

3 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors von *Rattus norvegicus* und *Torpedo californica* strukturell charakterisiert. Im Mittelpunkt stand die Etablierung eines geeigneten Expressionssystems für die Herstellung einer Probe für die Untersuchung der dreidimensionalen Struktur der Domäne mittels NMR-Spektroskopie. Die cytoplasmatische Domäne ist auf Grund ihrer Größe (unter 20 kDa) dieser Methode grundsätzlich zugänglich. Es könnten hierbei Prozesse wie die Phosphorylierung der Domäne oder Interaktionen mit anderen Untereinheiten in Lösung untersucht werden. Jedoch stellt die NMR-Spektroskopie hohe Anforderungen an eine Probe: Milligramm-Mengen Protein, hohe Löslichkeit (1 mM) und Stabilität unter geeigneten pH-Bedingungen ($< \text{pH } 7$) über mehrere Wochen (Bagby et al., 2001).

3.1 Wahl des Expressionssystems

Bei der Wahl des Expressionssystems muss zwischen einer Proteinexpression in einem Wirt, der die erforderlichen posttranslationalen Modifikationen gewährleistet, und einem schnellen, leicht beeinflussbaren und kosteneffektiven System entschieden werden.

Auf Grund vieler Vorteile ist *Escherichia coli* eines der meist eingesetzten Expressionssysteme für die Überexpression rekombinanter Proteine. Dieser Organismus ist leicht genetisch zu manipulieren. Die Bakterien können in einem einfachen Fermentationsprozess zu hohen Zelldichten wachsen, wobei durch variable Wachstumsbedingungen eine verbesserte Expression erzielt werden kann. Eine breite Auswahl an Expressionsvektoren mit starken, induzierbaren Promotoren ist verfügbar, wovon viele für die Produktion unterschiedlicher Fusionsproteine optimiert sind. Für die rekombinante Expression der intrazellulären Domäne des nAChR wurde *E. coli* als bevorzugtes Expressionssystem gewählt. Dabei mussten auf dem Weg der Herstellung einer geeigneten Probe für die strukturelle Charakterisierung zahlreiche Hürden genommen werden, wie im Folgenden detaillierter erörtert wird.

Zusätzlich wurde die Expression in eukaryotischen Organismen durchgeführt. Wenn die Synthese rekombinanter Proteine ohne Modifizierung oder korrekte Faltung in Mikroorganismen nicht möglich ist, muss auf höhere, eukaryotische Expressionswirte ausgewichen werden. Ein elegantes System ist der Einsatz von Baculoviren für die Expression in Insektenzellen, wo eine relativ starke Expression und die meisten eukaryotischen posttranslationalen Modifikationen kombiniert werden (Jones und Morikawa,

1996, Richardson, 1995). Die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR in Sf9-Insektenzellen durch Baculovirusinfektion und direkte Transfektion wurden vor dieser Arbeit in unserem Labor durchgeführt (Toepfer, 2002). Hierbei wurde beobachtet, dass die Expression des Proteins toxisch wirkt, was sich in Aggregationen des Proteins (beobachtet durch indirekte Immunfluoreszenz) und schnellem Absterben der Zellen zeigte. Eine Isolierung des Proteins konnte nicht in einem Maßstab erreicht werden, der für eine biophysikalische Charakterisierung ausreichend ist.

Kultivierte Säugetierzellen spielen eine wichtige Rolle für die Produktion rekombinanter Glykoproteine oder bei der Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen (Geisse et al., 1996). Das genetische Material kann durch Virusinfektion oder direkten DNA-Transfer in solche Zellen eingeschleust werden. Extrachromosomale Elemente werden auf Grund der genetischen Instabilität nur transient exprimiert, was in einer geringen Proteinexpression resultiert. In dieser Arbeit wurde die cytoplasmatische Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von Ratte als Hexahistidin-Fusionsprotein in HEK293 und CHO-K1 Zellen exprimiert. Hierbei konnten, wie in den Sf9 Insektenzellen, Proteinaggregate beobachtet werden, die zum Absterben der Zellen führen. Eine Isolierung des Proteins war aus diesen Gründen nicht möglich.

Mit diesen Ergebnissen ist eindeutig gezeigt worden, dass Expressionssysteme höherer Organismen sich nicht für eine Isolierung der intrazellulären Domäne des nAChR eignen. Dies ist vor allem in der toxischen Wirkung des Proteins begründet. Auch im prokaryotischen Expressionswirt *Escherichia coli* wirkt das exprimierte Rezeptorfragment auf die Zellen toxisch. Die Bakterien reagieren darauf mit der Bildung von *inclusion bodies*. Dieses Phänomen ist, wie später beschrieben wird, bei der Proteinisolierung jedoch handhabbar.

3.2 Expression in *Escherichia coli*

Nachdem für die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR, also einem eukaryotischen Protein, ein prokaryotisches System gewählt wurde, dürfen folgende Punkte nicht außer Acht gelassen werden.

3.2.1 Die Häufigkeit der verwendeten Aminosäure-Codons ist Organismus-spezifisch

Die Codon-Präferenz des zu exprimierenden Gens sollte analysiert werden, denn in jedem Organismus werden die 61 Aminosäure-Codons mit unterschiedlicher Häufigkeit verwendet. Die Codonhäufigkeit korreliert mit der Anzahl der entsprechenden tRNAs, d.h. für seltene Codons liegen nur wenige tRNAs vor (Dong et al., 1996). Dies beeinflusst entscheidend die

Translationseffizienz (Kane, 1995). In *E. coli* wird Arginin beispielsweise nur selten durch die die Codons AGA und AGG verschlüsselt. Eine einfache Lösung dieses Problems ist die Coexpression der seltenen tRNAs mit dem Zielprotein (Rosenberg et al, 1993). Verschiedene kommerziell erhältliche Bakterienstämme enthalten Plasmide, die für seltene *E. coli* tRNAs codieren. In dieser Arbeit wurden die Stämme *E. coli* Rosetta (DE3) und BL21(DE3) Codon⁺ verwendet. Bei der Isolierung der Hexahistidin-Fusionsproteine konnte eine etwa 30 % höhere Ausbeute erreicht werden, wenn die Fusionsproteine in Rosetta(DE3) anstatt in BL21(DE3) exprimiert wurden.

3.2.2 Die Wahl des Promotors ist entscheidend

Die Wahl des Promotors muss dem Wirtsorganismus angepasst werden, sie korreliert mit der Menge an exprimiertem Protein. Die Verwendung eines für den Expressionswirt idealen Promotors (= starker Promotor) kann in einer Anreicherung des exprimierten Proteins bis zu 30% der Gesamtproteinkonzentration resultieren. Promotoren, die nicht optimal ans Transkriptionssystem des Expressionswirtes angepasst sind (=schwacher Promotor), werden für eine verminderte Proteinexpression verwendet, wenn damit unerwünschte Nebenwirkungen, wie z. B. die Bildung von Proteinaggregaten, verhindert werden können.

Die in dieser Arbeit gewählten pASK-IBA Vektoren besitzen einen schwachen, regulierbaren Tet-Promotor. Die Expression der Strep-Fusionsproteine unter Kontrolle des Tet-Promotors erfolgte nur in sehr geringer Menge und die Proteine konnten nur als unlösliche *inclusion bodies* gewonnen werden. Eine Umklonierung in den Vektor pET28a und eine Expression unter Kontrolle des sehr starken T7 Promotors brachte keine Erhöhung der Ausbeute. Die Effizienz der Expression von Strep-Fusionsproteinen kann stark von der Faltung und Stabilität des Zielproteins abhängen (Skerra, 1994; Degenkolb et al., 1991). Der Grund für die niedrige Expression ist auf der Proteinebene zu suchen und resultiert vermutlich aus einer Kombination aus Instabilität durch proteolytischen Abbau und einer toxischen Wirkung des Proteins auf den Wirtsorganismus.

In dieser Arbeit wurden unter der Kontrolle des T7 Promotors viele Fusionsproteine der intrazellulären Domäne erfolgreich exprimiert, vor allem in verschiedenen pET-Vektoren (Novagen). pET-Vektoren (plasmid expression by *T7-RNA-Polymerase*) basieren auf dem T7-Expressionssystem, das sich durch eine sehr hohe Transkriptionseffizienz auszeichnet. Das System stammt aus dem Bakteriophagen T7, der durch seine starken Promotoren, die von der Phageneigenen T7-RNA-Polymerase erkannt werden, erfolgreich mit der Transkriptionsmaschinerie des Wirtes in Konkurrenz tritt (Studie et al., 1990; Dubendorff und

Studier, 1991). Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) eignet sich besonders für die Expression rekombinanter Proteine in pET-Systemen. Unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors wird die T7-RNA-Polymerase nach IPTG-Zugabe exprimiert und anschließend die unter der Kontrolle des T7-Promotors liegenden Gene transkribiert (Studier und Moffatt, 1986). Allerdings ist zu beachten, dass auch in Abwesenheit von IPTG eine Basisexpression der T7-RNA-Polymerase stattfindet und eine Expression des Zielproteins erfolgen kann. Wenn ein Protein untersucht werden soll, das toxisch auf den Wirt wirkt oder leicht von Proteasen angegriffen wird, ist ein stark regulierbarer Promotor, bei dem sich die Transkription vollständig reprimieren lässt, unverzichtbar. Für die löslich exprimierten GST- und MBP-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR konnte eindeutig beobachtet werden, dass schon vor Induktion mit IPTG das Zielprotein im Cytoplasma akkumuliert und durch Proteasen wieder abgebaut wird. Die Gegenwart des Plasmids pREP4 erlaubt die Coexpression eines Repressors, der die Expression vor der Induktion verhindert (Austin et al., 2004, Littlejohn et al., 2000). Die Bakterien können ungehindert zu einer hohen Zelldichte kultiviert werden, um dann das Zielprotein erst dann in einem kurzen Zeitraum durch IPTG-Induktion zu exprimieren. Dadurch erhält man eine hohe Gesamtproteinmenge, ohne dass das Zielprotein in den einzelnen Zellen zu sehr angereichert wird. Es kann so die toxische Wirkung des untersuchten Proteins auf den Wirtsorganismus vermindert bzw. der proteolytische Abbau des untersuchten Proteins eingeschränkt werden.

