbildung 2.26 Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment His-TID in Gegenwart von DPC

1,5 mg His-TID in Phosphatpuffer mit 50 mM DPC wurden gegen Wasser gemessen.

In der oberen Abbildung ist der Sedimentationsverlauf (wegen der Übersichtlichkeit nur jede 5. Messung) in der Zelle dargestellt. Im oberen Teil ist die Wanderung der Grenzschicht in der anfänglich homogen gefüllten Zelle von links nach rechts dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung zeigen die Residuen (mit einem r.m.s.d. Wert von 0,0066) keine systematischen Fehler, d.h. die theoretisch ermittelten Werte (- durchgezogene Linie, obere Abbildung) stehen in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Werten (\circ).

Bei der Bestimmung der s-Wert-Verteilung wurde deutlich, dass drei unterschiedliche Spezies in der Lösung vorhanden waren (siehe Abbildung 2.27). Die Partikel, die bei einer s-Wert-Verteilung von 0,5 S detektiert wurden, entsprechen den leeren DPC-Mizellen. Neben der Größe (ein Protein-Detergenz-Komplex sedimentiert wahrscheinlich bei s-Werten über 1 S) konnte dies vor allem aus dem Vergleich des quantitativen Verhältnisses dieses peaks zwischen Interferenz- und Absorptionsdaten bestimmt werden. DPC wurde vor allem durch die Interferenztomatik als ein starkes Signal detektiert, während bei 290 nm nur eine geringe Absorption detektiert werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei einer s-Wert-Verteilung um 1,4 S und 3 S wurden zwei weitere Spezies detektiert, die je einem Protein-Detergenz-Komplex entsprechen. Hier wurden mit Absorptionsmessung deutliche Signale enthalten. Die sedimentierenden Partikel bei höherer S-Wert Verteilung entsprechen vermutlich Aggregaten, die in geringen Anteilen vorhanden sind. Eine genauere Beschreibung des Protein-Detergenz-Komplexes ($s=1,4$ S) konnte durch ein Sedimentationsgleichgewichtsexperiment erfolgen.

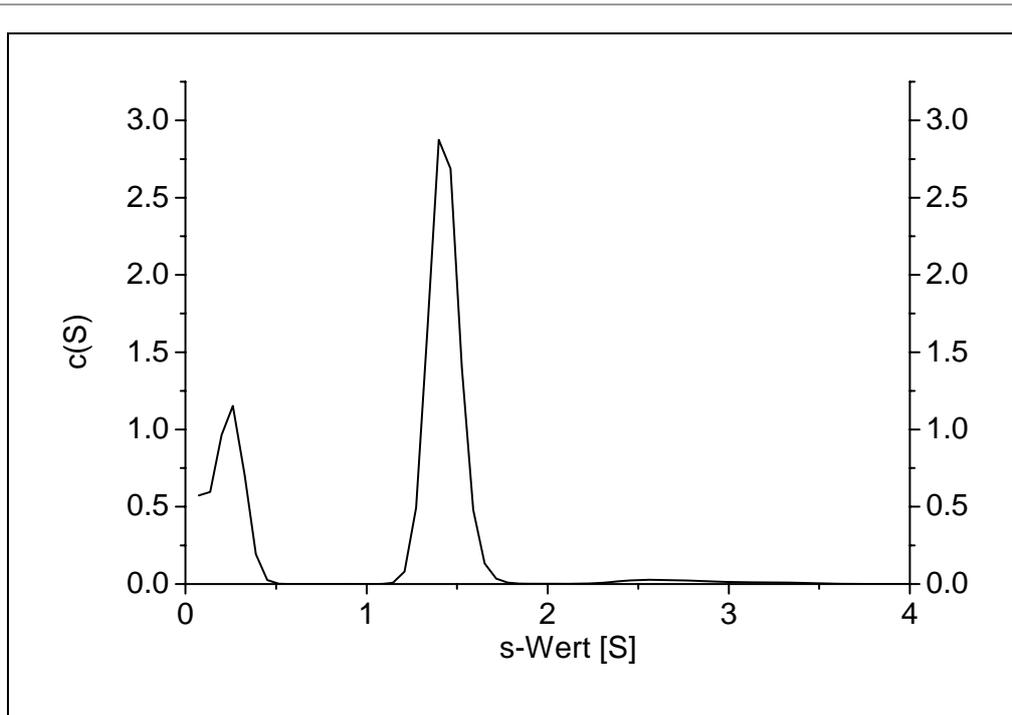


Abbildung 2.27

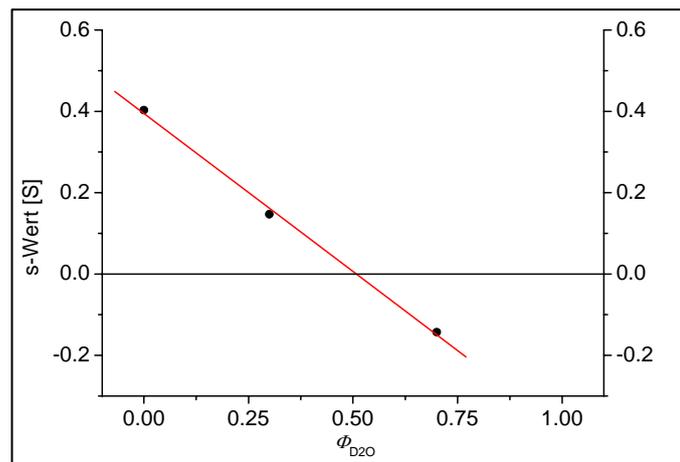
Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten von His-TID im Komplex mit DPC

Die Abbildung zeigt die $c(S)$ Verteilung, die durch Absorptionsmessung bestimmt wurde. Das freie, mizellare Detergenz kann durch Vergleich mit den durch Interferenz erhaltenen Daten als Signal bei 0,5 S detektiert werden. Die bei 1,4 S und 3 S sedimentierenden Partikel entsprechen jeweils einem Protein-Detergenz-Komplex.

Die Bestimmung der Molmasse und damit des Oligomerisierungszustandes von His-TID im Komplex mit DPC kann nur erfolgen, wenn das Massenverhältnis von Protein und gebundenen Detergenz bekannt ist. Die Bestimmung dieses Parameters kann jedoch umgangen werden, wenn ein Sedimentationsgleichgewichtsexperiment in einem Puffer durchgeführt wird, der die gleiche Dichte wie die Detergenzmizellen besitzt, d.h. die Sedimentation nur durch die Proteineigenschaften begründet ist. Die Bestimmung dieser Lösungsmitteldichte erfolgte durch die Sedimentation von DPC in einem Puffer mit unterschiedlichem H_2O/D_2O Verhältnis. Durch Interpolation der erhaltenen s -Werte wurde dieser isopyknische Punkt für DPC in Gegenwart von 51% D_2O im Lösungsmittel, also einer Dichte von 1,06 mg/ml gefunden (siehe Abbildung 2.28). Hier erfolgt keine Sedimentation von DPC mehr.

Abbildung 2.28 Bestimmung der Lösungsmitteldichte für das Gleichgewichtsexperiment

Es wurden 20 mM DPC in einem Puffer 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl in Wasser und in Gegenwart von 25% und 75% D₂O sedimentiert. Die ermittelten S-Werte wurden interpoliert und S=0 in Gegenwart von 51% D₂O bestimmt. Hier findet keine Sedimentation von DPC statt. Die Dichte dieses Lösungsmittels wurde auf 1,06 g/ml bestimmt.

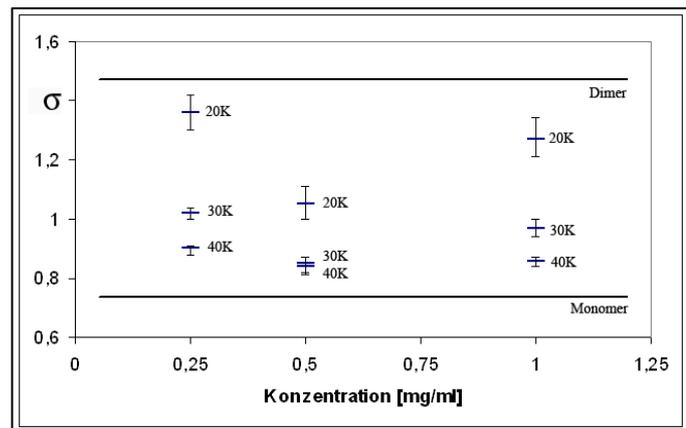


Mit diesem Puffer wurden Gleichgewichtsexperimente mit His-TID in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in Gegenwart unterschiedlicher DPC-Konzentrationen untersucht: 2 mg/ml mit 50 mM DPC, 2 mg/ml mit 25 mM DPC und 1 mg/ml mit 25 mM DPC; wovon jeweils eine 1:1, eine 1:2 und eine 1:4 Verdünnung mit Puffer ohne Detergenz (also bei gleichem Protein-Detergenz-Verhältnis) analysiert wurde. Dadurch sollte ein Einfluss der Proteinkonzentration und des Protein-Detergenz-Verhältnisses auf das Aggregationsverhalten charakterisiert werden.

