EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG VON NEUROTRANSMITTERREZEPTOREN DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS

Vom Fachbereich der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwisenschaften"
genehmigte

Dissertation

(D386)

vorgelegt von

Dipl. Chem. Markus Safferling

Betreuer der Arbeit: Dr. Dean Madden
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. Mai 2000

Kaiserslautern 2000

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1995 bis Dezember 1999 am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg angefertigt.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. Mai 2000

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. F. Preuss

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. W. Trommer

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. K. C. Holmes

Die vorliegende Arbeit ist zu wesentlichen Teilen durch die tatkräftige Hilfe zahlreicher Kollegen und Freunde ermöglicht worden. Ich bedanke mich zunächst bei all jenen, die hier nicht namentlich genannt sind, aber doch auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Dean Madden, der mir im Verlauf dieser Arbeit durch immer neue Ideen und seine Geduld viel Unterstützung hat zuteil werden lassen. Die Themenstellung empfand ich als ausgesprochen interessant und die gute und intensive Betreuung hat wesentlich dazu beigetragen, mich für das Forschungsgebiet der Membranproteine zu begeistern.

Aus der überaus netten Arbeitsgruppe möchte ich Herrn Dr. Rupert Abele herausheben, der mir über die längste Zeit dieses Projektes als Ideengeber, Lehrer und Diskussionspartner zur Verfügung stand und eine grosse Hilfe gewesen ist. Bei Frau Doris Bader und Herrn Günther Kümmerle bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Isolierung des GluRB und die selbstlose Hilfe wenn "das Protein mal wieder knapp war". Ausgesprochen dankbar bin ich ausserdem Frau Helga Cissé und Herrn Dr. Willem Tichelaar für die zahlreichen elektronenmikroskopischen Untersuchungen meiner Proteinproben und unzählige fruchtbare Diskussionen rund um strukturelle Aspekte des GluRB. Auch alle anderen Mitarbeiter der Gruppe haben durch ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität ein sehr angenehmes Arbeitsklima geschaffen, das ich sicherlich vermissen werde.

Bei Prof. Dr. Kenneth Holmes bedanke ich mich für die Aufnahme in der Abteilung Biophysik zu Beginn des Projektes und auch für seine Bereitschaft als Gutachter zur Verfügung zu stehen. Allen Mitarbeitern der Abteilung Biophysik sei herzlich für die zahllosen Hilfestellungen im ersten Jahr meiner Promotion gedankt. Dr. Veit Witzemann und seine Mitarbeiter aus der Abteilung Zellphysiologie haben mich beim α7-Projekt tatkräftig unterstützt, auch dafür vielen Dank.

Dr. Shirley Müller und Frau Sabine Wirtz vom Biozentrum der Universität Basel haben zu wesentlichen Teilen die STEM-Messungen durchgeführt und waren sehr hilfsbereit bei der Interpretation der Daten. Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. Richter vom Institut für Ultrastrukturforschung in Jena bedanken, der die Gefrierbrechungen vornahm.

Ein ganz grosser Dank gebührt ausserdem Dr. Arja Kuusinen und Dr. Kari Keinänen von der Universität Helsinki, die mich zur Einarbeitung in die Glutamatrezeptorisolation sehr freundschaftlich in ihre Gruppe aufgenommen haben.

Ein herzliches Dankeschön auch an Prof. Dr. Wolfgang Trommer von der Universität Kaiserslautern für die Begutachtung der Arbeit und sein Interesse an diesem Forschungsprojekt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 14

1.1. DAS ZENTRALE NERVENSYSTEM 14

1.2. DIE FAMILIE DER LIGANDENGESTEUERTEN IONENKANÄLE 15

1.3. NEURONALE NIKOTINISCHE ACETYLCHOLINREZEPTOREN 16

1.3.1. FUNKTION IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM 17

1.3.2. MEMBRANTOPOLOGIE UND STRUKTUR 18

1.3.3. DER HOMOMERE α7-ACETYLCHOLINREZEPTOR 19

1.4. IONOTROPE GLUTAMATREZEPTOREN 20

1.4.1. NMDA-REZEPTOREN 22

1.4.2. NON-NMDA-REZEPTOREN 22

1.4.3. STRUKTUR DER IONOTROPEN GLUTAMATREZEPTOREN 25

1.4.3.1. OLIGOMERISIERUNG 25

1.4.3.2. MEMBRANTOPOLOGIE 26

1.5. STRUKTURAUFKLÄRUNG VON MEMBRANPROTEINEN 29

1.5.1. BEISPIELE ERFOLGREICHER STRUKTURBESTIMMUNGEN 29

1.5.2. EINZELPARTIKELANALYSE UND REKONSTITUTION 30

1.5.3. LIMITIERUNGEN BEI EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON MEMBRANPROTEINEN. 31

1.5.4. AUSWAHL EINES GEEIGNETEN EXPRESSIONSSYSTEMS 32

1.5.4.1. BAKTERIEN ALS WIRTSORGANISMEN 32

1.5.4.2. HEFE-EXPRESSIONSSYSTEME 32

1.5.4.3. BACULOVIRUSEXPRESSIONSSYSTEME 33

1.5.4.4. ANDERE EXPRESSIONSSYSTEME 35

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT 36

3. MATERIALIEN UND METHODEN 37

3.1. NUKLEOTIDSEQUENZEN UND PRIMÄRSTRUKTUREN 37

3.1.1. CDNA DES α7-ACETYLCHOLINREZEPTORS 37

3.1.2. Proteinsequenz des α7-nAChR 38
3.1.3. Proteinsequenz des iGluRB$_{FLOP}$ 38
3.2. Darstellung rekombinanter Baculoviren 40
3.2.1. Klonierung des α7-Proteins in das Donorplasmid 40
3.2.1.1. Der Vektor pLM1 40
3.2.1.2. Der Vektor pFastBac1 41
3.2.1.3. Enzymatisches Aufschneiden der Vektoren 41
3.2.1.4. Präparative Agarose-Gelelektrophorese 42
3.2.1.5. DNA-Extraktion aus Agarose 43
3.2.1.6. Ligation von α7 und pFast Bac 43
3.2.1.7. Transformation 44
3.2.1.8. Minipräparation der Plasmid-DNA 45
3.2.1.9. Kontrollverdau der rekombinanten pFastBac-Plasmide 45
3.2.1.10. DNA-Konzentrationsbestimmung 45
3.2.2. Herstellung rekombinanter Virus-DNA 46
3.2.2.1. Kompetente DH10Bac-Zellen 46
3.2.2.2. Transposition 47
3.2.2.3. Isolierung der rekombinanten viralen DNA 48
3.2.3. Herstellung rekombinanter Baculoviren 49
3.2.3.1. Transfektion der Insektenzellen 49
3.2.3.2. Plaque Bildung zur Titerbestimmung 49
3.2.3.3. Virusvermehrung 50
3.2.4. Rekombinante Baculoviren für den Glutamatrezeptor 52
3.3. Insektenzellkultur 52
3.3.1. Baculoviridae 52
3.3.2. Baculovirus-Expressionssystem 52
3.3.3. Zelllinien 53
3.3.4. Auftauen von Insektenzellen 53
3.3.5. Kultivierung der Insektenzellen 54

3.3.6. Einfrieren der Insektenzellen 55
3.3.7. Trypanblaufärbung 55
3.4. Bakterienzellkultur 55
3.4.1. Klonierung rekombinanter Plasmide 55
3.4.1.1. Vorbereitung der DNA, Ligation und Transformation 55
3.4.1.2. Kontrollverdau mit HincII 56
3.4.1.3. Maxipräparation der rekombinanten Vektoren 57
3.4.1.4. DNA-Konzentrationsbestimmung 58
3.4.2. Transformation von C41 und C43 58
3.4.3. Expression in C41 und C43 58
3.4.3.1. Zellmedien 58
3.4.3.2. Expressionsansätze 59
3.4.3.3. Gesamtzellaufschluss 59
3.4.3.4. Fraktionierter Zellaufschluss 59
3.5. Hefezellkultur mit *Pichia pastoris* 60
3.5.1. Klonierung rekombinanter Plasmide 60
3.5.2. Transformation von Pichia pastoris 63
3.5.2.1. Vorbereitung der Zellen 63
3.5.2.2. Linearisierung der Plasmide 63
3.5.2.3. Elektroporation 64
3.5.3. Expressionsversuche in *Pichia pastoris* 65
3.5.3.1. Wachstumsmedien 65
3.5.3.2. Expression und Membranisolierung 65
3.6. Allgemeine Methoden 66
3.6.1. SDS-PAGE 66
3.6.2. Silberfärbung 67
3.6.3. Western-Blot 67
3.6.3.1. Anti-α7-AChR-Antikörper 68
3.6.3.2. M1- und M2-Antikörper 68

3.6.4. TCA-FÄLLUNG 69
3.6.5. BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN 69
3.6.5.1. BRADFORD-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG 69
3.6.5.2. AMIDOBLACKBESTIMMUNG 70
3.6.5.3. BCA-BESTIMMUNG 71
3.6.6. DECYLMALTOSID-BESTIMMUNG 71
3.7. PROTEINEXPRESSION UND -AUFREINIGUNG 72
3.7.1. α7-ACETYLCHOLINREZEPTOR 72
3.7.1.1. EXPRESSIONSBEDINGUNGEN 72
3.7.1.2. ISOLIERUNG DER MEMBRANPROTEINE 72
3.7.1.3. SOLUBILISIERUNG 73
3.7.1.4. NI/NTA-AUFREINIGUNG 73
3.7.1.5. NACHWEIS DER POLYHISTIDINMARKIERUNG 73
3.7.1.6. AUFREINIGUNG MIT IMMOBILISIERTEM STREPTAVIDIN 74
3.7.2. DER AMPA-GLUTAMATREZEPTOR GLURB 74
3.7.2.1. EXPRESSIONSBEDINGUNGEN 74
3.7.2.2. ISOLIERUNG DER MEMBRANFRAGMENTE 75
3.7.2.3. SOLUBILISIERUNG DER MEMBRANPROTEINE 76
3.7.2.4. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN IMMOBILISIERTEN METALLIONEN 76
3.7.2.5. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT M1-ANTIKÖRPER 78
3.7.2.6. AUFKONZENTRIERUNG 78
3.7.2.7. DIALYSE 79
3.7.2.8. DETERGENZAUSTAUSCH 79
3.8. LIGANDENBINDUNGSBESTIMMUNGEN 80
3.8.1. MESSUNGEN MIT [^{125}I]- α-BUNGAROTOXIN 80
3.8.1.1. AFFINITÄTSBESTIMMUNG IN INSEKTENZELLEN 80
3.8.1.2. VERDRÄNGUNGSEXPERIMENTE 81
3.8.1.3. LIGANDENBINDUNG VON HEFEZELLEN UND DEREN MEMBRANEN 81
3.8.1.4. LIGANDENBINDUNG AN C41 UND C43 82

3.8.2. Messungen mit [^{3}H]-AMPA 82
3.8.2.1. K_D-Bestimmung 82
3.8.2.2. Aktivitätsvergleiche verschiedener Proteinpräparationen 83
3.8.2.3. Ligandenbindung an Insektenzellmembranen 83
3.9. Hydrodynamische Messungen 84
3.9.1. Grössenausschlusschromatographie 84
3.9.2. Dichtegradienten 84
3.9.3. STEM 85
3.10. Rekonstitutionsexperimente 85
3.10.1. Detergenzdialyse 85
3.10.2. Verdünnung 87
3.10.3. Destabilisierung 87
3.10.3.1. Herstellung der Liposomen 87
3.10.3.2. Titration der Vesikel 88
3.10.3.3. Vorbereitung des Rekonstitutionsexperimentes 88
3.10.3.4. Rekonstitutionsversuch durch Destabilisierung 89
3.11. Elektronenmikroskopische Methoden 89
3.11.1. Negativfärbung 90
3.11.2. Gefrierbrechung 90
4. Ergebnisse 91
4.1. Der neuronale α7-Acetylcholinrezeptor 91
4.1.1. Expression im Baculovirussystem 91
4.1.1.1. Herstellung rekombinanter Baculoviren 91
4.1.1.2. Expressionsversuche mit nAChR 93
4.1.1.3. Immunologischer Nachweis des exprimierten α7-Proteins 95
4.1.2. Expression in Bakterien 99
4.1.2.1. klonierung des Expressionsvektors 99
4.1.2.2. Expressionsversuche 101

4.1.3. Expression in Pichia pastoris 104
4.1.3.1. Klonierung für die Expression in Pichia pastoris 104
4.1.3.2. Expressionsversuche 105
4.2. Der ionotrope Glutamatrezeptor GluRB 108
4.2.1. Expression und Aufreinigung 108
4.2.1.1. Stand des Projektes vor Beginn der Arbeit 108
4.2.1.2. Auswahl der zu exprimierenden AMPA-Untereinheit 109
4.2.1.3. Wahl der geeigneten Zelllinie 110
4.2.1.4. Ermittlung der optimalen Infektionsdauer 111
4.2.1.5. Bestimmung des optimalen MOI 113
4.2.1.6. Ernte mittels Durchflusszentrifugation 115
4.2.1.7. Solubilisation mit Lysophosphatidylcholin 116
4.2.1.8. Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen 119
4.2.1.9. Affinitätschromotographie mit immobilisiertem Antikörper 123
4.2.1.10. Weitere Modifikation des Aufreinigungsprotokolls 124
4.2.1.11. Detergenzaustausch 126
4.2.1.12. Bestimmung der Ligandenbindungsaffinität 133
4.2.1.13. Zusammenfassung: Expression und Aufreinigung des GluRB 134
4.2.2. Einzelpartikelanalyse 135
4.2.3. hydrodynamische Eigenschaften des GluRB 136
4.2.3.1. Grössenausschlusschromatographie 137
4.2.3.2. Zonale Ultrazentrifugation 140
4.2.3.3. STEM-Messungen 143
4.2.4. Rekonstitutionsversuche 148
4.2.4.1. Strategien für Membranprotein-Rekonstitutionen 149
4.2.4.2. Detergenz-Dialyse 150
4.2.4.3. Rekonstitution durch Verdünnung 156
4.2.4.4. Destabilisierung vorgefertigter Liposomen 158

5. DISKUSSION 162
5.1. EXPRESSION VON NEUROTRANSMITTERREZEPTOREN 162
5.2. AUFREINIGUNG VON GLURB 164
5.3. HYDRODYNAMISCHE EIGENSCHAFTEN DES GLURB 167
5.4. REKONSTITUTIONSEXPERIMENTE 172
6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 179
7. LITERATURVERZEICHNIS 181

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABB	AMPA-Bindungspuffer
ACh	Azetylcholin
AcNPV	*Autographae californica nuclear polyhedrosis virus*
ADH	Alkoholdehydrogenase
Amp	Ampicillin
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat
APO	Apoferritin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	*Absorbance unit*
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BHK	*Baby hamster kidney (cells)*
BLOTTO	*Bovine lacto transfer technique optimizer*
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Btx	α-Bungarotoxin
CFTR	*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
Chol	Cholesterin
CIP	*Calf intestinal phosphatase*
CMC	Kritische Mizellkonzentration
CV	Säulenvolumen
ddH_2O	Doppelt destilliertes Wasser
DDM	Dodezylmaltosid
DG	Dezylglukosid
DM	Dezylmaltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTSSP	3, 3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat)
DTT	Dithiothreitol

EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GABA	γ-Aminobuttersäure
HEC	*Human embryonic cidney (cells)*
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-2-ethansulfonsäure
HT	Hydroxytryptophan
iGluR	Ionotroper Glutamatrezeptor
IMAC	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LHC	*Light harvesting complex*
LP	Liposomenpuffer
LPR	*Lipid-to-protein ratio*
LTD	*Long term depression*
LTP	*Long term potentiation*
LysoPC	L-α-Lysophosphatidylcholin
MBN	Mungbohnen-Nuklease
MCS	*Multiple cloning site*
MEGA-10	Dekanoyl-N-methylglukamid
MOI	*Multiplicity of infection*
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
nAChR	Nikotinischer Azetylcholinrezeptor
NBT	Nitro-blue-tetrazoliumchlorid
NG	Nonylglukosid
NOGA	n-Octanoyl-β-D-glukosylamin
NTA	Nitrilotriazetat
OD	Optische Dichte
OG	Oktylglukosid
OM	Oktylmaltosid

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBP	Periplasmatisches Bindungsprotein
PC	Phosphatidylcholin
PDZ	*Postsynaptic density-95/ Discs large/ zona occludens-1*
PE	Phosphatidylethanolamin
pfu	*Plaque forming units*
PI	Phosphatidylinositol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QBP	Glutamin-Bindungsprotein
RT	Raumtemperatur
SCAM	*Substituted cystein accessibility method*
SDS	Natriumdodezylsulfat
STEM	*Scanning transmission electron microscopy*
TAE	Tris-Azetat/Essigsäure
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
THR	Thyroglobulin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TX100	Triton X-100
ü. N.	Über Nacht
vAChR	AChR-Baculovirus
vGluR	GluR-Baculovirus
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid
YNB	*Yeast Nitrogen Base*
YPD	*Yeast peptone dextrose*-Medium
ZG.3-10	Zwittergenz 3.10
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. DAS ZENTRALE NERVENSYSTEM

Das Zentrale Nervensystem besteht aus Augen, Gehirn und Rückenmark und bildet in Wirbeltieren die Schaltstelle für die Verarbeitung von Reizen. Das menschliche Gehirn ist dabei mit seinen etwa 10^{11} Nervenzellen und einer um das Vielfache höheren Zahl von interneuronalen Verknüpfungen ein äußerst kompliziert aufgebautes Organ[1]. Die korrekte Prozessierung der eingehenden Information erfordert ein extrem hohes Maß an Koordination der Neuronen untereinander, erlaubt aber auch ein sehr breites Spektrum von Reaktionen auf Umwelteinflüsse, verschiedensten Verhaltensmustern und Lernprozessen.

Die Nervenzelle, kleinste funktionelle Einheit des Nervensystems, ist für die Aufnahme, den Transport und die Weitergabe von Reizen verantwortlich (siehe Abb. 1.1). Die Kommunikation von Nervenzellen untereinander geschieht über Synapsen, Kontaktstellen, an denen sich sendende und empfangende Zelle räumlich sehr nahe kommen. Trotz der Vielfalt der Neuronen, alleine im menschlichen Organismus gibt es etwa 10000 Klassen, existiert ein Grundbauplan und ein einheitliches Funktionsprinzip sowohl für die Zellen des Zentralen als auch für solche des Peripheren Nervensystems: An derjenigen Synapse, von der ein Signal ausgeht, nimmt die Empfängerzelle über Dendriten die Reize in Form von Neurotransmittern auf. Durch Depolarisation der Membran wird der Reiz in ein elektrisches Signal umgewandelt und durch die Nervenzelle entlang des Axons geleitet. Die Depolarisation der postsynaptischen Membran erfolgt durch eine von Neurotransmittern induzierte Öffnung von Neurorezeptoren. Sie sind entweder selbst Ionenkanäle oder über sekundäre Botenstoffe mit diesen verbunden. Der Einstrom von Ionen bewirkt hier eine Änderung des elektrischen Membranpotentials, welches passiv entlang des Dendriten zum Axonhügel geleitet wird. Dort werden die eingehenden Potentialänderungen

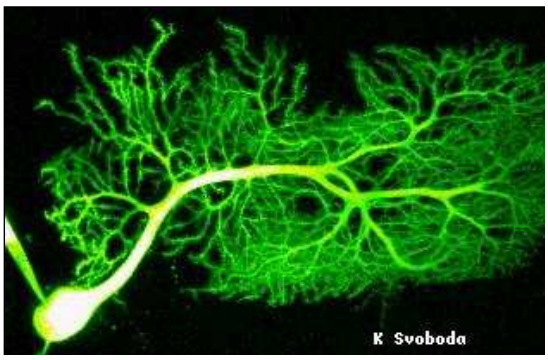


Abb. 1.1: Eine Purkinje-Zelle, ein Neuron des menschlichen Kleinhirns, gefärbt mit Fluoresceindextran. Das stark verzweigte Dendritennetzwerk empfängt Signale von mehr als 100000 anderen Nervenzellen (entnommen aus Svoboda 1996, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Svoboda, CSHL, Cold Spring Harbor, NY 11724, USA.

[1] Vgl. hierzu allgemeine Lehrbücher der Biologie und Biochemie.

aller Dendriten der Zelle addiert und bei ausreichender Stärke der Depolarisation ein Aktionspotential erzeugt, welches entlang des Axons zur Öffnung spannungsgesteuerter Ionenkanäle führt, die das Signal weiter zur präsynaptischen Membran einer anderen Synapse leiten. Durch die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle gelangen Ca^{2+}-Ionen in die Zelle und lösen eine Fusion von Vesikeln, die die Neurotransmitter enthalten, mit der präsynaptischen Membran aus. Die hierdurch freigesetzten Botenstoffe diffundieren in den synaptischen Spalt, binden ihrerseits an Neurorezeptoren und ermöglichen so die Weitergabe des Reizes. Im Säugerorganismus sind insgesamt weit mehr als dreißig Neurotransmitter bekannt, zumeist Peptide oder Aminosäuren bzw. deren Decarboxylierungsprodukte.

Um die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung innerhalb einer Nervenzelle zu erhöhen, ist das Axon bei Wirbeltieren mit einer Myelinscheide umgeben. Diese wird im Zentralen Nervensystem von Oligodendrozyten gebildet und isoliert das Axon bis auf regelmäßig wiederkehrende Abschnitte, die Ranvierschen Schnürringe, von der Umgebung. Die spannungsabhängigen Ionenkanäle sind dort auf sehr engem Raum konzentriert und die durch die Myelinisierung erreichte Erhöhung des Membranwiderstandes erlaubt eine passive, und damit schnellere Überleitung der Reize zwischen den Schnürringen.

Nicht nur aufgrund der Komplexität des Gehirnaufbaus, sondern auch wegen der Fülle der bei der Informationsverarbeitung ablaufenden Prozesse und der Vielzahl der beteiligten Proteine sind die molekularen Vorgänge beim Lernen oder bei Sinneswahrnehmungen noch wenig verstanden. Durch Untersuchungen an ligandengesteuerten Ionenkanälen, dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ und dem ionotropen Glutamatrezeptor GluRB, will die vorliegende Arbeit zum Verständnis der Funktionsweise von Membranproteinen im Zentralen Nervensystem beitragen.

1.2. DIE FAMILIE DER LIGANDENGESTEUERTEN IONENKANÄLE

Die an der postsynaptischen Membran lokalisierten ligandengesteuerten Ionenkanäle dienen der Umwandlung des chemischen Signals, dargestellt durch ausgeschüttete Neurotransmitter, in einen elektrischen Reiz. Man unterscheidet drei strukturell verschiedene Klassen dieser Proteine: Zum einen die Gruppe der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (Kandel, 1991), zu der auch die 5-HT_3-Rezeptoren (Maricq, 1991; Green, 1995), die $GABA_A$-Rezeptoren (Mody, 1994; Smith, 1995) und die Glycin-Rezeptoren (Langosch, 1988) gezählt werden. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor aus dem elektrischen Organ von *Torpedo marmorata* ist der biochemisch und pharmakologisch bei weitem am besten untersuchte Ionenkanal (Changeux, 1998a),

seine Struktur konnte elektronenmikroskopisch bis zu einer Auflösung von 4.6 Å bestimmt werden (Miyazawa, 1999). Für diesen und andere muskuläre nAChRs ist eine pentamere Struktur der Zusammensetzung $(\alpha 1)_2(\beta 1)\gamma\delta$ im fötalen bzw. $(\alpha 1)_2(\beta 1)\varepsilon\delta$ im adulten Organismus bei der Porenbildung nachgewiesen. Die einzelnen Untereinheiten haben eine Größe von 420 bis 500 Aminosäuren.

Eine weitaus weniger untersuchte Klasse von ligandengesteuerten Ionenkanälen stellen die ATP-gesteuerten P2X-Rezeptoren dar (Brake, 1994; Valera, 1994). In der gegenwärtig vermuteten Membrantopologie werden N- und C-Terminus im Gegensatz zum nAChR intrazellulär plaziert. Die zwei Transmembrandomänen werden durch einen großen extrazellulären Bereich, der die ATP-Bindungsstelle enthält, voneinander getrennt (Newbolt, 1998). Über die Stöchiometrie im funktionellen Zustand ist beim P2X-Rezeptor noch wenig bekannt. Es gibt Hinweise auf eine Tetramerisierung der extrazellulären Schleife (Kim, 1997), wohingegen anhand von Quervernetzungsexperimenten auf Trimere geschlossen werden konnte (Nicke, 1998).

Wiederum eine hinsichtlich der Aminosäurensequenz und Membrantopologie völlig eigenständige Proteinfamilie verkörpern die ionotropen Glutamatrezeptoren (Hollmann, 1989; Keinänen, 1990; Nakanishi, 1990; Sommer, 1990). Ihre Untereinheiten enthalten von 850 bis zu 1500 Aminosäuren; sie sind damit wesentlich größer als diejenigen der Acetylcholinrezeptorfamilie und zeigen mit dieser keine Sequenzhomologie.

In der vorliegenden Arbeit sind nikotinische Acetylcholinrezeptoren sowie ionotrope Glutamatrezeptoren Gegenstand der Untersuchungen. Im folgenden wird auf deren Bedeutung und Eigenschaften näher eingegangen.

1.3. NEURONALE NIKOTINISCHE ACETYLCHOLINREZEPTOREN

Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren stellen eine im Peripheren und Zentralen Nervensystem weit verbreitete Gruppe ligandengesteuerter Ionenkanäle dar. Man unterscheidet zwei Gruppen neuronaler nAChRs: solche, die von α-Bungarotoxin nur teilweise und andere, die bereits bei nanomolaren Konzentrationen vollständig blockiert werden. Zur ersten Gruppe gehören Kanäle, die aus den Untereinheiten $\alpha 2$ bis $\alpha 5$ und $\beta 2$ oder $\beta 4$ in der Zusammensetzung

$\alpha_2\beta_3$ aufgebaut sind[2]. Dagegen sind die zur anderen Gruppe gehörenden Untereinheiten α7, α8 und α9 in der Lage funktionelle homomere Kanäle zu bilden.

Neuronale α-Untereinheiten sind der α1-Untereinheit aus dem Muskelprotein homolog, insbesondere haben sie ebenfalls zwei direkt benachbarte Cysteine in der Ligandenbindungstasche, während neuronale β-Untereinheiten dem muskulären Namensgeber β1 nicht homolog sind und auch als *non*-α-Untereinheiten bezeichnet werden (Boulter, 1986; Whiting, 1987). Man nimmt für neuronale Acetylcholinrezeptoren ebenfalls eine pentamere Struktur an. Hinsichtlich des pharmakologischen und elektrophysiologischen Profils gibt es aber wesentliche Unterschiede zu den muskulären nAChRs, auf die noch eingegangen wird.

1.3.1. FUNKTION IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM

Während der nikotinische Acetylcholinrezeptor an der neuromuskulären Endplatte die Aufgabe der schnellen Reizweiterleitung an der Postsynapse hat, ist die Bedeutung der neuronalen AChRs weit weniger verstanden. Es kann bei Rezeptoren mit α3- und α4-Untereinheiten eine analoge Funktion nicht ausgeschlossen werden (Vernallis, 1993), aber die zusätzliche Lokalisierung vieler Acetylcholinrezeptoren an der Präsynapse hat möglicherweise Einfluß auf die Ausschüttung anderer Neurotransmitter und dient der Feinabstimmung der Übertragung (Colquhoun, 1997; Guo, 1998). Wenn nikotinische Bindungsstellen fehlen, werden Beeinträchtigungen im räumlichen Vorstellungs- und Erinnerungsvermögen beobachtet (Changeux, 1998b).

Bei einigen Krankheiten mit Gehirnfehlfunktion spielen neuronale Acetylcholinrezeptoren eine Rolle, wenngleich die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht verstanden sind. Im Verlauf beispielsweise der Alzheimerschen Krankheit kommt es zu einer Degeneration von cholinergen Neuronen und einer Abnahme von hochaffinen Nikotinbindungsstellen, in Säugern dargestellt vor allem durch $(\alpha4)_2(\beta2)_3$-Kanäle (Warpman, 1995). Eine bestimmte Form der Epilepsie wird durch eine Mutation der α4-Untereinheit verursacht (Steinlein, 1995). Außerdem sind nikotinische Rezeptoren an der Nikotinabhängigkeit von Rauchern beteiligt (Dani, 1996).

---

[2] Von den ebenfalls klonierten Untereinheiten α6 und β3 glaubte man lange, daß sie nicht in der Lage seien funktionelle Kanäle zu bilden (Deneris, 1991). Inzwischen ist es durch Koexpression von α6 mit β4 aber gelungen, einen Kanal mit allerdings ungewöhnlichen pharmakologischen Eigenschaften nachzuweisen (Gerzanich, 1997). Ebenso bildet β3 mit einem mutierten α7-Vertreter Kanäle mit außergewöhnlicher Pharmakologie (Palma, 1999).

1.3.2. MEMBRANTOPOLOGIE UND STRUKTUR

Alle nikotinischen AChRs, gleich ob muskulär oder neuronal, zeigen ein gemeinsames Hydropathie-Profil mit zwei großen hydrophilen und vier hydrophoben, je etwa 30 Aminosäuren langen Abschnitten. Durch Affinitätsmarkierungen und Mutagenesestudien wurde gezeigt, daß eine extrazelluläre, etwa 200 Aminosäuren umfassende N-terminale Domäne die Bindungsstelle des Neurotransmitters enthält (Dennis, 1988). Hieran schließen sich drei Transmembranregionen an (vgl. Abb. 1.2). Die Ionenpore wird dabei zu wesentlichen Teilen aus den Membranbereichen M2 aller fünf Untereinheiten gebildet (Hucho, 1986; Imoto, 1988). An M3 schließt sich eine große cytosolische Schleife aus ca. 80 bis 220 Aminosäuren an, welche unter den verschiedenen Untereinheiten hohe Sequenzvariabilität zeigt und zur Steuerung der Densensibilisierung phosphoryliert werden kann (Huganir, 1990). Nach dem letzten Membrandurchgang wird die Sequenz mit einem kurzen extrazellulären C-Terminus abgeschlossen.

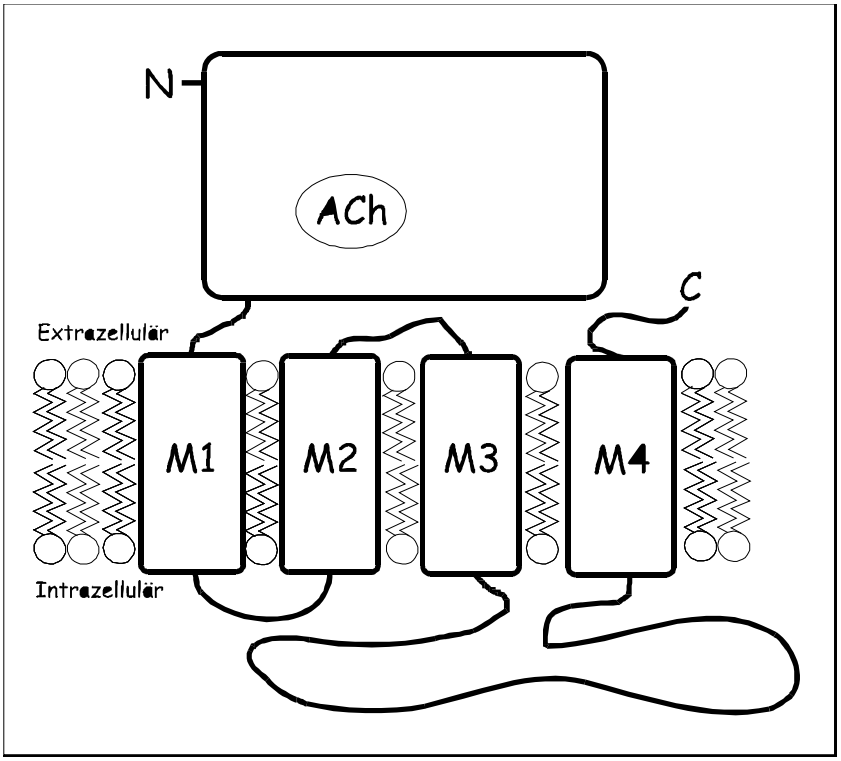


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Membrantopologie nikotinischer Acetylcholinrezeptoren. Eine nähere Beschreibung findet sich im Text.

In diesem Jahr ist es einer Gruppe um Nigel Unwin gelungen, elektronenmikroskopisch die Struktur des nikotinischen Acetylcholinrezeptors aus dem elektrischen Organ von *Torpedo marmorata* bis auf 4.6 Å zu bestimmen (Unwin, 1993; Miyazawa, 1999). Diese Arbeit steht beispielhaft auch für neuronale Rezeptoren, von denen keine gleichwertigen strukturellen Daten

vorliegen. Die Kristallisierbarkeit des Proteins in röhrenförmigen Vesikeln, in denen es fast in derselben Anordnung wie *in vivo* vorliegt (Heuser, 1979), war für die Datenerfassung sehr günstig. Ein Ring, bestehend aus den fünf Untereinheiten α_1, α_2, β, γ und δ, bildet eine enge Pore innerhalb der Zellmembran. In den extrazellulären Raum erstreckt sich das Protein als Zylinder von etwa 65 Å Länge, die einen Hohlraum von etwa 20 Å Durchmesser umschließt. Etwa 30 Å von der Membran entfernt befinden sich die beiden Ligandenbindungsstellen, jeweils am Ende einer 20 Å tiefen Höhle innerhalb der α-Untereinheiten. Wegen der großen Ähnlichkeit mit der Bindungstasche in der Acetylcholinesterase (Silman, 1999) wird eine ähnliche Wechselwirkung mit dem Substrat vermutet. Beiträge benachbarter Untereinheiten können nicht ausgeschlossen werden, denn es existiert eine Reihe von Mutagenese- und Markierungsexperimenten, die eine Lokalisation der Bindungsstelle zwischen zwei Untereinheiten vorschlagen (Corringer, 1995; Martin, 1997). Somit wären sie für konformelle Änderungen viel empfindlicher (Changeux, 1998a). Der intrazelluläre Teil des Ionenkanals ist an ein weiteres Protein, Rapsyn, gebunden, das den Rezeptor ans Cytoskelett fixiert.

1.3.3. DER HOMOMERE α7-ACETYLCHOLINREZEPTOR

Die mRNA des α7-nAChR wurde im Zentralen Nervensystem von Hühnerembryos entdeckt (Couturier, 1990), wo sie zeitgleich zur Ausbildung des Sehnerves gebildet wird. Das Gen enthält zehn Exons und 2500 Basenpaare, die für ein Protein von 479 Aminosäuren und eine 23 Aminosäuren umfassende Signalsequenz kodieren. Das Molekulargewicht des α7-Proteins beträgt 54,5 kD, es sind drei mögliche N-Glykosylierungsstellen vorhanden. Die Sequenzhomologie zu anderen nAChR-Untereinheiten liegt bei etwa 40 %. Inzwischen ist auch die DNA-Sequenz von α7 der Ratte (Séguéla, 1993), dem Rind (García-Guzmán, 1995) und dem Menschen (Peng, 1993) bekannt, die sich in physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften ähneln.

Eine wichtige Eigenschaft von α7 ist seine Fähigkeit zur Bildung homo-oligomerer Ionenkanäle. Eine zu anderen neuronalen nAChRs abweichende Pharmakologie zeigt sich bei der schwachen Reaktion auf Acetylcholin. Der EC_{50} für Hühner-α7 liegt bei 115 µM und damit deutlich über dem entsprechenden Wert des α4/β2-Kanals von 0,77 µM. Dagegen reagiert der α7-Kanal auf Nikotin etwa 10fach sensitiver als auf ACh, der EC_{50} liegt bei 10,5 µM (Bertrand, 1992). Auffällig ist die sehr schnelle Desensibilisierung innerhalb von 26 ms, andere neuronale ACh-Rezeptoren benötigen mehreren Sekunden (McGehee, 1995). Bereits nanomolare Konzentratio-

nen von α-Bungarotoxin blockieren den Kanal vollständig, der IC_{50}-Wert liegt bei 0,73 nM. Während Muskel-nAChRs divalente Kationen nur schlecht leiten, werden Na^+ und Ca^{2+} bei den meisten neuronalen AChRs etwa gleich gut transportiert. Im Falle des α7 ist die Durchlässigkeit für Ca^{2+} um den Faktor 20 besser als für Na^+ (Seguela, 1993). Interessanterweise kann die Kationen- in eine Anionenselektivität verwandelt werden, wenn Aminosäuren aus der zweiten Transmembrandomäne gegen entsprechend positionierte Aminosäuren eines inhibitorischen Ionenkanals ausgetauscht werden (Galzi, 1992).

Es ist nicht bekannt, ob im Zentralen Nervensystem tatsächlich homomere Ionenkanäle vorliegen, da native Ionenkanäle und rekombinante α7-nAChRs pharmakologisch sich zwar ähneln, aber nicht identisch sind (Anand, 1993). Es gibt Anhaltspunkte, daß α7-Untereinheiten im ZNS mit anderen α- oder β-Untereinheiten zu heteromeren Acetylcholinrezeptoren oligomerisieren (Yu, 1998; Palma, 1999).

Die funktionelle Bedeutung des perisynaptischen Auftretens von α7-Untereinheiten (Sargent, 1995) ist noch unklar. Neben der diskutierten Funktion neuronaler nAChRs (siehe Kap. 1.3.1) sind die α7-Untereinheiten in der frühen Entwicklung des Nervensystems von Hühnerembryos wichtig (Chang, 1999).

1.4. IONOTROPE GLUTAMATREZEPTOREN

Ionotrope Glutamatrezeptoren wurden zuerst in Vertebraten entdeckt, wo gezeigt wurde, daß sie an der Vermittlung von schnellen Reizweiterleitungen in erregenden Synapsen über den Neurotransmitter L-Glutamat beteiligt sind (Sprengel, 1995). Dessen hauptsächliche Aufgabe liegt in der Stimulation von kationenspezifischen postsynaptischen Ionenkanälen.

Inzwischen wurden iGluRs auch in Invertebraten gefunden (Schuster, 1991; Maricq, 1995), überraschenderweise sogar in der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, die gar kein Nervensystem besitzt (Lam, 1998). Eine mögliche Funktion ist das Übermitteln von Lichtsignalen. Die Sequenzhomologie zu den iGluRs von Vertebraten ist erstaunlich hoch (bis zu 40 % Aminosäure identität mit Ratten-GluRs) und läßt vermuten, daß sich die komplizierte Signalübertragung über Aminosäuren im menschlichen Gehirn aus einem primitiveren Mechanismus entwickelt hat, der bereits vor der evolutionären Trennung von Tieren und Pflanzen existierte (Chiu, 1999).

Die durch Glutamat erzeugte Aktivierung der iGluRs dient allerdings nicht nur der Reizweiterleitung im ZNS, sondern trägt auch zur Modifizierung bestehender Synapsen bei (Malenka, 1994), wobei es zu dauerhaften Veränderungen der synaptischen Effektivität kommt. Diese

Langzeitphänomenen wie *long term potentiation* (LTP) oder *long term depression* (LTD) sind wichtige Voraussetzungen für Lernprozesse und Erinnerungsvermögen (Bliss, 1993; Brennan, 1994; Zamanillo, 1999).

Die unkontrollierte, massive Aktivierung von Glutamatrezeptoren führt bei Ischämie oder Epilepsie zum Tod von Neuronen. Als Ursache wird eine von NMDA-Rezeptoren (s.u.) vermittelte, hohe intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration vermutet. Auch bei verschiedenen chronischen neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimerschen oder der Parkinsonschen Krankheit, der Huntingtonschen Krankheit oder amyotropher Lateralsklerose wird ein Einfluß von Glutamatrezeptoren angenommen (Lancelot, 1998). Die zellulären Vorgänge sind allerdings noch weitgehend unverstanden.

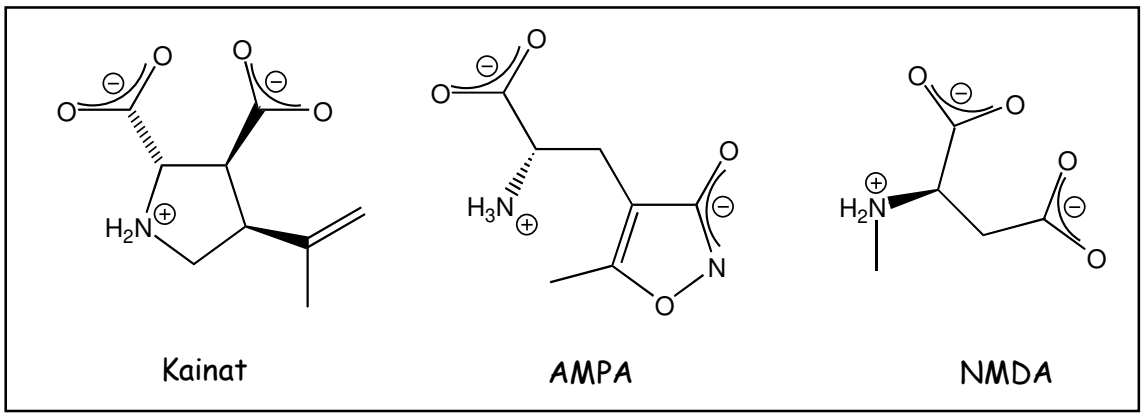


Abb. 1.3: Die namensgebenden Agonisten der ionotropen Glutamatrezeptoren.

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind für den überwiegenden Teil der erregenden Neurotransmission im Gehirn verantwortlich. Die Einteilung erfolgt in drei Unterfamilien (Nakanishi, 1994), entsprechend der Selektivität für verschiedene Agonisten: NMDA-, Kainat- und AMPA-Rezeptoren (siehe Abb. 1.3). Wegen ihres ähnlichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Verhaltens faßt man die beiden letzteren auch zur Gruppe der non-NMDA-Rezeptoren zusammen. Innerhalb der Klasse der NMDA-Rezeptoren beträgt die Sequenzhomologie etwa 35 %, innerhalb derer der AMPA-Rezeptoren 70 %. NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren sind nur zu 15 % homolog (Kutsuwada, 1992). Daneben wurden zwei weitere strukturell entfernt verwandte Gene entdeckt, die zu den anderen GluR-Untereinheiten 18-25 % homolog sind, die sogenannten “Waisen”-Rezeptoren, δ1 und δ2 (Lomeli, 1993). Obwohl sie selbst keine funktionellen Kanäle bilden oder Einfluß auf andere Kanäle zu nehmen scheinen, konnte doch gezeigt werden, daß das Ausschalten der entsprechenden Gene zu Koordinationsschwierigkeiten und Defekten bei der Synapsenbildung führt (Kashiwabushi, 1995). Auch die Neurodegeneration in Lurcher-Mäusen konnte auf eine Mutation in δ2 zurückgeführt werden (Zuo, 1997).

1.4.1. NMDA-REZEPTOREN

Diese von allen Glutamatrezeptoren am besten untersuchten Proteine fallen vor allem durch ihre sehr hohe Leitfähigkeit von 50 pS pro Kanal auf (Fagg, 1993). Sie können neben K^+- und Na^+-Ionen auch Ca^{2+}-Ionen leiten (MacDermott, 1986). NMDA-Rezeptoren öffnen nach etwa 10 ms, die Zerfallskonstante ist 50 bis 250 ms (Köhr, 1994). Außergewöhnlich ist die membranpotentialabhängige Blockierung des Kanals durch Mg^{2+}: erst nach einer Depolarisation der Postsynapse ab etwa 40 mV (Ascher, 1988), hervorgerufen durch non-NMDA-Rezeptoren, wird die Blockierung entfernt und damit das Eindringen von Ca^{2+} möglich (Malenka, 1994). Dieses Kalzium ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff; bei einem intrazellulären Anstieg seiner Konzentration werden über Calmodulin und andere Ca^{2+}-abhängige Enzyme wie NO-Synthase, einige Endonukleasen und Proteasen verschiedene Prozesse wie Glycogenolyse, Apoptose oder Nekrose initiiert (Kristian, 1998). NMDA-Rezeptoren sind außerdem entscheidend an der neuronalen Entwicklung, LTP und Lernprozessen beteiligt (Fagg, 1993; D'Angelo, 1998; Lipton, 1998). Eine wichtige Rolle spielen sie auch bei einer Reihe der bereits angesprochenen neuronalen Störungen (Green, 1998; Chen, 1999; Freese, 1999).

Es sind drei für den NMDA-Rezeptor kodierende Genfamilien bekannt (Dingledine, 1999), die mit NR1-3 bezeichnet werden. NR1 und NR2A-D bilden zusammen funktionelle Kanäle, wobei es Hinweise darauf gibt, daß je zwei Untereinheiten NR1 und NR2 zusammenkommen müssen (Benveniste, 1991; Clements, 1991), NR2 die Glutamatbindungsstelle enthält (Laube, 1997) und NR1 den für eine kontrollierte Kanalsteuerung notwendigen Koagonisten Glycin bindet (Johnson, 1987; Kuryatov, 1994)[3]. Die Untereinheit NR3A scheint der Regulation des Ca^{2+}-Einflusses und der Amplitude des Depolarisationssignals zu dienen (Dingledine, 1999). Eine endgültige Aufklärung der Stöchiometrie eines funktionellen NMDA-Ionenkanals steht allerdings noch aus, neben einer tetrameren Struktur wird auch eine Pentamerbildung diskutiert (Behle, 1995; Premkumar, 1997). Die einzelnen Untereinheiten bestehen aus 920 bis 1482 Aminosäuren (Hucho, 1993).

1.4.2. NON-NMDA-REZEPTOREN

AMPA- und Kainat-Rezeptoren sind sich in ihrer Primärstruktur und dem elektrophysiologischen Verhalten recht ähnlich und unterscheiden sich deutlich vom NMDA-Rezeptor. Im Ge-

[3] Inzwischen gibt es Hinweise darauf, daß D-Serin der Koagonist der NMDA-Rezeptoren ist (Wolosker, 1999).

gensatz zu diesem öffnen non-NMDA-GluR nach Glutamatzugabe innerhalb von 0,5 ms. Auch die Abnahme des Signals ist mit einer Zerfallskonstanten von 3 ms weitaus schneller. Die Leitfähigkeit des einzelnen Kanals beträgt etwa 1 pS. Im Gegensatz zu NMDA-Rezeptoren, bei denen dies nur für bestimmte Untereinheiten gilt, schließen sich non-NMDA-Rezeptoren nach kurzer Zeit in Gegenwart von Glutamat wieder. Diese Desensibilisierung geschieht mit einer Zeitkonstanten von etwa 10 ms (Jonas, 1993; Köhr, 1994).

Ihre Bedeutung für die Signalverarbeitung liegt in der schnellen Informationsübermittlung zwischen Synapsen. Der Einfluß auf die Plastizität von Synapsen, auf LTP oder LTD scheint dagegen im Vergleich zum NMDA-Rezeptor gering zu sein (Hucho, 1993). Allerdings gibt es Hinweise auf die Umwandlung von sogenannten “stillen Synapsen” - sie enthalten ausschließlich NMDA-Rezeptoren - in funktionelle Synapsen durch Fusion von Vesikeln, worin sich non-NMDA-Rezeptoren befinden, mit der postsynaptischen Membran (Liao, 1995; Lledo, 1998).

Bislang wurden fünf Kainat-GluR-kodierende Gene gefunden (Dingledine, 1999). Die hieraus gebildeten Untereinheiten tragen die Bezeichnungen KA1 und KA2 sowie GluR5-7 und sind aus aus 884 bis 888 Aminosäuren aufgebaut. Zu dieser Gruppe werden noch kleinere kainatbindende Proteine aus verschiedenen Organismen gezählt, die nur 450 Aminosäuren umfassen und eine Homologie von 40% zum C-terminalen Bereich von GluR6 zeigen. Eine Kanaleigenschaft wurde im Gegensatz zu den erstgenannten Proteinen allerdings nicht nachgewiesen (Gregor, 1988; Hampson, 1988; Ziegra, 1992). Lediglich GluR5-7 bilden funktionelle Homomere, KA1 und KA2 bringen nur als Heteromere in Verbindung mit GluR5/6 leitende Ionenkanäle hervor (Seeburg, 1993; Nakanishi, 1994; Schiffer, 1997).

AMPA-Rezeptoren werden aus den vier Untereinheiten GluRA-D aufgebaut (Hollmann, 1989; Boulter, 1990; Keinänen, 1990), wobei die Nomenklatur hier nicht eindeutig ist und auch die Bezeichnung GluR1-4 verwendet wird. Sie bestehen aus 862 bis 889 Aminosäuren. Bei der homologen Expression in *Xenopus* Oocyten bilden alle Untereinheiten funktionelle Ionenkanäle, aber es ist wahrscheinlich, daß AMPA-Rezeptoren *in vivo* als Heteromere auftreten (Boulter, 1990). Das Vorhandensein mindestens einer GluRB-Einheit im Kanal führt zu einer stark verminderten Durchlässigkeit von Ca^{2+}-Ionen und die Leitfähigkeit bei negativem Membranpotential wird spannungsunabhängig (Verdoorn, 1991). Anders verhalten sich Kanäle ohne GluRB oder nichteditierte GluRB-Untereinheiten, die sowohl bei positivem als auch bei negativem Membranpotential die Ionen spannungsabhängig leiten.

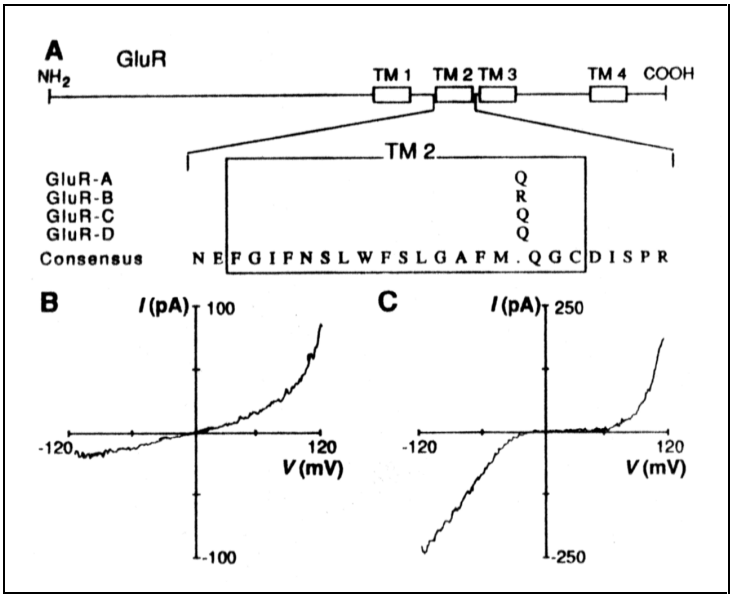


Abb. 1.4: Skizze der Primärstruktur der AMPA-Rezeptoren (A) und Leitfähigkeit in Abhängigkeit des Membranpotentials bei GluRB (B) und GluRD (C), entnommen aus Verdoorn, 1991[4].

Bei diesem RNA-Editing wird mit sehr hoher Effektivität - pränatal 99%, postnatal 100% - das Glutamin Q586 in der zweiten der insgesamt vier membranassoziierten Regionen des GluRB gegen ein Arginin ausgetauscht, was in der ansonsten mit GluRA, C und D identischen Sequenz dieses Abschnitts zum einzigen Unterschied führt (siehe Abb. 1.4). Aufgrund des dadurch erzielten starken Effekts auf die Ionenleitfähigkeit wird vermutet, daß dieser Bereich des Polypeptids maßgeblich an der Ausgestaltung der Pore beteiligt ist.

Andere Agonisten der AMPA-Rezeptoren sind neben Glutamat noch Quisqualat, AMPA und Kainat. Die Affinität ist dabei für das Quisqualat am höchsten, weswegen diese Rezeptoren früher nach diesem Agonisten benannt wurden. AMPA, der Agonist mit der nächstniedrigeren Affinität in dieser Reihe, ist jedoch selektiver für diese Rezeptorfamilie und hat sich bei der Namensgebung durchgesetzt. Seine Affinität beträgt je nach Kanalzusammensetzung zwischen 10 und 50 nM. Glutamat und Kainat binden deutlich schlechter, die Werte liegen um 300 nM bzw. 10 µM. Die EC_{50}-Werte liegen für alle Agonisten im Bereich von 3 bis 65 µM (Stein, 1992).

[4] In der gezeigten Abbildung ist bei der Bezeichnung dieser Region noch von der Transmembranregion TM2 die Rede. Später wurde es immer wahrscheinlicher, daß es sich um eine Membranschleife handelt, die die Doppellipidschicht auf der gleichen - intrazellulären - Seite wieder verläßt, auf der sie eingedrungen ist (vgl. hierzu Kap. 1.4.3.2 über die Membrantopologie der iGluR).

Mit Ausnahme von GluRC existieren von allen Untereinheiten zwei Spleißvarianten in der Nähe des C-Terminus (Köhler, 1994; Li, 1999). Des Weiteren gibt es in allen Untereinheiten im Bereich der extrazellulären Schleife zwischen den Transmembranregionen 3 und 4 die sogenannten Flip- und Flop-Spleißvarianten (Sommer, 1990). Hier kommt es bei der Bildung der mRNA zum Einbau von alternativen Exons gleicher Länge: Das Gen der AMPA-GluR wird von insgesamt 16 Introns und 17 Exons kodiert (Köhler, 1994), der Einbau von Exon 14 führt dabei zu der Flop-Variante, während Exon 15 zur Flip-Version führt. Eine unmittelbare Konsequenz ergibt sich hieraus für die Desensibilisierungskinetik: Kanäle, die ausschließlich aus Flip-Untereinheiten aufgebaut sind, zeigen eine im Vergleich zu Flop-haltigen Ionenkanälen langsamere Desensibilisierung.

1.4.3. STRUKTUR DER IONOTROPEN GLUTAMATREZEPTOREN

Bislang ist die Bestimmung der Quartärstruktur eines vollständigen ionotropen Glutamatrezeptors nicht gelungen. Allerdings konnte eine Kristallstruktur des extrazellulären Teils mit der Ligandenbindungsstelle im Komplex mit Kainat bis zu einer Auflösung von 1.9 Å bestimmt werden (Armstrong, 1998). Außerdem ist es durch eine Vielzahl von verschiedenen Methoden wie Mutationsstudien (Wo, 1995a), Sequenzvergleiche mit Proteinen bekannter Struktur (Nakanishi, 1990; O'Hara, 1993; Wo, 1995b), Untersuchungen an Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen (Hollmann, 1994b; Roche, 1994; Taverna, 1994; Roche, 1996), immunologischen Ansätzen (Molnar, 1994; Bennett, 1995) und elektrophysiologischen Experimenten (Tauboll, 1998) gelungen, ein detailliertes Topologiemodell bezüglich der Lage des iGluR innerhalb einer Lipidmembran zu entwickeln (Abb. 1.6). Damit konnte zwar die Ligandenbindung beschrieben werden, die Vermittlung von Ligandenbindung zur nachfolgenden Konformationsänderung, welche zum Öffnen des Kanals führt, sowie die genaue Abfolge der Ionenleitung durch die Pore hindurch sind aber bisher noch weitgehend unverstanden.

1.4.3.1. OLIGOMERISIERUNG

Gegenwärtig existieren zwei einander widersprechende Vorstellungen über die Zusammensetzung funktioneller ionotroper Glutamatrezeptoren. Die ersten Veröffentlichungen von Vernetzungsexperimenten oder Sedimentationsanalysen ließen die iGluR als Pentamere erscheinen (Blackstone, 1992; Wenthold, 1992; Brose, 1993), womit sie strukturell in die Nähe des zum damaligen Zeitpunkt bereits weit besser untersuchten nikotinischen Acetylcholinrezeptors gerückt wären. Die pentamere Struktur wurde auch durch elektrophysiologische Messungen

(Premkumar, 1997) und Beobachtungen bei Mutationsstudien gestützt (Ferrer-Montiel, 1996). Andere Autoren postulieren demgegenüber aufgrund von biochemischen und anderen elektrophysiologischen Untersuchungen (Wu, 1996; Mano, 1998; Rosenmund, 1998) eine tetramere Struktur. Damit ähnelten die iGluR den spannungsgesteuerten Ionenkanälen, von denen bereits eine Kristallstruktur eines vollständigen, tetrameren Kanalproteins bekannt ist (Doyle, 1998). Auch bei Ionenkanälen, die von zyklischen Nukleotiden aktiviert werden, nimmt man eine tetramere Struktur an (Liu, 1998).

1.4.3.2. MEMBRANTOPOLOGIE

Aufgrund von Hydropathiebestimmungen an verschiedenen AMPA-Rezeptoruntereinheiten, die insgesamt vier hydrophobe, also potentiell membrangängige Abschnitte in der Primärstruktur des Proteins deutlich machten (siehe Abb. 1.5), wurde auf eine analoge Topologie wie beim nAChR geschlossen (Devillers-Thiery, 1993; Hollmann, 1994a). Bei vier membranassoziierten Bereichen lägen N- und C-Terminus beide im extrazellulären Bereich, und die etwa 180 Aminosäuren umfassende Schleife zwischen den Transmembranregionen 3 und 4 könnte nur cytosolisch angeordnet sein.

Untersuchungen von Glykosylierungsmustern (Hollmann, 1994b; Roche, 1994) sowie Mutationsstudien an GluRC und NMDA-Rezeptoren (Bennett, 1995; Kuner, 1996; Beck, 1999) zeigten aber, daß nicht etwa der Bereich zwischen M3 und M4, sondern derjenige zwischen M1 und M3 sowie der C-Terminus intrazellulär liegen müssen. Darüberhinaus wurde eine Sequenzhomologie der Domänen S1 und S2 (vgl. Abb. 1.6) mit dem Glutaminbindungsprotein, einem periplasmatischen Bindungsprotein aus *Escherichia coli* festgestellt (Nakanishi, 1990; O'Hara, 1993), und es konnte gezeigt werden, daß allein diese beiden Domänen, aneinandergefügt über ein hydrophiles Verbindungspeptid und exprimiert in Insektenzellen, ein pharmakologisches Profil wie der intakte $GluRD_{flip}$ besitzen (Kuusinen, 1995a). Damit war klar, daß S1 und S2 auf der gleichen, extrazellulären Seite liegen mußten und wie zwei entsprechende Domänen in den PBPs gemeinsam Glutamat binden. Bestätigung fand diese Theorie durch die Untersuchung an chimären Rezeptoren aus GluRC und GluR6 (Stern-Bach, 1994).

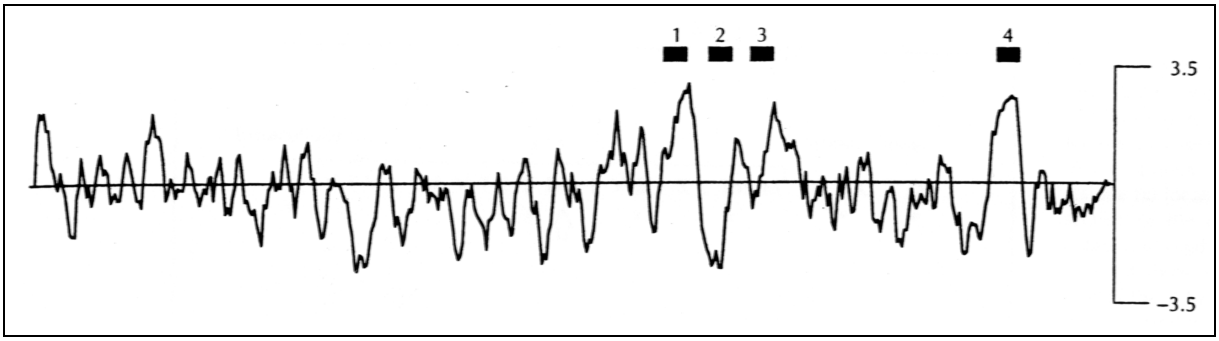


Abb. 1.5: Hydropathie-Plot der GluRA-Untereinheit. Die Lage der mutmaßlichen Membranregionen ist durch schwarze Balken markiert (entnommen aus Dani & Mayer, 1995).

Damit gilt heute das folgende Membrantopologiemodell (Abb. 1.6) als das wahrscheinlichste: An den extrazellulären N-Terminus schließt sich die sog. X-Domäne mit einer Länge von etwa 400 Aminosäuren an. Ihre Funktion ist nicht genau bekannt, es gibt aber Hinweise auf einen Einfluß bei der Oligomerisierung (Abele, 1998; Kuusinen, 1999; Leuschner, 1999) und im Falle der NR2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors eine Beteiligung an der Desensibilisierung (Krupp, 1998; Villaroel, 1998). Die weiteren etwa 150 Aminosäuren bis zur ersten Transmembranregion enthalten den zu den PBPs homologen S1-Bereich, der ein Teil der Ligandenbindungsstelle ist. Es schließen sich die Membranbereiche M1 und M2 an. Letzterer bildet eine Membranschleife, wie durch Untersuchungen der Zugänglichkeit eingeführter Cysteine gezeigt wurde (Kuner, 1996). Außerdem besteht eine Sequenzhomologie von 60% mit einer ähnlichen Membranschleife, dem P-Segment des Shaker-K^+-Kanals (Wo, 1995b). Nach einem kurzen cytosolischen Abschnitt und der nächsten Transmembranregion M3 folgt die ca. 180 Aminosäuren umfassende S2-Region, die den zweiten Teil der Ligandenbindungsstelle bildet. Hieran knüpft eine letzte Transmembranregion gefolgt vom cytosolischen C-Terminus an. Letzterer ist gewöhnlich etwa 70 Aminosäuren lang, erreicht bei NR2 aber eine Länge von bis zu 500 Aminosäuren. Er enthält Phosphorylierungsstellen und eine PDZ-bindende Domäne, mittels derer die Cytoskelettproteine der *post synaptic density* die Glutamatrezeptoren an der Postsynapse positionieren (Dong, 1997; Kennedy, 1997; Dingledine, 1999; Westphal, 1999).

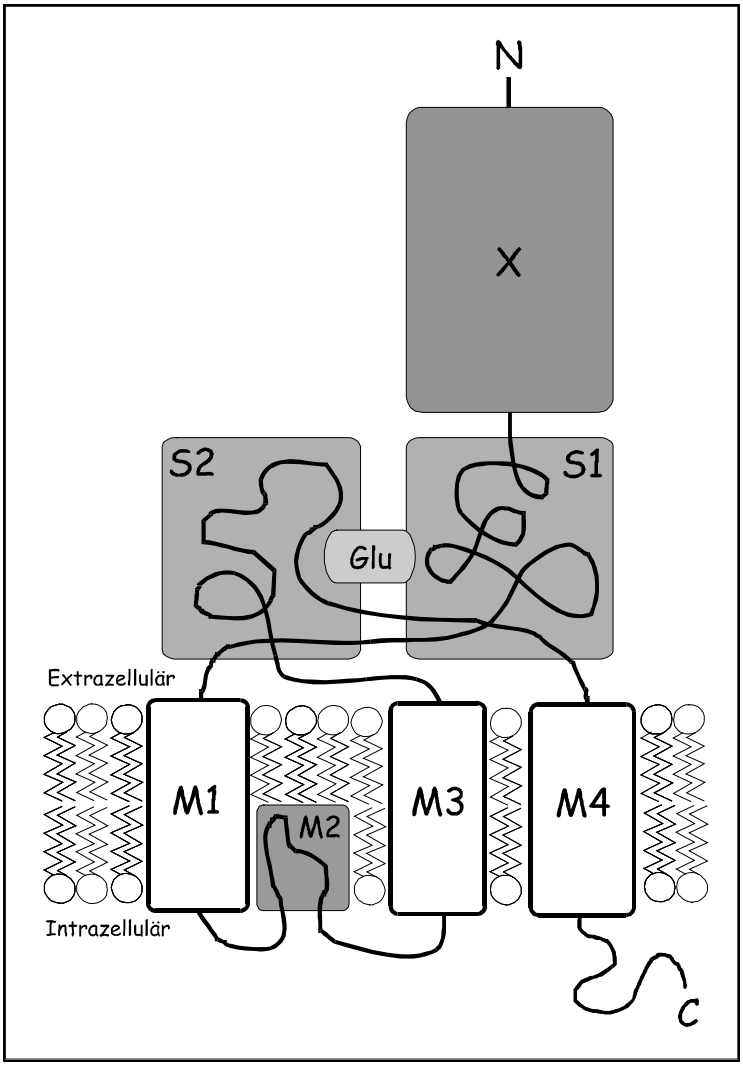


Abb. 1.6: Aktuelles Topologiemodell der iGluR. Die schematische Darstellung wird im Text näher erklärt. X: X-Domäne, S1/S2: Ligandenbindungsstelle, M1-M4: Membran-assoziierte Domänen.

Mit der Homologie von S1S2 und der X-Domäne zu verschiedenen periplasmatischen Bindungsproteinen (Saper, 1983; Nakanishi, 1990; Nikaido, 1992; Oh, 1993; O'Hara, 1993; Yao, 1994) und der Kenntnis der Kristallstruktur der PBPs (Saper, 1983; Sun, 1998), wurde ein dreidimensionales Strukturmodell für den extrazellulären Teil des Glutamatrezeptors erstellt (Stern-Bach, 1994; Sutcliffe, 1996; Paas, 1998; Sutcliffe, 1998). Trotz zahlreicher Mutationsstudien (Wafford, 1995; Hirai, 1996; Paas, 1996; Laube, 1997; Swanson, 1997; Lampinen, 1998; Sutcliffe, 1998) konnte erst die Ermittlung der Kristallstruktur von GluRB im Komplex mit Kainat (Armstrong, 1998) endgültigen Aufschluß über die Einbettung dieses Liganden in seine Bindungstasche geben. Weitere Strukturdaten der Ligandenbindungsdomäne, vor allem über deren unligierte Form, sind nötig, um einen genaueren Einblick in den Mechanismus der Ligandenbindung und dessen Übertragung auf eine Öffnung des Ionenkanals zu erhalten. Entsprechende Kristallisationsversuche (Gouaux, E., unveröffentlicht) und Untersuchungen des

Bindungsvorgangs mittels Kleinwinkelröntgenstreuung (Abele, 1999) deuten an, daß der Mechanismus der Ionenleitung und Desensibilisierung beim Glutamatrezeptor offensichtlich doch komplizierter ist, als es die strukturelle Ähnlichkeit seiner Bindungsdomäne mit den periplasmatischen Bindungsproteinen suggeriert.

1.5. STRUKTURAUFKLÄRUNG VON MEMBRANPROTEINEN

1.5.1. BEISPIELE ERFOLGREICHER STRUKTURBESTIMMUNGEN

Zumeist werden für eine elektronenmikroskopisch oder röntgenkristallographisch erzielte Struktur Proteinmengen benötigt, wie sie bei membranständigen Proteinen aus natürlichen Quellen nur in Einzelfällen in der notwendigen Reinheit isoliert werden können. Zumindest mehrere Milligramm gelten hier als untere Grenze. Aus diesem Grund ist es verständlich, daß die bislang gewonnenen hochaufgelösten Strukturen von Membranproteinen stammen, bei denen diese Isolierung aus natürlichen Quellen gelang oder die bakteriellen Ursprungs waren. Die Strukturaufklärung begann mit 3D-Kristallisationen des Photosynthetischen Reaktionszentrums (Allen, 1987; Deisenhofer, 1989), von Porinen (Weiss, 1991; Cowan, 1992; Schirmer, 1995), der Prostaglandin-H_2-Synthase (Picot, 1994) und eines LHC-Komplexes (McDermott, 1995). Die für elektronenmikroskopische Untersuchungen besonders hilfreiche Methode der 2D-Kristallisation führte bei Bakteriorhodopsin (Henderson, 1990) und erneut beim LHC-Komplex (Kühlbrandt, 1994) zum Erfolg. Aus kleinen 2D-Kristallen wurden durch cryo-EM und Bildrekonstruktionsverfahren Auflösungen von 6 bis 9 Å erhalten, z. B. für Rhodopsin (Unger, 1995), den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (Unwin, 1993; Miyazawa, 1999), LHC-1 (Karrasch, 1995), eine Ca^{2+}-ATPase (Zhang, 1998) und eine H^+-ATPase (Auer, 1998). Durch methodische Verbesserungen konnte die Auflösung der Struktur von Bakteriorhodopsin bis auf 3,0 Å erhöht werden (Grigorieff, 1996). Die ersten Kristallstrukturen von Ionenkanälen wurden vom pH-sensitiven bakteriellen K^+-Kanal aus *Streptomyces lividans* (Doyle, 1998) sowie einem mechanosensitiven Ionenkanal aus *Mycobacterium tuberculosis* (Chang, 1998) erhalten.

Eine entsprechende Strukturaufklärung an rekombinanten eukaryontischen Membranproteinen gelang nicht in gleichem Umfang. Das für den Wassertransport in Erythrozyten verantwortliche Aquaporin-1 wurde in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert und bildete bei der Rekonstitution 2D-Kristalle, deren Struktur bis auf 6 Å bestimmt wurde (Walz, 1997). Auch von einem humanen *gap junction*-Protein, das in transfizierten BHK-Zellen exprimiert wurde, konnte

durch 2D-Kristallisation eine Auflösung von 7,5 Å in der Kristallebene und 21 Å senkrecht dazu erzielt werden (Unger, 1999).

1.5.2. EINZELPARTIKELANALYSE UND REKONSTITUTION

Stehen nur sehr geringe Proteinmengen zur Verfügung, kann versucht werden, elektronenmikroskopisch eine Einzelpartikelanalyse gefolgt von einer Bildrekonstruktion durchzuführen. Die erzielte Auflösung ist aber in der Regel deutlich schlechter und liegt in jüngeren Arbeiten bei 20 bis 30 Å, z. B. für einen Na^+-Kanal (Sato, 1998), den Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette (Grigorieff, 1998) oder Clathrin-umschlossene Vesikel (Smith, 1998). Trotzdem machen die Strukturen wichtige Aussagen bezüglich der Zusammensetzung aus Untereinheiten oder der Form der Proteine. Für das Sec61-Oligomer, das wachsende Peptidketten während der Translation durch die ER-Membran schleußt, wurde aufgrund einer Struktur mit 26 Å Auflösung die Wechselwirkung mit dem Ribosom veranschaulicht (Beckmann, 1997). Wesentliche Limitierungen der *single particle analysis* sind Heterogenität der Probe sowie mögliche strukturelle Flexibilität und damit Verzerrung der Makromoleküle, die eine Datenverarbeitung erschweren. Die beste bislang erzielte Auflösung liegt bei 7,4 Å für ein Protein des Hepatitis B-Virus, dessen icosaedrische Struktur die Bildrekonstruktion vereinfacht (Böttcher, 1997).