3.2.3 Die Akkumulation von überexprimierten Proteinen in *inclusion bodies*

Oft kommt es bei der Überexpression rekombinanter Proteine im Cytoplasma oder Periplasma von Bakterien zur Aggregation des Zielproteins und zur Bildung von *inclusion bodies*. Dies kann verhindert werden, indem die Gesamtexpression verringert wird, lösliche Proteine als Fusion mit dem Zielprotein exprimiert werden oder die korrekte Faltung des Proteins durch Coexpression mit Chaperonen, unterstützt wird. In mehreren Arbeiten wurde eine Senkung der Expressionstemperatur zur Reduzierung der *in vivo* Aggregation rekombinanter Proteine beschrieben (Schein, 1991; Strandberg und Enfors, 1991). Für alle in dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR wurde der Einfluss der Expressionstemperatur auf die Löslichkeit untersucht. Dabei wurde bei niedriger Temperatur nur eine Verringerung der Gesamtexpression, nicht aber eine Erhöhung des Anteils an löslichem Protein beobachtet.

Generell beruhen die meisten Methoden zur Reduzierung von *inclusion bodies* auf einer Reduzierung der Konzentration des rekombinanten Proteins. Eine Verringerung der

Induktorkonzentration resultiert in geringerer Expression des Zielproteins in einer Zelle, wodurch die Aggregationswahrscheinlichkeit sinkt. Dies wiederum kann zu einem erhöhten Anteil an löslichem Protein führen (Weickert et al., 1996). Bei Induktion der Expression der Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR mit geringeren Konzentrationen an IPTG (100 μ M und 10 μ M) konnte wie bei der Senkung der Expressionstemperatur nur die Gesamtexpression verringert, nicht aber die Löslichkeit erhöht werden.

Der Zellstamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS exprimiert geringe Mengen T7 Lysozym. T7 Lysozym ist ein bifunktionelles Enzym, welches erstens spezifische Bindungen in der Peptidoglycanschicht in der Zellwand spaltet (Inouye et al., 1973) und so den Zellaufschluss erleichtert. Zweitens bindet es die T7 RNA Polymerase und inhibiert so die Transkription des Zielproteins (Mofatt und Studier, 1987; Studier, 1991). Bei Testexpressionen im Zellstamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS konnte keines der untersuchten Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR exprimiert werden. Somit ließ sich die Expression des Zielproteins nicht beliebig verringern, um lösliches Protein zu erhalten.

Die Gegenwart von Ethanol (Nygaard und Haarlow, 2001) oder von Osmolyten (Blackwell et al., 1991) im Nährmedium verringert ebenfalls das Wachstum der Bakterien und somit auch die Expression. Für die Hexahistidin-Fusionsproteine wurden zahlreiche Variationen der Expressionsbedingungen durchgeführt. Lediglich unter osmotischem Stress in Nährmedium mit Sorbitol und Betain konnten geringe Mengen lösliches Hexahistidin-Fusionsprotein erhalten werden. Es wurde deutlich, dass eine lösliche Expression der intrazellulären Domäne des nAChR nur durch Fusion mit einem gut löslichen Protein erreicht werden kann oder dass eine Rückfaltung aus *inclusion bodies* notwendig ist.

3.3 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen

Grundsätzlich unterscheidet sich die Reinigung rekombinanter Proteine nicht von der Isolierung von Proteinen aus einer natürlichen Quelle. Die rekombinante DNA-Technologie kann jedoch durch die Veränderung des Startmaterials die Reinigungsprozedur vereinfachen. Bedeutend dabei ist die bakterielle Überexpression des Zielproteins. So kann der Rohextrakt einer Bakterienanzucht bis zu 50 % des untersuchten Proteins enthalten (Gold, 1990). Der zweite große Vorteil der rekombinanten Proteinherstellung ist die Expression von Fusionsproteinen mit Affinitätstags für eine effektive Reinigung.

Einerseits nutzt man kleine Peptidtags, die nicht mit dem Zielprotein interagieren sollten, z.B. das Hexahistidinpeptid. Die Fusion mit großen Peptiden oder Proteinen, z.B. dem Maltosebindeprotein MBP kann zusätzlich die Löslichkeit und Stabilität des

Expressionsprodukts erhöhen. Jedoch ist später eine Abspaltung des Fusionspartners notwendig (Terpe, 2003).

Die intrazelluläre Domäne des nAChR wurde zunächst in Form unterschiedlicher Fusionsproteine untersucht. Mit einem kurzen Affinitätsanhang erfolgte die Expression ausschließlich in unlöslichen *inclusion bodies*. Für die Hexahistidin-Fusionsproteine konnte ein Protokoll für die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgen. Alternativ wurde eine lösliche Expression der intrazellulären Domäne des nAChR durch Fusion mit den löslichen Proteinen Glutathion-S-Transferase GST, Maltose-Bindeprotein MBP und SUMO (*small ubiquitin modifier*)-Protein erreicht.

3.3.1 Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR erlauben die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Rekombinante Proteine mit Polyhistidinresten können mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (Porath et al., 1975) gereinigt werden. Dabei steht der Affinitätsanhang mit 6 Histidinen (Hexahistidintag) im Vordergrund, da er mit hoher Effizienz in nativen Niedrig- oder Hochsalzpuffern, aber auch unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt werden kann (Hochuli et al., 1990). Die Elution erfolgt durch pH-Änderung oder mit steigenden Imidazolkonzentrationen (Hefti, 2001).

In dieser Arbeit wurde die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR als Hexahistidin-Fusionsprotein durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die Effektivität der Reinigung an Nickelagarose stark vom Ausgangsmaterial abhängt. Ist der Anteil an Fusionsprotein im Rohextrakt zu gering, sind nach der Metallaffinitätssäule weitere Reinigungsschritte notwendig, da die Kontamination mit bakteriellen Proteinen zu groß ist. Die Lösung der hier untersuchten Hexahistidin-Fusionsproteine war für weitere Reinigungsschritte unter nativen Bedingungen zu instabil. Daher konnte unter nativen Bedingungen (Expression nach Blackwell) keine Reinigung erfolgen. Es wurde unter nativen Bedingungen eine schwache Affinität des Hexahistidin-Fusionsproteins zur Nickelagarose deutlich, vermutlich war der Hexahistidintag nicht vollständig zugänglich. Dies kann durch die Ausbildung der Tertiärstruktur der Rezeptordomäne möglich sein. Wahrscheinlicher ist aber, dass eine Aggregatbildung die Zugänglichkeit des Affinitätstags beeinflusst. Durch die schwache Affinität konnte die Reinigung durch stringenteren Waschbedingungen nicht verbessert werden. Ein deutlicher Vorteil ist dagegen die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen, da die Zugänglichkeit des Hexahistidintags vollständig und somit eine hohe Affinität an die Nickelagarose gewährleistet ist. Zusätzlich ist der Anteil an Fusionsprotein im

Rohextrakt unter denaturierenden Bedingungen deutlich höher (bis zu 50%), was die Reinigungseffizienz deutlich verbessert. Dieser Effekt ist vor allem bei den schwach exprimierten Fusionsproteinen His-RID(+6N+4C) und His-RID(+10N+7C) beobachtbar, wo der Anteil an Fusionsprotein im Rohextrakt unter 10 % lag und eine Reinigung in einem Schritt mittels Affinitätschromatographie an Nickelagarose nicht erreicht werden konnte.

3.3.2 Fusion der intrazellulären Domäne des nAChR mit GST, MBP und SUMO

erhöhen die Löslichkeit

Eine Fusion mit dem 26-kDa Glutathion-S-Transferase Protein erlaubt eine effektive Reinigung mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion. Die Elution erfolgt mit reduziertem Glutathion unter nicht-denaturierenden Bedingungen (Smith und Johnson, 1988). GST kann helfen die Löslichkeit zu erhöhen, das Zielprotein gegen intrazelluläre Proteasen zu schützen und zu stabilisieren (Frangioni und Neel, 1993, Nygren et al., 1994). Eine verringerte Löslichkeit von GST-Fusionsproteinen wurde bei hydrophoben Regionen oder geladenen Resten im Fusionspartner oder bei einer Gesamtgröße von über 100 kDa beobachtet (Ghosh et al., 1995).

Die N-terminale Fusion von GST an die intrazelluläre Domäne des nAChR erlaubte die Expression von löslichem Fusionsprotein. Diese GST-Fusionsproteine zeigten allerdings besondere Anfälligkeit für einen proteolytischen Abbau, was teilweise schon während der Expression beobachtet werden konnte. Durch Zellanzucht in Gegenwart eines Transkriptionsrepressors und erhebliche Verkürzung der Expressionsdauer konnte ein proteolytischer Abbau des Zielproteins vermindert werden. Grundsätzlich ist bei der Reinigung von GST-Fusionsproteinen die Affinität an die GST-Sepharose höher als von Hexahistidin-Fusionsproteinen an Nickelagarose. Oft reicht hier ein Reinigungsschritt mittels Affinitätschromatographie aus, um 90% reines GST-Fusionsprotein zu erhalten, auch wenn im Rohextrakt die Konzentration des Fusionsproteins gering ist. Dies war hier essentiell, da auf Grund der kurzen Expressionsdauer nur wenig GST-Fusionsprotein synthetisiert wurde und der Anteil an der Gesamtproteinexpression gering war.