Es wurde deutlich, dass kein systematischer Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Protein-Detergenz-Verhältnis und dem Aggregationsverhalten von His-TID beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 2.29). Die ermittelten Werte entsprachen dem Monomer, sedimentierende Teilchen entsprechender Dimere konnten nicht beobachtet werden. Bei höheren Rotorgeschwindigkeiten wurde eine Annäherung ans ideale Monomer beobachtet, was vor allem in der Versuchsdurchführung begründet liegt. Die Zentrifugationsexperimente wurden zuerst bei geringen, anschließend bei höheren Geschwindigkeiten durchgeführt. Es wird angenommen, dass sich größere Aggregate in der Lösung befinden, die während der Messung sedimentieren. Durch diesen Massenverlust ergeben sich für den folgenden Lauf geringere Werte für das beschriebene Gleichgewicht.

Abbildung 2.29 Bestimmung der Molmasse von His-TID in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Dargestellt sind die ermittelten σ -Werte mit den bestimmten Abweichungen von Läufen bei unterschiedlicher Konzentration und unterschiedlicher Rotorgeschwindigkeit (20K= 20000rpm). Ein Einfluss der Proteinkonzentration ist nicht erkennbar. Wegen der Übersichtlichkeit sind die Daten bei unterschiedlichem Protein-Detergenz-Verhältnis nicht dargestellt, hier war ebenfalls kein Einfluss sichtbar. Die scheinbare Annäherung ans Monomer beruht auf beobachtete Massenverluste während der Versuchsdurchführung.



Die Auswertung der Konzentrationsgradienten erfolgte durch Anpassung der Messkurven an verschiedene Modelle (siehe Abbildung 2.30). Die beste Beschreibung der erhaltenen Signale erfolgte unter der Annahme, dass es sich um ein Monomer-Aggregat System handelt, wobei das Aggregat in variablen Stöchiometrien, als Vielfaches der Monomerenmasse, vorliegt. Mit diesem Modell konnte die Molmasse exakt bestimmt werden ($\sigma=0,733$, entspricht 17195 g/mol mit einem r.m.s.d. 0,0019; Durchschnitt aller Messungen). Andere Modelle, z.B. die Annahme eines Monomer-Dimer-Gleichgewichtes führten zu deutlich schlechteren Ergebnissen (ungenau Molmasse, größere bzw. systematische Fehler). Dies gilt für alle hier untersuchten Bedingungen. Die Analyse des Monomer-Aggregat-Modells bestätigt die Beobachtung von zwei Protein-Detergenz-Komplexen im Geschwindigkeitsexperiment (siehe Abbildung 2.27).

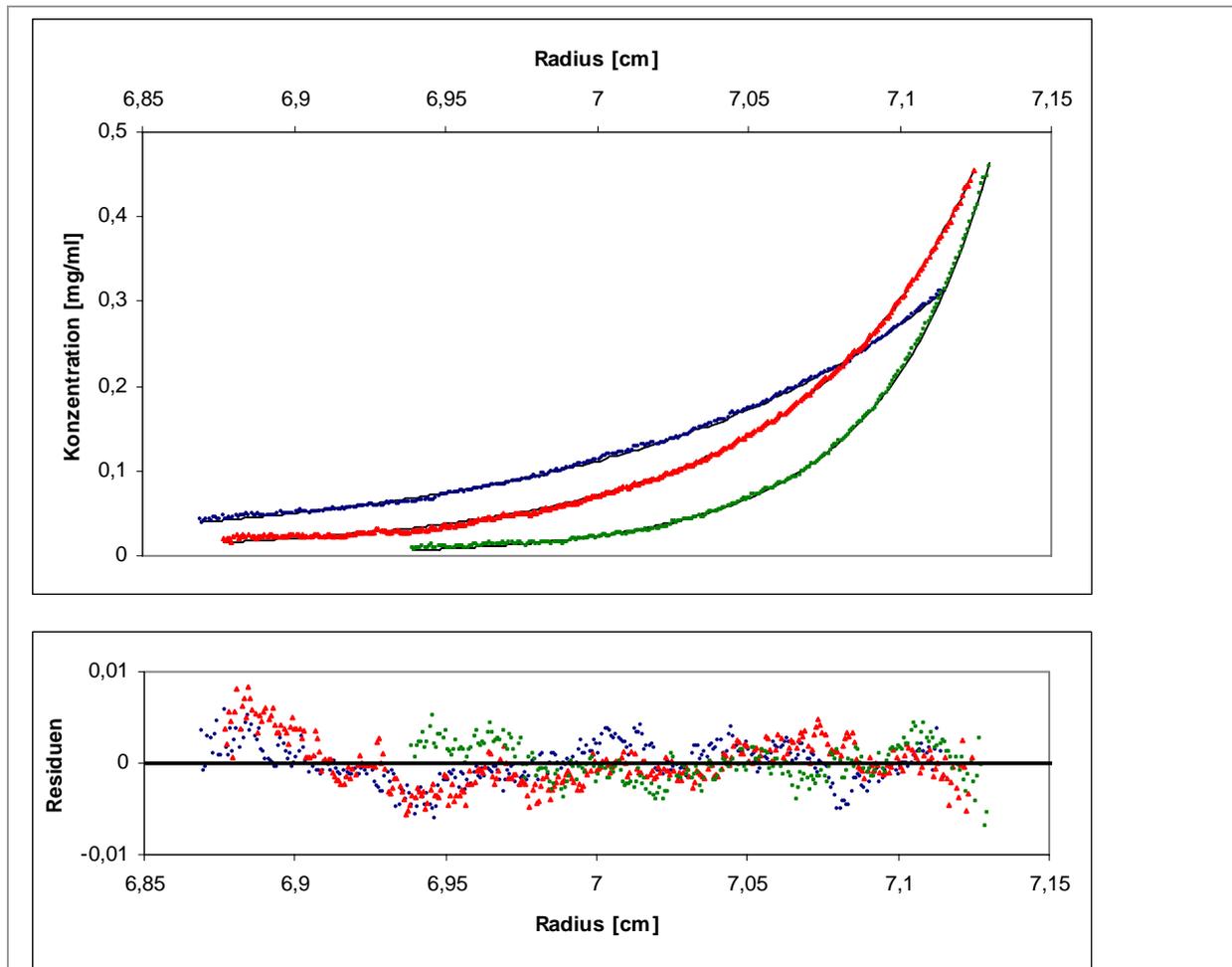


Abbildung 2.30 Sedimentationsgleichgewichtsanalyse von His-TID

In der oberen Darstellung die Konzentrationsgradienten von 0,25 mg/ml His-TID in Gegenwart von 25 mM DPC. Die Analyse erfolgte bei 20°C und unterschiedlichen Rotorgeschwindigkeiten: 20.000 rpm (blau), 30.000 rpm (rot) und 40.000 rpm (grün). Die Daten wurden nach einem Modell gefittet, welches Monomer mit Aggregatbildung beschreibt. Die Residuen der Kurvenanpassung sind in der unteren Darstellung gezeigt, hierbei sind keine systematischen Abweichungen erkennbar, wodurch die Modellvorstellung bestätigt wird.

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass His-TID als Monomer im Komplex mit dem Detergenz Dodecylphosphocholin vorliegt. Die Bildung von größeren Aggregaten konnte zusätzlich beobachtet werden, sie sind direkt nach der Probenherstellung nur in geringen Anteilen vorhanden. Nach 5 Tagen wurden etwa 10 % Aggregat in der Lösung detektiert.

2.2.2 CD Spektroskopie

Zur Charakterisierung mittels CD-Spektroskopie wurde das gereinigte Protein His-TID durch Dialyse im Rückfaltungspuffer renaturiert, in dem für die Spektroskopie günstigeren Phosphatpuffer aggregierte das Protein vollständig (siehe 2.1.2.5). His-TID und His-RID wurden mit 1% Dodecylmaltosid versetzt und gegen Phosphatpuffer dialysiert. Die Renaturierung in Gegenwart von Dodecylphosphocholin erfolgte durch Austausch gegen Phosphatpuffer auf Microcon-Filter.

Das Spektrum von His-TID in Rückfaltungspuffer weist ein Minimum der Elliptizität bei 202 nm auf. Durch Zugabe von Dodecylmaltosid (DM) oder Dodecylphosphocholin (DPC) wird eine Veränderung der CD-Spektren beobachtet: eine Verschiebung des Minimums zu höheren Wellenlängen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die gleichen Spektren wie durch Zugabe der Detergenzien wurden für die Proben erhalten, die durch Rückfaltung in Phosphatpuffer in Gegenwart der Detergenzien hergestellt wurden. Die Aufnahme der CD-Spektren wurde hier weniger durch die Absorption des Puffers gestört. Die Spektren für His-RID wurden von den renaturierten Proben in Phosphatpuffer mit Detergenz gemessen.