Eine Variante sowohl für Einzelteilchenanalyse als auch für die Kristallisation stellt eine Rekonstitution des Membranproteins in eine Doppellipidschicht dar. Insbesondere wenn das Protein bei der Probenpräparation für die Elektronenmikroskopie leidet, z. B. durch Verformungen auf dem Trägernetzchen, kann die Einbettung des Proteins in eine Lipidmembran stabilisierend wirken, weil dieser Zustand der natürlichen Umgebung des Ionenkanals sehr nahe kommt. Die Proteine werden außerdem in einer bevorzugten Orientierung ausgerichtet, was die 3D-Rekonstruktion bedeutend vereinfachen kann (Zhuang, 1999). Des Weiteren bieten Proteoliposomen die Möglichkeit funktioneller Studien des Membranproteins, z. B. der Untersuchung von Transportprozessen (Richard, 1990). Wird Protein bei niedrigem LPR (Massenverhältnis von Lipid zu Protein kleiner als 2) in die Vesikel inkorporiert, kann es spontan zu einer 2D-Kristallisation kommen (Hasler, 1998; Lambert, 1999; Williams, 1999; Zhuang, 1999), bisweilen läßt sich eine solche auch induzieren (Mohraz, 1999). Die hierdurch erzielten Strukturdaten lassen derzeit Auflösungen von bis zu 4 Å zu.

1.5.3. LIMITIERUNGEN BEI DER EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON MEMBRANPROTEINEN

Ein wesentliches Hindernis auf dem Weg zur atomaren Struktur dieser Molekülklasse ist mit dem üblicherweise sehr geringen natürlichen Vorkommen in Zell- und Organellmembranen bereits genannt. Die Überexpression in einem der gängigen Expressionssysteme stößt im Vergleich zu der entsprechenden Gewinnung von löslichen Proteinen ebenfalls schnell an Grenzen: Anders als diese müssen Membranproteine während der Translation zur Erreichung von endgültiger Konformation und damit Funktionalität korrekt gefaltet in die Wirtsmembran eingebaut werden. Oft sind hierzu posttranslationale Veränderungen notwendig (Ellis, 1991), und in einigen Fällen muß ein ganz bestimmtes Chaperon vorhanden sein, um zu einem funktionellen Produkt zu führen (Baker, 1994; Groves, 1994; Lenhard, 1997). Dies reduziert die Auswahl möglicher Wirtsorganismen und erfordert zumeist eine homologe Expression. Die Akkumulation des Proteins hat oftmals eine letale Wirkung auf den Wirtsorganismus. Ein insgesamt sehr niedriges Expressionsniveau von teilweise nur wenigen Mikrogramm Protein pro Liter Zellkultur und ein hohes Maß an falsch gefaltetem, inaktivem Protein sind die Folge (Grisshammer, 1995).

Die Bestimmung des Molekulargewichtes eines Membranproteins und damit insbesondere die Frage, ob es im Verlauf der Expression zu N- oder C-terminalem Abbau gekommen ist, läßt sich mit dem für lösliche Proteine mit hoher Genauigkeit angewendeten SDS-PAGE-Verfahren nicht gleichermaßen exakt beantworten, da hydrophobe Abschnitte und Glykosylierungen zu einem veränderten Laufverhalten führen können. Erstere erhöhen die Wanderungsgeschwindigkeit, letztere vermindern sie stärker, als nach ihrem tatsächlichen Molekulargewicht vermutet werden kann (Grisshammer, 1995). N- und C-terminal eingebrachte Antikörperepitope, die sich auch zur nachfolgenden Aufreinigung eignen, können beim Nachweis der intakten Termini helfen, sofern sie Struktur und Funktion des Proteins nicht wesentlich beeinflussen. Oft erleichtert aber gerade das Fehlen von terminalen Aminosäuren die Strukturbestimmung, falls sie nicht wesentlich zur Funktion beitragen oder im Kristall ungeordnet sind (Doyle, 1998).

Die Anwesenheit von Detergenz bei der Aufreinigung, ohne das ein Membranprotein nach dem Solubilisieren der Membran nicht in Lösung gehalten werden kann, ist ein wichtiger Unterschied zu löslichen Proteinen. Unerläßlich ist die Bestimmung desjenigen Detergenzes, welches eine ausreichende Effizienz bei der Membransolubilisierung und gleichzeitig eine hohe Verträglichkeit mit dem Zielprotein besitzt. Abhängig von der Art des Detergenzes ergeben sich auch Unterschiede in der Wirksamkeit der bereits angesprochenen Antikörperepitope oder

anderer, in die Proteinsequenz klonierter Reinigungspeptide, wie Streptavidin- oder Polyhistidin-Markierung (Loddenkötter, 1993; Pos, 1994).

1.5.4. AUSWAHL EINES GEEIGNETEN EXPRESSIONSSYSTEMS

1.5.4.1. BAKTERIEN ALS WIRTSORGANISMEN

Wegen ihrer einfachen Handhabbarkeit, der hohen Expression und der großen Auswahl an Plasmiden und Stämmen sind Proteinexpressionen in *Escherichia coli* weit verbreitet. Ein Beispiel von heterolog exprimiertem eukaryontischen Membranprotein ist der Neurotensin-Rezeptor der Ratte, der als Fusionsprotein mit dem periplasmatischen Maltosebindungsprotein in Ausbeuten von etwa 15 pmol pro Milligramm Membranprotein isoliert werden konnte (Grisshammer, 1993). Als unlösliche Aggregate im Cytoplasma wurde der pflanzliche LHC-Komplex exprimiert (Cammarata, 1992), welcher nach anschließender Renaturierung und Oligomerisierung strukturell dem aus Chloroplasten isolierten Protein entsprach (Hobe, 1994). Die Toxizität von Membranproteinen konnte durch Verwendung von BL21(DE3)-Mutanten stark reduziert werden und erlaubte die Expression von verschiedenen F-ATPase-Untereinheiten oder dem Oxoglutarat-Malat-Transporter jeweils vom Rind als unlösliche Einschlußkörper in sehr hohen Ausbeuten von bis zu 300 mg pro Liter Bakterienkultur (Miroux, 1996). Die meisten Membranproteine sind unter den denaturierenden Bedingungen der Isolierung aus den Aggregaten inaktiviert. Insbesondere bei komplizierter aufgebauten Molekülen - dazu gehören beispielsweise die ligandengesteuerten Ionenkanäle - stellt sich eine Rückgewinnung der Funktion auch bei einer Renaturierung oft nicht mehr ein. Insgesamt scheint die Hauptschwierigkeit in der unterschiedlichen Membraninsertion von Proteinen bei Pro- und Eukaryonten zu liegen: Offenbar ist es den *Escherichia coli* nicht möglich, durch die posttranslationale Insertion das gleiche funktionale Ergebnis zu erzielen, wie dies beim für Eukaryonten typischen kotranslationalen Einbau der Fall ist. Bei der homologen Expression haben Bakterien allerdings sehr wertvolle Dienste für die Strukturaufklärung geliefert.

1.5.4.2. HEFE-EXPRESSIONSSYSTEME

Hefen sind einzellige Eukaryonten, die sowohl *Escherichia coli* als auch anderen eukaryontischen Organismen gegenüber Vorteile besitzen. Im Gegensatz zu ersteren sind sie in der Lage, Proteine posttranslational zu modifizieren. Und anders als bei höheren Eukaryonten sind Vektoren ähnlich einfach darzustellen wie bei Bakterien, die Kultivierung ist vergleichsweise billig und Fermentation ohne Schwierigkeiten möglich.

Nachteilig ist die Beobachtung, daß die Überexpression von Membranproteinen toxisch wirkt, was das Expressionsniveau stark absenkt. Dennoch wurden Proteine in funktionellem Zustand isoliert, so eine pflanzliche H^+-ATPase mit einer Ausbeute von 1 % des gesamten Zellproteins (Villalba, 1992) und eine H^+-ATPase aus *Neurospora crassa*, deren Anteil an den Membranproteinen 4 % betrug (Mahanty, 1994). Unterschiedliche Resultate wurden mit typischen hetero-oligomeren Proteinen erzielt: Während der nikotinische Acetylcholinrezeptor nur in inaktiver Form vorlag (Yellen, 1990), wurden einige Na^+/K^+-ATPasen mit Ausbeuten von mehreren Pikomol pro Milligramm Zellgewicht exprimiert (Eakle, 1992). Nicht in der Plasmamembran, sondern aus dem ER konnte humaner CFTR in hohen Ausbeuten exprimiert werden (Huang, 1996), und ein weiterer ABC-Transporter humanen Ursprungs, das P-Glykoprotein, wurde aus der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen (Mao, 1997). In jüngerer Zeit ist vor allem in der Hefe *Pichia pastoris* die Expression von Membranproteinen in vergleichsweise hohen Ausbeuten gelungen; so konnten zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, der 5-Hydroxytryptamin-5A-Rezeptor der Maus und der humane β2-adrenerge Rezeptor, mit 40 bzw. 25 pmol pro mg Membran isoliert werden (Weiss, 1998).

Insgesamt sind Hefe-Expressionssysteme deutlich weniger erforscht als *Escherichia coli*-Systeme. Dennoch dürften sie wegen der genannten Vorteile in den nächsten Jahren noch eine wichtige Rolle bei der Gewinnung von Membranproteinen zur Strukturbestimmung spielen.

1.5.4.3. BACULOVIRUSEXPRESSIONSSYSTEME

Diese auf den Baculovirus *Autographa californica* gestützte Methode birgt ähnlich wie die Verwendung von Hefen große Vorteile gegenüber *Escherichia coli* bei der Expression von eukaryontischen Membranproteinen. Die Wirtszellen sind selbst Eukaryonten und sind somit zur Glykosylierung oder zur Disulfidbrückenbildung fähig. Die Haltung der Insektenzellen ist zwar nicht ganz so einfach wie bei Bakterien oder Hefen, aber es gelang, sehr große Proteine mit bis zu 12 Transmembranregionen (Tate, 1994) und Heteromere aus bis zu 3 verschiedenen Untereinheiten (Carter, 1992) funktionell herzustellen. Überexpression in einem für biochemische Charakterisierungen ausreichenden Maße wurde bei vielen Säuger- oder humanen Proteinen unter anderem bei einem Glukosetransporter (Yi, 1992), einer Ca^{2+}-ATPase (Skerjanc, 1993), einem muscarinischen Acetylcholinrezeptor (Weill, 1997), einem ionotropen Glutamatrezeptor (Keinänen, 1994), P2X-Rezeptoren (Radford, 1997) oder einem *gap junction*-Protein (Stauffer, 1991) berichtet. Obwohl viele Membranproteine exprimiert werden konnten, liegt das Expressionsniveau zumeist unter 5 pmol pro Milligramm Zellen. Ausbeuten von mehr

als 100 µg/mg, wie sie für den Glukosetransporter oder die Ca^{2+}-ATPase beobachtet wurden, sind seltene Ausnahmen. Nur sehr wenige Membranproteine konnten außerdem bislang in Milligramm-Mengen von ausreichender Reinheit und Funktionalität isoliert werden (Stauffer, 1991; Green, 1995). Die Faktoren, die die Expression beeinflussen, sind bislang nicht völlig verstanden. Im allgemeinen wird beobachtet, daß die Expression abnimmt, je mehr Transmembranregionen vorhanden sind und je umfangreicher eine post-translationale Modifikation notwendig ist (Grisshammer, 1995). Trotzdem ist insbesondere die Fähigkeit zu letzterem einer der großen Vorteile von Insektenzellkulturen. Eine notwendige Phosphorylierung von Säugertierproteinen erfolgt zumeist in identischer Weise wie in Säugerzellkulturen. Auch bei der für eine korrekte Faltung oder bei intrazellulären Transportprozessen wichtigen Glykosylierung gleichen sich Insekten- und Säugerzellen, obwohl erstere durchweg kleinere Oligosaccharide produzieren (Fraser, 1992). Für die in der vorliegenden Arbeit behandelten Ionenkanäle ist es außerdem von Vorteil, daß Insektenzellen keine eigenen Ionenkanäle produzieren, wodurch störende Hintergrundexpression unterbleibt (Joyce, 1993).

Da Insektenzellen im Verlauf der Baculovirusinfektion absterben, hängt die Glykosylierung auch von der Dauer der Infektion ab. Protein, das erst nach 3 bis 4 Tagen translatiert wurde, scheint weniger effektiv glykosyliert zu werden als Protein aus der Anfangsphase der Expression (Davidson, 1991; Tate, 1994; Blaukat, 1999). Ein Nachteil des Baculovirusexpressionssystems ist damit zweifelsohne die Produktion von heterogenen Proteinpopulationen. Selbst wenn die exprimierten Mengen hoch sind, ist vielfach nur ein Teil des Proteins auch aktiv. Da es aber bei vielen Membranproteinen lediglich im Baculovirussystem gelungen ist, überhaupt kleinere Mengen funktionellen Proteins darzustellen, ist es zu einem unverzichtbaren Bestandteil bei der Strukturaufklärung von Membranproteinen geworden. Wegen der Schwierigkeiten, diskontinuierliche Expressionen auf große Maßstäbe - Kulturvolumina von mehreren Litern - zu übertragen, ist es bisher selten gelungen, auf diesem Wege die isolierbare Proteinmenge zu erhöhen (Schertler, G., persönliche Mitteilung).

Bei dauerhaft transformierten Insektenzellen, die durch Transformation mit Plasmiden unter Selektionsdruck erzeugt werden, kann der Nachteil viraler Eingriffe in die zellulären Sekretionsprozesse vermieden werden (McCarroll, 1997). Schon verschiedene Rezeptoren wurden auf diese Weise exprimiert (Kleymann, 1993; Atkinson, 1996; Buckingham, 1996; Pfeifer, 1998), jedoch lagen die Ausbeuten weit unterhalb denjenigen, die mit Baculoviren erzielt wurden. Andererseits wurde mit stabil transformierten Insektenzellen auch Proteine in aktiver Form isoliert, wo dies mit Baculoviren nicht geglückt war (Lenhard, 1997). Insgesamt sind die Erfah-

rungen mit dieser Expressionsform jedoch noch gering, sodaß weitere Expressionsversuche dessen Eignung zeigen müssen.

1.5.4.4. ANDERE EXPRESSIONSSYSTEME

Die Expression von Membranproteinen in Säugerzellkulturen beschränkt sich bislang zumeist auf funktionelle Charakterisierungen. Obwohl es gelungen ist, viele Proteine entweder transient oder in stabilen Zelllinien zu exprimieren und die beobachteten Expressionslevel nicht schlechter sind als in Baculovirussystemen (Grisshammer, 1995), scheiterte die Isolierung von ausreichenden Mengen an der Schwierigkeit, Säugerzellen in großem Maßstab zu kultivieren. Die Bedeutung dieses Expressionssystems liegt daher vor allem in der umfangreichen post-translationalen Modifikation von humanen Membranproteinen, wenn dies zur Erreichung von Funktionalität Voraussetzung ist und in anderen Systemen nicht oder nur unvollständig gelingt. Beispiele für die Expression von Ionenkanälen sind der Shaker-K^+-Kanal mit 10^7 Kopien pro COS-Zelle (Sun, 1994) und ein Kainat-Rezeptor mit etwa 10^5 Kopien pro HEK 293-Zelle (Sommer, 1992). Auch verschiedene AMPA- und Kainat-GluRs wurden exprimiert, jedoch in für strukturelle Studien nicht ausreichenden Mengen und zum Teil in sehr labiler Form (Tygesen, 1994; Andersen, 1996).

Zuletzt seien noch die in elektrophysiologischen Messungen verbreitet eingesetzten Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* angeführt. Da für die Expression eines Proteins dessen DNA in jede einzelne Eizelle injiziert werden muß, ist dieses Amphibiensystem bei niedriger Expression als Wirt ungeeignet. Es gibt aber Beispiele, wo auch Membranproteine in für strukturelle Untersuchungen ausreichenden Mengen exprimiert wurden (Walz, 1997).

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, ligandengesteuerte Ionenkanäle in einem Maße zu isolieren, das strukturelle Untersuchungen ermöglichte. Im Verlaufe dieses Prozesses sollten die aufgereinigten Proteine biochemisch und biophysikalisch charakterisiert werden.

Ausgehend vom Baculovirusexpressionssystem, das bereits erfolgreich für ionotrope Glutamatrezeptoren (Keinänen, 1994) und weitere eukaryontische Membranproteine getestet worden war (vgl. Kap. 1.5.4.3), sollte die Überexpression des neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptors α7 versucht werden. Die Struktur des nAChR aus dem Skelettmuskel war zu Beginn dieser Arbeit bereits mit einer Auflösung von 9 Å bekannt (Unwin, 1993), sie konnte in der Zwischenzeit auf 4.6 Å verbessert werden (Miyazawa, 1999). Wegen der Bildung homooligomerer Ionenkanäle, schien uns der α7-nAChR ein guter Kandidat für eine Strukturanalyse. Die Identität aller Untereinheiten erhöht die Rotationssymmetrie und vereinfacht Bildrekonstruktionen.

Da auch mittels Hefezellen und sogar in Bakterien eukaryontische Membranproteine exprimiert werden konnten (Miroux, 1996; Weiss, 1998), wurden diese Expressionssysteme als weitere Möglichkeiten der heterologen Proteinexpression erwogen.

Die Expression von zwei AMPA-Glutamatrezeptoren war in kleinem Maßstab in Insektenzellen bereits erfolgreich gelungen (Keinänen, 1994), allerdings konnten keine für strukturelle Charakterisierungen ausreichende Mengen Protein isoliert werden. Dieses Problem sollte in dieser Arbeit angegangen werden. Wegen der Schwierigkeiten, Insektenzellen zu fermentieren und damit niedrige Expressionslevel zu kompensieren, gibt es bisher kein Beispiel einer hochaufgelösten Struktur ausgehend von in Insektenzellkultur exprimiertem Membranprotein.

Besonderes Gewicht bei der Charakterisierung des iGluR lag in der Untersuchung der Frage der Zusammensetzung des Oligomers, da es derzeit keine endgültige Erkenntnis darüber gibt, ob der Kanal als Tetramer oder Pentamer vorliegt (Ferrer-Montiel, 1996; Rosenmund, 1998).

Strukturelle Untersuchungen waren im Anschluß an die biochemische Charakterisierung vorgesehen. Zeitgleich zu einer *single particle analysis* sollten durch Rekonstitution des Proteins erste Schritte zu einer möglichen Kristallisation unternommen werden.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. NUKLEOTIDSEQUENZEN UND PRIMÄRSTRUKTUREN DER UNTERSUCHTEN PROTEINE

3.1.1. cDNA DES α7-ACETYLCHOLINREZEPTORS

1	GAGCCGACAT	CGCAGGGAGA	GCCCCGCGCG	GGCGCAGGAG	GGGGCGGGGC	GGCGAGAGGT
61	CCGCGGCGGC	GACGGAGGCT	CCCGGCTCCG	GCTGCTGCGG	CTCCCGGA**AT**	**G**GGCCTCCGG
121	GCGCTGATGC	TGTGGTTGCT	GGCGGCGGCG	GGGCTCGTGC	GCGAGTCCCT	GCAAGGAGAG
181	TTCCAAAGGA	AGCTGTACAA	GGAGCTGCTG	AAGAACTACA	ACCCTCTGGA	ACGACCAGTT
241	GCAAATGACT	CCCAGCCGCT	CACTGTCTAT	TTCACTCTCA	GCCTCATGCA	GATCATGGAT
301	GTGGATGAAA	AGAATCAAGT	ATTAACAACA	AACATCTGGC	TACAAATGTA	CTGGACAGAT
361	CATTACTTAC	AGTGGAATGT	GTCTGAATAC	CCTGGAGTGA	AGAACGTCCG	TTTTCCTGAT
421	GGACTGATTT	GGAAGCCAGA	TATTCTTCTC	TATAACAGTG	CTGATGAAAG	ATTTGATGCT
481	ACATTTCACA	CTAATGTTTT	AGTCAATTCT	TCGGGACACT	GCCAATATCT	GCCACCAGGC
541	ATATTTAAAA	GCTCATGCTA	CATAGACGTG	CGTTGGTTTC	CATTTGATGT	TCAGAAGTGC
601	AATCTGAAGT	TTGGATCTTG	GACATATGGA	GGCTGGTCCT	TAGACTTACA	AATGCAAGAA
661	GCAGATATAT	CCGGCTATAT	TTCAAATGGA	GAGTGGGATT	TAGTAGGAAT	TCCTGGGAAG
721	AGAACTGAGA	GCTTTTATGA	GTGCTGTAAA	GAACCATACC	CAGATATCAC	ATTCACAGTA
781	ACCATGAGAC	GCAGAACTCT	CTACTACGGG	CTCAACCTTC	TTATTCCCTG	TGTACTGATA
841	TCAGCACTTG	CCTTATTAGT	CTTTCTGCTT	CCAGCAGACT	CAGGAGAAAA	GATCTCACTA
901	GGTATAACAG	TTTTATTGTC	TCTCACCGTC	TTCATGTTAC	TCGTGGCTGA	AATTATGCCA
961	GCAACATCTG	ATTCTGTGCC	CTTAATTGCT	CAGTATTTTG	CCAGCACCAT	GATTATTGTT
1021	GGCCTCTCTG	TTGTTGTCAC	TGTTATCGTT	CTACAATACC	ATCATCACGA	TCCAGATGGG
1081	GGAAAAATGC	CTAAATGGAC	AAGAGTCATC	CTTCTGAATT	GGTGTGCTTG	GTTTCTGAGG
1141	ATGAAGAGAC	CAGGGGAAGA	TAAAGTGCGT	CCCGCCTGTC	AACATAAACA	GCGTCGATGC
1201	AGCCTGTCAA	GCATGGAGAT	GAACACTGTG	AGTGGTCAGC	AATGCAGTAA	TGGGAACATG
1261	CTGTATATTG	GGTTTCGAGG	GCTGGATGGG	GTTCACTGCA	CACCCACCAC	TGATTCAGGG
1321	GTGATCTGTG	GGAGGATGAC	CTGTTCACCA	ACAGAGGAAG	AAAATCTTCT	GCACAGTGGC
1381	CACCCCTCTG	AAGGCGACCC	AGATTTGGCT	AAGATCCTGG	AAGAGGTCAG	ATACATTGCA
1441	AACAGGTTCA	GAGACCAGGA	TGAAGAAGAA	GCCATTTGCA	ACGAATGGAA	GTTTGCAGCC
1501	TCTGTAGTAG	ATCGGCTCTG	CTTGATGGCA	TTTTCGGTCT	TCACCATCAT	TTGTACAATT
1561	GGCATCTTAA	TGTCAGCACC	AAACTTTGTA	GAGGCTGTCT	CTAAAGATTT	TGCT**TAA**CTC
1621	CTAACTATGA	TTTGATTCTC	TGAAGTATCA	TATGTAGCAA	ATAAGAGTGT	ATTTTTTTTT
1681	GTTTGTTTGC	TTGTTTTTAA	TGAGTACACT	GTATCTCATT	GTCCTCTGTC	TTTTGCCCCC
1741	CCCCCTATTC	CCCCAGCATT	CCTCTGACCC	TGGGCTCCTT	TCTGAACAGG	AGCACCCTTT
1801	CAGAAGGGGA	GCCAGGGATC	CCTCCCTGGG	CTGTATGCCA	CTCCTCTAAG	CTCTTCGCTT
1861	TGGGAGATGC	AAAGTGAGTG	CAAGACCCTT	CAGAATGAAA	GGATACTGCT	CCAGCATCTT
1921	TTATGCATTT	CAAACTGGCT	AGTACATAAA	TTAATAGGTA	GGTAATGCCA	GAAATGTCAT
1981	TTCTTCCAGA	ATTTACTTTA	AAAGATAGAA	GTTAGCCCTA	TGTTTTGGAG	AGGATTA

Abb. 3.1: Gensequenz des neuronalen α7-Acetylcholinrezeptors. Die Translation startet mit der Signalsequenz, die entsprechenden Nukleotide sind rot dargestellt. Die grauen Bereiche markieren nicht-kodierende Abschnitte des Gens. Start- und Stopcodon sind fett gekennzeichnet.

Die Gensequenz ist eine cDNA aus *Gallus gallus*, dem Haushuhn, entnommen aus der EMBL/GenBank, Zugangsnummer X68586 (Couturier, 1990). Das α7-Gen besteht aus 10 Exons mit insgesamt 2037 Nukleotiden. Das hierdurch kodierte Protein hat 502 Aminosäuren, wird aber vor dem Verlassen des ER noch prozessiert (s. u.).

3.1.2. PROTEINSEQUENZ DES α7-nACHR

Der Sequenz des eigentlichen, an der äußeren Zellmembran präsentierten Proteins ist bei der Translation noch die native, 23 Aminosäuren lange Signalsequenz vorgeschaltet, die den Transport des Proteins in die Plasmamembran steuert. Diese wird bereits im ER abgespalten, sodaß die Sequenz des nativen gereiften Proteins noch 479 Aminosäuren umfaßt.

-23	MGLRALMLWL	LAAAGLVRES	LQGEFQRKLY	KELLKNYNPL	ERPVANDSQP
28	LTVYFTLSLM	QIMDVDEKNQ	VLTTNIWLQM	YWTDHYLQWN VSEYPGVKNV	
78	RFPDGLIWKP	DILLYNSADE	RFDATFHTNV	LVNSSGHCQY	LPPGIFKSSC
128	YIDVRWFPFD	VQKCNLKFGS	WTYGGWSLDL	QMQEADISGY	ISNGEWDLVG
178	IPGKRTESFY	ECCKEPYPDI	TFTVTMRRRT	**LYYGLNLLIP**	**CVLISALALL**
228	**VFLL** PADSGE	K **ISLGITVLL**	**SLTVFMLLVA**	EIMPATSDSV	PLIAQ **YFAST**
278	**MIIVGLSVVV**	**TVIVLQY** HHH	DPDGGKMPKW	TRVILLNWCA	WFLRMKRPGE
328	DKVRPACQHK	QRRCSLSSME	MNTVSGQQCS	NGNMLYIGFR	GLDGVHCTPT
378	TDSGVICGRM	TCSPTEEENL	LHSGHPSEGD	PDLAKILEEV	RYIANRFRDQ
428	DEEEAICNEW	KFAASVVDR **L**	**CLMAFSVFTI**	**ICTIGILM** SA	PNFVEAVSKD
478	FA				

Abb. 3.2: Aminosäuresequenz von α7-nAChR inklusive des nativen N-terminalen Signalpeptids (rot). Die vier hydrophoben Membranbereiche sind eingerahmt, die Glykosylierungsstellen unterstrichen.

Bei zweien der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden Affinitätsmarkierungen eingefügt, um eine spätere Aufreinigung zu erleichtern. Hierzu wurde jeweils C-terminal eine Polyhistidinsequenz bestehend aus 6 Histidinen bzw. ein Streptavidinepitop verwendet (siehe Abb 4.1). Im Falle der Expression in *Pichia pastoris* war zudem eine N-terminales FLAG-Epitop vorhanden (Hopp, 1988).

Die berechnete Molmasse für α7-WT beträgt 54,5 kD. Für α7-His sowie α7-Str ergeben sich Werte von 55,3 kD bzw. 55,5 kD. Da es drei mögliche Glykosylierungsstellen gibt (N23, N67 und N110), und man einen Beitrag der Zucker von 2 kD pro Glykosylierung zur Molmasse annimmt, erwartet man für die rekombinanten Membranproteine eine endgültige Molmasse von etwa 60 kD.

3.1.3. PROTEINSEQUENZ DES IGLURB$_{FLOP}$

Die Gensequenz ist eine Ratten-cDNA (*Rattus norvegicus*), entnommen aus der EMBL/GenBank, Zugangsnummer M36419 (Keinänen, 1990). Der Sequenz des Proteins ist bei der Translation noch die native, 21 Aminosäuren lange Signalsequenz vorgeschaltet (Abb. 3.3),

die analog zum α7-nAChR den Transport des Proteins vom ER in die Plasmamembran steuert. Nach der Abspaltung dieser Sequenz umfaßt das Protein 862 Aminosäuren.

-21	MQKIMHISVL	LSPVLWGLIF	GVSSNSIQIG	GLFPRGADQE	YSAFRVGMVQ
30	FSTSEFRLTP	HIDNLEVANS	FAVTNAFCSQ	FSRGVYAIFG	FYDKKSVNTI
80	TSFCGTLHVS	FITPSFPTDG	THPFVIQMRP	DLKGALLSLI	EYYQWDKFAY
130	LYDSDRGLST	LQAVLDSAAE	KKWQVTAINV	GNINNDKKDE	TYRSLFQDLE
180	LKKERRVILD	CERDKVNDIV	DQVITIGKHV	KGYHYIIANL	GFTDGDLLKI
230	QFGGANVSGF	QIVDYDDSLV	SKFIERWSTL	EEKEYPGAHT	ATIKYTSALT
280	YDAVQVMTEA	FRNLRKQRIE	ISRRGNAGDC	LANPAVPWGQ	GVEIERALKQ
330	VQVEGLSGNI	KFDQNGKRIN	YTINIMELKT	NGPRKIGYWS	EVDKMVVTLT
380	ELPSGNDTSG	LENKTVVVTT	ILESPYVMMK	KNHEMLEGNE	RYEGYCVDLA
430	AEIAKHCGFK	YKLTIVGDGK	YGARDADTKI	WNGMVGELVY	GKADIAIAPL
480	TITLVREEVI	DFSKPFMSLG	ISIMIKKPQK	SKPGVFSFLD	PLAYE**IWMCI**
530	**VFAYIGVSVV**	**LFLVS**RFSPY	EWHTEEFEDG	RETQSSESTN	EFGIFNSLWF
580	SLG**AFMRQGC**	**DISP**RSLSGR	IVG**GVWWFFT**	**LIIISSYTAN**	**LAA**FLTVERM
630	VSPIESAEDL	SKQTEIAYGT	LDSGSTKEFF	RRSKIAVFDK	MWTYMRSAEP
680	SVFVRTTAEG	VARVRKSKGK	YAYLLESTMN	EYIEQRKPCD	TMKVGGNLDS
730	KGYGIATPKG	SSLGNAVNLA	VLKLNEQGLL	DKLKNKWWYD	KGECGSGGGD
780	SKEKTSALS**L**	**SNVAGVFYIL**	**VGGLGLAMLV**	ALIEFCYKSR	AEAKRMKVAK
830	NPQNINPSSS	QNSQNFATYK	EGYNVYGIES	VKI	

Abb. 3.3: Proteinsequenz von $GluRB_{flop}$ inklusive des N-terminalen Signalpeptids (rot). Die X-Domäne umfaßt die Aminosäuren 1-380. An sie schließt sich die Ligandenbindungsstelle an. Diese, aufgebaut aus S1 (381-524)und S2 (623-789), ist grün und magenta gekennzeichnet. Die vier hydrophoben Membranbereiche sind eingerahmt.

Das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt unterscheidet sich vom nativen Glutamatrezeptor durch die Anwesenheit zweier Affinitätsmarkierungen. Hinter die Signalsequenz des N-Terminus ist zunächst ein 8 Aminosäuren umfassendes FLAG-Epitop (Hopp, 1988) zur späteren Aufreinigung eingebaut worden (siehe Abb. 4.15). An dieses schließt sich dann die Sequenz des Glutamatrezeptors an. C-terminal wurde dann, gleichfalls aus Gründen einer erleichterten Aufreinigung, eine Poly-Histidinmarkierung angefügt. Insgesamt besteht das Konstrukt aus 899 Aminosäuren, wovon nach Abspaltung der Signalpeptids noch 878 verbleiben. Das Protein besitzt 3 mögliche Glykosylierungsstellen (N256, N370 und N413), die sich in der X-Domäne oder am Beginn des S1-Bereiches befinden.

Die theoretische Molmasse beträgt 98,4 kD für das native Membranprotein. Berücksichtigt man Glykosylierungen, kann von einer endgültigen Molmasse von etwa 104 kD ausgegangen wer-

den. Da zur Aufreinigung die Affinitätsmarkierungen an beiden Enden des Proteins vorhanden sein müssen, ist diese bereits ein guter Test auf die Expression der vollständigen Sequenz.

3.2. DARSTELLUNG REKOMBINANTER BACULOVIREN

3.2.1. KLONIERUNG DES α7-PROTEINS IN DAS DONORPLASMID

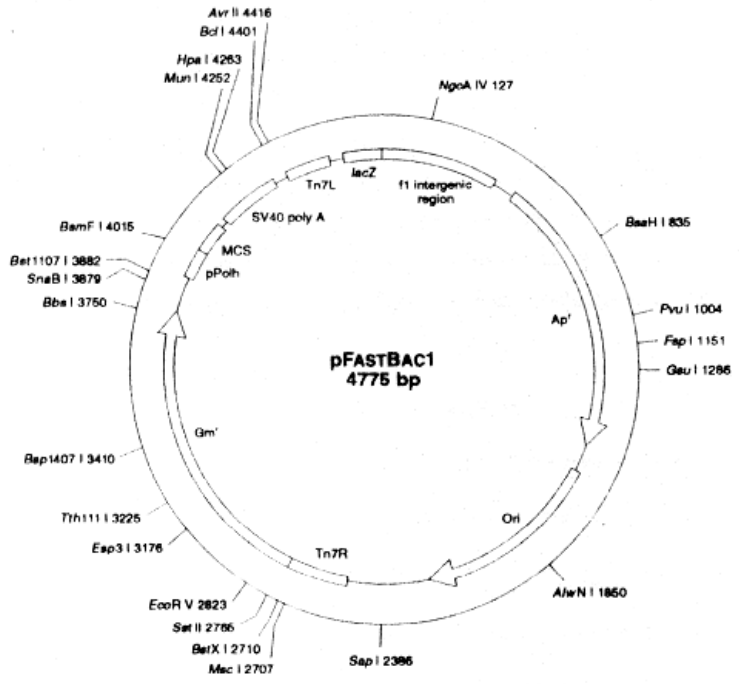
Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren wird das Bac-to-Bac® Baculovirus-Expressionssystem von Gibco BRL verwendet. Da das Genom des AcNPV von einer großen zirkulären Doppelstrang-DNA aus 130000 bp gebildet wird, erfolgt die Konstruktion rekombinanter Viren in zwei Schritten. Zunächst muß die cDNA des Rezeptors aus dem pLM1-Vektor in die Expressionskassette eines Donorplasmids kloniert werden. Diese enthält an beiden Enden die nötigen Erkennungssequenzen, um anschließend mittels Transposition in eine virale DNA eingebaut zu werden, welche die gleichen Sequenzen enthält (vgl. Abb. 3.4). Diese Transposition findet im Bakterium DH10Bac statt, das die benötigte Transposase bildet und das virale Genom als "Bacmid" enthält. Die Erkennungssequenzen befinden sich inmitten des lacZα-Gens, welches für die 146 N-terminalen Aminosäuren der β-Galaktosidase kodiert. Bei erfolgreicher Transposition wird dieses Leseraster zerstört, woraufhin die Bildung des Enzyms unterbleibt und die Bakterien die Fähigkeit verlieren, beigefügtes X-Gal umzusetzen. Dies erlaubt eine Unterscheidung von nicht-rekombinanten Bakterien, die auch weiterhin beim Kultivieren auf Nährstoffplatten durch das Freisetzen eines Indolderivats blaugefärbte Kolonien bilden können. Nach der Isolierung der rekombinanten Virus-DNA wird durch Transfektion von Insektenzellen intakter Virus gebildet und anschließend vermehrt.

3.2.1.1. DER VEKTOR pLM1

Der Plasmidvektor pLM1 ist ein reiner Transkriptionsvektor, er besitzt keine Signale für einen Translationsstart. Es trägt den RNA-Polymerasepromotor und die *translational leader sequence* des Gens 10 des T7-Phagen. Hieran schließt sich sogleich der Polylinker mit 16 verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme an. Der Transkriptionsterminator rrnBT_1T_2 sorgt für effiziente Transkription und ein β-Lactamasegen verschafft Ampicillin- und Carbenicillin-Resistenz.

3.2.1.2. DER VEKTOR pFASTBAC1

Der Donorvektor pFastBac1 enthält den starken Polyhedrin-Promotor (siehe Kap. 3.3.2), gefolgt von einem Polylinker, der zahlreiche Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthält. Der ursprüngliche Translationsstart des Polyhedrins wurde in die Sequenz ATT mutiert, wodurch das zu exprimierende Protein selbst das Startcodon ATG enthalten muß.



5’-[Polyhedrinpromotor] AAATAAGTAT TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTGTAATAA AAAAACCTAT AAATATTC

BamHI RsrII BssHII EcoRI StuI SalI
CG GATTATTCAT ACGTCCCAC CATCGGGCGC GGATCCCGGT CCGAAGCGCG CGGAATTCAA AGGCCTACGT

SstI SpeI NotI NspV XbaI PstI XhoI SphI KpnI HinDIII
CGACGAGCTC ACTAGTCGCG GCCGCTTTCG AATCTAGAGC CTGCAGTCTC GAGGCATGCG GTACCAAGCT

TGTCGAGAAG TACTAGAGGA TCATAATCAG-3’

Abb. 3.4: Der Donorvektor pFastBac1 und die Sequenz seines Polylinkers (MCS) mit einer Angabe der Restriktionsenzyme an deren spezifischen Schnittstellen. Der in ein ATT mutierte, ursprüngliche Translationsstart des Polyhedrins ist unterstrichen. Direkt vor dem Polylinker befindet sich der Polyhedrinpromotor, hier mit pPolh bezeichnet (leicht verändert übernommen aus dem Handbuch zum Bac-to-Bac® Baculovirus-Expressionssystem von Gibco BRL).

3.2.1.3. ENZYMATISCHES AUFSCHNEIDEN DER VEKTOREN

Die Klonierung von α7 aus pLM1 in pFastBac geschieht über BamHI-Schnittstellen. Diese sind in pLM1/α7 direkt vor und nach der α7-cDNA enthalten, in pFastBac ist sie in der MCS vor-

handen (vgl. Abb. 3.4). Das Restriktionsenzym und die Phosphatase sind von New England Biolabs, ebenso wie die zugehörigen Puffer (für BamHI: 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 150 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT; für CIP: 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) und das zugesetzte BSA.

Alle Restriktionsansätze werden zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach folgt eine Hitzeinaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 75 °C für die Dauer von 10 min.

Spaltung pFastBac1 mit BamHI:	10 µl pFastBac1 (101 µg/ml)
	2 µl BamHI-Puffer
	2 µl BSA (1 mg/ml)
	5 µl ddH_2O
	zuletzt 1 µl BamHI

Nach dieser Inkubation und Hitzedeaktivierung wird 1 µl CIP zupipettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend wird die Phosphatase durch Zugabe von 5 mM EDTA und Erhitzen auf 75 °C für 10 min inaktiviert. Der obige Ansatz wird in der beschriebenen Weise insgesamt dreimal durchgeführt, um genügend DNA für alle α7-Konstrukte zu haben.

Spaltung pLM1/α7(WT, His, Str):	5 µl pLM1/α7-WT, -His oder -Str (200 µg/ml)
	2 µl BamHI-Puffer
	2 µl BSA (1 mg/ml)
	10 µl ddH_2O
	zuletzt 1 µl BamHI

3.2.1.4. PRÄPARATIVE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Für die Herstellung von 1 %igen Agarosegelen werden 10 g niedrigschmelzende Agarose (Sigma) in 1 l TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 7,4, 1 mM EDTA) gegeben und in einer Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt. Vor dem Erkalten des Gels werden zu 150 ml der nun klaren Lösung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) zugesetzt, die Mischung in eine 10 x 10 cm große Gelkammer gegossen und nach dem Erstarren sofort verwendet. Die übrige Lösung wird bei 70 °C aufbewahrt, jedoch nicht länger als 2 Wochen.

Zu jeder aufzutrennenden Probe wird ein 6fach DNA-Probenpuffer gegeben (15 % Ficoll 400, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF), wobei jeweils 5 Volumenteile Nukleinsäure und 1 Teil Puffer gemischt werden. Als Marker wird $\lambda_{HindIII}$ (λ cl857 Sam7 DNA ΔHindIII) der Firma BioRad mit einem Molekulargewichtsverteilung von 125 bis 23130 bp verwendet.

Die obigen Restriktionsansätze werden vollständig auf das Agarosegel geladen und bei 200 V etwa 90 min im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Lokalisierung der DNA-Banden erfolgt UV-

spektroskopisch anhand eines Vergleichs mit den $\lambda_{HindIII}$-Banden. Die knapp unter der Marke von 2000 bp liegenden α7-Konstrukte werden mit einer sauberen, scharfen Rasierklinge aus dem Gel geschnitten, ebenso wie die mit BamHI geöffneten pFastBac-Vektoren.

3.2.1.5. DNA-EXTRAKTION AUS AGAROSE

Die Extraktion der Nukleotide erfolgt nach dem Standardprotokoll "QIAquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen. Alle Materialien und Reagenzien sind im Lieferumfang enthalten.

Nach dem Ausschneiden und Wiegen des DNA-haltigen Agarosegels wird die dreifache Menge QX1-Puffer zupipettiert und 10 min bei 50 °C inkubiert. Nach dem Auflösen des Gelstückes wird die Probe auf eine QIAquick-Säule aufgetragen und 60 s bei 16000 x g zentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer durch Zentrifugation gewaschen. Um diesen Puffer vollständig zu entfernen, wird nochmals zentrifugiert. Zuletzt wird die DNA mit 30 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA) nach einer Inkubationszeit von 5 min eluiert. Dabei wird Herstellerangaben entsprechend eine Rückgewinnung von 80 % angenommen, sodaß in allen Eluaten 800 ng DNA vorliegen sollte.

3.2.1.6. LIGATION VON α7 UND pFAST BAC

Dem aufgeschnittenen Plasmid wird zum einen die gleiche, zum anderen eine dreifache Menge an α7-DNA (WT, His oder Str) zugegeben. Alle Ligationen werden bei 16 °C über Nacht durchgeführt. T4-DNA-Ligase und 10fach Ligasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA) sind von New England Biolabs.

1:1-Ansatz:	3:1-Ansatz:
Je 2 µl DNA α7-WT, -His, -Str (50 ng)	6 µl DNA α7-WT, -His oder -Str (150 ng)
2 µl pFastBac1ΔBamHI (ca. 50 ng)	2 µl pFastBac1ΔBamHI
4 µl ddH_20	1 µl 10fach Ligasepuffer
1 µl 10fach Ligasepuffer	zuletzt 1 µl T4-DNA-Ligase
zuletzt 1 µl T4-DNA-Ligase	

Kontrolle:	2 µl pFastBacΔBamHI (ca. 50 ng)
	6 µl ddH_20
	1 µl 10fach Ligasepuffer
	1 µl T4-DNA-Ligase

3.2.1.7. TRANSFORMATION

Zur Transformation werden kompetente *E. coli*-Bakterien des Typs DH5α thi-1 relA1 (supE44 ΔlacU169 Φ80 lacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyr A96) verwendet. Dieser Stamm dient zur Anreicherung von Plasmiden (Hanahan, 1983). Alle Inhaltstoffe der Nährmedien stammen von Difco, die Antibiotika von Sigma. LB-Medium (10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 2,5 ml NaOH, pH 7,5, mit ddH_2O auf 1 l auffüllen) und ampicillinhaltige LB-Agarplatten (pro Liter Agar 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 16 g Bacto-Agar, mit ddH_2O auffüllen, vor dem Verfestigen 100 µg/ml Ampicillin zugeben) werden vor Gebrauch hergestellt und autoklaviert.

Pro Ligationsansatz (3 Konstrukte, je 2 Ansätze, zzgl. einer Kontrolle) werden 100 µl Zellen auf Eis aufgetaut und der gesamte Ligaseansatz zupipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4 °C wird die Suspension 4 min auf 37 °C erwärmt und danach wieder 2 min auf Eis gestellt. Zuletzt werden 500 µl LB-Medium zugegeben und weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. 100 µl jeder Suspension wird auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert (Serie 1), die restlichen Zellen werden 30 s bei 16000 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Davon werden 100 µl auf weitere LB/Amp-Platten ausgebracht (Serie 2). Bei 37 °C wird über Nacht inkubiert und die Anzahl sich entwickelnder Bakterienkolonien bestimmt.

	WT, 1:1	WT 3:1	His 1:1	His 3:1	Str 1:1	Str 3:1	Kontrolle
Serie 1	13	25	10	22	19	200	0
Serie 2	50	100	40	60	80	200	8

Tab. 3.1: Anzahl der DH5α-Kolonien aus den verschiedenen Ligationsansätzen. Die α7-Konstrukte sind nach der Affinitätsmarkierungen bezeichnet (siehe Abb. 4.1), die Bezeichnungen 1:1 und 3:1 geben die Mengenverhältnisse der DNA-Komponenten bei der Ligation wieder.

Da bereits in Serie 1 ausreichend viele Kolonien vorhanden sind und die entsprechende Kontrolle völlig leer blieb, werden diese Kolonien für eine weitere Vermehrung in Flüssigkultur ausgewählt. Hierzu werden von allen Platten dieser Serie bei je 6 Kolonien winzige Mengen Zellen mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in je 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin überführt. Nach 8 Stunden Schütteln bei 37 °C sind diese Ansätze trübe geworden. Die Bakterien werden durch Zentrifugation bei 5000 x g für 10 min pelletiert und die DNA isoliert.

3.2.1.8. MINIPRÄPARATION DER PLASMID-DNA

Die Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA erfolgt nach dem "QIAprep-spin Plasmid Miniprep Protocol" der Firma Qiagen. Alle verwendeten Reagenzien und Materialien sind Teil des gelieferten Anwenderpakets.

Die Bakterien werden nach obiger Zentrifugation in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 bei RT 5 min stehengelassen. Nach der Zugabe von 350 µl kaltem N3-Puffer wird gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Der weiße Niederschlag wird durch Zentrifugation (16000 x g, 10 min) entfernt und der Überstand auf eine QIAprep-Säule aufgetragen. Nach kurzer Zentrifugation (16000 x g, 1 min) und Verwerfung des Durchflusses wird mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert, bis der Puffer restlos entfernt ist. Zuletzt wird die DNA mit 100 µl TE-Puffer nach kurzer Inkubationszeit eluiert.

3.2.1.9. KONTROLLVERDAU DER REKOMBINANTEN pFASTBAC-PLASMIDE

Die Orientierung der in pFastBac eingebauten α7-DNA wird durch eine Spaltung mit dem Restriktionsenzym EcoRI bestimmt. Dieses und der zugehörige Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,025 % Triton X-100) sind von New England Biolabs. Der Restriktionsansatz wird zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach folgt eine Hitzeinaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 75 °C für die Dauer von 10 min.

Ansatz: 8 µl rekombinantes Plasmid (pFastBac mit α7-WT, -His oder -Str)
4,5 µl ddH_2O
1,5 µl EcoRI-Puffer
1 µl EcoRI

Die Plasmide, in denen die α7-DNA in der korrekten Orientierung eingebaut wurde, werden durch Agarosegelelektrophorese identifiziert. Als Marker dient $\lambda_{HindIII}$ sowie die Leiter von 50-2000 bp der Firma BioRad. Eine einwandfreie Insertion der DNA liegt dann vor, wenn der EcoRI-Verdau ein Fragment mit der Größe von ca. 600 bp freisetzt. Dies ist nur bei weniger als der Hälfte der Plasmide der Fall; für alle drei α7-Konstrukte findet sich jedoch mindestens ein rekombinantes Plasmid mit der korrekten Zusammensetzung, das für die weitere Prozessierung verwendet werden kann.

3.2.1.10. DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird durch UV-Absorptionsmessungen bei 260 nm ermittelt. Ein Absorptionswert von 1 AU bei einem Lichtweg von 1 cm entspricht dabei einer

Konzentration von 50 µg/ml für eine Doppelstrang-DNA bzw. 20 µg/ml im Falle einer einzelsträngigen DNA. Des Weiteren sollte die Absorption bei 260 nm mindestens um einen Faktor 1,5 bis 2 höher sein als diejenige bei 280 nm, um Verunreinigungen durch Proteine auszuschließen.

Da ein Plasmid zirkuläre Doppelstrang-DNA ist, findet die folgende Gleichung Anwendung:

A_{260} x Verdünnungsfaktor x 0,05 = Plasmid-Konzentration in µg/µl.

	DNA-Konzentration [µg/µl]	A_{260}/A_{280}
pFastBac/α7-WT	158	2,7
pFastBac/α7-His	280	2,9
pFastBac/α7-Str	174	2,2

Tab. 3.2: Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA rekombinanter pFastBac1-Vektoren. Das Verhältnis der Absorptionen von 260 und 280 nm hat einen Wert, der auf ausreichende Sauberkeit der DNA schließen läßt.

3.2.2. HERSTELLUNG REKOMBINANTER VIRUS-DNA

3.2.2.1. KOMPETENTE DH10BAC-ZELLEN

Die Transposition der α7-DNA in die Baculovirus-DNA hinein findet in Bakterien des Typs DH10Bac statt, welche mit dem Expressionssystem geliefert werden. Sie enthalten die virale DNA als Bacmid (bMON14272) und ein Helferplasmid (pMON7124), das eine Transposition ermöglicht. Da nur eine geringe Menge zur Verfügung steht, werden von diesem Stamm kompetente Zellen hergestellt (Hanahan, 1985). Die benötigten Antibiotika stammen von Sigma.

Mit einem sterilen Zahnstocher wird aus der gefrorenen Stammsuspension eine möglichst geringe Menge Zellen abgekratzt und auf einer LB-Platte mit 50 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Tetrazyklin ausgebracht. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wird von einer einzelnen Kolonie eine 2 ml-Flüssigkultur in LB mit 50 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Tetrazyklin angesetzt, welche nach einer weiteren ÜN-Inkubation zu 200 ml LB gegeben wird. Diese Kultur wird bei 225 rpm und 37 °C geschüttelt, bis die OD_{600} einen Wert von 0,2 bis 0,3 erreicht hat. Anschließend wird durch Schwenken in Eiswaser schnell auf 0 °C gekühlt und bei dieser Temperatur 10 min gehalten. Bei allen weiteren Arbeitsschritten darf die Temperatur 4 °C keinesfalls mehr überschreiten. Durch Zentrifugation in vorgekühlten JA14-Röhrchen bei 3000 Upm werden die Bakterien geerntet und mit 200 ml kaltem TFB I (30 mM Kaliumacetat pH 5,8, 100

mM RbCl, 50 mM $MnCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 0,5 mM LiCl, 15 % Glyzerin) aufgenommen. Nach weiteren 2 h bei 0 °C wird erneut abzentrifugiert und das Pellet in 8 ml kaltem TFB II (10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2$, 15 % Glyzerin) resuspendiert. Aliquots von 100 µl werden 10 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Qualitätskontrolle der kompetenten Zellen wird eine Transformation mit pLM1 durchgeführt und mit der Kompetenz von DH5α verglichen. Die Transformation, diesmal mit je 150 ng Plasmid, erfolgt wie schon beschrieben (3.2.1.7). Das Ausplattieren der DH5α erfolgte auf LB/Amp-Platten, für DH10Bac wurden LB/Kan+Tet-Platten eingesetzt, wobei hierfür 5 % aller transformierten Zellen verwendet wurden. Nach einer ÜN-Inkubation bei 37 °C wurden für DH5α 1600, für DH10Bac 600 Kolonien gezählt.

Die Kompetenz ergibt sich aus der Anzahl Kolonien pro Mikrogramm eingesetzter DNA (Sambrook, 1989). Für DH5α ergibt sich dabei ein Wert von 2,13 x 10^5, DH10Bac-Zellen erreichen immerhin einen Wert von 8 x 10^4, der sich bei der folgenden Transposition als hinreichend erwies.

3.2.2.2. TRANSPOSITION

Zunächst werden Nährstoffplatten der benötigten Zusammensetzung hergestellt. Die Komponenten des Luria Agar stammen von Gibco, alle Antibiotika, IPTG sowie X-gal von Sigma. 37 g Luria Agar (10 g SELECT-Peptone 140, 5 g SELECT-Hefeextrakt, 10 g NaCl, 12 g SELECT Agar) werden in 1 l ddH_2O gelöst und die Suspension autoklaviert. Wenn die Lösung auf 50 °C abgekühlt ist, werden 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin,10 µg/ml Tetrazyklin, 300 µg/ml X-Gal und 40 µg/ml IPTG zugegeben. Pro 60 mm-Petrischale werden jeweils 30 ml der Mischung ausgegossen.

100 µl DH10Bac-Zellen werden auf Eis aufgetaut und in 15 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Je etwa 1 mg der rekombinanten Donorplasmide (siehe Tab. 3.2) in 5-8 µl TE-Puffer werden zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wird 45 s auf 42 °C erwärmt und wieder 2 min auf Eis gekühlt. Jetzt werden 0,9 ml SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glukose) zugegeben und 4 h bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wird eine Verdünnungsreihe angesetzt. Mit SOC-Medium wird dabei die Zellsuspension Faktor 10, 10^2 und 10^3 verdünnt und von allen Proben - inklusive des unverdünnten Exemplars - je 100 µl auf die

vorbereiteten Platten ausgestrichen. Diese werden bei 37 °C inkubiert und auf das Entstehen von blauen und weißen Kolonien untersucht.

Nach 24 h lassen sich weiße und blaue Kolonien unterscheiden. Die überwiegende Mehrzahl der Zellen ist zunächst zwar weiß, nach weiteren 12 h zeigen dann aber die meisten der zunächst weißen Kolonien eine hellblaue Färbung und nur wenige Kolonien bleiben weiß. Die Platten mit 10^1 bis 10^3facher Verdünnung zeigen deutlich voneinander getrennte Kolonien. Bei α7-WT sind etwa 2 % der Kolonien weiß (insgesamt 8), bei α7-His sind es etwa 5 % (insgesamt 11) und bei α7-Str bleiben ca. 8 % (insgesamt 13) weiß. Diese Kolonien werden zur Kontrolle nochmals auf frische Nährplatten ausgestrichen, wobei weitere Kolonien sich nach Ablauf von 36 h blau färben. Von den auch jetzt noch eindeutig weißen Kolonien (6 beim WT, 10 bei α7-His und 12 bei α7-Str) werden 5 ml-Flüssigkulturen in LB mit Kanamycin, Gentamycin und Tetrazyklin in obigen Konzentrationen angelegt.

3.2.2.3. ISOLIERUNG DER REKOMBINANTEN VIRALEN DNA

Wegen der Länge des Bacmids von 130 kbp wurde ein eigens für die Isolierung von hochmolekularer DNA ausgearbeitetes Protokoll verwendet (Ioannou, 1994). Von den angesetzten Flüssigkulturen wird je 1 ml bei 14000 x g 1 min zentrifugiert und das Pellet in 0,3 ml 15 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA resuspendiert. Hierzu werden 0,3 ml 0,2 N NaOH, 1 % SDS gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT ist die anfangs trübe Probe klar geworden. Langsam wird 0,3 ml 3 M Kaliumazetat pH 5,5 zugefügt. Die Lösung wird 10 min auf Eis gestellt und dann der dicke, weiße Niederschlag 10 min bei 14000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird zu 0,8 ml i-Propanol gegeben, gemischt und weitere 10 min auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 14000 x g) und Entfernen des Überstandes wird zweimal je 0,5 ml 70 %iges Ethanol zugegeben, kurz vorsichtig geschüttelt und erneut zentrifugiert (10 min, 14000 x g). Nach Wegnahme des Überstandes wird die DNA bei RT vakuumgetrocknet und in 40 µl TE-Puffer aufgenommen.

Die Anwesenheit von hochmolekularer DNA wird durch Agarosegelelektrophorese verifiziert. Hierzu wird ein 0.5 %iges Gel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und 10 cm Länge gegossen und je 5 µl Bacmid-DNA aufgetragen. Als Marker wird $\lambda_{HindIII}$ verwendet, da dessen 23,1 kbp-Bande einen guten Größenvergleich mit der isolierten DNA erlaubt. Die Elektrophorese wird bei 15 V für die Dauer von 16,5 h durchgeführt.

Bis auf wenige Ansätze, in denen keine DNA gefunden wird, kann das Bacmid als Bande knapp oberhalb der 23,1 kbp-Markerbande idenfiziert werden. Die Banden knapp unterhalb 23,1 kbp und bei 6,6 kbp stammen aus dem Helferplasmid (Gibco, 1995).

3.2.3. HERSTELLUNG REKOMBINANTER BACULOVIREN

3.2.3.1. TRANSFEKTION DER INSEKTENZELLEN

Durch die Transfektion von Sf9-Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA wird die Produktion von rekombinanten Baculoviren initiiert. Dies wird mit Bacmid-DNA aller drei α7-Kontrukte je zweimal durchgeführt. Die benötigten Medien mit den entsprechenden Zusätzen stammen von Sigma.

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen. Zunächst werden in einer 60 mm-Petrischale 2 bis 2,3 x 10^6 Zellen in TNM-FH (Zusammensetzung siehe Kap. 3.3.3) ausgesät. Während die Zellen am Schalenboden anhaften, werden zwei Lösungen vorbereitet: Zum einen wird pro Transfektion zu 10 µl Bacmid-DNA 200 µl SFM 900-II (siehe 3.3.3) gegeben. Andererseits werden je 12 µl Cellfectin-Reagenz (Invitrogen) zu 200 µl SFM 900-II pipettiert. Diese Lösungen werden gemischt und 45 min bei RT inkubiert. Nun werden die Zellen mit 4 ml TNM-FH, an dieser Stelle jedoch ohne Antibiotika, gewaschen und das Medium wieder entfernt. Zu der vorbereiteten DNA/Lipid-Mischung wird 1,6 ml SFM 900-II gegeben und diese Lösung komplett auf die Zellen gegeben. Nach 5 h Inkubation bei 27 °C wird die Transfektionsmischung entfernt und durch 4 ml TNM-FH ersetzt. Die Zellen werden weitere 48 h bei 27 °C inkubiert und anschließend der Überstand (Virus I) durch Zentrifugation (500 x g, 5 min) von Zellen befreit. Erneut werden 4 ml TNM-FH auf die Zellen gegeben, nach 48 h Inkubation der Überstand geerntet und abzentrifugiert (Virus II).

3.2.3.2. PLAQUE BILDUNG ZUR TITERBESTIMMUNG

Alle Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen. In acht 60 mm-Petrischalen werden je 2,3 x 10^6 Sf9-Zellen ausgesät. Der Schalenboden sollte 50 % konfluent sein, wenn nach 1 h praktisch alle Zellen anhaften. Von der Transfektionslösung wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Da man einen Virustiter von etwa 10^7 erwartet (Gibco, 1995), sind Konzentrationen von 10^0, 10^{-2}, 10^{-3} und 10^{-4} geeignet. Je 100 µl jeder Verdünnung werden zu 1.5 ml TNM-FH gegeben. Dies geschieht zweimal, wonach das Medium aus den Schalen abgesaugt und durch die acht hergestellten Viruslösungen ersetzt wird. Bei RT wird unter langsamem Wippen (Certomat

TC 2, B. Braun Biotech Intl.) 90 min inkubiert. Je 20 ml 3% niedrigschmelzende Agarose (Biozym) und 1,5faches TNM-FH (Sigma) werden bei 37 °C gemischt und nach weiterem Abkühlen kurz vor dem Erhärten auf die Zellen pipettiert. Pro Schale werden 4 ml der Mischung verwendet. Nach vollständigem Aushärten der Agarose werden die Schalen kopfüber in einem abgeschlossenen Behälter bei 27 °C gelagert, bis sich Plaques, Löcher im Zellrasen, entwickeln. Die Agarose wird mit 1 ml einer 0.33 %igen Neutralrot-Lösung (Gibco), 1:20 verdünnt in TNM-FH angefärbt, wobei die Plaques weiß bleiben und sich deutlich umgrenzt von dem rot gefärbten Zellrasen abheben. Nach der Auszählung der Plaques wird der Virusgehalt bestimmt durch die Anzahl der Plaques pro Milliliter unverdünnt eingesetzte Viruslösung[5]. Bei zu geringer Verdünnung kommt es zu einer völligen Lyse der Zellen, was eine Auswertung verhindert. Die folgenden Berechnungen sind mit Schalen erzielt, die 100 bis maximal 400 Plaques aufwiesen. Von den Konzentrationen 10^{-2} bis 10^{-4} nimmt die Zahl der Plaques immer um etwa Faktor 10 ab, wie man es für die zunehmende Verdünnung des Viruses erwartet.

	Titer in Virus I-Lösung [pfu/ml]	Titer in Virus II-Lösung [pfu/ml]
α7-WT	$1{,}7 \times 10^5$	$2{,}6 \times 10^7$
α7-His	$1{,}1 \times 10^5$	$2{,}4 \times 10^7$
α7-Str	$1{,}8 \times 10^5$	$3{,}0 \times 10^7$

Tab. 3.3: Titer der durch Transfektion hergestellten Viruslösungen aller α7-Konstrukte. Virus I bezeichnet zwei Tage nach der Transfektion geerntete Lösungen, Virus II steht für Lösungen, die am vierten Tag isoliert wurden.

Das Entstehen von Plaques zeigt zunächst einmal an, daß virulente Partikel entstanden sind, die die Zellen infizieren und lysieren können. Die gemessenen Titer entsprechen den Erwartungen. Allerdings sind sie noch zu niedrig und die geernteten Volumina zu klein, um effiziente Virusinfektionen durchführen zu können. Eine weitere Virusvermehrung ist daher notwendig.

3.2.3.3. VIRUSVERMEHRUNG

Alle Virusvermehrungen werden mit Sf9-Zellen durchgeführt. Ziel der Vermehrung ist es, zunächst möglichst wenige Zellen zu infizieren, damit neuformierter Virus in einem zweiten und gegebenenfalls dritten Infektionsschritt noch genügend gesunde Zellen vorfindet, um sich

[5] Rechenbeispiel: Bei α7-WT-Baculoviren wurden 260 Plaques bei der 10^{-4}fachen Verdünnung gezählt. Da von dieser Lösung 0.1 ml eingesetzt wurden, ist der Titer 260 pfu x 10^4 x $(0.1\ \text{ml})^{-1}$ = $2{,}6 \times 10^7$ pfu/ml.

weiter vermehren zu können. Insgesamt resultiert daraus eine starke Anreicherung des Nährmediums mit Baculoviren.

Für die Vermehrung werden die Virus I-Lösungen verwendet, obwohl sie den niedrigeren Titer haben. Zum einen ist dieser Titer jedoch bereits hoch genug, um in ein bis zwei Vermehrungsschritten in die Nähe eines Titers von mehr als 10^8 pfu/ml zu kommen, hoch genug für Expressionsversuche und nahe an bisher beobachteten Maxima (Kitts, 1999). Zudem könnten die Virus II-Lösungen durch die fortgeschrittene Transfektion und die Lyse der Zellen bereits mit Proteasen verunreinigt sein, die eine weitere Vermehrung behindern.

Je 8.5 x 10^6 Zellen in 14 ml TNM-FH werden in insgesamt drei 75 cm^2-Rouxflaschen (Nalgene) ausgesät. Zu den nach 1 h entstandenen semikonfluenten Monolayern wird je 1 ml des obigen rekombinanten Virus aller α7-Konstrukte gegeben und eine Woche bei 27 °C inkubiert. Nach 3-4 Tagen wird eine zunehmende Anzahl schwimmender Zellen beobachtet, gegen Ende der Vermehrung zeigen fast alle Zellen ein unregelmäßiges Aussehen. Nach 7 Tagen wird das Medium geerntet und abzentrifugiert (2000 x g, 10 min). Die sich anschließende Titerbestimmung führt zu Werten knapp oberhalb von 10^8 pfu/ml (siehe Tab. 3.4). Damit ist die Konzentration der Viren um den Faktor 10^3 angestiegen und ein Wert erreicht, der effiziente Proteinexpressionsansätze gestattet.

	nach Transfektion	Monolayervermehrung	Schüttelvermehrung
α7-WT	1,7 x 10^5	1,2 x 10^8	1,6 x 10^8
α7-His	1,1 x 10^5	1,0 x 10^8	0,8 x 10^8
α7-Str	1,8 x 10^5	1,3 x 10^8	0,9 x 10^8

Tab. 3.4: Entwicklung des Titers im Laufe der Vermehrungszyklen bis zur Ernte von großen Volumina Viruslösung für Proteinexpressionen. Alle Werte sind in pfu/ml angegeben.

Um auf die benötigte Menge von Viruslösung mit ähnlich hohem Gehalt zu kommen, wird ein weiterer Vermehrungsschritt durchgeführt. Dabei werden bis zu 500 ml Zellen in Schüttelkultur mit den gerade geernteten Viruslösungen bei einem MOI von 0.05 bis 0.1 angeimpft und so lange geschüttelt, bis mindestens 90 % der Zellen abgestorben sind. Die gesamte Menge wird bei 4000 x g für 30 min zentrifugiert und die klare Viruslösung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Eine erneute Titerbestimmung ergibt Werte weiterhin um 10^8 pfu/ml (Tab. 3.4). Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, um Expressionsversuche zu starten.

3.2.4. REKOMBINANTE BACULOVIREN FÜR DEN GLUTAMATREZEPTOR

Die Klonierung der rekombinanten Baculoviren für die Überexpression des iGluRB wurde in der Gruppe von Dr. Keinänen, Dept. of Biosciences, University of Helsinki durchgeführt. Die Vermehrung der Viren findet dann analog wie für den α7-AChR beschrieben statt. In typischen Vermehrungsansätzen wurden 6 bis 8 l Viruslösung hergestellt. Die Titer liegen dabei in der Regel um 0,5 bis 1 x 10^8 pfu/ml.

3.3. INSEKTENZELLKULTUR

Die Expression der α7-Acetylcholin- und AMPA-Glutamatrezeptoren wird in Insektenzellen durchgeführt. Hierzu werden direkt die mittels des Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionssystems hergestellten rekombinanten Viren eingesetzt.

3.3.1. BACULOVIRIDAE

Das als Träger der Rezeptor-DNA verwendete *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) gehört zur Familie der *Baculoviridae* (Matthews, 1982). Dieses Virus befällt Endothelzellen des Mitteldarms verschiedener Insekten, u. a. *Spodoptera frugiperda* und *Trichoplusia ni*. Während einer Infektion kommt es zur Ausbildung zweier Arten viraler Nachkommen, zum einen extrazellulärer Partikel und zum anderen Viren, die im Zellkern des Wirts in viruseigene Proteine eingebettet sind (Summers, 1976; Volkman, 1976).

Die extrazellulären Viren werden 10 Stunden nach Beginn der Infektion exozytotisch in den Darm der Insekten entlassen und verbreiten dort die Infektion, indem sie mittels Endozytose von Nachbarzellen aufgenommen werden. Die Lebensdauer der Viren ist jedoch nur kurz, meist erfolgt eine schnelle Inaktivierung nach 36 bis 48 h. Weitaus besser vor Umwelteinflüssen geschützt sind die viralen Einschlußkörper, die sich noch lange nach dem Tod des Insektes und der Lyse seiner Zellen ausbreiten können und von Insektenlarven meist mit der Nahrung aufgenommen werden. Das wichtigste Protein der Schutzhülle ist das Polyhedrin.

3.3.2. BACULOVIRUS-EXPRESSIONSSYSTEM

Polyhedrin wird unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors im Wirtsorganismus sehr stark exprimiert und macht oft 50 % des Zellproteins infizierter Insektenzellen aus (Summers, 1978). Dabei ist Polyhedrin in der Zellkultur aber kein für das Virus essentielles Protein, die Replikation des Virus und Infektion von Insektenzellen laufen in dessen Abwesenheit ungehindert ab

(Smith, 1983). Dies macht den Einsatz des AcNPV als Vektor bei der Synthese rekombinanter Proteine sehr interessant: Ersetzt man das Polyhedrin-Gen durch die cDNA eines anderen Proteins, so wird es anstelle des Polyhedrins überexprimiert, ohne den Ablauf der Infektion einzuschränken[6]. Da ohne Polyhedrin außerdem keine viralen Einschlußkörper gebildet werden können, wird unter Verwendung eines Lichtmikroskops eine einfache morphologische Unterscheidung WT-infizierter Zellen von solchen, die mit rekombinanten Viren infiziert wurden, möglich. Der Polyhedrinpromotor wird erst im späten Verlauf einer Virusinfektion angeschaltet, weil Polyhedrin erst nach der Lyse der Zelle zum Schutz der Viren vor Umwelteinflüssen gebraucht wird. Dadurch kommt es erst zu einer Proteinexpression, wenn die Insektenzelle bereits erheblich geschädigt ist. Die Herstellung der rekombinanten Viren wurde bereits beschrieben.

3.3.3. ZELLLINIEN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen werden von Invitrogen erworben und ausgehend von der Generation P0 aufgetaut und kultiviert. Für die Vermehrung der Viren werden Sf9-Zellen aus *Spodoptera frugiperda* verwendet. Die Proteinexpression findet in Sf21-Zellen oder in High Five-Zellen aus *Trichoplusia ni* statt.

Zellmedien:

Sf9: TNM-FH (Sigma), vor Gebrauch werden 2,5 µg/ml Amphotericin (Sigma), 10 µg/ml Gentamycin (Sigma), 0,1 % Pluronic F 68 (Gibco BRL) und 10 % fötales Kälberserum (Sigma) zugegeben.

Sf21: Sf900-II SFM (Gibco BRL), vor Gebrauch werden pro Liter 10 ml 100fachAntibiotic/Antimyotic (Gibco BRL) zugesetzt.

High Five: Ex-Cell400^{TM} mit L-Glutamin (JRH-Bioscience).