Das 40 kDa große Maltose-Bindungsprotein (MBP) kann die Löslichkeit von in *E. coli* überexprimierten Fusionsproteinen, besonders von eukaryotischen Proteinen, erhöhen (Sachdev und Chirgwin, 1999). Die verbesserte Löslichkeit wird vor allem beobachtet, wenn MBP an den N-Terminus des untersuchten Proteins fusioniert wurde (Sachdev und Chirgwin, 1998). Verschiedene MBP-Fusionsproteine mit der intrazellulären Domäne des nAChR wurden in dieser Arbeit erfolgreich exprimiert. Die Reinigung an Amylose führte zu

löslichem, reinem Fusionsprotein mit einer Konzentration von 3 mg/ml, allerdings in Gegenwart sehr vieler Abbauprodukte. Vermutlich handelt es sich bei dem angereicherten Fusionsprotein um ein Produkt, bei dem zwar der MBP-Affinitätsanhang korrekt gefaltet ist, das fusionierte Zielprotein sich jedoch in einem entfalteten Zustand befindet und nur durch die Bindung an MBP in Lösung gehalten werden kann (Kapust und Waugh, 1999). So liegt das Zielprotein in einer Konformation vor in der es leicht von Proteasen angegriffen werden kann.

Das SUMO-Protein wurde in dieser Arbeit als Fusionsprotein der intrazellulären Domäne des nAChR mit erhöhter Löslichkeit untersucht (Malakhov et al., 2004). Für eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie wurde das Fusionsprotein N-terminal mit einem Hexahistidintag versehen. Die SUMO-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne konnten löslich exprimiert und die Reinigung unter nativen Bedingungen erfolgen. Es wurde ein spezifisches Abbauprodukt (SUMO-Protein mit 30 N-terminalen Aminosäureresten der intrazellulären Domäne des nAChR) beobachtet. Dieses konnte jedoch durch unterschiedliche Imidazolkonzentrationen vom SUMO-Fusionsprotein getrennt eluiert werden. Die unterschiedliche Affinität wird hier allerdings nicht durch die Zugänglichkeit des Hexahistidintags begründet, sondern durch eine ungewünschte Interaktion der intrazellulären Domäne des nAChR mit dem Säulenmaterial, was auch in anderen Experimenten beobachtet wurde. Eine Instabilität des SUMO-Fusionsproteins in Lösung wurde beobachtet, da nach längerer Inkubation in Lösung das spezifische Abbauprodukt wieder entstand. Auch wenn erste Tests zeigen, dass der Abbau in Gegenwart nicht-denaturierender Detergenzien (Dodecylmaltosid, Triton X-100) verhindert wird, konnten stabilisierende Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr etabliert werden. Im Vergleich zu den Fusionsproteinen mit GST und MBP, die kontinuierlich durch Proteasen abgebaut wurden, eignet sich das SUMO-System zur löslichen Expression und Isolierung eines relativ Protease-resistenten Fusionsproteins der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR.

3.4 Abspaltung des Affinitätstags in Fusionsproteinen

Wie in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden konnte, ist eine lösliche Expression der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR nur durch Fusion mit einem gut löslichen Partner möglich. Diese Proteine sind jedoch in der Regel sehr groß und könnten die nur 16 kDa große zu untersuchende Acetylcholinrezeptordomäne in Struktur und Funktion beeinflussen. Zudem war das Ziel eine NMR-spektroskopische Untersuchung in Lösung, für die eine Größenbeschränkung besteht. Da aber auch kleine Fusionspartner wie der

Hexahistidintag das Zielprotein beeinflussen können (Araujo et al., 2000), wurde hier auch versucht, eine Spaltung durchzuführen.

Chemische Spaltungsmethoden unterliegen in der Regel rauen Reaktionsbedingungen und können zu Proteindenaturierung oder Seitenkettenmodifizierungen des Zielproteins führen. Zusätzlich sind sie meist sehr unspezifisch und können in ungewollte Spaltungen im untersuchten Protein resultieren (Carter, 1990). Enzymatische Methoden werden aus diesen Gründen bevorzugt, da die Spaltung in der Regel spezifischer ist und unter milderen Bedingungen erfolgen kann (Forsberg et al., 1992).

Die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR wurde in unterschiedlichen Fusionsproteinen untersucht, in denen auch die Spaltstelle für die Entfernung des Fusionspartners variiert wurde.

3.4.1 Aminosäuresequenz-spezifische Proteasen

Die optimale Spaltstelle für Thrombin hat die Sequenz X4-X3-P-R[K]-X1-X2, wobei X4 und X3 hydrophobe Aminosäuren und X1 und X2 nicht-saure Aminosäuren sind (Chang 1985). Der in dieser Arbeit verwendete Expressionsvektor (pET28a) enthält die ideale Spaltsequenz LVPRGS für die Entfernung des Hexahistidintags. Eine sehr ähnliche Sequenz (GPRAL) wurde im Protein der cytoplasmatischen Domäne der δ -Untereinheit des nAChR aus Ratte identifiziert, da nach Spaltung mit Thrombin zwei Spaltprodukte entstanden sind. Dieses Beispiel zeigt die Problematik der Unspezifität dieser Protease, denn aus vorherigen Sequenzvergleichen war diese Spaltung unerwartet (Keil, 1992). Die cytoplasmatische Domäne mit abgespaltenen Hexahistidintag bzw. das unspezifisch gespaltene Produkt (Aminosäure 60-155), zeigten keine erhöhte Löslichkeit, d.h. sie konnten nur in Gegenwart von Harnstoff von der Säule eluiert werden. Ein negativer Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins durch den Histidintag konnte dadurch ausgeschlossen werden und somit wurden die weiteren Experimente mit dem ungespaltenen Hexahistidin-Fusionsprotein durchgeführt.

Zur Entfernung von GST wurde die Sequenz-spezifische Protease Faktor Xa eingesetzt, deren Spaltstelle auf dem verwendeten Expressionsvektor pGEX-5X-1 mit der Sequenz IEGR-X1 (X1 = jede beliebige Aminosäure außer Arginin und Prolin, hier Glycin) codiert ist (Nagai und Thorgeron, 1984). Die Abspaltung des GST vom GST-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne des nAChR erfolgte wie vorhergesagt nach dem Arginin in der Spaltsequenz. Allerdings konnte die intrazelluläre Domäne anschließend nicht isoliert in Lösung detektiert werden. Vermutlich kam es zu einem unspezifischen proteolytischen Abbau des Konstruktes, da das Zielprotein auch nicht als Aggregat identifiziert werden konnte.

Die gleiche Beobachtung wurde auch bei der Entfernung des MBP von den Fusionsproteinen der intrazellulären Domäne des nAChR durch die Protease Faktor Xa gemacht. Zahlreiche Arbeiten beschreiben die unspezifische Spaltung mit Thrombin und Faktor Xa (Jenny et al., 2003, Ko et al., 1994), wobei in einigen Fällen eine basische Aminosäure in der Primärstruktur des Proteins für die Spaltung ausreichte (Lonsdale-Eccles et al., 1980).

Um weitere Aminosäuresequenz-spezifische Proteasen zu testen, wurden MBP-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR mit Spaltstellen für Enterokinase mit der Sequenz DDDDK (Collins-Racie et al., 1995) und GenenaseI mit der Sequenz PGAAHY (Carter und Wells, 1987), isoliert. Aber auch für diese Proteasen ist beschrieben, dass sie, abhängig von den Spaltbedingungen und der Konformation des Zielproteins, unspezifisch spalten (Choi et al., 2001, Carter et al., 1991). In dieser Arbeit war der Einsatz dieser Sequenz-spezifischen Proteasen ebenfalls erfolglos. Nach Abspaltung von MBP konnte die isolierte intrazelluläre Domäne nicht identifiziert werden.

Die Entfernung eines Fusionspartners der intrazellulären Domäne des nAChR mit Aminosäuresequenz-spezifischen Proteasen war nicht erfolgreich. Die geringe Spezifität der Protease wurde von allem durch die Instabilität der GST- und MBP-Fusionsproteine in Lösung unterstützt. Es musste nach Alternativen gesucht werden, welche die Entfernung eines Fusionspartners erlauben.

3.4.2 Selbstspaltende Inteine

Es wurden verschiedene Inteinkonstrukte exprimiert und durch Bindung an Chitinmatrix isoliert. Die Spaltung erfolgt hier durch ein inteinvermitteltes Proteinsplicing (siehe Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dabei ist vor allem die Aminosäuresequenz entscheidend. Beeinflusst wird die Spaltung durch die C- und N-terminalen Aminosäuren des untersuchten Proteins (Xu et al., 2000). Für die Intein-Fusionsproteine mit der intrazellulären Domäne wurde die erste Inteinspaltung nicht erreicht. Neben der Variation der Spaltbedingungen wurde ein besonderes Augenmerk dabei auf die Aminosäuren des Zielproteins gelegt, die an der Inteinspaltung beteiligt sind. Nach den Erfahrungen aus anderen Arbeiten, zusammengefasst in David et al. (2004), erschwert ein Prolin am N-Terminus des Zielproteins die Spaltung. Bei den Varianten der intrazellulären Domäne des nAChR befinden sich jedoch andere Aminosäuren am N-Terminus. Die fehlende Spaltung liegt vermutlich an einer Aggregation der Intein-Fusionsproteine. Es konnte beobachtet werden, dass die Fusionsproteine nicht über einen längeren Zeitraum für die Spaltungsreaktion inkubiert werden können. So kann vermutet werden, dass die Intein-

Fusionsproteine in Lösung aggregieren und der beschriebene Spaltungsmechanismus, in dem die beiden Inteinspaltstellen miteinander interagieren müssen, nicht funktioniert. Bei der weiteren Aggregation kommt es zur Präzipitation des Proteins, wodurch es nicht mehr detektiert werden kann.

Der Spaltmechanismus im Rahmen dieser Arbeit war nur mit dem Referenzprotein Intein-MBP erfolgreich. Es wurde hierbei deutlich, dass eine Spaltung nur bei hoher Proteinkonzentration beobachtet werden konnte.

Die Inteinspaltung ist eine Alternative zu den Aminosäuresequenz-spezifischen Proteasen, es sind jedoch gut lösliche, monomere Fusionsproteine notwendig, um die Spaltung zu ermöglichen. Sie ist also von der Löslichkeit des untersuchten Proteins abhängig und war für die Isolierung der intrazellulären Domäne des nAChR nicht anwendbar.

