

6. METHODEN

6.1. Präparation nAChR-reicher Membranen aus dem elektrischen Gewebe von *Torpedo californica*

Als Ausgangsmaterial für die Präparation (Schiebler & Hucho, 1978) dient Gewebe aus dem elektrischen Organ von *T. californica*, das bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt wird. Alle Schritte der Präparation werden bei 4°C oder im Kühlraum durchgeführt. Etwa 100 g dieses Gewebes werden grob zerkleinert, wobei Bindegewebe weitestgehend entfernt wird. Nach Aufnahme in 200 ml Puffer I erfolgt dann im Warring Blendor eine dreiminütige Homogenisation bei höchster Umdrehung. Im Laufe der anschließenden Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (4°C; 27000 g; 90 min) werden lösliche und durch die hohe Salzkonzentration abgelöste Membranproteine abgetrennt. Die Überstände werden verworfen, die Pellets in 100 ml Puffer II im Warring Blendor auf niedriger Stufe erneut 3 min lang homogenisiert. Die bei der nachfolgenden Zentrifugation (4°C; 39000 g; 90 min) entstehenden Pellets bestehen aus zwei Schichten: Die weiße, faserige Schicht enthält vornehmlich Bindegewebe und wird daher abgetrennt und verworfen. Die darüberliegende gallert-artige Schicht besteht zum Großteil aus rezeptorreichen Vesikeln, die bei der Homogenisation spontan entstanden sind; sie wird nochmals in 100 ml Puffer II auf niedriger Stufe drei Minuten lang homogenisiert. Wieder wird das Homogenat bei 4°C mit 39000 g 90 min lang zentrifugiert.

Die Pellets werden in 40 ml Puffer II aufgenommen und mit einer Einwegspritze gründlich resuspendiert. Um noch verbliebene größere Zelltrümmer abzutrennen, wird die Suspension einer kurzen, niedertourigen Zentrifugation unterworfen (10 min; 6500 g). Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und auf sechs kontinuierliche Sucrosegradienten (25-50% Sucrose; 0,02 % NaN₃) geschichtet, die anschließend mindestens acht Stunden lang mit 59000 g bei 4°C in einer Ultrazentrifuge (Kontron) zentrifugiert werden. Bei diesem Schritt wandern die präparierten Vesikel so lange in den Sucrosegradienten, bis ihre Dichte der des Gradienten entspricht. Auf diesem Weg werden die relativ schweren nAChR-reichen Vesikel von den leichteren ATPase-reichen abgetrennt. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe werden die Gradienten nach abnehmender Dichte abgesaugt und in Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Die ersten zehn Fraktionen werden durch eine analytische

denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Trenngel: 10% Acrylamid/Bisacrylamid; Sammelgel: 4% Acrylamid/Bisacrylamid; siehe Abschnitt 6.8.) auf ihre Proteinzusammensetzung hin überprüft. Fraktionen mit hohem Rezeptor- und zugleich geringem ATPase-Gehalt werden vereinigt, mit H₂O bidest. auf das fünffache Volumen verdünnt und abschließend 30 min lang bei 39000 g pelletiert. Die Pellets werden in einem möglichst kleinem Volumen H₂O bidest. durch wiederholtes Auf- und Abziehen in einer Eppendorfpipette resuspendiert.

Puffer I:

NaCl	400 mM
Na _x H _x PO ₄ (pH 7,4)	20 mM
EDTA	2 mM
PMSF	100 µM
NaN ₃	0,02 % (w/v)

Puffer II:

Na _x H _x PO ₄ (pH 7,4)	20 mM
EDTA	2 mM
PMSF	100 µM
NaN ₃	0,02 % (w/v)

6.2. Methoden zur Proteinbestimmung

6.2.1. **Proteinbestimmung nach Bradford (1976)**

Grundlage dieser Methode ist die Färbung von Proteinen durch den Farbstoff "Coomassie Brilliant Blue", der unter sauren Bedingungen mit Aminogruppen interagiert. Das entstehende Konjugat absorbiert bei 595 nm und kann somit photometrisch quantifiziert werden. Die Anfälligkeit gegenüber Detergentien und Reduktionsmitteln stellt allerdings einen gravierenden Nachteil dieser Methode dar.

Proben mit einer Proteinmenge zwischen 2 und 20 µg werden mit H₂O auf ein Volumen von 500 µl gebracht und danach mit 500 µl Bradford-Reagenz versetzt. Parallel dazu wird eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA; 0 bis 20µg) erstellt und analog behandelt.

Bradford-Reagenz:

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,06 % (w/v)
Perchlorsäure (70-72 %)	42,8 % (w/v)

6.2.2. Proteinbestimmung mit der BCA-Methode (Pierce)

Diese Methode macht sich die Reduzierbarkeit von Proteinen unter alkalischen Bedingungen mit Cu^{2+} -Ionen zunutze. Das dabei entstehende Cu^+ bildet mit dem aromatischen System der Bicinchoninsäure einen violetten Komplex, dessen Absorption bei 562 nm verfolgt werden kann. Zwar stören bei diesem Test Detergentien nicht, es besteht jedoch eine starke Abhängigkeit von Temperatur und Inkubationsdauer.