3.3.4. AUFTAUEN VON INSEKTENZELLEN

Alle Zellen werden bei -196 °C in 1 ml-Portionen zu etwa 2-3 x 10^6 Zellen in für diese Temperaturen geeigneten Kryoröhrchen gelagert. Zum Auftauen wird das Tiefkühlgefäß unter vorsichtigem Schütteln bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellsuspension erkennbar verflüssigt. Sofort wird dann die Außenfläche des Röhrchens mit 70 %igem Ethanol abgerieben und die

[6] Handelt es sich bei dem zu exprimierenden Protein um ein für Insektenzellen toxisches Molekül, so wird dies natürlich Bedeutung für die Infektion haben. Allein aus der Veränderung der viralen DNA an dieser Stelle ergibt sich jedoch kein nachweisbarer Einfluß.

Zellen in eine bereits bereitgestellte 25 cm^2-Rouxflasche, die 4 ml eiskaltes Medium enthält, überführt. Besonders im Falle der High Five-Zellen darf damit keinesfalls gewartet werden, bis die Zellsuspension vollständig aufgetaut ist. Nach 30 min Inkubation bei 27 °C sollte die Mehrzahl der Zellen am Boden der Flasche angehaftet sein. Das überstehende Medium wird entfernt und durch frisches, 27 °C warmes Medium ersetzt. Schwimmen sehr viele Zellen noch im Medium, wird der Überstand nicht verworfen, sondern in eine neue Rouxflasche ausgesät und nochmals 30 min. inkubiert. Die in dieser Zeit anhaftenden Zellen können ebenfalls weiterverwendet werden.

3.3.5. KULTIVIERUNG DER INSEKTENZELLEN

Die Kultivierung der Insektenzellen erfolgt in Anlehnung an entsprechende Invitrogen-Handbücher, wurden aber für eigene Zwecke modifiziert. Die Wachstumstemperatur beträgt stets 27 °C. Grundsätzlich wird zwischen Monolayer- und Schüttelkultivierung unterschieden. Das Zellwachstum in Monolayern dient dabei der schonenden Langzeitpassagierung bis Generationen von etwa P50. Der Vorteil der Schüttelkultur liegt dagegen in schnell erreichbaren großen Volumina. Wegen der höheren mechanischen Belastung der Zellen sollten sie aber nicht länger als 10 Generationen geschüttelt werden. Danach werden wieder neue Zellen aus einer Rouxflasche in Schüttelkultur überführt. Die Verdoppelungszeiten liegen für High Five-Zellen bei etwa 18-24 h, für Sf9 bzw. Sf21-Zellen je nach Alter bei 24-36 h. Erfolgte die Vermehrung langsamer, werden die Zellen nicht weiter verwendet.

Für die Monolayer-Kultivierung werden Rouxflaschen der Größen 25 und 75 cm^2 verwendet (Costar). Spätestens bei Erreichen vollständiger Konfluenz werden Subkulturen im Verhältnis 1:6 angelegt. Zum Schütteln dienen bei kleineren Volumina Erlenmeyerkolben bis zu 1 l, die allerdings maximal zu 30 % befüllt werden, um einen ausreichenden Sauerstoffaustausch zu gewährleisten. Volumen bis zu 750 ml können dagegen in Fernbachkolben mit 1,8 l Fassungsvermögen geschüttelt werden. Die Kultivierung findet in Multitron-Schüttelinkubatoren (Infors) statt, wobei die Umdrehungszahlen so gewählt sind, daß gerade keine Verklumpungen der Zellen beobachtet werden. Erlenmeyerkolben werden mit einem Hub von 25 mm bei 93 Upm, Fernbachkolben mit 50 mm bei 60 Upm geschüttelt. Die Zellen werden bei einer Dichte von 0,3-0,4 x 10^6 Zellen/ml ausgesät und wachsen bis auf 2,0-2,4 x 10^6 Zellen/ml heran. Dann erfolgt eine Verdünnung wieder auf 0,3-0,4 x 10^6 Zellen/ml. Die Zelldichte wird mittels einer Neubauer-Zählkammer (NeoLab) bestimmt. Wird dieser Bereich wesentlich überschritten, finden die Zellen keine weitere Verwendung.

3.3.6. EINFRIEREN DER INSEKTENZELLEN

In regelmäßigen Abständen werden Zellen bei niedrigen Passagenzahlen nach dem Auftauen und kurzer Vermehrung wieder eingefroren, um stets genügend frisches Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben. Hierzu läßt man regelmäßig wachsende Monolayerzellen konfluent werden, worauf sie vom Boden der Rouxflasche abgeschlagen oder abgespült werden. Nach kurzer Zentrifugation (10 min bei 1000 x g) werden die Zellen mit einer Dichte von 3 x 10^6 Zellen/ml für High Five und 5-8 x 10^6 Zellen/ml für Sf9 und Sf21 in Einfrierlösung resuspendiert. Diese besteht aus 90 % des jeweiligen Mediums und 10 % DMSO. Die Suspensionen werden 1 h bei -20 °C, weitere 24 h bei -80 °C und abschließend bei -196 °C gelagert.

3.3.7. TRYPANBLAUFÄRBUNG

Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen wird eine Probe der Zellsuspension mit Trypanblau (Sigma) angefärbt. Dieses kann in löchrige Zellen, wie sie typischerweise im Verlaufe einer Baculovirusinfektion entstehen, eindringen, nicht jedoch in gesunde, uninfizierte Zellen. 900 µl Zellsuspension und 100 µl 0,4 %iger Farbstoff werden gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer blaue und ungefärbte Zellen ausgezählt. Bei uninfizierten Zellen sollte der Anteil toter Zellen maximal 1 % betragen, im Verlaufe von Proteinexpressionen steigt dieser Anteil abhängig von der Art des exprimierten Proteins und der Infektionsdauer bis zur Ernte auf 5 bis 40 % an.

3.4. BAKTERIENZELLKULTUR

3.4.1. KLONIERUNG REKOMBINANTER PLASMIDE

3.4.1.1. VORBEREITUNG DER DNA, LIGATION UND TRANSFORMATION

Zunächst muß die α7-cDNA, einmal als WT-cDNA, dann auch mit C-terminaler Polyhistidin- sowie Streptavidinmarkierung in den Expressionsvektor pLX3 kloniert werden. Hierzu wird der Vektor jeweils mit EcoRI (New England Biolabs) aufgeschnitten, mit Mungbohnen-Nuklease die überstehenden Nukleotide entfernt (30 min, 30 °C, anschließend Zugabe von 0,01 % SDS) und mit CIP die 5'-Phosphatgruppen entfernt. Die α7-cDNA wird mittels BamHI aus dem Transkriptionsvektor pLM1 herausgeschnitten, isoliert und ebenfalls mit Mungbohnen-Nuklease behandelt. Der MBN-Puffer stammt von New England Biolabs. Zum Einsatz dieser Restriktions- und anderer Enzyme sowie zur Isolierung der DNA-Fragmente siehe Kap. 3.2. Es

werden dabei 0,8 µg α7WT-cDNA, 1 µg α7His-cDNA, 0,9 µg α7Str-cDNA sowie 4 µg pLX3ΔEcoRI in je 30 µl TE isoliert.

Spaltung pLX3 mit EcoRI:	7 µl pFastBac1 (5 µg) 2 µl EcoRI-Puffer 10 µl ddH_2O zuletzt 1 µl EcoRI
Spaltung pLM1/α7(WT, His, Str):	3 µl pLM1/α7-WT, -His oder -Str (3-5 µg) 2 µl BamHI-Puffer 2 µl BSA (1 mg/ml) 12 µl ddH_2O zuletzt 1 µl BamHI

Behandlung mit MBN:	10 µl pLM1/α7ΔBamHI (1 µg) 3 µl MBN-Puffer 16 µl ddH_2O zuletzt 1 µl MBN	18 µl pLX3ΔEcoRI (3 µg) 3 µl MBN-Puffer 8 µl ddH_2O zuletzt 1 µl MBN

Die Ligation wird durchgeführt wie bereits in 3.2.1.6 beschrieben. Eingesetzt werden 200 oder 600 ng der verschiedenen α7-cDNAs mit jeweils 200 ng des aufgeschnittenen Vektors.

1:1-Ansatz:	3:1-Ansatz:
Je 7,5 µl DNA α7-WT, -His, -Str (200 ng)	22,5 µl DNA α7-WT, -His oder -Str (600 ng)
6 µl pLX3ΔEcoRI (600 ng)	6 µl pLX3ΔEcoRI (600 ng)
1,5 µl 10fach Ligasepuffer	3,5 µl 10fach Ligasepuffer
zuletzt 1 µl T4-DNA-Ligase	zuletzt 1,5 µl T4-DNA-Ligase

Kontrolle:	7,5 µl ddH_20 6 µl pLX3ΔEcoRI (600 ng) 1,5 µl 10fach Ligasepuffer 1 µl T4-DNA-Ligase

Bei der nachfolgenden Transformation (vgl. 3.2.1.7) zeigt sich, daß mit den 1:1-Ansätzen eine größere Anzahl an Klonen erhalten werden kann. Bei α7WT werden 15, bei α7His 7 und bei α7Str 27 Kolonien gezählt. Die anschließende DNA-Isolierung wird mit je 12 (bei α7His mit allen 7 vorhandenen) Kolonien durchgeführt (vgl. 3.2.1.8), wobei die DNA in je 100 µl TE eluiert wird.

3.4.1.2. KONTROLLVERDAU MIT HINCII

Die Orientierung der in pLX3 eingebauten α7-DNA wird durch eine Spaltung mit dem Restriktionsenzym HincII bestimmt. Dieses, sowie BSA und der zugehörige Puffer (100 mM Tris-HCl,

pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,025 % Triton X-100) sind von New England Biolabs. Der Restriktionsansatz wird zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach folgt eine Hitzeinaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 65 °C für die Dauer von 20 min.

Ansatz: 11 µl rekombinantes Plasmid (pLX3 mit α7WT, -His oder -Str)
1,5 µl BSA
1,5 µl NEB Puffer 3
1 µl HincII

Die Plasmide, in denen die α7-DNA in der korrekten Orientierung eingebaut wurde, werden wieder durch Agarosegelelektrophorese identifiziert. Als Marker dient $\lambda_{HindIII}$ sowie die Leiter von 50-2000 bp der Firma BioRad. Eine korrekte Insertion der DNA liegt dann vor, wenn der HincII-Verdau ein Fragment mit der Größe von ca. 450 bp freisetzt. Dies ist bei einem der α7WT-, bei dreien der α7His- und bei zweien der α7Str-Klone der Fall. Jeweils ein korrekter Klon jedes Typs wird für die weitere Prozessierung verwendet.

3.4.1.3. MAXIPRÄPARATION DER REKOMBINANTEN VEKTOREN

Die Maxipräparation von Plasmiden dient der Isolation von größeren DNA-Mengen. Verwendet werden hierzu die Anionenaustauschersäulen tip 500 der Firma Qiagen, welche eine Kapazität von 500 µg besitzen. Die Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA erfolgt nach dem "Maxi-Plasmid Purification Protocol" der Firma Qiagen. Alle verwendeten Reagenzien und Materialien sind Teil des gelieferten Anwenderpakets.

Zunächst werden von den oben identifizierten Klonen mit korrektem Plasmid 200 ml-Flüssigkulturen in LB-Medium mit 100 mg/ml Carbenicillin angelegt. Über Nacht wird bei 225 Upm und 37 °C inkubiert und anschließend die Zellen pellettiert (Beckman Avanti J25, Rotor JA-14, 15 min, 6000 Upm). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach vorsichtigem Mischen mit 10 ml Puffer P2 wird 5 min bei RT inkubiert und die Lyse der Zellen durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Puffer P3 und Mischen gestoppt. Nun wird 30 min bei 15000 Upm (Rotor JA-25.50, Beckman Avanti J25) zentrifugiert. Währenddessen wird die tip 500-Säule mit 10 ml Puffer QBT equilibriert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand auf die Säule gegeben und letztere zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen. Anschließend wird die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Dieses Eluat wird mit 10,5 ml i-Propanol gemischt und 30 min bei 20000 Upm im JA-25.50 zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen an der Luft in 500 µl TE gelöst.

3.4.1.4. DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Diese erfolgte in gleicher Weise wie zuvor (Kap. 3.2.1.10) und ergab für die rekombinanten pLX3-Vektoren die in Tab. 3.5 aufgeführten Werte.

	Ausbeute [µg]	**DNA-Konzentration [µg/µl]**	**A_{260}/A_{280}**
pLX3/α7-WT	464	928	1,76
pLX3/α7-His	673	663	1,76
pLX3/α7-Str	490	980	1,9

Tab. 3.5: Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA rekombinanter pLX3-Vektoren.

3.4.2. TRANSFORMATION VON C41 UND C43

Die Bakterien wurden von Dr. Miroux, Laboratory of Molecular Biology, MRC Cambridge zur Verfügung gestellt. Die Herstellung kompetenter C41 und C43 findet wie in Kap. 3.2.2.1 beschrieben statt. Als Antibiotikum wird in diesem Fall allerdings Carbenicillin (Sigma) in einer Konzentration vom 100 µg/ml verwendet.

Die Transformation kompetenter C41- und C43-Bakterien geschieht durch die bereits beschriebene Hitzeschockmethode (vgl. 3.2.1.7). Für jedes der drei α7-Konstrukte werden je 100 µl C41 und C43 verwendet. Die eingesetzte DNA-Menge beträgt in allen Fällen 1 µg, für die dazu benötigten Volumina siehe Tab. 3.5. Nach Zugabe der DNA zu den Zellen wird 30 min auf Eis inkubiert, 4 min auf 37 °C erwärmt und wieder 2 min auf Eis gekühlt. Nun werden 500 µl 2xTY-Medium (16 g Bacto-Trypton,10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 l mit ddH_2O auffüllen) zupipettiert und weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Hälfte eines jeden Ansatzes wird auf 2xTY-Nährplatten mit 100 µg/ml Ampicillin (pro Liter Agar 16 g Bacto-Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agarose, mit ddH_2O auffüllen, kurz vor dem Verfestigen 100 µg/ml Ampicillin zugeben) ausplattiert. C41 und C43 zeigen keine Unterschiede in der Zahl der entstehenden Kolonien, in beiden Fällen entstanden mehr als 500 Klone.

3.4.3. EXPRESSION IN C41 UND C43

3.4.3.1. ZELLMEDIEN

Alle Inhaltsstoffe der Nährmedien stammen von Gifco oder Sigma. Die angegebenen Mengen sind diejenigen, die für 1 l des Mediums benötigt werden.

2xTY: 16 g Bacto-Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl

M9: 6 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NH_4Cl, 0,5 g NaCl, 3 mg $CaCl_2$

M63: 2 g $(NH_4)_2SO_4$, 13,6 g KH_2PO_4, 0,5 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, mit KOH pH 7 einstellen

Den Minimalmedien M9 und M63 werden noch 1 mM $MgSO_4$ sowie 0,2 % Glyzerin beigefügt.

3.4.3.2. EXPRESSIONSANSÄTZE

Typischerweise werden die transformierten C41 bzw. C43 in ca. 50 ml des jeweiligen Nährmediums angeimpft und bei 225 Upm und 37 °C so lange inkubiert, bis die optische Dichte den Wert von $OD_{600\ nm}$=0,6 erreicht hatte. Dann wird durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 2 mM die Proteinexpression induziert und weiter wie angegeben inkubiert. An verschiedenen Punkten erfolgen dabei Probenentnahmen bzw. nach spätestens 20 h die Ernte der Zellen.

3.4.3.3. GESAMTZELLAUFSCHLUSS

Die hierfür verwendete SDS/Harnstofflyse der Zellen denaturiert sehr schnell zelluläre Proteine und verhindert den einen proteolytischen Abbau exprimierter Proteine während der Aufreinigung.

Die zu untersuchenden Zellen werden in Flüssigkultur vermehrt, die gewünschte Menge abzentrifugiert (5 min bei 2500 Upm in einer Heraeus Megafuge 1.0 R) und in einem 2:1-Gemisch von 10 M Harnstoff (Sigma) und SDS-Probenpuffer (150 mM Tris-HCl, 6 % SDS, 0,3 % Bromphenolblau, 30 % Glyzerin, vor Gebrauch pro Milliliter 100 µl β-Mercaptoethanol hinzufügen) solubilisiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei 95 °C werden die Zellen 10 min bei 13000 Upm in einer Heraeus pico-Tischzentrifuge pellettiert und der Überstand direkt für die SDS-PAGE verwendet.

3.4.3.4. FRAKTIONIERTER ZELLAUFSCHLUSS

Bei diesem Verfahren werden die Zellen schonender aufgeschlossen, was die Trennung in zytosolische, membrangebundene und unlösliche Proteine erlaubt (Nagai, 1987).

Wieder werden die Zellen in Flüssigkultur vermehrt. Die hier beschriebenen Volumina sind für den fraktionierten Aufschluß von 5 ml Kulturvolumen einer $OD_{600\ nm}$ von 1,5 geeignet. Die Zellen werden wie oben pellettiert und in 60 µl 50 mM Tris pH 8, 25 % Sukrose, 1 mM EDTA resuspendiert. Es werden 15 µl Lysozym der Konzentration 10 mg/ml und 0,75 µl 100 mM

PMSF (Sigma) zugegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 8,3 µl 100 µg/ml DNase I (Sigma), 100 mM $MgCl_2$, 10 mM $MnCl_2$ wird weitere 30 min bei 4 °C inkubiert. Nun werden 150 µl Aufnahmepuffer I (20 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 % Natriumdeoxycholat, 1 % Nonidet P-40, 2 mM EDTA) zugegeben. Die Detergenzien stammen von Boehringer Mannheim. Nach der Zentrifugation bei 25000 Upm im JA.25-50 (Beckman Avanti J25) für 10 min wird der Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthält, abgenommen und das Pellet in 100 µl Aufnahmpuffer II (0,5 % Triton X-100, 1 mM EDTA) suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wird der Überstand, der nun die Membranproteine enthält, abgenommen. Das verbleibende Pellet wird nun sooft mit Aufnahmepuffer II gewaschen, bis sich ein festes Pellet gebildet hat. Der jeweils bei der Zentrifugation anfallende Überstand wird verworfen. Zuletzt wird das verbleibende Pellet in 30 µl Aufnahmepuffer III (10 mM Tris pH 8, 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM β-Mercaptoethanol) gelöst. Hierin sind unlösliche, als Einschlußkörper vorliegende Proteine enthalten.

3.5. HEFEZELLKULTUR MIT *PICHIA PASTORIS*

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte zur Klonierung der Expressionsplasmide und zur Transformation und Kultivierung der Hefezellen werden in Anlehnung an den "*Pichia* Expression Kit" der Firma Invitrogen durchgeführt. Von dort werden auch die entsprechenden Plasmide und alle benötigten Reagenzien bezogen, sofern dies nicht anders angegeben ist.

3.5.1. KLONIERUNG REKOMBINANTER PLASMIDE

Zunächst muß wieder die α7-cDNA in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert werden. Die cDNA der für die Expression in Hefen verwendeten Acetylcholinrezeptoren unterscheidet sich im Vorhandensein einer N-terminalen FLAG-Affinitätsmarkierung von denjenigen Konstrukten, wie sie im Baculovirussystem oder bei der Expression in C41 oder C43 verwendet werden. Die drei Varianten des C-Terminus sind aber identisch und wie diese muß die cDNA mit BamHI aus dem Transkriptionsvektor pLM1 ausgeschnitten werden. Die zur Sekretion benötigte Signalsequenz wird durch den Expressionsvektor pPICZαC bereitgestellt (siehe Abb. 3.5).

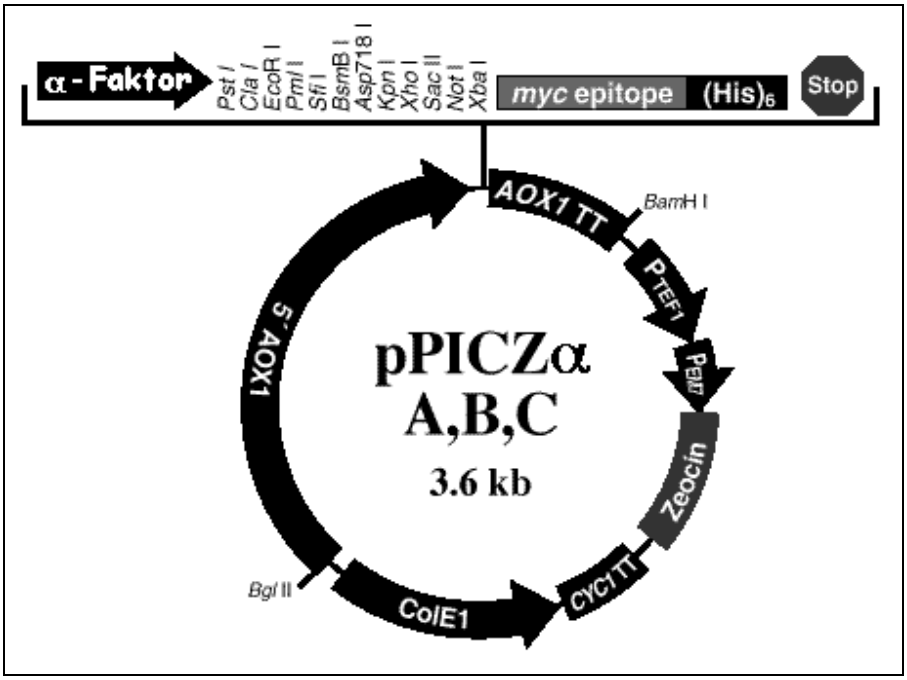


Abb. 3.5: Der Pichia-Expressionsvektor pPICZα. Das Leseraster der Versionen A, B und C ist jeweils um ein Nukleotid versetzt. Der α-Faktor ist die Signalsequenz aus *Saccharomyces cerevisiae*. Da die eingesetzte α7-cDNA ein eigenes Stopsignal besitzt, wird das im Vektor vorhandene nicht benötigt. Auch kommt es dadurch nicht zur Überführung des myc-Epitops oder einer weiteren Polyhistidinmarkierung in die α7-Proteinsequenz. AOX1 stellt den methanolabhängigen Promotor dar, mit Zeocin ist der für die Zeocin-Resistenz verantwortliche DNA-Abschnitt bezeichnet (entnommen aus dem Handbuch zum *Pichia Expression Kit* von Invitrogen).

Die α7-cDNA wird mit dem Restriktionsenzym BamHI aus pLM1 geschnitten, der Expressionsvektor pPICZαC wird durch BsmBI-Verdau geöffnet. Diese Schnittstelle kann direkt mit BamHI-gespaltener DNA ligiert werden. Alle nachfolgend verwendeten Enzyme sowie die angegebenen Puffer stammen von New England Biolabs.

Spaltung pLM1/FLAG-α7(WT, His, Str):	15 µl pLM1/FLAG-α7DNA (100 µg/ml)
	2 µl BamHI-Puffer
	2 µl BSA (1 mg/ml)
	zuletzt 1 µl BamHI

Der Ansatz wird 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach einer präparativen Agarosegelelektrophorese und Isolierung der α7-DNA-Banden aus dem Gel (vgl. 3.2.1.4 und 3.2.1.5) können die Fragmente FLAG-α7WT, FLAG-α7His und FLAG-α7Str für die nachfolgende Ligation eingesetzt werden.

Spaltung pPICZαC mit BsmB1:	5 µl pPICZαC (1 µg/µl)
	2 µl 10 x NEB Puffer 3
	12 µl ddH_2O
	zuletzt 1 µl BsmB1

Nach der Inkubation von 2 h bei 55 °C wird der Restriktionsansatz ohne Hitzedeaktivierung auf einem Agarosegel aufgereinigt, die Vektorbande ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel isoliert. Nun wird 3,5 µl 10 x NEB Puffer 3 und 1 µl CIP zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend wird die Phosphatase durch Zugabe von 5 mM EDTA und Erhitzen auf 75 °C für 10 min inaktiviert.

Für die Ligation wird wieder bei jedem Konstrukt zum einen die gleiche Menge α7-DNA und Expressionsvektor, zum anderen die dreifache Menge der α7-DNA verwendet. Alle Ligationen werden bei 16 °C über Nacht durchgeführt.

1:1-Ansatz:	3:1-Ansatz:
Je 7,5 µl FLAG-α7-WT/His/Str (150 ng)	Je 22,5 µl FLAG-α7-WT/His/Str (450 ng)
2 µl pPICZαCΔBsmB1 (ca. 150 ng)	2 µl pPICZαCΔBsmB1
1,1 µl 10fach Ligasepuffer	2,7 µl 10fach Ligasepuffer
zuletzt 1 µl T4-DNA-Ligase	zuletzt 1 µl T4-DNA-Ligase

Kontrolle: 7,5 µl ddH_2O
2 µl pPICZαCΔBsmB1
1,1 µl 10fach Ligasepuffer
1 µl T4-DNA-Ligase

Die anschließende Transformation kompetenter HB101-Zellen wird nach der Hitzeschockprozedur durchgeführt (vgl 3.2.1.7). Als Medium wird LB_{low} verwendet. Dabei handelt es sich um LB-Medium mit einer um die Hälfte reduzierten NaCl-Menge, was für die Effektivität des später eingesetzten Antibiotikums Zeocin notwendig ist. Es zeigt sich, daß sich bei den 3:1-Ansätzen nur je eine einzige Kolonie entwickelt. Eine Ausnahme bildet FLAG-α7Str, wo keine Kolonie beobachtet wird. Bei den 1:1-Ansätzen zeigen sich für FLAG-α7WT 5 Kolonien, für FLAG-α7His und FLAG-α7Str jeweils deren 3. Die Nährplatten mit den Kontrollen bleiben leer.

Von allen 13 Klonen werden Flüssigkulturen in LB_{low}, 25 µg/ml Zeocin angesetzt und für 8 h bei 37 °C und 225 Upm geschüttelt. Dann wird mit den Zellen jeder Flüssigkultur eine DNA-Minipräparation durchgeführt (siehe Kap. 3.2.1.8) und mit einem Kontrollverdau die Orientierung der insertierten α7-cDNA kontrolliert.

Hierzu wird das Restriktionsenzym EcoRI verwendet (vgl. 3.2.1.9). Bei korrektem Einbau der α7-cDNA muß aus dem rekombinanten Vektor ein 625 bp-Fragment freigesetzt werden.

Ansatz: je 17 µl rekombinantes Plasmid (pPICZαC mit FLAG-α7-WT/His/Str)
2 µl EcoRI-Puffer, zuletzt 1 µl EcoRI

Mittels Gelelektrophorese werden bei 2 Klonen mit FLAG-α7WT-Insertion und je einem Klon mit FLAG-α7His bzw. -Str die richtige Orientierung festgestellt. Mit diesen wird nun eine DNA-Maxipräparation durchgeführt (vgl. Kap. 3.4.1.3), wonach sich die in Tab. 3.6 angegebenen Konzentrationen ergeben.

	Ausbeute [μg]	**DNA-Konzentration [μg/μl]**	**A_{260}/A_{280}**
pPICZαC/α7-WT	405	1010	1,82
pPICZαC/α7-His	362	910	1,80
pPICZαC/α7-Str	386	960	1,81

Tab. 3.6: DNA-Konzentrationsbestimmung der rekombinanten pPICZαC-Vektoren.

3.5.2. TRANSFORMATION VON PICHIA PASTORIS

3.5.2.1. VORBEREITUNG DER ZELLEN

Aus Stabkolonien der *Pichia pastoris*-Stämme GS115 und SMD1163 werden 100 ml-Übernachtkulturen in YPD-Medium (1% Hefeextrakt, Difco, 2 % Pepton, Sigma, 2 % Dextrose, Sigma) gezogen[7], bis die optische Dichte einen Wert von $OD_{600\ nm}$=1,4 erreicht hat. Nach Zentrifugation bei 1500 x g für 5 min bei 4 °C wird der Überstand entfernt und die Zellen in 100 ml eiskaltem sterilen ddH_2O resuspendiert. Die Zentrifugation wird jetzt mehrfach wiederholt, die Resuspendierung erfolgt nacheinander in 50 ml eiskalten ddH_2O, in 4 ml eiskaltem 1 M Sorbitol (Sigma) und zuletzt in 200 μl 1 M Sorbitol. Die Zellen werden dann bei 4 °C gelagert und am gleichen Tag weiterverarbeitet.

3.5.2.2. LINEARISIERUNG DER PLASMIDE

Parallel zu den obigen Schritten werden die rekombinanten Plasmide für die spätere Geninsertion in die 5'-AOX1-Region des Wirts linearisiert. Dies geschieht durch enzymatische Spaltung mit dem Restriktionsenzym SacI (Boehringer Mannheim), welches in der Promotorregion AOX1, nicht jedoch in der α7-Sequenz schneidet. Verwendet werden die rekombinanten Plasmide aus der Maxipräparation in Tab. 3.6 bzw. nicht-rekombinante pPICZαC-Vektoren für spätere Kontrollversuche.

[7] Die Hefezellen wurden von Dr. Helmut Reiländer, Abt. Molekulare Membranbiologie, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt zur Verfügung gestellt.

Ansatz I: je 17,8 µl rekombinantes Plasmid (pPICZαC mit FLAG-α7-WT/His/Str)
2,2 µl Puffer A (Boehringer Mannheim)
zuletzt 2 µl SacI

Ansatz II: je 12 µl pPICZαC (0,83 µg/ml)
1,5 µl Puffer A
1,5 µl SacI

Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wird eine Hitzeinaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min durchgeführt. Die DNA wird analog einer Minipräparation isoliert (vgl. Kap. 3.2.1.8). Allerdings werden hierzu 20 µl ddH_2O statt des TE-Puffers verwendet und die DNA sofort weiterverarbeitet, um autokatalytische Zersetzung zu vermeiden.

3.5.2.3. ELEKTROPORATION

Die Elektroporation wird mit der Gene Pulser II-Einheit der Firma BioRad durchgeführt. 80 µl der aus obiger Vorbereitung in Sorbitol suspendierten Zellen werden mit den 20 µl der linearisierten DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette einer Dicke von 0,2 cm (BioRad) überführt. Die Küvette wird 5 min auf Eis inkubiert. Der Puls wird mit einer Ladespannung von 1500 V erzeugt, was eine elektrische Feldstärke von 7500 V/cm ergibt. Die Kapazität beträgt 25 µF, der eingestellte Widerstand 200 Ω und der erzeugte Puls hat eine Dauer von ca. 5 ms. Sofort danach wird 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol zugegeben und der Küvetteninhalt in ein steriles 15 ml-Röhrchen (Falcon) überführt. Ohne zu schütteln wird 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach werden verschiedene Volumina von 10-200 µl der Suspension auf YPDS-Platten (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Dextrose, 1 M Sorbitol, 2 % Agar, 100 µg/ml Zeocin) ausplattiert. Diese Nährstoffplatten werden für 70 h bei 30 °C inkubiert und anschließend die Zahl der transformanten Klone bestimmt (siehe Tab. 3.7).

	Anzahl Kolonien mit GS115				**Anzahl Kolonien mit SMD1163**			
Vol [µl]	**pPICZα**	**α7-WT**	**α7-His**	**α7-Str**	**pPICZα**	**α7-WT**	**α7-His**	**α7-Str**
10	2	3	5	3	1	1	1	0
50	11	20	19	2	1	3	3	1
200	14	60	100	9	2	11	3	3

Tab. 3.7: Anzahl transformierter Klone nach Elektroporation von GS115 und SMD1163, sowohl mit pPICZαC-Vektoren ohne α7-Insertion als auch mit den rekombinanten α7WT, -His, oder -Str haltigen PICZαC-Vektoren in Abhängigkeit des ausplattierten Volumens elektroporierter Zellen.

Bei den dichter bewachsenen Platten wird außerdem das Auftreten von winzigen Kolonien in der Umgebung transformanter Klone beobachtet. Da hier die Gefahr besteht, daß diese auch ohne erfolgreiche Transformation wachsen können, weil die lokale Zeocin-Konzentration abgenommen hat, werden sie nicht für die weiteren Experimente eingesetzt.

Soweit vorhanden, werden für jedes Kontrukt beider Hefestämme 10 der großen Kolonien auf frische, zeocinhaltige YPDS-Platten neu ausgestrichen und weitere 48 h inkubiert.

3.5.3. EXPRESSIONSVERSUCHE IN *PICHIA PASTORIS*

3.5.3.1. WACHSTUMSMEDIEN

Die verwendeten Inhaltsstoffe werden, soweit nicht im *Pichia Expression Kit* enthalten, von Difco oder Sigma bezogen.

BMGY: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 100 mM K_3PO_4 pH 6, 1,34 % YNB, 4 x 10^{-5} % Biotin, 0,004 % Histidin, 1 % Glyzerin

BMMY: wie BMGY, jedoch 0,5 % Methanol statt 1 % Glyzerin

MGYH: 1,34 % YNB, 1 % Glyzerin, 4 x 10^{-5} % Biotin, 0,004 % Histidin

MMH: wie MGYH, jedoch 0,5 % Methanol statt 1 % Glyzerin

3.5.3.2. EXPRESSION UND MEMBRANISOLIERUNG

Sowohl bei einer Expression in Vollmedium (BMGY/BMMY) wie auch in Minimalmedium (MGYH/MMH) wurden die rekombinanten Hefen im jeweiligen glyzerinhaltigen Medium angeimpft und bei 30 °C ü. N. bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600\ nm}$=2.5 wachsen gelassen. Dann werden die Zellen abzentrifugiert (1500 x g, 5 min) und in dem entsprechenden methanolhaltigen Medium bei einer OD von 1,0, typischerweise 200 ml, resuspendiert. Die Induktion mit Methanol wird nach der gewünschten Zeit gestoppt und die Zellen unter Verwendung eines Disintegrators (Disintegrator-S, BIOmatik) oder einer French Pressure Cell Press (SLM Instruments) aufgeschlossen.

Zur Lyse in der French Press werden die Zellen in Lysepuffer (50 mM Na_3PO_4, pH 7,4, 1 mM EDTA, 5 % Glyzerin, 1 mM PMSF) bei 4 °C resuspendiert, abzentrifugiert und in weiteren 15 ml Lysepuffer aufgenommen. Anschließend werden sie durch einen dreimaligen Durchlauf durch die Druckkammer aufgeschlossen. Zur Lyse im Disintegrator werden die pelletierten Zellen analog vorbereitet, jedoch werden zusätzlich 15 ml Glaskugeln (425-600 µM, Sigma) zugegeben und 2 x 5 min bei 5000 Upm gemischt. Die Temperatur wird während der gesamten

Zeit bei 4 °C gehalten. Die Lyse der Zellen wird mit einem Lichtmikroskop verfolgt und sollte eine Ausbeute von mindestens 90 % haben. Die Glaskugeln und ganze Zellen werden durch eine Zentrifugation bei 700 x g abgetrennt und die Membranfragmente durch Ultrazentrifugation (Rotor Ti45, Beckman Optima LE 80-K, 30000 Upm, 30 min) geerntet. Nach Resuspendierung in 50 mM Na_3PO_4, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA werden sie bei -20 °C aufbewahrt.

3.6. ALLGEMEINE METHODEN

3.6.1. SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von Proteingemischen anhand der Molekulargewichte, wobei das Dodecylsulfat-Anion den Proteinen eine der Masse proportionale negative Ladung verleiht. Zur Fokussierung durchlaufen die Proben ein Sammelgel mit neutralem pH, im anschließenden alkalischen Trenngel erfolgt dann die Auftrennung im elektrischen Feld. Es wird das Minigel-PAGE-System der Firma BioRad verwendet, die Maße der Gele sind hier 10 x 8 x 0,075 cm^3. Alle Proben werden vor dem Auftrag mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht. Die Elektrophorese dauert 45-50 min bei 200 V. Zur Bestimmung der Molekulargewicht wurden Gemische von Standardproteinen der Firma BioRad im Größenbereich von 205 bis 14 kD verwendet.

Sammelgel		Trenngel	
Sammelgelpuffer	1,25 ml	Trenngelpuffer	3,75 ml
ddH_2O	3 ml	ddH_2O	6,25 ml
Acrylamidlösung	0,75 ml	Acrylamidlösung	5 ml
10 % APS	30 µl	10 % APS	70 µl
TEMED	12 µl	TEMED	15 µl

Tab. 3.8: Pipettierschema für die Herstellung von zwei 10 %igen SDS-PAGE-Gelen. Zunächst wird das Trenngel gegossen und bis zum Festwerden mit 70 % Ethanol überschichtet. Nach dessen vollständiger Entfernung wird das Sammelgel darübergelegt.

SDS-Probenpuffer: 150 mM Tris-HCl, 6 % SDS, 0,3 % Bromphenolblau, 30 % Glyzerin, vor Gebrauch werden pro Milliliter 100 µl β-Mercaptoethanol hinzu gefügt

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % SDS

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4 % SDS

Acrylamidlösung: 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Bei der Herstellung der Gele werden zunächst Puffer, Wasser und Acrylamidlösung gemischt und zuletzt APS und TEMED zugegeben. Die benötigten Volumina sind in Tab. 3.8 angegeben.

3.6.2. SILBERFÄRBUNG

Wegen der durchweg sehr niedrigen Expression der in dieser Arbeit untersuchten Membranproteine, kommt eine Coomassieblau-Färbung der Proteingele wegen deren niedrigen Sensitivität nicht in Frage. Mittels der Silberfärbung (Oakley, 1980) ist dagegen die Detektion von wenigen Nanogramm Protein möglich.

Fixierlösung: 30 % Ethanol (acetonvergällt), 10 % Essigsäure

Thiosulfatlösung: 30 % Ethanol, 0,1 M Natriumacetat pH 6,0, zu 100 ml vor Gebrauch 100 mg Natriumthiosulfat zufügen.

Silbernitratlösung: 0,1 % Silbernitrat, zu 50 ml vor Gebrauch 12,5 µl 36 % Formaldehyd zufügen.

Entwicklerlösung: 2,5 g $NaCO_3$ in 100 ml ddH_2O, 50 µl 37 % Formaldehyd zugeben; diese Lösung immer frisch ansetzen.

Alle nachfolgenden Schritte finden bei RT statt. Das Gel wird nach der Elektrophorese 15 min in Fixierlösung gegeben, dann die gleiche Zeit in Thiosulfatlösung. Nach 3 x 5 min in ddH_2O wird 15 min in Silbernitratlösung inkubiert, kurz in ddH_2O sowie in 2 x 25 ml Entwickler gespült und zuletzt in den restlichen 50 ml Entwickler so lange inkubiert, bis eine befriedigende Farbentwicklung eingetreten ist. Diese wird dann durch Zugabe von 1 ml Essigsäure gestoppt und das Gel in ddH_2O gewaschen und aufbewahrt.

3.6.3. WESTERN-BLOT

Der Western-Blot dient des immunologischen Nachweises bestimmter Proteine bzw. Aminosäuresequenzen durch spezifische Antikörperreaktionen. Die Proteine werden nach der elektrophoretischen Auftrennung in der SDS-PAGE auf einer Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) immobilisiert. In dieser Arbeit werden folgende Antikörper verwendet: Der monoklonale α7-Antikörper (Dianova) sowie die Antikörper M1 und M2 der Firma Kodak, die spezifisch an das FLAG-Peptid binden, welches als N-terminale Affinitätsmarkierung beim GluRB verwendet wird. Während M1 das Peptid nur bindet, wenn das Epitop N-terminal ist, spielt dies

für den M2-Antikörper keine Rolle. Letzter benötigt auch nicht die Anwesenheit von Ca^{2+}, wie dies für M1 der Fall ist.

Verwendet wird die Transblot SD-Apparatur der Firma BioRad. Zur Größenbestimmung werden vorgefärbte Proteinstandards von Biorad verwendet. Gleichzeitig ist deren Blotverhalten eine einfache visuelle Kontrolle auf die korrekte Durchführung des Westernblots.

Auf die Anode wurden zunächst zwei zuvor in Blotpuffer (s. u.) getauchte 10 x 10 cm^2 große Whatman 3MM-Filterpapiere gelegt. Hierauf wird die in Puffer getränkte Membran und blasenfrei darauf das 30 s in Puffer inkubierte Proteingel gelegt. Eine Plastikmaske beschränkt den Stromfluß auf die Fläche des Gels. Abschließend werden 2 weitere 3MM-Filterpapiere auf die Anordnung gelegt und die Kathode befestigt. Bei einer Spannung von 15 V wird 20 min geblottet.

Anschließend wird die Membran mit 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure gefärbt, die Banden durch Spülen in ddH_2O sichtbar gemacht und die Membran nach der Kontrolle mit Leitungswasser wieder entfärbt. Für die weitere Entwicklung des Westernblots werden je nach Antikörper zwei verschiedene Protokolle verwendet. Alle Schritte finden bei RT statt.

3.6.3.1. ANTI-α7-ACHR-ANTIKÖRPER

Anodenpuffer:	0,3 M Tris-HCl pH 10,4, 20 % Methanol
Kathodenpuffer:	25 mM Tris-HCl pH 9,4, 40 mM ε-Aminocapronsäure, 20 % Methanol
Blotto:	3 % Magermilchpulver oder 3 % BSA (letzteres im Falle des Nachweises des Streptavidinlabels) in PBS
1. Antikörper:	10 µg/ml in PBS
2. Antikörper:	Anti-Ratte IgG (Sigma), 1:1000 in PBS

Die Membran wird 15 min in 50 ml Blotto inkubiert und 2 x 5 min in PBS gewaschen. Der 1. Antikörper wird eine Stunde zugegeben, wonach wiederum zweimal mit PBS gewaschen wird. Nach 30 minütiger Inkubation mit dem 2. Antikörper wird erneut gewaschen und danach die Membran angefärbt. Hierzu wird eine NBT/BCIP-Tablette (Sigma) in 10 ml ddH_2O gelöst. Die Färbereaktion wird durch Spülen in Wasser gestoppt.

3.6.3.2. M1- UND M2-ANTIKÖRPER

Das aufgeführte Protokoll gilt für den M1-Antikörper, kann aber durch Weglassen des $CaCl_2$ auch mit dem M2-Antikörper angewendet werden.

Blotpuffer: 25 mM Tris-HCl pH 8,2, 192 mM Glyzin, 20 % Methanol

1. Antikörper: M1-Antikörper, 20 µg/ml in TBS, 0,05 % Tween 20, 1 mM $CaCl_2$ oder M2-Antikörper, 20 µg/ml in TBS, 0,05 % Tween 20

2. Antikörper: Anti-Maus IgG (Sigma), 1:1000 in TBS, 0,05 % Tween 20

Die Membran wird 15 min mit Blotto inkubiert und 2 x 5 min mit TBS, 1 mM $CaCl_2$ gewaschen. Der 1. Antikörper wird 1 h bei lang auf die Membran gegeben. Nach dem Waschen mit TBS, 0,05 % Tween 20, 1 mM $CaCl_2$ (2 x 5 min), wird die Membran im 2. Antikörper für 30 min inkubiert. Es folgen 2 Waschschritte mit TBS, 0,05 % Tween 20, 1 mM $CaCl_2$ und einer mit TBS, 1 mM $CaCl_2$. Die Färbung erfolgt wieder mit einer NBT/BCIP-Tablette.

3.6.4. TCA-FÄLLUNG

Diese Methode dient der Aufkonzentrierung verdünnter Proteingemische. Zu 500 µl Proteinlösung werden 125 µl 50 % TCA gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wird 30 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird nacheinander mit je 500 µl Aceton, 90 % Ethanol und 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in der Vakuumzentrifuge (Savant Speedvac Concentrator) getrocknet. Zuletzt wird es in 50 µl einer 2:1 Mischung aus SDS-Probenpuffer (siehe 3.6.1) und 10 M Harnstoff resuspendiert und 5 min bei 95 °C gekocht. Die Probe kann direkt zur Auftragung auf ein Proteingel verwendet werden.

3.6.5. BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN

Abhängig von der zu erwarteten Proteinkonzentration und des vorliegenden Puffersystems werden verschiedene Proteinbestimmungen durchgeführt. Zur UV/VIS-spektroskopischen Messung wird der Spektrophotometer DU-640 der Firma Beckman verwendet.

3.6.5.1. BRADFORD-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Bei dieser Methode wird die Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau G-250 an Proteine quantifiziert (Bradford, 1976). Durch die Bindung stabilisiert sich die anionische Form des Farbstoffes, welche ein Absorptionsmaximum bei 595 nm erzeugt. Die Proteinkonzentration sollte zwischen 1 und 30 µg/ml liegen. Nachteilig wirkt sich aus, daß die Genauigkeit der Methode durch verschiedene Detergenzien und Lipide bereits in niedriger Konzentration gestört wird, sodaß in der Mehrzahl der in dieser Arbeit durchgeführten Bestimmungen auf andere Methoden zurückgegriffen werden mußte.

Bradfordlösung: 0,01 % Coomassie-Brilliantblau G-250 (Sigma) in 5 % Ethanol, 8,5 % Phosphorsäure. Die Lösung wird nach der Herstellung durch Whatman Filterpapier Nr. 1 gefiltert.

Diese Lösung ist über Monate stabil und muß deshalb nur zu Beginn einmal geeicht werden. Die Eichkurve wird im Bereich von 1-10 µg erstellt. Hierzu werden je 50 µl BSA-Lösung im Konzentrationsbereich von 20 bis 200 µg/ml zu 1 ml Bradfordlösung gegeben. Als Referenzwert dienen 50 µl Proteinpuffer. Die anschließenden Bestimmungen werden mit ähnlichen Proteinmengen durchgeführt.

3.6.5.2. AMIDOBLACKBESTIMMUNG

Diese Proteinbestimmung kann auch bei sehr hohem Überschuß von Lipid durchgeführt werden (Kaplan, 1989). Das Protein wird nach dem Denaturieren vollständig mit TCA gefällt und auf einem Filterpapier immobilisiert. Nach dem Färben der Filter mit Amidoblack wird der Farbstoff wieder in lösliche Form überführt und die Absorption dieser Lösung bei 630 nm gemessen. Proteinkonzentrationen bis hinunter auf 0,5 µg/ml können bestimmt werden.

Bei jedem Meßvorgang werden interne Standards mitvermessen. Hierzu werden je 2 ml von BSA-Lösungen der Konzentrationen 0,5 bis 10 µg/ml hergestellt. Als Referenzwert dienen 2 ml ddH_2O. Die zu bestimmenden Proteinlösungen werden auf 2 ml mit ddH_2O verdünnt. Alle nachfolgenden Schritte finden bei RT statt.

Es werden nacheinander 200 µl 10 % SDS, 300 µl 1 M Tris-HCl pH 7,5, 1 % SDS und 600 µl 104 % TCA zugegeben. Nach jedem Schritt werden alle Proben vorsichtig gemischt und nach der letzten Zugabe 20 min inkubiert. Nun werden die Proben mit einem 12-Kanal-Filtrationsgerät (Millipore) durch 25 mm-Filter aus Zellulosemischester (HAWP02500, Millipore) gesaugt und mit je 2 ml 6 % TCA gewaschen. Die Filter werden einzeln mit 250 µl Amidoblacklösung (0,1 % Amidoblack 10 B (BioRad) in Methanol/Eisessig/ddH_2O 40/10/45) 3 min gefärbt und kurz mit ddH_2O gewaschen. Anschließend werden sie mit 2 x 4 ml Entfärbelösung (Methanol/Eisessig/ddH_2O 45/1/4) inkubiert, bis die Ränder der Filter wieder weiß sind. Nach kurzem Trocknen auf Papierhandtüchern werden die Filter zweimal gefaltet und in 1,5 ml-Reagiergefäße gesteckt. Nach der Zugabe von je 1 ml 25 mM NaOH, 0,05 mM EDTA, 50 % Ethanol wird 20 min unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nachdem der Farbstoff in Lösung gegangen ist, werden die Proben spektroskopisch vermessen.

3.6.5.3. BCA-BESTIMMUNG

Diese Proteinmessung dient in der vorliegenden Arbeit der Bestimmung von Gesamtproteinkonzentrationen bei der Aufreinigung der Membranproteine. Der Konzentrationsbereich liegt zwischen 0,1 und 0,5 mg/ml. Cu^{2+} wird unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Protein zu Cu^{+} reduziert, welches dann durch Komplexierung durch BCA purpurfarben gefärbt wird (Smith, 1985). Das Absorptionsmaximum des Komplexes liegt bei 562 nm. Auch diese Bestimmungsmethode unterliegt der Störung durch Detergenzien und konnte nur an der angegebenen Stelle eingesetzt werden.

Verwendet wird die BCA-Methode der Firma Pierce, bestehend aus Reagenz A (BCA, Na_2CO_3, $Na_2C_2O_5$, Natriumtartrat, 0,1 M NaOH) und Reagenz B (4 % $CuSO_4$). Vor jeder Bestimmung wird die BCA-Lösung frisch aus den Reagenzien hergestellt. In jedem Fall werden auch interne Standards eingesetzt. Hierzu werden BSA-Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,5 mg/ml hergestellt. Als Referenz dient der Proteinpuffer.

Zu je 50 µl der zu untersuchenden Proben bzw. Standards wird je 1 ml BCA-Mischung gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT kann die Absorption bei 562 nm bestimmt werden.

3.6.6. DECYLMALTOSID-BESTIMMUNG

Die Bestimmung der DM-Konzentration beruht auf der Oxidation des Zuckers durch Schwefelsäure und Farbentwicklung in Gegenwart von Phenol (Dubois, 1956). Als Standards werden DM-Pufferlösungen der Konzentrationen 3, 6 und 12 mg/ml hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt. Dabei wird der gleiche Puffer verwendet, der in der zu bestimmenden Proteinprobe des DM-solubilisierten GluRB vorliegt. Jeder Standard sowie die Proteinlösungen werden dreifach bestimmt.

2 µl jeder Probe wird in ein 15 ml-Reagenzglas gegeben und 998 µl ddH_2O zugefügt. Danach werden 50 µl einer 90 %igen wäßrigen Lösung von Phenol (Riedel-de Haën) zupipettiert und gut gemischt. Zuletzt werden 2,5 ml konzentrierte H_2SO_4 (Merck) zugegeben, gut gemischt und die Gläser in einem kalten Wasserbad 10 min inkubiert. Die entstehende Braunfärbung wird durch Messung der Absorption bei 490 nm quantifiziert. Zur Auswertung wird wegen der teilweise hohen Streuung der Werte keine lineare Regression der Standardwerte durchgeführt, sondern in einer Dreisatzrechung die DM-Konzentration der Proteinprobe mit dem hinsichtlich der Absorption am nächsten liegenden Standard berechnet.

3.7. PROTEINEXPRESSION UND -AUFREINIGUNG

3.7.1. α7-ACETYLCHOLINREZEPTOR

3.7.1.1. EXPRESSIONSBEDINGUNGEN

Alle Konstrukte werden in Sf21- oder High Five-Zellen exprimiert. Eine typische Proteinexpression findet mit 0,5 l Zellsuspension in einem Fernbachkolben statt. Beim Erreichen einer Zelldichte von 1,8 - 2,2 x 10^6 Zellen/ml wird die einem MOI von 5 bis 7,5 entsprechende Menge Viren zugegeben und mindestens 70 h geschüttelt. Vor der Ernte der Zellen wird deren Viabilität mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Dieser Wert liegt zumeist um 60-80 %.

3.7.1.2. ISOLIERUNG DER MEMBRANPROTEINE

Für die Aufreinigung der exprimierten Membranproteine werden verschiedene Zentrifugen verwendet. Zum Abzentrifugieren ganzer Zellen oder Membranfragmenten stehen je nach Volumen und benötigter Beschleunigung entweder eine Heraeus Megafuge 1.0 R für Volumina bis 200 ml und Beschleunigungen von maximal 4000 x g oder eine Beckman Avanti J-25 Kühlzentrifuge mit bis maximal 76000 x g und den Rotoren JLA-9.1000 (bis zu 4 l Fassungsvermögen), JA-14 (1,5 l) oder JA-25.50 (300 ml) zur Verfügung. Für höhere Beschleunigungen findet eine Beckman Optima LE-80K Ultrazentrifuge mit den Rotoren Ti70 oder Ti45 Verwendung.

Lysepuffer: 20 mM HEPES, pH 7,4, 2,5 mM EDTA

Waschpuffer: 20 mM HEPES, pH 7,4, 200 mM NaCl, 0,5 mM EDTA

Solubilisierungspuffer: 20 mM HEPES, pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % Glyzerin

Die Zellen werden durch 10minütige Zentrifugation bei 1000 x g pellettiert und in 20 ml TBS gewaschen. Nach erneuter Pelletierung werden sie in 30 ml Lysepuffer, versetzt mit 0,1 mM PMSF und einer Tablette complete®-Proteaseinhibitorcocktail (Boehringer Mannheim), aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung mit einem Branson Sonifier 250 (4 x 20 s, Pulsstärke 4) lysiert. Etwa 70 % der Zellen werden hierdurch bereits aufgeschlossen, was lichtmikroskopisch verfolgt wird. Die entstandenen Membranfragmente werden bei 30000 x g 30 min lang zentrifugiert und erneut in Lysepuffer mit Proteaseinhibitor aufgenommen. Nach erneuter Ultraschallbehandlung verbleiben nunmehr weniger als 10 % der Zellen intakt. Nach der Zentrifugation erfolgt eine Resuspendierung in 30 ml Waschpuffer, ebenfalls versetzt mit PMSF und dem Inhibitorcocktail, und eine letzter Durchgang der Beschallung, wonach mind. 95 % der Zellen lysiert worden sind. Nach Zentrifugation und Resuspendierung in 30 ml Solubilisierungspuffer,

wiederum versetzt mit Proteaseinhibitoren, erfolgt eine Homogenisierung durch einen einmaligen Ultraschallpuls von 10 s.

3.7.1.3. SOLUBILISIERUNG

Die Gesamtproteinkonzentration wird mittels BCA-Methode bestimmt und mit weiterem Solubilisierungspuffer auf 2-5 mg/ml eingestellt. Zur Solubilisierung wird mit einer 20 %igen Lösung aus Triton X-100 (Boehringer Mannheim) eine Detergenzkonzentration von 1,5 % eingestellt und über Nacht sehr langsam mit dem Überkopfschüttler Heidolph Reax 20, Rotationsgeschwindigkeit 4 Upm, gemischt. Die solubilisierten Membranproteine werden durch Ultrazentrifugation (160000 x g, 45 min) von unsolubilisiertem Material abgetrennt und das Solubilisat anschließend für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

3.7.1.4. NI/NTA-AUFREINIGUNG

Verwendet werden die Ni/NTA-Spin Columns der Firma Qiagen und die Pico-Tischzentrifuge der Firma Heraeus. Alle Arbeitsschritte werden bei 4 °C durchgeführt.

Puffer I: 50 mM Na-phosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol

Puffer II: 50 mM Na-phosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF

Puffer III: 50 mM Na-phosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM PMSF

Nach Equilibierung mit 600 µl Puffer I und Zentrifugation (2 min, 2000 Upm) wird das Solubilisat, evtl. mittels TCA-Fällung zuvor auf 600 µl eingeengt, auf die Säule gegeben und analog zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 2 x 600 µl Puffer II wird gebundenes Protein mit 2 x 200 µl Puffer III eluiert.

3.7.1.5. NACHWEIS DER POLYHISTIDINMARKIERUNG MIT DEM NI/NTA-KONJUGAT

Zum Nachweis der C-terminalen Histidinmarkierung im α7His-Protein wird das Ni/NTA-Konjugat der Firma Qiagen verwendet. Für die abschließende Färbereaktion werden die NBT/BCIP-Tabletten von Sigma verwendet. Alle Schritte finden bei Raumtemperatur statt.

TBS: 25 mM Tris, pH 7,4, 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl

TBST: 25 mM Tris, pH 7,4, 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,05 % Tween 20

Blotto: 3 % Milchpulver in TBS

Puffer A: 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$

Nach dem Westernblot wird die Nitrocellulosemembran 2 x 5 min in TBS gewaschen und 15 min bei RT in Blotto inkubiert. Nach weiterem Waschen für 3 x 5 min in TBST wird die Membran 1 h lang in einer verdünnten Lösung des Ni/NTA-Konjugats (Verdünnungsfaktor 1:200 bis 1:1000) in TBST inkubiert. Nach abschließendem Waschen für wiederum 3 x 5 min in TBST wird mit einer frisch hergestellten NBT/BCIP-Lösung gefärbt und die Reaktion nach 10 min durch Waschen der Membran in ddH_2O abgebrochen.

3.7.1.6. AUFREINIGUNG MIT IMMOBILISIERTEM STREPTAVIDIN

Verwendet wird eine 0,5 ml-Säule der Firma Biometra. Alle Arbeiten werden bei 4 °C durchgeführt.

Waschpuffer: 100 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0,02 % NaN_3,

Elutionspuffer: 100 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 3 mM Diaminobiotin, 0,02 % NaN_3

Die Säule wird mit 5 ml Waschpuffer equilibiert und 1 ml des Solubilisats, gegebenfalls mittels TCA-Fällung eingeengt, auf die Säule gegeben. Dann werden zweimal 2,5 ml Waschpuffer zugegeben und zuletzt gebundenes Protein mit 2 x 1,5 ml Elutionspuffer eluiert. Die Regeneration der Säule erfolgt durch Spülen mit 10 ml Waschpuffer.

3.7.2. DER AMPA-GLUTAMATREZEPTOR GLURB

Die Expressionsversuche finden in Sf21- oder High Five-Insektenzellen statt. Da sich die Expression in High Five als vorteilhafter erweist, wird für diese Zelllinie das Protokoll schrittweise an immer größere Volumina angepaßt. Das Zellkulturvolumen beträgt typischerweise vor einer Infektion etwa 15 bis 16 l, welche in 24 Fernbachkolben zu je 650 ml geschüttelt werden. Maximal beträgt das Kulturvolumen bis zu 24 l, die Volumina der benötigten Lösungen werden dann entsprechend angepaßt. Im folgenden ist die Aufreinigung des Proteins aus 24 Fernbachkolben High Five-Insektenzellen (15,6 l) beschrieben.

3.7.2.1. EXPRESSIONSBEDINGUNGEN

Ausgehend von Zellen aus einer Rouxflasche einer Passagenzahl von maximal 50, wenn möglich jedoch deutlich geringer, wird eine 40 ml-Schüttelkultur angelegt und diese schrittweise innerhalb der nächsten 10 Tage auf 16 l vermehrt. Haben diese Zellen eine Dichte von 1,8 bis 2,2 x 10^6 Zellen/ml erreicht, was durch Auszählung in mindestens 3 Kolben sichergestellt wird, wird Viruslösung mit einem MOI von mindestens 5 zugegeben. Spätestens 80 bis 90 Stunden

nach der Infektion wird die Viabilität der Zellen durch Trypanblau-Färbung kontrolliert. Sie sollte einen Wert von 80 % nicht unterschreiten.

3.7.2.2. ISOLIERUNG DER MEMBRANFRAGMENTE

Unterschreitet die Viabilität 80 % oder beträgt die Infektionsdauer 90 h, werden die Zellen mittels der Durchflußzentrifuge Contifuge 20 RS (Heraeus) im Titan-Durchflußrotor 8684 vom Nährmedium abgetrennt[8]. Vor Beginn des Trennvorgangs wird der Rotor auf 4 °C abgekühlt. Die eingestellte Umdrehungsgeschwindigkeit beträgt 4000 Upm, die zugehörige Peristaltikpumpe Pericor CD240 wird dabei mit 280 ml/min betrieben und der abgepumpte Überstand von Zeit zu Zeit auf die Abwesenheit von Zellen kontrolliert. Dies geschieht durch erneutes Abzentrifugieren einer Probe bei 4000 x g, was kein Zellpellet erzeugen darf.

Lysepuffer: 20 mM HEPES pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,1 mM PMSF; hiervon werden 1,2 l angesetzt und vor Gebrauch zwei Tabletten complete®-Proteaseinhibitorcocktail (Boehringer Mannheim) zugegeben.

Waschpuffer: 20 mM HEPES pH 7,4, 200 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM PMSF; vor Gebrauch wird eine Tablette complete®-Proteaseinhibitorcocktail zugegeben (600 ml).

Solubilisierungspuffer: 20 mM HEPES pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % Glyzerol, 0,1 mM PMSF; vor Gebrauch werden zwei Tabletten complete®-Proteaseinhibitorcocktail zugegeben (2 l)[9].

Alle weiteren Schritte finden bei 4 °C oder auf Eis statt. Die geernteten Zellen werden nach Demontage des Rotors mit 300 ml TBS resuspendiert und im JA-14 bei 1500 x g 15 min zentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Überstandes vom weichen Pellet, werden 100 ml Lysepuffer zugegeben und die Suspension in 16 volumengleiche Portionen in 29 x 104 mm-Zentrifugenröhrchen mit Deckel (Beckman) aufgeteilt.

Mit einem Polytron (Kinematica 1200 C) werden nun die Zellen aufgeschlossen. Dabei wird der Inhalt jedes Röhrchens insgesamt 3 x 10 s bei einer Umdrehungszahl von 5000 Upm homogenisiert, wobei die Temperatur von 4 °C nicht ansteigt. Das Zentrifugenröhrchen wird aufgefüllt

---

[8] Bei Infektionsvolumina unter 8 l wurde die Abtrennung der Zellen mit einer Avanti J-25 Kühlzentrifuge im Rotor JLA 9.1000 bei 1500 x g ohne signifikanten Schaden an den Zellen durchgeführt (vgl Kap. 4.2.1.6).

[9] Bei der Untersuchung des Einflusses von L-Glutamat und höherer Glyzerinkonzentrationen (Kap. 4.2.1.10) enthält der Solubilisierungspuffer 30 % Glyzerin. Des Weiteren wird 300 µM L-Glutamat in Lyse-, Wasch- und Solubilisierungspuffer gegeben.

mit Lysepuffer, die Membranen durch Zentrifugation (JA-25.50, 16000 Upm, 30 min) pelletiert und der Überstand verworfen. In jedes der 16 Gefäße wird 5 ml Lysepuffer gegeben, abermals 3 x 10 s im Polytron homogenisiert, mit Lysepuffer aufgefüllt und zentrifugiert. Diese Schritte werden noch einmal wiederholt, wobei jetzt Waschpuffer anstelle des Lysepuffers verwendet wird. Die Effizienz der Lyse wird durch Betrachten der fragmentierten Zellen im Lichtmikroskop kontrolliert, wo nur noch wenige ganze Zellen (< 1% der ursprünglich vorhandenen) sichtbar sind.

Nach Zugabe von je 5 ml Solubilisierungspuffer werden die Membranfragmente kurz homogenisert und die Suspensionen vereinigt. Zum gründlichen Ausspülen der Röhrchens werden insgesamt weitere 150 ml Solubilisierungspuffer verwandt. Der Gesamtproteingehalt in den Membranen wird nun in einer BCA-Bestimmung gemessen und liegt typischerweise zwischen 20 und 30 mg/ml.

3.7.2.3. SOLUBILISIERUNG DER MEMBRANPROTEINE

Die Gesamtprotein-Konzentration wird durch Zugabe von weiterem Solubilisierungspuffer auf 3-4 mg/ml verringert. Meist werden insgesamt 2 l Solubilisierungspuffer verbraucht. Mit einer 20 %igen Lösung von Triton X-100 in 20 mM HEPES pH 7,4 wird eine Detergenzkonzentration von 1,5 % eingestellt. Die Suspension wird mit 4 Upm 60-90 min. auf einem REAX 20-Überkopfschüttler (Heidolph) gemischt. Anschließend werden nicht-solubilisierte Bestandteile portionsweise durch Zentrifugation abgetrennt. Wegen der großen Volumina werden hierfür sowohl die Ultrazentrifuge Optima LE-80K (Rotor Ti45, 40000 Upm, 15 min) als auch die Avanti J-25 (Rotor JA-25.50, 25000 Upm, 30 min) verwendet. Zuletzt werden alle Überstände gesammelt und die Pellets verworfen. Wird LysoPC zur Solubilisierung verwendet, werden 5 mg des Detergenzes pro Milligramm Gesamtprotein eingesetzt.

3.7.2.4. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN IMMOBILISIERTEN METALLIONEN

Bei allen folgenden Säulenchromatographieschritten werden die Lösungen und Puffer durch Peristaltikpumpen des Typs REGLO-digital MS-4/8/100 (IsmaTec) transportiert. Die Flußraten liegen dabei im Bereich von 1 - 1,5 ml/min, sofern nicht anders angegeben.

Zum soeben isolierten Solubilisat werden 5 mM Imidazol und 0,8 M NaCl zugegeben. Parallel dazu werden 10 ml chelatbildende Sepharose (Pharmacia) mit $Zn(OAc)_2$ beladen. Hierzu wird die Sepharose in einen Säulenkörper passender Größe (Pharmacia oder BioRad) gegeben und mit 5 CV ddH_20 gewaschen. Danach werden 3-4 CV 100 mM $Zn(OAc)_2$ über die Sepharose

geleitet[10], erneut mit 5 CV ddH_20 gewaschen und die Säule mit mindestens 5 CV 20 mM HEPES pH 7,4, 1 M NaCl, 10 % Glyzerin equilibriert[11].

Der Bindungsschritt erfolgt im Chargenverfahren. Die beladenen Sepharose wird vollständig zu den etwa 2 l Solubilisat gegeben und die Suspension mindestens 3 h inkubiert. Danach wird die Sepharose durch Abfritten des Ansatzes (Korngröße G2) wiedergewonnen. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß das Säulenmaterial nicht austrocknet. Wenn nur noch wenig Flüssigkeit in der Fritte vorhanden ist, wird die Sepharose portionsweise wieder in den Säulenkörper zurückgefüllt. In den nachfolgenden Schritten wird die Sepharose dann mit steigenden Konzentrationen von Imidazol behandelt. Der erste Waschpuffer kann außerdem dazu dienen, die Sepharose vollständig aus der Fritte zu entfernen.

Puffer I (50 ml): 20 mM HEPES pH 7,4, 1 M NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100, 10 mM Imidazol

Puffer II (25 ml): 20 mM HEPES pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100, 10 mM Imidazol

Puffer III (25ml): 20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100, 10 mM Imidazol

Puffer IV (2 x 25 ml): 20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100, 50 mM Imidazol

Puffer V (2 x 25 ml): 20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100, 100 mM Imidazol

Puffer VI (2 x 25 ml): 20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100, 200 mM Imidazol

Puffer VII (4 x 25 ml): 20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100, 500 mM Imidazol

[10] Entsprechend werden für den Vergleich verschiedener Metallionen (Kap. 4.2.1.8) jeweils 100 mM $NiSO_4$ sowie $CoCl_2$ eingesetzt.

[11] Auch hier wird bei Experimenten mit erhöhter Glyzerinkonzentration in allen Puffern, die bei der IMAC benötigt werden, die entsprechende Konzentration eingestellt. Außerdem ist auch wieder 300 µM L-Glutamat in allen Puffern vorhanden.

Im Anschluß wird die Säule mit 5 CV 50 mM EDTA gewaschen und bis zur erneuten Verwendung in ddH_20 mit 0,02 % NaN_3 gelagert. Die Sepharose wird maximal für 3 Präparationen dieses Umfangs verwendet.

Die Imidazolfraktionenwerden durch silbergefärbte SDS-Gele und Westernblot auf die Anwesenheit von GluRB und dessen Reinheit untersucht. Typischerweise werden alle Fraktionen mit mindestens 100 mM Imidazol für die weitere Aufreinigung verwendet.

3.7.2.5. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT IMMOBILISIERTEM M1-ANTIKÖRPER

Bei diesem Aufreinigungsschritt werden 3-5 ml M1-Antikörper-Material der Firma Kodak verwendet. Nach Einfüllen des Harzes in einen Säulenkörper passender Größe (BioRad) wird mit 10 CV TBS, 3 mM $CaCl_2$, 0,1 % Triton X-100 equilibiriert. In die vereinigten Fraktionen aus obiger Metallionenchromatographie werden 3 mM $CaCl_2$ gegeben und die Lösung über das M1-Gel geleitet. Anschließend wird mit 2 x 25 ml TBS, 3 mM $CaCl_2$, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100 gewaschen und gebundenes Protein mit 4 x 15 ml TBS, 500 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100, 10 mM EDTA eluiert. Zur Regeneration des M1-Geles wird mit 15 ml 100 mM Glyzin pH 3,5 gewaschen und anschließend mit TBS, 0,02 % NaN_3 equilibriert.

Die Fraktionen werden mittels silbergefärbter SDS-Gele und Westernblot analysiert. Die GluRB-Konzentration in den Eluaten wird durch Amidoblackbestimmung gemessen. Das isolierte Protein wird entweder direkt für Einzelpartikelanalysen verwendet, für weitere Untersuchungen aufkonzentriert, dialysiert oder durch einen Detergenzaustausch für Rekonstitutionsexperimente vorbereitet.

3.7.2.6. AUFKONZENTRIERUNG

Für die Aufkonzentrierung des Proteins werden Konzentratoren mit einer Ausschlußgrenze von 100 kD verwendet. Je nach Volumenanforderungen kamen hierfür Centriplus-100 für Volumen bis zu 15 ml (Millipore) oder Nanosep-100 (Pall) bei Volumina unterhalb 0,5 ml zur Anwendung. Größere Volumen werden durch portionsweises Beladen der Centriplus-100-Konzentratoren eingeengt.

Aufgrund der Mizellbildung zeigen Detergenzien in Abhängigkeit ihrer CMC ein unterscheidliches Verhalten. Während Triton X-100 in typischen Aufkonzentrierungen von 20 auf 500 µg/ml GluRB nur zu 50 % aus der Probe entfernt wird und sich infolgedessen anreichert, kann Decylmaltosid zu über 90 % aus der Proteinlösung entfernt werden.

3.7.2.7. DIALYSE

Die Dialyse von GluRB wird in Slide-A-Lyzern der Firma Pierce durchgeführt. Hier bietet sich die Möglichkeit der weitgehend verlustfreien Dialyse auch kleiner Volumina. Zur Auswahl stehen je nach benötigtem Volumen Kammern mit einer Füllmenge von bis zu 3 ml oder bis maximal 0,5 ml. Die Ausschlußgrenze beträgt in beiden Fällen 10 kD. Dialysiert wird stets in 3 Schritten von je mindestens 8 h gegen einer 500fach größeres Außenvolumen, das bei jedem Schritt gewechselt wird.