3.4.3 Tertiärstruktur-spezifische Proteasen

Eine weitere Alternative zur Entfernung des Fusionspartners sind Proteasen, die nicht Aminosäure-spezifisch spalten. Die SUMO1-Protease ist eine Cystein-Protease, die die Sekundärstruktur von SUMO erkennt und es abspaltet. Zusätzlich ist die Protease sehr widerstandsfähig, da sie zwischen 4°C und 37°C über einen breiten pH Bereich (5,5-10,5) und auch in Gegenwart von 2M Harnstoff aktiv ist (Malakhov et al., 2004). Die Entfernung des SUMO-Proteins von den SUMO-Fusionsproteinen der intrazellulären Domäne des nAChR mit der SUMO-Protease konnte erfolgreich durchgeführt werden. Nach der Spaltung ist die intrazelluläre Domäne des nAChR in Lösung zu identifizieren, was sich deutlich von der Spaltung mit den klassischen Sequenz-spezifischen Proteasen unterscheidet.

Eine nachfolgende Charakterisierung der intrazellulären Domäne des nAChR war jedoch aus folgenden Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich: Nach der Spaltung befanden sich in der Lösung noch ungespaltenes Fusionsprotein, das spezifische Abbauprodukt und die SUMO-Protease, die alle einen N-terminalen Hexahistidintag tragen. Eine weitere Reinigung mittels Affinitätschromatographie an Nickelagarose war nicht erfolgreich, da die intrazelluläre Domäne des nAChR unspezifisch an die Matrix bindet und unter nativen Bedingungen nicht wieder zu eluieren war. Weitere Reinigungsversuche spiegeln eine ähnlich hohe Instabilität der Lösung wie bei den renaturierten Hexahistidin-Fusionsproteinen wieder. Ein vollständiges Reinigungsprotokoll für die Aufarbeitung der SUMO-Fusionsproteine konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen. Es wurde jedoch deutlich, dass stabilisierende nicht-ionische Detergenzien notwendig sind, um die Domäne zu charakterisieren.

3.5 Rückfaltung rekombinanter Proteine

Die Akkumulation hoher Mengen von inaktivem Protein in der Wirtszelle führt zur Bildung von dichten, granulären Strukturen als intrazelluläre Einschlusskörper. Diese so genannten *inclusion bodies* lassen sich nur durch hohe Konzentrationen an Harnstoff, Guanidiumhydrochlorid (GuHCl) und starke ionische Detergenzien wie SDS oder N-Lauroylsarcosine solubilisieren. Harnstoff und GuHCl führt zu flexiblen und ungeordneten Proteinstrukturen, während die durch Detergenzien solubilisierten Proteine meist nicht komplett denaturiert sind und teilweise geordnete Strukturen aufweisen (Takagi et al., 1979; Gierasch et al., 1982).

Die in *inclusion bodies* exprimierten Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR konnten mit hoher Ausbeute in 8M Harnstoff gelöst und gereinigt werden. Aber auch die Solubilisierung mit SDS oder N-Lauroylsarcosine der Hexahistidin-Fusionsproteine aus *inclusion bodies* konnte im Rahmen dieser Arbeit erreicht werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Allerdings waren für die nachfolgende Bindung der Fusionsproteine an Nickelagarose weitere Detergenzien für die Bildung von Mischmizellen notwendig (Fragioni und Neel, 1992). Durch die geringe, und für ionische Detergenzien von der Zusammensetzung des verwendeten Puffers abhängige kritische Mizellenkonzentration (cmc), konnte für ein nachfolgendes Rückfaltungsprotokoll eine vollständige Entfernung des Detergenz nicht garantiert werden. Auch die Solubilisierung mit GuHCl war erfolgreich, allerdings wurde eine schlechte Bindung an Nickelagarose beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt), was zu Verlusten während der Proteinanreicherung führte. Somit wurde die Solubilisierung in Gegenwart von Harnstoff durchgeführt.

Eine nachfolgende Rückfaltung durch die Entfernung des Denaturierungsmittels war notwendig. Die Proteine in Gegenwart von Harnstoff sind hoch flexibel und ungeordnet. Eine Rückfaltung bedeutet also einen Wechsel der Proteinkonformation in eine kompakte, gefaltete Form. Dieser Übergang muss so erfolgen, dass Fehlfaltung und Aggregation des Proteins verhindert werden (Kiefhaber et al., 1991). Dafür sollte die Konzentration des Denaturierungsmittels so vorliegen, dass sie gering genug ist, um das untersuchte Protein so flexibel in Lösung zu halten und die Organisation seiner Strukturen zu erlauben, bis es in seine native Konformation einnimmt (Tsumoto et al., 2003). Für die Entfernung des Denaturierungsmittels gibt es mehrere experimentelle Ansätze, die für die Rückfaltung der Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne angewendet wurden.

Das Hexahistidin-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne des nAChR von *Torpedo* konnte durch Gelfiltration und Dialyse rückgefaltet werden, während für die Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte die Gegenwart von nicht-ionischen Detergenzien essentiell war.

3.5.1 Rückfaltung durch Dialyse

Die Dialyse ist die klassische Methode, um durch einen Pufferaustausch das Denaturierungsmittel zu entfernen. Dabei unterscheidet man die direkte Dialyse in einen harnstofffreien Puffer oder die schrittweise durchgeführte Dialyse, wobei die im Puffer vorhandene Konzentration des Denaturierungsmittels Schritt für Schritt gesenkt wird (Kumagai et al., 1998; Tsumoto et al., 1998). Erfolgreich ist diese Methode nur, wenn die Rate der Fehlfaltung oder Aggregation langsamer ist als die Rate der korrekten Rückfaltung. Um die Aggregationswahrscheinlichkeit möglichst gering zu halten, sollte die Rückfaltung bei Proteinkonzentrationen von 10-100 µg/ml durchgeführt werden (Lilie et al., 1998). Das Hexahistidin-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne des nAChR von *Torpedo* konnte durch direkte Dialyse renaturiert werden, allerdings präzipitierte während der Rückfaltung etwa 90 % des Fusionsproteins unabhängig von der Ausgangsproteinkonzentration. Die Renaturierung bei geringen Konzentrationen (unter 1 mg/ml der harnstoffhaltigen Probe) erwies sich als problematisch, da nachfolgende Konzentrierungsversuche scheiterten. Die Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR zeigten ungewollte Interaktionen mit sämtlichen Säulenmaterialien, wodurch eine Anreicherung durch nachfolgende Affinitätschromatographie und Gelfiltration nicht durchgeführt werden konnte. Auch eine Konzentrierung auf Microcon-Filtern war nicht möglich, da das Protein auf der Membran präzipitierte.

Die Dialyse des in Harnstoff solubilisierten Hexahistidin-Fusionsproteins der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte führte zur vollständigen Präzipitation des Proteins. Die schrittweise durchgeführte Dialyse wurde auch in mehreren Variationen in Dialysedauer und Konzentration des Denaturierungsmittels im Puffer durchgeführt. In Gegenwart von weniger als 2 M Harnstoff wurde die vollständige (His-RID) oder nahezu vollständige (~90%), (His-TID) Proteinpräzipitation beobachtet.

3.5.2 Rückfaltung durch Gelfiltration

Eine kontinuierliche Entfernung des Denaturierungsmittels ähnlich wie bei der Dialyse führt zum Pufferaustausch (Gu et al., 2001). Die Rückfaltung von His-TID konnte auch durch

Gelfiltration erreicht werden. Allerdings wurde eine geringere Konzentration (0,1 mg/ml) des Fusionsproteins als durch Dialyse erreicht und zusätzlich eine hohe Instabilität der Lösung beobachtet. Vermutlich erfolgte die Entfernung des Harnstoffs zu schnell. Eine Interaktion des Proteins mit der Matrix, die hier ebenfalls auf Grund des Elutionsverhaltens vermutet wird, erfolgt über Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen. Dies wurde unterstützend für die Rückfaltung beobachtet (Ejima et al., 1999), da die beschriebenen Interaktionen so nicht unter den Proteinmolekülen zu Fehlfaltung und Aggregation führen. Die Renaturierung von His-RID konnte auch durch Gelfiltration nicht erreicht werden. Auf dem gleichen Prinzip beruht die Methode der Entsalzungssäule, wobei hier das Denaturierungsmittel noch schneller entfernt wird als bei der Gelfiltration. Das untersuchte Protein konnte hier erst in den Fraktionen mit Harnstoff eluiert werden. Bei der Rückfaltung mittels Entsalzungssäule handelt es sich um eine leicht durchführbare, schnelle Methode mit relativ wenig Materialaufwand. Durch UV-Absorption kann man direkt zu beobachten, ob das Protein in nativer Umgebung eluiert werden kann. Daher eignete sich die Entsalzungssäule (Sephadex G25) bei der Suche nach verschiedenen Agenzien, die die Faltung unterstützen.

3.5.3 Rückfaltung mittels Affinitätschromatographie

Die hier untersuchten Hexahistidin-Fusionsproteine wurden durch Affinitätschromatographie mittels Nickelagarose gereinigt, wodurch eine Rückfaltung mit an der Matrix gebundenem Protein eine naheliegende Methode ist (Gu et al., 2002, Lemercier et al., 2003). Da hier der N-Terminus mit dem Histidintag an der Matrix fixiert ist, kann die Aggregation von ungefalteten Proteinen oder von Faltungsintermediaten verringert werden. Andererseits ist möglicherweise der N-Terminus wichtig für die Faltung ist, was durch die Bindung an die Agarose behindert wird. An Nickelagarose gebundenem His-RID wurde in mehreren Waschschritten der Harnstoff langsam entzogen und konnte so in geringen Konzentrationen (>80 µg/ml) in nativem Puffer eluiert werden. Da dieses Protein extrem schnell (wenige Stunden) präzipitierte, handelte es sich hier vermutlich nicht um wirklich rückgefaltetes Protein, sondern eher um lösliche Aggregate. Dies konnte nicht weiter analysiert werden und die Methode der Rückfaltung mittels Affinitätschromatographie für His-RID wurde auf Grund dieser Ergebnisse als ungeeignet betrachtet. Dies ist auch darin begründet, dass die intrazelluläre Domäne des nAChR zusätzlich, wie schon besprochen, ungewollte Interaktionen mit dem Matrixmaterial eingeht.