Die Bestimmung wird mit einem Kit der Firma Pierce durchgeführt. Die Proben und eine Eichreihe mit BSA werden mit H_2O bidest. auf 50 μl gebracht. Dazu wird 1 ml BCA-Reagenz pipettiert (Lösungen A und B im Verhältnis 50 zu 1). Bei 60°C wird so lange im Thermoschüttler inkubiert, bis die Farbe der Proben von grün nach violett umschlägt. Nach dem Abkühlen der Proben wird die Absorption bei 562 nm bestimmt.

6.3. Vernetzung nativer nAChR -reicher Membranen

Theoretisch können für die Vernetzung des nAChR an den Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten verschiedene bifunktionelle Reagenzien verwendet werden, darunter die Lysin-spezifischen Vernetzer Dimethylsuberimidat (DMS) und Glutardialdehyd (Watty *et al.*, 1997). Die Vernetzung mit DMS ist jedoch mit drei Nachteilen verbunden: Zum einen ist DMS ein Agonist des nAChR, so dass ausschließlich der desensibilisierte Zustand des nAChR fixiert werden kann. Zum anderen müssen hohe Konzentrationen an Puffer zugesetzt werden, um die während der Vernetzung freigesetzte Säure abzufangen. Hohe Salzkonzentrationen wiederum verhindern die Assoziation von Ethidium an seine hoch-affine Bindungsstelle (Herz *et al.*, 1991). Ferner gelingt die Vernetzung mit DMS nie vollständig, so dass man Gefahr läuft, eine Mischung von vernetzten und unernetzten Rezeptoren zu analysieren. Für die Untersuchungen an fixierten Rezeptoren wurde im Rahmen dieser Arbeit daher ausschließlich Glutardialdehyd verwendet.

Glutardialdehyd kondensiert mit primären Aminen zu einer Schiff'schen Base. Aufgrund der Polykondensation des Glutardialdehyds kommt es allerdings auch zur Bildung weiterer Reaktionsprodukte. So entstehen durch Michael-Addition von Lysin an die Doppelbindung

des α - β -ungesättigten Aldehyds im polymerisierten Glutardialdehyd auch sekundäre Amine.

Die Vernetzung nAChR-reicher Membranen erfolgt optimalerweise in Gegenwart von 4 mM Glutardialdehyd in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 bei einer Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml. Wegen der niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit beträgt die Inkubationszeit mindestens 18 Stunden bei 20°C. Soll der Rezeptor im desensibilisierten Zustand vernetzt werden, erfolgt vorher eine viertelstündige Inkubation bei RT unter Zusatz von 100 μ M Carbachol. Sollen hinterher Bindungsstudien mit Agonisten oder kompetitiven Antagonisten durchgeführt werden, werden die rezeptorreichen Vesikel nach Abschluß der Reaktion fünfmal in einer Tischzentrifuge bei 4°C über 15 min mit höchster Umdrehung pelletiert und in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 resuspendiert, um das zugesetzte Carbachol auszuwaschen.

6.4. Bindungstests

6.4.1. [³H]ACh-Bindungstests

In [³H]ACh-Bindungstests werden Rezeptor-reiche Membranen in Ringer-Lösung zunächst über 30 min mit 0,1 M Eserin bei RT vorbehandelt, um die im Präparat vorhandene Acetylcholinesterase zu blockieren. Dann werden zu 160 μ l Proteinlösung 20 μ l Puffer und 20 μ l [³H]ACh (spezifische Radioaktivität: 40 mCi/mmol) pipettiert und weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Endkonzentration an [³H]ACh wird so auf Werte zwischen 3 und $62,5 \times 10^{-8}$ M eingestellt. Bei Bindungstests mit nAChR-reichen Vesikeln, die zuvor in Gegenwart verschiedener Liganden vernetzt worden waren (siehe Vernetzung nAChR-reicher Vesikel mit Glutardialdehyd), wurde die doppelte Proteinkonzentration eingesetzt, um neben den niedrig-affinen Rezeptoren im Ruhezustand auch den Anteil hoch-affiner Rezeptoren zu erfassen. Vor diesen Bindungstests wurde der bei der Präinkubation zugegebene Ligand durch wiederholte Zyklen von Pelletion und Resuspension entfernt (Tischzentrifuge, 4°C, 15 min, höchste Umdrehung).

Zur Bestimmung der Totalwerte werden 50 μ l des 200 μ l-Ansatzes entnommen. Die Trennung von gebundenem und freiem Ligand erfolgt danach aufgrund der relativ niedrigen Affinität des Acetylcholins durch Gleichgewichtszentrifugation. Dazu werden

die Ansätze nach Equilibrierung in einer Ultrazentrifuge (100.000 g, 20 °C, 20 min) pelletiert. Aus dem Überstand werden weitere 50 µl zur Bestimmung der Konzentration an freiem [³H]ACh entnommen. Die Radioaktivität in allen abgenommenen Aliquots wird durch Flüssigszintillation (3 ml Szintillatorflüssigkeit) in einem β-Zähler gemessen. Die Konzentration von gebundenem Ligand ermittelt man durch Subtraktion der freien Konzentrationen von den jeweiligen Totalwerten.