3.7.2.8. DETERGENZAUSTAUSCH

Der Detergenzaustausch findet durch Immobilisierung des GluRB an Zn^{2+}-Sepharose statt. Hierzu wird das Protein auf etwa 100 µg/ml aufkonzentriert und zur Erniedrigung der EDTA-Konzentration, welches durch Komplexierung des Metallions die Bindungsreaktion verhindert, mit 20 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100 in einer Weise verdünnt, die die EDTA-Konzentration auf 2 mM begrenzt. Das Sepharosevolumen beträgt 1 ml pro 25 µg GluRB. Die Sepharose wird in gleicher Weise wie zuvor beladen (siehe Kap. 3.7.2.4).

Nach Auftrag der Proteinlösung wird das Triton X-100 durch Waschen mit einem Puffer (20 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 % Glyzerin) entfernt, dem das gewünschte Detergenz zugesetzt ist. Die Konzentration der verschiedenen dabei eingesetzten Detergenzien sind in Tab. 3.9 angegeben.

Die Abnahme der Konzentration von Triton X-100 wird durch Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt (DU-640 Spektrophotometer, Beckman). Die ursprünglich vorhandenen 0,1 % Triton X-100 erzeugen eine UV-Absorption von 2 AU. Nach dem Überleiten von üblicherweise 10-15 CV Waschpuffer fällt der Gehalt an Triton X-100 um ein Mehrfaches unter die CMC und läßt sich auch durch vermehrtes Waschen nicht spürbar weiter erniedrigen. Nun wird das Protein mit 20 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 400 mM Imidazol zzgl. des Detergenzes (s.o.) von der Säule eluiert, wobei nur 2 CV nötig sind, um GluRB vollständig zu isolieren.

Die Ausbeute an GluRB in den verschiedenen Detergenzien wird mittels Amidoblackbestimmung gemessen. Im folgenden wird GluRB auch über einen Zeitraum von mehreren Wochen bei 4 °C inkubiert, die AMPA-Bindungsaktivität des Proteins verfolgt und mit dem Ausgangswert in Triton X-100 verglichen.

Detergenz	CMC [mM]	eingesetzte Konz. [mM]
OG (Sigma)	20-25	35
Thio-OG	9	13
NG (Calbiochem)	6,5	13
DG (Calbiochem)[12]	2-3	6
OM (Calbiochem)	23,4	30
DM (Sigma)	1,6	3,7
DDM (Biomol)	0,1-0,6	2
NOGA (Calbiochem)	80	90
MEGA-10 (Calbiochem)	6-7	11,5
Zwittergent-3.10 (Calbiochem)	25-40	50

Tab. 3.9: Beim Austausch für Triton X-100 eingesetzte Konzentrationen derjenigen Detergenzien. Angegeben sind auch die jeweiligen kritische Mizellkonzentrationen. Des Weiteren wird die Austauschprozedur zur Kontrolle auch mit Triton X-100 bzw. Triton X-100, 10 % Methanol durchgeführt.

3.8. LIGANDENBINDUNGSBESTIMMUNGEN

3.8.1. MESSUNGEN MIT [^{125}I]- α-BUNGAROTOXIN

3.8.1.1. AFFINITÄTSBESTIMMUNG IN INSEKTENZELLEN

[^{125}I]-α-Bungarotoxin wird von NEN bezogen. Wegen der Halbwertzeit von 60 Tagen muß die Restaktivität am Tage des Experimentes durch Auszählung eines bestimmten Volumens bekannter Konzentration bestimmt werden. Die Insektenzellmembranen werden wie beschrieben isoliert (siehe Kap. 3.7.1.2) und direkt für Ligandenbindungsmessungen verwendet. Pro Einzelmessung werden die Membranen aus 10^6 Zellen eingesetzt. [^{125}I]-α-Bungarotoxin wird mit α-Bungarotoxin (Sigma) immer im Verhältnis 1:9 gemischt, um den Verbrauch der radioaktiven Substanz zu begrenzen. Die nachstehend angegebenen Konzentrationen beziehen sich immer auf die Gesamtbungarotoxinkonzentration der Lösung und werden durch Verdünnung der Ausgangslösung mit 20 mM HEPES, pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % Glyzerin hergestellt. Das

[12]Um Dezylglukosid in dieser Konzentration in Lösung zu bringen, war es notwendig 10 % Methanol zum Pro benpuffer zuzusetzen. Der Einfluß des Methanols wurde deswegen ebenfalls untersucht.

Volumen der Membransuspension wird so eingestellt, daß sich nach der Zugabe des Likganden ein Volumen von 500 µl ergibt. Jeder Ansatz wird dreifach durchgeführt. Die Inkubation erfolgt für 1 h auf Eis bei Ligandenkonzentrationen von 10, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 und 750 nM sowie 1 und 3 µM. Zur Bestimmung der Hintergrundbindung wird bei jeder Konzentration eine weitere Probe in Gegenwart von 10 mM α-Bungarotoxin inkubiert. Danach werden die Proben mit einem 12-Kanal-Filtrationsgerät (Millipore) durch 25 mm-Filter aus Zellulosemischester (HAWP02500, Millipore) gesaugt und dreimal mit je 5 ml 20 mM HEPES, pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % Glyzerin gewaschen. Zur Messung der Radiaktivität wird das Cobra 5003 Autogamma-System (Canberra-Packard) verwendet. Die Filter werden in die Zählgefäße gegeben und mit dem Benutzerprogramm Nr. 5 für ^{125}I-Kerne vermessen.

3.8.1.2. VERDRÄNGUNGSEXPERIMENTE

Acetylcholin (2-(Acetyloxy)-N,N,N-trimethylethanaminiumchlorid) und Nikotin (S(-)-3-(1-Methyl-2-pyrrolindinyl)pyridin-di-D-tatrat) werden von RBI bezogen. Die Insektenzellmembranen werden in analoger Weise wie oben vorbereitet. In jede Probe wird 500 nM [^{125}I]-α-Bungarotoxin zugegeben, um ein ausreichendes Signal bei der Verdrängung zu erhalten. Wieder beträgt das Probenvolumen nach Zugabe aller Komponenten 500 µl, und es wird eine Dreifachbestimmung bei jeder Ligandenkonzentration durchgeführt. Acetylcholin wird in den Konzentrationen 3,3, 10, 33, 100, 200, 300 und 333 mM sowie 1 und 2 M eingesetzt, für Nikotin gelten die Werte von 33, 100 und 333 µM, 1, 3,3, 10, 33, 100 und 250 mM. Die Inkubation der Proben sowie die Auszählung der Radioaktivität erfolgt wie in Kap. 3.8.1.1 beschrieben.

3.8.1.3. LIGANDENBINDUNG VON HEFEZELLEN UND DEREN MEMBRANEN

Ganze Zellen werden nach der Methanolinduktion pellettiert (Heraeus Megefuge 1.0 R, 1500 Upm, 10 min). Sowohl bei Messungen an Zellen als auch mit Membranfragmenten (vgl. 3.5.3.2) wird pro Messung eine Probenmenge verwendet, die 250 µl einer Flüssigkultur mit einer $OD_{600\ nm}$=2.8 entspricht. Diese wird in 200 µl 50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl aufgenommen, dem 1, 10 sowie 100 nM [^{125}I]-α-Bungarotoxin beigefügt ist. Zur Bestimmung unspezifischer Bindung wird zusätzlich 10 mM α-Bungarotoxin zugegeben. Die Inkubation erfolgt ü. N. bei 4 °C, die Abtrennung ungebundenen Ligandens und die Auszählung der Proben wird wie in 3.8.1.1 durchgeführt. Zum Waschen der Proben wird allerdings 3 x 5 ml 50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl verwendet.

3.8.1.4. LIGANDENBINDUNG AN C41 UND C43

Ganze Zellen werden direkt nach einer IPTG-Induktion von 17-19 h verwendet. 20 µl einer Flüssigkultur der Dichte $OD_{600\ nm}$=2 werden pellettiert (Heraeus Biofuge pico, 5000 Upm, 5 min) und in 100 µl 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA resuspendiert, dem 1, 10, 50, 100, 250 sowie 500 nM [^{125}I]-α-Bungarotoxin beigefügt ist. Die unspezifische Bindung wird in Gegenwart eines 500fachen Überschusses an α-Bungarotoxin ermittelt. Inkubiert wird ü. N. bei 4 °C, die Entfernung von ungebundenem Liganden erfolgt wie oben beschrieben, als Waschpuffer wird 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA verwendet.

Bei der Bindung an Membranfragmente sowie Einschlußkörper wird deren Gesamtproteinkonzentration bestimmt (siehe Kap. 3.6.5.3) und eine Probenmenge pellettiert, die 30 µg Protein enthält. Diese wird in 100 µl 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA aufgenommen, welches 1, 10 sowie 100 nM [^{125}I]-α-Bungarotoxin enthält. Das weitere Vorgehen entspricht dem für ganze Zellen beschriebenen.

3.8.2. MESSUNGEN MIT [^{3}H]-AMPA

3.8.2.1. K_D-BESTIMMUNG

Verwendet wird in TX-100 solubilisierter GluRB nach der Aufreinigung mittels IMAC und M1- Affinitätschromatographie. Die Konzentration des Proteins beträgt 10-20 µg/ml. [^{3}H]-AMPA stammt von NEN. Aus dieser Ausgangslösung wird eine [^{3}H]-AMPA-Lösung der Konzentration von 300 nM hergestellt, aus welcher die Ligandenkonzentration in den Proben eingestellt wird. Diese Verdünnung erfolgt in ABB (30 mM Tris, pH 7,2, 2,5 mM $CaCl_2$, 100 mM KSCN), versetzt mit 0,1 % TX-100. Zur K_D-Bestimmung werden Konzentrationen von 1, 3, 10, 15, 30, 100 und 300 nM verwendet. Bei der AMPA-Konzentration von 300 nM wird 60 nM [^{3}H]-AMPA und 240 nM unmarkiertes S-AMPA (Sigma) verwendet und später das resultierende Signal mit einem Faktor 5 multipliziert. Die Ligandenbingung wird stets dreifach gemessen. Unspezifische Bindung wird bei jeder Konzentration durch Zugabe von 10 mM L-Glutamat bestimmt. Das endgültige Probenvolumen wird durch Auffüllen mit ABB+0,1 % TX-100 auf 500 µl eingestellt. Die Inkubation erfolgt 1 h auf Eis, danach werden die Proben mit einem 12-Kanal-Filtrationsgerät (Millipore) durch 25 mm-GF/B-Filter (Whatman) gesaugt und dreimal mit je 5 ml ABB gewaschen. Die Filter werden in Zählgefäßen in je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier Safe, Canberra-Packard) gegeben und ü. N. inkubiert. Abschließend erfolgt die

Auszählung in einem Beckman LS 6500 Szintillationszähler mit dem Benutzerprogramm Nr. 2 für ^{14}C- und ^{3}H-Kerne.

3.8.2.2. AKTIVITÄTSVERGLEICHE VERSCHIEDENER PROTEINPRÄPARATIONEN

Die Aktivität verschiedener Proteinproben wird bei einer gegebenen [^{3}H]-AMPA-Konzentration, üblicherweise 5 oder 15 nM, verglichen. Dabei wird im Laufe des Experiments jeweils dasjenige Detergenz verwendet, in dem das Protein solubilisiert ist. Die verwendeten Konzentrationen entsprechen denen, die beim Detergenzaustausch eingesetzt werden (siehe Tab. 3.9). Für eine Probe werden 50 µl Proteinlösung, 25 µl 300 nM [^{3}H]-AMPA und 425 µl ABB mit dem entsprechenden Detergenz zusammen pipettiert. Bei der Bestimmung der unspezifischen Bindung wird zusätzlich 10 mM L-Glutamat zugegeben. Inkubation und weitere Prozessierung der Proben erfolgt wie oben beschrieben.

3.8.2.3. LIGANDENBINDUNG AN INSEKTENZELLMEMBRANEN

Die Ligandenbindung von Zellmembranen wird für die Bestimung von optimaler Infektionsdauer und MOI (Kap. 4.2.1.4 und 4.2.1.5) bestimmt. Alle Arbeitsschritte werden bei 4 °C durchgeführt. 30 ml High Five-Zellen werden zu bestimmten Zeitpunkten (0, 46, 62, 72, 86, 98, 115 sowie 144 h) nach der Viruszugabe pellettiert (Heraeus Megafuge 1.0 R, 1500 Upm, 10 min) und in 500 µl TBS, dem pro 50 ml 1 Tablette Breitbandproteaseinhibitor (complete®, Boehringer Mannheim) und 0,1 mM PMSF zugegeben wird, resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 5000 Upm, 10 min) wird Lysepuffer (500 µl 20 mM HEPES pH 7,4, 5 mM EDTA), versetzt mit complete® (1 Tablette pro 10 ml) und 0,5 mM PMSF, zugegeben. Die Zellen werden durch Ultraschallbehandlung mit einem Branson Sonifier 250 (3 x 5 s, Pulsstärke 4) lysiert und nach weiterer Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 10000 Upm, 10 min) in 500 µl Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren gewaschen. Die Membranfragmente werden in 500 µl Solubilisierungspuffer (20 mM HEPES pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % Glyzerol), versetzt mit Breitbandinhibitor und PMSF wie im Lysepuffer, aufgenommen. Zu 200 µl dieser Membransuspension werden 10,5 µl 20 % Triton X-100 gegeben und 1 h bei 4 °C solubilisiert. Nach einer Zentrifugation (Beckman TL 100, Rotor TLA 100, 160000 x g, 30 min) werden 50 µl des Solubilisats zur Aktivitätsbestimmung in Gegenwart von 15 nM [^{3}H]-AMPA in gleicher Weise wie in 3.8.2.2 verwendet.

3.9. HYDRODYNAMISCHE MESSUNGEN

3.9.1. GRÖSSENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE

Diese wird an einem ÄKTAexplorer 100 der Firma Pharmacia durchgeführt. Zur Auftrennung werden verschiedenen Säulen verwendet: Die TSK G4000SW$_{XL}$-Säule (0,78 x 30 cm) der Firma Tosohaas, sowie die Säulen Hi-Prep Sephacryl 16/60 S-200 und HiLoad 16/60 Superdex 200 der Firma Pharmacia. Die Flußrate liegt in allen Läufen bei 1 ml/min, als Laufpuffer dient normalerweise TBS, 500 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % Triton X-100. In einigen Fällen wird auch mit 50 mM NaCl gearbeitet. Die Elution wird bei 280 und 260 nm verfolgt. Das maximale Probenvolumen beträgt für die TSK G4000SW$_{XL}$ 100 µl, für die beiden anderen Säulen 500 µl. Die Standardproteine stammen von Sigma und werden in einer Konzentration von 5 mg/ml in dem angegebenen Laufpuffer verwendet.

3.9.2. DICHTEGRADIENTEN

Für den Sukrosegradienten werden aus einer 60 %igen Lösung von Sukrose in TBS, 0,1 % TX-100, 10fach TBS und 20 % Triton X-100 Sukroselösungen der Konzentrationen 12, 15, 18, 21, 24 und 27 % in TBS, 0,1 % TX-100 angesetzt. Entsprechendes gilt für einen Glyzeringradienten, wo aus Glyzerin, 10fach TBS und 20 % Triton X-100 Pufferlösungen mit den Glyzerinkonzentrationen von 20, 32, 44, 56, 68 und 80 % hergestellt werden. In Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (14 x 89 mm, Beckman) wird nun zuunterst ein Volumen von 0,5 ml 60 % Sukrose bzw. 100 % Glyzerin gegeben und dann von den angesetzten Lösungen, beginnend mit der jeweils höchsten Konzentration, je 1,5 ml vorsichtig zupipettiert. Nach dem Gießen des Gradienten müssen die Phasengrenzen deutlich zu sehen sein. Das Röhrchen wird bei RT 3,5 h stehen gelassen, wobei sich ein lineares Konzentrationsgefälle einstellt. Anschließend wird der Gradient eine weitere halbe Stunde bei 4 °C gelagert.

Die Gradienten werden mit maximal 1 ml Probenlösung beladen. Die Standardproteine (Thyroglobulin, Apoferritin und ADH, jeweils von Sigma) werden mit einer Konzentration von 5 mg/ml angesetzt, von GluRB wird eine Menge von 20 - 50 µg benötigt.

Direkt nach der Applikation der Probe wird der Gradient zentrifugiert. Dies geschieht mit einem Ti67-Rotor (Beckman) in einer Beckman Optima LE-80 K Ultrazentrifuge. Die Beschleunigung wird auf die kleinste Stufe eingestellt, die Bremsen ausgeschaltet. Die Zentrifugation wird bei 37000 Upm für 16 h durchgeführt.

Nach dem Auslaufen des Gradienten wird das Zentrifugenröhrchen vorsichtig bei 4 °C von oben herab mittels einer REGLO-digital MS-4/8-100 Peristaltikpumpe (IsmaTec) abgetragen und in Portionen von 10 Tropfen (ca. 500 µl) portioniert. Standardproteine werden in den Fraktionen durch Bradfordkonzentrationsbestimmung detektiert, das Vorhandensein von GluRB wird über seine AMPA-Bindungsaktivität nachgewiesen.

3.9.3. STEM

Für die STEM-Untersuchungen in dieser Arbeit wird GluRB-Protein auf 125 µg/ml konzentriert. Der Gehalt an Triton X-100 beträgt am Ende des Konzentrationsvorgangs 0,8 %.

Für die STEM-Probenpräparation wird das Protein 24fach verdünnt. Die Verdünnung geschieht zum einen in ddH_2O, zum anderen in 100 mM Ammoniumacetat. Im Anschluß daran werden die Proben auf den Kohlefilmträger gegeben und gefriergetrocknet. Die weitere Behandlung sowie die Auswertung der Daten erfolgt in Zusammenarbeit mit Fr. Wirtz und Dr. Müller am Maurice E. Müller Institut, Biozentrum der Universität Basel nach dort entwickelten Standardmethoden (Engel, 1997).

3.10. REKONSTITUTIONSEXPERIMENTE

Die Lipide (alle von Sigma) werden bei Konzentrationen von 20 mg/ml nach einer Ultrabeschallung von 5 min zur Auflösung größerer Klumpen (Ultraschallbad 88169, Bioblock Scientific) als Suspension in Liposomenpuffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl) unter Argon bei -80 °C aufbewahrt. Hergestellt werden Suspensionen von PC, von PC/PE/Chol (10:1:5), PC/PE (10:1), Asolectin sowie Asolectin/Chol (2:1). Angegeben sind jeweils die molaren Verhältnisse. Von den Detergenzien OG und DM werden Lösungen in LP angesetzt, 10 % für OG, 1 % für DM und bei -20 °C aufbewahrt, jedoch nicht länger als 2 Wochen.

GluRB wird vor der Rekonstitution auf 500-700 µg/ml aufkonzentriert und mittels SEC auf die Abwesenheit von Proteinaggregaten kontrolliert. Mit SDS-PAGE und Silberfärbung wird die Sauberkeit des Proteins kontrolliert und nochmals das Entstehen von Proteinaggregaten während der Aufkonzentrierung ausgeschlossen.

3.10.1. DETERGENZDIALYSE

In einem typischen Ansatz werden 200-500 µg Lipide eingesetzt. Deren Endkonzentration beträgt dabei immer 1 mg/ml, sodaß sich hieraus die Volumina der Rekonstitutionsansätze

ergeben. Die Detergenzien werden so zugegeben, daß sich eine Endkonzentration von 1,2 % für OG bzw. 0,2 % für DM einstellt. Das Probenvolumen wird nach dem Zusammengeben dieser Komponenten mit LP auf 200 bzw. 500 µl abzüglich des benötigten Volumens der Proteinlösung aufgefüllt. Dieses wird entsprechend des gewünschten LPR und der Proteinkonzentration berechnet. Vor der Zugabe des Proteins als letztem Bestandteil des Ansatzes müssen die Lipide vollständig solubilisiert sein.

Nachstehend ist der Ansatz für die Rekonstitution von DM-solubilisiertem GluRB in PC-Liposomen angegeben. Das Protein besitzt nach dem Detergenzaustausch von Triton X-100 in DM und der Aufkonzentrierung eine Konzentration von 530 µg/ml. Die Detergenzkonzentration beträgt 0,19 %. Je nach gewünschtem LPR, Lipidzusammensetzung und Detergenz sowie unter Beachtung der vorliegenden Proteinkonzentration ergeben sich für andere Rekonstitutionsversuche entprechend angepaßte Pipettierprotokolle.

Ebenfalls angegeben ist die Zusammensetzung der entsprechenden Kontrolle. Es wird sichergestellt, daß diese eine identische Pufferzusammensetzung und Detergenzkonzentration besitzt wie die proteinhaltige Probe und sich von dieser nur durch die Abwesenheit von GluRB unterscheidet. In der Probe ist der LPR auf 5 eingestellt.

Ansatz:
10 µl der PC-Lösung von 20 mg/ml (200 µg PC)
24 µl 1 % DM
20 µl 10fach LP (200 mM HEPES, pH 7,4, 1,5 M NaCl)
66 µl ddH_2O
80 µl GluRB (530 µg/ml, in 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 400 mM Imidazol, 10 % Glyzerin, 0,19 % DM)

Kontrolle:
10 µl der PC-Lösung von 20 mg/ml (200 µg PC)
40 µl 1 % DM
20 µl 10fach LP
50 µl ddH_2O
80 µl 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 400 mM Imidazol, 10 % Glyzerin

Nach einer Inkubationszeit von 6 h bei 4 °C werden die Ansätze in eine Dialysekammer (Slide-A-Lyzer, Kammervolumen 0,1-0,5 ml, Pierce) überführt und bei der gewünschten Temperatur (zumeist 4 °C) 3 x 24 h gegen ein mindestens 1000faches Volumen von LP dialysiert. Nach der Isolierung der Ansätze aus der Kammer werden die gebildeten Liposomen 45 min lang bei 160000 x g zentrifugiert (Beckman TL-100 Ultrazentrifuge, Rotor TLA-100) und zweimal in je 200 µl LP gewaschen. Zuletzt erfolgt eine Resuspension in 20 µl LP für elektronenmikroskopische Aufnahmen mittels Negativfärbung, sowie in maximal 10 µl für eine Gefrierbrechung.

3.10.2. VERDÜNNUNG

Es gelten die gleichen Überlegungen wie für die Dialyseexperimente. Insbesondere wird mit gleicher Lipid- und Detergenzkonzentration gearbeitet. Die Zusammenstellung der Ansätze erfolgt in der gleichen Reihenfolge wie oben.

Nach dessen Fertigstellung wird die Probe in ein Ultrazentrifugenröhrchen des Rotors Ti45 (Beckman) überführt. An eine Inkubation des Ansatzes von 15 min bis 6 h auf Eis schließt sich die Pufferzugabe ohne Detergenz an. Es werden 50 ml LP zugegeben und die Probe weitere 2 h auf Eis inkubiert. Die gebildeten Liposomen werden 60 min lang bei 160000 x g zentrifugiert (Beckman Optima LE 80-K, Rotor Ti 45) und mit zunächst 3 ml, dann 200 µl LP gewaschen. Für die Pelettierung der kleiner werdenden Volumina wird die Beckman TL-100 Ultrazentrifuge mit den Rotoren TLA-100.3 und TLA-100 verwendet. Anschließend werden die Proben zur Vorbereitung der EM-Untersuchungen wieder analog zu den Dialyseexperimenten behandelt (siehe 3.10.1).

3.10.3. DESTABILISIERUNG

3.10.3.1. HERSTELLUNG DER LIPOSOMEN

30,2 mg PC und 2,9 mg PE werden in 1 ml LP suspendiert und 10 min mit Ultraschall behandelt, sodaß die Suspension keine sichtbaren Verklumpungen mehr zeigt. Jetzt werden weitere 8,5 ml LP sowie 500 µl 10 % DM zugegeben und die Suspension ü. N. bei 4 °C inkubiert. Mittels OD-Messungen wird gezeigt, daß 93 % der Lipide solubilisiert sind. Unsolubilisiertes Lipid wird durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 13000 Upm, 15 min) abgetrennt. Die verbleibende Lipidkonzentration beträgt danach 3,1 mg/ml. Die nun klare Lösung wird zweimal für je 8 h gegen ein 500fach größeres Volumen von LP dialysiert (Slide-A-Lyzer, Pierce), wonach eine weißliche Suspension entsteht. Außerdem wird ein weißer Niederschlag gebildet, der aggregiertes Lipid enthält. Dieser wird wie oben abgetrennt. Die entstandenen Liposomen werden durch Ultrazentrifugation (Beckman TL-100 Ultrazentrifuge, Rotor TLA-100.3, 160000 x g, 45 min) geerntet und in 1 ml LP resuspendiert. Im Überstand kann kein DM mehr nachgewiesen werden. Die Lipidkonzentration in der Liposomenprobe wird wieder durch OD-Messung zu 15,1 mg/ml bestimmt.

3.10.3.2. TITRATION DER VESIKEL

Diejenige Detergenzkonzentration, bei der die Liposomen gerade soweit destabilisiert werden, daß ein spontaner Einbau von GluRB erfolgen kann, wird über eine Titration der Vesikel mit DM in einer 100 µl Präzisionsmikroküvette (Hellma) ermittelt. Dabei werden 10 µl der soeben isolierten Liposomen durch Zugabe von LP auf 100 µl verdünnt und DM aus einer 1 %igen Lösung in LP in 1 µl-Schritten zupipettiert und vorsichtig gemischt, um keine Schaumbildung zu verursachen. Nach jeder Zugabe wird die Lichtstreuung gemessen. Diese erreicht allerdings erst nach ca. 5 min einen konstanten Wert. Die Zugabe von DM wird solange fortgesetzt, bis die Lösung völlig klar, mithin die Vesikel vollständig solubilisiert sind. Dabei wird in der Nähe der CMC des Detergenzes (1,6 mM bzw. 0,77 %) ein Maximum der Lichtstreuung festgestellt. Im nachfolgend beschriebenen Rekonstitutionsexperiment wir dann versucht, diejenige Detergenz-konzentration einzustellen, bei der nach Überschreiten des Maximums die Lichtstreuung nur noch 50-70 % des Maximalwertes beträgt.

3.10.3.3. VORBEREITUNG DES REKONSTITUTIONSEXPERIMENTES

Um die vorgesehene Detergenzkonzentration richtig zu treffen, muß der DM-Gehalt in der Probe des solubilisierten Proteins möglichst genau bekannt sein. Mit dem hier verwendeten GluRB, zuvor aufkonzentriert auf 680 µg/ml, wird eine DM-Bestimmung durchgeführt, welche eine Konzentration von 0,28 % liefert. Zur Rekonstitution sollen 50 µg Lipid eingesetzt werden

Vol. LP+0,02 % DM [µl]	Vol. LP+0,28 % DM [µl]	DM-Konz. [%]	$OD_{560\ nm}$
240	50	0,062	0,127
235	55	0,065	0,144
230	60	0,071	0,138
225	65	0,075	0,113
220	70	0,08	0,074
215	75	0,084	0,020
210	80	0,088	0,049

Tab. 3.10: Lichtstreuung von PC/PE-Liposomen in Abhängigkeit der DM-Konzentration. In allen Messungen werden 10 µl der Vesikelsuspension vorgelegt, sodaß das Gesamtvolumen 300 µl beträgt.

und der LPR etwa 3-6 betragen. Dafür sind 10-15 µg GluRB nötig, was einem Probenvolumen von 17-25 µl entspricht. Um sicher zu sein, daß die richtige Detergenzkonzentration erreicht wird, wird das Volumenverhältnis von LP und Proteinlösung empirisch unter den Bedingungen des Experimentes bestimmt. Hierfür wird LP mit 0,28 % DM und LP mit 0,02 % DM in verschiedenen Mengenverhältnissen zu je 10 µl (150 µg) der Liposomen gegeben und die Lichtstreuung in Abhängigkeit der resultierenden DM-Konzentration bestimmt (siehe Tab. 3.10).
Das Maximum der Lichtstreuung wird kurz vor der CMC von DM erreicht und beträgt 0,144 AU. Somit sollte die Absorption nach der Addition von GluRB um 0,7-1,0 AU betragen, was eine 50-70 %ige Destabilisierung der Vesikel anzeigen würde. Dies wird erreicht beim Mischen von 150 µg Liposomen, 220-225 µl LP+0,02 % DM sowie 65-70 µl LP+0,28 %.

3.10.3.4. REKONSTITUTIONSVERSUCH DURCH DESTABILISIERUNG

Zu 3,3 µl Liposomen (50 µg) werden 76 µl LP+0,02 % DM gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Dann werden 21 µl GluRB (680 µg/ml, 0,28 % DM) zugegeben, was den LPR auf einen Wert von 3,7 einstellt. Die Lichtstreuung dieses Ansatzes beträgt 0,098 AU, was 68 % des oben bestimmten Maximalwertes bedeutet. Dies liegt sehr gut im anvisierten Bereich, man kann also von einer partiellen Destabilisierung der Liposomen, geeignet für spontane Proteininsertion ausgehen. Der Ansatz wird ü. N. auf Eis inkubiert und nochmals die optische Dichte bestimmt, welche unverändert 0,098 beträgt. Nun werden 20 ml LP ohne Detergenz zugegeben und dadurch die DM-Konzentration auf weit unterhalb der CMC erniedrigt. Die jetzt wieder stabilen Liposomen werden durch Ultrazentrifugation (Beckman Optima LE 80-K, Rotor Ti70, 160000 x g, 60 min) pellettiert, anschließend in 3 ml sowie 200 µl LP gewaschen und in 10 µl LP resuspendiert.

3.11. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE METHODEN

Die Untersuchung von in dieser Arbeit hergestellten Proteinproben mittels Elektronenmikroskopie wird von Fr. Cissé und Dr. Tichelaar aus der Arbeitsgruppe durchgeführt. Daher erfolgt an dieser Stelle nur eine kurze Beschreibung. Für in dieser Arbeit vorgestellten EM-Resultate werden die Elektronenmikroskope 902 und 912 der Firma Zeiss verwendet.

3.11.1. NEGATIVFÄRBUNG

Bei der Präparation von negativ gefärbten Proben werden mit Kohlefilm bedeckte Cu-Trägernetzchen (300 mesh, Plano) in Restluft beglimmt und 30-60 min bei RT aufbewahrt. Von der Protein- oder Liposomenprobe werden 3 µl vorsichtig auf das Netz pipettiert und 30 s gewartet. Das Netzchen wird in 2 Tropfen Probenpuffer inkubiert und 30-60 s in einer wäßrigen Lösung von 2 % Uranylazetat, 0,1 % Glukose gefärbt.

3.11.2. GEFRIERBRECHUNG

Die Präparation der gefriergebrochenen Proben wurde von Dr. Richter, Institut fuer Ultrastrukturforschung, Klinikum der Universitaet Jena durchgeführt. Sie erfolgte nach Standardmethoden der Gefrierbrechung (Moor, 1961). Die elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Proben fand dann durch H. Cissé und Dr. Tichelaar statt.

4. ERGEBNISSE

4.1. DER NEURONALE α7-ACETYLCHOLINREZEPTOR

4.1.1. EXPRESSION IM BACULOVIRUSSYSTEM

4.1.1.1. HERSTELLUNG REKOMBINANTER BACULOVIREN

Die Expression des α7-Acetylcholinrezeptors wurde unter Verwendung dreier verschiedener DNA-Konstrukte untersucht. Diese unterscheiden sich durch die Gestaltung des C-Terminus, der in einem Fall demjenigen des Wildtyps entspricht und in zwei weiteren Fällen verschiedene Affinitätsmarkierungen enthält (Abb. 4.1).

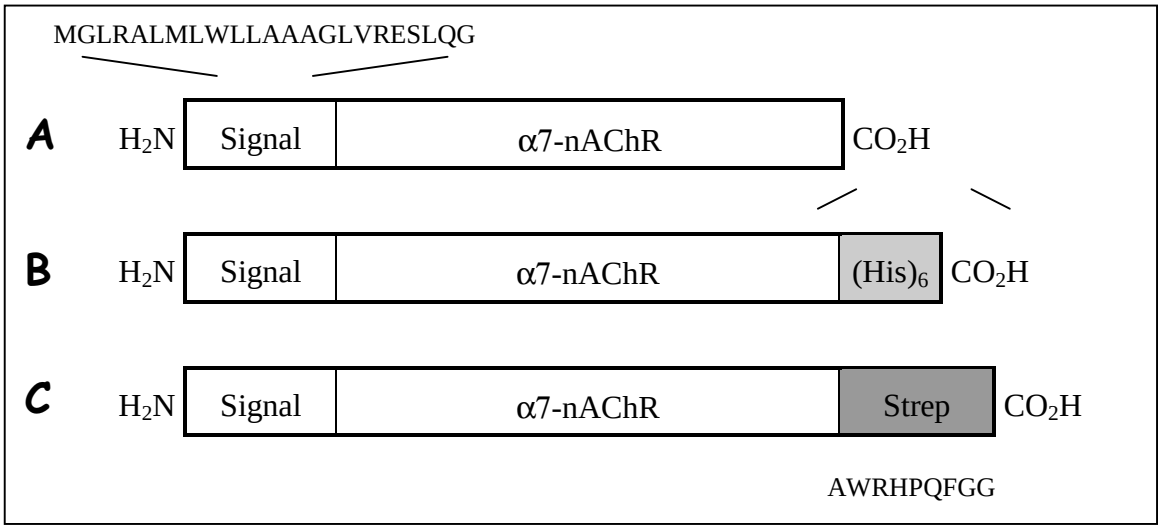


Abb. 4.1: Primärsequenzen der in dieser Arbeit für die Baculovirus-Expression verwendeten α7-nAChR-Konstrukte. A: α7-WT-Sequenz. Die Signalsequenz umfaßt 23 Aminosäuren, die Primärsequenz des Ionenkanals hat 479 Aminosäuren. B: α7-Sequenz mit 6 C-terminalen Histidinen (α7-His). C: α7-Sequenz mit C-terminaler Streptavidinmarkierung (α7-Str).

Zur Herstellung der rekombinanten Baculoviren wurde von der cDNA des α7-Acetylcholinrezeptors, kloniert in einen pLM1-Vektor (Sodeoka, 1993), ausgegangen[13]. Im folgenden wurde eine von der Firma Monsanto entwickelte Methode angewandt, um die Rezeptor-DNA in die virale DNA zu inkorporieren (Luckow, 1993) und rekombinante Baculoviren in ausreichender Menge herzustellen (Abb. 4.2).

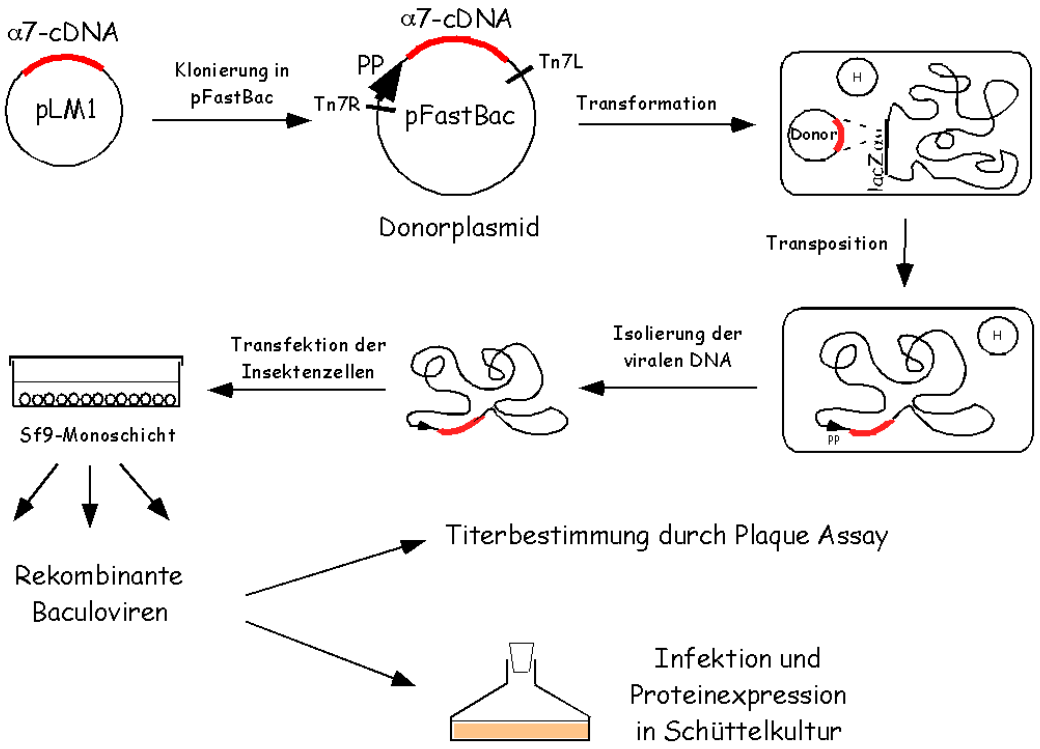


Abb. 4.2: Herstellung rekombinanter Baculoviren und Genexpression mit dem Bac-to-Bac-Expressionssystem (Gibco, 1995). PP: Polyhedrinpromotor, H: Helferplasmid, Tn7L/R: Transposone.

Alle hierbei gemachten Beobachtungen, wie Anzahl gebildeter Kolonien oder Titerbestimmungen, sind in Kap. 3.2 als Bestandteil der entsprechenden Protokolle beschrieben. An dieser Stelle sei nur gesagt, daß es für alle drei α7-Konstrukte gelang, rekombinante Viren in ausreichender Menge und Konzentration zu isolieren (Tab. 4.1).

Konstrukt (vgl. Abb. 4.1)	Titer [pfu/ml]
α7-WT	$1{,}6 \times 10^8$
α7-His	$0{,}8 \times 10^8$
α7-Str	$0{,}9 \times 10^8$

Tab. 4.1: Titer der rekombinanten Virenlösungen nach zweifacher Vermehrung. Nach der Transfektion von Sf9-Zellen wurde die geerntete Viruslösung zunächst substratgebunden, danach in Schüttelkultur durch Infektion von Sf9-Zellen bei niedrigem MOI (0,05-0,1) vermehrt (siehe Kap. 3.2.3.3).

[13]Der Vektor wurde von Dr. Garboczi, Dept. of Chemistry, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA zur Verfügung gestellt, die α7-cDNA von Dr. Witzemann, Abt. Zellphysiologie, MPI med. Forschung überlassen. Letztere wurde von Dr. Madden, Abt. Ionenkanalstruktur, MPI med. Forschung in den Vektor pLM1 kloniert.

4.1.1.2. EXPRESSIONSVERSUCHE MIT NACHR

Bislang war es in keinem Expressionssystem gelungen, hinreichende Mengen α7-Acetylcholinrezeptor zu erhalten. Zunächst wurde deshalb geprüft, ob das Baculovirussystem überhaupt in der Lage ist, funktionelles Rezeptorprotein zu liefern[14]. Hierzu wurden High Five-Insektenzellen bei einem MOI von 7,5 mit α7His-Viren infiziert und nach einer Infektions-

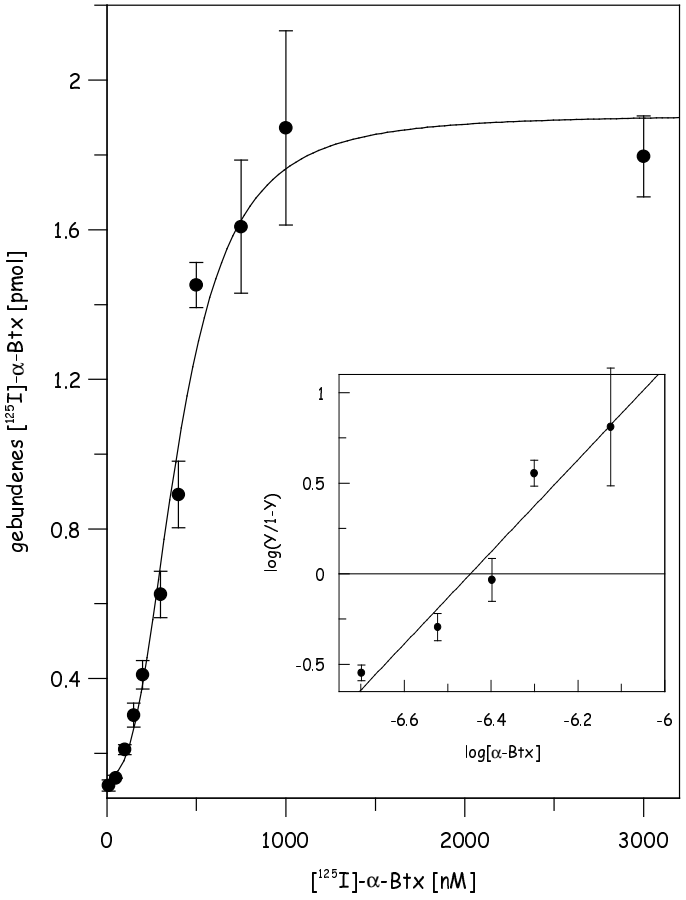


Abb. 4.3: Filterbindungsexperiment zur Bestimmung der Affinität für α-Bungarotoxin in High Five-Insektenzellmembranen. Jeder Datenpunkt ist das Resultat einer Dreifachmessung mit je 10^6 Zellen, wovon die entsprechende unspezifische Bindung subtrahiert wurde. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. Für die Berechnung der gebundenen Menge des Toxins wurde wegen dessen geringer Halbwertszeit (60 Tage) die Restaktivität am Tage des Experiments bestimmt. Im kleinen Fenster ist die Hill-Auftragung wiedergegeben. Y steht für den Sättigungsgrad der Bindungsstellen.

[14]Die korrekte Funktionalität der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurde zuvor mittels *in-vivo*-Transkription in einem Oozytenexpressionssystem und Zugabe von 50-100 µM Azetylcholin überprüft, wobei die gemessenen Signale denjenigen nativer α7-Azetylcholinrezeptoren entsprachen. Diese Versuche wurden von Dr. Witzemann, Abt. Zellphysiologie, MPI med. Forschung durchgeführt.

dauer von 80 Stunden geerntet. Nach der Lyse der Zellen wurden die Plasmamembranfragmente isoliert, gewaschen und ohne weitere Aufreinigung für Ligandenbindungsexperimente eingesetzt. Zur Kontrolle wurden Zellen auch mit AcNPV-WT-Viren infiziert und in gleicher Weise behandelt.

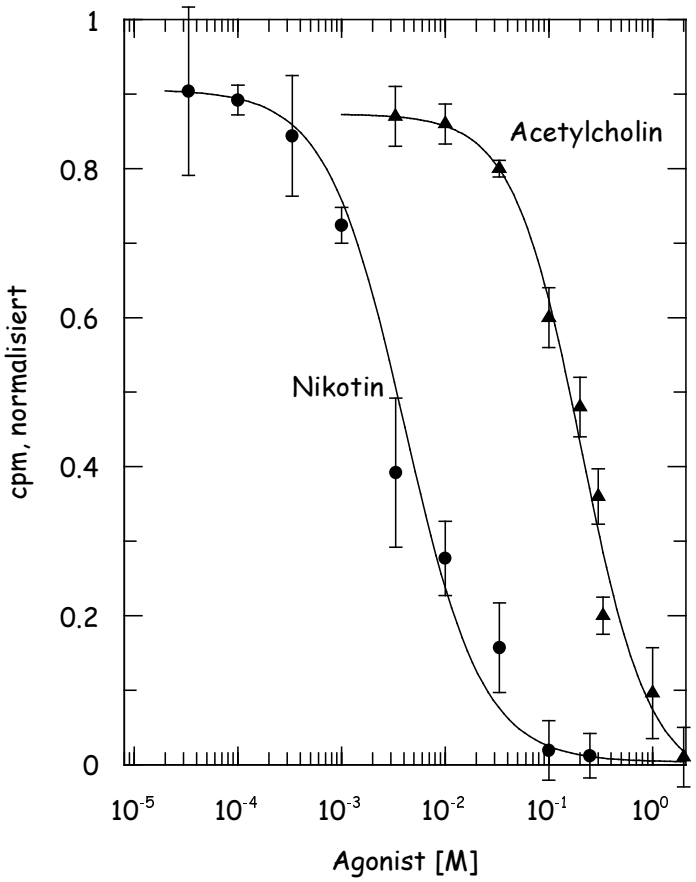


Abb. 4.4: Verdrängung von α-Bungarotoxin durch steigende Konzentrationen der AChR-Agonisten Nikotin und Acetylcholin. Die Toxinkonzentration war in beiden Fällen 500 nM (vgl. Abb. 4.3). Die Meßwerte sind das Ergebnis einer Dreifachmessung, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Die erhaltene Kurve (Abb. 4.3) zeigt nicht den von bisherigen elektrophysiologischen oder pharmakologischen Studien mit dem α7-Acetylcholinrezeptor (Couturier, 1990; Anand, 1993; Gotti, 1994; Garcia-Guzman, 1995) erwarteten hyperbolischen Verlauf. Statt diesem für eine einstufige Bindung des Inhibitors charakteristischen Kurvenverlauf wird hier ein Verhalten beobachtet, das einem kooperativen Bindungsmuster gleicht (Hill-Koeffizient n_H=2,5). Des Weiteren sehr auffällig und mit dem ungewöhnlichen Bindungsmuster einhergehend ist die starke Erniedrigung der gemessenen Affinität des Toxins. Anstelle einer Affinität im Bereich von 1 bis 3 nM wird die halbmaximale Beladung der Bindungsstellen in den Zellmembranen erst bei 400 nM erreicht, also etwa zwei Größenordnungen unter den aus Oozyten bekannten

Werten (siehe Tab. 4.2). Der aus dem Niveau der Sättigung ermittelte maximale Belegungsgrad von 1.85 pmol α-Bungarotoxin pro 10^6 High Five-Zellen läßt sich zu einem Expressionslevel von ca. 200000 Rezeptoren pro Insektenzelle umrechnen, wenn man annimmt, daß jede Untereinheit des Ionenkanals eine Bindungsstelle liefert und alle Untereinheiten in pentamere Kanäle eingebaut wurden. Die mit WT-Virus infizierten Insektenzellen zeigen keine spezifischen Bindungsstellen für α-Bungarotoxin im Konzentrationsbereich des Liganden von 10 nM bis 3 µM.

Zur weiteren Charakterisierung des hier exprimierten Rezeptors wurden die Affinitäten zweier Agonisten, Nikotin und Acetylcholin, bestimmt (Abb. 4.4). Da die aus der Literatur bekannten Werte, 25 bis 100 µM für Acetylcholin sowie 0,5 bis 10 µM für Nikotin (Bertrand, 1992; Anand, 1993; Peng, 1993), ungeeignet für Filterbindungsexperimente sind, wurden Verdrängungsstudien in Gegenwart von 500 nM α-Bungarotoxin durchgeführt und diejenige Konzentration des Agonisten bestimmt, bei der 50 % des vorgelegten Toxins freigesetzt wurden (Tab. 4.2).

Die erhaltenen IC_{50}-Werte spiegeln das bereits für α-Bungarotoxin erhaltene Bild wieder. Statt im mikromolaren Bereich wie für den α7-AChR berichtet, erhält man wieder um mehrere Größenordnungen reduzierte Werte, 206 mM für Acetylcholin bzw. 4,1 mM für Nikotin. Die pharmakologischen Eigenschaften des hier im Baculovirussystem exprimierten Rezeptors sind also von denjenigen in Oozyten oder Säugerzellen untersuchten Ionenkanälen deutlich verschieden. Die stark reduzierte Bindungsaffinität für Agonisten wie für Inhibitioren legt trotz der zufriedenstellenden Expression von etwa 200000 Rezeptoren pro Zelle eine fehlerhafte oder unvollständige Ausbildung zumindest der Ligandenbindungsstelle nahe.

Ligand	**α7-AChR in Oozyten**	**α7-AChR in Insektenzellen**
α-Bungarotoxin	K_D=1,62 ± 0.08 nM	K_{app}=400 ± 24 nM
Acetylcholin	K_I=24,9 ± 4 µM	IC_{50}=206 ± 34 mM
Nikotin	K_I=0,545 ± 0,02 µM	IC_{50}=4,1 ± 0,2 mM

Tab. 4.2: Vergleich der Affinitäten für typische Liganden neuronaler Acetylcholinrezeptoren des α7-AChR aus Oozyten von *Xenopus laevis* sowie aus dem Baculovirussystem. Die Oozyten-Werte wurden durch *patch-clamp*-Messungen ermittelt (Anand, 1993).

4.1.1.3. IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS DES EXPRIMIERTEN α7-PROTEINS

Beide α7-AChR-Konstrukte mit C-terminalen Affinitätsmarkierungen (siehe Abb. 4.1) wurden für eine bessere biochemische Charakterisierung des hier exprimierten ACh-bindenden Proteins

verwendet, um die pharmakologischen Unterschiede zum Verhalten des homomeren α7-AChRs zu untersuchen.

Mit α7-His-Viren infizierte High Five-Zellen wurden geerntet und lysiert, sowie die resultierenden Membranfragmente solubilisiert. Die Aufreinigung polyhistidinmarkierten Proteins erfolgte durch Verwendung einer Ni-NTA-Säule, deren unvollständig komplexierte Metallionen bevorzugt benachbart angeordnete Histidin-Seitenketten binden. Die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung wurden unter Verwendung eines Ni/NTA-Konjugats untersucht (Abb. 4.5).

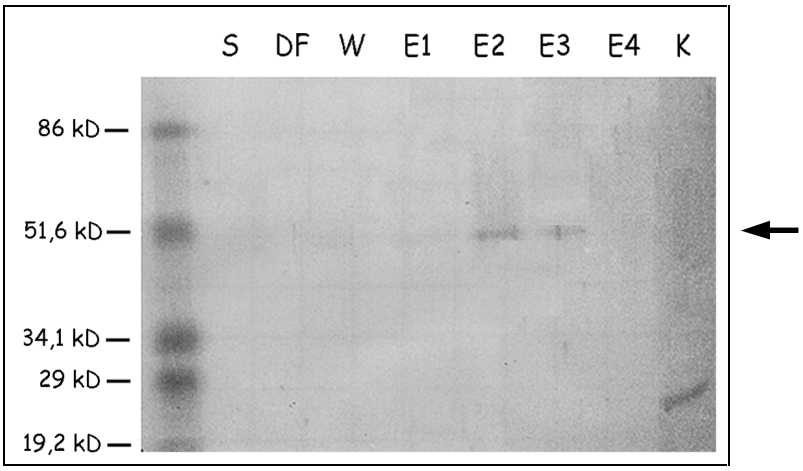


Abb. 4.5: NBT/BCIP-gefärbter Westernblot der Ni/NTA-Auftrennung des Solubilisats einer α7-His-Infektion. Polyhistidinmarkierte Proteine werden über ein Ni/NTA-Konjugat sichtbar gemacht. S: Solubilisat der Membranfragmente; DF: Durchfluß durch die Säule; W: Waschpuffer, enthält 20 mM Imidazol; E1-E4: Eluate (250 mM Imidazol). K: Kontrolle. Letztere ist ein extrazelluläres Fragment des Glutamatrezeptors, der Abschnitt zwischen TM3 und TM4, welches mit einer 6xHis-Markierung versehen wurde[15]. Hiervon wurde 1 μg verwendet.

Während im Solubilisat wegen des geringen Anteils von α7-Protein an der Gesamtmenge der Membranproteine und der damit verbundenen großen Konkurrenz um Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran kein polyhistidinmarkiertes Protein sichtbar wurde, zeigte sich in den Eluaten (siehe Pfeil in Abb. 4.5) sowie in der verwendeten Kontrolle eine Anfärbung. Daher ist von einer spezifischen Farbreaktion auszugehen, wobei die Farbentwicklung insgesamt sehr schwach blieb und nach längerer Inkubationszeit auch zu unspezifischer Nachweisreaktion führte. Statt eines Molekulargewichtes von ca. 60000, wie man es für den kompletten histidinmarkierten und glykosilierten Acetylcholinrezeptor erwartet, wird ein Protein mit einer Molma-

[15]Dieses Protein wurde von Dr. Abele, Institut für Physiologie, Universität Marburg aufgereinigt und zur Verfügung gestellt.

sse von 47,1 kD spezifisch angefärbt. Im Bereich von 55 bis 60 kD wird dagegen keine Bande beobachtet. Da die Affinitätsmarkierung C-terminal angeordnet ist, muß von einem N-terminalen Abbau der Untereinheit ausgegangen werden, dem etwa 10 kD des Proteins zum Opfer fallen. Die extrazelluläre Domäne, in der die Ligandenbindungsstelle liegt, ist dann nur zu etwa der Hälfte vorhanden. Das beobachtete Molekulargewicht kann mit einer Schnittstelle zwischen der zweiten und dritten Glykosylierungssequenz erklärt werden.

Ein analoges Vorgehen wurde nun auch an Insektenzellen durchgeführt, welche mit α7-Str-Viren infiziert worden waren. Die solubilisierten Membranproteine wurden, entsprechend der Affinitätsmarkierung, auf einer Streptavidin-Säule aufgetrennt und einzelne Fraktionen unter Verwendung eines monoklonalen α7-Antikörpers auf das Vorhandensein von α7-Komponenten untersucht.

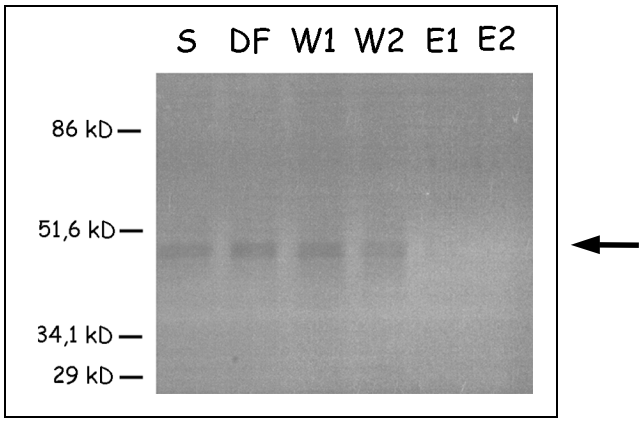


Abb. 4.6: NBT/BCIP-gefärbter Westernblot der Streptavidin-Auftrennung des Solubilisats einer α7-Str-Infektion. Der Nachweis des Proteins erfolgte durch Verwendung eines monoklonalen α7-Antikörpers. S: Solubilisat, DF: Durchfluß, W1/W2: Waschpuffer, E1/E2: Eluate, welche 3 mM Diaminobiotin enthalten.

Das Ergebnis bestätigt das bei der Untersuchung des α7-His-Proteins erhaltene Resultat. Spezifisch angefärbt wird lediglich eine Bande, die einem Molekulargewicht von etwa 47,7 kD entspricht. Dieses verglichen mit der α7-His-Infektion nur geringfügig höhere Gewicht geht auf die unterschiedliche Größe der Affinitätsmarkierungen zurück (vgl Abb. 4.1) und läßt darauf schließen, daß die Fragmentierung des α7-Proteins jeweils an der gleichen Stelle der Aminosäurensequenz erfolgt. Die unvollständige Expression der α7-Untereinheit ist unabhängig von der Art des gewählten Konstruktes und läßt sich auch durch die Zugabe verschiedener Proteaseinhibitoren vor und während der Lyse der Insektenzellen nicht unterbinden. Verwendet wurde dabei ein Breitband-Inhibitorcocktail, der Serin-, Cystein und Metalloproteasen hemmt, entweder

alleine oder im Gemisch mit PMSF, Leupeptin und Pepstatin, welche spezifisch Serin-, Cystein- bzw. Aspartatproteasen hemmen.

Proteolyse im Baculovirusexpressionssystem wurde schon in anderen Fällen beobachtet (Gunne, 1990; Slack, 1995; Heitz, 1997). Im letzten Jahr konnte Proteolysetätigkeit auf eine bestimmte virale Cysteinprotease, V-CATH[16], zurückgeführt werden (Hom, 1998), welche gezielt inhibiert werden konnte. Interessant wäre sicherlich, die Aufreinigung des α7-AchR in Anwesenheit dieses spezifischen Inhibitors, *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butan, zu versuchen[17], gleichwohl Cysteinproteasen bereits in dieser Arbeit durch den Breitbandinhibitor sowie durch Leupeptin inhibiert wurden. Insofern ist die Erfolgsaussicht eher gering einzuschätzen. Auch die Beobachtung, daß V-CATH gerade durch SDS-Probenpuffer aktiviert wird und damit Proteolyse durch eine SDS-PAGE nur vorgetäuscht wird (Hom, 1998), erscheint angesichts der reduzierten Ligandenaffinität unwahrscheinlich. Andere Untersuchungen stellten außerdem fest, daß Proteolyse zu großen Teilen durch die Verwendung von Breitbandinhibitormischungen verhindert werden kann (Grosch, 1998).

Bei obiger Aufreinigung wurde außerdem festgestellt, daß es nicht gelingt, α7-Str-Protein an die Säule zu binden. Das Protein fand sich praktisch vollständig im Durchfluß wieder. Möglicherweise verhindert die Anwesenheit des Detergenzes eine Wechselwirkung von Affinitätsmarkierung und Streptavidin.

Zuletzt wurde noch versucht, die Schnittstelle in der α7-Sequenz zu ermitteln, um die spaltende Protease zu ermitteln und diese gezielt inhibieren zu können. Dieses Vorhaben konnte allerdings nicht verwirklicht werden, da eine Aufreinigung auf der Streptavidin-Säule völlig unterblieb und auch mit Ni-NTA nur ein ungenügender Reinigungseffekt erzielt wurde (Abb. 4.7), der einer N-terminalen Sequenzierung entgegenstand. Eine bessere Aufreinigung hätte der Anwesenheit einer zweiten, N-terminalen Affinitätsmarkierung bedurft. Allerdings wurde auch beobachtet, daß bei einer N-terminalen Markierung der Proteinsequenz des α7-nAChR keinerlei elektrische Signale in Oozyten als Antwort auf Acetylcholinzugabe beobachtet werden konnten (Witzemann, V., persönliche Mitteilung). Somit ist es auch zweifelhaft, ob derart modifiziertes Protein im Baculovirussystem funktionell wäre. Außerdem würde eine N-terminale Markierung bei der hier beobachteten Fragmentierung des Proteins ohnehin verlorengehen.

[16]Der Name V-CATH leitet sich von der Homologie zum lysosomalen Enzym Cathepsin L ab.

[17]Diese Verbindung ist als E64 bei Boehringer Mannheim käuflich.

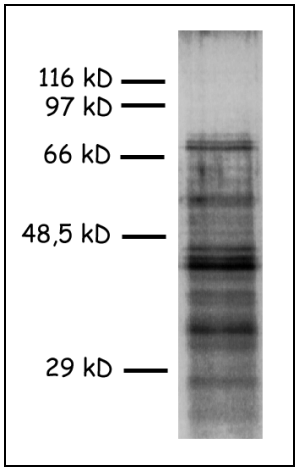


Abb. 4.7: Silbergefärbtes SDS-Gel der Ni/NTA-Elution nach Auftrag des Solubilisats α7-His-infizierter Insektenzellen. Die mit α7-Antikörper spezifisch angefärbte Bande (Abb. 4.5) befindet sich in einer Gruppe von Banden im Bereich von 44 - 48 kD. Die erzielte Aufreinigung ist nicht hoch genug für eine N-terminale Sequenzierung.

Des Weiteren könnte eine Aufreinigung an einer α-Bungarotoxin-Säule versucht werden, wie sie schon für die Isolation von anderen Acetylcholinrezeptoren verwendet wurde (Gotti, 1992). Allerdings ist wegen der niedrigen Bungarotoxin-Affinität des hier exprimierten Fragments fraglich, ob das Protein damit effektiv aufgereinigt werden kann.

4.1.2. EXPRESSION IN BAKTERIEN

Es konnte gezeigt werden, daß es auch in Bakterien möglich ist, integrale Membranproteine funktionell zu exprimieren (Miroux, 1996). Die hierfür verwendeten Bakterienstämme C41(DE3) und C43(DE3) sind Mutanten des Stamms BL21(DE3) und zeichnen sich durch geringere Empfindlichkeit gegenüber toxischen Effekten bei der Expression von Membranproteinen aus. Mit ihnen sollte nun auch die Expression des α7-Acetylcholinrezeptors versucht werden.

4.1.2.1. KLONIERUNG DES EXPRESSIONSVEKTORS

Zunächst war die Klonierung der α7-cDNA aus dem Transkriptionsvektor pLM1 in einen Expressionsvektor notwendig. Verwendet wurde hierzu der Vektor pLX3, der im Unterschied zu pLM1 eine Ribosomenbindungsstelle vor dem Polylinker besitzt. Der Ablauf der Klonierungsschritte ist in Abb. 4.8 dargestellt.

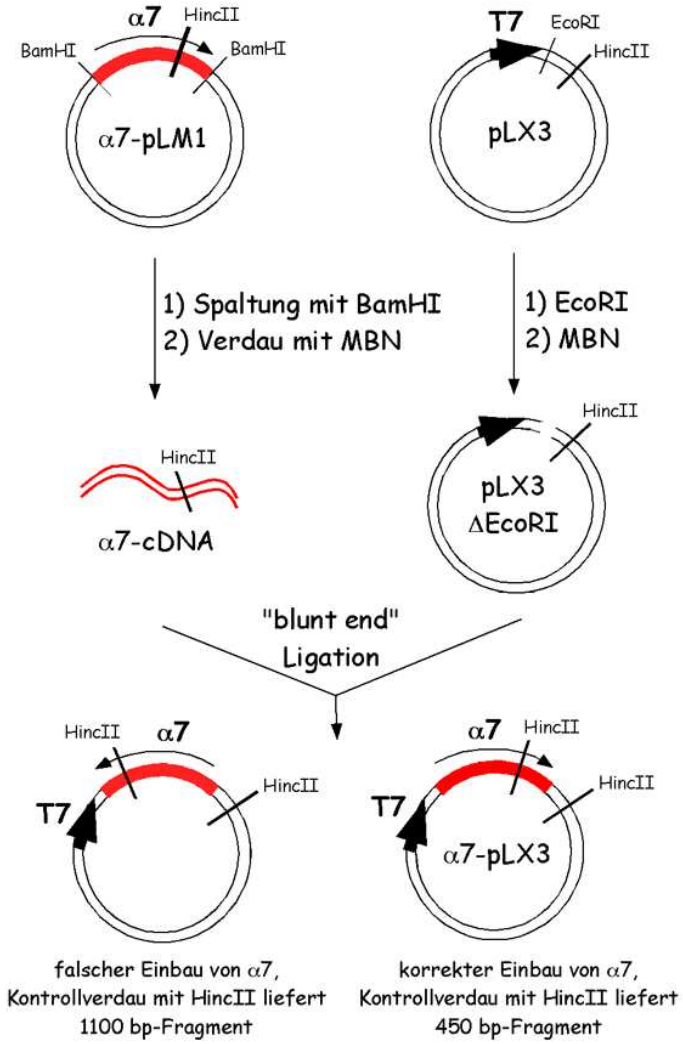


Abb. 4.8: Schematische Darstellung der Klonierung rekombinanter Expressionsvektoren zur Überexpression des α7-Acetylcholinrezeptors in *Escherichia coli*. Eine kurze Beschreibung findet sich im Text.

Die α7-cDNA wird mit BamHI aus dem Vektor geschnitten und die an der Schnittstelle überstehenden Nukleotide mit Mungbohnennuklease entfernt. Der pLX3-Vektor wird an der EcoRI-Schnittstelle seines Polylinkers, der dem Promoter benachbart ist, aufgetrennt und ebenfalls mit der Nuklease behandelt. Beide DNA-Stücke werden nun ligiert, wobei es wegen der Kompatibilität der Enden zwei Möglichkeiten gibt, die α7-DNA in den geöffneten pLX3-Vektor einzubauen. Derjenige Vektor, in dem Promoter und cDNA-Leseraster in der gleichen Richtung liegen, ist der gewünschte. Durch einen Kontrollverdau mit HincII wird hieraus ein 450 bp-DNA-Fragment freigesetzt, das im Agarosegel nachgewiesen wird. Bei falschem Einbau entsteht im Kontrollverdau ein 1100 bp-Fragment. Von allen Konstrukten konnte die korrekte DNA hergestellt und isoliert werden. Tab. 4.3 gibt einen Überblick über die verfügbaren Mengen.

Expressionsvektor	Menge [µg]	Konzentration [mg/ml]
pLX3-α7WT	464	0,93
pLX3-α7His	673	0,68
pLX3-α7Str	490	0,98

Tab. 4.3: Menge und Konzentration der rekombinanten Vektoren für die Expression von α7-Konstrukten in *Escherichia coli* des Typs C41(DE3) und C43(DE3).

4.1.2.2. EXPRESSIONSVERSUCHE

Analog dem Baculovirussystem lag das Interesse zunächst in der Beantwortung der Frage, ob überhaupt funktionelles α7-Protein exprimiert werden konnte. Mittels Gelelektrophorese und Ligandenbindung an ganzen Zellen wurde in einem ersten Schritt nach einer Antwort gesucht.

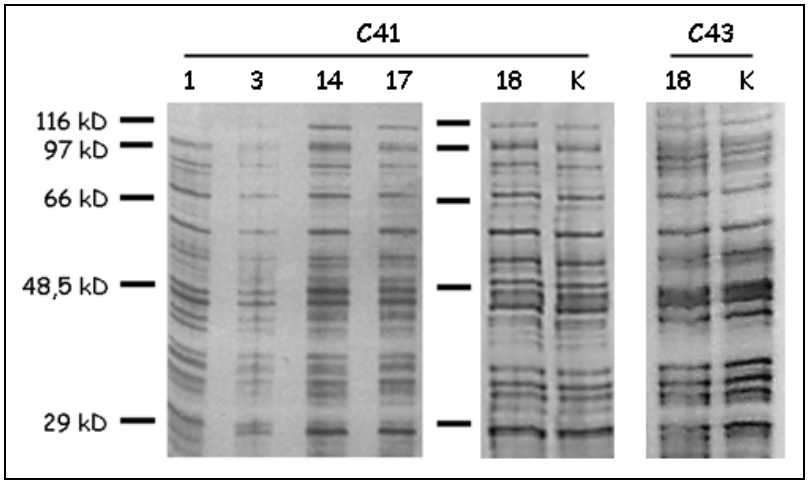


Abb. 4.9: Silbergefärbtes SDS-Gel pLX3-α7WT-transformierter C41- und C43-Kulturen und Vergleich mit einer untransformierten Kontrolle. Die Ziffern geben den Zeitpunkt der Probenentnahme nach der IPTG-Induktion in Stunden an. Die Zellen wurden pelletiert und ohne weitere Aufreinigung aufgetragen. Die Kontroll-Bakterien wurden ebenfalls 18 h nach der Induktion geerntet.

Nach der Transformation von C41 und C43 mit pLX3-α7WT wurde die Expression in Schüttelkultur durch Zugabe von IPTG induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die Proteine wurden durch ein SDS/Harnstoff-Gemisch bei der Lyse der Zellen denaturiert und ohne weitere Aufreinigung für eine elektrophoretische Auftrennung eingesetzt (Abb. 4.9).

Das silbergefärbte Proteingel zeigt keinerlei Anzeichen für die Akkumulation eines Proteins in der erwarteten Größe, wie dies bei anderen getesteten Membranproteinen der Fall war (Miroux,

1996). Unter den vielen, teilweise auch recht deutlichen Banden fand sich außerdem keine, die nach einem Westernblot mit einem monoklonalen α7-Antikörper spezifisch reagierte. Des Weiteren zeigen Bakterien, die nicht mit α7-Protein transformiert worden waren, praktisch dasselbe Bandenmuster (siehe Abb. 4.9), sodaß offensichtlich kein α7-nAChR entstand. Zuletzt konnte mittels Ligandenbindung unter Verwendung des radioaktiven [^{125}I]-α-Bungarotoxin kein spezifisches Signal gemessen werden. Der untersuchte Bereich reichte bei den Filterbindungsexperimenten von 1 bis 500 nM Ligand, schloß also auch diejenigen Konzentrationen ein, bei denen mit dem Baculovirussystem schon deutliche Bindungsaktivität gemessen werden konnte (vgl. Abb. 4.3). Das beschriebene Experiment wurde bei 37 °C sowie bei 25 °C durchgeführt, wobei erhofft worden war, daß ein langsames Wachstum bei niedriger Temperatur eine kontrollierte Expression ermöglichen würde (Miroux, 1996). Beide Experimente führten allerdings zu einem identischen Ergebnis.

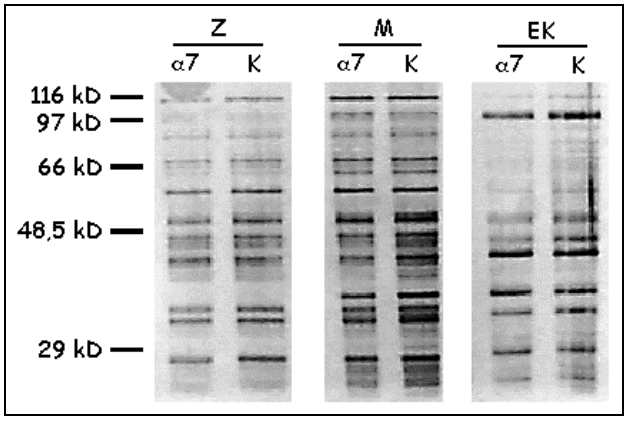


Abb. 4.10: Silbergefäbtes SDS-Gel von Proben eines fraktionierten Zellaufschlusses von α7His-transformierten sowie untransformierten C41-Bakterien zur Kontrolle. Die Zellen wuchsen in LB-Medium und wurden 22 h nach der IPTG-Induktion geerntet. Z: Zytosolische Fraktion, M: Membran, EK: Einschlußkörper.

Im nächsten Schritt wurde mit den transformierten Bakterien ein fraktionierter Zellaufschluß durchgeführt, bei dem die Zellen in Einschlußkörper, Membranfragmente und Zytosol aufgetrennt werden (Nagai, 1987). Sollte α7-Protein unlöslich in Einschlußkörpern exprimiert werden, ist es durch die bisher angewandten Methoden nicht leicht zu finden, insbesondere wenn das Expressionslevel sehr niedrig ist.