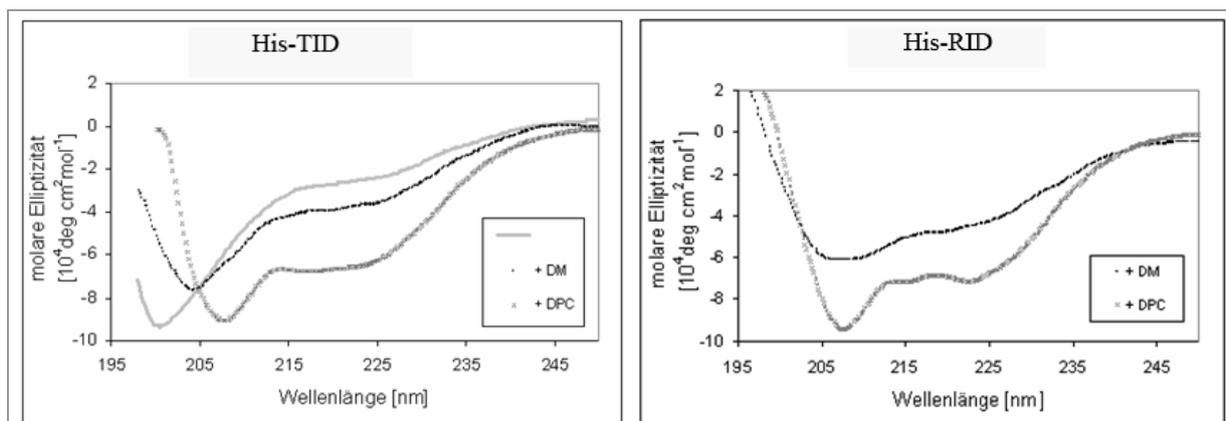


Abbildung 2.29 CD-Spektroskopie der His-TID und His-RID

In der linken Abbildung die CD-Spektren von His-TID in Rückfaltungspuffer (—) und in Phosphatpuffer in Gegenwart von Dodecylmaltosid (•) bzw. Dodecylphosphocholin (×) dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt die CD-Spektren von His-RID in Phosphatpuffer mit Dodecylmaltosid (•) bzw. Dodecylphosphocholin (×).

Die Auswertung erfolgte über die Umrechnung der gemessenen Elliptizität in molare Elliptizität. Auf Grund der hohen Absorption der Probe konnte die Messung nur bis maximal 195 nm erfolgen. Mit diesen Messwerten war eine Sekundärstrukturvorhersage mit dem k2D-Algorithmus möglich. Zusätzlich wurden Vorhersagen mit dem CONTIN-Algorithmus durchgeführt, beide Vorhersagen ergaben ähnliche Werte. In Übereinstimmung mit dem Minimum des Spektrums bei 202 nm wurden 45-56% unstrukturiertes Protein vorhergesagt.

Tabelle 2-2 Sekundärstrukturvorhersage mit dem k2D Algorithmus

	α -Helix	β -Faltblatt	andere
His-TID			
Rückfaltungspuffer	7 %	47 %	45 %
Phosphatpuffer + DM	17 %	27 %	56 %
Phosphatpuffer + DPC	27 %	17 %	56 %
His-RID			
Phosphatpuffer + DM	29 %	15 %	56 %
Phosphatpuffer + DPC	37 %	16 %	48 %

2.2.3 NMR Spektroskopie

Die NMR-Experimente wurden am FMP Berlin in Zusammenarbeit mit Dr. Bert Heise durchgeführt.

Die Hexahistidin-Fusionsproteine wurden in Phosphatpuffer in Gegenwart von Dodecylphosphocholin mittels Microcon-Filter renaturiert und konzentriert.

Von der Probe wurde ein 1D- ^1H -NMR Spektrum aufgenommen (siehe Abbildung 1.32).

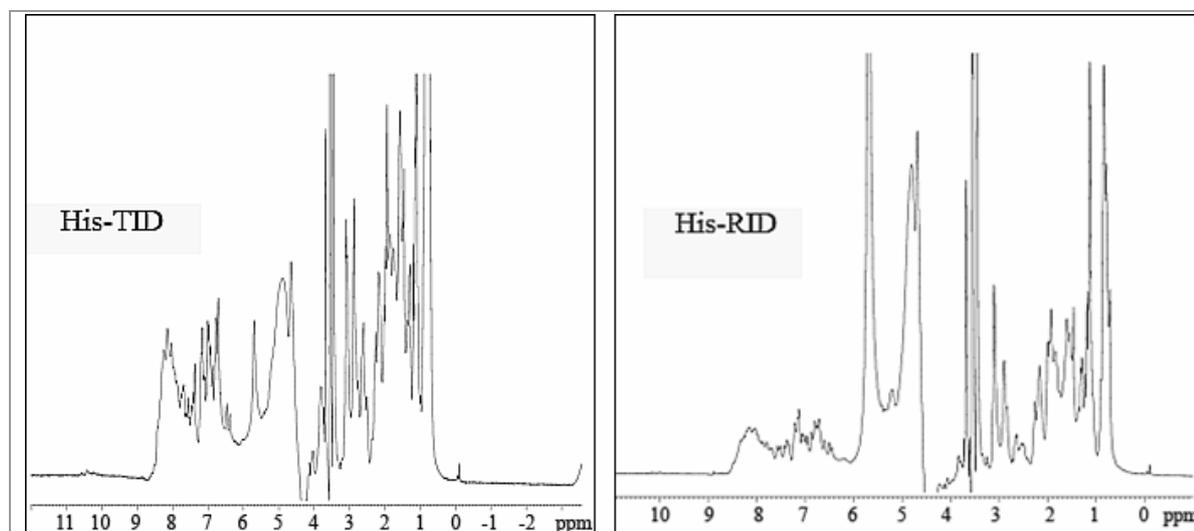


Abbildung 2.30 1D- ^1H -NMR Spektren von His-TID und His-RID

300 μM His-TID und His-RID in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, 50 mM NaCl, 10 % (v/v) D_2O

In diesem erhaltenen Spektrum sind die CH-Resonanzen durch das Signal des Detergenz überlagert und können daher nicht detaillierter analysiert werden. Im Bereich von 6,5–8,5 ppm sind die Amid- und Aromatenprotonensignale erkennbar. Die geringe Dispersion der Signale weist auf einen hohen Anteil an unstrukturiertem Protein (*random coil*) hin. Entsprechende Amidprotonensignale können allerdings auch bei Proteinen mit einem hohen Anteil an α -Helix beobachtet werden.

Für folgende NMR-Experimente wurden die Hexahistidin-Fusionsproteine ^{15}N isotopenmarkiert. Die Expression erfolgte in M9-Minimalmedium mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als einziger Stickstoffquelle, die Expressionsrate war ungefähr 50 % geringer als in LB-Vollmedium. Die Proteinreinigung und Renaturierung erfolgte wie beim unmarkierten Protein. Es wurde deuteriertes Dodecylphosphocholin eingesetzt.

Ein ^{15}N -HSQC Spektrum zeigt grundsätzlich ein Signal für jedes Proton, das direkt an einen Stickstoffrest gebunden ist, also die Amidprotonen des gesamten Proteinrückgrats (außer Prolin) und einige Seitenketten. Die Positionen dieser Signale spiegeln wider, ob es sich um ein strukturiertes Protein handelt. Im ^{15}N HSQC sind die meisten Amidprotonenresonanzen überlagert. Dies spricht für ein Protein ohne ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur (siehe Abbildung 2.31). Für His-TID können keine einzelnen Resonanzen detektiert werden. Für His-RID liegen wenige Signale in der Region der ^{15}N -Frequenz 125-135 ppm aufgelöst vor. Diese Signale sind typisch für Aminosäuren wie Leucin und Lysin in einer strukturierten Umgebung. Diese Aminosäuren kommen bei His-RID im Bereich der Aminosäuren 21-33 gehäuft vor. Eventuell ist hier eine kurze α -Helix vorhanden.