<u>Ringer-Lösung:</u>	NaCl	160 mM
	KCl	5 mM
	CaCl ₂	2 mM
	Na _x H _x PO ₄ pH 7,4	3 mM

Auswertung:

Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten aus [³H]ACh-Bindungstests erfolgt im sog. Scatchard-Plot. Hierfür wird der Quotient B/F über B aufgetragen, nach der linearisierten Michaelis-Menten-Gleichung

$$B/F = -1/K_D \cdot B + B_{\max} / K_D$$

wobei B der Konzentration an gebundenem und F der an freiem Ligand entspricht. B_{max} ist die maximale Konzentration an gebundenem Ligand.

Im Scatchard-Plot führt die Homogenität der vorliegenden Bindungsstellen (im Gegensatz zur kooperativen Ligandbindung) zu einem linearen Kurvenverlauf; die K_D errechnet sich aus dem negativen Kehrwert der Steigung, B_{max} kann aus dem Schnittpunkt mit der x-Achse abgelesen werden.

Weist der aus den Bindungsdaten resultierende Graph keine Linearität auf, so liegt das an der Heterogenität der vorliegenden Bindungsstellen, die bei allosterischen Proteinen häufig beobachtet wird. Das Ausmaß der Kooperativität der Ligandbindung kann mit Hilfe des sog. Hill-Plot ermittelt werden, dem die Gleichung

$$\log [B / (B_{\max} - B)] = \log K_D + n_H \log F$$

zugrunde liegt und der zur Ermittlung des Hill-Koeffizienten n_H führt.

Kompetitionsexperimente:

Um die Affinität nicht-radioaktiver Liganden für die Agonistbindungsstellen des nAChR zu bestimmen, wurde im Prinzip der gleiche Ansatz wie der eben beschriebene verwendet. In diesem Fall enthielten jedoch alle Ansätze die gleiche Konzentration an [³H]ACh (2 µM); außerdem wurden statt 20 µl Puffer 20 µl einer entsprechenden Effektorkonzentration zupipettiert, so dass die Endkonzentration der zu testenden Substanzen im Bereich zwischen 10 nM und 100 mM lag. Die Endkonzentration an Gesamtprotein lag bei 0,1 mg/ml, wenn im Ruhezustand vernetzte Rezeptoren, und bei 0,2 mg/ml, wenn im desensibilisierten Zustand vernetzte Rezeptoren untersucht werden sollten. Die Ermittlung der Konzentrationen von freiem und gebundenen [³H]ACh erfolgte wie oben beschrieben.

Die IC₅₀ kann aus der Auftragung von $\lg [P' / (1-P')]$ gegen den Logarithmus der Ligandkonzentration ermittelt werden. P' entspricht dem Quotienten B / B_{max}, wobei B hier der Konzentration an gebundenem [³H]ACh in Anwesenheit von Effektoren entspricht, während B_{max} die Konzentration an [³H]ACh in Abwesenheit von Effektor repräsentiert. Der Plot resultiert in einer Geraden, deren Schnittpunkt mit der x-Achse die IC₅₀ anzeigt. Aus der IC₅₀ kann unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen (etwa fünf- bis zehnfacher Überschuss an [³H]ACh über B_{max}) die Dissoziationskonstante des Inhibitors (K_i) gemäß der Formel

$$IC_{50} = K_i \cdot (1 + (F / K_D))$$

berechnet werden, wobei F in etwa der Konzentration an eingesetztem [³H]ACh entspricht (2 µM).

6.4.2. Fluoreszenztitrationen

Alle Fluoreszenzspektren wurden mit einem Aminco Bowman Spektrometer Serie 2 (Rochester, USA) aufgenommen.

Bestimmung Dissoziationskonstante von Ethidium:

In einer Küvette wurden nAChR-reiche Membranen in einer Konzentration von ca. 100 nM in 50 mM Na_xH_xPO₄, pH 7,4 vorgelegt. Zu dieser Suspension wurden aufsteigende Mengen Ethidium pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Fluoreszenzemission

zwischen 550 nm und 650 nm bestimmt. Eine zweite Küvette, die zur Bestimmung der Fluoreszenz von ungebundenem Ethidium diente, enthielt zudem noch 300 μM TPMP⁺ und wurde analog behandelt. Die Emissionskurven, die mit beiden Küvetten erhalten wurden, wurden zur Berechnung der spezifischen Fluoreszenz für jede einzelne Ethidiumkonzentration voneinander abgezogen. Die Intensität der Emission bei 595 nm diente als Meßgröße für den Grad der Bindung von Ethidium am nAChR. Ab einer ausreichenden Ethidiumkonzentration wurde die spezifische Emission nicht mehr stärker, da alle hoch-affinen Bindungsstellen im Ansatz besetzt waren. Alle Meßwerte wurden auf diesen Sättigungswert bezogen. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten der Bindung von Ethidium an den nAChR in verschiedenen Zuständen erfolgte durch Scatchard-Plots.