3.5.4 Rückfaltung durch Verdünnungsexperimente

Eine weitere Gruppe der Rückfaltungsmethoden sind Verdünnungsexperimente (Yokoyama et al., 2002). Diese umfassen die direkte Verdünnung der harnstoffhaltige Proteinprobe mit dem Rückfaltungspuffer, dass die denaturierende Wirkung sofort entfernt wird. Das untersuchte Protein sollte so direkt seine native Struktur „kollabieren“, ohne dass Faltungsintermediate entstehen können. Ein Vorteil ist hierbei, dass noch geringe Konzentrationen des Denaturierungsmittels vorhanden sind, die dem untersuchten Protein helfen können die native Struktur anzunehmen. Außerdem erfolgt die Rückfaltung Schritt für Schritt nur bei geringen Proteinkonzentrationen, was die Aggregationswahrscheinlichkeit während der Rückfaltung vermindert (Lilie et al., 1998). Eine weitere Methode ist die inverse Verdünnung, d.h. zu der Proteinprobe wird langsam der Rückfaltungspuffer hinzugegeben. Hierbei ist die Proteinkonzentration sehr hoch und das Denaturierungsmittel wird kontinuierlich verdünnt. Die Verdünnungsmethoden eignen sich nicht für die Rückfaltung von His-RID, da trotz vielfältiger Variationen der Verdünnungsgeschwindigkeit, Pufferzusammensetzung und Temperatur eine Proteinpräzipitation beobachtet wurde. Zudem, wie schon beschrieben, waren Maßnahmen der Proteinkonzentrierung nicht möglich, weshalb diese Methode auch für die Rückfaltung von His-TID nicht anwendbar war.

3.5.5 Rückfaltung in Gegenwart von Faltungshelfern

Für die Rückfaltung von His-RID waren so genannte Faltungshelfer notwendig. Hierbei handelt es sich um kleine Moleküle oder Detergenzien, die die Proteinstabilität erhöhen. Man unterscheidet Substanzen, die die Faltung unterstützen oder die die Aggregatbildung minimieren. Letztere unterdrücken Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten und somit die Assoziation von Faltungsintermediaten. Zu dieser Substanzgruppe zählen Harnstoff und GuHCl, die wie schon bei den Verdünnungsexperimenten besprochen, in geringen Konzentrationen durch die Reduzierung von Protein-Protein-Interaktionen einen stabilisierenden Effekt haben (Builder und Ogez, 1986).

Die Zugabe von L-Arginin als Faltungshelfer wurde mehrfach für eine erfolgreiche Proteinrenaturierung eingesetzt (Buchner und Rudolph, 1991; Lin et al., 1993, Hsih et al., 1997). Der Mechanismus, wie es zu stabilisierenden Effekten der Aminosäure kommt, ist jedoch noch ungeklärt. Die Gegenwart von Salzen und Zuckern wie Ammoniumsulfat (Neagu et al., 2001) bzw. Glycerin (Ahn et al., 1997; Arakawa und Timasheff, 1982) kann die Rückfaltung unterstützen. Aber auch durch Zugabe von L-Arginin, Zuckern bzw. Salzen konnte die Rückfaltung von His-RID nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Substanzen aus der Gruppe der Sulfobetaine (NDSB – *non-detergent sulfobetaines*), die keine Mizellen bilden, verbessern die Proteinstabilität durch Unterdrücken von Protein-Protein-Interaktionen und können ebenfalls die Rückfaltung erleichtern (Vuillard et al., 1998). Die Gegenwart von NDSB-195 und -201 unterstützte auch nicht die Renaturierung von His-RID. Dennoch verminderten diese Substanzen die Aggregation des rückgefalteten Proteins His-TID, vor allem in nachfolgenden Experimenten wie der *in vitro* Phosphorylierung.

Eine weitere große Gruppe stabilisierender Agenzien sind die nicht-ionischen Detergenzien (Maire et al., 2000), sie vermindern ebenfalls die Aggregation des denaturierten Proteins im Rückfaltungspuffer. Eine Reihe nicht-ionischer Detergenzien wurde bei der Rückfaltung von His-RID getestet, da sich das Verhalten eines Proteins in Gegenwart dieser Substanzen nicht vorhersagen lässt. Deutlich wurde, dass die eingesetzten Detergenzien erst einen positiven Einfluss zeigten, wenn sie in Konzentrationen über ihren cmc eingesetzt wurden, d.h. eine Mizellenbildung war für die Stabilisierung essentiell (Mogensen et al., 2005). Erfolgreich erwies sich dabei das Detergenz Dodecylmaltosid, in dessen Gegenwart erstmals His-RID durch Dialyse renaturiert und in Lösung erhalten werden konnte.

Dodecylphosphocholin (DPC) wurde als effizientes Solubilisierungssagenz für hydrophobe und amphipatische α -Helices beschrieben (Soulié et al., 1999; Beswick et al., 1999) und findet auf Grund seiner Größe als mizellenbildendes Lipid immer mehr Anwendung in der NMR-Spektroskopie (Lauterwein et al., 1979). Die Hexahistidin-Fusionsproteine konnten in Gegenwart von DPC erfolgreich renaturiert und konzentriert werden. Da eine spätere Entfernung von Dodecylmaltosid und des Lipids DPC wieder zur Präzipitation des Proteins führt, sind diese Detergenzien hier nicht als Parameter in der Rückfaltung zu betrachten, sondern als essentielle Proteinstabilisatoren der intrazellulären Domäne des nAChR.

3.6 Strukturelle Charakterisierung der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR

3.6.1 Strukturvorhersagen der intrazellulären Domäne des nAChR

Eine Arbeit von Le Novère (1999) befasste sich mit der bioinformatischen Analyse des Gesamtzeptors. Die hier getroffenen Vorhersagen für die Sekundärstrukturen der extrazellulären Domäne (2 N-terminale α -Helix, 11 β -Faltblattstrukturen) stehen in guter Übereinstimmung mit der durch Kristallisation aufgeklärten Struktur des homologen Acetylcholinbindepoteins AChBP (1 N-terminale α -Helix, 10 β -Faltblattstrukturen), (Breijc et al., 2001). Für die Transmembrandomäne werden α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen postuliert, während die durch Elektronenmikroskopie bestimmten Transmembransequenzen

rein α -helikal sind (Miyazawa et al., 2003). Die intrazelluläre Domäne soll nach Le Novère (1999) größtenteils unstrukturiert vorliegen und lediglich α -helikale Strukturen in den proximalen Bereichen enthalten. In den aktuellen elektronenmikroskopischen Arbeiten wurde eine α -Helix im C-terminalen Bereich der intrazellulären Domäne des nAChR identifiziert (Unwin, 2005), die als MA-Helix bezeichnet wurde. Weitere Bereiche dieser Domäne konnten mit der Elektronenmikroskopie nicht aufgelöst werden, vermutlich handelt es sich um Sequenzen mit ungeordneter Konformation. Nahe des N-Terminus der intrazellulären Domäne ist ein Motiv (RXPXTH(X)₁₄P) identifiziert worden (Morgado-Valle et al., 2000), welches auch in unterschiedlichen Catalasen vorkommt. Hier bilden die beiden Prolinreste die Enden einer α -Helix. Dieses Motiv unterstützt die Vorhersage einer α -Helix im N-terminalen Bereich der intrazellulären Domäne des nAChR.

Die so genannten *third generation* Algorithmen basieren auf Daten von cytoplasmatischen Proteinen mit bekannter 3D-Struktur und der Analyse der Evolution bestimmter Proteinmotive (Rost und Sander, 2000). Da in den letzten Jahren die Anzahl an bekannten Strukturen deutlich gestiegen ist, werden die Sekundärstrukturvorhersagen immer verlässlicher. Daher wurde eine Sekundärstrukturvorhersage für die intrazelluläre Domäne des nAChR im Rahmen dieser Arbeit mit drei aktuellen Algorithmen durchgeführt. Hierbei wurden eine kurze α -Helix nahe dem N-Terminus und ein etwas längeres Sekundärstrukturelement, welches auch als 2 Helices interpretiert werden könnte, nahe dem C-Terminus vorhergesagt. Dies entspricht genau den Vorhersagen von Le Novère (1999). Allerdings basieren die Vorhersagealgorithmen vor allem auf Daten von globulären Proteinen, weshalb eine Vorhersage für Sekundärstrukturelemente von Membranproteinen und ihrer Domänen weniger verlässlich ist als für cytoplasmatische Proteine. Daher wurden die Vorhersagen für die Sekundärstrukturanalyse für die intrazelluläre Domäne des nAChR durch Analysen für die Vorhersage von unstrukturierten Proteinregionen unterstützt (Linding et al., 2003). Hier wurde für die intrazelluläre Domäne des nAChR ein hoher Anteil ungeordneter Proteinkonformation vorhergesagt, wobei die Regionen, in denen sich die postulierten α -Helices befinden, ebenfalls als potentielle Bereiche für Sekundärstrukturelemente bestimmt wurden.

Auf Grund dieser Analysen ist es sehr wahrscheinlich, dass die intrazelluläre Domäne des nAChR vorwiegend unstrukturiert vorliegt und nur in den proximalen Bereichen α -helikale Sekundärstrukturelemente vorkommen.