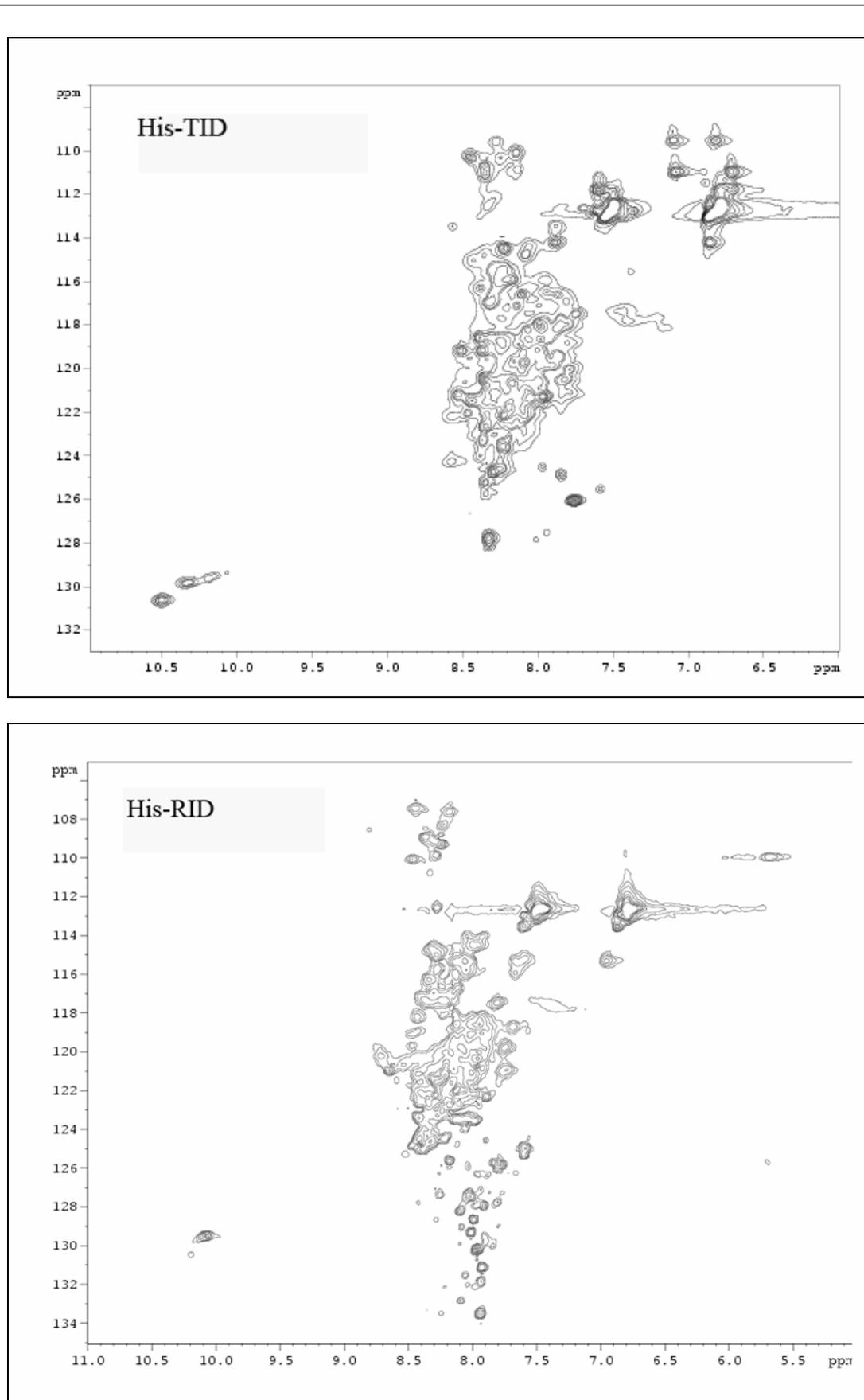


Abbildung 2.31 ^{15}N HSQC-NMR Spektren (Ausschnitt) von His-TID und His-RID
300 μM His-TID und His-RID in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, 50 mM NaCl, 10 % (v/v) D_2O

2.2.4 Strukturvorhersagen

Sekundärstrukturvorhersagen und die Analyse von unstrukturierten Bereichen der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Torpedo* wurden im Rahmen dieser Arbeit von Dr. Viktoria Kukhtina durchgeführt. Dafür wurden ungeordnete Regionen mit dem Programm DisEMBL, Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.4 (Linding et al., 2003) vorhergesagt. Hier wurde für die cytoplasmatische Domäne ein hoher Anteil an ungeordneter Struktur postuliert (siehe Abbildung 2.32). Die Sekundärstrukturvorhersagen erfolgten mit drei unterschiedlichen Programmen Jpred secondary structure prediction server (Cuff et al., 1998), PROF- Secondary Structure Prediction System (Rost und Sander, 1993) und PSIPRED Protein Structure Prediction Server (Jones, 1999). Eine Zusammenfassung dieser Vorhersagen beschreibt eine α -Helix im N-terminalen Bereich und zwei α -Helices im C-terminalen Bereich, die sehr nah beieinander liegen und möglicherweise eine größere Helix bilden könnten (siehe Abbildung 2.32).

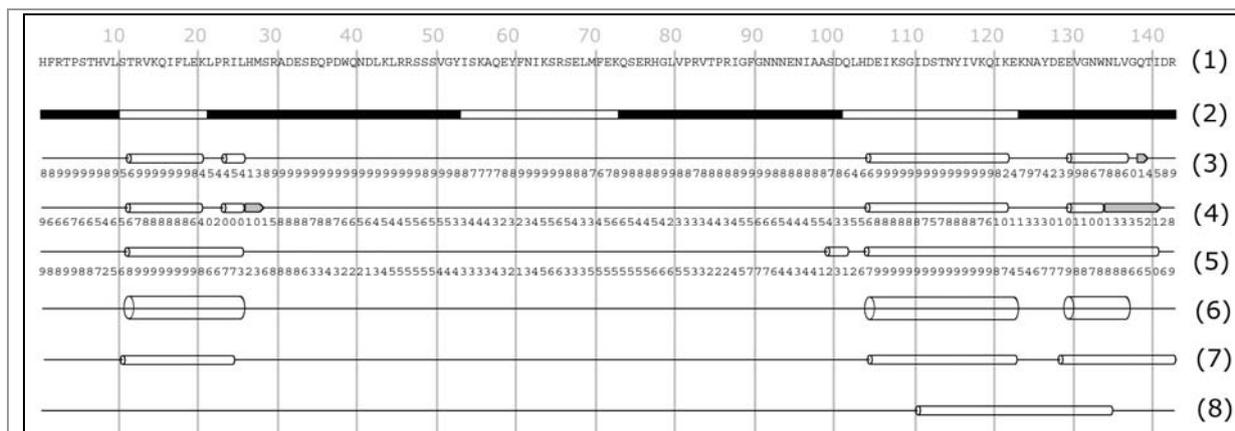


Abbildung 2.32 Vorhersagen der Sekundärstruktur für TID

Oben die Aminosäuresequenz für TID (1), darunter die nach DisEMBL vorhergesagten nicht strukturierten Regionen (schwarze Balken) (2). Verschiedene Sekundärstrukturvorhersagen postulieren α -Helices in den proximalen Bereichen: nach Jpred (3) nach PROF (4) PSIPRED (5); die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Vorhersage ist als Zifferindex von 0=gering bis 9=hoch angegeben. Eine Zusammenfassung dieser Vorhersagen spiegelt (6) wieder. Zum Vergleich sind die nach Le Novère et al. (1999) postulierten α -Helices in (7) gekennzeichnet und die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifizierte MA-Helix (Unwin, 2005) in (8) angegeben.

2.2.5 Limitierte Proteolyse

Mit His-TID in Rückfaltungspuffer ohne Detergenz und in Phosphatpuffer mit Dodecylphosphocholin wurde eine limitierte Proteolyse durchgeführt. Dadurch können gut strukturierte Regionen von Proteinen identifiziert werden, die deutlich resistenter gegenüber proteolytischem Verdau sind als unstrukturierte Bereiche. Dazu wurden die Proben mit steigenden Konzentrationen Trypsin und Proteinase K versetzt und unterschiedlich lange

inkubiert. Der Verdau wurde mittels Tricin-Gel Analyse ausgewertet. Für His-TID in Rückfaltungspuffer konnten nach 2h mit 1 ng/ml Trypsin und 1ng/ml Proteinase K Fragmente ähnlicher Größe beobachtet werden, bei höherer Konzentration entstehen weitere kleinere Fragmente bzw. es kommt zu einem kompletten Abbau. Es konnten keine Protease-resistenten Fragmente identifiziert werden, die auf stabile Sekundärstrukturelemente hinweisen. Für den Verdau in Gegenwart des stabilisierenden Dodecylphosphocholin wurden analoge Fragmente beobachtet, jedoch erst nach einem längeren Zeitraum (1ng/ml 20h) oder bei höherer Proteasekonzentration (10 ng/ml 2h). Die Analyse verschiedener Fragmente mit MALDI-MS-Fingerprint ergab, dass es sich um einen systematischen Abbau vom N-Terminus bzw. vom C-Terminus handelt.

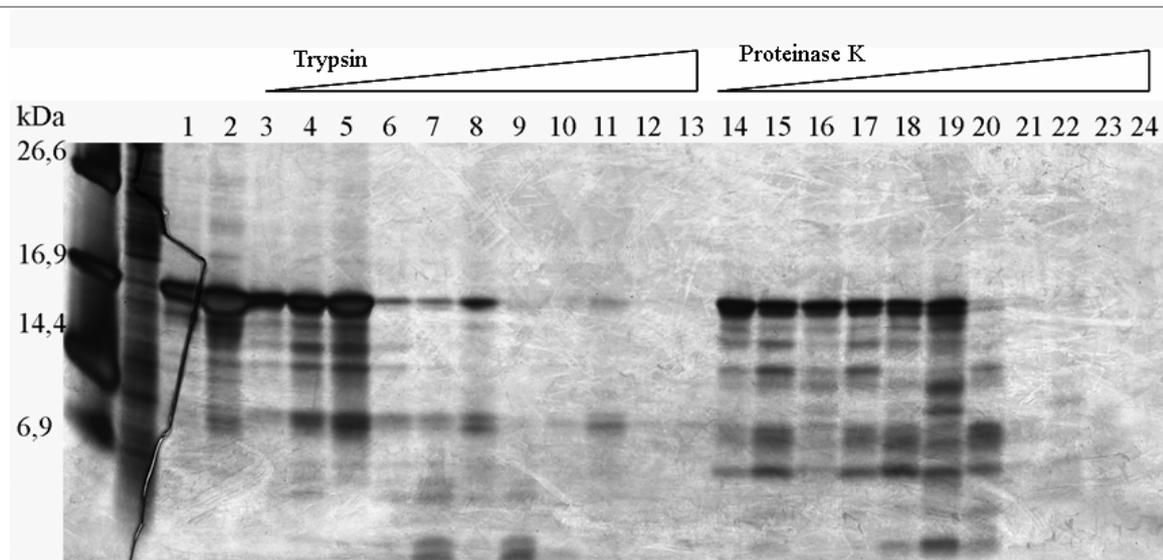


Abbildung 2.33 Limitierte Proteolyse von His-TID in Rückfaltungspuffer

16,5% Criterion Peptid Gel (Biorad), Silberfärbung

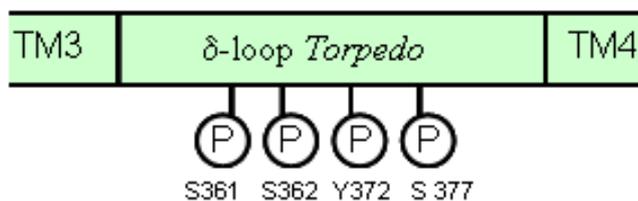
Die Fusionsproteine wurden mit steigender Konzentration an Trypsin und Proteinase K verdaut und analysiert.