Kompetitionsexperimente:

Zu einer Suspension von nAChR-reichen Membranen (Rezeptorkonzentration: 1 μM) in 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 7,4, 3 μM bzw. 6,5 μM Ethidium, und 1mM Carbamoylcholin wurden schrittweise aufsteigende Konzentrationen von kompetierendem Ligand eingestellt. Nach jeder Zugabe folgte eine 15 minütige Inkubation; dann wurde die Fluoreszenzemission in einem Wellenlängenbereich zwischen 540 nm und 740 nm bestimmt. Die Anregung erfolgte bei 490 nm (Spaltbreiten: 4 nm / 4 nm).

Analyse der Ligandbindung:

Aus ihrer Kapazität, Ethidium aus seiner Bindungsstelle zu verdrängen, können apparente Dissoziationskonstanten auch für nicht-fluoreszierende Liganden berechnet werden. Dazu werden die Messpunkte nach folgender logarithmischen Funktion aufgetragen (Taylor & Lappi, 1975):

$$\lg [(f_{\text{EtBr}} - f) / (f - f_{\text{NCl}})] = n_H \cdot \lg (K_{\text{EtBr}} / K_{\text{NCl}}) + n_H \lg ([\text{NCl}]_{\text{frei}} / [\text{EtBr}]_{\text{frei}})$$

wobei f_{EtBr} der Fluoreszenz in Abwesenheit von kompetierendem Liganden entspricht, f_{NCl} der Emission, wenn Ethidium vollständig durch 300 μM TPMP⁺ verdrängt worden ist, und f der Emission bei jeder beliebigen Konzentration von kompetierendem Liganden im Verlauf der Titration. $[\text{NCl}]_{\text{frei}}$ und $[\text{EtBr}]_{\text{frei}}$ repräsentieren die Konzentrationen an freiem Kompetitor und freiem Ethidium. Ihre Berechnung erfolgt nach den Formeln:

$$[\text{NCI}]_{\text{frei}} = [\text{NCI}]_{\text{total}} - [(f_{\text{EtBr}} - f) / (f_{\text{EtBr}} - f_{\text{NCI}})] [\text{nAChR}]$$

$$[\text{EtBr}]_{\text{frei}} = [\text{EtBr}]_{\text{total}} - [(f - f_{\text{NCI}}) / (f_{\text{EtBr}} - f_{\text{NCI}})] [\text{nAChR}]$$

K_{NCI} und K_{EtBr} bezeichnen die Dissoziationskonstanten der entsprechenden Liganden.

Aus den Auftragungen von $\lg [(f_{\text{EtBr}} - f) / (f - f_{\text{NCI}})]$ über $\lg ([\text{NCI}]_{\text{frei}} / [\text{EtBr}]_{\text{frei}})$, die den Hill-Plots sehr ähnlich sind, ergeben sich aus den Schnittpunkten mit der Abszisse die Dissoziationskonstanten für die verdrängende Substanz, denn hier gilt

$$\lg [(f_{\text{EtBr}} - f) / (f - f_{\text{NCI}})] = 0$$

und $\lg K_{\text{NCI}} = \lg K_{\text{EtBr}} + \lg ([\text{NCI}]_{\text{frei}} / [\text{EtBr}]_{\text{frei}})$

Es wurde die für den jeweiligen Zustand der Membranen charakteristische Dissoziationskonstante für Ethidium zugrunde gelegt, d.h. 75 nM für den nativen nAChR und 250 nM für den vernetzten desensibilisierten nAChR.

6.4.3. α -Bungarotoxin-Bindungstests (nach Hartig und Raftery, 1979)

6.4.3.1. Bestimmung der Anzahl der α -BgTx-Bindungsstellen im Präparat

α -Bungarotoxin aus *Bungarus multicinctus* ist ein Neurotoxin, das als hochaffiner kompetitiver Antagonist am muskeltypischen nAChR mit einer Dissoziationskonstante im picomolaren Bereich quasi-irreversibel bindet. Folgendermaßen läßt sich daher der genaue Rezeptorgehalt der Membranpräparation über die Bindung von [^{125}I]- α -Bungarotoxin bestimmen:

Zunächst werden die Membransuspension auf ca. 40 $\mu\text{g/ml}$ und die [^{125}I]-BgTx-Stammlösung auf 5,5 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt (spezifische Radioaktivität am Ende: etwa 500 cpm/pmol). Durch die Versetzung mit dem Detergens Triton werden dabei die rezeptorreichen Membranen aufgelöst, so dass einzelne Rezeptor-Dimere in Lösung vorliegen. Je 30 μl der Toxinverdünnung werden mit aufsteigenden Volumina (0-150 μl) der verdünnten Membransuspension versetzt, die Ansätze dann auf je 200 μl aufgefüllt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden von jedem Ansatz 50 μl auf separate Whatman DE 81-Filter (kationisch) pipettiert; dabei bindet nur der negativ

geladene α -BgTx-Rezeptor-Komplex am Filter, nicht aber das freie positiv geladene Toxin. Zusätzlich werden aus beliebigen Ansätzen je 50 μ l auf Filter pipettiert, die zur Ermittlung des Totalwerts an eingesetzter Radioaktivität dienen. Alle Filter außer den zuletzt genannten werden dreimal 15 min lang mit 10 ml Waschpuffer pro Filter gewaschen und danach in 2 ml Szintillationsgefäßen im γ -Zähler gemessen. Die Filter zur Bestimmung des Totalwertes werden ungewaschen genauso vermessen.