3.6.2 Die Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte und *Torpedo* liegen als Monomer vor

Nach Reinigung und Renaturierung der Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR wurde vorrangig His-TID in Lösung charakterisiert, weil das Protein mit und ohne Detergenzien untersucht werden konnte. Die Bestimmung der Gesamtmasse mit MALDI-TOF ergab einen Wert nahe dem theoretischen Molekulargewicht. Dadurch wird sichergestellt, dass keine Modifikationen durch funktionelle Gruppen oder durch Abbau vorliegen. Mit den Methoden der Gelfiltration, dynamischen Lichtstreuung und analytischen Ultrazentrifugation erfolgte die Bestimmung des Oligomerisierungszustandes der renaturierten Hexahistidin-Fusionsproteine.

3.6.2.1 Gelfiltration

Die Gelfiltration hat sich als einfache und effektive Methode entwickelt, Aussagen über das Molekulargewicht in Lösung befindlicher Proteine zu erhalten (Irvine, 1994). Verschiedene Eichproteine werden unter den gleichen Bedingungen mittels der Gelfiltrationssäule getrennt und die Elution direkt durch Absorption detektiert. Die Analyse des Zielproteins erfolgt durch Vergleich der Elutionsverhalten von Eichproteinen. Hierbei erweist sich jedoch problematisch, dass es sich bei den Eichproteinen um globuläre und gut lösliche Proteine handelt, die keine unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial eingehen. Genau das Gegenteil kann bei den untersuchten Proteinen auftreten, was die Bewertung der Elutionschromatogramme erschwert. Eine Bestimmung des Molekulargewichtes von His-TID mittels Gelfiltration war aus den genannten Gründen nicht möglich. Die Elution des Proteins in Rückfaltungspuffer wurde hier nur in einem langen breiten Peak beobachtet werden, was vor allem mit der geringen Löslichkeit begründet ist (Winzor, 2003). Zusätzlich wird eine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial vermutet (Glod, 1997) bzw. eine Präzipitation des Proteins beobachtet (Watson und Kenney, 1988).

Auch in Gegenwart der Detergenzien Dodecylmaltosid und Dodecylphosphocholin wurde bei der Elution der Fusionsproteine His-TID und His-RID ein breiter Peak beobachtet, weshalb eine Bestimmung des Oligomerisierungszustandes nicht möglich war.

3.6.2.2 Dynamische Lichtstreuung

Eine Charakterisierung der Hexahistidin-Fusionsproteine musste daher frei in Lösung erfolgen. Zunächst wurde die Methode der dynamischen Lichtstreuung verwendet (Oliva et

al., 2001; Ahrer et al., 2003). Die Charakterisierung von His-TID ohne Detergenzien war hier auf Grund der geringen Konzentration nicht möglich. In Gegenwart von DPC wurden mittels der dynamischen Lichtstreuung drei unterschiedliche Partikelspezies in der Lösung definiert. Hierbei handelt es sich vermutlich um freie Dodecylphosphocholinmizellen, einem Protein-Mizellenkomplex und einem Protein-Aggregat (Mendz et al., 1988). Da die Versuche, die großen Partikel durch Filtration oder Zentrifugation zu entfernen, scheiterten, handelt es sich wahrscheinlich um ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Partikeln. Aussagen über den Oligomerisierungszustand des Proteins in Komplex mit dem Detergenz lassen sich allerdings nicht mit dieser einfachen Anwendung der dynamischen Lichtstreuung treffen.

3.6.2.3 Analytische Ultrazentrifugation

Eine Methode zur Untersuchung des Oligomerisierungszustandes und der Dispersität der Lösung ist die analytische Ultrazentrifugation (Lebowitz et al., 2002). Bei dieser Methode werden Makromoleküle frei in Lösung charakterisiert und es können Aussagen über Oligomerisierungszustand und Assoziationsverhalten erhalten werden. In einem Geschwindigkeitsexperiment wurde das Vorhandensein von drei unterschiedlich sedimentierenden Partikeln in einer Lösung von His-TID in Gegenwart des Detergenz DPC in Phosphatpuffer detektiert. Es wurde deutlich, dass es sich um eine Spezies leerer Mizellen, dem Protein-Detergenz-Komplex und höheres Aggregat handelt. Dies bestätigt die Beobachtungen der dynamischen Lichtstreuung. Es wurde mit einem Gleichgewichtsexperiment eindeutig gezeigt, dass ein Komplex aus His-TID Monomer und DPC vorliegt. Zusätzlich wurde eine Tendenz zur Aggregatbildung beobachtet.

Durch die Rückfaltung von His-TID in Gegenwart von DPC konnte eine geeignete Probe für die strukturelle Charakterisierung der intrazellulären Domäne des nAChR hergestellt werden. Die beobachtete Aggregatbildung kann hier vernachlässigt werden, da die Experimente in einem Zeitraum bis 20 h nach der Probenherstellung durchgeführt wurden. Durch die analytische Ultrazentrifugation wurde deutlich, dass nach 20 h nur geringe Anteile und erst nach 5 Tagen etwa 10% in der Lösung als Proteinaggregat vorlagen.

Da His-RID unter gleichen Bedingungen in Gegenwart von DPC renaturiert wurde, sich analoge Elutionschromatogramme bei der Gelfiltration und vergleichbare Resultate bei der dynamischen Lichtstreuung ergab (Ergebnisse nicht gezeigt), kann davon ausgegangen werden, dass hier ebenfalls ein Monomer-Detergenz-Komplex mit geringen Anteilen an größeren Aggregaten vorliegt.

Für die Proteine His-TID, His-TID(S56,57,72D) und His-RID(S53,54,69D) in Rückfaltungspuffer ohne Detergenzien lässt sich ein ähnliches Verhalten in Lösung vermuten: kurz nach der Rückfaltung liegt das Monomer des untersuchten Proteins vor, welches stark zur Aggregation neigt. Auf Grund der hohen Instabilität der Lösung ließ sich dieses Modell nicht weiter analysieren.

3.6.3 Die Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte und *Torpedo* sind vorwiegend unstrukturiert

3.6.3.1 CD-Spektroskopie

Eine Charakterisierung von His-TID in Rückfaltungspuffer erfolgte durch CD-Spektroskopie. Das CD-Spektrum dieses Fusionsproteins ist durch ein Minimum der molaren Elliptizität bei 202 nm gekennzeichnet. Dies ist charakteristisch für Proteine mit *random coil* Konformation (Woody, 1994; Adler et al., 1973). Mit den erhaltenen Daten wurden Vorhersagen mit den Algorithmen k2D (Andrade et al., 1993) und CONTIN (Provencher und Glockner, 1981) durchgeführt, die auf einen hohen Anteil ungeordneter Struktur in His-TID hinweisen. Die Vorhersagen beruhen auf dem Vergleich mit Proteinen bekannter Strukturen. Hierbei handelt es sich vor allem um Daten von globulären Proteinen, wodurch die Vorhersage für eine Domäne eines Membranproteins sehr ungenau erfolgt. Der nahe UV-Bereich reflektiert Symmetrien in der Umgebung von aromatischen Resten und damit die Tertiärstruktur von Proteinen (Johnson, 1988). Da die aromatischen Aminosäuren in His-TID kontinuierlich im gesamten Protein vorkommen, ist es wahrscheinlich, dass die intrazelluläre Domäne des nAChR nur einen sehr geringen Anteil an Sekundärstrukturen enthält. In Gegenwart von Detergenzien konnte eine Veränderung der CD-Kurven beobachtet werden, es gibt eine leichte Verschiebung der Elliptizitätsminima zu 208 und 222 nm. Diese Minima sind charakteristisch für α -Helices. Dieser Einfluss ist jedoch sehr gering und wird später noch besprochen (siehe Kapitel 3.7.4) In Gegenwart der Detergenzien ergaben die Sekundärstrukturvorhersagen auf Basis der CD-Spektren immer noch große Anteile ohne geordnete Proteinkonformation.

3.6.3.2 NMR-Spektroskopie

Die Vorhersagen auf Grund der CD-Daten ergaben etwa 40-60% unstrukturierte Bereiche in der intrazellulären Domäne. Eine detaillierte Aussage konnte mittels der NMR-Spektroskopie getroffen werden. Die NMR-Spektren bestätigen die Hinweise, dass es sich bei der

intrazellulären Domäne des nAChR um ein Protein ungeordneter Konformation handelt. So zeigen die ^1D - ^1H -Spektren von His-TID und His-RID in Gegenwart von DPC im Amidprotonenbereich (zwischen 7,5 und 8,5 ppm) eine geringe Dispersion der chemischen Verschiebungen, was typisch für Proteine mit geringem Sekundärstrukturanteil ist (Rehm et al., 2002). Die Region für Protonensignale der Aliphaten (um 1 ppm) konnte nicht analysiert werden, da sie durch Signale des Dodecylphosphocholins überlagert waren.

Eindeutig sind die Ergebnisse der ^{15}N -HSQC NMR Spektroskopie. Hierfür wurden His-TID und His-RID ^{15}N -isotopenmarkiert, in dem die Proteinexpression in Minimalmedium mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als einziger Stickstoffquelle durchgeführt wurde. Im HSQC Spektrum wird für jedes Proton, das direkt an einem Stickstoffrest gebunden ist, ein Signal erwartet. Somit werden die Amidprotonen des gesamten Proteinrückgrats (außer Prolin) und einige Seitenketten detektiert. Die Positionen dieser Signale geben Hinweise auf die Sekundärstruktur des Proteins. Im Mittelpunkt steht dabei wie beim ^1D - ^1H -Spektrum die Region der Amidprotonensignale. Überlagern sich in der Region der ^1H -Frequenz von 7,5 und 8,5 ppm die Signale und zeigen eine geringe Dispersion in beide Richtungen, dann ist dies charakteristisch für nicht strukturierte Polypeptide (Dyson und Wright, 2001, 2004). Genau diese Signalüberlagerung wurde bei His-TID und His-RID in Gegenwart von DPC beobachtet. Lediglich wenige Signale sind aufgelöst, wie für His-RID im Spektrum in der Region der ^{15}N -Frequenz 125-135 ppm. Diese Signale sind typisch für Aminosäuren wie Leucin und Lysin in einer strukturierten Umgebung. Da diese Aminosäuren bekannte α -Helix-Bildner sind (Snell und Fasman, 1972) und His-RID im Bereich der Aminosäuren 21-33 reich an Leucin und Lysin ist, kann möglicherweise hier eine kurze α -Helix vorkommen. Diese Region enthält das Motiv (RXPXTH(X)₁₄P), das eine α -Helix umfasst und die Rezeptorsensitivität des nAChR beeinflusst (Morgado-Valle et al., 2000). Eine genaue Analyse der NMR-Daten, um beispielsweise das Vorhandensein dieser N-terminalen Helix zu bestätigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Die Wechselwirkung mit Dodecylphosphocholin konnte nicht eindeutig erklärt werden und somit war ein Vergleich für die intrazelluläre Domäne des nAChR in Lösung ohne Detergenzien nicht möglich.