	1 vor Spaltung			2 20 h ohne Protease		
Trypsin	3	1 ng/ml 30 min		14	1 ng/ml 30 min	
	4	1 ng/ml 2h	Proteinase K	15	1 ng/ml 2h	
	5	1 ng/ml 20h		16	1 ng/ml 20h	
	6	10 ng/ml 30 min		17	10 ng/ml 30 min	
	7	10 ng/ml 2h		18	10 ng/ml 2h	
	8	10 ng/ml 20h		19	10 ng/ml 20h	
	9	100 ng/ml 30 min		20	100 ng/ml 30 min	
	10	100 ng/ml 2h		21	100 ng/ml 2h	
	11	100 ng/ml 20h		22	100 ng/ml 20h	
	12	1 µg/ml 30 min		23	1 µg/ml 30 min	
	13	1 µg/ml 2h		24	1 µg/ml 2h	

2.3 Einfluss der Phosphorylierung auf die Struktur der intrazellulären Domäne des nAChR

In mehreren Arbeiten wurden Phosphorylierungsstellen in der intrazellulären Domäne des nAChR identifiziert (siehe Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Inwieweit eine Phosphorylierung einen Einfluss auf die Sekundärstruktur hat, sollte im Folgenden durch *in vitro* Phosphorylierung und durch gezielte Mutagenese untersucht werden.

Phosphorylierungsstellen in der δ -Untereinheit des nAChR von *Torpedo californica*:



δ -Untereinheit des nAChR von <i>Torpedo californica</i>	S361	S362	Y372	S277
His-RID	S53	S54	Y64	S69
His-TID	S56	S57	Y67	S72

Abbildung 2.34 Nomenklatur der Phosphorylierungsstellen in den Hexahistidin-Fusionsproteinen

In der oberen Abbildung ist die Nomenklatur der identifizierten Phosphorylierungsstellen in der δ -Untereinheit des nAChR von *Torpedo californica* angegeben. Die untere Tabelle gibt die entsprechenden Positionen in den Fusionsproteinen an.

2.3.1 *In vitro* Phosphorylierung von His-TID

Der His-TID wurde *in vitro* mit Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert (dieses Experiment wurde von Dr. Viktoria Kukhtina durchgeführt). Durch Radioaktivitätsmessungen (^{32}P) wurden nach Phosphorylierung 2,5 Phosphatgruppen pro mol Protein identifiziert. Durch Sequenzierung mit MALDI-MS konnte die Phosphorylierung von Ser56 bestätigt werden (siehe Abbildung 2.36), das Vorhandensein einer zweiten Phosphatgruppe konnte nicht gezeigt werden.

Die nach *reverse phase* HPLC durch Lyophilisierung erhaltene Probe ließ sich nur schwer lösen. Dies war nur in Gegenwart von Dodecylphosphocholin möglich. Mittels CD-Spektroskopie wurden ähnliche CD-Spektren von unphosphoryliertem und phosphoryliertem Fusionsprotein His-TID erhalten. Ein Einfluss der Phosphorylierung auf die Sekundärstruktur war daher nicht anzunehmen (siehe Abbildung 2.35).

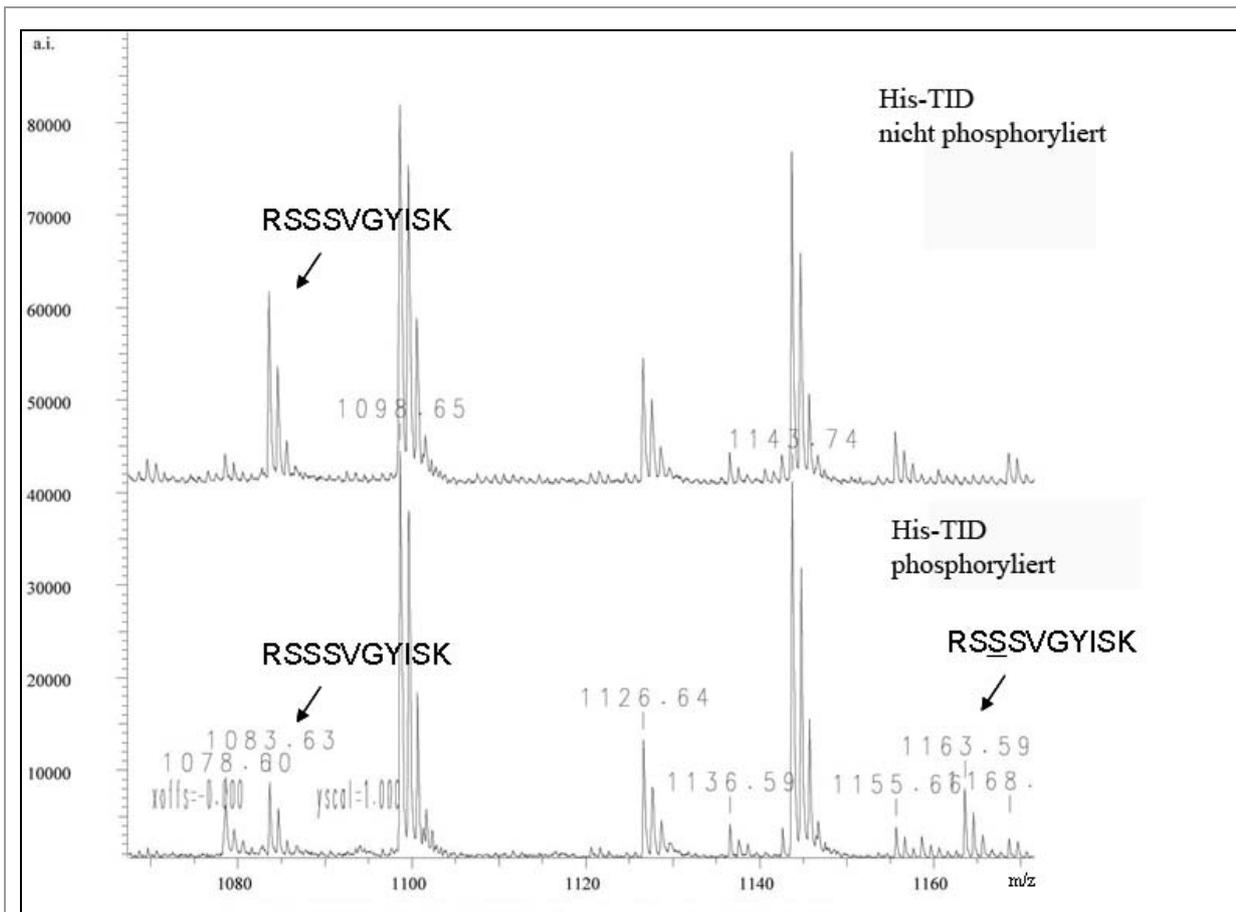
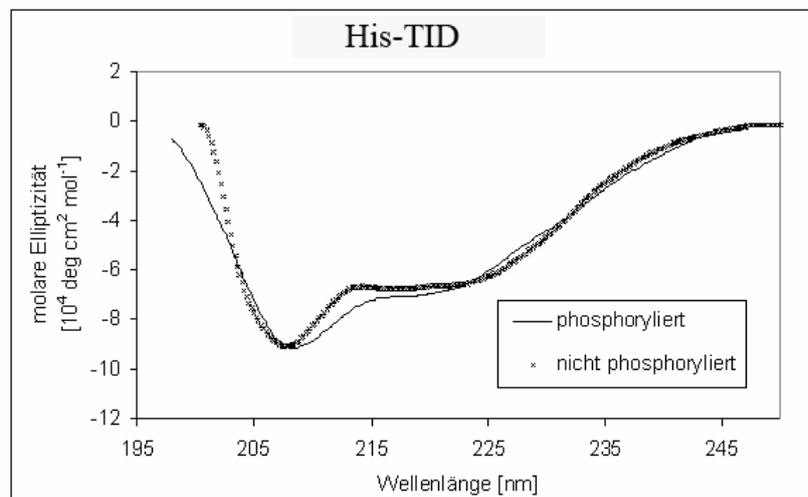


Abbildung 2.35
Einfluss der Phosphorylierung
auf die Sekundärstruktur

Oben: Durch MALDI-MS Fingerprint wurde die Phosphorylierung von His-TID im Fragment R~~S~~SSVGYISK (1083 Da, phosphoryliert 1163 Da) identifiziert. Durch Sequenzierung wurde die Phosphorylierung an Ser56 bestätigt.

Unten: CD-Spektren von His-TID nicht phosphoryliert und *in vitro* mit PKA an Position Ser56 phosphoryliert.