Auch hier zeigt ein silbergefärbtes Gel (Abb. 4.10) keinen Hinweis auf das Vorliegen einer überexprimierten α7-Komponente, weder in den Membranen, noch in den Einschlußkörpern. Unterstützt wird dieser Befund durch die Tatsache, daß Immunoblotting gefolgt von α7-

Antikörperbindung wiederum zu keiner spezifischen Reaktion führte. Erneute wurde auch keine spezifische Ligandenbindung festgestellt.

Zuletzt wurden die Expressionsversuche in Minimalmedien durchgeführt. Diese Medien enthalten eine geringe Anzahl genau bekannter Inhaltsstoffe, was die Reproduzierbarkeit erhöht und Einfluß auf die Proteolyse exprimierter Proteine hat. Sowohl verstärkte wie auch reduzierte Fragmentierung sind bekannt (Schlotmann, 1979; Rosenberger, 1990).

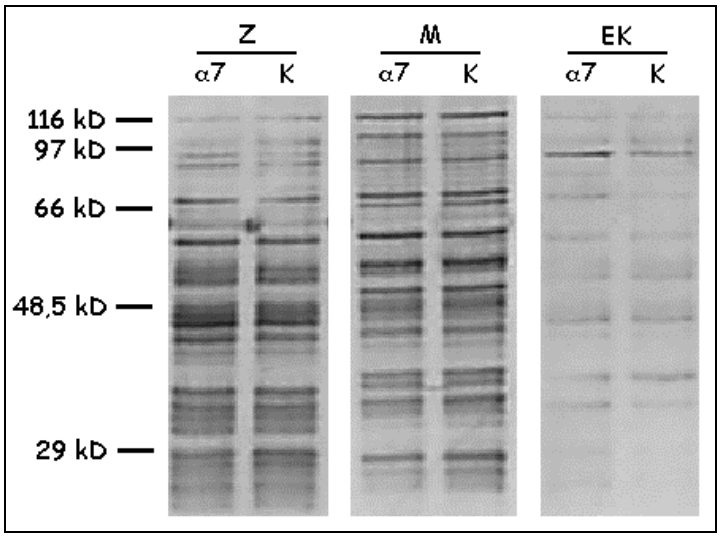


Abb. 4.11: Silbergefärbtes SDS-Gel verschiedener Proben eines fraktionierten Zellaufschlusses von α7His-transformierten C41 sowie einer Kontrolle von untransformierten Zellen (K). Die Bakterien wurden in M63, einem Bakterienminimalmedium, gezüchtet und 17 h nach der IPTG-Induktion geerntet. Z: Zytosol, M: Membran, EK: Einschlußkörper.

Wiederum wurde ein fraktionierter Zellaufschluß am Ende der Induktionsphase durchgeführt und die einzelnen Komponenten der Zelle elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4.11). Am negativen Ergebnis konnte auch die Verwendung der Minimalmedien nichts ändern. Wie bei der Verwendung von Vollmedium zeigen nicht-transformierte Bakterien das gleiche Bandenmuster wie α7His-transformierte Zellen. Nach Westernblot und Inkubation mit α7-Antikörper wurde keine der Banden in Zytosol, Membran oder Einschlußkörper der transformierten C41 spezifisch detektiert. Außerdem konnte keine Ligandenbindungsaktivität für α-Bungarotoxin nachgewiesen werden. Man muß also davon ausgehen, daß es in C41, und auch in C43, mit denen ein analoges Resultat erzielt wurde, nicht zu einer Expression von α7-nAChR kommt. Offensichtlich ist der prokaryontische Wirt nicht in der Lage, den eukaryontischen Neurotransmitterrezeptor zu bilden, weder funktionell in die Zellmembran, noch unlöslich in Einschlußkörpern.

4.1.3. EXPRESSION IN PICHIA PASTORIS

Die Hefe *Pichia pastoris* wurde in jüngerer Zeit erfolgreich für die Expression von Membranproteinen eingesetzt, darunter auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Weiss, 1998). Da das Expressionssystem, ähnlich wie bei den Bakterien, vergleichsweise schnell etabliert werden kann, sollte hiermit ein weiterer Versuch unternommen werden den α7-Acetylcholinrezeptor doch noch funktionell zu exprimieren.

4.1.3.1. KLONIERUNG FÜR DIE EXPRESSION IN PICHIA PASTORIS

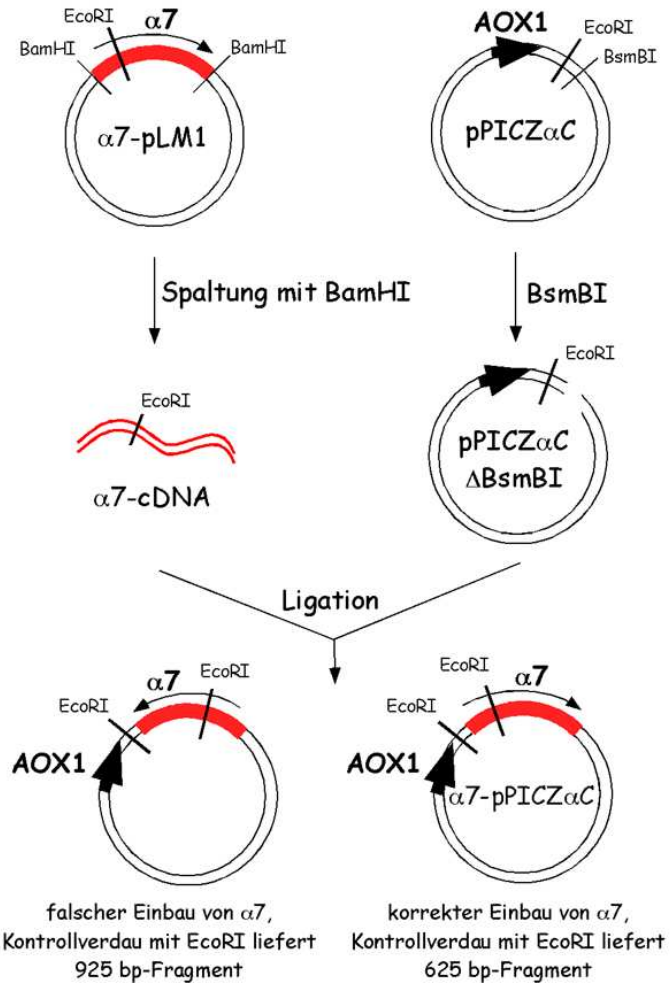


Abb. 4.12: Herstellung der rekombinanten Expressionsvektoren zur Überexpression des α7-Acetylcholinrezeptors in *Pichia pastoris*. Eine kurze Beschreibung wird im Text gegeben.

Wiederum war der erste Schritt das Ausschneiden der α7-cDNA aus dem Transkriptionsvektor pLM1 in einen Expressionsvektor. Verwendet wurde der Vektor pPICZαC, der das eingebaute Protein mit einem eigenen Sekretionssignal ausstattet und für die Expression unter der Kon-

trolle des methanolabhängigen AOX1-Promotors sorgt. Alle α7-Konstrukte enthalten ein N-terminales FLAG-Peptid (Hopp, 1988), die C-terminalen Affinitätsepitope entsprechen denjenigen aus Abb. 4.1. Die einzelnen Klonierungsschritte sind in Abb. 4.12 dargestellt.

Die α7-cDNA wird mit BamHI aus pLM1 herausgeschnitten und pPICZαC mit BsmBI aufgetrennt. Die BsmBI-Schnittstelle ist so konstruiert, daß sie mit BamHI kompatibel ist. Im nächsten Schritt kann deshalb sogleich ligiert werden. Der Vektor mit der gewünschten Orientierung der cDNA gibt sich bei einem EcoRI-Kontrollverdau durch das Entstehen eines 625 bp-Fragmentes zu erkennen, ein falscher Einbau ergibt ein 925 bp-Fragment. Nach der Transformation kompetenter Bakterien konnten die rekombinanten Vektoren in ausreichenden Mengen isoliert werden (siehe Tab. 4.4).

Expressionsvektor	Menge [μg]	Konzentration [mg/ml]
pPICZαC-α7WT	405	1,01
pPICZαC-α7His	362	0,91
pPICZαC-α7Str	386	0,96

Tab. 4.4: Menge und Konzentration rekombinanter Vektoren für die Expression von α7-Konstrukten in *Pichia pastoris*.

4.1.3.2. EXPRESSIONSVERSUCHE

Wie in den beiden bereits getesteten Expressionssystemen stand auch hier zunächst ein möglichst schneller Nachweis funktionellen α7-Proteins im Vordergrund. Die Untersuchung der Bindungsaktivität ganzer Hefezellen schien dabei ein günstiger Ausgangspunkt zu sein, da dieser eukaryontische Wirt anders als Bakterien zu posttranslationaler Modifikation fähig ist und bessere Chancen bestehen, das Membranprotein korrekt prozessiert in der Plasmamembran zu finden.

Die Expressionen wurden mit den Stämmen GS115 und SMD1163 durchgeführt. GS115 ist eine *Pichia pastoris* Wildtyp-Linie, während es sich bei SMD1163 um eine Protease-defiziente Zelllinie handelt. In der Vergangenheit hatte die Expression rekombinanter Proteine in diesen Zelllinien unterschiedliche Resultate ergeben, wobei teils SMD1163 (Weiss, 1995) teils GS115 (Henry, 1997) zu höheren Ausbeuten führte.

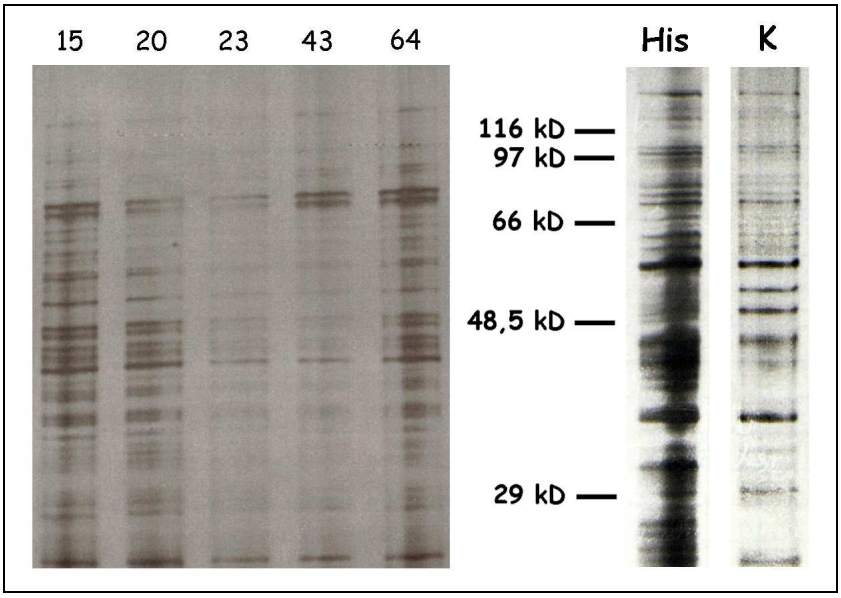


Abb. 4.13: Links: Silbergefärbtes SDS-Gel der Membranen α7His-transformierter GS115-Hefen. Die Ziffern geben den Zeitpunkt der Probenentnahme nach der Induktion mit Methanol in Stunden an. Die Zellen wurden lysiert und die Membranfragmente nach Zentrifugation ohne weitere Aufreinigung aufgetragen. Rechts: Vergleich der Membranproteine von α7His-transformierten Zellen mit einer Kontrolle. Letztere wurde mit dem Vektor pPICZαC transformiert, in dem keine α7-cDNA eingebaut war.

Die ersten Expressionsversuche in dieser Arbeit zeigten allerdings, daß bei Verwendung ganzer Zellen sowie isolierter Zellmembranen keine Bindungsaktivität für α-Bungarotoxin vorhanden war, daß also keine Acetylcholinrezeptoren funktionell in die Plasmamembran eingebaut wurden. Getestet wurde dies mit gleichem Ergebnis in Voll- und Minimalmedien über einen Zeitraum von 15 h bis zu 64 h nach Zugabe des Methanols. Bei anderen Membranproteinen war bereits nach 24 h das Maximum der Expression erreicht worden (Weiss, 1998). Dasselbe Resultat ergab auch eine Untersuchung der in der Membran vorhandenen Proteine mittels SDS-PAGE (Abb. 4.13, links). Es zeigt sich keine Anreicherung eines Proteins der Masse 55 bis 60 kD. Das Bandenmuster von Zellmembranen α7His-transformierter Zellen unterscheidet sich außerdem in diesem Bereich nicht von demjenigen, welches Zellen zeigen, die zur Kontrolle mit pPICZαC ohne α7-cDNA (vgl. Abb. 4.12) transformiert wurden, sodaß davon auszugehen ist, daß es sich um hefezelleigene Proteine handelt (rechtes Bild in Abb. 4.13).

Im nächsten Schritt wurden die Hefen ähnlich wie bei der Untersuchung der Bakterien in die Komponenten Plasmamembran und Zytosol zerlegt. Es wurde versucht, das α7-AChR-Protein durch immunochemischen Nachweis mit dem M1-Antikörpers nachzuweisen (Abb. 4.14). In den Membranen wurden wie im Baculovirussystem Proteine detektiert, deren Molekulargewichte deutlich zu klein waren. Die Molmassen der beiden dominanten Banden wurden zu 40

bzw. 30 kD berechnet, also wiederum weit entfernt von dem theoretisch zu erwarteten Molekulargewicht von 55000 bis 60000 für den intakten α7-AChR. Wieder muß eine Fragmentierung angenommen werden, die zum Verlust der Ligandenbindungsaktivität des Proteins führt. Da hier der Antikörper gegen das N-terminale FLAG-Peptid gerichtet ist, handelt es sich um α7-Proteinfragmente, die C-terminal abgebaut wurden.

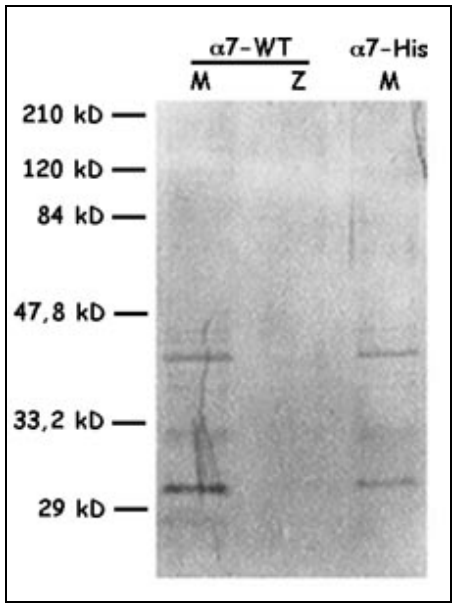


Abb. 4.14: NBT/BCIP-gefärbter α-FLAG-Westernblot fraktionierter Hefezellen nach einem Expressionsversuch über 24 h. M: Membran, Z: Zytosol. Untersucht wurde die α7-WT- und α7-His-Expression in GS115.

Expressionsversuche mit den Stämmen GS115 und SMD1163 wurden in verschiedenen Medien bei unterschiedlich langer Induktion durchgeführt und ganze Zellen sowie die Zellbestandteile getrennt voneinander untersucht. Zu keiner Zeit gelang es dabei eine meßbare Bindungsaktivität für α-Bungarotoxin nachzuweisen bzw. einen immunochemischen Nachweis auf das Vorliegen eines intakten, vollständigen Acetylcholinrezeptor zu erhalten. Aufgrund dieser durchweg negativen Ergebnisse wurde es nicht für sinnvoll gehalten, eine detailliertere Analyse des Ablaufs der Acetylcholinrezeptor-Expression in *Pichia pastoris* vorzunehmen.

Den beiden eukaryontischen Wirten, Hefen und Insekten, ist die Expression fragmentierter α7-AChR-Untereinheiten gemeinsam. Während im Baculovirussystem allerdings zumindest eine reduzierte Bindungsaktivität nachgewiesen werden konnte, scheinen die Fragmentierungen in Hefen derart, daß die Fähigkeit zur Ligandenbindung völlig verlorengeht. In den Bakterien wurden dagegen überhaupt keine Hinweise auf die Bildung von α7-nAChR gefunden, auch

nicht in fragmentierter Form. Selbst eine Akkumulation als unlösliches Protein in Einschlußkörper unterbleibt.

Es existieren bislang auch für andere Expressionssysteme keine Veröffentlichungen, die die Expression von α7-Acetylcholinrezeptoren in strukturbiologisch relevanten Mengen beschreiben. Eine funktionelle Expression gelingt lediglich in Oozyten von *Xenopus laevis*, was elektrophysiologische Messungen gestattet (Colquhoun, 1997). Ebenfalls in Oozyten konnte die extrazelluläre Domäne dieses Ionenkanals als Teil eines chimären Rezeptors exprimiert werden. Hierbei wurde der α7-N-Terminus bis zum Beginn der ersten Transmembranregion mit der membranständigen Domäne aus dem 5-HT_3-Rezeptor verbunden und ein Rezeptor exprimiert, der die Kanaleigenschaften des 5-HT_3-Rezeptors offenbarte, jedoch Ligandenbindung zeigte, wie sie typisch für den α7-AChR ist (Eiselé, 1993).

4.2. DER IONOTROPE GLUTAMATREZEPTOR GLURB

4.2.1. EXPRESSION UND AUFREINIGUNG

4.2.1.1. STAND DES PROJEKTES VOR BEGINN DER ARBEIT

Die erstmalige Expression von ionotropen Glutamatrezeptoren in Insektenzellen gelang im Jahre 1991 (Kawamoto, 1991). Später wurden in *Spodoptera frugiperda* Sf21-Insektenzellen die AMPA-Rezeptoren $GluRB_{flop}$, $GluRD_{flip}$ sowie GluRB/D-Heteromere exprimiert (Keinänen, 1994). Es konnte gezeigt werden, daß die Kanäle eine Affinität für AMPA im nanomolaren Bereich haben und auf Potentialänderungen in der erwarteten Weise reagierten (vgl. Abb. 1.4).

Eine Aufreinigung des $GluRD_{flip}$ wurde bereits beschrieben (Kuusinen, 1995b). Dabei wurde das Protein durch Verwendung von Affinitätsepitopen an N- und C-Terminus aufgereinigt: Zunächst wurden nach der Solubilisierung der Plasmamembran Proteine mit Histidinmarkierung durch Bindung an Ni^{2+}-Sepharose isoliert und anschließend mittels einer M1-Antikörpersäule FLAG-Epitope gebunden, mit denen der Rezeptor N-terminal markiert war. Unter günstigen Bedingungen wurden 50 bis 100 µg des Rezeptors aus einem Liter Zellkultur isoliert. Allerdings variierte die Reinheit und die Aktivität des Proteins zwischen verschiedenen Präparationen erheblich. Vielfach mußte hochmolekulares, aggregiertes Protein durch einen Dichtegradienten von intakten Ionenkanälen abgetrennt werden, was die endgültige Ausbeute auf wenige Mikrogramm GluRD pro Liter Zellkultur verringerte. Wegen dieser geringen Ausbeute und den auf wenige Liter Insektenzellen begrenzten Präparationen, beschränkten sich strukturelle Untersuchungen auf die Begutachtung von *single particles* im EM, wobei das Pro-

tein sehr heterogen erschien und keinen Aufschluß beispielsweise über die Zahl der Untereinheiten erlaubte. Die Umsetzung der Expression auf großvolumige Bioreaktoren schlug fehl, da die diskontinuierliche Infektion, die das Absterben der Zellen bedingt, keine fortlaufende Zellkultivierung zuließ und auch sorgfältiges Reinigen des Reaktors Kontaminationen nicht ausschließen konnte (Keinänen, K., Kuusinen, A., persönliche Mitteilung).

4.2.1.2. AUSWAHL DER ZU EXPRIMIERENDEN AMPA-UNTEREINHEIT

Unterschiede in der Aufreinigung zwischen $GluRD_{flip}$ und $GluRB_{flop}$ zeigten sich vor allem bei der Solubilisierung der Insektenzellmembranen. GluRB wurde deutlich effizienter aus der Membran herausgelöst als GluRD (Keinänen, 1994). Da es in der vorliegenden Arbeit um die Isolierung einer möglichst großen Menge an AMPA-Glutamatrezeptor ging, schien GluRB der vielversprechendere Kandidat zu sein, auch wenn die weitere Aufreinigung noch nicht so intensiv wie für GluRD untersucht worden war.

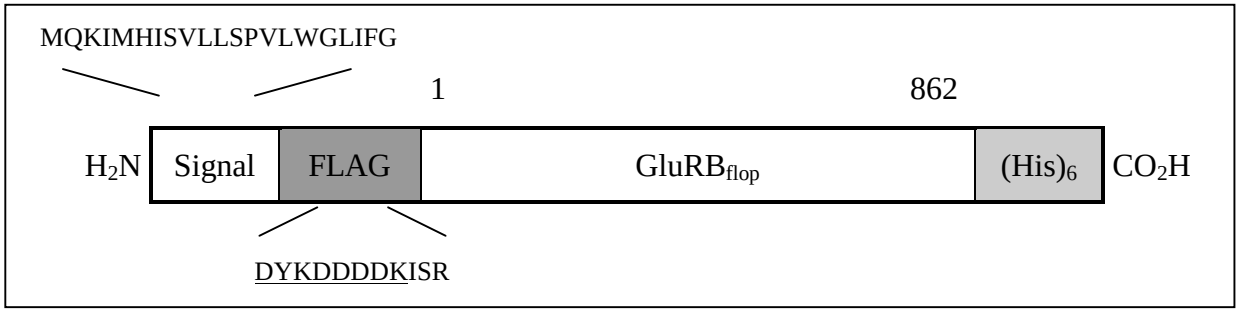


Abb. 4.15: Primärsequenz des in dieser Arbeit für die Expression im Baculovirussystem verwendeten GluRB-Konstruktes. Die Signalsequenz umfaßt 21 Aminosäuren. Das eigentliche FLAG-Epitop besteht aus 8 Aminosäuren (DYKDDDDK), zusammen mit einem kurzen Verbindungsstück vor Beginn der GluRB-Sequenz ergeben sich jedoch 11 Aminosäuren. An den C-Terminus des GluRB-Sequenz sind 6 Histidine angefügt.

Das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt unterscheidet sich vom nativen Glutamatrezeptor durch die Anwesenheit zweier Affinitätsmarkierungen. Hinter die Signalsequenz des N-Terminus ist zunächst ein 8 Aminosäuren umfassendes FLAG-Epitop (Hopp, 1988) zur späteren Aufreinigung eingebaut worden (Abb. 4.15). An dieses schließt sich dann die eigentliche Sequenz des Glutamatrezeptors an. C-terminal wurde, gleichfalls aus Gründen einer erleichterten Aufreinigung, eine Polyhistidin-Markierung angefügt. Insgesamt besteht das Konstrukt aus 899 Aminosäuren, wovon nach Abspaltung der Signalpeptids noch 878 verbleiben. Das Protein besitzt 3 mögliche Glykosylierungsstellen (N256, N370 und N413), die sich in der X-Domäne bzw. am Beginn des S1-Bereiches befinden (vgl. Abb. 1.6).

Das theoretische Molekulargewicht beträgt 98,4 kD für das native Membranprotein. Berücksichtigt man Glykosylierungen, kann von einem endgültigen Molekulargewicht von etwa 104 kD ausgegangen werden. Da zur Aufreinigung die Affinitätsmarkierungen an beiden Enden des Proteins vorhanden sein müssen, ist diese bereits ein guter Test auf die Expression der vollständigen Sequenz (Abb. 4.15).

4.2.1.3. WAHL DER GEEIGNETEN ZELLLINIE

Für die Expression von Glutamatrezeptoren wurden bislang ausschließlich Insektenzellen des Typs *Spodoptera frugiperda* Sf9 und Sf21 verwendet (Keinänen, 1994; Kuusinen, 1995b). Hierbei zeigte sich hinsichtlich des Expressionslevels und Handhabbarkeit eine leichte Überlegenheit der Sf21-Zellen (Kuusinen, A., persönliche Mitteilung). Eine weitere Zelllinie, die für andere Membranproteine erfolgreich zur Proteinexpression verwendet wurde (Grisshammer, 1995), sind *Trichoplusia ni* High Five-Insektenzellen. Diese schnell wachsenden Zellen (Verdopplungszeit 16-24 h) sind zwar etwas kleiner als die langsamer wachsenden Sf21 (Verdopplungszeit etwa 24-36 h), bieten also weniger Membranoberfläche pro Zelle, in die sich die Ionenkanäle einbauen könnten. Sie erreichen aber in kürzerer Zeit höhere Zelldichten und große Kulturvolumina lassen sich schneller erzeugen.

Eine weitere Zelllinie aus *Trichoplusia ni*, MG1, besitzt nicht die Fähigkeit in Rühr- oder Schüttelkultur zu wachsen. Sie vermehrt sich ausschließlich substratgebunden bis zum Erreichen einer konfluenten Einzelschicht. Hierdurch ist es schwierig, sie für die Isolierung von ausreichenden Mengen Membranprotein heranzuziehen. Daher wurde auf eine Charakterisierung der GluRB-Expression in MG1 verzichtet.

Zum Vergleich der Expression von GluRB in High Five- bzw. in Sf21-Zellen wurden die Zellen bei gleicher Ausgangsdichte jeweils bei einem MOI von 5 infiziert. Diese Menge an Virus hatte in der Vergangenheit ausgereicht, die Proteinexpression zu gewährleisten (Kuusinen, 1995b), siehe dazu auch Kap. 4.2.1.5.

Der Verlauf der Infektion wurde mittels Trypanblaufärbung verfolgt. Ziel war es, die Zellernte beim Unterschreiten einer Viabilität von 90 % durchzuführen, um der Gefahr einer proteolytischen Spaltung des Zielproteins durch Proteasen, die aus lysierten Zellen freigesetzt werden, zu entgehen. Bei den Sf21 war dieser Punkt nach 88 h erreicht, während die High Five-Zellen auch nach 90 h immer noch eine Viabilität von mehr als 95 % zeigten. Die Aufreinigung des exprimierten GluRB orientierte sich an einer ursprünglich für GluRD ausgearbeiteten Methode (Kuusinen, 1995b). Die Ausbeute an GluRB wurde durch Amidoblackbestimmung ermittelt und

die Qualität der Präparation mittels SDS-PAGE gefolgt von Silberfärbung und Westernblot untersucht (siehe Tab. 4.5 und Tab. 4.5: Ausbeute von aufgereinigtem GluRB nach Expression in Sf21- und High Five-Insektenzellen

Abb. 4.16). Dabei zeigte sich zum einen eine deutlich bessere Expression bei den High Five-Zellen, welche die Isolation von mehr als der dreifachen Menge GluRB erlaubt. Zum anderen zeigt die Anfärbung mit einem Antikörper gegen den N-Terminus des Proteins, daß in der Sf21-Präparation neben monomerisierten GluRB auch höhermolekulare Anteile gefunden werden, die nicht ins Trenngel eindringen. Dieser offensichtlich aggregierte GluRB ist in der High Five-Probe nicht nachzuweisen.

Zelltyp	Ausbeute pro l Zellen
Sf21	25 µg
High Five	85 µg

Tab. 4.5: Ausbeute von aufgereinigtem GluRB nach Expression in Sf21- und High Five-Insektenzellen

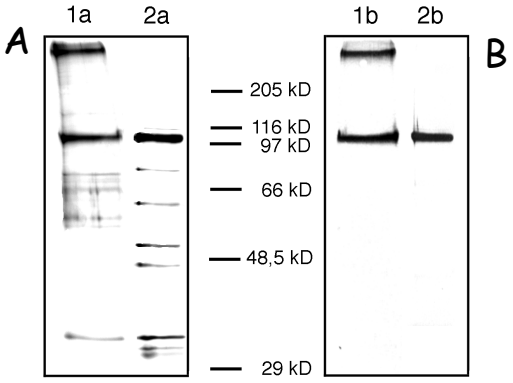


Abb. 4.16: Silberfärbung (A) und Westernblot (B) von GluRB nach Expression und Aufreinigung (siehe Kap. 4.2.1.8ff). Als Antikörper wurde der Anti-FLAG-Antikörper verwendet. 1a/1b: GluRB aus Sf21-Zellen. 2a/2b: GluRB aus High Five-Zellen. Das Protein ist in beiden Präparationen in Triton X-100 solubilisiert.

High Five-Insektenzellen lassen sich also nicht nur schneller auf große Volumen bringen, sondern scheinen für die Expression von GluRB auch hinsichtlich der Ausbeute besser geeignet. Die erzielte Sauberkeit des Membranproteins ist jedoch noch nicht zufriedenstellend. Dieses Problem wird aber noch Gegenstand dieser Arbeit sein (vgl. Abb. 4.35, Bahnen 3 und 4).

4.2.1.4. ERMITTLUNG DER OPTIMALEN INFEKTIONSDAUER

Trypanblaufärbung infizierter Zellen ist zwar eine gute Möglichkeit den allgemeinen Zustand der Insektenzellen zu beurteilen, sie erlaubt aber keine zuverlässigen Hinweise auf denjenigen Zeitpunkt der Expression, bei dem die Proteinausbeute maximal ist. Um dies für die jetzt verwendeten High Five-Zellen herauszufinden, wurde im Verlaufe einer Expression, bei der Insektenzellen mit einem MOI von 5 infiziert wurden, an nachfolgend angegebenen Zeitpunkten

Proben entnommen und mittels Ligandenbindung die Menge an exprimiertem GluRB-Protein bestimmt.

Für eine zuverlässige Aussage war es nötig, die entnommenen Zellen zu lysieren und die entstandenen Membranfragmente zu solubilisieren. Die für die Ligandenbindungsexperimente verwendeten Filter verstopften bei der Applikation von ganzen Zellen sehr schnell und auch bei der Filtration der z. T. recht großen Membranbruchstücke wurde ein unreproduzierbar verzögerter Durchfluß beobachtet, der den Vergleich zwischen den Proben erschwerte. Die Ligandenbindung in den Solubilisaten ist in Abb. 4.17 gezeigt.

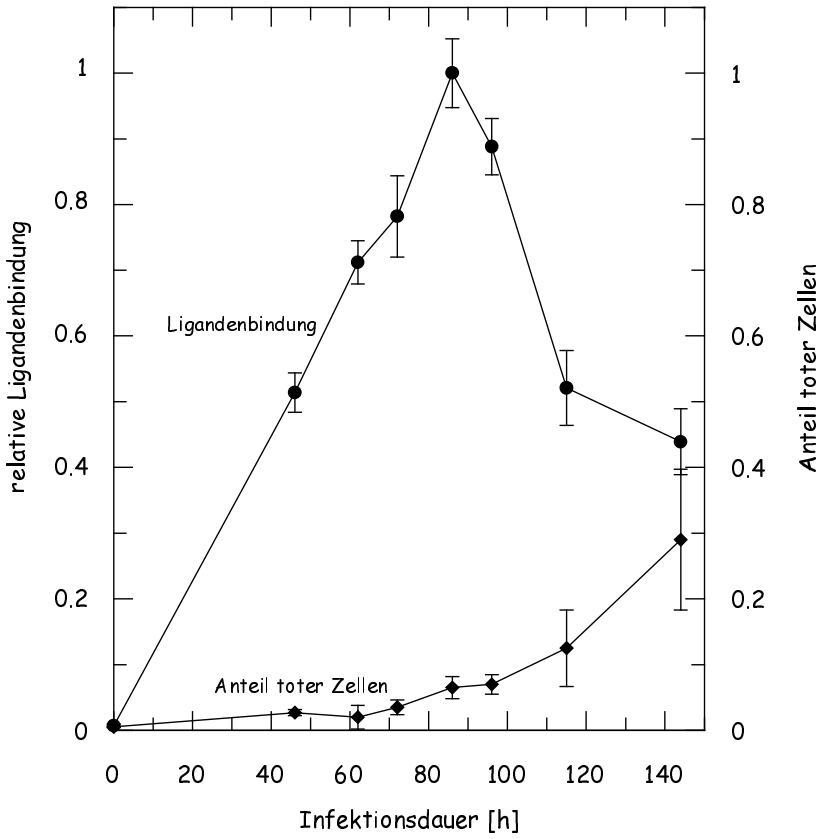


Abb. 4.17: Bestimmung der Menge des gebundenen [^{3}H]-AMPA sowie Darstellung der Viabilität der Insektenzellen im Verlauf einer Infektion. Jeder Meßpunkt ist das Resultat einer Dreifachmessung; die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Die Trypanblau-Färbung der Zellen wurde bei jedem Meßpunkt ebenfalls dreimal bestimmt. Das Experiment wurde mit gleichem Ergebnis zweimal mit verschiedenen High Five-Zellkulturen durchgeführt. Nur eine Zeitkurve ist hier gezeigt.

Erst nach etwa 2 Tagen erreicht sie etwa 50% des späteren Maximalwertes. Dies liegt an der Kontrolle durch den Polyhedrinpromoter, der erst dann voll eingeschaltet wird, wenn die Synthese insektenzelleigener Proteine durch fortgeschrittene Infektion bereits weitgehend eingestellt ist. Bis zum Erreichen der maximalen Bindungsaktivität nimmt dann die Menge gebunde-

ner Liganden linear zu. Das Maximum wird etwa 85 bis 90 h nach der Zugabe der Baculoviren erreicht. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Viabilität der Zellen noch deutlich mehr als 90 %. Im weiteren Verlauf der Infektion nimmt die gemessene Aktivität dann aber stark ab, 24 h nach Überschreiten des Maximums beträgt die Ligandenbindung nur noch 50 % dieses Wertes. Parallel dazu steigt die Zahl toter Zellen stark an, möglicherweise sind sogar erste Zellen bereits vollständig lysiert und die Viabilität damit eher noch zu hoch bestimmt.

Dieser Rückgang der Bindungsaktivität könnte durch Freisetzung von Proteasen aus ganz oder teilweise lysierten Zellen ins Zellmedium verursacht werden, wodurch eine Proteolyse am extrazellulären Teil des Ionenkanals, der die Bindungsstelle trägt, ermöglicht würde. Wegen des gewählten MOI dürften zu diesem späten Zeitpunkt praktisch alle Zellen von der Infektion betroffen sein. Eine weitere Expression funktionellen Membranproteins ist dann wegen gestörter Sekretionsabläufe ausgeschlossen.

Der zeitliche Verlauf der Infektion stimmt im Wesentlichen überein mit den Beobachtungen, die schon mit Sf21-Zellen gemacht wurden (Keinänen, 1994). Dort wurde die maximale Ligandenbindung etwa 3 Tage nach der Infektion erreicht, wobei die Werte einen Tag vor und nach diesem Zeitpunkt noch etwa 80 % des Maximums betrugen. Möglicherweise muß der Zeitpunkt der Zellernte bei High Five-Zellen vorsichtiger gewählt werden, um Ausbeuteverluste durch unvollständige Expression oder proteolytischen Abbau zu vermeiden.

4.2.1.5. BESTIMMUNG DES OPTIMALEN MOI

Ziel eines Expressionsansatzes muß es sein, genügend Baculoviren zu den Insektenzellen zu geben, um möglichst alle Zellen sofort mit mindestens einem Viruspartikel zu infizieren und so die Infektion gleichzeitig zu starten. Da die Herstellung des Virus zeitaufwendig und teuer ist, sollte vermieden werden, unnötig viel Viruslösung zu den Zellen zu geben. Dies gilt umso mehr, als daß Viruslösung aus bereits verwendetem, damit nährstoffarmem Insektenzellmedium besteht, welches unerwünschte Inhaltsstoffe lysierter Insektenzellen enthalten kann (zur Virusvermehrung vgl. Kap. 3.2.3.3).

Die Bestimmung der optimalen Virusmenge, ausgedrückt durch die *multiplicity of infection*, ist also für eine effiziente Proteinexpression unumgänglich. Hierzu wurden gleiche Mengen High Five-Zellen mit verschiedenen MOI von 0.3 bis 7 infiziert, nach 88 h (vgl. 4.2.1.4) geerntet und lysiert. Die Membranfragmente wurden solubilisiert und die Ligandenbindung in den solubilisierten Proben gemessen.

Es zeigt sich sehr deutlich, daß eine Mindestmenge Virus zugegeben werden muß, um überhaupt eine Expression von GluRB zu erhalten. Unterhalb von MOI 3 sind nur sehr wenige hochaffine Ligandenbindungsstellen vorhanden. Oberhalb dieser Marke steigt die Expression zunächst sprunghaft an, verharrt dann aber auf dem erreichten Niveau, auch wenn die Menge des zugegebenen Virus zunehmend erhöht wird. Dies läßt darauf schließen, daß oberhalb eines MOI von 3 jede Insektenzelle direkt nach der Viruszugabe infiziert wird und weitere Viren nur noch zu mehrfacher Infektion führen, ohne daß dabei die Transkription der viralen DNA beschleunigt wird. Um auf jeden Fall in diesen Bereich zu kommen, wurde im folgenden - auch wegen der begrenzten Genauigkeit der Titerbestimmung - immer mit einem MOI von 4 bis 5 gearbeitet.

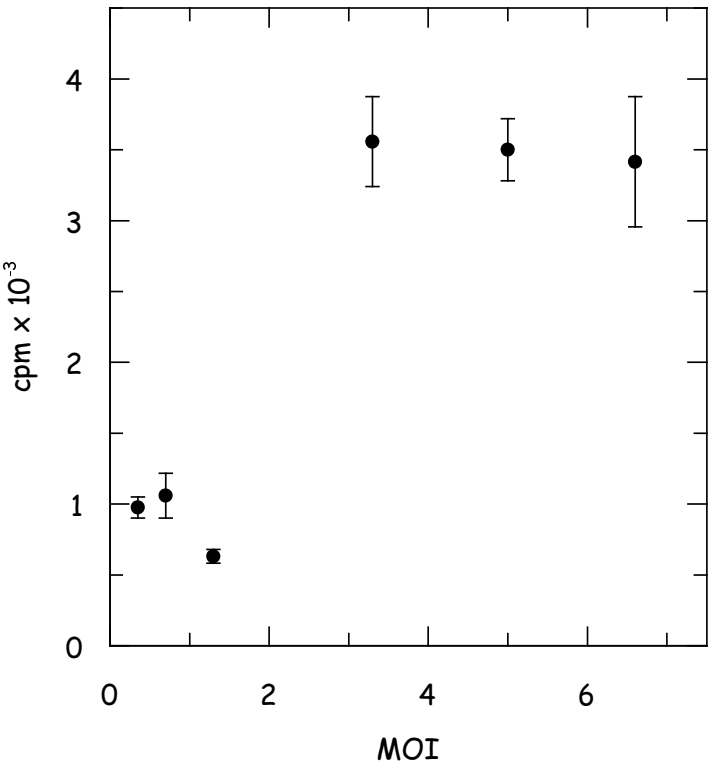


Abb. 4.18: Darstellung der Bindungsaktivität für [^{3}H]-AMPA in solubilisierten High Five-Membranen in Abhängigkeit des MOI. Alle Werte sind das Ergebnis einer Doppelbestimmung und korrigiert bezüglich eines Kontrollwertes, der von Membranen Wildtyp-AcNPV-infizierter Zellen erhalten wurde.

Dieses Ergebnis entspricht den allgemeinen Erwartungen, wonach die Virusmenge einem MOI von 5 bis 10 entsprechen sollte (O'Reilly, 1992). Die Expression von GluRD in Sf21 wurde bei einem MOI von 2 bis 5 durchgeführt (Kuusinen, 1995b). Entweder tritt eine befriedigende Expression bei dieser Zelllinie schon bei geringeren Virusmengen ein, oder der Titer der dort

verwendeten Viruslösung wurde etwas zu niedrig bestimmt und damit die Anzahl der zugegebenen Viren unterschätzt.

4.2.1.6. ERNTE MITTELS DURCHFLUSSZENTRIFUGATION

Bei den Arbeiten mit kleineren Volumina wurden die Insektenzellen am Ende der Infektion mittels Zentrifugation vom Medium abgetrennt. Diese Methode gerät bei größeren Zellvolumina schnell an ihre Grenze und deshalb wurde die Verwendung einer Durchflußzentrifuge zur Sedimentation der Zellen getestet. Nicht nur durch das praktisch unbegrenzte applizierbare Volumen wurden Vorteile für die Präparation erhofft, sondern auch durch das kontinuierliche Umspülen des Zellpellets mit Medium. Letzteres sollte die Zellen bis zuletzt vor einer vorzeitigen Lyse schützen.

Um Durchfluß- und herkömmliche Sedimentation zu vergleichen, wurden gleiche Mengen Zellen nach einer Infektion mit vGluRB$_{flop}$ auf beide Weisen zentrifugiert. Nach identisch durchgeführter Lyse der Zellen, Solubilisierung der Membranen und nachfolgender Affinitätschromatographie konnten Sauberkeit, Ausbeute und Bindungsaktivität miteinander verglichen werden.

Beide aufgereinigten Proteine zeigten eine ähnliche Bindungsaktivität. Eine etwas größere Differenz zeigt sich bei der erzielten Ausbeute, hier wurde mit der Durchflußzentrifuge ein um 30 % besserer Wert erreicht. Möglicherweise werden bei der Durchflußzentrifugation tatsächlich weniger Zellen lysiert und bleibt demzufolge auch mehr Protein intakt, welches dann im Zuge der Aufreinigung von unvollständigem Protein abgetrennt wird.

	Ausbeute [µg GluRB/l Zellen]	**[^{3}H]-AMPA-Bindung** [pmol/mg Protein]
normale Zentrifugation	104	642 ± 16
Durchflußzentrifugation	134	594 ± 13

Tab. 4.6: Vergleich von normaler Zentrifugation und Durchflußzentrifugation hinsichtlich Menge und Aktivität des isolierten GluRB$_{flop}$. Die Bindungsexperimente wurden bei 5 nM [^{3}H]-AMPA durchgeführt.

Außerdem wurde ein leicht verringerter Anteil aggregierten Proteins in der durchflußzentrifugierten Probe gefunden (Abb. 4.19), was ebenfalls auf eine schonendere Behandlung hindeuten könnte. Gleichwohl ist die Differenz nur gering, und da in beiden Fällen das Protein gleicher-

maßen sauber und aktiv ist, sowie die Ausbeute mehr als 100 µg pro Liter Zellen beträgt, können je nach Kulturvolumen beide Zentrifugationsmethoden mit Erfolg angewendet werden.

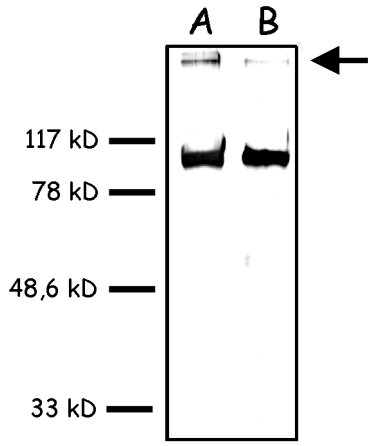


Abb. 4.19: NBT/BCIP-gefärbter α-FLAG-Westernblot mit einem Vergleich von GluRB aus verschiedentlich geernteten High Five-Zellen. A: Zellernte mit konventioneller Zentrifuge, B: Ernte mittels Durchflußzentrifugation. Der Pfeil weist auf den Übergang von Sammel- zu Trenngel hin, an dem Proteinaggregate zurückgehalten werden.

4.2.1.7. SOLUBILISATION MIT LYSOPHOSPHATIDYLCHOLIN

Die Wahl des geeigneten Detergenzes spielt für die Solubilisation und auch nachfolgend für die Stabilität des Proteins insgesamt eine sehr wichtige Rolle. Bei den bisherigen Untersuchungen stellte sich der nichtionische Polyethylenglykolether Triton X-100 als dasjenige Detergenz heraus, bei dem die Ligandenbindung nach der Solubilisierung am stärksten war (Keinänen, 1994). Nicht getestet wurde dabei Lysophosphatidylcholin, das bei der Aufreinigung einiger anderer Membranproteine mit Erfolg verwendet worden war (Hennessey, 1988; Mao, 1997; Huang, 1998). Dort konnte durch Zugabe von LysoPC die Aktivität des Proteins stark erhöht werden. Offenbar war dessen Anwesenheit ausreichend, um die bei der Solubilisierung der Membranen wegfallenden Wechselwirkungen des hydrophoben Mittelteils des Proteins mit Lipiden gleichwertig zu ersetzen.

Um einen direkten Vergleich zwischen Triton X-100 und LysoPC zu erhalten, wurden Insektenzellen aus der gleichen Infektion in vier gleiche Teile portioniert und mit beiden Detergenzien jeweils eine Stunde und über Nacht solubilisiert.

Eine charakteristische Bande für den Glutamatrezeptor ist an dieser Stelle der Präparation nicht zu erkennen, da dieses Protein nur etwa 0.1 % des insgesamt in der Membran vorkommenden

Proteins ausmacht[18]. Zwei andere Beobachtungen lassen jedoch Unterschiede zwischen beiden Detergenzien erkennen: Am Übergang von Sammel- zu Trenngel, wo sich die Acrylamid-Konzentration sprunghaft von 4.5 % auf 10 % erhöht, werden besonders große Proteine bzw. Proteinaggregate zurückgehalten. Dieser Bereich ist bei der Verwendung von Triton X-100 durch eine stärkere Bande gekennzeichnet, als dies bei LysoPC der Fall ist. Des Weiteren ist zu erkennen, daß die Aggregation mit der Dauer der Solubilisation zunimmt. Insbesondere bei der Verwendung von LysoPC zeigen sich nach Inkubation über Nacht deutlich mehr Aggregate als dies nach einer Stunde der Fall ist. In jedem Fall sollte also der Solubilisierungsprozess so kurz wie möglich gehalten werden. Zu klären blieb freilich, ob der beobachtete Unterschied weniger an der Verträglichkeit des Detergenzes sondern an dessen Solubilisierungsvermögen liegt.

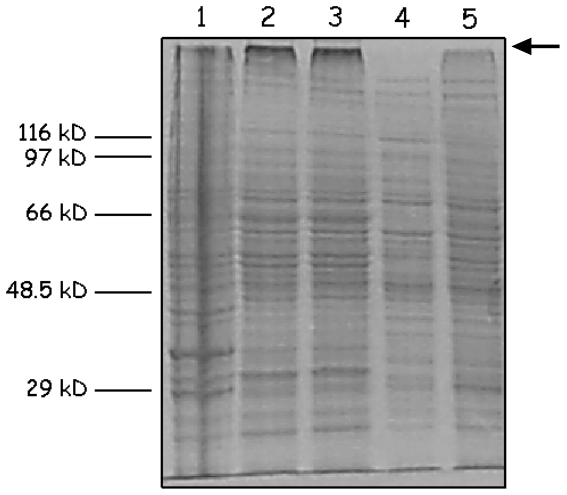


Abb. 4.20: Silbergefärbtes Polyacrylamidgel des Solubilisierungsprozesses von Insektenzellmembranen. 1: Membranfragmente, 2: Solubilisat nach 60 min Inkubation mit 1.5 % Triton X-100, 3: Ü.N.-Inkubation mit TX-100, 4: Solubilisat nach 60 min Inkubation mit LysoPC (5 mg pro mg Gesamtprotein), 5: ÜN-Inkubation mit LysoPC. Der Pfeil weist auf den Übergang von Sammel- zum Trenngel hin.

Um dies zu testen, wurden die Solubilisate durch Affinitätschromatographie an Ni^{2+}-Sepharose gereinigt. Die isolierten Mengen an Glutamatrezeptor wurden mittels Westernblot verglichen und anhand der Ligandenbindungsaktivität überprüft (siehe Abb. 4.21 und Tab. 4.7).

Schon beim Vergleich der Elutionen der Affinitätschromatographie (jeweils Banden 4 und 5 in Abb. 4.21) wird deutlich, daß mit Triton X-100 eine viel größere Menge Glutamatrezeptor isoliert werden kann, als das mit LysoPC der Fall ist. Die Bestimmung der Ligandenbindungs-

[18]Der Gehalt an GluRB in der Insektenzellmembran wurde durch Vergleich der Ausbeute nach Aufreinigung mit der durch BCA-Bestimmung ermittelten Gesamtproteinkonzentration in den Membranen erhalten.

aktivität bestätigt das Resultat: Aus LysoPC-solubilisierten Membranen kann nur ein Siebtel der AMPA-Bindungsstellen isoliert werden. Die Ausbeute, die nach einer sich anschließenden Immunoaffinitätschromatograhie bestimmt wurde, ergibt ein ähnliches Bild, siehe Tab. 4.7. Die spezifische Aktivität des mit LysoPC solubilisierten Protein ließ sich wegen der niedrigen Proteinkonzentration nur ungenau bestimmen. Aus diesem Grund sollte der im Vergleich zu Triton X-100 etwas höhere Wert nicht überbewertet werden.

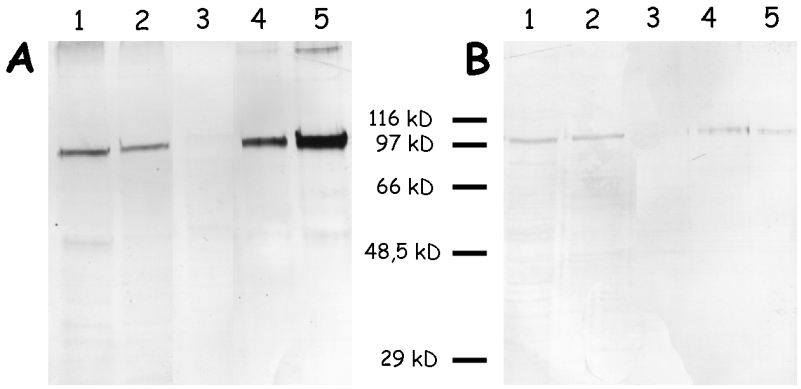


Abb. 4.21: NBT/BCIP-gefärbte Western-Blots verschiedener Fraktionen der IMAC nach Solubilisation in Triton X-100 (A) bzw. LysoPC (B). 1: Solubilisat, 2: Säulendurchfluß, 3: 50 mM Imidazol, 4: 200 mM Imidazol, 5: 500 mM Imidazol. In beiden Gelen wurde der gleiche Marker verwendet, Molekulargewichte sind in B angegeben.

Triton X-100 bleibt damit weiterhin das zur Membransolubilisation am besten geeignete Detergenz. Es ist nicht nur in der Lage große Mengen Glutamatrezeptor aus der Membran zu lösen, sondern hält das Protein auch in einem aktiven Zustand. Da die Intention dieser Arbeit das Umstellen der Präparation auf große Zellvolumina mit der Folge von großen zu solubilisierenden Mengen ist, wird für die Solubilisierung an Triton X-100, nicht zuletzt auch wegen seines relativ geringen Preises, festgehalten[19].

Detergenz	**Bindungsaktivität** [pmol/mg Protein]	**Gesamtligandenbindung** [cpm x 10^{-6}]	**Ausbeute** [µg GluRB pro l Zellen]
Triton X-100	440 ± 54	1,673 ± 0,038	106,8
LysoPC	511 ± 108	0,212 ± 0,016	18,4

Tab. 4.7: Vergleich der spezifischen und der Gesamtligandenbindung sowie der Ausbeute von GluRB nach Solubilisation der Zellmembranen mit Triton X-100 bzw. LysoPC und anschließender Aufreinigung mit IMAC und M1-Antikörpersäule. Die Bindungsexperimente wurden bei 5 nM [^{3}H]-AMPA durchgeführt.

[19]In Kap. 4.2.1.11 wird im Zusammenhang mit der Vorbereitung von Rekonstitutionsexperimenten nochmals auf die Stabilität von GluRB in verschiedenen Detergenzien eingegangen.

4.2.1.8. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT IMMOBILISIERTEN METALLIONEN

Vor der Umstellung der Präparation auf die Verarbeitung großer Zellvolumina wurden die beiden zur Aufreinigung bislang verwendeten Chromatographieschritte näher untersucht. Dabei war die gegen die Polyhistidin-Markierung des C-Terminus gerichtete Affinitätschromatographie an unvollständig komplexierte zweiwertige Metallionen von besonderem Interesse, weil in der Vergangenheit für GluRD eine hohe unspezifische Bindung beobachtet wurde (Kuusinen, 1995b), die bei der weiteren Aufarbeitung die Isolation des Membranproteins in reiner Form erschwerte.

Zunächst wurde versucht, mittels einer Umkehrung der Reihenfolge der beiden Aufreinigungsschritte ein saubereres Produkt zu erhalten (vgl. 4.2.1.1). Das Solubilisat wird zunächst auf die M1-Säule aufgetragen, und erst im Anschluß daran wurde die Metallaffinitätschromatographie durchgeführt. Die Sauberkeit des isolierten GluRB wurde mit derjenigen verglichen, wie sie auf herkömmlichen Wege erzielt worden war (vgl. Tab. 4.5: Ausbeute von aufgereinigtem GluRB nach Expression in Sf21- und High Five-Insektenzellen

Abb. 4.16).

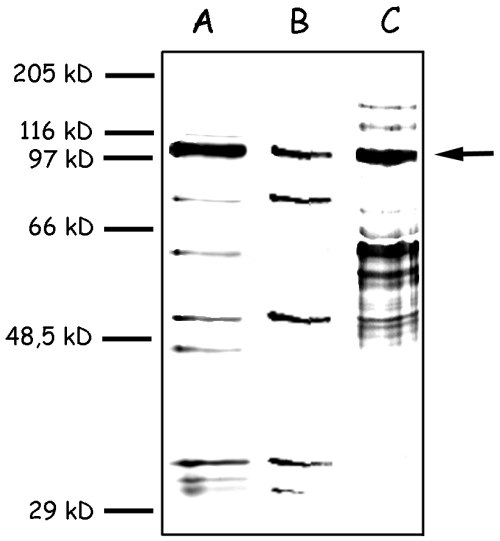


Abb. 4.22: Silbergefärbtes SDS-Gel mit einem Vergleich verschiedener GluRB-Präparationen. In A wurde das Solubilisat zunächst mittels IMAC, danach mit der M1-Antikörpersäule aufgereinigt. Bei B war diese Reihenfolge umgekehrt. In C ist die Reihenfolge wie in A, allerdings betrug während Solubilisation und IMAC die Salzkonzentration nur 200 mM statt 1 M. Die GluRB-Bande bei 104 kD ist durch den Pfeil gekennzeichet.

Wie in Abb. 4.22 zu sehen ist, brachte die Umstellung in der Reihenfolge der Aufreinigungsschritte keinen Fortschritt bezüglich einer erhöhten Sauberkeit des GluRB. Die Verunreinigun-

gen, die sich nach den beiden Affinitätschromatographien nachweisen lassen, sind sogar stärker, als dies mit der bislang angewandten Methode der Fall ist. Einige Verunreinigungen sind in beiden Bahnen zu sehen, insgesamt bei B jedoch im Verhältnis zur GluRB-Bande (Pfeil) durchweg stärker als in A. In beiden Fällen ist allerdings GluRB nicht völlig sauber, sodaß weitere Experimente zur Erhöhung des Reinheitsgrades erforderlich sind. An der ursprünglichen Reihenfolge, zuerst Metallionen- gefolgt von Immunitätschromatographie, wird dabei festgehalten.

Eine mögliche Ursache der hohen Hintergrundbindung könnten hydrophobe Wechelwirkungen der zahlreichen Membranproteine mit dem Säulenmaterial sein. Die Konzentration von NaCl betrug in den bisherigen GluRB-Aufreinigungen während der IMAC in Anlehnung an die GluRD-Methode (Kuusinen, A., persönliche Mitteilung) stets 1 M, was ursprünglich ionische Wechselwirkungen verhindern sollte, die bei GluRD zu verstärkter unspezifischer Bindung geführt hatten (Kuusinen, 1995b). Um nun sicher zu sein, daß damit bei GluRB nicht unnötigerweise hydrophobe Wechselwirkungen provoziert wurden, wurde die Konzentrationen des NaCl auf 200 mM begrenzt. Dies konnte allerdings die unspezifische Bindung nicht reduzieren, im Gegenteil war GluRB nach der sich anschließenden M1-Affinitätschromatographie verglichen mit der üblichen Präparation deutlich weniger sauber (vgl. Bahnen A und C in Abb. 4.22). Dies deutet darauf hin, daß elektrostatische Wechselwirkungen eine größere Rolle spielen als hydrophobe und bestätigte die bereits beim GluRD gemachte Beobachtung (vgl. hierzu auch Kap. 4.2.3.1).

Ein vielversprechenderer Ansatz zur Erhöhung der Sauberkeit des Ionenkanals liegt in der Variation des Metallions bei der IMAC. In vielen Untersuchungen ist gezeigt worden, daß mit einem bestimmten, zumeist zweiwertigen Metallion deutlich bessere Werte hinsichtlich Sauberkeit oder Ausbeute erzielt werden können, als mit anderen (Ostrove, 1990). Vorhersagen bezüglich eines gegebenen Proteins sind allerdings zumeist nicht möglich, und es bleibt ein empirisches Verfahren, das jeweils am besten geeignete Ion zu ermitteln.

Für GluRD wurden bereits mehrere zweiwertige Metalle getestet, wobei Ni^{2+}-Sepharose sich hinsichtlich der gebundenen Rezeptormenge als am besten geeignet erwies (Kuusinen, 1995b). Gleichwohl war die Hintergrundbindung insgesamt sehr hoch, was die Isolation eines reinen Produktes am Ende der Aufreinigung erschwerte. Bei der Aufreinigung von GluRB in dieser Arbeit zeigte sich ein ähnlich unbefriedigendes Ergebnis (vgl. auch Abb. 4.24). Um diese unerwünschte Bindung unspezifischer oder fragmentierter Proteine zurückzudrängen, wurde die

chelatbildende Sepharose mit verschiedenen Metallionen beladen und der resultierende Reinigungseffekt auf den isolierten GluRB sowie dessen Ausbeute untersucht.

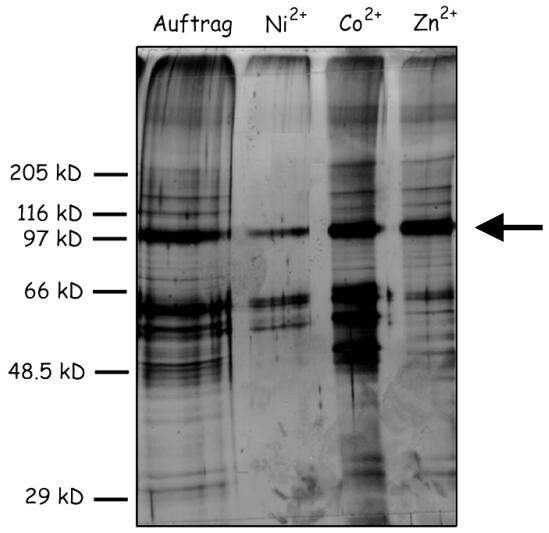


Abb. 4.23: Silbergefärbtes Polyacrylamidgel des Einflusses verschiedener Metallionen auf Sauberkeit und Ausbeute der IMAC. Die Proteine wurden alle mit 10-50 mM Imidazol gewaschen und mit 200 mM Imidazol eluiert. Diese Eluate sind hier als Bahnen 2-4 aufgetragen. 1: Als Auftrag wurde ein ungenügend aufgereinigter GluRB aus einer Präparation verwendet, bei der die IMAC mit nur 200 mM NaCl durchgeführt wurde[20], 2: Aufreinigung mit Ni^{2+}-Sepharose, 3: Co^{2+}-Sepharose, 4: Zn^{2+}-Sepharose. Der Pfeil markiert die Lage der GluRB-Bande.

Beim Vergleich der Proben (siehe Abb. 4.23) fällt zunächst auf, daß mit Ni^{2+}-beladener Sepharose die geringste Menge Glutamatrezeptor isoliert werden kann. Die entsprechende Bande des Proteins fällt deutlich schwächer aus, als bei Co^{2+} oder Zn^{2+}. Die letzteren unterschieden sich bei gleicher Ausbeute an GluRB deutlich in der Sauberkeit des eluierten Proteins. Während bei Co^{2+}-beladener Sepharose kaum ein Reinigungseffekt zu beobachten ist, sind die sich zwischen 45 und 65 kD befindlichen Verunreinigungen im Zn^{2+}-Eluat deutlich reduziert.

Die gerade beschriebene Beobachtung wurde nochmals bei der Expression in größerem Maßstab von 10 l verifiziert, da wegen der großen aufzureinigenden Volumina die Durchführung dieses Chromatographieschrittes modifiziert wurde (siehe Kap. 3.7.2.4). Dabei wurde die herkömmliche Aufreinigung an Ni^{2+}-Sepharose derjenigen mit Zn^{2+}-Sepharose gegenübergestellt.

[20]Dabei wurde festgestellt, daß elektrostatische Wechselwirkungen zu einer deutlich schlechteren Aufreinigung des Proteins führen (s. o.).

Sehr deutlich ist zu sehen, daß mit Zn^{2+}-Sepharose ein höherer Reinigungseffekt erzielt wird. In A ist GluRB in der Vielzahl der Banden noch nicht einmal eindeutig auszumachen. Dagegen wird in B das 104 kD-Protein bereits erkennbar aufgereinigt. Vor allem im Bereich von 40 bis 100 kD ist die unspezifische Bindung von Insektenzell- und Virusproteinen deutlich geringer. Des Weiteren ist die GluRB-Ausbeute, abgeschätzt anhand der Stärke der Banden im Silbergel, bei Zn^{2+}-Sepharose höher als mit Ni^{2+}-Sepharose.

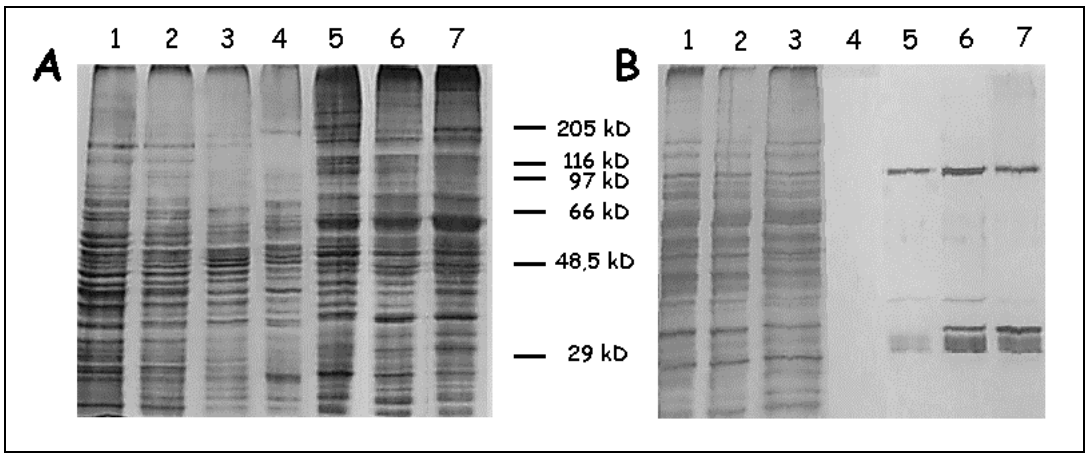


Abb. 4.24: Vergleich zweier silbergefärbter Gele mit verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung an metallbeladener Sepharose. A: Beladung mit Ni^{2+}, B: Beladung mit Zn^{2+}. 1: Solubilisat, 2: Durchfluß, 3: 10 mM Imidazol, 4: 50 mM Imidazol, 5: 100 mM Imidazol, 6: 200 mM Imidazol, 7: 500 mM Imidazol.

Es sei auch gesagt, daß die Reinigung des GluRB nicht in jeder Präparation in der gleichen Qualität gelang. Der Zustand der Zellen sollte möglichst gut und die Sepharose frisch sein. Alte oder schlecht wachsende Zellen hatten einen negativen Einfluß auf die Sauberkeit von GluRB.

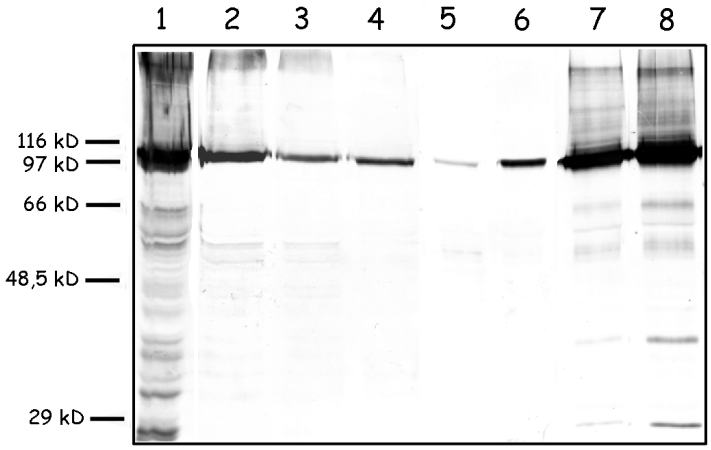


Abb. 4.25: NBT/BCIP-gefärbter M1-Westernblot einer GluRB-Präparation nach der Durchführung einer IMAC mit Zn^{2+}-Sepharose. 1: Membranfragmente vor der Solubilisierung, 2: Solubilisat, 3: Durchfluß, 4: 10 mM Imidazol, 5: 50 mM Imidazol, 6: 100 mM Imidazol, 7: 200 mM Imidazol, 8: 500 mM Imidazol.

Der Westernblot (Abb. 4.25) bestätigt die obige Beobachtung, wonach GluRB bei 100-500 mM Imidazol eluiert. Im nächsten Aufreinigungsschritt wurde mit denjenigen Imidazolfraktionen weitergearbeitet, die sowohl signifikante Mengen GluRB als auch dieses Protein in guter Reinheit enthielten. Üblicherweise war dies ab 100 mM Imidazol der Fall. Die Fraktionen mit 10 und 50 mM Imidazol enthielten zumeist nur wenig GluRB bzw. noch eine Vielzahl anderer Proteine und wurden deshalb nicht weiter verwendet.

4.2.1.9. AFFINITÄTSCHROMOTOGRAPHIE MIT IMMOBILISIERTEM ANTIKÖRPER

Bei diesem Reinigungsschritt bindet das N-terminale FLAG-Epitop des in dieser Arbeit verwendeten GluRB-Konstruktes an einen immobilisierten M1-Antikörper. Diese Wechselwirkung ist Ca^{2+}-abhängig und kann durch Zugabe von EDTA aufgebrochen werden. Da dies bei neutralem pH möglich ist, bietet sich hier eine schonende Methode der Proteinaufreinigung.

Bei der Aufreinigung des GluRD war diese Affinitätsmarkierung bereits eingesetzt worden (Kuusinen, 1995b). In vorliegender Arbeit konnte für GluRB in Kombination mit der Verwendung von Zn^{2+}-Sepharose im vorherigen Aufreinigungsschritt ein sehr hoher Reinheitsgrad erzielt werden. Das nach der IMAC schon erkennbar besser vorgereinigte Protein (vgl. Abb. 4.24), ist nach Verwendung der Antikörpersäule praktisch rein. Die bei Ni^{2+}-Sepharose noch starken Verunreinigungen, wie sie auch bei der GluRD-Aufreinigung beobachtet wurden, führen dazu, daß auch nach der Anti-FLAG-Säule noch störende Banden verbleiben (Abb. 4.26). Die hohe Sauberkeit des Glutamatrezeptors könnte eine wesentliche Erleichterung bei der Rekonstitution und Kristallisation dieses Membranproteins sein.

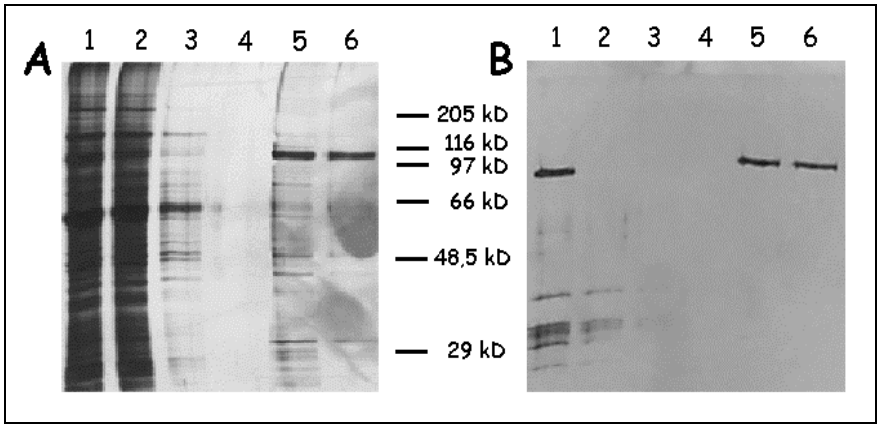


Abb. 4.26: Silbergefärbtes SDS-Gel, an dem die Sauberkeit des GluRB nach IMAC und Antikörpersäule in Abhängigkeit von der Art des bei der IMAC verwendeten Metalls zu erkennen ist. A: Ni^{2+}-Sepharose, B: Zn^{2+}-Sepharose. 1: Auftrag (entspricht den Fraktionen 5-7 in Abb. 4.24), 2: Durchfluß, 3,4: Waschschritte, 5,6: Eluate (10 mM EDTA).

Wie noch gezeigt werden wird (vgl. Kap. 4.2.3), ist das Protein bezüglich des Molekulargewichts homogen, was ein wesentlicher Vorteil zu bisherigen Isolierungen ist. Damit wird die Durchführung zusätzlicher Aufreinigungsschritte überflüssig, die die Ausbeute in der Vergangenheit auf wenige µg pro Liter Sf21-Zellen erniedrigt hatten. Bei der hier vorgestellten Präparationen konnten 100-130 µg GluRB, solubilisiert in TX-100, pro Liter High Five-Zellen gewonnen werden.

4.2.1.10. Weitere Versuche zur Modifikation des Aufreinigungsprotokolls

Mit den bisher beschriebenen Ergebnissen konnte die Expression und Aufreinigung von GluRB bereits wesentlich verbessert werden. Während die Isolation dieses Membranproteins in hoher Reinheit gelingt, bleibt die erzielte Ausbeute trotz signifikanter Verbesserungen weiterhin ein limitierender Faktor für spätere Rekonstitutions- oder Kristallisationsversuche. Daher wurden weitere Versuche unternommen, um die Stabilität des Ionenkanals im Laufe der Aufreinigung und damit die Ausbeute zu erhöhen.