3.6.3.3 Limitierte Proteolyse

Die spektroskopischen Daten sollten durch Analyse mittels limitierter Proteolyse gestützt werden. Mit dieser Methode werden kompakte, strukturierte Bereiche von Proteinen identifiziert sind, die deutlicher proteaseresistent sind als unstrukturierte Bereiche (Fontana et al., 2004). Der Verdau von His-TID mit Proteinase K und Trypsin führte zu vielen

Proteinfragmenten variabler Größe. Mit MALDI-MS-Fingerprint wurde ein kontinuierlicher Abbau vom N-Terminus bzw. vom C-Terminus beobachtet. Es wurden keine größeren strukturierten kompakten Bereiche identifiziert, die schwerer für Proteasen zugänglich sind als unstrukturierte Bereiche (Dunker et al., 2001). Die Gegenwart von Dodecylphosphocholin führte zu einer generellen Stabilisierung des Proteins, so wurde die Proteolyse erst bei höherer Proteasekonzentration bzw. längerer Inkubation als ohne Detergenz beobachtet. Aber auch hier konnten keine stabilen Fragmente identifiziert werden.

Die untersuchte intrazelluläre Domäne des nAChR als Hexahistidin-Fusionsprotein wurde als überwiegend unstrukturiert charakterisiert. Diese Beobachtung ist mit den Sekundärstrukturvorhersagen vereinbar. Das Vorhandensein kleiner, postulierter α -helicaler Elemente in den proximalen Bereichen konnte nicht eindeutig bewiesen werden. Dies war vor allem experimentell begründet, da eine Aufklärung der NMR-Struktur auf Grund des ungeklärten Einflusses des Detergenzes DPC nicht durchgeführt wurde.

3.7 Interaktionen der intrazellulären Domäne im nAChR

Vermutlich bestimmen Modifikationen oder Interaktionen mit anderen Proteinen die Faltung der intrazellulären Domäne des nAChR. So wurden im Rahmen dieser Arbeit ein Einfluss durch die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne oder die Modifikation ihrer Termini untersucht. Die Interaktion mit den anderen Untereinheiten des nAChR oder mit assoziierten Proteinen wurde zusätzlich charakterisiert.

3.7.1 Phosphorylierung

In der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR sind die Phosphorylierungsstellen an den Positionen Ser361, Ser362, Tyr 372 und Ser377 (Nomenklatur für nAChR von *Torpedo californica*) konserviert (Swope et al., 1999). Ein Einfluss durch die Phosphorylierung auf die Sekundärstruktur der Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR von Ratte und *Torpedo* wurde untersucht.

Eine Strukturinduzierung durch Phosphorylierung unstrukturierter Bereiche in Proteinen kann deren Stabilität erhöhen (Meijberg et al., 1996). Andererseits befinden sich

Phosphorylierungen, die Protein-Protein-Interaktionen in Signalwegen vermitteln, oft auf der Proteinoberfläche und haben keinen großen Einfluss auf die Proteinkonformation.

Nach einer *in vitro* Phosphorylierung von His-TID wurden mit Radioaktivitätsmessung zwei Phosphatgruppen pro Protein detektiert. Mit MALDI-MS Sequenzierung wurde jedoch nur die Phosphorylierung an Ser56 (=Ser361) bestimmt. Da Phosphopeptide mit MALDI-MS deutlich schlechter als unphosphorylierte Peptide identifiziert werden, ist möglich, dass das Peptid mit zwei Phosphatgruppen nicht detektiert werden konnte. Dieser Widerspruch konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, die Phosphorylierung an Position Ser56 war für das untersuchte Fusionsprotein eindeutig. Die Charakterisierung der Sekundärstruktur erfolgte mit CD-Spektroskopie. Hierbei konnte keine Veränderung durch die *in vitro* Phosphorylierung gegenüber dem unphosphorylierten His-TID beobachtet werden.

Die Phosphorylierung wurde weiterhin bezüglich der Ladung und Größe imitiert, indem Serin-Aspartat-Mutationen in die Hexahistidin-Fusionsproteine der intrazellulären Domäne des nAChR eingeführt wurden. Die Mutanten wurden mittels CD-Spektroskopie analysiert und es wurde keine Veränderung der Sekundärstruktur beobachtet. Die Phosphorylierung bzw. Mutation scheint nur einen geringen Einfluss zu haben, der durch CD-Spektroskopie nicht beobachtet werden konnte. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne auf der Proteinoberfläche stattfindet. Dieses Argument wird dadurch bestärkt, dass die Dreifachmutanten eine erhöhte Löslichkeit aufweisen, denn die eingeführten Ladungen auf der Oberfläche verhindern die im Wildtyp beobachtete Aggregation (Ito et al., 2004).

3.7.2 Einfluss des N- und C-Terminus

Eine Proteindomäne ist ein Bereich innerhalb der Peptidsequenz eines [Proteins](#), der aufgrund definierter Eigenschaften von seiner Umgebungssequenz unterschieden werden kann. Sie weist eine eigenständige, vom Gesamtprotein unabhängige Faltung auf. Die Annahme, dass es sich bei der intrazellulären Domäne des nAChR um eine sich autonom faltende Region handelt, beruht auf den Sekundärstrukturvorhersagen von Le Novère (1999) und den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Unwin (1995). Die extrazelluläre Domäne und einzelne Transmembranhelices konnten bereits isoliert untersucht werden (Hung et al., 2005; Opella et. al., 1996; Avramopoulou et al., 2004).

Für die intrazelluläre Domäne des nAChR ist jedoch nicht klar abgegrenzt, welche Aminosäuren die sich autonom faltende Proteindomäne begrenzen. Zusätzlich sind die Termini der intrazellulären Domäne des nAChR in Membrannähe lokalisiert sind und neigen

eventuell ohne Gegenwart von Lipiden zur Aggregation. Generell kann die Flexibilität der Termini von heterolog exprimierten Proteinen die Faltung negativ beeinflussen (Chung et al., 2002; Li et al., 2002).

Möglicherweise hat jedoch die Fixierung der Enden der intrazellulären Domäne ähnlich wie im Rezeptor der Übergang zur M3-Helix bzw. zur die M4-Helix einen Einfluss auf die Faltung und Stabilität 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.

Die Fixierung der Enden sollte über zwei unterschiedliche Methoden erfolgen. Einerseits wurde die intrazelluläre Domäne mit Teilen der Transmembransequenzen exprimiert. Da die Membranhelices stark hydrophob sind, wäre es möglich, dass die beiden Termini eine Interaktion in Lösung eingehen und dadurch fixiert werden (Kwan und Gros, 1998; Carlson et al., 1996). Andererseits wurde versucht die beiden Enden durch eine Inteinvermittelte Proteinligation miteinander zu verbinden (Williams et al., 2005). Beide Ansätze konnten allerdings wegen Problemen der Expression und Reinigung, wie es schon besprochen wurde, nicht ausreichend untersucht werden. Für das Protein His-RID(+6N+4C) erfolgte eine Charakterisierung mittels CD-Spektroskopie. Hierbei wurde kein Einfluss auf die Sekundärstruktur beobachtet. Vermutlich waren die Teile der Transmembransequenzen zu kurz, um eine Assoziation der Termini in Lösung zu ermöglichen.

Die Expression der intrazellulären Domäne führte eventuell zu sehr flexiblen Enden, die die Ausbildung der postulierten α -Helices in den proximalen Bereichen nicht erlauben. Durch die Verlängerung der Termini konnte aber auch keine Induzierung von Sekundärstrukturelementen in der cytoplasmatischen Domäne beobachtet werden.

Laut Sekundärstrukturvorhersagen und den elektronenmikroskopischen Aufnahmen befindet sich nahe dem C-Terminus eine kurze α -Helix. Diese müsste durch eine Verkürzung des C-Terminus um 10 Aminosäuren für His-RID detektierbar sein. Es konnte keine Veränderung der Löslichkeit und der Sekundärstruktur beobachtet werden. Diese Helix ist bei den untersuchten Hexahistidin-Fusionsproteinen der intrazellulären Domäne des nAChR wahrscheinlich nicht vorhanden. Dieser Struktur wird vermutlich durch die Interaktion mit den anderen Untereinheiten induziert (siehe Kapitel 3.7.4).

Ein Einfluss der Termini auf die Faltung der intrazellulären Domäne des nAChR konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Die Verlängerung der Enden um Sequenzen

der Transmembranhelices bzw. eine Verkürzung des C-Terminus führten nicht zu einer Stabilisierung und hatten keinen Einfluss auf die Faltung der Domäne.

3.7.3 Interaktion des intrazellulären Domäne des nAChR mit der Zellmembran

In Gegenwart der Detergenzien Dodecylmaltosid und Dodecylphosphocholin konnte mittels CD-Spektroskopie die Ausbildung von α -Helices in der intrazellulären Domäne des nAChR beobachtet werden. Eine Induzierung α -helikaler Strukturen in Gegenwart von Membran-imitierenden Mizellen konnte bei einigen anderen intrinsisch unstrukturierten Proteinen für deren Funktion als essentiell charakterisiert werden. Beispielsweise benötigt die ζ -Untereinheit des T-Zellrezeptors eine Lipid-abhängige Faltung bevor eine Phosphorylierung für die nachfolgende Signaltransduktion erfolgen kann (Aivazian und Stern, 2000). Ein anderes Beispiel ist das Herpes-Simplex Virus Protein ICP47, dass in wässriger Umgebung unstrukturiert ist, aber als α -Helix die Membran bindet (Pfander et al., 1999). *In vitro* wird die Selbstassoziation von α -Synuclein verhindert, in dem die Gegenwart von Membranen zur Ausbildung α -helicaler Sekundärstrukturen führt (Bisgalia et al., 2005).