Auswertung:

Die Zählwerte werden nach Abzug des Nullwerts graphisch gegen das Volumen der eingesetzten Rezeptorlösung aufgetragen. Die resultierende Kurve weist einen hyperbolischen Verlauf auf und zeigt ab einer bestimmten Rezeptormenge Sättigung an. Der Quotient aus dem Sättigungswert und dem Totalwert ergibt den Anteil an bindungsfähigem Toxin. Aus der Steigung der Kurve bei niedrigen Rezeptormengen erhält man durch den Vergleich mit dem Totalwert die Menge an α -Bungarotoxin, die pro Volumen Rezeptorlösung gebunden wurde. Die relativen Molekülmassen von Rezeptor (300 kD) und Toxin (8kD) erlauben nun die genaue Berechnung der Konzentration des Rezeptors in der Ausgangslösung, wobei berücksichtigt werden muss, dass pro Rezeptormonomer zwei Moleküle Toxin binden können.

<u>Waschpuffer:</u>	NaCl	50 mM
	Na _x H _x PO ₄ , pH 7,4	10 mM
	Triton-X-100	0,1% (w/v)

6.4.3.2. Abhängigkeit der α -BgTx-Bindung an nAChR-reiche Membranen von Packungsdichte und Membranfluidität

Um die Packungsdichte bzw. die Fluidität der Membran zu variieren, wurden native rezeptorreiche Vesikel mit zunehmenden Konzentrationen von Triton-X-100 schrittweise solubilisiert, oder bei unterschiedlichen Temperaturen mit α -BgTx inkubiert.

Sowohl rezeptorreiche Vesikel als auch die α -BgTx-Stammlösung wurden mit Puffer I auf 100 μ g/ml bzw. auf 5,5 μ g/ml verdünnt. Um die Bindungstests, die bei verschiedenen Tritonkonzentrationen durchgeführt wurden, zuverlässig miteinander vergleichen zu

können, wurde darauf geachtet, dass für alle Tests einer Messreihe stets dieselben Verdünnungen verwendet wurden, die dann - falls nötig - nachträglich mit Triton in den angegebenen Konzentrationen versetzt wurden. 40 µl der verdünnten Membransuspension (finale Konzentration im Ansatz 4µg/ml) wurden mit aufsteigenden Volumina der Toxinverdünnung (0 - 160 µl) versetzt; mit Puffer I (mit den entsprechenden Tritonkonzentrationen versetzt) wurden alle Ansätze auf 200 µl aufgefüllt. Die Proben wurden dann im Fall der Solubilisierung mit Triton-X-100 eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert; im Fall der Temperaturvariation erfolgte die Inkubation bei 4°C (4 h), 15°C (2 h), 25°C (1h) bzw. 35°C (1h). Dann wurden wie oben beschrieben Aliquots aus den Ansätzen entnommen, um das Ausmaß der Bindung von α-BgTx an die nAChR-reichen Membranen zu bestimmen. Die resultierenden Bindungskurven wiesen auf unspezifische Bindung von [¹²⁵I]-α-BgTx an die Filter hin. Das Ausmaß dieser unspezifischen Bindung wurde über Parallelansätze ermittelt, die alle Komponenten außer der nAChR-reichen Membranen enthielten, und ging als Korrekturwert in die Berechnung der spezifischen Bindung ein.

<u>Puffer I:</u>	NaCl	50 mM
	Na _x H _x PO ₄ , pH 7,4	10 mM
	Casein	0,125% (w/v)
	Triton-X-100	(in den angegebenen Konzentrationen) (w/v)

6.4.3.3. Zeitabhängigkeit der α-BgTx-Bindung bei verschiedenen Temperaturen

Um den Zeitverlauf der α-BgTx-Bindung bei verschiedenen Temperaturen zu verfolgen, wurden native nAChR-reiche Vesikel (finale Konzentration an Gesamtprotein 4 µg/ml) mit [¹²⁵I]-α-BgTx (finale Konzentration: 0,8 µg/ml) im oben beschriebenen Puffer I ohne Triton versetzt. (Alle Lösungen waren eine Stunde lang bei den angegebenen Temperaturen vorinkubiert worden). Aus allen Ansätzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots von je 30 µl entnommen und auf Whatman DE-81-Filter pipettiert, um wie oben beschrieben den Anteil an gebundenem Toxin zu bestimmen. Alle Filter wurden schnellst möglich nach Probenentnahme zunächst in kaltem Waschpuffer gespült; die beiden folgenden Waschschrte erfolgten in ungekühltem Puffer.

