

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors von *Torpedo californica* und *Rattus norvegicus* kloniert, exprimiert, gereinigt und strukturell charakterisiert.

Als geeignetes Expressionssystem wurde *Escherichia coli* gewählt. Die Expression in eukaryotischen Zellen konnte auf Grund der Toxizität des untersuchten Proteins nicht in größeren Mengen erfolgen.

Die intrazelluläre Domäne des nAChR wurde in Form unterschiedlicher Fusionsproteine untersucht. Als Strep-Fusionsprotein wurde nur eine unlösliche, geringe Expression erreicht, eine nachfolgende Anreicherung war nicht möglich. Dagegen konnte das Hexahistidin-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne des nAChR in großer Menge exprimiert werden. Dies wurde jedoch ausschließlich in *inclusion bodies* erreicht. Durch Reinigung unter denaturierenden Bedingungen konnte reines Protein (auf SDS-Page, Coomassie gefärbt) isoliert werden.

Allerdings sollte ein Protokoll für die Isolierung der intrazellulären Domäne des nAChR unter nicht-denaturierenden Bedingungen entwickelt werden, da für die Aktivität der Domäne kein biochemischer Test zur Verfügung steht und es so am wahrscheinlichsten ist, die Domäne in ihrer nativen Form zu erhalten. So wurden Fusionsproteine generiert, die die Löslichkeit des untersuchten Proteins verbessern. Eine lösliche Expression und die Reinigung unter nativen Bedingungen als GST- und MBP-Fusionsprotein konnte erreicht werden. Allerdings erwiesen sich diese Fusionsproteine als besonders instabil, was sich durch die Anwesenheit mehrerer Degradationsprodukte zeigte. Eine nachfolgende Abspaltung des Fusionspartners mit verschiedenen Aminosäuresequenz-spezifischen Proteasen (Faktor Xa, Enterokinase, Genenase I) war möglich, führte jedoch auch zu einem Abbau der intrazellulären Domäne des nAChR. Alternativ wurden Intein- und SUMO-Fusionsproteine löslich exprimiert. Für die Isolierung der intrazellulären Domäne des nAChR vom Intein-Fusionsprotein war ein internes Proteinsplicing notwendig, das allerdings für die untersuchten Proteine nicht erreicht werden konnte. Das SUMO-Fusionsprotein konnte unter nativen Bedingungen gereinigt werden. Eine nachfolgende Abspaltung des Fusionspartners mit der Tertiärstruktur-erkennenden SUMO-Protease war ebenfalls erfolgreich. Eine Isolierung der intrazellulären Domäne des nAChR von den unverdauten SUMO-Fusionsproteinen für eine weitere Charakterisierung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden, eine Stabilisierung durch Detergenzien erwies sich als notwendig.

Da eine Anreicherung der intrazellulären Domäne des nAChR unter nativen Bedingungen nicht erfolgreich war, erfolgte die Rückfaltung der aus *inclusion bodies* gewonnenen Hexahistidin-Fusionsproteine. Für das Fusionsprotein aus *Torpedo* war eine Renaturierung durch Gelfiltration und Dialyse erfolgreich. Es konnte eine Probe mit 0,3 mg/ml Fusionsprotein erhalten werden, die für eine nachfolgende strukturelle Charakterisierung zur Verfügung stand. Die Renaturierung für das Hexahistidin-Fusionsprotein der intrazellulären Domäne des nAChR aus Ratte war nur erfolgreich in Gegenwart der Detergenzien Dodecylmaltosid und Dodecylphosphocholin.

Eine Charakterisierung mittels CD-Spektroskopie ergab einen hohen Anteil ungeordneter Konformation im untersuchten Protein. Diese Annahme wurde durch Experimente mit limitierter Proteolyse unterstützt, wo keine Fragmente, die auf kompakte Strukturen hinweisen, identifiziert wurden. Da in Gegenwart von Dodecylphosphocholin eine Konzentration der Hexahistidin-Fusionsproteine von 6 mg/ml erreicht wurde, erfolgte hier eine NMR-spektroskopische Untersuchung. Die Aufnahme eines ^{15}N -HSQC Spektrums bestätigte die Beobachtung, dass die untersuchten Proteine vorwiegend unstrukturiert vorliegen. Mit analytischer Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem untersuchten Protein in diesen Experimenten um ein Monomer im Komplex mit Dodecylphosphocholin handelt.

Der Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Sekundärstruktur der intrazellulären Domäne des nAChR wurde durch Variationen der Konstrukte untersucht. Die Einführung einer Phosphorylierung bzw. die Imitation einer Serinphosphorylierung durch eine Serin-Aspartat-Mutation zeigten keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur. Auch die Veränderung des N- und C-Terminus der intrazellulären Domäne des nAChR bezüglich ihrer Länge zeigte keinen Effekt auf die Faltung des untersuchten Proteins.

Sekundärstrukturvorhersagen ergeben für die intrazelluläre Domäne des nAChR einen hohen Anteil ungeordneter Konformation. Vermutlich führt erst eine Bindung von Interaktionspartnern zur Induzierung einer Sekundärstruktur. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht detaillierter untersucht werden.