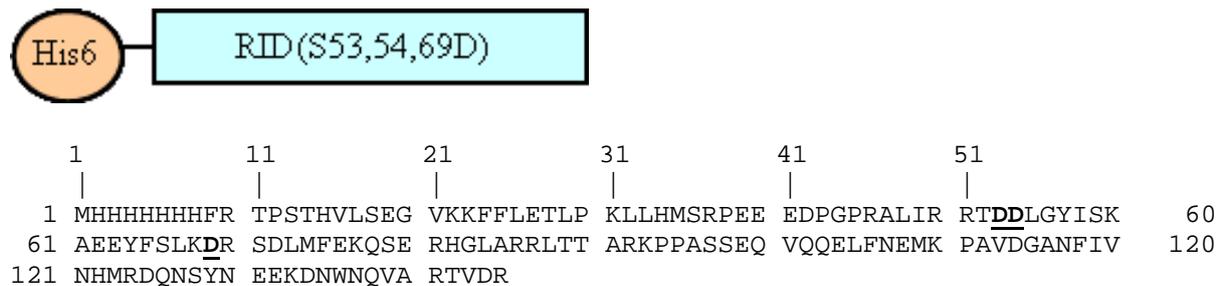
2.3.2 Serin-Aspartat Mutanten zur Simulation der Phosphorylierung

Da das Fusionsprotein His-RID nicht ohne Detergenzien renaturiert werden konnte, stand es für die *in vitro* - Phosphorylierung nicht zur Verfügung. Zudem gab es Löslichkeitsprobleme mit dem phosphorylierten His-TID und es konnte *in vitro* nicht die Phosphorylierung aller bekannten Serin- und Tyrosinreste nachvollzogen werden. Daher sollte die

Serinphosphorylierung bezüglich ihrer Größe und Ladung simuliert werden, in dem die Serinreste durch Aspartatreste ersetzt werden.

Dafür wurde eine gerichtete Mutagenese mit synthetischen Oligonukleotiden durchgeführt, die für eine Serin-Aspartat Austauschmutation codieren (siehe Abbildung 2.36).

His-RID(S53,54,69D) in pET24a:



His-TID(S56,57,72D) in pET11a:

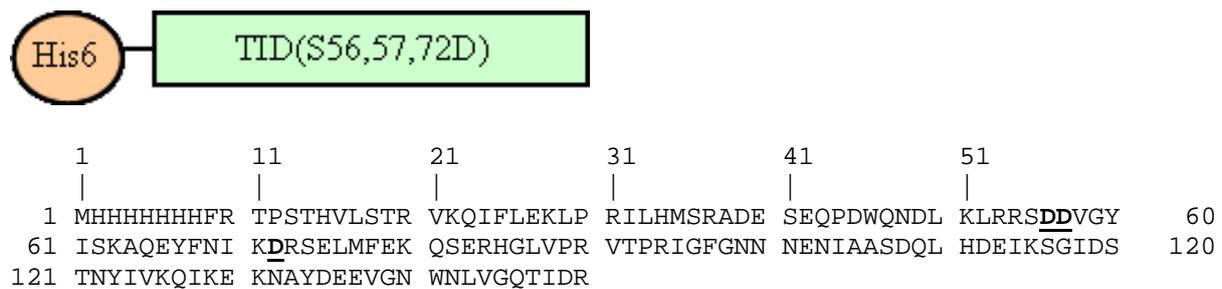


Abbildung 2.36 Übersicht His-TID und His-RID Ser-Asp Mutanten

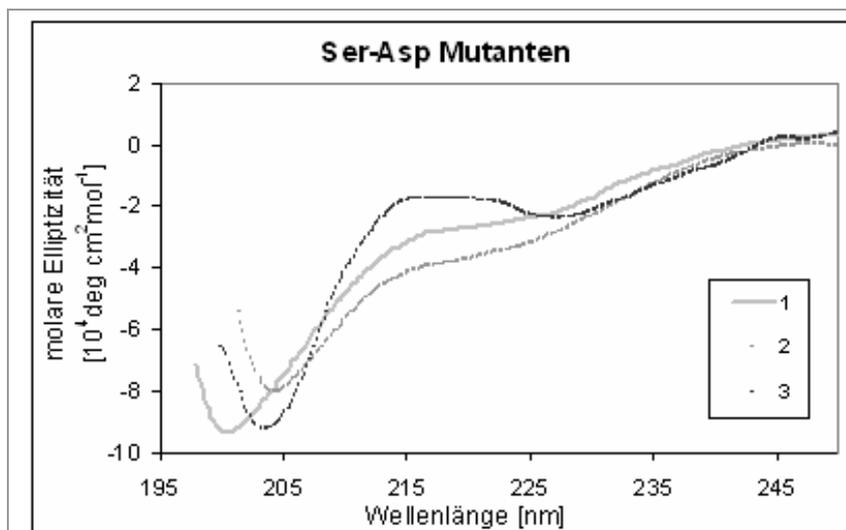
Durch gerichtete Mutagenese der Plasmide His-TID in pET11a und His-RID in pET24a wurden die cDNA so verändert, dass Serinreste, die im nativen Rezeptor als Phosphorylierungstargets identifiziert wurden, als Aspartatreste exprimiert werden. In den Sequenzen sind die entsprechenden Positionen fett und unterstrichen gekennzeichnet. Es wurden Nomenklatur der Fusionsproteine und die Expressionsvektoren genannt. Die Fusionsproteine sind mit N-terminalem Hexahistidintag sind graphisch dargestellt.

Die Expression, Reinigung und Rückfaltung erfolgte wie bei den His-TID/His-RID Wildtypkonstrukten (siehe 2.1.2.4 und 2.1.2.5). Die im Rahmen der Klonierung entstandenen Einfach- (Ratte S53D, S54D und S69D bzw. *Torpedo* S56D, S57D und S72D) und Doppelmutanten (Ratte S53,54D und S53,69D bzw. *Torpedo* S56,57D und S56,72D) zeigten nach der Rückfaltung keinen Unterschied im Löslichkeitsverhalten (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Dreifachmutanten (Ratte S53,54,69D bzw. *Torpedo* S56,57,S72D) konnten jedoch nach Renaturierung etwas höher als die Wildtypproteine konzentriert werden. Somit wurde His-RID erstmals ohne die Anwesenheit von Detergenzien in Lösung detektiert. Jedoch zeigte diese Lösung ebenfalls eine sehr geringe Stabilität.

Tabelle 2-3 Renaturierung von His-RID und His-TID und der Ser-Asp Mutanten

	His-RID	His-RID (S53,54,69D)	His-TID	His-TID (S56,57,72D)
Rückfaltungspuffer	0,3 mg/ml	0,6 mg/ml	0,05 mg/ml	0,2 mg/ml
Phosphatpuffer + DM	0,7 mg/ml	0,7 mg/ml	0,3 mg/ml	0,6 mg/ml
Phosphatpuffer + DPC	6 mg/ml	6 mg/ml	6 mg/ml	6 mg/ml

Die Dreifachmutanten der Fusionsproteine wurden CD-spektroskopisch charakterisiert. Durch die erhöhte Löslichkeit konnte erstmals ein CD-Spektrum der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte ohne Detergenzien aufgenommen werden. Dieses ist dem Spektrum von Wildtyp His-TID ähnlich. Wie bei dem *in vitro* phosphorylierten His-TID konnte kein Einfluss auf die Sekundärstruktur beobachtet werden (siehe Abbildung 2.37).

**Abbildung 2.37 CD-Spektren Ser-Asp Mutanten**

Die CD-Spektren von Wildtyp (1) His-TID und Mutanten (2) His-TID(S56, 57,72D) und (3) His-RID(S53, 54,70D) sind sehr ähnlich. Es wurde kein Einfluss auf die Sekundärstruktur durch die eingeführten Aspartatreste, die eine Serinphosphorylierung imitieren, festgestellt.

Auf Grund der erhöhten Löslichkeit der Serin-Aspartat-Mutanten sollte der Oligomerisierungszustand der Konstrukte untersucht werden. Mittels Gelfiltration wurde eine ähnliche Elution wie beim Wildtyp beobachtet, d.h. die Elution von His-TID(S56, 57,69D) erfolgte nur als ein breiter Peak und His-RID(S53,54,70D) konnte nicht eluiert werden. Die Charakterisierung mit analytischer Ultrazentrifugation war auch hier auf Grund der geringen Konzentration nicht möglich.

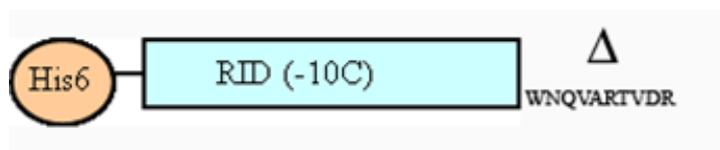
2.4 Einfluss der Termini der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte auf Faltung und Stabilität der heterolog exprimierten Proteine

Die Aminosäuresequenz der cytoplasmatischen Domäne verschiedener Untereinheiten des nAChR und anderer Rezeptoren der Cys-loop-Superfamilie wurden miteinander auf Homologie und Ähnlichkeiten in der Sequenz (Ladungs-/Hydrophobizitätsmuster) verglichen (vorausgehende Arbeiten, nicht veröffentlicht). Aus diesen Daten im Vergleich mit den bekannten elektronenmikroskopischen Strukturbildern und Sekundärstrukturvorhersagen konnte ein Einfluss der N- und C-terminalen Aminosäuresequenzen auf die Struktur vermutet werden. Es kann nicht klar abgegrenzt werden, welche Aminosäuren die intrazelluläre Schleife zwischen der M3 und M4 Helix als sich autonom faltende Proteindomäne begrenzen. Zudem ist zu beachten, dass die Termini der intrazellulären Domäne des nAChR in Membrannähe lokalisiert sind und diese Proteinsequenzen ohne Gegenwart von Lipiden zur Aggregation neigen können. Daher wurden unterschiedliche Fusionsproteine mit variablen Termini untersucht.