6.5. Radioaktive Jodierung von NTII

10 μl NTII (2 mg/ml) in bidest. Wasser und 3 μl 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 7,4 werden mit 5 μl K^{125}I (1mg/ml in 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 7,4 ; spezifische Aktivität mindestens 10^6 cpm/nmol) gemischt. Die Jodierungsreaktion wird durch Zugabe von 15 μl Chloramin T (CAT, 0,5 mg/ml in 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 7,4) gestartet. Nach siebenminütiger Inkubation bei RT wird die gesamte Reaktionsmischung mittels Umkehr-Phasen-HPLC (Säule: Vydac- C_{18} ; Elution: H_2O / 0,1 % TFA; CH_3CN / 0,085 % TFA; Flussrate: 1 ml/min; Gradient: 1 %/min; $\lambda = 280$ nm) in ihre Einzelbestandteile getrennt. Ein Aliquot von jeder HPLC-Fraktion (je 1ml Gesamtvolumen) wird im γ -Zähler auf den Gehalt an ^{125}I hin überprüft. Die radioaktiven Fraktionen mit dem bijodiertem bzw. die mit dem monojodiertem NTII werden vereinigt und durch Vakuumkonzentration in der Speed-vac eingengt. Der Einbau des radioaktiven Jods wird durch MALDI-Massenspektrometrie überprüft.

Bei den Bindungstests mit $[\text{}^{125}\text{I}]\text{NTII}$ wurden gebundener und freier Ligand durch Gleichgewichtszentrifugation getrennt (siehe Abschnitt 6.4.1.)

6.6. MALDI-Massenspektrometrie

Die Massenanalyse von Peptiden erfolgt mit der Matrix-Assisted-Laser-Desorbtion-Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS). Hierfür wird die Probe in einem Überschuss einer kristallisierenden Matrix eingebettet. Durch die Interaktion mit der Matrix kommt es zur Abschwächung der intermolekularen Kräfte zwischen den Probenmolekülen und vermutlich auch zur Ionisierung. Die Matrix absorbiert Energie eines Lasers, wodurch ein Bruchteil der Matrixmoleküle in die Gasphase überführt werden. Dabei werden einige desorbierte Probenmoleküle mitgerissen. Dann werden die gasförmigen Ionen in der Ionenquelle durch Anlegen einer Spannung beschleunigt. Die Detektion der Ionen erfolgt in einem Time Of Flight-Detektor (TOF); die Fluggeschwindigkeit der Ionen ist propotional zu ihrem Masse-Ladungsverhältnis (m/z).

Die möglichst salz- und detergenzienfreien Proben werden durch Lyophyllisierung zur Trockene eingengt und in einem kleinen Volumen (1-2 μl) 50 % Acetonitril / 0,1% TFA

aufgenommen. Dann wird das gleiche Volumen einer gesättigten Lösung der Matrix α -Cyanozimtsäure zugesetzt. Schließlich werden die Proben auf den Probensteller pipettiert und im Vakuum mit einem UV-Laser ionisiert.

6.7. Verdau mit Proteinase K

Rezeptorreiche Membranen (2,5 mg; finale Proteinkonzentration: 1 mg/ml) wurden zunächst mit 1 mM Carbamoylcholin und 10 μ M Ethidiumbromid in 100 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 8 für 15 min bei RT inkubiert, um eine hoch-affine Ethidiumbindung zu ermöglichen. Dann wurde der eigentliche Verdau gestartet. Dazu wurden die Proben auf 37°C gebracht, mit 1 mg/ml PnK versetzt und etwa 25h lang geschüttelt. Nach 7 und 20 h Inkubation wurde noch einmal je 1 mg/ml PnK zugegeben. Schließlich wurde die Reaktion durch 15-minütige Behandlung mit 0,5 mM PMSF bei RT gestoppt. Die Lösung wurde dann auf 0,5 M NaCl gebracht und eine Stunde bei 4°C geschüttelt. Durch zweimalige Verdünnung mit 5 Volumina kaltem 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 7,4 und anschließende Ultrazentrifugation (30.000 rpm; 4°C; 20 min; Rotortyp: TFT 65.13) wurden während des Verdau freigesetzte Peptide von den Vesikeln getrennt. Die pelletierten Vesikel wurden schließlich in 1,2 ml 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 7,4 resuspendiert und unter 20-minütigem starkem Schütteln bei 4 °C mit 6 μ M Ethidiumbromid equilibriert. Der Erfolg des Verdau kann mit einer SDS-PAGE überprüft werden.

Die Ansätze wurden danach geteilt und mit Puffer auf 1 ml gebracht; eine Hälfte wurde nach weiterer Verdünnung mit 600 μ l 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 7,4 / 6 μ M Ethidiumbromid in Fluoreszenzmessungen eingesetzt, von der anderen Hälfte wurden 200 μ l in eine Proteinbestimmung mit der BCA-Methode, die restlichen 800 μ l in einen Bindungstest mit [125 I] α -BgTx eingesetzt. Nach Abschluss des Verdau sind etwa 70 ± 5 % des gesamten Proteins degradiert und nur noch 2-5 % der ursprünglichen Bindungsstellen für α -BgTx detektierbar.

6.8. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Mit dem Biorad-Gelsystem werden Flachgele (10 % Trenngel; 4 % Sammelgel) gegossen. Nach dem Einbau in die entsprechende Gelapparatur wird die Kammer mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proben werden nach Zugabe von Probenpuffer 5 min bei 95°C erhitzt und danach kurz in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die Überstände werden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Die Trennung erfolgt bei maximal 20 mA (0,75 mm Geldicke).