Die funktionelle Relevanz der Strukturinduktion durch Lipidinteraktion der intrazellulären Domäne des nAChR konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Da kein funktioneller Test für die intrazelluläre Domäne zur Verfügung stand, sollte für die strukturelle Untersuchung auf die Gegenwart von Detergenzien verzichtet werden. Die Vielzahl der gescheiterten Expressions- und Reinigungsprotokolle für die untersuchte Domäne unter nativen Bedingungen ergab jedoch, dass die Gegenwart von Detergenzien unabdingbar ist. Eine detaillierte Charakterisierung einer potentiellen Membranassoziation würde ein weiterer Schritt für die Strukturaufklärung der intrazellulären Domäne des nAChR sein.

3.7.4 Interaktion mit anderen Untereinheiten

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Unwin (2005) zeigt die identifizierte MA-Helix einer Untereinheit intensive Wechselwirkungen mit den MA-Helices der anderen Untereinheiten. In Arbeiten von Yu und Hall (1994) wurden die entsprechenden Sequenzen im C-terminalen Bereich der intrazellulären Domäne für den Rezeptorzusammenbau als essentiell identifiziert. Es ist daher wahrscheinlich, dass die α -Helix am C-Terminus erst durch Interaktion mit den anderen Untereinheiten induziert wird. Dies wurde von Dr. Viktoria Kukhtina in unserem Labor detaillierter untersucht. Hierfür wurde ein Expressionsvektor kloniert, der die polycistronische Expression der cytoplasmatischen Domänen der vier

unterschiedlichen Untereinheiten des nAChR von *Torpedo californica* erlaubt. Unter Kontrolle des gleichen Promotors sollte hier die gleichzeitige Expression der vier Domänen erfolgen. Bei Vorliegen einer spezifischen Interaktion wurde erwartet, dass sich Dimere oder Oligomere mit erhöhter Löslichkeit bilden (Slice und Taylor, 1989). Die gleichzeitige Expression der vier Domänen in *E.coli* konnte erfolgreich durchgeführt werden, allerdings lagen alle vier Proteine ausschließlich als unlösliche *inclusion bodies* vor. Nach Renaturierung mittels Gelfiltration konnte eine Reinigung als Komplex und eine nachfolgende Charakterisierung auf Grund der Instabilität der Lösung nicht erfolgen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die notwendigen Kontakte für die Ausbildung der MA-Helix durch die Vorassoziation der Rezeptoruntereinheiten entstehen. Der Einfluss der intrazellulären Domäne beim Rezeptorzusammenbau wurde erst gezeigt, wenn schon Dimere und Trimere der Untereinheiten vorhanden waren, deren Assoziation von Sequenzen in der extrazellulären Domäne abhängig ist (Blount and Merlie, 1989; Green und Claudio, 1993).

3.7.5 Interaktion mit anderen Proteinen

Aus den Sekundärstrukturvorhersagen wurde ein großer Bereich der intrazellulären Domäne mit ungeordneter Konformation vorhergesagt und für das heterolog exprimierte Hexahistidin-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR im Rahmen dieser Arbeit gezeigt. Verschiedene Arbeiten postulieren eine Beteiligung an intrazellulären Signalwegen, vor allem über die identifizierten Phosphorylierungen. Bei der Isolierung des nikotinischen Acetylcholinrezeptor aus dem elektrischen Gewebe von *Torpedo californica*, wird eine hohe Assoziation zu dem 43 kDa Protein Rapsyn beobachtet. Eine vergleichbare Wechselwirkung mit membranassoziierten Proteinen wurde bereits anderen Cys-loop Rezeptoren beobachtet. So ist beispielsweise eine direkte Interaktion des Proteins Gephyrin mit dem Glycin-Rezeptor (Schrader et al., 2004) oder des Proteins GABARAP (GABA-Rezeptor-assoziiertes Protein) mit dem GABA_A-Rezeptor (Wang et al., 1999) gezeigt worden. Eine direkte Interaktion von Rapsyn mit nAChR konnte mit biochemischen Methoden konnte noch nicht nachgewiesen werden (Burden et al., 1983, Froehner et al., 1991, Colledge und Froehner, 1998). Eine Bindung der cytoplasmatischen Domäne mit einem intrazellulären Protein würde die Untersuchung deutlich erleichtern. Zum einen wäre so ein biochemischer Test für die Aktivität des heterolog exprimierten Proteins vorhanden, zum anderen könnte eine Interaktion eventuell die Faltung beeinflussen und dadurch Strukturuntersuchungen ermöglichen.

Nach Inkubation einer Rezeptorpräparation mit isoliertem Rapsyn und anschließender Detektion mit Rapsyn-Antikörpern konnte eine direkte Interaktion des nAChR mit Rapsyn nicht nachgewiesen werden (Experimente von Dr. Viktoria Kukhtina). Daher stand dieser Test leider nicht für die Charakterisierung der heterolog exprimierten intrazellulären Domäne des nAChR zur Verfügung.

Nach den hier beobachteten Ergebnissen, treten andere Protein-Protein-Interaktionen des nikotinischen Acetylcholinrezeptors mit cytoplasmatischen Proteinen weiter in den Mittelpunkt. Den bisherigen Daten zur Folge liegt die intrazelluläre Domäne des nAChR im Rezeptor vermutlich größtenteils unstrukturiert vor. Dies ist aber für die Größe der Domäne sehr ungewöhnlich. Die Induzierung von Sekundärstrukturen durch die Interaktion mit anderen Proteinen, beispielsweise bei der Beteiligung bei intrazellulären Signalwegen, ist sehr wahrscheinlich.

In der cytoplasmatischen Domäne können mehrere Protein-Bindungsmotive identifiziert werden. Eine Analyse mit Eukaryotic Linear Motif Resource (Punternvoll et al., 2003) wurde von Dr. Viktoria Kukhtina durchgeführt. Dabei konnten Motive für die folgenden Bindungspartner identifiziert werden: 14-3-3 Proteine, "fork-head" assoziierte (FHA) Domänen, PDZ Domänen der Klasse III, die katalytische Untereinheit der Protein-Phosphatase 1 (PP1), Src-Homologie 2-Domänen (SH2), WW Domäne der Klasse IV und die katalytische Untereinheit des Adaptor Komplex AP-2. Die cytoplasmatische Domäne des nAChR enthält potentielle Phosphorylierungsstellen für CK2, GSK3, Phosphorylasekinase, Proteinkinase A (PKA) und MAPK (Ergebnisse nicht gezeigt).

Einige Interaktionspartner wurden schon identifiziert. So konnte mit Oberflächenplasmonresonanz die Bindung des Adaptorproteins Grb2 mit seiner SH2 Domäne an die Tyrosin-phosphorylierte intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit gezeigt werden (Colledge und Froehner, 1997). Eine Interaktion der intrazellulären Domäne der $\alpha 4$ -Untereinheit des nAChR mit dem Chaperonprotein 14-3-3 η (Jeanclos et al., 2001) und dem Calcium Sensor Protein „visinin-like“ Protein-1 (Lin et al., 2002) konnte durch einen *Yeast two-hybrid* Screen identifiziert werden.

Die Vielfalt der potentiellen Interaktionspartner und die Tatsache, dass die intrazelluläre Domäne des nAChR mit ungeordneter Konformation charakterisiert wurde, zeigt hier ein typisches Protein in Signalkaskaden. Die Kopplung von Bindung und Faltung führt generell zu einem Komplex hoher Spezifität und relativ geringer Affinität. Dies unterstützt die Funktion von Signal-Übertragenden Proteinen, da hier nicht nur eine spezifische Wechselwirkung für die Initiierung der Signaltransduktion sondern auch eine schnelle

Dissoziation nach Ende des Signals erfolgen kann (Dyson und Wright, 2005). Ein weiterer Vorteil unstrukturierter Proteine ist ihre inhärente Flexibilität, die eine Anpassung der Struktur lokal als auch global an die unterschiedlichsten Interaktionspartner erlaubt (Dyson und Wright, 2002). Zusätzlich haben unstrukturierte Proteine einen größeren „Fangradius“ für Interaktionspartner als kompakte Proteine. Dieses Phänomen wurde als *fly-casting*-Mechanismus von Shoemaker et al. (2000) bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Domäne des nAChR als vorwiegend unstrukturiert identifiziert. Kleinere, postulierte α -helikale Sekundärstrukturelemente in den proximalen Bereichen der Domäne gelten als essentiell für den Rezeptoraufbau (Yu und Hall, 1994) und die Funktion (Morgado-Valle et al., 2000). Das Vorhandensein dieser Helices in den untersuchten Hexahistidin-Fusionsproteinen der intrazellulären Domäne des nAChR konnte nicht eindeutig gezeigt werden, da die Charakterisierung der Fusionsproteine nur in Gegenwart von Detergenz möglich war. Der Einfluss von Lipiden auf die intrazelluläre Domäne muss demnach in künftigen Untersuchungen aufgeklärt werden. Die Identifizierung direkter Interaktionspartner, deren Bindung zu einer Strukturinduktion der intrazellulären Domäne des nAChR führt, wird jedoch als essentieller Schritt für die Charakterisierung dieser Domäne angesehen. Diese Interaktion tritt eventuell nur in Gegenwart von Phosphorylierungen und Membranassoziation auf. Da die intrazelluläre Domäne des nAChR isoliert, d.h. ohne Interaktionspartner und Modifikationen, als Probe für eine Strukturaufklärung nicht geeignet ist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.