2.4.1 Charakterisierung der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte mit verkürztem C-Terminus

Die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte mit einer Deletion von zehn Aminosäuren am C-Terminus (-10C) wurde analog zu His-RID und His-RID_Thr kloniert (siehe Abbildung 2.38).

His-RID(-10C) in pET24a:



His-RID(-10C)_Thr in pET28a:

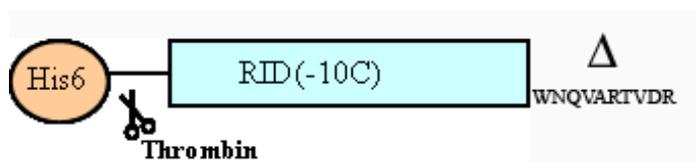


Abbildung 2.38 Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica* mit verkürztem C-Terminus

Es wurden Nomenklatur der Fusionsproteine und die Expressionsvektoren genannt. Die um 10 Aminosäuren am C-Terminus (-10C) verkürzten Hexahistidin-Fusionsproteine mit und ohne Thrombinspaltstelle sind graphisch dargestellt, die Deletionssequenz (Δ) ist angegeben.

Die beiden verkürzten Hexahistidin-Fusionsproteine (mit und ohne Thrombinspaltstelle) verhielten sich wie die Konstrukte mit vollständigem C-Terminus. Die Reinigung erfolgte ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen und die Renaturierung war nur in Gegenwart der Detergenzien Dodecylmaltosid und Dodecylphosphocholin erfolgreich. Es konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Fusionsproteinen bezüglich der Löslichkeit beobachtet werden. Mittels CD-Spektroskopie konnte kein Einfluss auf die Sekundärstruktur durch die letzten zehn Aminosäuren detektiert werden (siehe Abbildung 2.39).

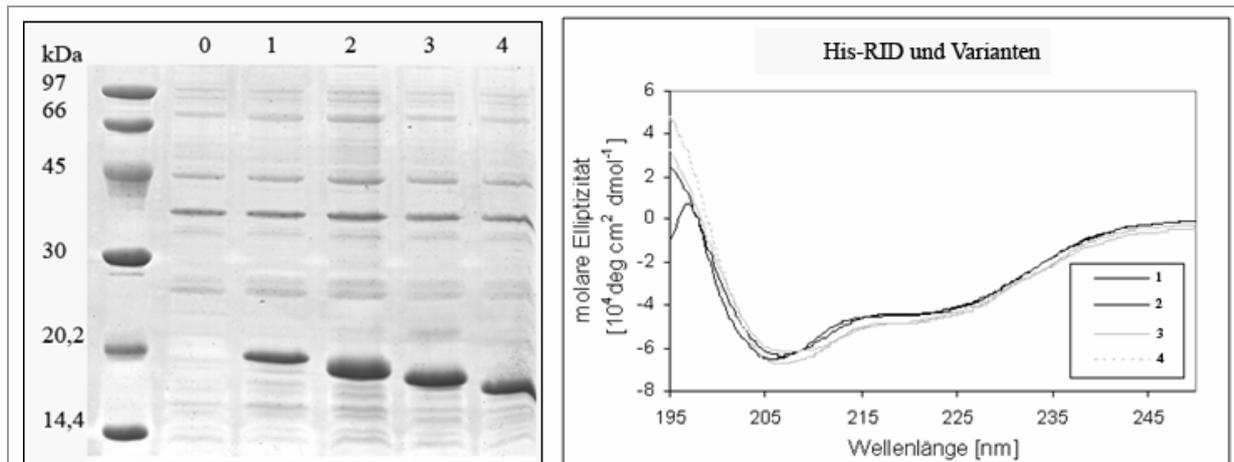


Abbildung 2.39 Charakterisierung der verkürzten His-RID Konstrukte

Die linke Abbildung (15 % SDS-PAGE, Coomassie gefärbt) zeigt die Überexpression der unterschiedlichen Konstrukte. Die rechte Abbildung zeigt die CD-Spektren der verschiedenen Fusionsproteine in Phosphatpuffer in Gegenwart von Dodecylmaltosid.

0 Proteinexpression vor Induktion; 1 His-RID_Thr; 2 His-RID(-10C)_Thr; 3 His-RID; 4 His-RID(-10C)

2.4.2 Charakterisierung der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte mit verlängerten Termini

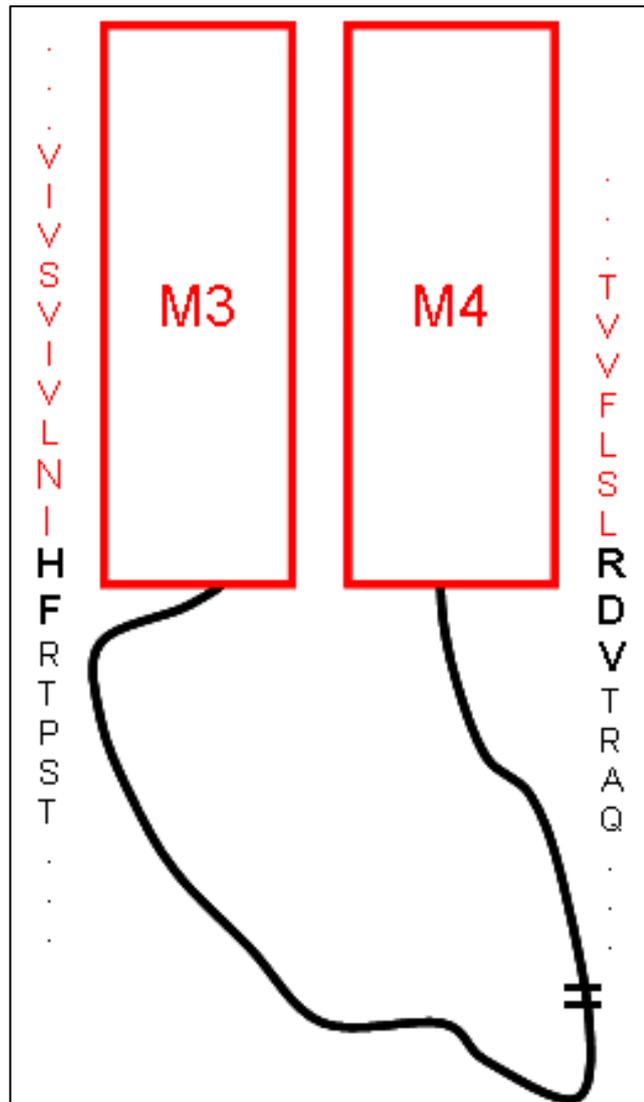
Es wurden Konstrukte der intrazellulären Domäne charakterisiert, deren Termini um Sequenzen der Transmembranhelix TM3 (N-Terminus) und TM4 (C-Terminus) des nAChR verlängert sind (siehe Abbildung 2.40). Neben dem Einfluss durch Veränderung der Länge der Termini der Domäne, ist eventuell eine Fixierung der Enden der intrazellulären Domäne ähnlich wie im Rezeptor wichtig für die Faltung der Domäne. Durch die Fixierung der Termini würden sich im entfalteten Protein weniger mögliche Konformationen ergeben als mit freien Enden. Eine korrekte Faltung der Domäne würde also dadurch begünstigt werden, dass die Unterschiede in der Entropie zwischen korrekt gefaltetem und entfaltetem Protein reduziert sind. Eine Interaktion von N- und C-Terminus könnte auf Grund der Hydrophobizität der Transmembransequenzen erfolgen. Andererseits wurde versucht die beiden Enden durch eine Inteinvermittelte Proteinligation miteinander zu verbinden (siehe Kapitel 2.1.3). Der Einfluss verlängerter Termini wurde hier ebenfalls untersucht.

Abbildung 2.40**Verlängerung von His-RID mit Bereichen der angrenzenden Membranbereiche**

Die cytoplasmatische Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte ist mit den angrenzenden Transmembranbereichen (rot) graphisch dargestellt.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden aus bioinformatischen Daten die schwarz gekennzeichneten Sequenzen als Termini der intrazellulären Domäne festgelegt und die entsprechenden Fusionsproteine danach generiert.

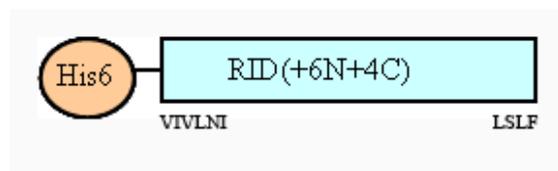
Nach Vergleichen mit den aktuellen Arbeiten von N. Unwin (2005) bilden die dick und schwarz gedruckten Aminosäurereste die Enden der Transmembranhelices.