<u>Trenngel:</u>	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)	10 % (w/v)
	Tris/HCl pH 8,8	375 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	750 µg/ml
	TEMED	1 µl/ml

<u>Sammelgel:</u>	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)	4 % (w/v)
	Tris/HCl pH 6,8	125 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	750 µg/ml
	TEMED	1 µl/ml

<u>Elektrophorese-Puffer:</u>		
	Tris/HCl pH 8,3	25 mM
	Glycin	190 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

<u>Probenpuffer (4x):</u>		
	Tris/HCl pH 6,8	62,5 mM
	Glycerin	20 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	5 % (w/v)
	SDS	3 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)

Am Ende der Elektrophorese wird das Gel gefärbt und entfärbt.

Färbung mit Coomassie

Das Gel wird in einer Schale mit Färbelösung 30 bis 60 min lang (je nach Schichtdicke) langsam geschüttelt. Danach wird es so lange mit Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden deutlich blaugefärbt hervortreten, der Hintergrund aber durchsichtig geworden ist. Schließlich wird das Gel zwischen Zellophan und Filterpapier unter Vakuum getrocknet.

<u>Färbelösung:</u>	Serva Blue R-250	0,1 % (w/v)
	Isopropanol	30 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (w/v)

Entfärbelösung: wie Färbelösung ohne Farbstoff

6.9. Bestimmung des Ordnungsparameters nativer nAChR-reicher Membranen bei verschiedenen Temperaturen

Um den Einfluss der Temperatur auf die Membranfluidität zu ermitteln, wurde ESR-Spektroskopie eingesetzt. Als Lipidsonde diente das spinmarkierte Lipidanalogen I(13/2)-doxyl-Stearinsäure. Die gewünschte Menge (final 1,0 - 1,5 mol % von endogenen Lipiden in nAChR-reichen Membranen; als Grundlage für die Berechnung diente eine Lipidbestimmung von Gonzales-Ros *et al.*, 1982) wurde in ein Glasröhrchen überführt. Nach dem Abdampfen des Chloroform/Methanol-Gemisches (1:1 v/v) unter einem Stickstoffstrom wurde das Fettsäurederivat in 10 µl TPS durch Vortexen und Ultraschallbehandlung resuspendiert. Dann wurden 50 µl nAChR-reicher Membranen (5-6 mg/ml) zugegeben und sorgfältig mit der Lipidsuspension gemischt. Die Mischung wurde zur Messung in eine Glaskapillare überführt. ESR-Spektren wurden mit einem Bruker ECS 106 ESR-Spektrometer mit einer Magnetfeldstärke von 100 MHz aufgenommen. Die Messkapillare war von einem Dewargefäß aus Quarz umgeben, durch das trockener Stickstoff bei konstanter Temperatur geleitet wurde. Die Spektren wurden unmittelbar nach Markierung der Probe mit einer Mikrowellenstärke von 20 mW

aufgenommen. Bei jeder Temperatur wurden acht bis sechzehn Spektren akkumuliert, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Die resultierenden Spektren wurden bezüglich der äußeren ($A_{||}$) und inneren (A_{\perp}) Hyperfeinaufspaltung analysiert. Der Ordnungsparameter s_{mol} bei den unterschiedlichen Temperaturen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$s_{mol} = \tau_{app} \cdot [(A_{||} - A_{\perp})/a_0], \text{ mit } \tau_{app} = 0,5407 \text{ und } a_0 = 1/3 (A_{||} - 2A_{\perp})$$

6.10. Manipulation des Cholesteringehalts nAChR-reicher Membranen

6.10.1. Entzug von Cholesterin

Methyl- β -Cyclodextrin kann spezifisch Cholesterin komplexieren. Die Spezifität beruht dabei auf der Einschlussgröße der Cycloheptaamylose. Durch Inkubation einer konstanten Menge nAChR-reicher Membranen mit steigenden Konzentrationen von Methyl- β -Cyclodextrin kann das optimale Konzentrationsverhältnis für die Depletion der Membranen ermittelt werden. Im Falle der nAChR-reichen Vesikel kann die Depletion unter folgenden Bedingungen durchgeführt werden:

1 mg/ml rezeptorreiche Membranen werden mit 50 mg/ml Methyl- β -Cyclodextrin 15 min lang bei RT unter Schütteln inkubiert. Durch Zusatz von 500 μ M EDTA, 500 μ M PMSF, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Aprotinin wird ein Abbau der Rezeptoruntereinheiten durch endogene Proteasen verhindert. Dann wird das Cyclodextrin durch viermalige Pelletion und Resuspension in Ringerlösung entfernt.

6.10.2. Rückführung von Cholesterin in depletierte nAChR-reiche Membranen

Die Rückführung von Cholesterin in Cholesterin-verarmte Membranen gelingt mit einem ähnlichen Verfahren: Durch einstündige Inkubation von 1,5 mg Cholesterin in 100 mg/ml Methyl- β -Cyclodextrin bei 80°C wird eine konzentrierte Stammlösung von komplexiertem Cholesterin hergestellt. Dann werden nAChR-reiche Membranen (Konzentration an Gesamtprotein: 1 mg/ml) mit den gewünschten Konzentrationen des komplexierten

Steroids unter 20-minütigem Schütteln bei RT equilibriert; liegt die Cholesterinkonzentration dabei über 400 μM , kann man davon ausgehen, dass die Membranen nach Abschluss der Behandlung annähernd soviel Cholesterin enthalten wie die nativen Vesikel.