Zwei Ideen standen dabei im Vordergrund. Zum einen könnte es möglich sein, durch Zugabe von L-Glutamat den extrazellulären Teil des Rezeptors zu stabilisieren, da bei der Ligandenbindung die beiden extrazellulären Domänen verbrückt werden (vgl. Abb. 1.6). Allerdings ist es nicht klar, inwieweit es überhaupt zu einer konformellen Änderung bei der Ligandenbindung hin zu einer kompakteren Struktur kommt. Dem Modell einer Venusfliegenfalle (Armstrong, 1998) stehen hier Messungen der Kleinwinkelstreuung gegenüber (Abele, 1999).

Der andere Ansatz besteht in der Erhöhung der Glyzerinkonzentration. Dieses erhöht die Stabilität von Proteinen in Lösung (Radha, 1998; Khan, 1999; Knubovets, 1999). Nachdem in den bisherigen Versuchen 10 % Glyzerin verwendet wurden, sollte jetzt der Einfluß auf die Aufreinigung des GluRB bei 35 % untersucht werden.

Um einen etwaigen stabilisierenden Effekt von Glyzerin und L-Glutamat zu untersuchen, wurde die Zellernte bereits in Gegenwart von 300 µM L-Glutamat durchgeführt und die Konzentration bis zu IMAC konstant gehalten. Diese liegt um ein Mehrfaches oberhalb der elektrophysiologisch bestimmten Affinität von Glutamat bei AMPA-Rezeptoren (Stein, 1992), sodaß alle Bindungsstellen besetzt sind. Die Solubilisierung wurde in 35 % Glyzerin durchgeführt und diese Konzentration ebenfalls beibehalten. Danach wurde dann diese Präparation mit einer herkömmlichen verglichen (Abb. 4.27).

Den wesentlichen Unterschied der beiden Präparationen zeigt die Beobachtung, daß in der Anwesenheit von 35 % Glyzerin deutlich weniger Protein isoliert werden kann. Wegen der

hohen Viskosität der Lösung in Präparation B konnte die Chromatographie nur im Chargenverfahren durchgeführt werden, bei der das Solubilisat zur Sepharose gegeben und diese nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden abzentrifugiert wurde. Während bei 10 %igem Glyzeringehalt diese Inkubationszeit ausreichte, um GluRB an die Sepharose zu binden, könnte die hohe Viskosität bei B dazu geführt haben, daß die Proteine nicht schnell genug ihre Bindungsstellen erreichten. Eventuell wird auch die Wechselwirkung von Histidin und Metallion durch hohe Glyzerinkonzentrationen beeinträchtigt.

Ein stabilisierender Effekt auf GluRB, wie er durch reduzierte Aggregation auf dem Westernblot sichtbar werden sollte, konnte nicht festgestellt werden. Bereits im Solubilisat ist die Aggregation auch in Gegenwart von L-Glutamat und hoher Glyzerinkonzentration nachweisbar (siehe Pfeile in Abb. 4.27) und gegenüber derjenigen herkömmlicher Präparationen verglichen mit der entsprechenden GluRB-Monomerbande nicht spürbar vermindert.

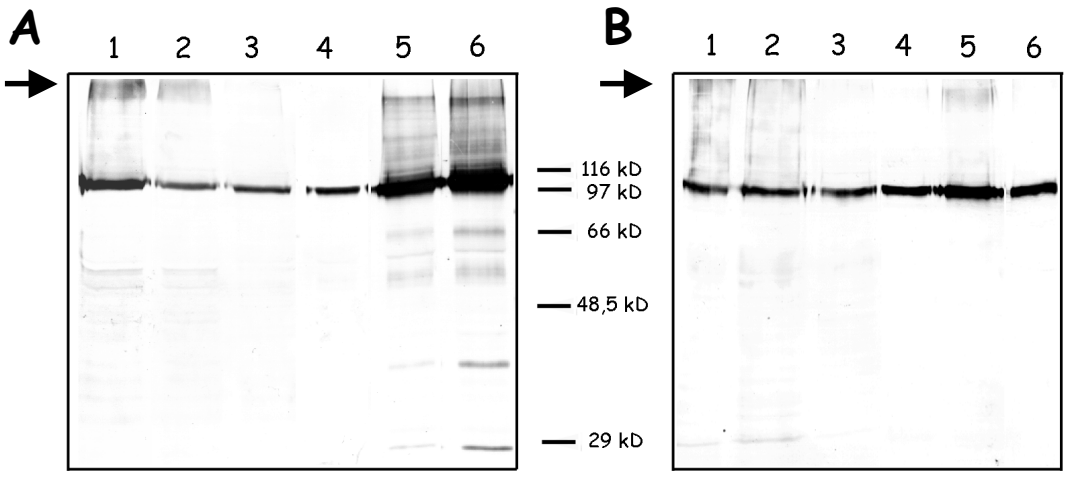


Abb. 4.27: Vergleich zweier NBT/BCIP-gefärbter Westernblots mit verschiedenen IMAC-Aufreinigungen. A: 10 % Glyzerin, ohne L-Glutamat und B: 35 % Glyzerin, 300 µM L-Glutamat. 1: Aufgetragenes Solubilisat, 2: Durchfluß, 3: 10 mM Imidazol, 4: 100 mM Imidazol, 5: 200 mM Imidazol, 6: 500 mM Imidazol. Die Pfeile weisen auf das Vorhandensein von aggregiertem GluRB hin.

Die Idee einer Stabilisierung von GluRB führte also nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Das Protein konnte durch Zugabe von L-Glutamat und höherer Glyzerinkonzentration nicht in einem Zustand gewonnen werden, der auf eine größere Stabilität hätte schließen lassen. In einer weiteren Präparation wurde mit 20 % noch ein leicht erhöhter Glyzeringehalt getestet. Dabei traten die Ausbeuteverluste, wie sie bei 35 % Glyzerin beobachtet wurden, zwar nicht mehr auf, signifikante Verbesserungen zu Präparationen mit 10 % Glyzerin hinsichtlich der Aufreinigung und Ausbeute wurden jedoch gleichfalls nicht festgestellt.

4.2.1.11. DETERGENZAUSTAUSCH

Die Solubilisierung und Aufreinigung des Membranproteins erfolgte aufgrund der guten Solubilisierungseigenschaften und der hohen Ligandenbindungsaktivität in Triton X-100 (vgl. Kap. 4.2.1.7). Mit einer kritischen Mizellkonzentration von etwa 0,25 mM (Goldston, 1998) ist Triton X-100 jedoch ein typisches Niedrig-CMC-Detergenz und kann mittels Dialyse nicht oder nur unvollständig entfernt werden (Rigaud, 1995). Für strukturelle Untersuchungen am GluRB waren im weiteren Verlauf dieser Arbeit jedoch Rekonstitutionsexperimente geplant, in denen sowohl Dialyseschritte eingesetzt werden als auch die Verdünnungsmethode, bei welcher wegen des notwendigen hohen Verdünnungsfaktors Triton X-100 ebenfalls ungeeignet ist (vgl. Kap. 4.2.4). Daher war es erforderlich nach Detergenzien mit einer CMC deutlich oberhalb von 1 mM zu suchen, die dialysierbar waren und in denen GluRB seine hohe spezifische Aktivität behielt.

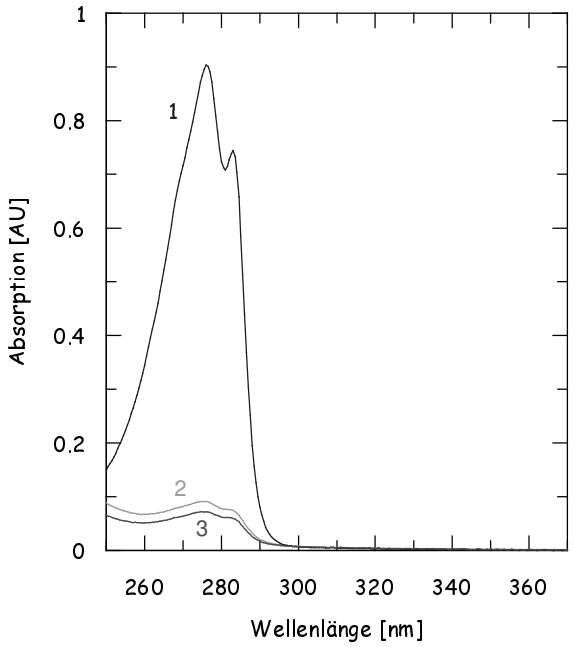


Abb. 4.28: UV-spektroskopisch verfolgte Abnahme der Konzentration von Triton X-100 im Verlaufe eines Detergenzwechsels an einer Zn^{2+}-Sepharose-Säule. Als Beispiel dient hier der Austausch von Triton X-100 durch Octylglukosid. GluRB war solubilisiert in 20 mM HEPES pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10 % Glyzerin, 1,6 mM TX-100. Die UV-Spektren dreier aufeinanderfolgender Waschschritte (20 mM HEPES pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10 % Glyzerin, 1 % OG) im Bereich von 250 bis 370 nm sind gezeigt. Aus der Absorption bei 280 nm und Vergleich mit einer zuvor angefertigten Kalibrierung errechnen sich die Konzentrationen von Triton X-100 in den Waschschritten zu 0,56 mM, 0,06 mM bzw. 0,05 mM.

Der Detergenzaustausch konnte während einer Immobilisierung des Membranproteins an Zn^{2+}-Sepharose durchgeführt werden. In Triton X-100 solubilisiertes, vollständig aufgereinigtes

Protein wurde über die C-terminale Histidinmarkierung an die Zn^{2+}-Sepharose gebunden und solange mit gewünschtem Detergenzpuffer gewaschen, bis sich Triton X-100 nur noch in Mengen deutlich unterhalb der CMC nachweisen ließ (siehe Abb. 4.28). Anschließend erfolgte durch Imidazolzugabe die Elution des Ionenkanals im gewünschten Detergenz.

Triton X-100 konnte in dem gezeigten Austausch-Experiment zu etwa 97 % entfernt werden. Die Konzentration nahm von 1,6 mM zunächst sehr schnell auf 0,56 mM und 0,06 mM ab und stabilisierte sich dann nach dem letzten Waschschritt bei weniger als 0,05 mM. Diese Konzentration liegt um mehr als das Fünffache unterhalb des CMC dieses Detergenzes. Für Dialyse- und Verdünnungsexperimente sollte dies ausreichend niedrig sein. Das Protein wird nun ausschließlich von β-Octylglukosid in Lösung gehalten.

Mit einer Reihe weiterer getesteter Detergenzien (siehe unten) konnte ein analoges Resultat erzielt werden. Die verbleibenden Konzentrationen von Triton X-100 lagen noch niedriger als bei OG (vgl. Tab. 4.4). In jedem Fall wurde die CMC um mindestens das Fünffache unterschritten und 97 bis 99,5 % des ursprünglich vorhandenen Triton X-100 entfernt.

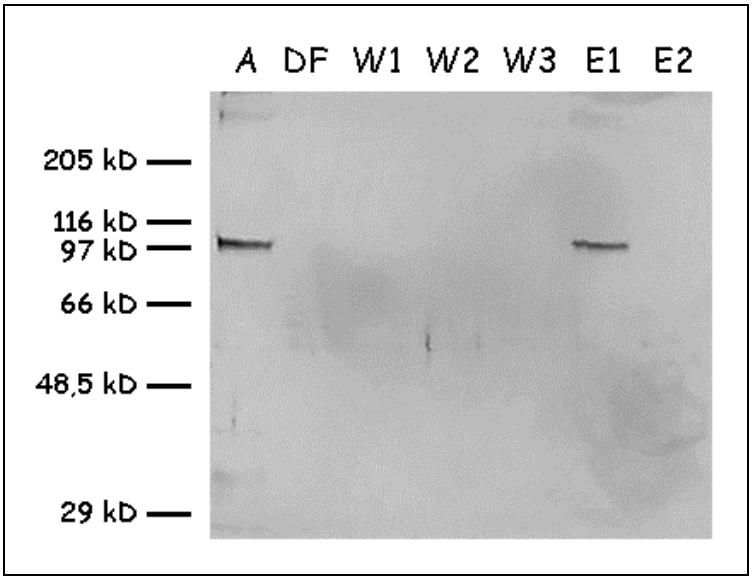


Abb. 4.29: Silbergefärbtes Polyacrylamidgel des Kontrollversuchs zum Detergenzaustausch an Zn^{2+}-Sepharose. A: Auftrag (108 μg GluRB in 20 mM HEPES pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % TX), die Proteinkonzentration beträgt 11 μg/ml, DF: Durchfluß, W1-W3: Waschschritte (je 10 ml Puffer wie oben), E1/E2: Eluate (je 10 ml, Puffer enthält zusätzlich 400 mM Imidazol).

In einem Kontrollversuch, in dem sowohl Wasch- als auch Elutionspuffer Triton X-100 enthielt, konnte das Protein in großen Mengen und praktisch ohne Aktivitätsverlust isoliert werden (siehe Abb. 4.29 und Abb. 4.32). Mehr als 85 % des GluRB wurden zurückgewonnen, wobei

die Aktivität noch 96 % des Ausgangswertes betrug. Die Affinitätschromatographie schadet der Ligandenbindung also nicht.

Detergenzwechsel in andere Detergenzien führten zu ähnlichen Ergebnissen bei der SDS-PAGE. Die Austauschchromatographie wurde dabei mit allen unten angegebenen Detergenzien in identischer Weise durchgeführt. In keinem Fall wurde Protein im Durchfluß gefunden oder bereits beim Waschen mit dem Austauschdetergenz eluiert (vgl. Abb. 4.30). Allerdings schwankte die Rückgewinnung und die verbleibende Aktivität des Proteins in Abhängigkeit von der Art des Detergenzes erheblich (siehe Abb. 4.32 und Tab. 4.8).

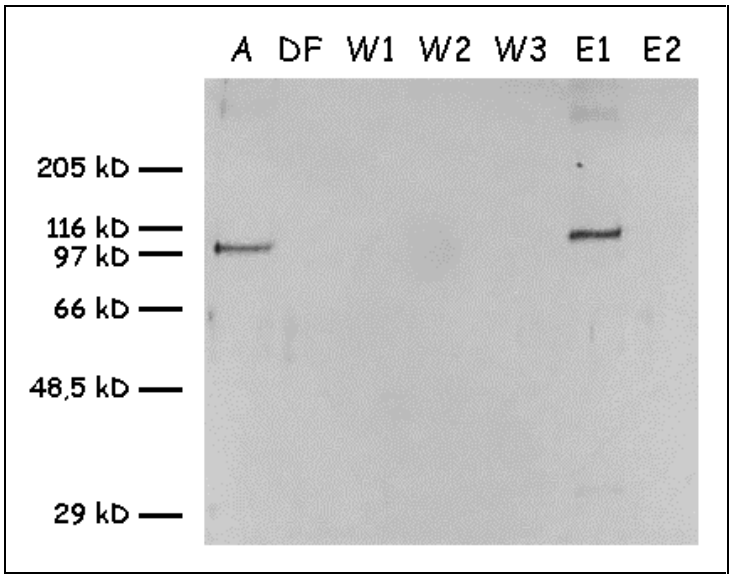


Abb. 4.30: Silbergefärbtes Polyacrylamidgel des Austausches von Triton X-100 in Decylmaltosid. A: Auftrag (108 μg GluRB in 20 mM HEPES pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % TX), die Proteinkonzentration beträgt 11 μg/ml, DF: Durchfluß, W1-W3: Waschschritte (je 10 ml Puffer wie oben, jedoch mit 0,2 % DM statt 0,1 % TX), E1/E2: Elutate (je 10 ml des obigen Puffer, jedoch wieder mit 0,2 % DM und zusätzlich 400 mM Imidazol).

Vor allem Maltopyranoside schneiden sowohl hinsichtlich der Wiedergewinnung des Proteins als auch bei der Ligandenbindung des solubilisierten GluRB sehr gut ab. Die Ausbeuten liegen vor allem bei den längerkettigen Decyl- und Dodecylmaltosid sehr hoch und übertreffen sogar den Wert, der für Triton X-100 erhalten worden war. Wichtiger noch ist die Beobachtung, daß der Ionenkanal in DM und DDM weiterhin eine sehr hohe Aktivität zeigt, die mit der von Triton X-100 vergleichbar ist. DDM ist allerdings wegen seiner niedrigen CMC ebensowenig wie Triton X-100 für Dialyse- und Verdünnungsrekonstitutionen geeignet. Die Aktivität im kürzerkettigen Octylmaltosid ist deutlich schlechter. Sichtbar weniger geeignet sind auch Glukoside, wobei die Ausbeuten zwar mit 60% noch akzetabel sind, die Aktivität jedoch zum Teil stark

erniedrigt ist. Bei dem schwerlöslichen Decylglukosid mußten darüberhinaus 10 % Methanol in den Probenpuffer gegeben, um die CMC zu überschreiten. Die Aktivität des Proteins könnte also auch durch das organische Lösungsmittel beeinträchtigt sein. Aus diesem Grund wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt, in der GluRB in Triton X-100 mit 10 % Methanol überführt wurde. Dies hatte zwar zunächst nur eine mäßige Aktivitätserniedrigung zur Folge (Abb. 4.32), in den Langzeitversuchen wurde aber ein deutlich negativer Einfluß des Methanols auf die Ligandenbindungsaktivität festgestellt (vgl. Abb. 4.33).

Insofern scheint das Membranprotein vor allem in Alkylglykosiden mit langen Ketten von mindestens 10 C-Atomen eine hohe spezifische Aktivität zu behalten, wobei mit Maltose als hydrophiler Kopfgruppe sehr gute Ergebnisse erzielt werden.

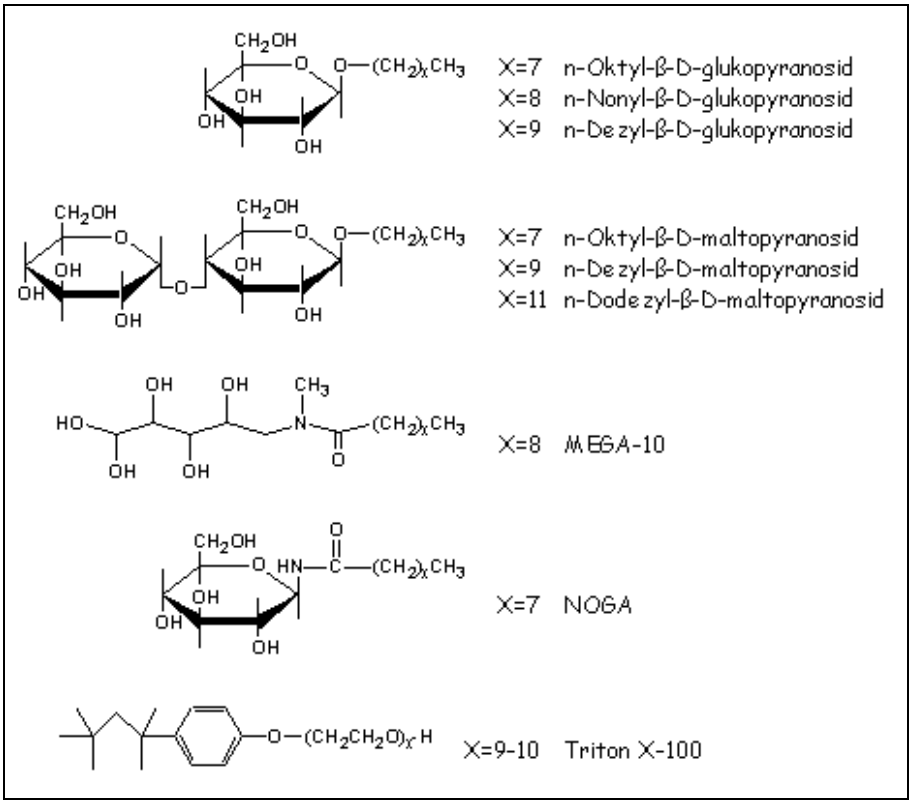


Abb. 4.31: Strukturformeln einiger in dieser Arbeit verwendeten Detergenzien.

Andere nichtionische Detergenzien geben weit weniger befriedigende Resultate. Solubilisiert in MEGA-10 oder NOGA zeigt GluRB praktisch keine Bindungsaktivität mehr. Chemisch läßt sich dieses Verhalten nicht leicht erklären, MEGA-10 als Glukamid und das Glycosylamin NOGA sind den Glukosiden NG oder DG ähnlich und unterscheiden sich von Maltosiden nur durch die weniger hydrophile Kopfgruppe (siehe Abb. 4.31). Triton X-100 ist als Polyoxyethylen dagegen ein eigenständiger Vertreter. Möglicherweise kommt der Länge des Detergenzes eine besondere Bedeutung zu. Die Detergenzien mit den längsten Ketten und größten Kopf-

gruppen (Triton X-100 sowie DM und DDM) besitzen auch die höchste Aktivität. Dagegen ist die Ligandenbindungsaktivität in Octylmaltosid, das sich von Decylmaltosid nur durch das Fehlen zweier Methylengruppen unterscheidet, deutlich geringer. Ähnlich ist der Verlauf bei den Glukosiden, wo NG höhere Aktivität ermöglicht als OG. Wegen des Methanoleinflusses bleibt DG ein Sonderfall. Ein Einfluß der Kettenlänge wurde auch schon bei der Kristallisation der H^+-ATPase von *N. Crassa* vermutet (Auer, 1998). Hier scheint DDM gerade die richtige Länge zu haben, um die für die 2D-Kristallisation notwendigen Kontakte sowohl zwischen Mizellen als auch zwischen löslichen Domänen der Proteine zu erlauben.

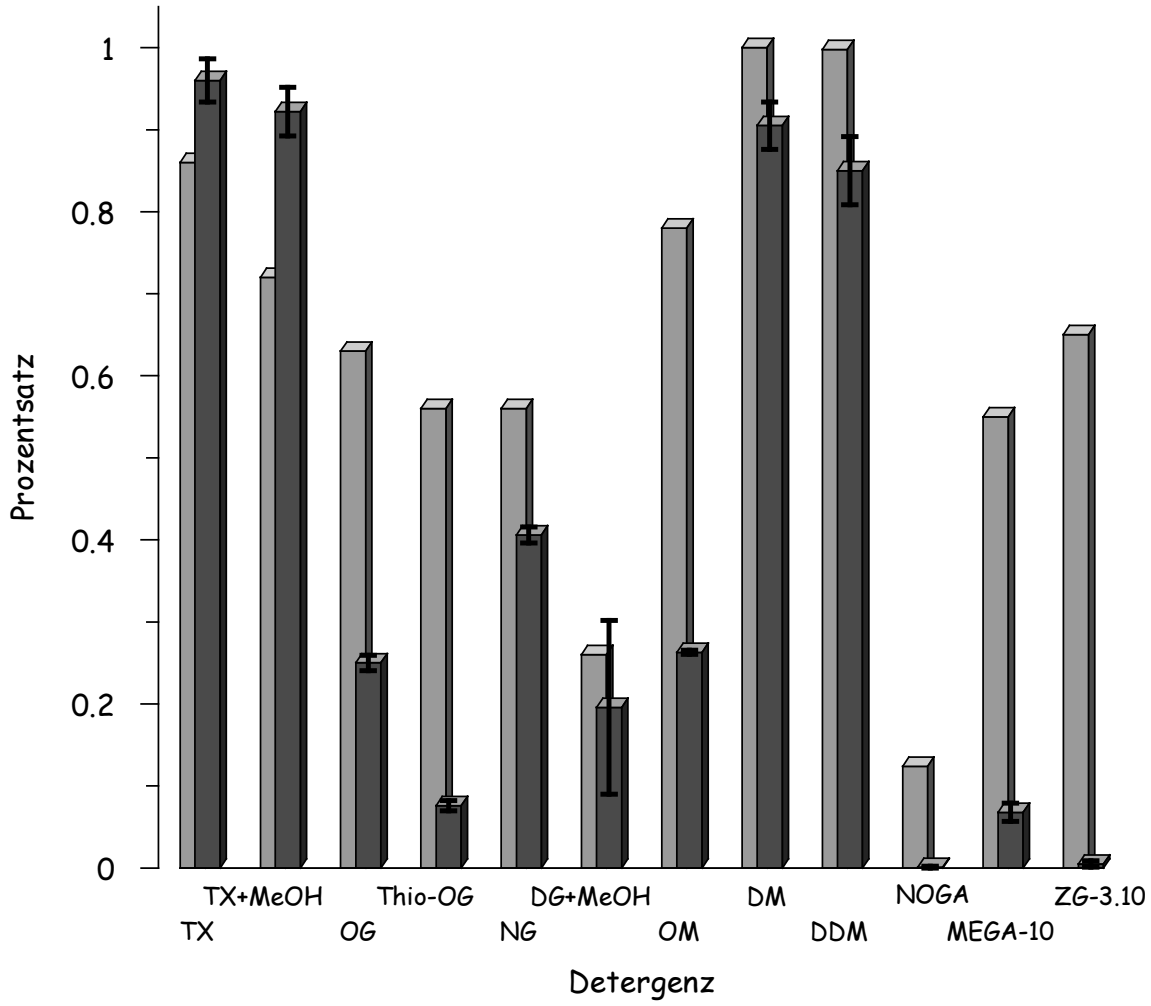


Abb. 4.32: Vergleichende Darstellung von Ausbeute und Bindungsaktivität des GluRB nach Austausch von Triton X-100 in die angegebenen Detergenzien. Die grüne Säule stellt dabei die Rückgewinnung des GluRB nach der Austauschchromatographie dar, die rote Säule kennzeichnet die verbleibende Aktivität relativ zum Ausgangswert.

Mit dem einzigen getesteten ionischen Detergenz, Zwittergent-3.10, ging die Bindungsaktivität vollständig verloren. Auf weitere Untersuchungen dieser Klasse von Detergenzien wurde daher verzichtet.

Um einen genaueren Einblick in das Verhalten des Proteins in den verschiedenen Detergenzien zu erhalten, wurde der zeitliche Verlauf der Bindungsaktivität bei denjenigen Vertretern untersucht, in denen GluRB eine Restaktivität von mind. 20 % zeigte. Hierzu wurde die Ligandenbindung des im entsprechenden Detergenz solubilisierten GluRB über einen Zeitraum von mehreren Wochen gemessen. Während dieser Zeit wurden die Lösungen bei 4 °C aufbewahrt (siehe Abb. 4.33).

Detergenz	**CMC [mM]**	**$[TX\text{-}100]_{Rest}$ [mM]**	**Ausbeute [%]**	**Aktivität [%]**
TX-100	0,22-0,27	-	86	96 ± 2,62
TX-100+MeOH	nicht bekannt	-	72	92,2 ± 2,97
OG	20-25	0,054	63	25 ± 0,93
Thio-OG	9	0,037	56	7,6 ± 0,63
NG	6,5	0,034	57	41 ± 0,96
DG+MeOH	2-3	0,015	26	19,6 ± 10,6
OM	23,4	0,036	78	26,3 ± 0,25
DM	1,6	0,032	99,5	90,5 ± 2,89
DDM	0,1-0,6	0,005	99	85 ± 4,16
MEGA-10	6-7	0,01	55	6,8 ± 1,1
NOGA	80	0,046	12,4	0,1 ± 0,1
Zwittergent-3.10	25-40	0,042	65	0,5 ± 0,37

Tab. 4.8: Zusammenfassung der Experimente zum Detergenzaustausch. Angegeben sind CMC der Detergenzien, die verbleibende Triton-Konzentration nach dem Austausch, sowie Wiedergewinnungsrate und Aktivität des Proteins.

Die Bindungsaktivität von GluRB nimmt in allen Detergenzien stetig ab. Bei den Detergenzien mit ursprünglich hoher Aktivität geschieht dieser Prozeß langsamer als bei denjenigen, in denen GluRB schon von vornherein eine reduzierte Ligandenbindung zeigte. Langfristig ergeben sich die stabilsten Werte weiterhin für Triton X-100, das damit seine Bedeutung als wichtiges Detergenz bei der Aufreinigung und Untersuchung des GluRB unterstreicht. Nur wenig schlechtere

Werte zeigen DM und DDM, wobei DM wegen seiner CMC von mehr als 1 mM ein geeigneter Kandidat für Rekonstitutionsexperimente sein könnte. Dessen Dialysierbarkeit konnte außerdem nachgewiesen werden[21]. Der Einfluß, den Methanol auf das Protein hat, ist deutlich und könnte den niedrigen Aktivitätswert des GluRB in Decylglukosid erklären. Insgesamt scheint

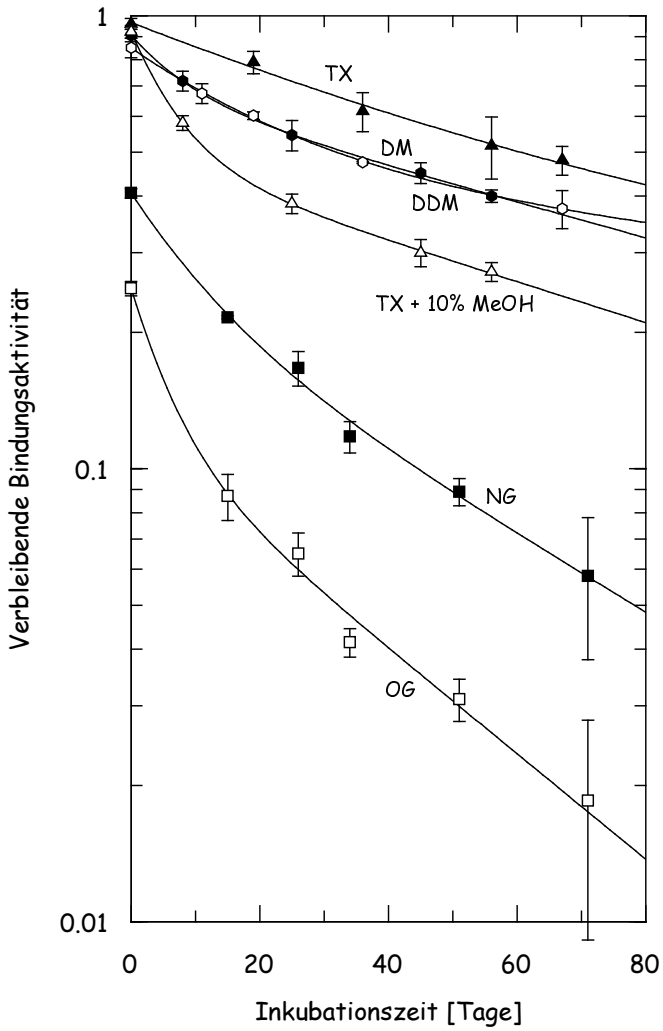


Abb. 4.33: Entwicklung der Ligandenbindung des in den angegebenen Detergenzien solubilisierten GluRB nach Inkubation von bis zu 70 Tagen bei 4 °C. Die Meßpunkte sind Mittelwerte einer Dreifachmesung und mit einer doppelt-exponentiellen Zerfallskurve angenähert. Die Werte auf der Ordinaten entsprechen denjenigen der Abb. 4.32.

GluRB aber in den genannten Detergenzien zumindest über kurze Zeiträume stabil. Mit DM und DDM geht ein Drittel der Ligandenbindung nach etwa 15 Tagen verloren, bei Triton X-100

[21] Hierzu wurde 1 ml einer 0,14 %igen Lösung von DM in einer Slide-A-Lyzer-Dialysekammer (Pierce) mit einer Ausschlußgrenze von 10 kD gegen ein 500faches Volumen ddH_2O dialysiert. Nach einer Dialyse von 24 h ließen sich von ursprünglich eingesetzten 1,4 mg des Detergenzes nur noch 26 µg nachweisen.

dauert dies doppelt so lange. Ein schnellerer Abbau der Ligandenbindung findet bei den Alkylglukosiden OG und NG statt. Nach 15 Tagen ist hier die Bindungsaktivität bereits auf ein Drittel bzw. die Hälfte reduziert.

Durch Immobilisierung von GluRB, solubilisiert in Triton X-100, an Zn^{2+}-Sepharose ist es gelungen, die Detergenzmoleküle in der Mizelle um den hydrophoben Proteinbereich vollständig auszutauschen. Nur in wenigen Fällen blieb dabei allerdings die Ligandenbindung des Proteins erhalten. Mit n-Decyl-β-D-maltopyranosid steht ein Detergenz zur Verfügung, in dem die Aktivität des Glutamatrezeptors auch über mehrere Tage hinweg auf hohem Niveau verbleibt und das durch Dialyse und Verdünnung von Protein abgetrennt werden kann. Weiterhin nicht gelungen ist das Auffinden eines Detergenzes, in dem GluRB eine höhere Aktivität zeigt als in Triton X-100.

4.2.1.12. BESTIMMUNG DER LIGANDENBINDUNGSAFFINITÄT

Aufgrund der hohen Affinität der AMPA-Glutamatrezeptoren für den Liganden AMPA (Stein, 1992; Keinänen, 1994) kann die Affinität mittels Filterbindung bestimmt werden. Dabei wird GluRB mit steigenden Konzentrationen von [^{3}H]-AMPA inkubiert und diejenige Konzentration bestimmt, bei der die Bindung halbmaximal ist.

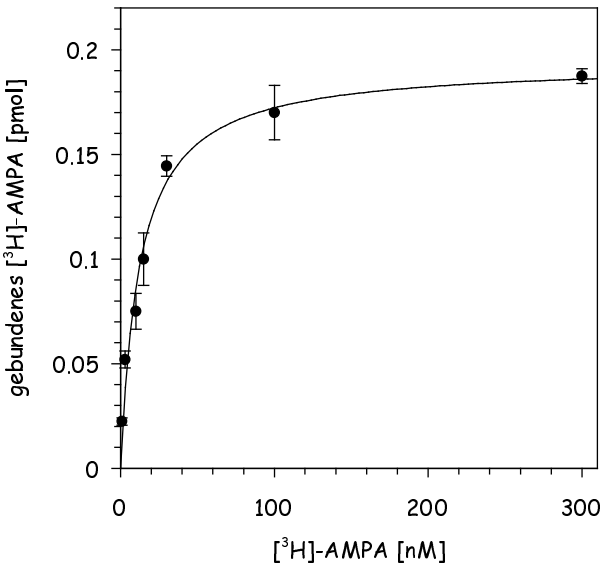


Abb. 4.34: Sättigungsbindungs-Isotherme der [^{3}H]-AMPA-Bindung an GluRB, solubilisiert in Triton X-100. Die Meßpunkte liegen auf einer hyperbolischen Kurve. Die berechnete Affinität beträgt 18,2 nM, der B_{max}-Wert liegt bei 2140 pmol/mg GluRB.

Der Kurvenverlauf entspricht demjenigen, den man für eine einstufige Ligandenbindung erwartet. Der K_D von 18,2 nM liegt inmitten der 15-20 nM, die bereits für GluRB ermittelt wurden (Keinänen, 1994). Auch der Wert für B_{max} liegt im gleichen Bereich wie bei GluRD.

4.2.1.13. ZUSAMMENFASSUNG: EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DES GLURB

Für die Expression und Aufreinigung des ionotropen Glutamatrezeptors GluRB konnte ein Verfahren erarbeitet werden, das die Isolierung dieses Membranproteins in Mengen ermöglichte, wie sie für sinnvolle strukturelle Untersuchungen unerläßlich sind. Die Reinheit des Ionenkanals ist sehr hoch, das Molekulargewicht der Untereinheit mit 103,6 kD im erwarteten Bereich und das Protein zeigt eine hohe Affinität für AMPA.

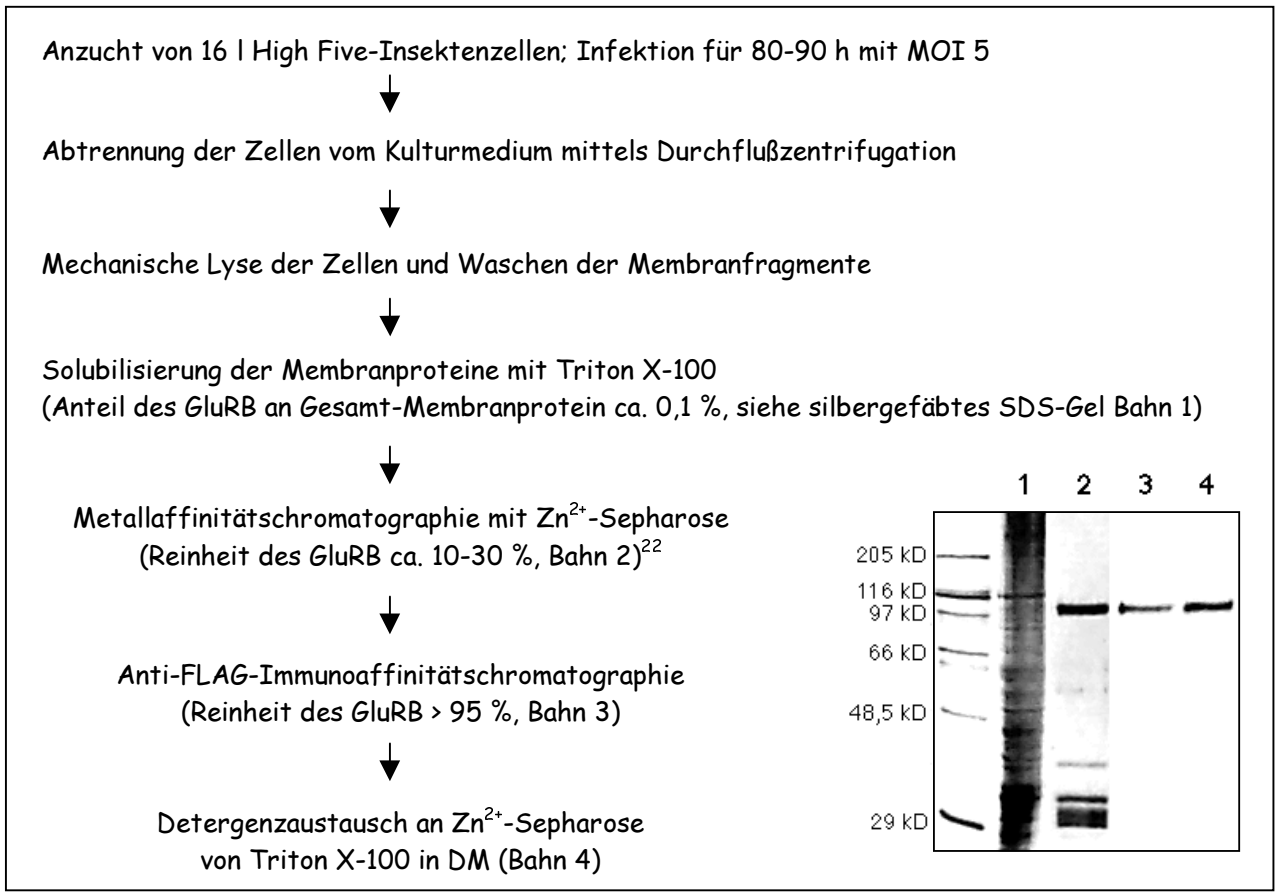


Abb. 4.35: Schema der wichtigsten Schritte zur Expression und Aufreinigung von GluRB aus Insektenzellen. Das silbergefärbte Gel verdeutlicht den Fortgang der Aufreinigung. 1: Triton X-100-solubilisierte Membran, 2: IMAC-Eluat, 3: Anti-FLAG-Eluat, 4: GluRB solubilisiert in Decylmaltosid.

[22]Dieser Wert wurde anhand eines Intensitätsvergleichs der Proteinbanden mit dem Analyseprogramm "Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software" der Firma Kodak berechnet.

Insgesamt betrug die Ausbeute nach dem vollständigen Durchlauf des Aufreinigungsprotokolls regelmäßig etwa 100 bis 130 µg pro Liter Zellkultur. Bei der Expression im Maßstab von üblicherweise 10 bis 16 l ließen sich mehr als 1,5 mg GluRB isolieren. Die Adaption der einzelnen Expressions- und Reinigungsschritte an die Verarbeitung dieser großen Volumina gestattet damit eine Isolierung bislang nicht verfügbarer Mengen dieser Klasse von ligandengesteuerten Ionenkanälen.

Anhand von Detergenzaustauschexperimenten konnten Bedingungen erarbeitet werden, die es erlauben, Triton X-100-solubilisierten GluRB ohne wesentlichen Aktivitätsverlust in andere Detergenzien zu überführen. Insbesondere gelang es dabei ein geeignetes Detergenz zu finden, dessen CMC größer als 1 mM ist, mithin also Detergenzdialyse gestattet. Damit sollte es möglich sein, mit einem breiten experimentellen Ansatz Rekonstitutionsexperimente durchzuführen (siehe Kap. 4.2.4). Zunächst wird aber noch auf einige strukturbiologische und biochemische Charakterisierungen eingegangen, um den oligomeren Zustand des Ionenkanals zu untersuchen.

4.2.2. EINZELPARTIKELANALYSE

Die Untersuchung negativ gefärbter, einzelner Proteinmoleküle im Elektronenmikroskop ist wegen der geringen benötigten Menge Protein ein gutes Werkzeug, um die Qualität einer Proteinprobe hinsichtlich ihrer Homogenität und Verwendbarkeit für Bildrekonstruktionsverfahren abzuschätzen. In einigen wenigen Fällen hat die Analyse von Einzelpartikeln, negativ gefärbt oder in Eis eingebettet, zur 3D-Struktur von Membranproteinen im Auflösungsbereich von 20 bis 30 Å geführt (Grigorieff, 1998; Sato, 1998). Vorteilhaft war in diesen Fällen, daß sich das Protein mit einer bevorzugten Orientierung auf dem EM-Trägernetz niederließ, woraus unmittelbar auf die Molekülsymmetrie geschlossen werden konnte.

Bei der Analyse des GluRB läßt sich keine bevorzugte Orientierung feststellen (siehe Abb. 4.36). Die solubilisierten Rezeptoren nehmen auf dem EM-Trägernetz verschiedene Positionen ein und führen zu einem heterogenen Aussehen der Probe. Einige ringförmige Partikel könnten als Ansichten des Membranproteins von der extra- oder intrazellulären Seite gedeutet werden, wobei der Eindruck einer zentralen Pore durch das Eindringen von Färbemittel in den Ionenkanal entsteht (Markierungen 1 in Abb. 4.36). Längliche Partikel sind möglicherweise Seitenansichten des Glutamatrezeptors (2). Ein das Partikel umschließender Quader hat Kantenlängen von etwa 12,5 x 15 x 17 nm. Des Weiteren sind einige Gebilde zu sehen, die wegen ihrer Größe aggregiertes Protein darstellen könnten (3). Der Anteil dieser Aggregate schwankte mit der Präparation, war in der Regel aber gering. Einige kleinere Strukturen (4) könnten unvollständig

oligomerisierte Ionenkanäle sein. Sowohl Aggregate als auch unvollständige Oligomere leisten aber keinen signifikanten Beitrag zur Population der Partikel, was später auch mittels SEC gezeigt werden konnte(vgl. Kap. 4.2.3.1).

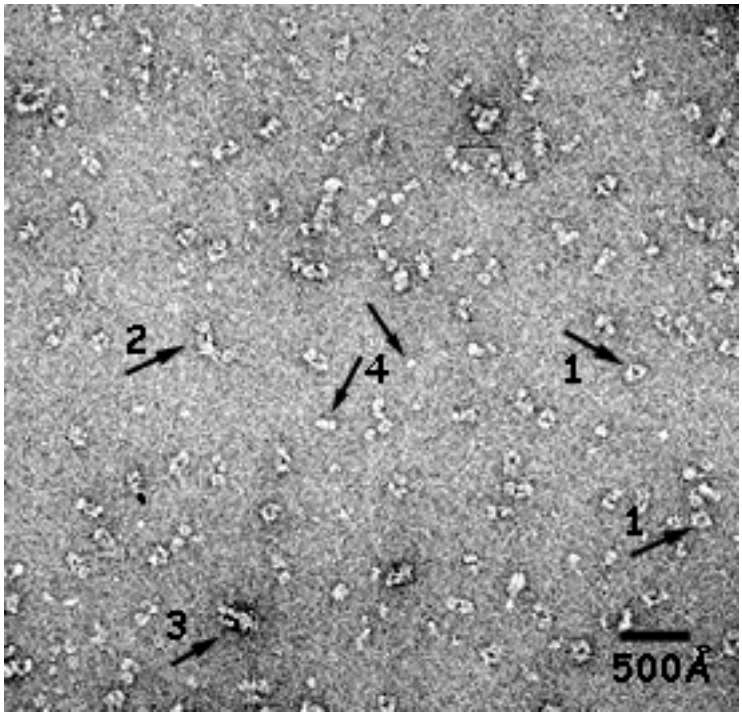


Abb. 4.36: Uranylacetatgefärbte Probe von GluRB-Einzelpartikeln[23], solubilisiert in Triton X-100 bei 125000facher Vergrößerung. Die Bedeutung der Markierungen wird im Text erläutert, eine Vorstellung von der Größe der Partikel vermittelt der Balken rechts unten.

Mehrere tausend Einzelpartikel werden derzeit verwendet, um eine 3D-Rekonstitution zu erstellen. Dies ist allerdings nicht Gegenstand vorliegender Arbeit und wird lediglich in der Diskussion (Kap. 5.3) noch einmal aufgegriffen.

4.2.3. HYDRODYNAMISCHE EIGENSCHAFTEN DES GLURB

Bislang ist die Frage nach der oligomeren Zusammensetzung der ionotropen Glutamatrezeptoren noch nicht beantwortet. Bisherige Untersuchungen legen eine Tetramerisierung (Mano, 1998; Rosenmund, 1998) oder Pentamerisierung (Wenthold, 1992; Ferrer-Montiel, 1996; Wu, 1996; Premkumar, 1997; Hawkins, 1999) der Untereinheiten nahe. Bei NMDA-Rezeptoren machen pharmakologische Untersuchungen eine tetramere Struktur wahrscheinlich (Kuryatov, 1994; Laube, 1997), entsprechende Hinweise fehlen jedoch für die non-NMDA-Rezeptoren.

[23]Die hier gezeigte Aufnahme wurde von Frau Cissé und Dr. Tichelaar erstellt.

4.2.3.1. GRÖSSENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE

Bei dieser auch Gelfiltrationschromatographie genannten Methode werden Moleküle nach ihrer Größe und Form getrennt. Die stationäre Phase besteht aus Kügelchen mit konstanter Porenweite. Dies hat die Wirkung eines Molekularsiebs. Moleküle, deren Größe die Porenweite überschreitet, werden vom Lösungsvolumen in den Kügelchen ausgeschlossen und eluieren alle im Ausschlußvolumen. Andere Moleküle werden umso langsamer eluiert, je kleiner sie sind. Bei der Untersuchung des Glutamatrezeptors erlaubt dieses Verfahren neben der Bestimmung des Molekulargewichtes auch eine Beurteilung der Homogenität des Proteins, insbesondere möglicher Aggregation, da sich diese in einem Proteinpeak im Ausschlußvolumen äußert.

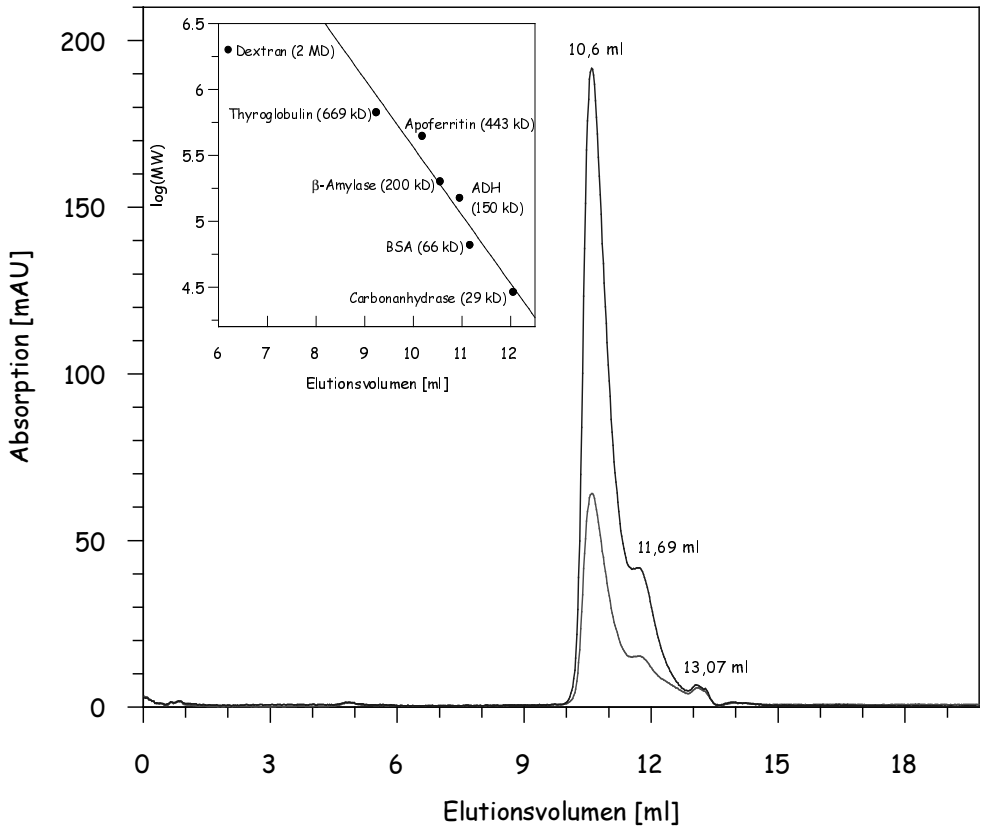


Abb. 4.37: Elutionsprofil von mit Triton X-100 solubilisiertem GluRB (12 μg) nach Gelfiltration auf einer TSK G4000SW$_{XL}$. Das Protein wurde nach der Elution von der M1-Antikörpersäule auf 120 μg/ml aufkonzentriert und ohne weitere Dialyse verwendet. Flußrate 1 ml/min in TBS pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % TX-100. Gezeigt sind die Absorptionskurven bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Im kleinen Fenster ist die Kalibrierung der Säule durch verschiedene Standardproteine wiedergegeben.

Das Membranprotein eluiert als ein einzelner Peak von einer TSK-Säule, welcher auf der niedermolekularen Seite zwei kleine Schultern besitzt. Diese Schultern waren nicht in allen Präparationen wegen der zum Teil etwas geringeren Auflösung zu erkennen. Der Rezeptor scheint

also im Wesentlichen aus einer Spezies zu bestehen, die Schultern könnten auf unvollständig oligomerisierte Kanäle hindeuten (vgl. Pfeil 4 in Abb. 4.36). Signifikante Beiträge von Fremdproteinen sind wegen der hohen Reinheit der Probe, nachgewiesen im silbergefärbten SDS-Gel (vgl. Abb. 4.35), unwahrscheinlich.

Insbesondere wichtig ist der Befund, daß im Durchbruchvolumen, bei der verwendeten TSK-Säule etwa 5 ml, kein Protein detektiert wird. Damit ist auszuschließen, daß sich GluRB-Untereinheiten unter den Bedingungen des Reinigungsprotokolls unkontrolliert zu Aggregaten zusammenlagern, mit denen eine Strukturbestimmung nicht möglich wäre. Das Elutionsprofil deutet auf ein überwiegend homogenes Membranprotein hin, das sich vollständig in solubilisiertem Zustand befindet.

Berechnet man anhand der Elutionsvolumina der Standardproteine das Molekulargewicht des Ionenkanals, so erhält man statt einer Masse von 400 - 600 kD, die man für einen tetra- oder pentameren GluRB-Kanal mit einer Detergenzmizelle um den hydrophoben Membranbereich erwartet, nur eine Molmasse von 215 ± 30 kD. Dies könnte auf eine Dimerisierung der GluRB-Untereinheiten hindeuten. Diese Masse wäre aber etwas zu gering, da eine Triton X-100-Mizelle mit mindestens 60 kD berücksichtigt werden sollte (Robson, 1977; Goldston, 1998) und somit ein Dimer wenigstens eine Molmasse von 270 kD haben müßte. Die Massen der Schultern berechnen sich zu nur 81 bzw. 11 kD, können dann also keinesfalls GluRB sein.

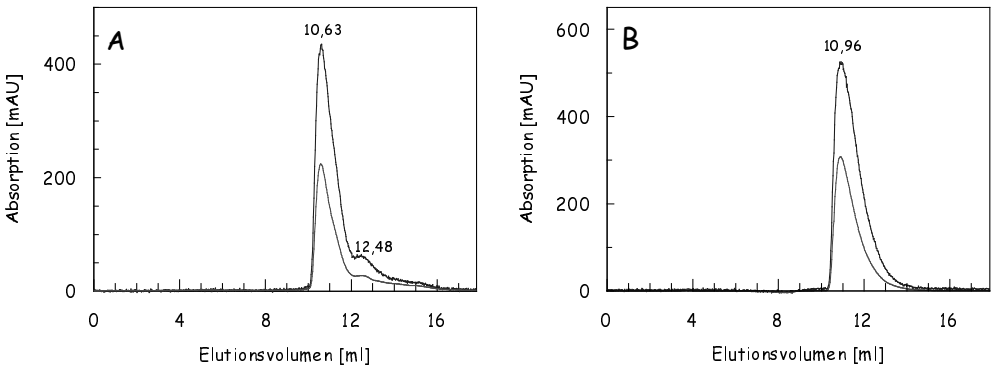


Abb. 4.38: Elutionsprofile von mit Triton X-100 solubilisierten GluRB-Proben nach Gelfiltration auf einer TSK G4000SW$_{XL}$. Das Protein für die Versuche stammt aus derselben Präparation, liegt in A aber wie zuvor in 500 mM NaCl, in B dagegen in nur 50 mM NaCl vor. Flußrate 1 ml/min, Laufpuffer TBS, 500 mM NaCl, 10 % Glyzerin, 0,1 % TX-100 (A) sowie ohne NaCl (B). Gezeigt sind die Absorptionskurven bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot).

Es erscheint wahrscheinlicher, daß das Membranprotein entweder über die Detergenzmizelle oder direkt über seine große hydrophobe Domäne mit dem Silicagel der Säule in anderer Weise interagiert, als dies die durchweg löslichen Standardproteine tun. Möglich sind dabei ein größe-

rer Einfluß hydrophober Wechselwirkungen beim Membranprotein, die dessen Elution verlangsamt (Laue, 1990), oder Einwirkungen des Detergenzes. Um hierüber eine Vorstellung zu erhalten, wurde die Chromatographie unter Ausschluß von NaCl durchgeführt, was die hydrophoben Wechselwirkungen verringert, dagegen die elektrostatischen erhöht (Abb. 4.38). Das Elutionsvolumen von GluRB wurde dabei leicht vergrößert. Offensichtlich sind es nicht hydrophobe, sondern andere Wechselwirkungen, die für das niedrige Molekulargewicht des Membranproteins verantwortlich sind.

Die Abweichung könnte auch auf Unterschiede in der äußeren Form der Proteine zurückgehen. Während die Standardproteine globuläre Proteine sind, ist dem Glutamatrezeptor, analog zum Acetylcholinrezeptor, eher eine zylindrische Form zuzurechnen, was auch die vorläufige 3D-Rekonstruktion zu bestätigen scheint (Tichelarr, W., Madden, D. R., unveröffentlicht). Dies kann zu einem anderen Elutionsverhalten führen, allerdings ist eine derartige Abweichung vom theoretischen Molekulargewicht wie hier beobachtet schwer vorstellbar (Ackers, 1970). Nicht auszuschließen ist außerdem ein Zerfall des oligomeren GluRB während der Chromatographie in dimere Einheiten. Die Tatsache, daß das Protein überwiegend als eine einzige Spezies eluiert, würde dann eher auf eine ursprünglich tetramere denn eine pentamere Zusammensetzung hindeuten. Ein möglicherweise leicht eintretender Zerfall in Dimere aus höheren Oligomeren, höchstwahrscheinlich Tetrameren, wird auch durch STEM-Untersuchungen unterstützt (siehe Kap. 4.2.3.3). Eine weitere Erklärung, nach der das Protein bereits als Dimer in den Insektenzellen exprimiert wird bzw. während der Aufreinigung in ebensolche zerfällt, scheint aber aufgrund der Ergebnisse von Dichtegradienten (siehe 4.2.3.2) und Vernetzungsversuchen sowie 3D-Rekonstruktion (siehe Kap. 5.3) nicht zuzutreffen.

Bei zwei weiteren getesteten Gelfiltrationssäulen konnten die hier beschriebenen Ergebnisse im Wesentlichen bestätigt werden. Auch bei Verwendung von Sephacryl- bzw. Superdex-Material zeigt das Protein ein zu geringes Molekulargewicht (Abb. 4.39).

Bei Sephacryl S-300 ergibt sich für das Hauptsignal ein Molekulargewicht von 240 kD, das kleine niedermolekulare Signal errechnet sich zu 64 kD. Bei Verwendung einer Superdex 200-Säule ergeben sich Molekulargewichte von nur 145 kD bzw. 72 kD. Die Schwankungen sind also bei den verschiedenen hydrophilen Materialien beträchtlich. Lediglich das Erscheinungsbild des Proteins, ein Hauptsignal gefolgt von 1-2 niedermolekularen Signalen, wird in allen drei Fällen beobachtet. Insofern kommt der Größenausschlußchromatographie Bedeutung wohl nur bei der Beurteilung der Homogenität der Probe zu, die Ergebnisse einer Molekulargewichtsbestimmung sind dagegen mit Vorsicht zu bewerten.

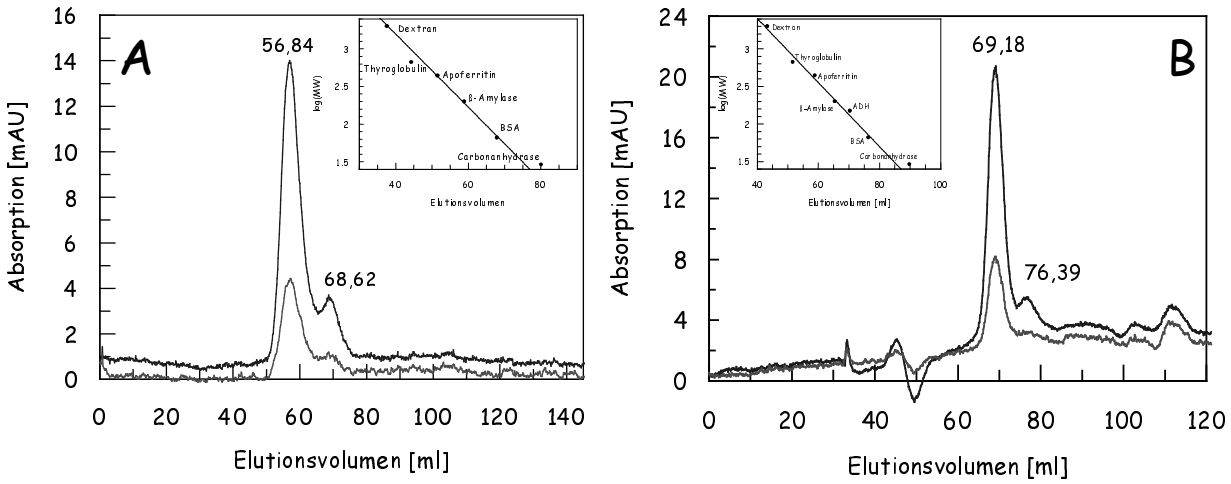


Abb. 4.39: Elutionsprofil von GluRB, solubilisiert in Triton X-100, nach Gelfiltration auf einer HiPrep Sephacryl S-300 (A) und einer HiLoad Superdex-200 (B). Flußrate 1.2 ml/min, Laufpuffer wie in Abb. 4.37. Gezeigt sind die Absorptionskurven bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). In den kleinen Fenstern sind die Kalibrierungen der Säulen durch verschiedene Standardproteine wiedergegeben.

4.2.3.2. ZONALE ULTRAZENTRIFUGATION

Bei der zonalen Ultrazentrifugation wird eine Lösung von Makromolekülen vorsichtig auf die Oberfläche eines Dichtegradienten geschichtet. Dieser ermöglicht eine unabhängige Wanderung verschiedener makromolekularer Komponenten und verhindert Durchmischung der Probe durch Konvektion. Der Gradient wurde durch ein Konzentrationsgefälle der biochemisch kompatiblen Substanzen Sukrose und Glyzerin erzeugt.

	[^{3}H]-AMPA-Bindung [pmol/mg GluRB]
GluRB in 10 % Glyzerin	468 ± 10
GluRB in 30 % Glyzerin	461 ± 25

Tab. 4.9: [^{3}H]-AMPA-Bindung von GluRB in Abhängigkeit der Glyzerinkonzentration. Das Protein ist solubilisiert in TBS, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 sowie der angegebenen Glyzerinkonzentration. Die Messung fand bei 5 nM [^{3}H]-AMPA statt.

Im Gegensatz zur Gelfiltration werden bei dieser Analysemethode die Proteine nur auf der Basis ihrer molekularen Massen aufgetrennt. Die äußere Form der Moleküle spielt keine Rolle. Außerdem wird zur Auftrennung der Proteingemische keine Matrix benötigt, die schwer vorherzusagende Wechselwirkungen verursachen kann. Der einzige Unterschied hinsichtlich des Puffers, in dem GluRB gewöhnlicherweise isoliert und aufbewahrt wird, liegt in der Anwesenheit er-

höhter Konzentrationen von Sukrose oder Glyzerin. Es konnte im Vorfeld der Dichtezentrifugationen mittels Ligandenbindungsexperimenten jedoch gezeigt werden, daß eine Glyzerinkonzentration von 30 % keinen negativen Einfluß auf die Aktivität von GluRB hat (siehe Tab. 4.9). Es darf daher angenommen werden, daß unter den Bedingungen der Dichtezentrifugation die Funktionalität und Zusammensetzung des Proteins gewahrt bleiben.

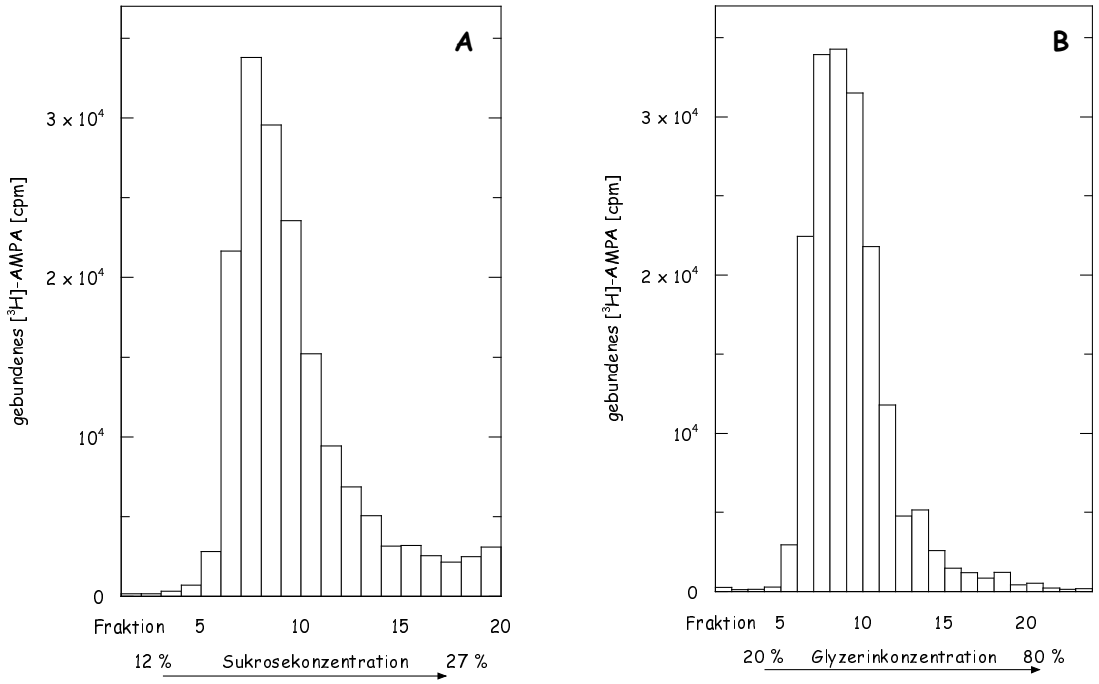


Abb. 4.40: Elutionsprofile von zonalen Ultrazentrifugationen mit aufgereinigten Proben von GluRB in einem (A) Sukrose- bzw. (B) Glyzerin-Dichtegradienten. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert und die Ligandenbindungsaktivität in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

Die Verteilung der Bindungsaktivität ist in beiden Gradienten sehr ähnlich. Im Wesentlichen besteht sie aus einem Hauptsignal, das auf der Seite des höheren Molekulargewichts etwas breiter ist als auf der niedermolekularen Seite. Die Radioaktivität nimmt nach beiden Seiten schnell ab und stabilisiert sich im Sukrosegradienten zu höheren Dichten hin bei etwa 10 % des Maximums, im Glyzeringradienten sogar bei weniger als 1 %. Dieser Unterschied kann mit der Präparation des Proteins erklärt werden: Bei der Probe in A handelt es sich um ein Protein aus einer älteren Präparation, wo einige der später eingeführten Verbesserungen noch nicht umgesetzt waren. Das Protein in B wurde dagegen mit der in dieser Arbeit beschriebenen Aufreinigungsmethode isoliert. Die geringe Bindungsaktivität bei hohen Sukrose- bzw. Glyzerinkonzentrationen ist außerdem ein weiterer Hinweis auf die Abwesenheit von Protein-Aggregaten, wie dies schon bei der Gelfiltrationschromatographie beobachtet wurde. GluRB

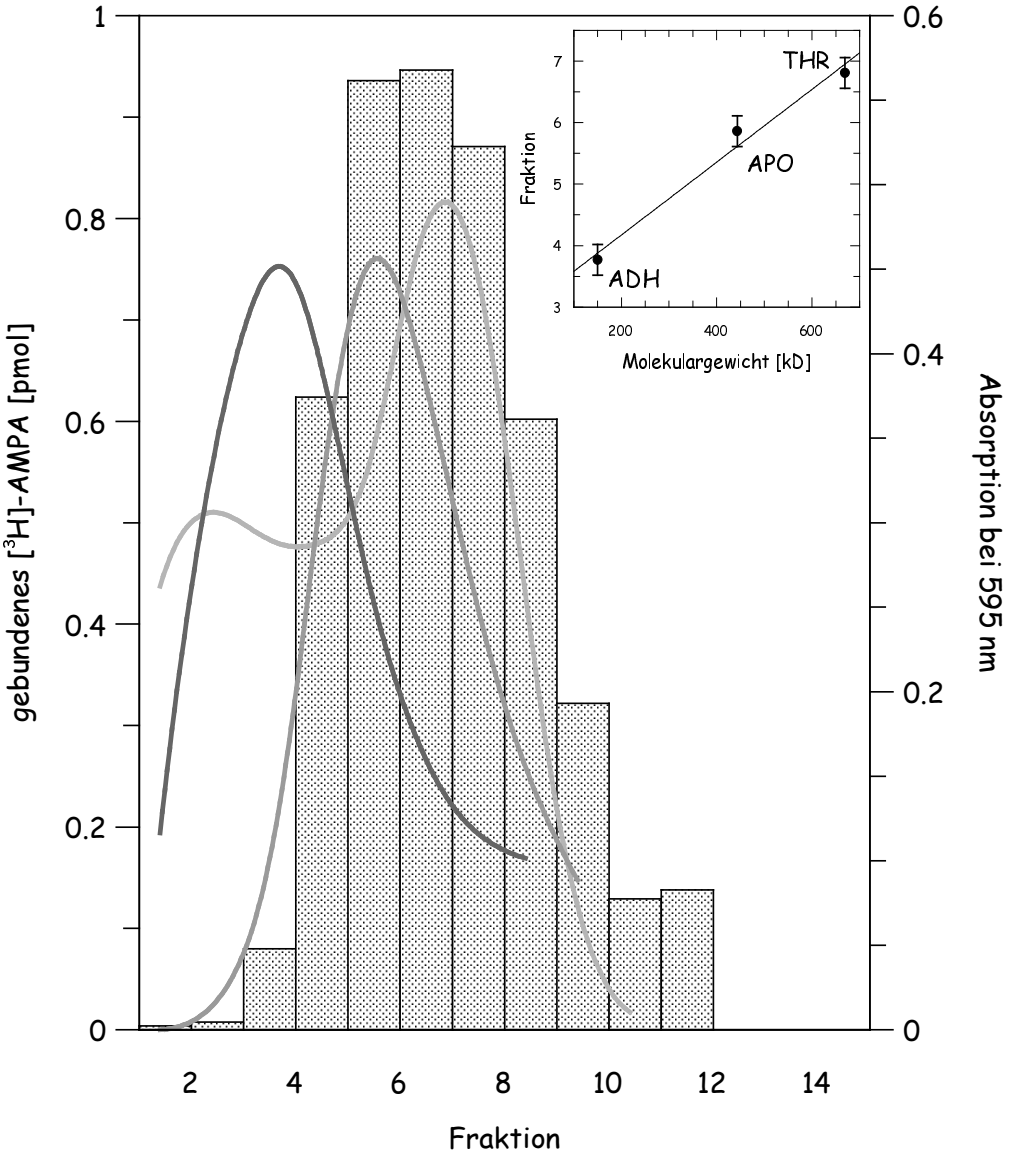


Abb. 4.41: Kalibrierung des Glyzeringradienten mit Thyroglobulin (669 kD, hellblaue Linie), Apoferritin (443 kD, grün) sowie Alkoholdehydrogenase (150 kD, magenta). Die Standards wurden nach Ablauf der Dichtezentrifugation mittels Bradford-Konzentrationsbestimmung in den Fraktionen detektiert (Werte der rechten Ordinate). Durch [^{3}H]-AMPA-Bindung wurde GluRB detektiert (links) und als Histogramm dargestellt. Die Verteilungsmaxima wurden durch Gaußnäherungen der Kurven bestimmt. Die aus der Lage der drei Standardproteine ermittelte Ausgleichsgerade ist im kleinen Fenster gezeigt.

wandert im Sukrosegradienten bis zu einer Konzentration von etwa 17 %, die Dichte an dieser Stelle des Gradienten beträgt 1.071 g/ml. Im Glyzeringradienten findet sich das Protein bei etwa

35 %, hier ist die Dichte mit 1.09 g/ml nur geringfügig höher[24]. Damit ist davon auszugehen, daß es sich in beiden Fällen um dasselbe Protein handelt, bzw. sich GluRB in beiden Lösungen ähnlich verhält.