2.4.2.1 Charakterisierung der Hexahistidin-Fusionsproteine mit verlängerten Termini

Es wurden Hexahistidin-Fusionsproteine der Domäne mit einer Verlängerung um 6 Aminosäuren am N-Terminus und 4 Aminosäuren am C-Terminus (+6N+4C) bzw. um 10 Aminosäuren am N-Terminus und 6 Aminosäuren am C-Terminus (+10N+6C) untersucht (siehe Abbildung 2.41). Die im Wildtyp vorkommenden Cysteinreste in den verlängerten Sequenzen wurden durch einen Serinrest ersetzt, indem eine entsprechende Mutation auf den PCR-Primern eingeführt wurde. Dadurch soll die Bildung unspezifischer Disulfidbrücken verhindert werden.

His-RID(+6N+4C) in pET21a:



His-RID(+10N+6C) in pET21a:

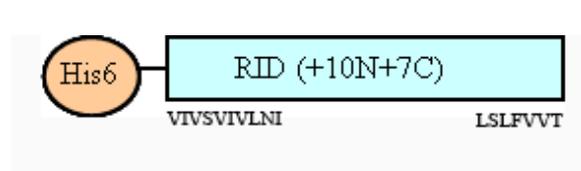


Abbildung 2.41

Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* mit verlängertem N- und C-Terminus

Es wurden Nomenklatur der Fusionsproteine und die Expressionsvektoren genannt. Die Fusionsproteine mit N-terminalem Hexahistidintag sind graphisch dargestellt. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen der Transmembranhelices, um die die Konstrukte verlängert wurden sind angegeben.

Die beiden um Bereiche der Transmembransequenzen verlängerten Hexahistidin-Fusionsproteine konnten nur deutlich geringer als das His-RID in *E. coli* Rosetta(DE3) exprimiert werden. Durch Variation der Bedingungen wurde die Expression nicht verbessert. Nach einem Zellaufschluss unter denaturierenden Bedingungen konnte an Nickelagarose eine Anreicherung von His-RID(+6N+4C) und His-RID(+10N+7C), jedoch keine ausreichende Reinigung erreicht werden. Weitere Reinigungsschritte, z.B. mittels Gelfiltration waren nicht erfolgreich, da keine Abtrennung der bakteriellen Proteine erfolgen konnte. Die Elution erfolgte hier über mehrere Fraktionen, eine Anreicherung des untersuchten Proteins konnte nicht erreicht werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

His-RID(+6N+4C) wurde analog His-RID mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose angereichert. Bei der Dialyse ohne Detergenzien konnte wie bei His-RID nur eine sehr geringe Menge in Lösung gehalten werden, die für weitere Untersuchungen nicht zur Verfügung stand. Durch Dialyse in Gegenwart von Dodecylphosphocholin wurde His-RID(+6N+4C) renaturiert. Trotz Verunreinigung mit bakteriellen Proteinen wurde ein CD-Spektrum aufgenommen. Es wurde ein sehr ähnliches CD-Spektrum im Vergleich zu His-RID (siehe Abbildung 2.29) in Gegenwart von Dodecylphosphocholin erhalten (siehe Abbildung 2.42). Das Fusionsprotein His-RID(+10N+7C) konnte nicht angereichert und charakterisiert werden.

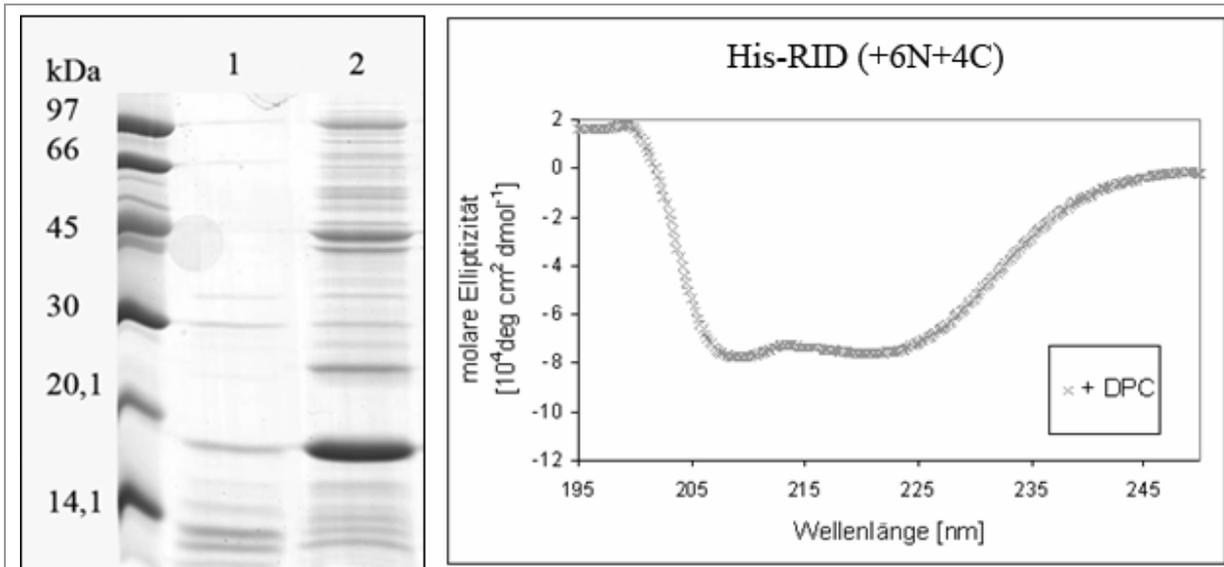


Abbildung 2.42 Charakterisierung der von His-RID(+6N+4C)

Die linke Abbildung (15 % SDS-PAGE, Coomassie gefärbt) zeigt nach Anreicherung und Renaturierung durch Dialyse von His-RID(+6N+4C).

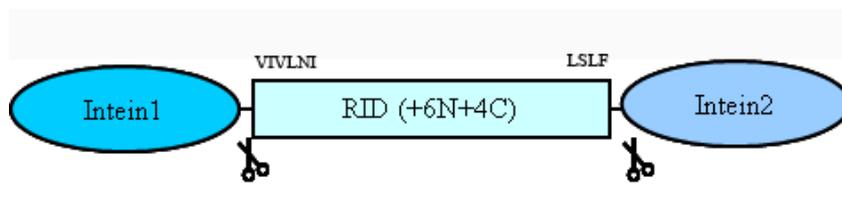
1 in Phosphatpuffer ohne Agenzien, 2 in Phosphatpuffer mit Dodecylphosphocholin (DPC)

Die rechte Abbildung zeigt das CD-Spektrum von His-RID(+6N+4C) in Phosphatpuffer mit Dodecylphosphocholin.

2.4.2.2 Charakterisierung der Intein-Fusionsproteine mit verlängerten Termini

Ein Einfluss auf die Expression der Intein-Fusionsproteine durch eine Verlängerung der Termini (+10N+7C) wurde ebenfalls untersucht (siehe Abbildung 2.41).

Intein1-RID(+6N+4C) in pTWIN1:



Intein2-RID(+6N+4C) in pTWIN2:

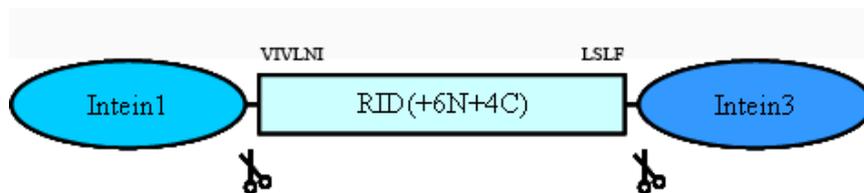


Abbildung 2.43

Intein-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Rattus norvegicus* mit verlängertem N- und C-Terminus

Es wurden Nomenklatur der Fusionsproteine und die Expressionsvektoren genannt. In der Abbildung sind die Intein-Konstrukte der intrazellulären Domäne mit Teilen der angrenzenden Transmembranhelices graphisch dargestellt und die entsprechenden Aminosäuresequenz angegeben.

Analog zu den Intein-Fusionsproteinen mit Intein1-TID, Intein1-RID und Intein2-RID konnten die verlängerten Konstrukte in *E. coli* ER2566 löslich exprimiert werden (siehe Kapitel 2.1.3). Durch die zusätzlichen Aminosäuren am N- und C-Terminus konnte keine Erhöhung der Löslichkeit festgestellt werden. Auch die Bindung an die Chitin-Agarose erfolgte nur mit geringer Affinität und die erste Inteinspaltung konnte auch nach längerer Inkubationszeit nicht erreicht werden. Durch Verlängerung um Transmembranbereiche konnte für die Intein-Fusionsproteine keine Veränderung in der Expression und Reinigung beobachtet werden.

Durch die Modifikationen der intrazellulären Domäne des nAChR durch Deletion oder Verlängerung der Termini konnte kein Einfluss auf die Löslichkeit und Faltung der untersuchten Domäne beobachtet werden. Eine Fixierung der Enden durch hydrophobe Wechselwirkungen der Transmembransequenzen bzw. Proteinligation von N- und C-Terminus der untersuchten Domäne konnte nicht erfolgen und ein Einfluss daher nicht untersucht werden.