6.10.3. Lipidextraktion (nach Bligh & Dyer, 1959)

Rezeptorreiche Membranen werden gegebenenfalls durch Pelletion und Resuspension in TPS auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml gebracht. Die Proben werden mit 2,2 Volumina MeOH und 1 Volumen Chloroform versetzt; nach kurzem Vortexen sollte nur eine Phase sichtbar sein. Falls nicht, muss tropfenweise MeOH zugesetzt werden. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis unter häufigem Vortexen werden nochmals je ein Volumen Wasser (oder 10 mM Essigsäure, falls saure Lipide präpariert werden sollen) und ein Volumen Chloroform zugesetzt. Nach gründlichem Vortexen erfolgt bei 3000 rpm in der Kühlzentrifuge die Phasentrennung. Die schwerere untere Chloroformphase wird abgenommen und in ein frisches Glasgefäß transferiert. Nach dem Abdampfen des Chloroforms wird der Lipidextrakt unter Stickstoff gesetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

6.10.4. Cholesterinbestimmung

Die Bestimmung der Cholesterinmenge im Lipidextrakt erfolgt mit einem Kit der Fa. Boehringer (Mannheim). Durch zwei aufeinander folgende enzymatische Reaktionen (Oxidation von Cholesterin durch Cholesterinoxidase unter Bildung von H_2O_2 ; Oxidation von Methanol zu Formaldehyd mit H_2O_2 durch Katalase) entsteht Formaldehyd, der mit Ammoniumionen und Acetylaceton zu einem gelben Farbstoff umgesetzt werden kann. Dieser Farbstoff wird in stöchiometrischen Mengen zum vorgelegten Cholesterin gebildet und kann über seine Absorption von sichtbarem Licht (405 nm) quantifiziert werden.

Die Probenlösung wird mit Isopropanol auf eine Konzentration von 0,07 bis 0,4 mg/ml gebracht; das Endvolumen der Probe beträgt 400 μl . Drei Teile von Testlösung 1 (Ammoniumphosphatpuffer, pH 7; Methanol; Katalase) und zwei Teile von Lösung 2

(Acetylaceton; Methanol) werden gemischt und vor Gebrauch eine Stunde lang bei RT stehen gelassen. Dann wird die Probelösung mit 5 ml dieser Lösung versetzt und gut gemischt. 2,5 ml dieser Mischung werden danach mit 20 µl von Lösung 3 (Cholesterinoxidase) versetzt und ein Stunde bei 37 °C inkubiert. Die übrigen 2,5 ml werden ohne Zusatz von Lösung 3 genauso weiterbehandelt (Nullwert). Nach Abkühlen auf RT werden die Absorptionen von Probe und Nullwert bei 405 nm bestimmt und voneinander abgezogen. Aus der Differenz kann über den Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs die Cholesterinmenge bestimmt werden.

6.11. Materialien

Geräte

Ultrazentrifuge	TGA-65 Kontron, München
Kühlzentrifuge	Centricon H-401, Kontron-Hermle, München
Tischzentrifuge	Modell 5415S, Eppendorf, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf-Ultrazentrifuge	Beckmann
Photometer	Modell UV-1202, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan
Peristaltische Pumpe	Gilson Abimed Miniplus 2, Abimed, Düsseldorf
Elektrophorese-Systeme	Flachgelapparatur, BioRad, Richmond, Californien
Spannungsquellen	Modell 380, ISCO, Lincoln / Nebraska Modell ECSP 3000/150, Pharmacia
pH-Messgerät	Modell 643, Knick, Berlin mit Elektrode N 5700 A (Schott, Hofheim)
Fluoreszenzspektrometer	Aminco Bowman Spectrometer series 2, Rochester, USA
ESR-Spektrometer	Bruker ECS 106
γ-Zähler	Radioaktivitätszähler MR 252, Kontron, München
β-Zähler	Modell 1209 Rackbeta, Pharmacia, Freiburg
rp-HPLC	600S Controller mit 490E Multiwavelength Detektor und 626 Pumpe, Waters, Eschborn
Trennsäule	Vydac-Narrowbore, C ₁₈ , MZ-Analysentechnik

Vakuumkonzentrator	Evaporatorzentrifuge Univapo VUC 150 H, Lyophyllisator GT 2; Leybold-Heraeus, Köln
Massenspektrometer	Bruker Reflex (Bruker Daltonik, Bremen) (MALDI-TOF-Massenspektrometer mit Reflektor und kontinuierlicher Extraktion)

Gewebe

Winkler Enterprises, San Pedro, Kalifornien

Radiochemikalien

[³ H]ACh	40 mCi/mmol, NEN Du Pont, Dreieich
[¹²⁵ I]α-BgTx	1 μCi/μg, NEN Du Pont, Dreieich

Alle übrigen Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität von unterschiedlichen Firmen bezogen.