Um aus der beobachteten Aktivitätsverteilung das Molekulargewicht des Proteins berechnen zu können, wurde ein analoger Dichtegradient mit Standardproteinen kalibriert (Abb. 4.41). Die Korrelation zwischen Molekulargewicht des Standards und seiner Lage im Konzentrationsgradienten war dabei hoch. Das Molekulargewicht des solubilisierten Ionenkanals inklusive der Detergenzmizelle berechnet sich mittels linearer Regression zu 495 kD. Dies liegt in der Nähe des theoretischen Molekulargewichts eines tetrameren Ionenkanals, dessen Molmasse sich aus ca. 420 kD der Untereinheiten und einer Detergenzmizelle von etwa 60-90 kD zusammensetzt. Aufgrund der breiten Verteilung des Rezeptors im Gradienten sollte allerdings von einer Ungenauigkeit von etwa 50 kD ausgegangen werden, wenn man Volumenfehler angemessen berücksichtigt. Dennoch erscheint die Möglichkeit, daß es sich bei dem untersuchten Protein um ein Pentamer handelt, dessen theoretisches Molekulargewicht 580-610 kD beträgt, eher gering. Auch niederoligomere Zusammensetzungen werden durch die Molmassenbestimmung mittels Dichtezentrifugation nicht favorisiert. Damit wird auch die Interpretation der aus der Größenausschlußchromatographie (4.2.3.1) erhaltenen Resultate als GluRB-Dimersignale unwahrscheinlich. Eher scheinen dort also Wechselwirkungen mit der Matrix ursächlich für das beobachtete Molekulargewicht zu sein.

4.2.3.3. STEM-MESSUNGEN

Das *Scanning Transmission Electron Microscope* (STEM) ist ein im Transmissionsmodus arbeitendes Rasterelektronenmikroskop. Ein fokussierter Elektronenstrahl wird über das Präparat gerastert, und die transmittierten Elektronen werden detektiert. Die Berechnung der elastisch gestreuten Elektronen erlaubt die Massenbestimmung von Makromolekülen (Engel, 1978; Wall, 1986).

Da Metallionen starke Elektronenstreuungen verursachen, was die Berechnung verfälscht, muß das Protein nach der Applikation auf das Trägernetz zur Entfernung der Puffersalze mehrfach mit H_2O gewaschen werden. Außerdem sollte die Konzentration des schwer flüchtigen Glyze-

[24] Die Werte sind entnommen dem *Handbook of Biochemistry*, CRC, 2nd Edition, 1970 sowie dem Merck-Index, Merck & Co., Inc., 9th Edition, 1976. Es handelte sich um Angaben für wäßrige Lösungen, die hier für den verwendeten Puffer übernommen wurden.

rins möglichst gering gehalten werden, da sein Verbleib in der Probe ebenfalls zu Überschätzungen des Molekulargewichtes führt. Nicht alle Proteine überstehen diese Prozedur ohne Schaden, beispielsweise einem Zerfall von Oligomeren in die Untereinheiten. Alternativ bietet sich das Waschen mit einer Lösung eines flüchtigen Salzes anstelle von H_2O oder eine Quervernetzung oligomerer Protein an (Müller, 1992). Auch beim Glutamatrezeptor, der nach der Aufreinigung in einem Tris-Puffer mit 500 mM NaCl, 10 % Glyzerin und 0,1 % Triton X-100 aufbewahrt wird, mußten derartige Folgen befürchtet werden.

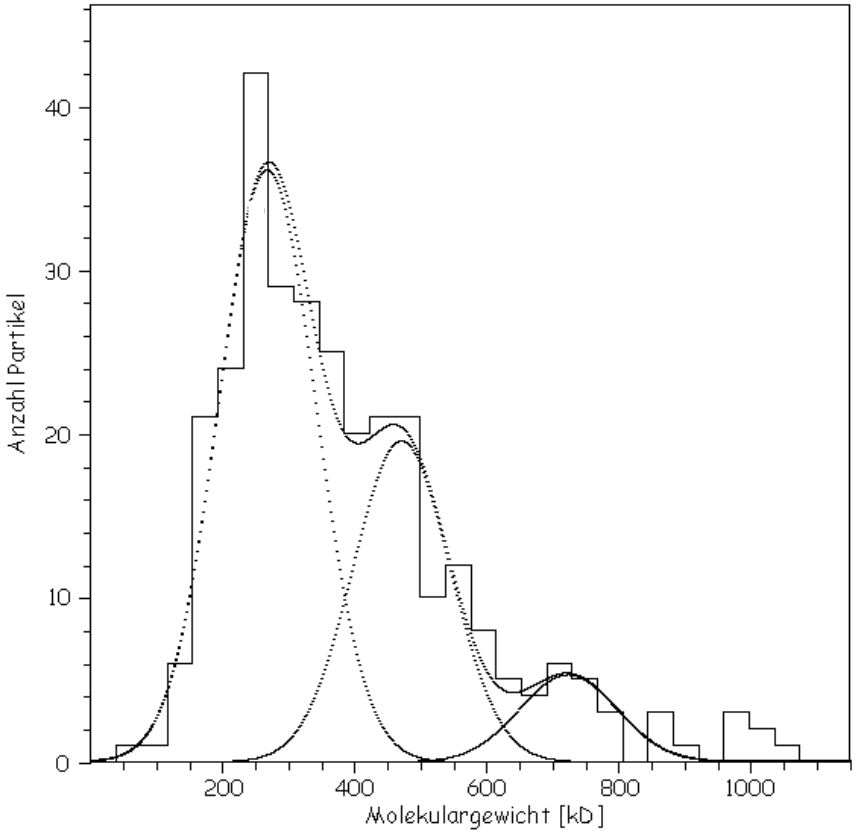


Abb. 4.42: Rohdaten der Massenanalyse von GluRB in 25 mM Tris pH 7,4, 20 mM NaCl, 0,4 % Glyzerin, 0,33 % Triton X-100. Das EM-Trägernetz wurde zum Entfernen des Salzes und des Glyzerins 5 mal in H_2O gewaschen. Das Histogramm enthält Daten von 303 Partikeln, die Abbildungen wurden im Dosisbereich von 321 ± 21 e/nm^2 aufgenommen. Die Korrektur des strahlinduzierten Massenverlustes wurde durch Extrapolation auf eine Dosis von Null Elektronen pro nm^2 ermittelt. Hierdurch ergeben sich Molekulargewichte von 266, 469 und 722 kD. Die Standardabweichung beträgt 74 kD.

In einem ersten Experiment wurde der solubilisierte Glutamatrezeptor aus einer konzentrierten Lösung in einer Weise verdünnt, die die Salzkonzentration auf 20 mM, die Detergenzkonzentration auf 0,33 % und die Glyzerinkonzentration auf 0,4 % erniedrigte. Nach der Applikation auf das Trägernetz wurde mehrfach mit H_2O gewaschen und die Probe gefriergetrocknet. Die

Gefriertrocknung der Probe entfernt das Lösungsmittel und verhindert gleichzeitig Deformationen der Proteinpartikel durch Oberflächenspannungseffekte.

Die Analyse dieser Probe zeigte für etwa zwei Drittel der Partikel ein Molekulargewicht von deutlich unter 400 kD. Für das einzige gut definierte Maximum ergab sich ein für Massenverlust korrigiertes Molekulargewicht von 266 kD. Andere Maxima ließen sich nur ungenau festlegen. Eine Näherung mit 3 Gaußkurven lieferte weitere Molmassen von 469 und 722 kD, welche aus 28 bzw. 8 % der Partikel errechnet werden.

In einem ähnlichen Experiment wurde die Proteinprobe nicht mit reinem Wasser, sondern mit 100 mM Ammoniumacetatlösung gewaschen (Abb. 4.43). NH_4OAc verhindert ebenso wie NaCl elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen, ist aber ein flüchtiges Salz und wird daher bei der anschließenden Gefriertrocknung entfernt.

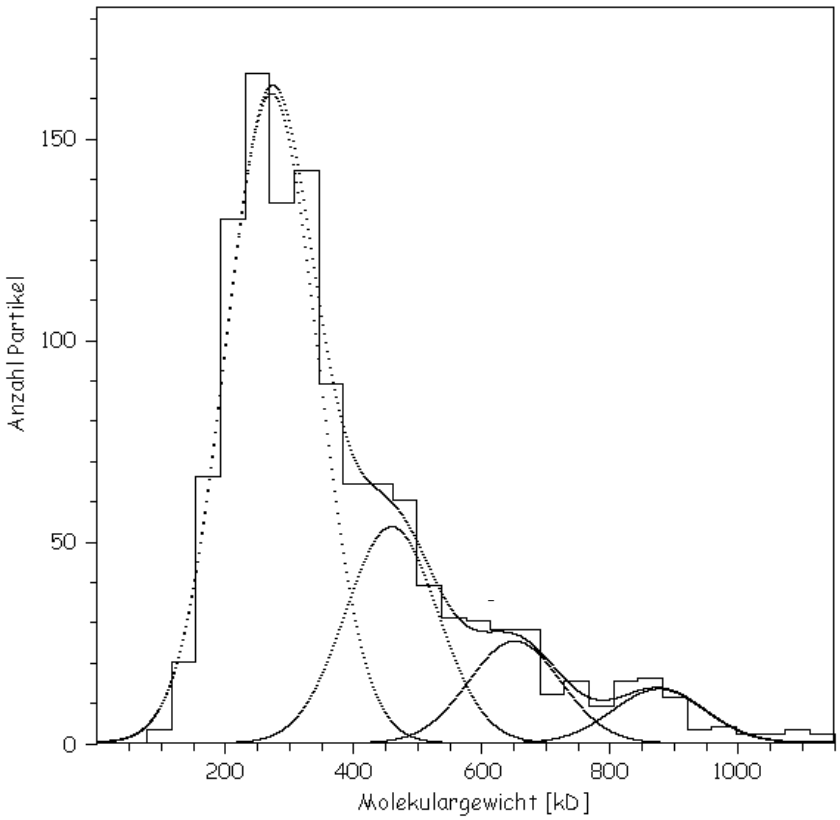


Abb. 4.43: Rohdaten der STEM-Analyse von GluRB im gleichen Puffer wie zuvor, diesmal jedoch vor der Gefriertrocknung mit Ammoniumacetat gewaschen. 1188 Partikel wurden für die Erstellung des Histogramms verwendet, die Elektronendosis betrug 348 ± 29 e/nm^2. Die Massenkorrektur erfolgte wieder durch Extrapolation auf eine Dosis von Null, woraus sich Molekulargewichte von 270, 458, 650 und 875 kD ergeben. Die Standardabweichung beträgt 72 kD.

Diesmal zeigt sich noch deutlicher, daß lediglich ein Maximum hinreichend genau lokalisiert werden kann. Es handelt sich um ein Signal bei 270 kD, zu dem etwa 75 % aller Partikel beitragen. Unter Verwendung von 4 Gaußfunktionen zur Näherung des Histogramms werden weitere höhermolekulare Signale zu 458, 650 und 875 kD berechnet.

Beide Auswertungen ergeben ähnliche Resultate und zeigen im Wesentlichen Proteinkomplexe einer Masse knapp unter 270 kD. Dies würde auf einen lediglich dimeren Komplex des GluRB hindeuten, wobei die beiden Untereinheiten durch eine 60 bis 70 kD schwere Detergenzmizelle umgeben wären (Robson, 1977; Goldston, 1998). Höhermolekulare Partikel sind zwar vorhanden, ihre Anzahl ist jedoch relativ gering, und die entsprechenden Molekulargewichte sind schlecht definiert. Durch die Substitution des NaCl mit NH_4OAc beim Waschen der Probe kann kein stabilisierender Effekt erzielt werden. Eine wichtige Frage ist jetzt, ob das beobachtete Molekulargewicht das Resultat eines Zerfalls der Oligomere auf dem Trägernetz darstellt oder das Protein schon in solubilisierter Form als Dimer vorlag.

Um diesem Zerfall beim Auswaschen von Salz, Glycerol und Detergenz vorzubeugen, wurde das Protein vor der Applikation auf das Trägernetz und dem nachfolgenden Waschen für die Dauer von 20 min mit 10 mM Glutaraldehyd fixiert. Dies sollte intramolekulare Amidgruppen vernetzen und so die Untereinheiten eines Komplexes unter den Bedingungen des Experiments irreversibel miteinander verbinden. Dabei wurde eine Proteinkonzentration von 40 µg/ml nicht überschritten, um die Gefahr der Brückenbildung zwischen Oligomeren gering zu halten. Parallel in der Arbeitsgruppe durchgeführte Quervernetzungsexperimente (Huse, N., Tichelaar, W., unveröffentlicht) machen es zum gegenwärtigen Zeitpunkt aber noch nicht möglich, eine solche Vernetzung von Oligomeren völlig auszuschließen.

Das durch die Fixierung erhaltene Resultat (Abb. 4.44) unterscheidet sich von den bisherigen, wenngleich eine Interpretation der Ergebnisse weiterhin schwerfällt. Die Anzahl höhermolekularer Partikel ist aber nach der Fixierung deutlich erhöht und deren Molekulargewichte merklich besser definiert als zuvor.

Im Wesentlichen ergeben sich drei Maxima. Das höchste Signal liegt weiterhin bei einem Molekulargewicht von unter 300 kD. Die geringfügig höhere Masse von 294 kD im Vergleich zu den zuvor berechneten knapp 270 kD könnte dabei zwei Ursachen haben. Zum einen gebundenes Glutaraldehyd, wobei nicht klar ist, wieviele der zahlreichen Lysin-Seitenketten des GluRB (insgesamt 62) tatsächlich zugänglich sind, zum anderen die Nebenreaktion des Glutaraldehyds mit dem zum Waschen verwendeten NH_4OAc. 48 % der ausgewählten Partikel tragen zu diesem Signal bei. Die weiteren Maxima werden von 33 % bzw. 15 % der Partikel gebildet. Sie

entsprechen Molekulargewichten von 507 bzw. 719 kD. Dies kann durch das Vorliegen von in Triton X-100 solubilisierten Tetrameren - 420 kD aus den Untereinheiten sowie der Detergenzmizelle[25] - und geringen Mengen weiterer höherer Aggregate erklärt werden. Hinweise auf das Vorliegen pentamerer Komplexe gibt es dagegen nicht.

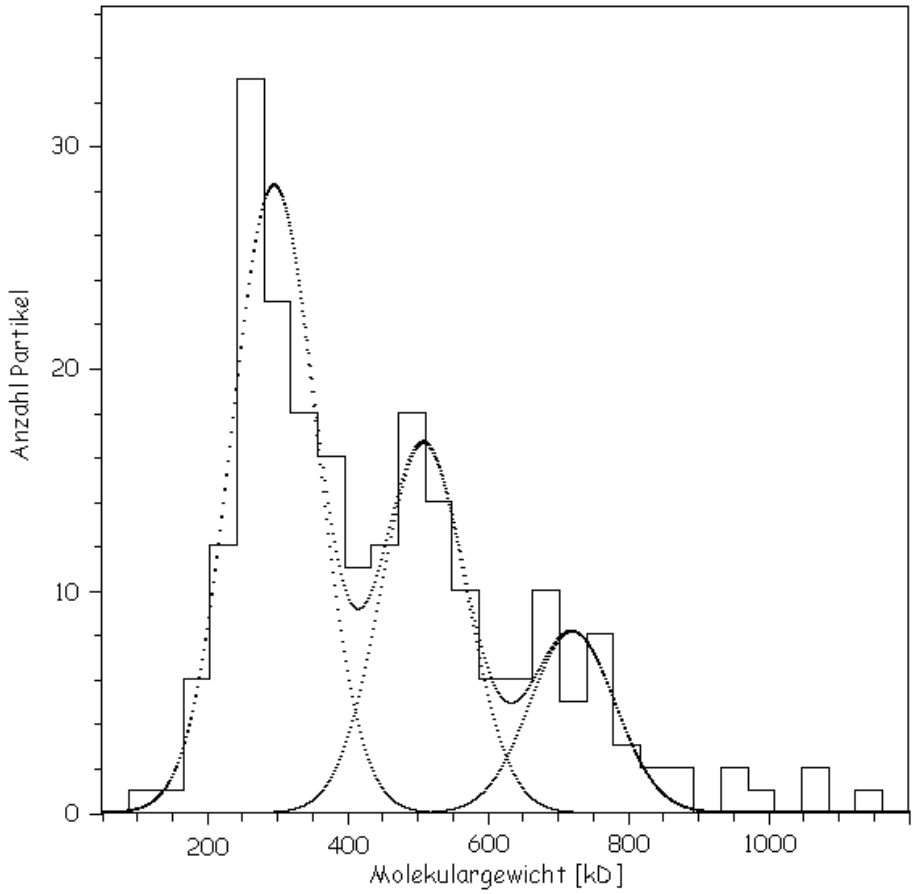


Abb. 4.44: Rohdaten der Massenberechnung von Glutaraldehyd-fixiertem GluRB. Für die Analyse wurden 223 in ihren Umrissen gut definierte Partikel verwendet. Die Elektronendosis lag bei 359 ± 9 e/nm^2, eine Massenkorrektur erfolgte wie beschrieben. Die Molekulargewichte ergaben sich zu 294, 507 und 719 kD. Die Standardabweichung beträgt 61 kD.

Der erhöhte Anteil der Tetramere in der Probe kann als Folge der Fixierung gedeutet werden. Das hierfür errechnete Molmasse von 507 kD stimmt gut mit demjenigen von 495 kD aus dem Dichtegradienten (siehe 4.2.3.2) überein. Die Vernetzungsbedingungen sind aber nicht derart, daß alle Kanäle gleichmäßig in einer tetrameren Form fixiert würden. Dies entspräche auch

[25] Das Molekulargewicht der Tritonmizelle wird stets mit 60 bis 90 kD angenommen (Robson, 1977; Goldston, 1998), unabhängig davon, in welchem oligomeren Zustand sich das Membranprotein befindet. Möglicherweise ist die Mizelle eines Dimers kleiner als diejenige eines Tetramers, es existieren hierüber jedoch keine Angaben.

Beobachtungen in den bereits angesprochenen Quervernetzungsexperimenten (Huse, N., Tichelaar, W., unveröffentlicht) wo es mit Glutaraldehyd nicht gelang, unter reduzierenden Bedingungen GluRB als eine einzige oligomere Spezies zu beobachten.

Verglichen mit den Ergebnissen aus der Gelfiltration und der Dichtezentrifugation, wo eine homogene Molekulargewichtsverteilung des solubilisierten Proteins nachgewiesen werden konnte, zeigt sich hier eine solche nicht. Offenbar ist unter den Bedingungen der Probenpräparation für die STEM-Analyse das Protein nicht in dem oligomeren Zustand zu halten, den es in solubilisierter Form einnimmt. Zumindest teilweise kommt es augenscheinlich auch nach Reaktion mit Glutaraldehyd zu einem Zerfall des Komplexes, was auf unvollständige Fixierung hindeutet. Die signifikante Ausbildung von Tetrameren bei der Fixierung läßt jedoch den Schluß zu, daß sich GluRB in den quervernetzten STEM-Präparaten vorwiegend in dimeren und bzw. oder tetrameren Komplexen befindet. Wünschenswert wäre es in jedem Fall, die Quervernetzungsexperimente, die derzeit auch mit anderen Fixierungsmitteln durchgeführt werden, so zu optimieren, daß das Verhalten des GluRB besser interpretiert werden kann. Gelänge es, Vernetzungsbedingungen zu finden, nach denen solubilisierter GluRB als eine einzige Bande in einem SDS-Gel erscheint, würden sich die gegenwärtigen Fragen möglicherweise beantworten lassen.

4.2.4. REKONSTITUTIONSVERSUCHE

Die Rekonstitution von Membranproteinen in Phospholipidvesikel zur Bildung funktioneller Proteoliposomen oder zweidimensionaler Proteinkristalle bietet gute Möglichkeiten, deren Funktion und Struktur zu untersuchen (Stephens, 1997; Hasler, 1998; Knol, 1998; Lambert, 1999; Williams, 1999; Zhuang, 1999). Zum einen befinden sich die Proteine in einer Lipidumgebung, die ihrem *in vivo*-Zustand näher kommt als Detergenzmizellen. Zudem werden Schwierigkeiten vermieden, wie sie durch die Untersuchung komplexer nativer Membranen oder Wechselwirkungen mit anderen Membranbestandteilen entstehen (Rigaud, 1995).

Für den Glutamatrezeptor würde eine funktionelle Rekonstitution mehrere Möglichkeiten eröffnen. Die Aktivität des Proteins könnte nicht nur hinsichtlich seiner Ligandenbindungsaktivität, sondern auch elektrophysiologisch über seine Kanaleigenschaften nachgewiesen werden. Dies wäre zudem der Nachweis einer vollständigen Oligomerisierung, wie er auf biochemischem Wege nur schwierig zu führen ist (vgl. Kap. 4.2.3).

Die zahlreichen Positionen des solubilisierten Glutamatrezeptors, die das Protein in negativ gefärbten elektronenmikroskopischen Proben annimmt (vgl. Abb. 4.36), machen eine umfang-

reiche 3D-Rekonstruktion notwendig. Eingebettet in eine Lipiddoppelschicht auf dem EM-Trägernetz hätte das Protein möglicherweise eine bevorzugte Orientierung, die die Rekonstitution vereinfachen könnte. Gelänge es schließlich, das Protein in großen Mengen in die Vesikel zu integrieren, könnte es im günstigsten Fall zu einer spontanen 2D-Kristallisation kommen (Zhuang, 1999).

4.2.4.1. STRATEGIEN FÜR MEMBRANPROTEIN-REKONSTITUTIONEN

Die verschiedenen Methoden, mit denen bisher Membranproteine in Liposomen inkorporiert werden konnten, lassen sich in drei Gruppen zusammenfassen. Zunächst gibt es Beispiele für eine durch organische Lösungsmittel vermittelte Insertion (Darszon, 1979; Rigaud, 1983), was direkt zu sehr großen, für elektrophysiologische Versuche geeigneten Liposomen führt. Da allerdings solubilisierter GluRB bei der Anwesenheit von Methanol erniedrigte Bindungsaktivität zeigt (siehe Abb. 4.32) und es Möglichkeiten der Erzeugung großer Liposomen auf anderem Wege gibt (Correa, 1988; Keller, 1988; Riquelme, 1990), wurde von einer Anwendung dieser Methode in vorliegender Arbeit abgesehen.

Vielversprechender erschienen Rekonstitutionen, die auf der Entfernung des Detergenzes aus einer Protein-Lipid-Mischung beruhen. Für Membranproteine, die stets in Gegenwart von Detergenzien aufgereinigt werden müssen, ist dieser Ansatz gleichsam der natürliche. Das Detergenz kann dabei durch Dialyse (Hasler, 1998; Williams, 1999), durch Verdünnung unterhalb der CMC (Stephens, 1997; van der Does, 1998) oder durch Zugabe unpolarer Polystyrenkugeln (Rigaud, 1998; Mohraz, 1999; Racher, 1999) entfernt werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Rekonstitution des Membranproteins in bereits vorgefertigte, mit wenig Detergenz destabilisierte Liposomen. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer zumeist uniformen Orientierung des Proteins relativ zur Membran (Jain, 1987; Richard, 1990), setzt aber genaue Kenntnis der Menge des notwendigen Detergenzes voraus.

Insgesamt lassen sich jedoch aus den zahlreichen Rekonstitutionen, die mit Membranproteinen durchgeführt wurden, keine Vorhersagen bezüglich des Verhaltens eines zu untersuchenden Proteins machen. Die Zahl wichtiger Parameter wie LPR, Lipidzusammensetzung, Wahl des Detergenzes, Temperatur oder Methode der Inkorporation ist groß und die zugrundeliegenden Mechanismen noch wenig verstanden (Rigaud, 1995). Um eine funktionelle Rekonstitution des GluRB zu erreichen, sollte der experimentelle Ansatz deshalb möglichst breit gewählt und verschiedene Methoden erprobt werden.

4.2.4.2. DETERGENZ-DIALYSE

Ein Detergenz mit einer CMC oberhalb von 1mM läßt sich vollständig durch Dialyse aus einer Protein/Lipid/Detergenz-Mischung entfernen (Allen, 1980). Die Voraussetzung hierfür liegt in einer weit höheren Monomerkonzentration des Detergenzes verglichen mit dem Lipid, welches praktisch vollständig in gemischten Mizellen vorliegt. Der Vorgang dauert, abhängig von der CMC, mehrere Stunden oder Tage. Für die 2D-Kristallisation ist dieses Verfahren die bisher am häufigsten eingesetzte und am besten charakterisierte Methode (Ringler, 1999).

Wegen des schonenden, weil langsamen Ablaufs der Detergenzentfernung wurde die Dialyse für eine erfolgversprechende Methode gehalten, den ionotropen Glutamatrezeptor in Liposomen zu rekonstituieren. Zum Nachweis erfolgreicher Inkorporation sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen negativ gefärbter bzw. gefriergebrochener Liposomenpräparationen dienen. Eine grundsätzliche Schwierigkeit bei der Durchführung der Versuche bestand in der geringen Verfügbarkeit des Proteins auf der einen und der Vielzahl veränderbarer Parameter auf der anderen Seite. Das Mengenverhältnis von Lipiden zu Protein sollte möglichst niedrig sein, um die Membranproteine im Falle eines Einbaus visualisieren zu können.

Bei ersten Experimenten zeigte sich, daß die mittels Dialyse erzeugten Liposomen unabhängig von der Lipidzusammensetzung einen Durchmesser von etwa 50-200 nm aufwiesen (siehe Abb. 4.45, E). Für ein Vesikel des Durchmessers 150 nm berechnet sich die Lipidoberfläche zu 1,4 x 10^5 nm^2 (da es sich um eine Doppellipidschicht handelt, entspricht dies dem Doppelten der Vesikeloberfläche). Bei einer Fläche von 0,6 nm^2 pro Lipidmolekül (Richard, 1990) enthält ein durchschnittliches Vesikel 2,4 x 10^5 Lipidmoleküle. Bei der typischerweise verwendeten Lipidkonzentration von 500 µg/ml oder 0,625 mM beträgt die Vesikelkonzentration dann 2,6 nM, wobei angenommen wird, daß alle Lipidmoleküle aus den gemischten Mizellen in Liposomen überführt werden. Die Proteinkonzentration wurde mit 200-300 nM so gewählt, daß sich ein LPR von 3 bis 5 einstellte. Damit können unter der Annahme, daß vier Untereinheiten zur Bildung eines Kanals notwendig sind und das Protein vollständig eingebaut wird, etwa 100 Ionenkanäle pro Vesikel erwartet werden. Dies liegt zwar oberhalb dessen, was für eine 2D-Kristallisation notwendig ist (Ziegra, 1992; Hasler, 1998; Williams, 1999), müßte jedoch ausreichend sein, um einzeln eingebaute Kanäle auf der Liposomenoberfläche erkennen zu können (Weinkauf, S., persönliche Mitteilung).

Neben dem LPR kann auch der Zusammensetzung der Lipide beim Einbau des Proteins eine entscheidende Rolle zukommen. Um den nativen Bedingungen des GluRB möglichst nahe zu

kommen, wurden in dieser Arbeit diejenigen Lipide verwendet, die in größeren Mengen in Rattenneuronen vorhanden sind. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um Phospholipide, die mehr als drei Viertel der vorhandenen Lipide ausmachen, mit Phosphatidylcholin als dem Hauptvertreter (Freysz, 1968; White, 1973). Zum einen wurden Gemische aus aufgereinigten Lipiden mit einer definierten Zusammensetzung hergestellt, zum anderen wurde Asolectin verwendet, eine wenig aufgereinigte Lipidisolation aus der Sojabohne, die aus den Phospholipiden PC, PE und PI besteht und sowohl gesättigte wie auch ein- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthält (Sigma-Aldrich, 1999). Eine definierte Zusammensetzung hätte den Vorteil besserer Reproduzierbarkeit, wohingegen Asolectin dem Membranprotein die Möglichkeit eröffnet, aus der Vielzahl der vorhandenen Lipide dasjenige zu binden, welches eine korrekte Konformation bzw. maximale Aktivität erlaubt (Hermoni-Levine, 1990).

Die Zahl geeigneter Detergenzien wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits stark eingegrenzt (siehe Kap. 4.2.1.11). Lediglich Decylmaltosid vereint beide Kriterien einer CMC oberhalb 1 mM und hoher Proteinaktivität. In Octyl- und Nonylglukosid, beides Detergenzien mit hoher CMC, zeigt das Protein bereits eine signifikant reduzierte Bindungsaktivität. Alle anderen getesteten Detergenzien scheiden wegen zu niedriger CMC oder Zerstörung der GluRB-Aktivität für die Rekonstitutionen aus.

Detergenzdialysen wurden sowohl mit OG als auch mit DM durchgeführt. Die Verwendung von OG resultierte aus dessen Einsatz bei Rekonstitutionsversuchen mit GluRD (Jespersen, 1999), wo die Bildung von Proteoliposomen bei einem LPR von 100 berichtet wird. Dort stand die Herstellung von Antikörpern gegen AMPA-Rezeptoren im Vordergrund, während das Verhalten des Proteins bei der Rekonstitution nicht geprüft wurde.

In einem ersten Versuch wurde der Einfluß der Lipidzusammensetzung anhand zweier verschiedener Lipidmischungen untersucht. Eine Versuchsreihe wurde mit PC, PE sowie Cholesterin im molaren Verhältnis von 10:1:5 durchgeführt, bei der anderen wurde Asolectin verwendet. Es wurde mit einem LPR von 5 gearbeitet, ein Kontrollexperiment unter identischen Bedingungen wurde in Abwesenheit des Proteins durchgeführt (siehe Abb. 4.45).

In den negativ gefärbten Proben sind im Elektronenmikroskop in allen Fällen die gebildeten Liposomen zu erkennen. In der Kontrolle handelt es sich um Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von ca. 100 nm, die sich sowohl negativ gefärbt (E) wie nach Gefrierbrechung (F) durch keine besonderen Merkmale auszeichnen. Die Doppellipidschicht erscheint regelmäßig und ohne Einlagerungen von Fremdkörpern. Die in dieser Arbeit angewendete Methode der

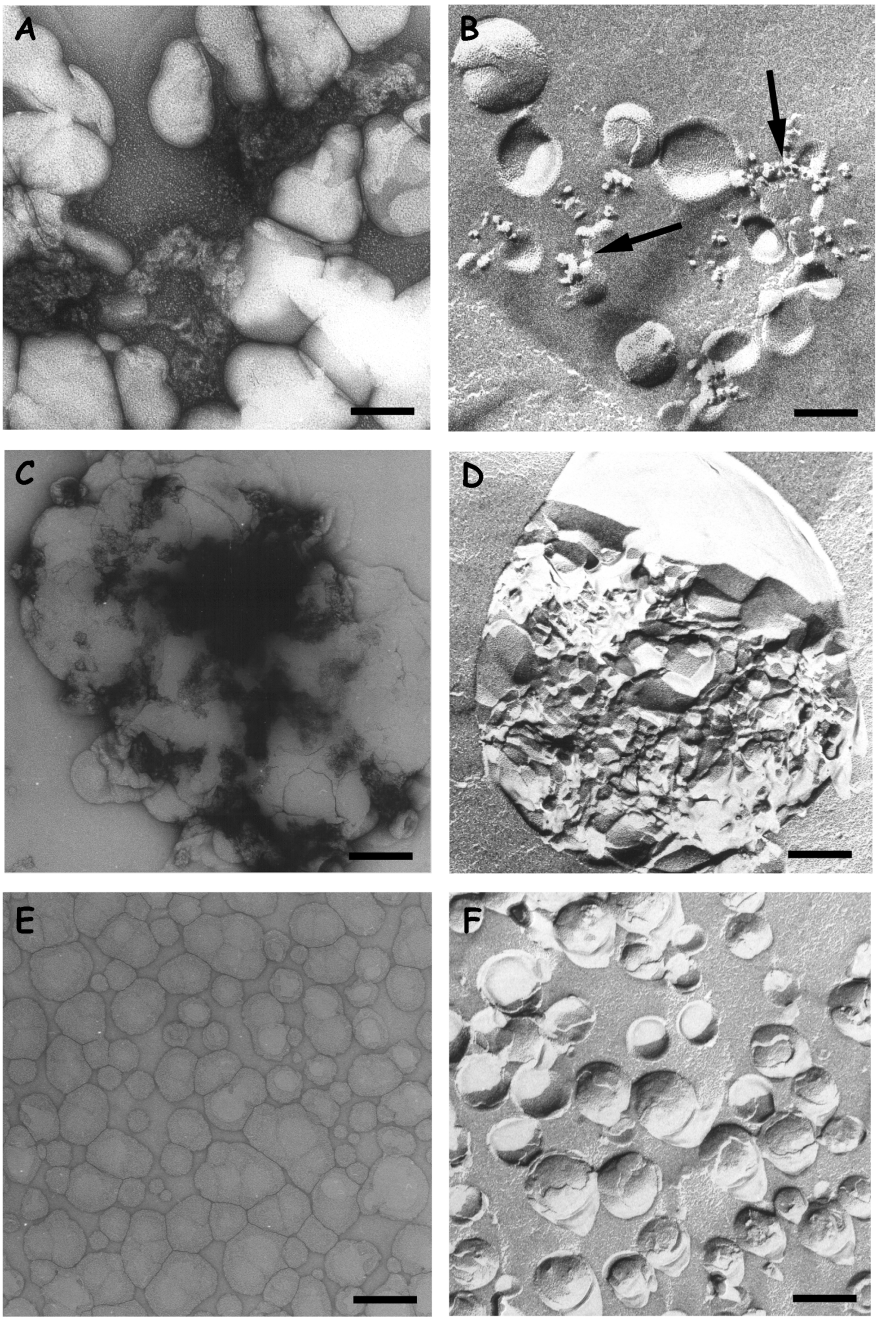


Abb. 4.45: Versuche zur Rekonstitution von GluRB durch Detergenzdialyse[26]. Als Detergenz wurde Octylglukosid verwendet, das LPR in A-D betrug jeweils 5. Negativ gefärbte (linke Spalte) und gefriergebrochene (rechte Spalte) Liposomenproben aus verschiedenen Lipiden. A/B: PC/PE/Chol (molares Verhältnis 10:1:5), C/D: Asolectin, E/F: Kontrollexperiment ohne GluRB, das Lipid ist Asolectin. Der Balken stellt eine Länge von 100 nm dar.

Liposomendarstellung führt also zu der Bildung gleichförmiger Vesikel mit einer recht homogenen Größenverteilung. Dieses Ergebnis wurde unabhängig von der verwendeten

[26] Die Fotos wurden von Frau Cissé und Dr. Tichelaar aufgenommen.

Lipidzusammensetzung erhalten, sowohl mit Asolectin als auch mit Mischungen aufgereinigter Lipide.

Im Vergleich dazu fallen bei der Rekonstitution von GluRB bei einem LPR von 5 in der negativ gefärbten Probe (A) sofort Verklumpungen auf, die sich hinsichtlich ihrer Form und inneren Struktur deutlich von den Lipiden unterscheiden. Die starke Kontrastierung ist typisch für Proteinaggregate. Die Liposomen selbst unterscheiden sich nicht von denjenigen des Kontrollexperiments, sie erscheinen weiterhin glatt, also ohne eingebaute Ionenkanäle. Verglichen mit Abb. 4.36 müßte es allerdings möglich sein, eventuell eingebaute Proteinmoleküle als kleine Pünktchen zu lokalisieren. Offensichtlich ist aber das Protein während des langsamen Prozesses der Entfernung des Detergenzes völlig aggregiert statt rekonstituiert worden. Die Möglichkeit eines teilweisen, jedoch mit Negativfärbung schlecht sichtbaren Einbaus des Membranproteins in die Liposomen erscheint wegen des analogen Ergebnisses der gefriergebrochenen Probe (B) unwahrscheinlich. Auch hier ist kein Hinweis auf Proteinpartikel in den Liposomen zu sehen. Dagegen enthält diese Probe Anhäufungen kleiner Teilchen (siehe Pfeil), die Proteinaggregate darstellen könnten. In der entsprechenden Kontrolle (F) sind diese Erscheinungen nicht anzutreffen. Die Proteinaggregate scheinen mit den Liposomen zu assoziieren. So werden sie bevorzugt direkt benachbart zu Vesikeln oder gleichsam auf ihnen liegend angetroffen. Worauf diese Kontakte beruhen ist bislang unbekannt. Dieser Befund wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß es nicht möglich war, Protein und Liposomen durch Zentrifugation bei niedriger Beschleunigung (15000 x g) zu trennen. Die Aggregate wurden trotz ihrer höheren Dichte erst durch Ultrazentrifugation (160000 x g) gemeinsam mit den Vesikeln pelettiert, wie Untersuchungen mittels SDS-PAGE ergaben.

Ein ähnliches Bild bietet sich, wenn Asolectin das eingesetzte Lipid ist. Wiederum erscheint GluRB aggregiert als große, kontrastreiche Klumpen, überwiegend assoziiert an die gebildeten Vesikel. Diese sind allerdings im Gegensatz zur Rekonstitution mit dem Gemisch aus PC/PE/Chol (A) und auch im Kontrast mit dem analogen Experiment ohne Protein (E) sehr viel größer. Der Durchmesser dieser Liposomen liegt z. T. bei mehr als 1 µm. Es kann anhand der negativ gefärbten Probe nicht ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um aus kleineren Vesikeln zusammengesetzte Liposomen handelt. Das entsprechende gefriergebrochene Präparat (D) zeigt allerdings ein einzelnes Liposom mit großen Durchmesser. Die unteren beiden Drittel dieses Vesikels erscheinen sehr unregelmäßig und deuten darauf hin, daß hier bei der Gefrierbrechung ein mit dem Vesikel assoziiertes oder auf ihm liegendes Proteinaggregat weggerissen wurde (Weinkauf, S., persönliche Mitteilung).

Der ionotrope Glutamatrezeptor zeigt also in den hier durchgeführten Rekonstitutionsexperimenten eine hohe Tendenz zur Aggregation. Eine Inkorporation in die sich während der Detergenzdialyse bildenden Lipiddoppelschichten kann hingegen nicht - auch nicht teilweise - beobachtet werden. Die möglichen Ursachen sollten in den nächsten Experimenten ausgeschlossen werden. Zum einen schien es möglich, daß der Mischung aus detergenzsolubilisiertem Lipid sowie solubilisiertem Protein nicht genügend Zeit gegeben wurde, ternäre Mizellen zu bilden. Es gibt verschiedene Angaben darüber, wie lange dieser Prozeß dauert, allerdings haben bei 4 °C, wo auch oben beschriebene Versuche durchgeführt wurden, schon 5 min ausgereicht (van der Does, 1998). In anderen Veröffentlichungen wurde dagegen 1 h bei RT inkubiert, bevor mit der Entfernung des Detergenzes begonnen wurde (Richard, 1990). Es erscheint plausibel anzunehmen, daß Proteoliposomen nur aus solchen Mizellen entstehen, die neben Detergenz sowohl Protein als auch Lipid enthalten. Aus Detergenzmizellen, die lediglich Lipide enthalten, entstehen dagegen leere Liposomen, während offensichtlich aus solubilisiertem Protein ohne Lipidanteil nur Proteinaggregate hervorgehen können.

Eine weitere Möglichkeit für den Fehlschlag besteht in der falschen Wahl des Detergenzes. Wenngleich OG ein in Rekonstitutionen bereits häufig erfolgreich eingesetztes nichtionisches Detergenz ist (Lund, 1989; Lampe, 1991; Savage, 1996; Walz, 1997), ist die Aktivität von GluRB in anderen Detergenzien doch deutlich höher (siehe Abb. 4.31). Bei einer GluRD-Rekonstitution mit dem Ziel der Antikörperbildung (Jespersen, 1999), bei der OG verwendet wurde, sind wohl ebenso wie in dieser Arbeit (s. o.) Liposomen und Proteinaggregate nicht getrennt isoliert worden und die Fähigkeit der Aggregate zur Immunisierung von Mäusen täuschte eine Rekonstitution der Ionenkanäle vor. In den folgenden Dialyseexperimenten wird Decylmaltosid verwendet

Weiterhin kann die Phasenübergangstemperatur der Lipide einen Einfluß auf den Einbau von Membranproteinen haben. Bei einer für das Lipid charakteristischen Temperatur gehen Lipidmembrane von einem geordneten “gelartigen” Zustand in einen ungeordneten “flüssigen” Zustand über. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur ist die Beweglichkeit innerhalb der Membran sehr begrenzt. Unter physiologischen Bedingungen liegen biologische Membranen daher stets im flüssigen Zustand vor (Cevc, 1987). Rekonstitutionen unterhalb der Phasenübergangstemperatur sind deshalb weniger erfolgversprechend. Die Beweglichkeit der langkettigen Lipide sollte hoch sein, um einen Einbau des Membranproteins zu erleichtern. Die Zusammensetzung der Kohlenwasserstoffketten im zuletzt verwendeten PC aus Eidotter ist in Tab. 4.10 angegeben. Die gemessene Phasenübergangstemperatur beträgt -15 °C, theoretische Berechnun-

gen ergeben +2 bis -8 °C (Cevc, 1991)[27]. In Mischungen mit anderen Lipiden, wie hier als PC/PE/Chol, nimmt sie noch weiter ab.

Anteil	Anzahl C-Atome und ungesättigte Bindungen
26,54 %	16:0
9,54 %	18:0
3,15 %	16:1
43,36 %	18:1
14,99 %	18:2
0,34 %	18:3
2,08 %	20:4

Tab. 4.10: Zusammensetzung der Kohlenwasserstoffketten von Phosphatidylcholin aus Eidotter (Schäfer, 1998).

Eigentlich sollte also bei den bisher vorgestellten Rekonstitutionsversuchen mit aufgereinigten Lipiden, welche sämtlich bei 4 °C stattfanden, die Phasenübergangstemperatur überschritten worden sein. Um dennoch auszuschließen, daß mangelnde Beweglichkeit der Lipidketten einer Inkorporation von GluRB entgegenstand, wurde die Dialysetemperatur auf 16 °C erhöht.

Abb. 4.46 zeigt das Ergebnis eines Dialyseexperimentes, das die etwaigen Gründe für die bislang fehlende Rekonstitution des GluRB in Betracht zieht. Das eingesetzte Lipid ist Phosphatidylcholin aus Eidotter (vgl. Tab. 4.10), als Detergenz wurde DM verwendet. Nach dem Mischen wurde die Bildung von ternären Mizellen in einem Zeitraum von 6 h bei 4 °C erlaubt und anschließend bei 16 °C dialysiert. Mit sehr ähnlicher Pufferzusammensetzung, den Detergenzien OG und DM sowie mit Phosphatidylcholin war bei dieser Temperatur die Rekonstitution und sogar 2D-Kristallisation einer bakteriellen Laktose-Permease gelungen (Zhuang, 1999).

[27] Dieser Berechnung liegt noch eine ältere Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung in Eidotter-PC zugrunde (Hawthorne, 1982), die sich von der in Tab. 4.10 geringfügig unterscheidet. Der für die Phasenübergangstemperatur aber wesentliche Anteil ungesättigter Fettsäuren, 49 % in Tab. 4.10, ist dort aber mit 52 % sehr ähnlich bestimmt worden.

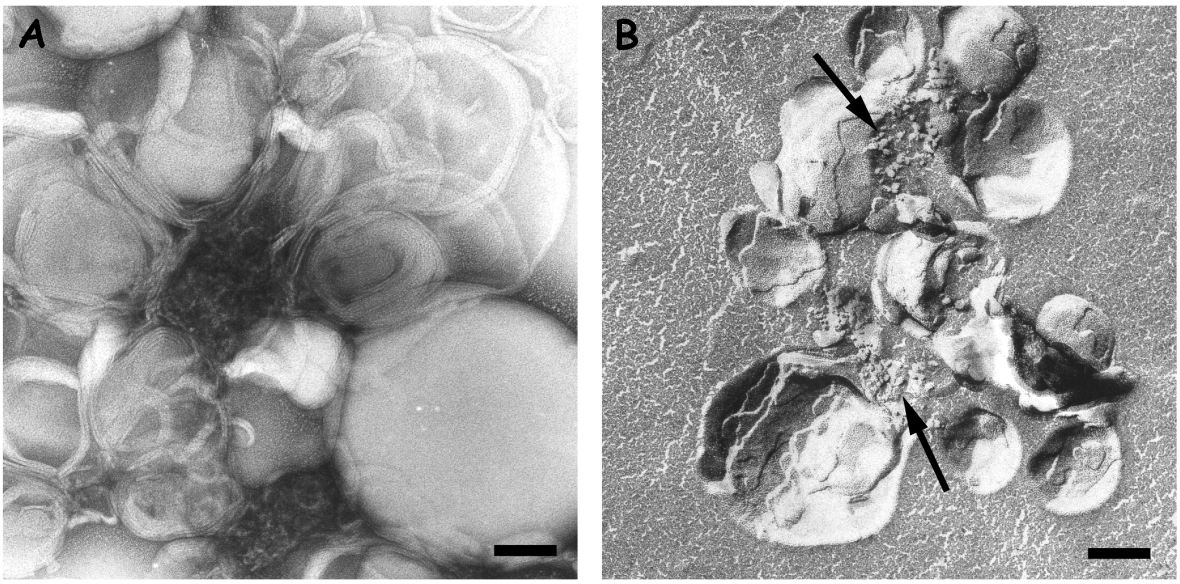


Abb. 4.46: Erneuter Versuch zur Rekonstitution von GluRB durch Detergenzdialyse. Als Detergenz wurde Decylmaltosid verwendet, aufgereinigtes PC aus Eidotter ist das hierfür eingesetzte Lipid. Es wurde ein LPR von 5 eingestellt und die Dialyse bei 16 °C durchgeführt. Aufnahme A zeigt die Aufnahme der negativ gefärbten Probe, B deren Aussehen nach Gefrierbruch. Die Balken stellen eine Länge von 100 nm dar.

Leider zeigt sich ein ähnlicher Erfolg wie bei der Permease beim Versuch der Rekonstitution des GluRB nicht. Verglichen mit den Aufnahmen aus Abb. 4.45 zeigt sich ein vollkommen gleiches Bild. Wieder entstehen Liposomen, die keinerlei Hinweis auf inkorporiertes Protein enthalten. Dieses ist erneut entweder als schwarzes Aggregat (A) oder als Sprenkelung um die Vesikel (Pfeile in B) zu sehen. Die verlängerte Zeit zur Bildung ternärer Mizellen hat ebensowenig einen sichtbaren Fortschritt gebracht wie die Temperaturerhöhung oder die Verwendung eines Detergenzes, in dem GluRB eine hohe Ligandenbindungsaktivität behält. Entweder ist die Detergenzdialyse nicht die richtige Methode, um GluRB rekonstituieren zu können, oder die Nichtberücksichtigung anderer Parameter verhindert bislang einen erfolgreichen Einbau. Im nächsten Schritt wird eine andere Methode der Liposomendarstellung erprobt.

4.2.4.3. REKONSTITUTION DURCH VERDÜNNUNG

Für diese Methode gibt es noch nicht so viele Beispiele wie für die Dialyse (Helenius, 1981; Stephens, 1997). Andererseits gibt es auch Beobachtungen, wonach eine Rekonstitution nur über die Verdünnungsmethode gelingt (van der Does, 1998). Die Bildung der Liposomen beruht auf der schnellen Verdünnung einer Protein/Lipid/Detergenz-Mischung mit einem detergenzfreien Puffer, was die Detergenzkonzentration auf weit unterhalb der CMC verringert und Pro-

tein sowie Lipid zwingt, die hydrophoben Bereiche vor dem Kontakt mit der wäßrigen Umgebung zu schützen.

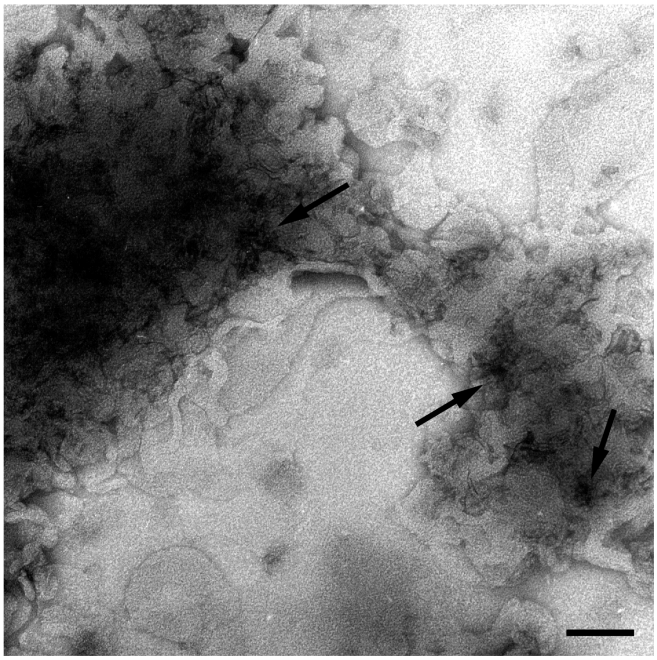


Abb. 4.47: Negativ gefärbte Probe eines Versuchs zur Rekonstitution von GluRB durch Verdünnung. Als Detergenz wurde Decylmaltosid verwendet, Asolectin ist das hierfür eingesetzte Lipid. Es wurde ein LPR von 5 eingestellt und die Dialyse bei 4 °C durchgeführt. Die Balken stellen eine Länge von 100 nm dar.

GluRB verhält sich in den Verdünnungsansätzen sehr ähnlich wie in den Dialyseexperimenten. Abb. 4.47 zeigt eine Liposomenprobe, bei der DM-solubilisierter GluRB mit Asolectin rekonstituiert werden sollte. Die Vesikeldichte ist im gezeigten Bild höher als diejenige im Dialyseexperiment C in Abb. 4.45, das Resultat ist aber dennoch ähnlich. Wieder befindet sich das Protein in Aggregaten, die zwischen riesigen, jedoch leeren Liposomen angeordnet sind. Allerdings scheinen hier die Proteinaggregate kleiner zu sein als in Abb. 4.45 beobachtet. Wahrscheinlich beruht dieser Unterschied auf der unterschiedlich langen Zeit, die dem Membranprotein zur Aggregation verbleibt. Während sich bei der Dialyse entstehende Aggregate durch Anlagerung weiteren Proteins stetig vergrößern können, ist bei einer schnellen Verdünnung der Probe die CMC des Detergenzes augenblicklich unterschritten, das Protein kann nicht mehr in Lösung gehalten werden und fällt komplett in kleineren Aggregaten aus. Das obige Experiment wurde auch mit PC durchgeführt, wobei analog zu den Dialyseexperimenten mit gleichem Lipid Liposomen im Größenbereich von 150 bis 300 nm gebildet wurden und das Protein als klumpiges Aggregat erschien.

4.2.4.4. DESTABILISIERUNG VORGEFERTIGTER LIPOSOMEN

Im Gegensatz zu den bisher getesteten Rekonstitutionsmethoden werden hier nicht solubilisiertes Protein und Lipid gemischt, sondern solubilisiertes Protein zu bereits vorgefertigten Liposomen gegeben, welche mit einer zuvor bestimmten Menge Detergenz gerade soweit destabilisiert wurden, daß eine Inkorporation des Membranproteins möglich wird. Nur wenige Beispiele einer Rekonstitution auf diesem Wege sind bekannt (Jain, 1987; Richard, 1990; Knol, 1998), was auch an der Schwierigkeit liegen könnte, exakt die richtige Menge Detergenz einzustellen.

Zunächst mußte für die vorgelegten Liposomen das Verhalten im gewählten Detergenz untersucht werden. Dies geschah nach einer von J.-L. Rigaud eingeführten Methode der Titration von Liposomen mit steigenden Konzentrationen des Detergenzes unter Messung der Lichstreuung der Suspension (Richard, 1990). Zur Vorbereitung des nachfolgend vorgestellten Rekonstitutionsexperiments wurde das Verhalten von Liposomen aus PC/PE gegen DM untersucht (siehe Abb. 4.48).

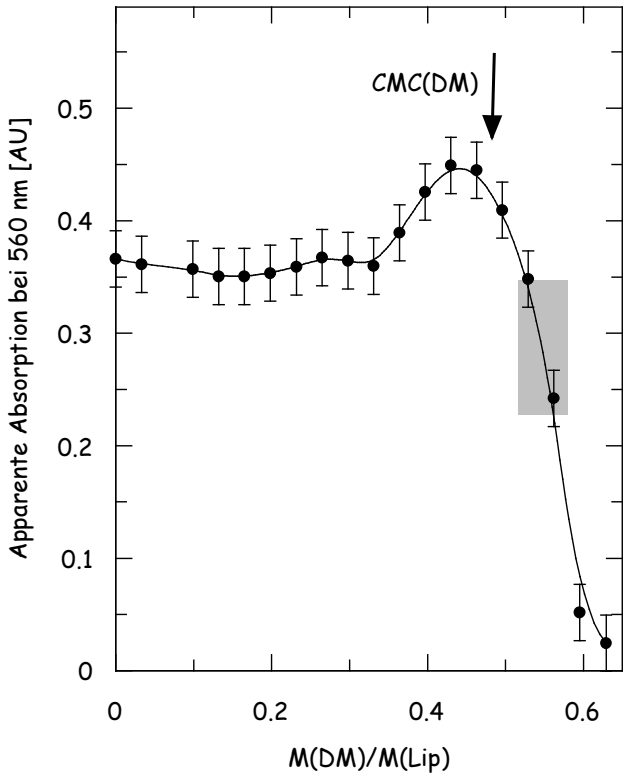


Abb. 4.48: Absorption bei 560 nm einer Lipid-Detergenz-Mischung in Abhängigkeit der Detergenzkonzentration. Lipid: PC/PE (molares Verhältnis 2:1), Detergenz: DM. Das graue Kästchen gibt den Zielbereich für die spätere Rekonstitution an, in dem die gemessene Absorption auf 50-75 % des Maximalwertes zurückgegangen ist.

Ist die Detergenzkonzentration weit unterhalb der entsprechenden CMC, ändert sich die Absorption kaum. In der Nähe der CMC nimmt dann allmählich die Inkorporation von Detergenz in die Liposomen zu, was zu einer Volumenvergrößerung der Vesikel und damit einer höheren optischen Dichte der Suspension führt. In der Nähe der CMC von DM erreicht der Detergenzgehalt der Liposomen ein Maximum. Die Vesikel sind jetzt mit Detergenz gesättigt, und weitere Zugabe von DM führt zu einer Solubilisation der Lipide. Durch diese Mizellbildung nimmt auch die optische Dichte der Suspension ab, bis sie schließlich klar erscheint. Der Prozeß der Solubilisation vollzieht sich sehr schnell, was experimentelle Schwierigkeiten verursacht. Eine maximale Rekonstitution von Membranproteinen wurde nämlich gerade in dem Bereich gefunden, der schon eine partielle Solubilisation der Lipidvesikel anzeigt (Richard, 1990). Hierfür muß in obigem Beispiel die Detergenzmenge sehr genau eingestellt werden, um eine zu starke Auflösung der Liposomen zu vermeiden (siehe grauer Kasten in Abb. 4.48).

Die Liposomen wurden dann zur Rekonstitution des GluRB mit derjenigen Menge DM destabilisiert, die nach der Zugabe des Membranproteins die Lichtstreuung auf 70 % des Maximalwertes (siehe Abb. 4.48) einstellte. Damit war die optimale DM-Konzentration für eine teilweise, jedoch nicht zu starke Destabilisierung der Liposomen getroffen. Nach der Zugabe von GluRB zu den destabilisierten Vesikeln wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, wobei sich die gemessene Absorption nicht änderte. Im Anschluß daran wurde durch Pufferzugabe die DM-Konzentration weit unter die CMC erniedrigt, die Vesikel isoliert und im Elektronenmikroskop untersucht (siehe Abb. 4.49).

Im Vergleich zu Abb. 4.45 (A) oder Abb. 4.46 ist die Verflechtung von Vesikeln und Proteinaggregat hier noch enger. Die Liposomen scheinen mit Proteinaggregat regelrechte Konglomerate zu bilden. Während bei Dialyse und Verdünnung das Membranprotein vermutlich aggregierte, bevor oder während Lipiddoppelschichten ausgebildet wurden, könnte sich hier der solubilisierte GluRB vor Entfernung des Detergenzes gleichmäßiger an die Membran assoziieren, möglicherweise über eine Lipidbindungsstelle. Zu einem Einbau von GluRB kommt es dennoch nicht, die Vesikel zeigen kein Anzeichen inkorporierter Proteinmoleküle. Die unter identischen Bedingungen durchgeführte Kontrolle ohne Proteinzugabe (Abb. 4.49, C) zeigt wieder kontrastarme Vesikel ohne die Anwesenheit schwarzer Aggregate.

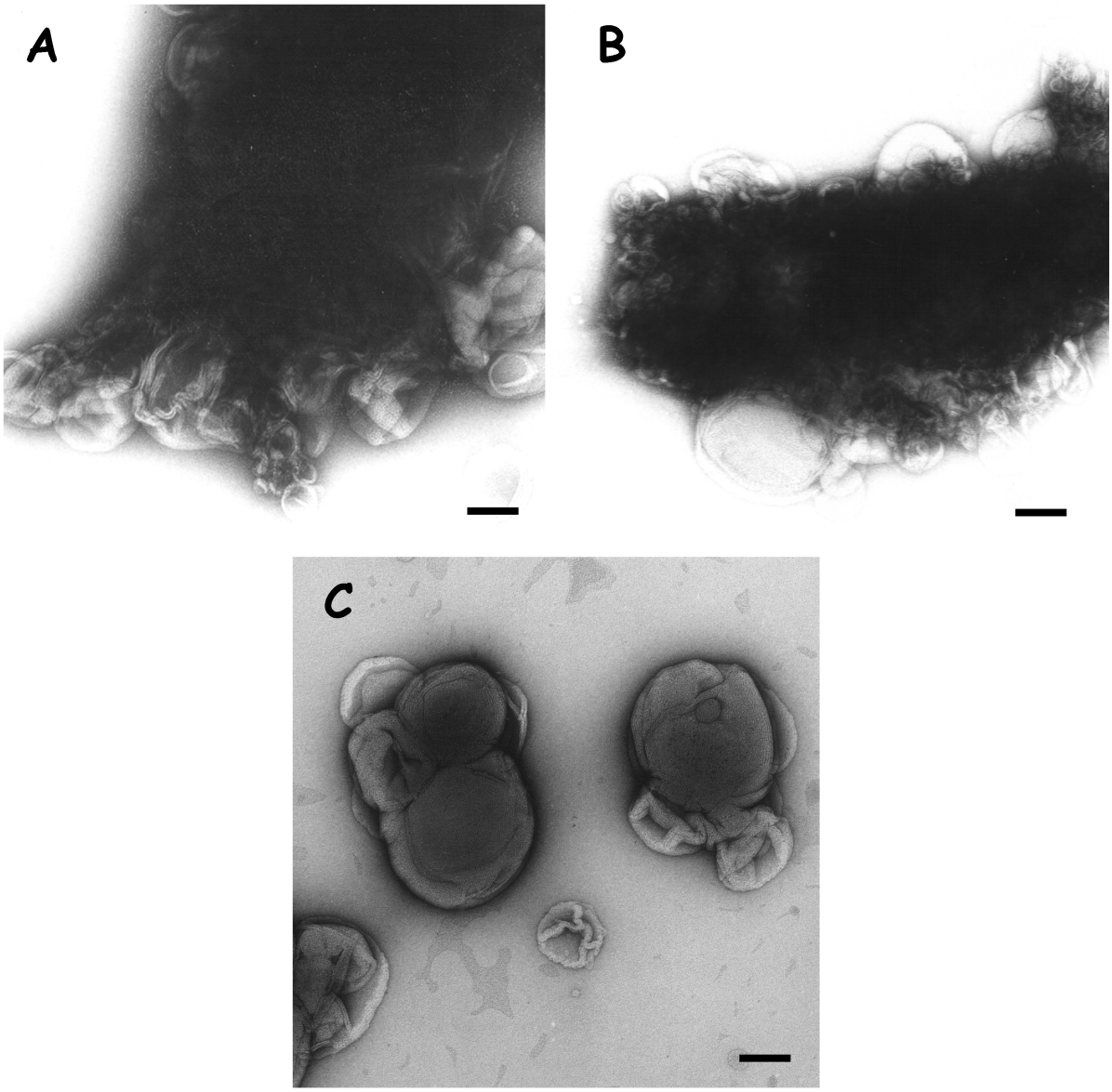


Abb. 4.49: Negativ gefärbte Proben eines Versuch zur Rekonstitution von GluRB durch Destabilisierung vorgefertigter Liposomen. Als Detergenz wurde Decylmaltosid verwendet, PC/PE (molares Verhältnis 2:1) ist die hierfür eingesetzte Lipidmischung. A und B: GluRB-Rekonstitution mit einem LPR von 4; C: Kontrollexperiment ohne Protein. Die Balken stellen eine Länge von 100 nm dar.

Die obigen Ausführungen müssen solange Spekulation bleiben, bis eine systematischere Untersuchung der GluRB-Rekonstitution gelingt. Die Interpretation allein aufgrund negativ gefärbter Proben ist außerdem keine ausreichende Methodik, um das Verhalten von Lipiden und Protein erklären zu können. Wünschenswert ist in jedem Fall auch eine verstärkte Analyse gefriergebrochener Proben. Die hier vorgestellten Resultate stellen lediglich erste Erkenntnisse dar, die ohne weitere Experimente Stückwerk bleiben müssen. Leider ist nicht ausreichend gelungen, weiteren Untersuchungen durch eine Klassifizierung der Experimente in viel und wenig versprechende Ansätze den Weg zu ebnen. Aufgrund des über alle Methoden hinweg negativen

Ergebnisses kann nicht ausgeschlossen werden, daß ein wesentlicher Parameter für eine GluRB-Rekonstitution noch nicht ausreichend berücksichtigt wurde. Mögliche Gründe und Alternativen werden in der Diskussion (Kap. 5.4) angesprochen.

5. DISKUSSION

5.1. EXPRESSION VON NEUROTRANSMITTERREZEPTOREN

Der Versuch, zwei verschiedene Neurotransmitterrezeptoren, den neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptor sowie den ionotropen Glutamatrezeptor, in einem Baculovirusexpressionssystem zu überexperimieren, führte zu unterschiedlichen Resultaten.

Der ionotrope Glutamatrezeptor GluRB konnte in dieser Arbeit mit Ligandenbindungseigenschaften exprimiert werden, die denen anderer Untersuchungen entsprechen (Keinänen, 1994). Die gemessene Affinität für AMPA liegt bei ca. 18 nM. Das Molekulargewicht der Monomerbande beträgt laut SDS-PAGE 103,6 kD und deutet auf eine vollständige und glykosylierte GluRB-Untereinheit hin. Dies wurde auch durch die Beobachtung unterstützt, daß eine Aufreinigung gegen N- und C-terminale Affinitätsmarkierungen erfolgreich durchgeführt werden konnte, mithin die Sequenz unverkürzt war. Nach dem Nachweis von Vollständigkeit und Funktionalität des Proteins wurde die Insektenzellkultivierung im Rahmen dieser Arbeit in großem Maßstab von üblicherweise 16 l Zellkulturvolumen betrieben, was die Isolierung dieses Ionenkanals in für strukturelle Untersuchungen notwendigem Maße ermöglichte.

Im Falle des Acetylcholinrezeptors gelang die Expression funktioneller Ionenkanäle mit pharmakologischen Eigenschaften, wie sie in Oozyten exprimiertes oder aus natürlichen Quellen verwendetes Protein zeigt, nicht. Zwar wurden im Baculovirussystem ca. 200000 Kopien dieses Proteins pro Zelle gebildet, was einem Expressionsniveau von etwa 100 µg pro Liter Insektenzellen entspricht und Voraussetzung für die Isolation des Membranproteins in strukturbiologisch relevanten Mengen wäre. Allerdings konnte in dieser Arbeit lediglich die Expression eines fragmentierten α7-Proteins mit deutlich schwächerer Ligandenaffinität nachgewiesen werden. Statt einer Blockierung durch α-Bungarotoxin bei Konzentrationen von wenigen Nanomol pro Liter, wie sie α7-Rezeptoren in Oozyten bzw. *in vivo* zeigen (Anand, 1993), bindet das in Insektenzellen exprimierte Protein diesen Antagonisten mit einer Affinität von nur 400 nM deutlich schlechter. Gleiches wird auch bei Verdrängungsexperimenten festgestellt, wo die Agonisten Nikotin und Acetylcholin erst bei viel höheren Konzentrationen (IC_{50}= 4,1 bzw 206 mM) ihre Bindungsplätze einnehmen können, als sie dies in funktionellen Rezeptoren tun (K_I=0,545 bzw. 24,9 µM; Anand, 1993). Zurückzuführen ist die verminderte Ligandenaffinität auf einen N-terminalen Abbau der α7-Untereinheit. Es konnte durch Ligandenbindungsexperimente und immunologische Charakterisierung gezeigt werden, daß es im Laufe der Baculovi-

rusexpression zur Bildung einer verkürzten α7-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von nur etwa 47 kD statt der für die komplette Sequenz erwarteten 55-60 kD kommt. Infolgedessen fehlt dem Ionenkanal ein wesentlicher Teil seiner N-terminalen Ligandenbindungsdomäne. Die Schnittstelle wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht genau lokalisiert, liegt aber wahrscheinlich zwischen der zweiten und dritten Glykosylierungsstelle des Proteins. Mithin fehlt etwa die Hälfte der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Die Fragmentierung des Ionenkanals ließ sich auch nicht durch Beigabe verschiedener Proteaseinhibitoren bei der Aufreinigung verhindern, sodaß davon auszugehen ist, daß die Spaltung bereits während der Expression in den Insektenzellen erfolgt.

Wegen der unvollständigen Expression im Baculovirussystem wurde versucht, α7-nAChR in Bakterien und Hefezellen zu überexprimieren. Die verwendeten *E. coli*-Bakterienstämme C41 und C43 hatten zwar bei einigen Membranproteinen zu funktioneller Expression geführt (Miroux, 1996), zeigen jedoch keine Anzeichen einer Bildung von α7-Ionenkanälen. Zu deren Nachweis wurden Ligandenbindungsexperimente mit ganzen Zellen sowie mit den einzelnen Bestandteilen des Bakteriums, Zytosol, Membran und Einschlußkörper, durchgeführt. Außerdem wurde mittels SDS-PAGE und Westernblotting nach dem Auftreten von α7-nAChR-Protein gesucht. In keinem Fall gab es einen Hinweis auf spezifische Ligandenbindungsaktivität, und Vergleiche mit nicht-transformierten Bakterien gleichen Typs zeigten keinerlei Unterschiede im Bandenmuster der vorhandenen Proteine. Offenbar kommt es in C41 und C43 also nicht zu einer meßbaren Expression des α7-Acetylcholinrezeptors.

Die Ergebnisse der Überexpression von α7-nAChR in der Hefe *Pichia pastoris* sind denen, die mit dem Baculovirussystem erhalten werden, ähnlich. Wiederum scheint es lediglich zur Expression einer unvollständigen α7-Untereinheit zu kommen. Ein immunologischer Nachweis der verwendeten Affinitätsmarkierung zeigte das Vorhandensein von fragmentierten α7-nAChR-Proteinen in der Plasmamembran der Hefe mit Molekulargewichten von 30 und 40 kD. Im Gegensatz zum 47 kD-Protein, das in Insektenzellen exprimiert wurde und eine meßbare, wenngleich stark reduzierte Ligandenbindung zeigte, ließ sich in Hefezellen überhaupt keine Bindungsaffinität für α-Bungarotoxin feststellen. Die Ausbildung der N-terminalen Domäne mit der Ligandenbindungsstelle ist in *Pichia pastoris* demnach noch stärker gestört als in Insektenzellen.

Eine funktionelle Überexpression des neuronalen nikotinischen α7-Acetylcholinrezeptors ist damit in dieser Arbeit nicht gelungen. Es existieren bis heute allerdings keine Publikationen, die

eine Überexpression des α7-nAChR beschreiben. Offenbar ist es bislang nicht möglich, diesen Ionenkanal in anderer Weise zu exprimieren als durch *in-vivo*-Transkription in Oozyten (Couturier, 1990). Diese Methode erlaubt zwar elektrophysiologische Charakterisierungen, ist aber für strukturelle Untersuchungen nicht geeignet, weil sie es nicht erlaubt, die notwendigen Mengen des Proteins zu isolieren. Es ist nicht klar, worauf die Schwierigkeiten bei der Überexpression in den beschriebenen Expressionssystemen beruhen, möglicherweise ließen sie sich aber durch Verwendung anderer Wirtsorganismen wie beispielsweise der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* oder dauerhaft transformierten Insektenzellen überwinden. Aufgrund der im Vergleich zu löslichen Proteinen immer noch geringen Zahl von rekombinanten Membranproteinen, die erfolgreich überexprimiert wurden, sind diesbezügliche Vorhersagen für ein bestimmtes Protein aber kaum möglich.

5.2. AUFREINIGUNG VON GLURB

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, die Expression und Aufreinigung eines AMPA-Glutamatrezeptors in einer Weise zu entwickeln, die die Isolation des Ionenkanals in größeren Mengen als bislang möglich erlaubte. Die Expression für GluRB und GluRD in Insektenzellen ist zwar bereits beschrieben worden (Keinänen, 1994), die Präparation des Proteins auf dem dort beschriebenen Wege hatte allerdings einige Nachteile, die strukturelle Untersuchungen verhinderten. So schwankte Reinheit und Bindungsaktivität von GluRD zwischen verschiedenen Präparationen (Kuusinen, 1995b), und der Rezeptor zeigte nach der chromatographischen Aufreinigung eine Molekulargewichtsverteilung, die auf teilweise Aggregation des Proteins schließen ließ. Dies machte die Durchführung von präparativen Dichtegradienten notwendig, was die effektive Ausbeute an intaktem Membranprotein auf Werte von wenigen Mikrogramm pro Liter Insektenzellen erniedrigte. Mit diesen Mengen aber waren die geplanten Rekonstitutions- und Kristallisationsexperimente nicht durchführbar. Zumindest die Isolation in Milligramm-Mengen mußte als untere Grenze für deren Durchführbarkeit angesehen werden. Aus diesem Grund wurde auch GluRB für die Expressionsversuche ausgewählt. Dieser AMPA-Rezeptor läßt sich effektiver als GluRD solubilisieren (Keinänen, 1994) und war damit der bessere Kandidat auf dem Weg zur Erhöhung der isolierbaren Menge an ionotropem Glutamatrezeptor.

Neben der Insektenzell-Kultivierung in großem Maßstab (siehe 5.1) wurden zahlreiche Modifikationen im Aufreinigungsprotokoll getestet sowie das gesamte Aufreinigungsverfahren auf die Handhabung großer Volumina umgestellt.

Eine erste Verbesserung ergab sich durch die Verwendung von High five-Zellen der Insektenzelllinie *Trichoplusia ni*. Diese Zellen erweisen sich für die Kultivierung in großen Volumen verglichen mit Zellen der *Spodoptera frugiperda*-Linie als besser geeignet. Neben dem schnelleren Wachstum zeichnen sie sich durch eine höhere GluRB-Expression aus und produzieren darüberhinaus weniger Proteinaggregate als Sf21-Zellen. Gleichwohl gelang es alleine dadurch noch nicht, GluRB in reiner Form zu gewinnen.

Die Infektionsdauer sowie der für eine Expression notwendige MOI unterscheidet sich bei den High five-Zellen nur geringfügig von denjenigen Werten, die für Sf21-Zellen bekannt waren (Keinänen, 1994). Allerdings muß der Zeitpunkt der Zellernte sorgfältig gewählt werden, um Ausbeuteverluste und Ansammlung von nicht-funktionellem Protein zu vermeiden, zum anderen ist ein MOI von mehr als 3 notwendig, um merkliche GluRB-Expression nachweisen zu können.

Die für die Umsetzung von großen Volumen eingesetzte Durchflußzentrifugation erwies sich für eine schonende Ernte der Insektenzellen als gut geeignet. Während die Bindungsaktivität von diesen und mittels herkömmlicher Zentrifugation geernteter Zellen vergleichbar war, zeigten erstere doch eine geringere Tendenz zur Aggregation. Auch die ca. 30 % höhere Ausbeute an GluRB ließ darauf schließen, daß mehr Protein in funktionellem Zustand verblieb und aufgereinigt werden konnte.

Bei der Analyse des Solubilisierungsprozesses konnte das Resultat vorheriger Untersuchungen, nach denen Triton X-100 das effektivste Detergenz zur Solubilisation von Glutamat rezeptoren aus Insektenzellmembranen war, bestätigt werden. Des Weiteren wurde aber festgestellt, daß die Solubilisierung in einem möglichst kurzen Zeitraum stattfinden sollte. Zu lange Solubilisierung führt zu vermehrter Aggregation der Membranproteine. Eine einstündige Inkubation mit dem Detergenz ist der Solubilisation über Nacht vorzuziehen. Es ist nicht klar, worauf dieser Aggregationsprozeß, bei Membranproteinen im Wesentlichen bewirkt durch das Wechselwirken der hydrophoben Domänen, zurückgeht. Einerseits könnte angenommen werden, daß die hydrophoben membranassoziierten Bereiche umso besser voneinander abgeschirmt werden, je mehr Detergenz vorhanden ist. Andererseits könnte eine zu lange Inkubation mit hohen Detergenzkonzentrationen aber auch eine zu starke Delipidierung des Membranproteins bewirken. Dies hat in anderen Fällen zu starken Aktivitätseinbußen des Proteins geführt (Jones, 1988; Callaghan, 1997). Auch wurde bei Erhöhungen der Konzentration von solubilisiertem GluRB durch Größenausschlußzentrifugation, bei der sich Detergenzien vor allem mit niedriger CMC gleichfalls anreichern, ebenfalls Aggregation beobachtet. Hohe Detergenzkonzentrationen

scheinen also, zumindest über einen längeren Zeitraum, die Aggregation des GluRB zu initiieren. Auf die Frage nach der Stabilität von Membranproteinen bei zu starkem Entzug assoziierter Lipide wird bei der Diskussion der Rekonstitutionsexperimente (siehe Kap. 5.4) noch einmal eingegangen.

Eine wesentliche Verbesserung der Präparation konnte beim ersten chromatographischen Reinigungsschritt, der Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen erzielt werden. In der Vergangenheit war dort die unspezifische Bindung sehr hoch (Kuusinen, 1995b), was die Qualität der Aufreinigung limitierte. Durch die Verwendung von Zn^{2+}-Sepharose statt der bis dahin üblichen Ni^{2+}-Sepharose konnte dieses Bindungsverhalten stark zugunsten des GluRB verschoben werden, was sich im späteren Verlauf der Reinigung sehr positiv auf die Reinheit des Ionenkanals auswirkte. Dieser war nach der anschließenden Immunoaffinitätschromatographie praktisch rein, was aus der hohen Empfindlichkeit eines silbergefärbten SDS-Gels abgeleitet wurde, in dem das Protein keine Verunreinigungen mehr zeigte.

Darüberhinaus zeigt der hier isolierte GluRB eine sehr homogene Molekulargewichtsverteilung. Dies macht einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt zur Entfernung von Proteinaggregate überflüssig und läßt die Isolation eines AMPA-Rezeptors in bislang nicht verfügbaren Mengen zu. Unter den in dieser Arbeit angewandten Bedingungen wurde das Membranprotein mit einer Ausbeute von mehr als 100 µg pro Liter Insektenzellen bzw. 1 pmol pro Milligramm Gesamtmembranprotein aufgereinigt. Dies ist zwar weiterhin ein niedriges Expressionsniveau, wenn die für Rekonstitutionen und 2D-Kristallisationen notwendigen Mengen bedacht werden, liegt aber durchaus in dem Bereich, der auch mit anderen eukaryontischen Membranproteinen erreicht wurde (Grisshammer, 1995). Insofern ist das Ziel der Überexpression eines ionotropen Glutamatrezeptors in großem Maßstab und in hoher Reinheit unter Erhalt der Ligandenbindungsaktivität sowie struktureller Homogenität erreicht worden.

Wegen der niedrigen CMC des bei Solubilisierung und Aufreinigung eingesetzten Triton X-100 eignet sich dieses Detergenz nicht für die in dieser Arbeit geplanten Rekonstitutionsversuche (siehe Kap. 5.4). Es mußte deshalb ein Weg gefunden werden, das solubilisierte Protein in ein anderes Detergenz mit höherer CMC zu überführen. Durch Immobilisierung des GluRB an Zn^{2+}-Sepharose und anschließendem Pufferwechsel konnte Triton X-100 durch zahlreiche andere Detergenzien praktisch vollständig ersetzt werden. Allerdings behielt GluRB nur in wenigen der untersuchten Detergenzien seine Fähigkeit zur Ligandenbindung. Ausgehend von der in Triton X-100 gemessenen Aktivität waren nur die Maltopyranoside DM und DDM vergleichbar gut geeignet. Im kürzerkettigen OM war die Ligandenbindung bereits um das Vierfa-

che reduziert. Auch in Glukopyranosiden büßte GluRB stark an Aktivität ein. Grundsätzlich scheint die Kettenlänge des Detergenzes eine wichtige Rolle bei der Proteinaktivität zu spielen. Kurzkettige Detergenzien können das Protein offenbar nicht mehr effektiv solubilisieren (de Foresta, 1989; Dolder, 1996; Callaghan, 1997). Dies wird auch bei 2D-Kristallisationen beobachtet, wo mit abnehmender Kettenlänge des Detergenzes Protein-Protein-Wechselwirkungen an Bedeutung gewinnen und Inaktivierung durch Proteinaggregation bei Zusammenlagerung der hydrophoben Membranbereiche möglich wird (Ringler, 1999). Ähnliche Beobachtungen mit kurzkettigen Lipiden wurden bei Rekonstitutionsversuchen gemacht (Mohraz, 1999). Festzuhalten bleibt, daß neben Triton X-100 nur wenige Detergenzien zur Solubilisation des GluRB geeignet sind. Eines davon, Decylmaltosid, besitzt außerdem eine CMC von 1,6 mM, was über dem Wert von 1 mM liegt, den man üblicherweise als untere Grenze für die Dialysierbarkeit eines Detergenzes annimmt (Ringler, 1999). Die leichte Dialysierbarkeit von DM unter Rekonstitutionsbedingungen konnte außerdem gezeigt werden. Damit stand ein Detergenz zur Verfügung, mit dem ein breiter experimenteller Ansatz zu Versuchen zur Inkorporation von GluRB in Liposomen möglich wurde (siehe 5.4).

5.3. HYDRODYNAMISCHE EIGENSCHAFTEN DES GLURB

Mit Untersuchungen zum Molekulargewicht des GluRB sollte in dieser Arbeit ein Beitrag geleistet werden, die Frage nach der oligomeren Zusammensetzung der ionotropen Glutamatrezeptoren zu lösen. Derzeit gibt es Hinweise, daß diese Rezeptorklasse entweder tetramere (Mano, 1998; Rosenmund, 1998) oder pentamere Ionenkanäle bildet (Wenthold, 1992; Ferrer-Montiel, 1996; Wu, 1996; Premkumar, 1997; Hawkins, 1999).

Mit Größenausschlußchromatographie, zonaler Ultrazentrifugation und STEM-Messungen wurde eine Charakterisierung des solubilisierten GluRB versucht. Insgesamt geben die hierbei erzielten Ergebnisse kein klares Bild von der oligomeren Zusammensetzung des Ionenkanals ab. In ihrer Gesamtheit und unter Berücksichtigung weiterer parallel durchgeführter Untersuchungen des Proteins, wie Quervernetzungsversuche (Huse, N., Tichelaar, W., unveröffentlicht) und einer elektronenmikroskopischen 3D-Rekonstruktion von negativ gefärbten Einzelpartikeln (Tichelaar, W., Madden, D. R., unveröffentlicht), scheinen sie jedoch den Aufbau des GluRB aus vier Untereinheiten zu favorisieren.

Den klarsten Hinweis darauf ergab die Massenbestimmung des solubilisierten Proteins anhand eines mit Standardproteinen kalibrierten Dichtegradienten. Da störende Wechselwirkungen mit einer festen Phase nicht befürchtet werden müssen, gibt das erzielte Ergebnis von 495 kD den

tatsächlichen Zustand von solubilisiertem GluRB mit höherer Wahrscheinlichkeit wieder, als dies SEC- oder STEM-Messungen tun (s. u.). Von diesem Wert muß noch der Beitrag der Detergenzmizelle subtrahiert werden, um das Molekulargewicht des Ionenkanals zu erhalten. Da deren Einfluß mit 60 bis 90 kD angenommen werden kann (Robson, 1977; Goldston, 1998), ergibt sich ein Nettogewicht des Proteins von ca. 405 bis 435 kD. Auch unter großzügiger Berücksichtigung von Ungenauigkeiten bei dieser Massenbestimmung wird damit eine pentamere Struktur von GluRB sehr unwahrscheinlich. Da eine Untereinheit etwa 104 kD beiträgt, paßt der gemessene Wert dagegen sehr gut zu einer tetrameren Zusammensetzung mit dem theoretischen Molekulargewicht von ca. 415 kD.

Mittels Größenausschlußchromatographie wurde dagegen ein scheinbares Molekulargewicht von 150 bis 240 kD berechnet. Mehrere Ursachen für dieses Ergebnis scheinen möglich. Daß das tatsächliche Molekulargewicht des Rezeptors dadurch wiedergegeben wird, ist unwahrscheinlich. Dagegen spricht sowohl das Ergebnis des Dichtegradienten als auch eine 3D-Rekonstruktion und Quervernetzungsversuche (s. u.). Eher könnte eine Wechselwirkung mit der Säulenmatrix zu einer Verlangsamung der Elution oder auch zu einem Zerfall des Oligomers geführt haben. Auch bei Untersuchungen an der extrazellulären Domäne des GluRD (X-Domäne und S1S2-Bereich, vgl. Abb. 1.6) wurden Dimere beobachtet und als Zerfallsprodukte eines Tetramers interpretiert (Abele, 1998). Ebenso wie bei der zonalen Ultrazentrifugation beobachtet, ist das solubilisierte Membranprotein bezüglich seines Molekulargewichts weitgehend homogen, ein Zerfall während der SEC müßte also vollständig stattfinden. Allerdings entspricht das beobachtete Molekulargewicht nicht einfach dem theoretischen Wert eines solubilisierten GluRB-Dimers von ca. 270 bis 300 kD, sondern liegt in allen Fällen darunter. Zusätzliche, das Elutionsverhalten beeinflussende Wechselwirkungen müßten also ebenfalls angenommen werden. Die Unterschiede zwischen den getesteten Gelfiltrationsmaterialien sind dabei beachtlich. Es handelt sich um durchweg hydrophile Polymere mit allerdings unterschiedlichem chemischen Aufbau. Die auf Silikaten basierende SEC-Säule TSK G4000SW$_{XL}$ ergibt ein MW von 215 kD, das aus quervernetzter Dextrose und Agarose aufgebaute Superdex zeigt 145 kD an und mit Sephacryl, einem Polymer aus Allyldextran und N, N'-Methylenbisacrylamid, wird ein MW von 240 kD erhalten. Insbesondere die große Differenz zwischen den beiden letztgenannten überrascht, da sich die Harze im Aufbau ähneln. Eine Reduktion der Ionenstärke im Puffer bringt keine wesentliche Änderung, sodaß die Ursache der Abweichungen wohl nicht auf hydrophobe Wechselwirkungen, etwa der Membrandomäne des Ionenkanals zurückgeht. Eher scheint die Anwesenheit von Detergenz die Laufeigenschaften des solubilisierten Proteins

anders zu beeinflussen, als dies für die zur Kalibrierung verwendeten hydrophilen und damit nicht solubilisierten Standardproteine gilt. Insgesamt gibt die Größenausschlußchromatographie kein klares Bild von der oligomeren Zusammensetzung des GluRB. Allerdings ist sie gut geeignet, um aufgereinigtes solubilisiertes Membranprotein auf die Abwesenheit von Proteinaggregaten zu kontrollieren. Für eine Molekulargewichtsbestimmung des GluRB ist sein Verhalten bei dieser Methode noch zu wenig verstanden.

Auch bei der STEM-Analyse konnte GluRB bislang nur ansatzweise charakterisiert werden. Angesichts der von physiologischen Bedingungen stark abweichenden Probenpräparation bleibt es offen, ob das beobachtete Molekulargewicht dasjenige solubilisierter GluRB-Moleküle oder Folge eines Zerfalles beim Entfernen von Salzen, Glyzerin und Detergenz ist. Mehrfach in H_2O gewaschenes Protein besteht zu mehr als 60 % aus Partikeln, deren MW mit etwa 270 kD demjenigen eines solubilisierten GluRB-Dimers entspricht. Etwa ein Viertel der Partikel liegt in einem Molmassenbereich, der einem tetrameren und/oder pentameren Ionenkanal entspräche. Die Verteilung ist allerdings breit und das Signal nicht eindeutig, sodaß aufgrund dieser schlechten Auflösung eine fundierte Interpretation von Molekulargewichten schwierig ist.

Keine wesentliche Verbesserung der Untersuchung ergab sich aus dem Waschen der Proteinprobe mit dem flüchtigen NH_4OAc, das auftretende elektrostatische Wechselwirkungen ausschließen sollte. Im Unterschied zum vorherigen Experiment stellten jetzt Partikel um 270 kD mehr als 75 % aller Partikel dar, und weitere Signale ließen sich nur ungenau lokalisieren. Insbesondere verschwand die ohnehin nur schwach ausgeprägte Trennung zwischen dem Dimer- und Tetramersignal praktisch vollständig. Sollte GluRB tatsächlich auf dem EM-Trägernetz überwiegend in Dimere zerfallen, so würde sich dies beim Waschen mit H_2O durch elektrostatische Anziehung der Untereinheiten möglicherweise weniger stark bemerkbar machen als bei der Verwendung von NH_4OAc. Damit ließe sich dann die Beobachtung des höheren Anteils von Tetrameren nach dem Waschen mit Wasser erklären. Angesichts der geringen Unterschiede bleibt ein solcher Interpretationsversuch freilich Spekulation.

Wesentlich besser definierte Signale wurden nach der Behandlung des Proteins mit 10 mM Glutaraldehyd bei RT erhalten. Offensichtlich bewirkt die Vernetzung der Untereinheiten eine kompaktere äußere Form der Oligomere, wodurch die STEM-Signale eine weniger breite Verteilung und damit höhere Auflösung besitzen. Als wesentliche Beobachtung der Quervernetzung wurde festgestellt, daß es zumindest teilweise gelang, GluRB aus dem dimeren Zustand in eine tetramere Zusammensetzung zu überführen. Weniger als die Hälfte aller Partikel zeigten noch ein MW von unter 300 kD, dagegen hatten mehr als ein Drittel ein Molekulargewicht von

507 kD. Darüberhinaus wurde auch eine geringe Menge höherer Oligomere, wahrscheinlich Hexamere, beobachtet, wenngleich deren Signal deutlich schlechter definiert war. Die Bedingungen der Fixierung führten nicht zu einer vollständigen Quervernetzung in eine Spezies, was mit parallel durchgeführten Quervernetzungsexperimenten übereinstimmt (Huse, N., Tichelaar, W., unveröffentlicht). Da diese Untersuchungen aber noch nicht abgeschlossen sind und eine endgültige Bewertung noch aussteht, muß die Deutung der hier erzielten Ergebnisse sehr vorsichtig erfolgen. Das als Folge der Fixierung auftretende und deutlich abgesetzte Signal bei 507 kD stimmt jedenfalls mit dem Molekulargewicht aus dem Dichtegradienten von 495 kD gut überein und macht für GluRB in jedem Fall eine tetramere Zusammensetzung viel wahrscheinlicher als eine pentamere. Für letztere gibt es nach den STEM-Messungen, insbesondere beim Betrachten der Molekulargewichte quervernetzter GluRB-Proben, keine Hinweise. Ebenso werden keine Monomere oder Trimere beobachtet. Der untersuchte Glutamatrezeptor könnte also ein tetramerer Ionenkanal sein, der sehr leicht in dimere Einheiten zerfällt. Um hierfür bessere experimentelle Anhaltspunkte zu erhalten, müßte es gelingen, die Quervernetzung so zu optimieren, daß GluRB als einzelne, hochmolekulare Bande in einem reduzierenden SDS-Gel erscheint. Erst dann kann man sicher sein, daß ein Zerfall unter den Bedingungen des STEM-Experimentes ausgeschlossen werden darf. Intermolekulare Verknüpfungen müßten natürlich weiterhin ausgeschlossen bleiben. Das hieraus ermittelte Molekulargewicht würde dann eine weit bessere Vorstellung vom oligomeren Zustand des GluRB vermitteln, als dies die bislang durchgeführten Experimente tun.

Die schon mehrfach angesprochenen Quervernetzungsexperimente, die bislang mit GluRB durchgeführt wurden (Huse, N., Tichelaar, W., unveröffentlicht) unterstützten die Hypothese eines tetrameren Membranproteins. Unter Verwendung von Glutaraldehyd und DSS als Fixierungsmittel konnten Hinweise auf das Entstehen von maximal 4 Banden erhalten werden. Allerdings trat auch hier die Beobachtung auf, daß in reduzierenden SDS-Gelen nur diejenigen Banden, die GluRB-Monomer sowie Trimer darstellten, bei längerer Reaktionszeit verschwanden. Die Dimerbande blieb dagegen neben der Tetramerbande erhalten. Vorstellbar ist, daß Quervernetzungen mit den verwendeten Fixierungsmitteln innerhalb eines Dimers einfacher stattfinden können, als solche zwischen Dimeren.

Die Verwendung von DTSSP zur Vernetzung, einer Verbindung, die nach der Fixierung reduktiv gespalten werden kann, überführte GluRB praktisch vollständig in eine oligomere Spezies, deren Molekulargewicht deutlich über demjenigen eines Dimers liegt, eine Unterscheidung, ob es sich um Tetramere oder Pentamere handelt, bislang aber noch nicht zuläßt (Kümmerle, G.,

unveröffentlicht). Ungeachtet dessen ist das völlige Fehlen von Dimeren ein großer Vorteil gegenüber den anderen Vernetzungsexperimenten. Dieser Ansatz ist vor allem hinsichtlich einer Optimierung der STEM-Analyse bedeutsam. Gegenüber silbergefärbten SDS-Gelen fällt hier eine Berechung des Molekulargewichtes leichter und eine Beantwortung der Frage, ob quervernetzter GluRB ein tetrameres oder pentameres Protein ist, sollte dann möglich sein.

Ein letzter Hinweis auf das Molekulargewicht des in dieser Arbeit exprimierten Glutamatrezeptors wurde durch eine vorläufige 3D-Rekonstruktion ausgehend von mehr als 10000 negativ gefärbten GluRB-Einzelpartikeln erhalten (Tichelaar, W., Madden, D. R., unveröffentlicht). Die derzeit vorliegenden Ergebnisse lassen zumindest darauf schließen, daß es sich bei dem in dieser Arbeit exprimierten GluRB nicht um ein dimeres Protein handeln kann. Das berechnete 3D-Modell schließt ein Molekulargewicht von weniger als 300 kD aufgrund der dann entstehenden isolierten Bereiche von Elektronendichte aus. Eine Unterscheidung von Tetrameren und Pentameren läßt sich allerdings erneut nicht ausreichend sicher treffen, gerade auch weil eine 4- oder 5-zählige Symmetrie des Modells nicht zu erkennen ist.

Zusammenfassend läßt sich damit festhalten, daß die auf biochemischem Wege ohnehin nur schwer zu treffende Beurteilung der oligomeren Zusammensetzung eines Proteins für den hier untersuchten GluRB nicht eindeutig gelungen ist. Einzeln betrachtet kann keine der angewandten Methoden eine stichhaltige Antwort darauf geben, ob der ionotrope Glutamatrezeptor nun tetramer oder pentamer aufgebaut ist. In ihrer Gesamtheit deuten die Ergebnisse jedoch auf eine tetramere Zusammensetzung des Proteins hin. Neben dem einzig direkten Anhaltspunkt hierfür, der Molekulargewichtsbestimmung mittels zonaler Ultrazentrifugation, wurde eine Reihe von indirekten Hinweisen zusammengetragen, die vor allem darauf abzielten, die Nicht-Existenz von Pentameren zu dokumentieren. Hier sind vor allem die Ergebnisse aus STEM-Messungen und Quervernetzungsexperimenten zu nennen. Die Massenbestimmung durch zonale Ultrazentrifugation hat dabei den wesentlichen methodischen Vorteil, daß keine Wechselwirkungen mit festen Phasen Einfluß nehmen können, leidet allerdings an der begrenzten Auflösung. Eine Aussage aus der 3D-Rekonstruktion ist derzeit nur äußerst begrenzt möglich. Solange das Modell keine Symmetrieeigenschaften zeigt, wird sich dies auch nicht wesentlich ändern. Letzten Endes sind die zusammengetragenen Ergebnisse wohl noch nicht stichhaltig genug, um eine Pentamerisierung des GluRB völlig ausschließen zu können.

Auffällig ist es, wie häufig in den Untersuchungen Molekulargewichte auftraten, die auf dimerisierte Membranproteine hinweisen. Bei der SEC noch recht ungenau, wurden doch bei STEM-Analysen sowie Quervernetzungsexperimenten eindeutig GluRB-Dimere identifiziert. Dagegen

gab es bei keinem einzigen Experiment Hinweise auf Trimere oder Pentamere, von der vorübergehenden Trimerbildung bei der Fixation einmal abgesehen. Offenbar stellen Dimere neben den vollständig oligomerisierten Ionenkanälen eine weitere stabile Spezies dar. Interessanterweise wurde bei Untersuchungen an der extrazellulären Domäne des GluRD ebenfalls Dimerisierung beobachtet (Kuusinen, 1999). Der fehlende Nachweis auf höhere Oligomere wurde mit dem Fehlen wichtiger Determinanten begründet. So könnte eine vollständige Oligomerisierung etwa durch die in den untersuchten Konstrukten fehlende Membrandomäne gesteuert werden, oder sie kommt nur zustande, wenn das Protein in eine Doppellipidschicht eingebaut bzw. in einer Detergenzmizelle solubilisiert ist.

Alle hier diskutierten Beobachtungen sind mit der Vorstellung kompatibel, daß die AMPA-Rezeptoren tetramere Membranproteine sind, die sich strukturell aus zwei Hälften zusammensetzen, welche aus jeweils einem GluR-Dimer bestehen. Dabei scheinen die Kontakte zwischen den Untereinheiten eines Dimers stärker zu sein, als zwischen den beiden Dimeren, sodaß Destabilisierungen des Proteins zu einem Zerfall in zwei Hälften führen. In diesem Sinne könnten ionotrope Glutamatrezeptoren als “dimer of dimers” aufgefaßt werden. Unter welchen Bedingungen es zu dem Zerfall kommt, ist nicht hinreichend geklärt. In Analogie zum Aufbau des pentameren Acetylcholinrezeptor, wo eine festgelgete Reihenfolge beim Zusammenbau der Untereinheiten postuliert wurde, bei dem erst ein α, β, γ-Trimer gebildet wird, woran sich nacheinander eine δ-und eine weitere α-Untereinheit anlagern (Green, 1993), könnte auch im Falle des ionotropen Glutamatrezeptors ein Ordnungsprinzip gelten, bei dem erst zwei Dimere entstehen müssen, die dann zu einem Tetramer dimerisieren.

5.4. REKONSTITUTIONSEXPERIMENTE

Eine Rekonstitution des aufgereinigten GluRB konnte in dieser Arbeit nicht erreicht werden. Stattdessen offenbarte das Membranprotein bei der Entfernung des Detergenzes in Gegenwart von Lipiden eine hohe Tendenz zur Aggregation.

In den ersten Experimenten wurde eine Rekonstitution durch Detergenzdialyse angestrebt. Kontrollexperimente ohne das Hinzufügen von GluRB zeigten zunächst, daß unter den geplanten Dialysebedingungen Liposomen mit einer recht homogenen Größenverteilung von 50 bis 200 nm Durchmesser gebildet werden konnten. Die Vesikel zeigen bei negativer Färbung nur geringen Kontrast. In Gefrierbruchexperimenten erscheint die Lipidschicht als glatte Oberfläche ohne besondere Kennzeichen.

Bei Anwesenheit von GluRB wurde erwartet, daß sich eventuell eingebaute Ionenkanäle als kleine punktförmige Strukturen auf der sonst glatten Vesikeloberfläche zeigen sollten. Das Mengenverhältnis von Lipid zu Protein war mit einem Wert von 5 so niedrig gewählt, daß zumindest bei der Gefrierbrechung auch ein teilweiser Einbau des Proteins noch hätte nachgewiesen werden können. Bei beiden eingesetzten Detergenzien und allen verwendeten Lipidzusammensetzungen wurde das zugegebene Membranprotein dagegen stets in großen Aggregaten gefunden, die in negativ gefärbten Präparaten als schwarze Klumpen, in gefriergebrochenen Proben als deutlich von den Liposomen zu unterscheidendes, körniges Material sichtbar waren. Dabei schienen die Aggregate bevorzugt an oder auf den Vesikeln zu liegen, was auf eine Assoziation hindeuten könnte. Die in diesen Experimenten gebildeten Vesikel zeigten keinerlei Hinweis auf Insertion von Membranprotein in ihre Doppellipidschicht. In negativ gefärbten Proben erschien diese ebenso kontrastarm wie diejenige der Kontrollvesikel. Bei gefriergebrochenen Präparaten wurde entweder eine ebenso glatte Oberfläche wie in den Kontrollen oder eine unregelmäßige Struktur beobachtet, die auf das Auseinanderreißen von Proteinaggregaten und Liposomen zurückgehen dürfte (Weinkauf, S.: Persönliche Mitteilung). Somit ist davon auszugehen, daß GluRB bei langsamer Dialyse des Detergenzes in Gegenwart von Lipid vollständig aggregiert und sich nicht in die sich parallel ausbildenden Liposomen einlagern läßt.

Analoge Ergebnisse wurden bei anderen Rekonstitutionsmethoden erhalten. Auch bei dem Versuch, eine Proteininkorporation durch schnelle Verdünnung der Probe und damit Erniedrigung der Detergenzkonzentration deutlich unterhalb der CMC zu erreichen (Helenius, 1981; Stephens, 1997; van der Does, 1998), wurden lediglich Proteinaggregate sowie weiterhin leere Liposomen beobachtet.

Ein weiterer in dieser Arbeit unternommener Versuch einer GluRB-Rekonstitution setzte vorgefertigte Liposomen ein, die mit einer zuvor bestimmten Menge Detergenz gerade soweit destabilisiert wurden, daß ein Einbau von Membranproteinen spontan erfolgen sollte (Jain, 1987; Richard, 1990; Knol, 1998). Obwohl zuvor sichergestellt worden war, daß die Destabilisierung der Liposomen gerade das richtige Maß erreicht hatte, zeigte sich ein solcher Einbau im Falle des GluRB jedoch nicht. Analog zu den Methoden Dialyse und Verdünnung aggregiert GluRB, während die Liposomen wiederum keine Hinweise auf eingebaute Ionenkanäle zeigen.

Die durchgängig in allen Rekonstitutionsexperimenten erhaltenen Hinweise auf Proteinaggregation belegen eine hohe Tendenz des Glutamatrezeptors bei Entfernung des Detergenzes vollständig zu aggregieren. Im Wesentlichen sind hierfür folgende Ursachen vorstellbar: Zum einen könnte die Aggregation auf eine inhärente Instabilität des Proteins hindeuten, zum anderen wird

der Erfolg eines Rekonstitutionsexperimentes von einer Reihe von Parametern beeinflußt, die bei Nichtbeachtung einen Einbau verhindern können. Auf den ersten Punkt wird später bei der Diskussion der Protein-Lipid-Wechselwirkungen eingegangen. Zunächst werden noch diejenigen wichtigen Kenngrößen einer Rekonstitution angesprochen, mit denen sich die vorliegende Arbeit auseinandergesetzt hat.

Die bislang einzige Methode einer direkten Messung der Funktionalität des GluRB besteht in der Bestimmung der Ligandenbindungsaktivität. Damit wird allerdings keine Aussage erlaubt über die Funktionalität des Membranteils, der den Ionenfluß regelt. Solange ein Aktivitätstest dieser Domäne aber nicht zur Verfügung steht, muß die Ligandenbindung als Referenz für die Aktivität des GluRB dienen. Kann diese nicht mehr nachgewiesen werden, ist die Funktion des Proteins in jedem Fall stark beeinträchtigt. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, hängt diese sehr stark vom verwendeten Detergenz ab. Insofern empfielt es sich in jedem Fall, für die Rekonstitution ein Detergenz zu verwenden, daß eine möglichst hohe Bindungsaktivität zuläßt. Dies gilt für Decylmaltosid, weit weniger jedoch für Oktylglukosid, wo die Bindungsaktivität um einen Faktor 4 geringer ist. Da jedoch in beiden Fällen die gleichen, negativen Resultate bezüglich der GluRB-Aggregation gemacht wurden, scheint das Detergenz nicht derjenige Parameter gewesen zu sein, an dem die Rekonstitution scheiterte. OG wurde zu Beginn der Experimente eingesetzt, weil eine erfolgreiche Rekonstitution von GluRD mit OG berichtet wurde (Jespersen, 1999). Diese wurde mit der Bildung von GluRD-Antikörpern in Kaninchen nach einer Immunisierung mit GluRD-Liposomen begründet. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung fand dort allerdings nicht statt. Mit Blick auf die hier dargelegten Ergebnisse erscheint es wahrscheinlich, daß auch dort nur an Liposomen assoziierte Proteinaggregate entstanden sind, die aber die Fähigkeit zur Immunisierung behielten. In jedem Fall sollte bei künftigen Rekonstitutionsversuchen verstärkt mit DM gearbeitet werden. Sollte die CMC in der gewählten Methodik keine limitierende Rolle spielen, z. B. durch die Verwendung von “BioBeads” (s. u.), kann auch auf DDM oder Triton X-100 zurückgegriffen werden.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Wahl des Lipids, das zur Darstellung der Liposomen verwendet werden soll. Als Anhaltspunkt für GluRB diente dabei die Lipidzusammensetzung von Neuronen (Freysz, 1968), die der natürlichen Umgebung der ionotropen Glutamatrezeptoren - der postsynaptischen Membran - sehr ähnlich sind. Da die in dieser Arbeit verwendete cDNA des Glutamatrezeptors aus der Ratte stammt und Phosphatidylcholin der Hauptbestandteil in deren Neuronen ist, wurde dieses Lipid in den Mittelpunkt der Untersuchungen gestellt. Die verschiedenen Ansätze, in denen sowohl definierte Mischungen aufgereinigter Lipide als auch

das eine Vielzahl verschiedener Lipide als Verunreinigungen enthaltende Asolectin verwendet wurden, gaben dem Membranprotein ein großes Angebot vor, falls nötig sich die zur Rekonstitution essentiellen Lipide heraussuchen zu können. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß die Rekonstitution an einer ungeeigneten Lipidzusammensetzung gescheitert sein könnte. Gerade mit Asolectin gelang eine Rekonstitution mit hoher Funktionalität von synaptischen (Hermoni-Levine, 1990; Ryan, 1996) sowie einer Reihe weiterer Membranproteine (Sukharev, 1993; Ziegler, 1993; Awashti, 1998; Villa, 1998; Saba, 1999).

Die Phasenübergangstemperatur der Lipide ist ein weiterer Parameter, der eine Rekonstitution beeinflussen kann. Da unterhalb dieser Temperatur die hydrophoben Alkylketten in einem unbeweglichen, gelartigen Zustand vorliegen und biologisch wichtige Transportprozesse durch eine derartige Membran nicht stattfinden können (Cevc, 1987), ist es durchaus vorstellbar, daß dann auch eine Rekonstitution von Membranproteinen unmöglich würde. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Lipidgemischen lag die Reaktionstemperatur zumeist bei 4 °C, in einem Fall sogar 16 °C. Diese Temperatur ist oberhalb der Phasenübergangstemperatur von PC aus Eidotter, sodaß sich diese Lipide in der “flüssigen” und damit sehr beweglichen Phase befunden haben sollten. Außerdem konnte durch Inkubation des Gemischs von Proteinaggregat und Liposomen bei 37 °C keine weiteren Veränderung beobachtet werden. Mit Asolectin sind Rekonstitutionen auch bei 4 °C gelungen (Callaghan, 1997; Awashti, 1998). Das Verhalten von GluRB bei Temperaturerhöhung wurde in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht. Deswegen ist nicht bekannt, inwieweit die Rekonstitutionstemperatur noch erhöht werden könnte, ohne das Protein zu denaturieren. Angesichts des bei 16 °C negativen Ergebnisses ist ein derartiger Ansatz vielleicht nicht erfolgversprechend, gleichwohl wären Versuche zur Temperaturstabilität von GluRB sicher sinnvoll. Beobachtet wurden 2D-Kristallisationen, die durch Rekonstitutionen bei sehr niedrigem LPR von unter 1 und Dialysetemperaturen von oberhalb 30 °C erzielt wurden (Hasler, 1998; Williams, 1999; Zhuang, 1999). Mit GluRB müßte aber das Ziel zunächst einmal sein, überhaupt Hinweise auf Rekonstitution zumindest einzelner Ionenkanäle zu erhalten.

Einem weiteren Einwand, der fehlenden Bildung ternärer Mizellen aus Protein, Lipid und Detergenz, die die fehlende Rekonstitutionsfähigkeit des GluRB erklären könnte, wurde in dieser Arbeit mit sehr langen Inkubationszeiten von solubilisiertem Lipid und Protein begegnet. Lipid und Protein enthaltende Mizellen sind die Vorstufe der Proteoliposomen, weil durch Entfernung des Detergenzes Lipid-Protein-Kontakte erzwungen werden, um die hydrophoben Bereiche vor dem Kontakt mit wäßrigem Medium zu schützen (Rigaud, 1995). Kommt es nicht zu deren

Bildung, verbleiben also Lipide und Protein in getrennten Mizellen, führt die Detergenzentfernung zwangsläufig zur Bildung leerer Liposomen sowie aggregierten Proteins, sofern die Lipid-Protein-Kontakte nicht auch zwischen verschiedenen Mizellen hergestellt werden können. Im Falle des GluRB war im Rahmen dieser Arbeit nicht feststellbar, ob ternäre Mizellen gebildet wurden oder die Rekonstitution trotz deren Bildung unterblieb. Nach allem, was hierüber veröffentlicht ist, stellt sich ein Gleichgewicht aller Komponenten in den Mizellen aber recht schnell ein (Richard, 1990; Hasler, 1998; van der Does, 1998; Williams, 1999). Die Inkubationszeit betrug maximal 1 h bei RT, in den meisten Fällen sogar deutlich darunter. Insofern waren die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationszeiten ausreichend. Möglicherweise läßt sich GluRB allerdings unter den bisher erprobten Bedingungen nicht in ternäre Mizellen überführen. Vorstellbar ist, daß Protein-Protein-Kontakte bei der Entfernung des Detergenzes gegenüber Lipid-Protein-Kontakten bevorzugt werden und somit Aggregation eintritt.

Überhaupt scheinen ausreichende Protein-Lipid-Kontakte sehr wichtig bei der Rekonstitution von Membranproteinen zu sein. Ein sehr augenfälliges Beispiel hierfür gibt die Lactose-Permease von *Escherichia coli* (Zhuang, 1999). Hier konnte Protein nach einer Anionenaustauschchromatographie nicht mehr rekonstituiert werden. Lediglich das eine Stufe in der Aufreinigung vorher isolierte, weniger saubere Protein ließ sich in Liposomen überführen und bildete gar 2D-Kristalle. Das vollständig aufgereinigte Protein dagegen endete, genau wie GluRB in dieser Arbeit, stets in aggregiertem Zustand, während die gleichfalls gebildeten Liposomen leer blieben. Die Erklärung wurde in der Anionenaustauschchromatographie gefunden. Diese entfernt nicht nur Proteinverunreinigungen, sondern auch natives Lipid, das bei der Solubilisierung des Membranproteins an die Permease assoziiert bleibt. Der Verlust dieses gebundenen Lipids wirkte derartig destabilisierend, daß der Versuch einer Rekonstitution zur Aggregation des Proteins führte. Wurden Phospholipide nach der Anionenaustauschchromatographie wieder beigefügt, so kam es beim anschließenden Rekonstitutionsversuch zur Bildung von sehr großen Vesikeln (∅>1,5 μM), in denen weder eingebaute Partikel noch Proteinaggregate zu sehen waren. Die Rekonstitution dieses Proteins gelingt auf jeden Fall nicht mehr in gleicher Weise wie zuvor. Dies kann als Hinweis auf die Wichtigkeit nativer Lipide verstanden werden. Interessanterweise wurden in vorliegender Arbeit beim Versuch der Rekonstitution des GluRB in Asolectinliposomen ebenfalls riesige Vesikel ähnlichen Durchmessers erhalten, ebenfalls ohne negativ gefärbtes oder nach Gefrierbruch rekonstituiertes Protein zu erkennen zu geben.

In einem anderen Beispiel, der Delipidierung eines nikotinischen Acetylcholinrezeptors, wurde festgestellt, daß sowohl Ligandenbindung als auch Ionenkanalfunktionalität von einer Lipid-

Einzelschicht um den hydrophoben Membranbereich abhängig sind (Jones, 1988). Wurde dieses Lipid entfernt, kam es zu einer Inaktivierung des Rezeptors. Auch im Falle der Aufreinigung des P-Glykoproteins war der Erhalt von Protein-Lipid-Kontakten entscheidend für die ATPase-Aktivität des Proteins (Callaghan, 1997). Die nach Anionenaustauschchromatographie reduzierte Aktivität konnte durch Zugabe von Phospholipiden wiederhergestellt werden.

Die Frage nach der Lipidierung des GluRB scheint deshalb ein wichtiger Ansatzpunkt für weitere Experimente zu sein. Bislang wurde dieser Aspekt bei der Aufreinigung des Proteins nicht genauer untersucht, sodaß nicht bekannt ist, inwieweit gereinigter GluRB noch assoziierte Lipide enthält. Diese könnten bei der Solubilisierung der Zellmembranen mit Triton X-100 vom Membranteil des GluRB abgelöst werden (siehe Kap. 5.2), ebenso wie bei den nachfolgenden Affinitäts-Chromatographieschritten. Bei der IMAC wird vor Elution des Proteins die Salzkonzentration von 1M auf 100 mM erniedrigt, was die hydrophoben Wechselwirkungen soweit erniedrigen könnte, daß Lipid-Protein-Kontakte gelöst werden.

Trotz der deutlichen Verbesserungen hinsichtlich der Proteinexpression und Aufreinigung blieb die geringe Menge an intaktem Glutamatrezeptor während der gesamten Untersuchung ein erhebliches Problem. Die große Zahl von Parametern, die bei der Rekonstitution von Membranproteinen eine Rolle spielen, ließ eine systematische Untersuchung des Verhaltens von GluRB kaum zu. Im Grunde konnten zahlreiche Fragen nur angerissen werden, und weitere Experimente wären sicher wünschenswert. Leider konnte kein Hinweis darauf erarbeitet werden, welche der angewandten Rekonstitutionsmethoden die erfolgversprechendste sein könnte. Dies hätte eine große Hilfe bei der Eingrenzung kommender Experimente sein können. Auch die bereits erwähnten unpolaren Polystyrenkugeln (“BioBeads”), die ebenfalls zum schnellen Entfernen von Detergenz eingesetzt werden und mit denen Rekonstitutionen von Membranproteinen gelangen (Rigaud, 1998; Kruip, 1999; Lambert, 1999; Mohraz, 1999), wurden zur Rekonstitution von GluRB in Liposomen eingesetzt. Ein erster Versuch (Tichelaar, W., unveröffentlicht) zeigte aber die gleichen Symptome wie die bereits hier beschriebenen Methoden, und von einer genaueren Untersuchung wurde deshalb abgesehen. Methodisch ähnelt das Verfahren der Detergenzdialyse, weil es zu einer ähnlich langsamen Entfernung des Detergenzes kommt. Insofern sind auch die Erfolgsaussichten beider Methoden für den GluRB zur Zeit etwa gleich zu bewerten.

Auf dem Wege hin zu einer Strukturbestimmung des Rezeptors kann die Rekonstitution trotz der bislang unbefriedigenden Ergebnisse noch eine große Rolle spielen. Vielversprechend scheint in jedem Fall eine genauere Betrachtung der Lipid-Protein-Wechselwirkungen zu sein.

Gerade das Verständnis, ob, welche und vor allem wieviele native Lipidmoleküle bei der Expression und Aufreinigung an GluRB koordiniert sind, dürfte ein erster Schritt hin zu einer erfolgreichen funktionellen Rekonstitution des Proteins sein. Die Destabilisierung anderer Proteine bei Entfernung insbesondere der nativen Lipide (Jones, 1988; Callaghan, 1997; Zhuang, 1999) macht die Bedeutung dieser Frage deutlich und ist in den hier vorgestellten Rekonstitutionsversuchen eine mögliche Ursache des Mißerfolges. Rekonstitutionen in noch engerer Anlehnung an die Lipidzusammensetzung in Neuronen, beispielweise durch andere Phospholipide oder Zugabe des Neuronenstrukturlipids Sphingomyelin, das in einem Anteil von etwa 6 % vorkommt (Freysz, 1968), könnten zu einer Verbesserung führen. Ein anderer Ansatz ist die Verkürzung des Reinigungsprotokolls, um die Gefahr eines Auswaschens der Lipide zu minimieren. Die Herstellung eines GluRB-Konstruktes mit 10 statt nur 6 Histidinen am C-Terminus ist bereits in Vorbereitung. Ob es tatsächlich gelingen wird, auf die M1-Antikörpersäule zu verzichten und die Reinigung auf einen Schritt zu verkürzen, muß angesichts des geringen Anteils von GluRB-Protein in den Membranen (0,1 %) abgewartet werden.

Die Beobachtung, daß die Proteinaggregate oftmals an die parallel gebildeten Liposomen assoziieren, könnte auf das Vorliegen einer Lipidbindungsstelle im Membranbereich des GluRB hindeuten. Eine solche wurde auch beim bakteriellen Transportprotein SecA festgestellt und als Ursache der Aggregation bei Rekonstitutionsversuchen vermutet (Weinkauf, S.: Persönliche Mitteilung). Auch diese Möglichkeit könnte sich durch eine genauere Untersuchung der Lipid-GluRB-Wechselwirkungen erhärten lassen. Ein weiterer Grund für die bisherigen Fehlschläge der GluRB-Rekonstitution könnte auch der zu geringe Durchmesser der gebildeten Liposomen sein (Weinkauf, S.: Persönliche Mitteilung). Wird der Krümmungsradius eines Liposoms zu klein, werden Membranproteine nicht mehr eingebaut (Defrise-Quertain, 1989). Allerdings würde dies nur für die Vesikel aus gereinigten Phospholipiden gelten. Mit Asolectin wurden ja bereits sehr große Vesikel gebildet und trotzdem kein Einbau beobachtet.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit konnte ein Protokoll für die Isolierung von bisher nicht zugänglichen Mengen des ionotropen Glutamatrezeptors GluRB erarbeitet werden. Insbesondere die im Vergleich zu früheren Präparationen deutlich verbesserte Reinheit und Homogenität des Proteins ermöglichten erste Schritte hin zu einer strukturellen Aufklärung. Wenngleich diese bei den verschiedenen Ansatzpunkten - hydrodynamische Eigenschaften, Rekonstitution, Quervernetztung, 3D-Rekonstruktion und auch den in jüngerer Zeit begonnenen 2D-Kristallisationversuchen (Kümmerle, G., unveröffentlicht) - bislang nur zu vorläufigen und oftmals negativen Ergebnissen geführt hat, so stellt doch die Verfügbarkeit des Proteins im heutigen Maßstab eine wichtige Voraussetzung für alle genannten und weitere Untersuchungen dar.

Die Untersuchungen der hydrodynamischen Eigenschaften des Proteins konnten die oligomere Zusammensetzung des Ionenkanals nicht endgültig aufklären. Weitere Untersuchungen sind deshalb unerlässlich. Insbesondere die bessere Verknüpfung von Quervernetzungs- und STEM-Untersuchungen scheint ein vielversprechender Ansatz zur Ermittlung des Molekulargewichtes zu sein. Dennoch sind die hier vorgestellten Ergebnisse mit der Vorstellung eines tetrameren Ionenkanals (Kuryatov, 1994; Laube, 1997; Mano, 1998; Rosenmund, 1998) eher in Einklang zu bringen, als mit einer pentameren Zusammensetzung (Wenthold, 1992; Ferrer-Montiel, 1996; Wu, 1996; Premkumar, 1997; Hawkins, 1999). Die Hinweise auf das Vorliegen von Dimeren in STEM- und Quervernetzungsexperimenten, seien sie gedeutet als Zerfallsprodukte des intakten-Kanals oder als weitere stabile Konformation des Proteins, lassen die Hypothese zu, daß sich Glutamatrezeptoren zur Ausbildung des Ionenkanals aus zwei Dimeren zusammensetzen, wobei die Wechselwirkungen innerhalb eines Dimers stärker sind als diejenigen zwischen ihnen. Inwieweit dies physiologische Bedeutung haben könnte, ist derzeit aber nicht bekannt.

Auf dem Wege zu einer strukturellen Charakterisierung des GluRB sollten Rekonstitutionsversuche auch weiterhin unternommen werden, obgleich sich Hinweise auf funktionelle Inkorporation des Proteins in dieser Arbeit nicht ergaben. Besonders wichtig für das Membranprotein scheint es zu sein, auch im solubilisierten Zustand Bedingungen vorzufinden, die seinem nativen Zustand nahe kommen (Jones, 1988; Callaghan, 1997; Zhuang, 1999). Aufgrund der weiterhin begrenzten Verfügbarkeit von GluRB sowie der zahlreichen Parameter, die die Rekonstitution beeinflussen, haben die hier vorgestellten Experimente allenfalls vorläufigen Charakter und sollten nicht zum Anlaß genommen werden, die Rekonstitution grundsätzlich als wichtige

Methode zur strukturellen Charakterisierung des GluRB in Frage zu stellen. Die gegenwärtig durchgeführte Einzelpartikelanalyse (Tichelaar, W., Madden, D. R., unveröffentlicht) könnte durch eine gelungene Rekonstitution wesentlich erleichtert werden.

Leider ist die Expression des neuronalen α7-Acetylcholinrezeptors nicht mit gleichem Erfolg gelungen. Im Baculovirussystem konnte lediglich ein fragmentierter Rezeptor mit schlechten Ligandenbindungseigenschaften exprimiert werden. Hefen und Bakterien ergaben noch schlechtere Ergebnisse. Optimistisch mag die Erkenntnis stimmen, daß das Expressionsniveau der Fragmente in den Insektenzellen erstaunlich hoch war. Die Proteolyseanfälligkeit ist das eigentliche Problem in dieser Arbeit gewesen. Mittels einer verbesserten Aufreinigung, eventuell unter Verwendung einer 10fach-Histidinmarkierung oder anderer C-terminaler Epitope, könnte die Ermittlung der Proteaseschnittstelle gelingen. Die Expression müßte mit einem α7-Konstrukt versucht werden, in dem diese Schnittstelle durch Mutation entfernt wurde.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß das Baculovirusexpressionssystem gute Möglichkeiten bietet, eukaryontische Neurotransmitterrezeptoren in für strukturelle Untersuchungen notwendigem Maße zu erzeugen. Im Falle des α7-nAChR müßte es allerdings gelingen, die Fragmentierung zu unterdrücken. Die Aufreinigung und weitere Untersuchung bleibt angesichts der im Vergleich zu löslichen Proteinen weitaus niedrigeren Expression weiterhin schwierig. Die zahlreichen Arbeiten, die gegenwärtig an Membranproteinen durchgeführt werden, führen in absehbarer Zeit sicherlich zu einem besseren Verständnis dieser wichtigen Klasse von Proteinen und werden dann auch experimentelle Erfolge ermöglichen, die in dieser Arbeit noch nicht gelungen sind.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abele, R. (1998) *Biochemische und biophysikalische Charakterisierung extrazellularer Fragmente der ionotropen Glutamatrezeptoruntereinheit GluRD*. Universität Heidelberg, Heidelberg, pp. 116.

Abele, R., Svergun, D., Keinänen, K., Koch, M. H. J., Madden, D. R. (1999) *Biochemistry*, **38**, 10949-57.

Ackers, G.K. (1970) *Advances in Protein Chemistry*, **24**, 343-447.

Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H., Rees, D. C. (1987) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **84**, 5730-34.

Allen, T.M., Romans, A. Y., Kercret, H., Segrest, J. P. (1980) *Biochimica Biophysica Acta*, **601**, 328-42.

Anand, R., Peng, X., Lindstrom, J. (1993) *FEBS Letters*, **327**, 241-46.

Andersen, P.H., Tygesen, C. K., Rasmussen, J. S., Søegaard-Nielsen, L., Hansen, A., Hansen, K., Kiemer, A., Stidsen, C. E, (1996) *European Journal of Pharmacology*, **311**, 95-100.

Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G.-Q., Gouaux, E. (1998) *Nature*, **395**, 913-17.

Ascher, P., Nowak, L. (1988) *Journal of Physiology*, **399**, 247-66.

Atkinson, A.E., Henderson, J., Hawes, C. R., King, L. A. (1996) *Cytotechnology*, **19**, 37-42.

Auer, M., Scarborough, G. A., Kühlbrandt, W. (1998) *Nature*, **392**, 840-43.

Awashti, S., Singhal, S. S., Pikula, S., Piper, J. T., Srivastava, S. K., Torman, R. T., Bandorowicz-Pikula, J., Lin, J. T., Singh, S. V., Zimniak, P., Awashti, Y. C. (1998) *Biochemistry*, **37**, 5239-48.

Baker, E.K., Colley, N. J., Zuker, C. S. (1994) *EMBO Journal*, **13**, 4996-95.

Beck, C., Wollmuth, L. P., Seeburg, P. H., Sakmann, B., Kuner, T. (1999) *Neuron*, **22(3)**, 559-70.

Beckmann, R., Bubeck, D., Grasucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., Frank, J. (1997) *Science*, **278**, 2123-26.

Behle, P., Stern, P., Wyllie, D. J., Nassar, M., Schopfer, R., Colquhoun, D. (1995) *Proceedings of the Royal Society of British Biological Sciences*, **262**, 205-13.

Bennett, J.A., Dingledine, R. (1995) *Neuron*, **14**, 373-84.

Benveniste, M., Mayer, M. L. (1991) *Biophysical Journal*, **59**, 560-73.

Bertrand, D., Bertrand, S., Ballivet, M. (1992) *Neuroscience Letters*, **146**, 87-90.

Blackstone, C.D., Moss, S. J., Martin, L. J., Levey, A. I., Price, D. L., Huganir, R. (1992) *Journal of Neurochemistry*, **58**, 1118-26.

Blaukat, A., Herzer, K., Schroeder, C., Bachmann, M., Nash, N., Müller-Esterl, W. (1999) *Biochemistry*, **38(4)**, 1300-09.

Bliss, T.V.P., Collingridge, G. L. (1993) *Nature*, **361**, 31-39.

Böttcher, B., Wynne, S. A., Crowther, R. A. (1997) *Nature*, **386**, 88-91.

Boulter, J., Evans, K., Goldman, D., Martin, G., Treco, D (1986) *Nature*, **319**, 368-74.

Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Grennfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., Heinemann, S. (1990) *Science*, **249**, 1033-37.

Bradford, M.M. (1976) *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-54.

Brake, A., Wagenbach, M., Julius, D. (1994) *Nature*, **371**, 519-23.

Brennan, P.A. (1994) *Neuroscience*, **60**, 691-708.

Brose, N., Gasic, N. P., Vetter, D. E., Sullivan, J. M., Heinemann, S. F. (1993) *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 22663-71.

Buckingham, S.D., Matsuda, K., Hosie, A. M., Baylis, H. A., Squire, M. D., Lansdell, S. J., Millar, N. S., Satelle, D. B. (1996) *Neuropharmacology*, **35**, 1393-1401.

Callaghan, R., Berridge, G., Ferry, D. R., Higgins, C. F. (1997) *Biochimica et Biophysica Acta*, **1328**, 109-24.

Cammarata, K.V., Schmidt, G. W. (1992) *Biochemistry*, **31**, 2779-89.

Carter, D.B., Thomsen, D. R., Im, W. B., Lennon, D. J., Ngo, D. M., Gale, W., Im, H. K., Seeburg, P. H., Smith, M. W. (1992) *Bio/Technology*, **10**, 679-81.

Cevc, G., Marsh, D. (1987) *Phospholipid bilayers: Physical principles and models*. John Wiley and sons.

Cevc, G. (1991) *Biochemistry*, **30**, 7186-93.

Chang, G., Spencer, R. H., Lee, A. T., Barclay, M. T., Rees, D. C. (1998) *Science*, **282**, 2220-26.

Chang, K.T., Berg, D. K. (1999) *Journal of Neuroscience*, **19(10)**, 3701-10.

Changeux, J.-P., Edelstein, S. J. (1998a) *Neuron*, **21**, 959-980.

Changeux, J.-P., Bertrand, D., Corringer, P.-J., Dehaene, S., Edelstein, S., Léna, C., Le Novere, N., Marubio, L., Picciotto, M., Zoli, M. (1998b) *Brain Research Reviews*, **26**, 198-216.

Chen, M., Fernandez, H. L. (1999) *Frontiers in Bioscience*, **4**, A9-15.

Chiu, J., DeSalle, R., Lam, H. M., Meisel, L., Coruzzi, G. (1999) *Molecular Biology & Evolution*, **16(6)**, 826-838.

Clements, J.D., Westbrook, G. L. (1991) *Neuron*, **7**, 605-13.

Colquhoun, L.M., Patrick, J. W. (1997) *Advances in Pharmacology (New York)*, **39**, 191-220.

Correa, A.M., Agnew, W. S. (1988) *Biophysical Journal*, **54**, 569-75.

Corringer, P.-J., Galzi, J.-L., Eisele, J.-L., Bretrand, S., Changeux, J.-P., Bertrand, D. (1995) *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 11749-52.

Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J.-M., Hernandez, M.-C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T., Ballivet, M. (1990) *Neuron*, **5**, 847-56.

Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N., Rosenbusch, J. P. (1992) *Nature*, **358**, 847-856.

D'Angelo, E., Rossi, P. (1998) *Neural Plasticity*, **6(3)**, 8-16.

Dani, J., Heinemann, S. (1996) *Neuron*, **16**, 905-08.

Darszon, A., Vandenberg, C. A., Ellisman, M. H., Montal, M. (1979) *Journal of Cell Biology*, **81**, 446-52.

Davidson, D.J., Castellino, F. J. (1991) *Biochemistry*, **30**, 6167-74.

de Foresta, B., le Maire, M., Orlowski, S., Champeil, S., Lund, J. V., Møller, J. V., Michelangeli, F., Lee, A. G. (1989) *Biochemistry*, **28**, 2558-67.

Defrise-Quertain, F., Cabiaux, V., Vandenbranden, M., Wattiez, R., Falmagne, P., Ruysschaert, J. M. (1989) *Biochemistry*, **28**, 3406-13.

Deisenhofer, J., Michel, H. (1989) *EMBO Journal*, **8**, 2149-2170.

Deneris, E., Connolly, J., Rogers, S., Duvoisin, R. (1991) *Trends in Pharmacological Sciences*, **12**, 34-40.

Dennis, M., Giraudat, F., Kotzyba-Hibert, M., Goeldner, C., Hirth, C., Chang, J. Y., Lazure, C., Chrétien, M., Changeux, J.-P. (1988) *Biochemistry*, **27**, 2346-57.

Devillers-Thiéry, A., Galzi, J.- L., Eisele, J. L., Bertrand, S., Bertrand, D., Changeux, J.-P. (1993) *Journal of Membrane Biology*, **136**, 97-112.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F. (1999) *Pharmacological Reviews*, **51**, 7-61.

Dolder, M., Engel, A., Zulauf, M. (1996) *FEBS Letters*, **382**, 203-08.

Dong, H., O'Brien, R. J., Fung, E. T., Lanahan, A. A., Worley, P. F., Huganir, R. L. (1997) *Nature*, **386**, 279-84.

Doyle, D.A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R. (1998) *Science*, **280**, 69-77.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) *Analytical Chemistry*, **28**, 350-56.

Eakle, K.A., Kim, K. S., Kabalin, M. A., Fraley, R. A. (1992) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **89**, 2834-38.

Eiselé, J.L., Bertrand, S., Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Changeux, J.-P., Bertrand, D. (1993) *Nature*, **366**, 479-83.

Ellis, R.J., van der Vies, S. M. (1991) *Annual Reviews of Biochemistry*, **60**, 321-347.

Engel, A. (1978) *Ultramicroscopy*, **3**, 273-81.

Engel, A., Schönenberger, C. A., Müller, D. J. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, **7**, 279-84.

Fagg, G.E., Foster, A. C. (1993) *Neurotransmitter Receptors (Ed. Hucho, F.), Elsevier, Amsterdam*, 267-93.

Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M. (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**, 2741-44.

Fraser, M.J. (1992) *Current topics in Microbiology & Immunology*, **158**, 131-72.

Freese, A. (1999) *Medical Clinics of North America*, **83(2)**, 537-48.

Freysz, L., Bieth, R., Judes, C., Sensenbrenner, M., Jacob, M., Mandel, P. (1968) *Journal of Neurochemistry*, **15**, 307-15.

Galzi, J.-L., Devillers-Thiery, A., Hussy, N., Bertrand, S., Changeux, J.-P., Bertrand, D. (1992) *Nature*, **359**, 500-05.

García-Guzmán, M., Sala, F., Sala, S., Campos-Caro, A., Stühmer, W., Gutiérrez, L. M., Criado, M. (1995) *European Journal of Neuroscience*, **7**, 647-55.

Gerzanich, V., Kuryatov, A., Anand, R., Lindstrom, J. (1997) *Molecular Pharmacology*, **51(2)**, 320-27.

Gibco (1995) *Instruction Manual Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*.

Goldston (1998) *Solutions, Application Notes from Protein Solutions Inc.*, **109**.

Gotti, C., Hanke, W., Schlue, W. R., Briscini, L., Moretti, M., Clementi, F. (1992) *Neuroscience. 50(1)*, **50**.

Gotti, C., Hanke, W., Maury, K., Moretti, M., Ballivet, M., Clementi, F., Bertrand, D. (1994) *European Journal of Neuroscience*, **6**, 1281-91.

Green, T., Stauffer, K. A., Lummis, S. C. R. (1995) *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 6056-61.

Green, T., Heinemann, S. F., Gusella, J. F. (1998) *Neuron*, **20**, 427-44.

Green, W.N., Claudio, T. (1993) *Cell*, **74**, 57-69.

Gregor, P., Eshnar, N., Ortega, A., Teichberg, V. (1988) *EMBO Journal*, **7**, 2673-9.

Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M., Henderson, R. (1996) *Journal of Molecular Biology*, **259**, 393-421.

Grigorieff, N. (1998) *Journal of Molecular Biology*, **277(5)**, 1033-46.

Grisshammer, R., Duckworth, R., Henderson, R. (1993) *Biochemistry Journal*, **295**, 571-76.

Grisshammer, R., Tate, C. G. (1995) *Quarterly Reviews of Biophysics*, **28(3)**, 315-422.

Grosch, H.-W., Hasilik, A. (1998) *BioTechniques*, **24**, 930-34.

Groves, J.D., Tanner, M. J. A. (1994) *Journal of Membrane Biology*, **140**, 81-88.

Gunne, H., Hellers, M., Steiner, H. (1990) *European journal of biochemistry*, **187**, 699-703.

Guo, J.Z., Tredway, T. L., Chiappinelli, V. A. (1998) *Journal of Neuroscience*, **18(6)**, 1963-69.

Hampson, D.R., Wentholt, R. J. (1988) *Journal of Biological Chemistry*, **263**.

Hanahan, D. (1983) *Journal of Molecular Biology*, **166**, 577-80.

Hanahan, D. (1985) *Techniques for Transformation in Escherichia coli*. ICL Press, Oxford.

Hasler, L., Walz, T., Tittmann, P., Gross, H., Kistler, J., Engel, A. (1998) *Journal of Molecular Biology*, **279**, 855-64.

Hawkins, L.M., Chazot, P. L., Stephenson, F. A. (1999) *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 27211-18.

Hawthorne, J.N., Ansell, G. B. (1982) *Phospholipids*. Elsevier, Amsterdam.

Heitz, F., Nay, C., Guenet, C. (1997) *Journal of receptor and Signal Transduction Research*, **17**, 305-17.

Helenius, A., Sarvas, M., Simons, K. (1981) *European Journal of Biochemistry*, **116**, 27-35.

Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E., Downing, K. H. (1990) *Journal of Molecular Biology*, **213**, 899-929.

Hennessey, J.P.J., Scarborough, G. A. (1988) *Journal of Biological Chemistry*, **263(7)**, 3123-30.

Henry, A., Masters, C. L., Beyreuther, K., Cappai, R. (1997) *Protein Expression & Purification*, **10**, 283-91.

Hermoni-Levine, M., Rahamimoff, H. (1990) *Biochemistry*, **29**, 4940-50.

Heuser, J.M., Salpeter, S. R. (1979) *Journal of Cell Biology*, **82**, 150-73.

Hirai, H., Kirsch, J., Laube, B., Betz, H., Kuhse, J. (1996) *Neurobiology*, **93**, 6031-36.

Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W., Paulsen, H. (1994) *EMBO Journal*, **13**, 3423-29.

Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S. W., Heinemann, S. (1989) *Nature*, **342**, 643-48.

Hollmann, M., Heinemann, S. (1994a) *Annual reviews of neuroscience*, **17**, 31-108.

Hollmann, M., Maron, C., Heinemann, S. (1994b) *Neuron*, **13**, 1331-43.

Hom, L.G., Volkman, L. E. (1998) *BioTechniques*, **25**, 18-20.

Hopp, T.P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Ceretti, D. P., Urdal, D. L., Conlon, P. J. (1988) *Biotechnology*, **6**, 1204.

Huang, P., Stroffekova, K., Cuppoletti, J., Mahanty, S. K., Scarborough, G. A. (1996) *Biochimica et Biophysica Acta*, **1281(1)**, 80-90.

Huang, P., Liu, Q., Scarborough, G. A. (1998) *Analytical Biochemistry*, **259**, 89-97.

Hucho, F., Oberthur, W., Lottspeich, F. (1986) *FEBS Letters*, **205**, 137-42.

Hucho, F. (1993) *Neurotransmitter receptors*. Elsevier, Amsterdam, Vol. 24.

Huganir, R.L., Greengard, P. (1990) *Neuron*, **5**, 555-67.

Imoto, K., Busch, C., Sackmann, B., Mishina, m., Konno, T., Nakai, J., Bujo, H., Mori, Y., Fukuda, K., Numa, S. (1988) *Nature*, **335**, 645-48.

Ioannou, P.A., Amemiya, C. T., Garnes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M. A., DeJong, P. J. (1994) *Nature Genetics*, **6(1)**, 84-89.

Jain, M.K., Zakim, D. (1987) *Biochimica Biophysica Acta*, **906**, 33-68.

Jespersen, L.K., Kuusinen, A., Orellana, A., Keinänen, K., Engberg, J. (1999) *European Journal of Biochemistry*, Manuskript eingereicht.

Johnson, J.W., Ascher, P. (1987) *Nature*, **361**, 31-39.

Jonas, P. (1993) *Annals of the New York Academy of Sciences*, **707**, 126-35.

Jones, O.T., Eubanks, J. H., Earnest, J. P., McNamee, M. G. (1988) *Biochemistry*, **27**, 3733-42.

Joyce, K.A., Atkinson, A. E., Bermudez, I., Beadle, D. J., King, L. A. (1993) *FEBS Letters*, **335**, 61-64.

Kandel, E.R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M. (1991) *Principles of neuronal sciences*. Elsevier, New York.

Kaplan, R.S., Petersen, P. L. (1989) *Methode in Enzymology*, **172**, 393-99.

Karrasch, S., Bullough, P. A., Ghosh, R. (1995) *EMBO Journal*, **14**, 631-38.

Kashiwabushi, N., Ikeda, K., Araki, K., Aizawa, S., Mishina, M. (1995) *Cell*, **81**, 245-52.

Kawamoto, S., Onishi, H., Hattori, S., Miyaga, Y., Amaya, Y., Mishina, M., Okuda, K. (1991) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **181**, 756-63.

Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T. A., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1990) *Science*, **249**, 556-60.

Keinänen, K., Köhr, G., Seeburg, P. H., Laukkanen, M.-L., Oker-Blom, C. (1994) *Bio/Technology*, **12**, 802-06.

Keller, B.U., Hedrich, R., Vaz, W. L. C., Criado, M. (1988) *Pflügers Archiv*, **411**, 94-100.

Kennedy, M.B. (1997) *Trends in Neuroscience*, **20(6)**, 264-68.

Khan, A.I., Chowdry, B. Z., Yon, R. J. (1999) *European Journal of Biochemistry*, **259**, 71-78.

Kim, M., Yoo, O. J., Choe, S. (1997) *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **240**, 618-22.

Kitts, P.A., Green, G. (1999) *Analytical Biochemistry*, **268**, 173-78.

Kleymann, G., Boege, F., Hahn, M., Hampe, M., Vasudevan, S., Reiländer, H. (1993) *European Journal of Biochemistry*, **213**, 797-804.

Knol, J., Sjollema, K., Poolman, B. (1998) *Biochemistry*, **37**, 16410-15.

Knubovets, T., Osterhout, J. J., Connolly, P. J., Klibanov, A. M. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**, 1262-67.

Köhler, M., Kornau, H. C., Seeburg, P. H. (1994) *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 17367-70.

Köhr, G., Eckardt, S., Luddens, H., Monyer, H., Seeburg, P. H. (1994) *Neuron*, **12**, 1031-40.

Kristian, T., Siesjo, B. K. (1998) *Stroke*, **29**.

Kruip, J., Karapetyan, N. V., Terekhova, I. V., Rögner, M. (1999) *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 18181-88.

Krupp, J.J., Vissel, B., Heinemann, S. F., Westbrook, G. L. (1998) *Neuron*, **20**, 317-27.

Kühlbrandt, W., Wang, D.-N., Fujiyoshi, Y. (1994) *Nature*, **367**, 614-21.

Kuner, T., Wolmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H., Sakmann, B., (1996) *Neuron*, **17**, 343-52.

Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H., Kuhse, J. (1994) *Neuron*, **12**, 1291-1300.

Kutsuwada, T., Kashiwabushi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., Mishina, M. (1992) *Nature*, **358**.

Kuusinen, A., Arvola, M., Keinänen, K. (1995a) *EMBO Journal*, **14**, 6327-32.

Kuusinen, A., Arvola, M., Oker-Blom, C., Keinänen, K. (1995b) *European Journal of Biochemistry*, **233(3)**, 720-26.

Kuusinen, A., Abele, R., Madden, D. R., Keinänen, K. (1999) *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 28937-43.

Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-85.

Lam, H.M., Chiu, J., Hsieh, M. H., Meisel, L., Oliveira, I. C., Shin, M., Coruzzi, G. (1998) *Nature*, **396**, 125-26.

Lambert, O., Moeck, G. S., Levy, D., Plançon, L., Letellier, L., Rigaud, J. L. (1999) *Journal of Structural Biology*, **126**, 145-55.

Lampe, P.D., Kistler, J., Hefti, A., Bond, J., Müller, S., Johnson, R. G., Engel, A. (1991) *Journal of Structural Biology*, **107**, 281-90.

Lampinen, M., Pentikainen, O., Johnson, M. S., Keinänen, K. (1998) *EMBO Journal*, **17(16)**, 4704-11.

Lancelot, E., Beal, M. F. (1998) *Progress in Brain Research*, **116**, 331-47.

Langosch, D., Thomas, L., Betz, H. (1988) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **85**, 7394-8.

Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., Kuhse, J. (1997) *Neuron*, **18**, 493-503.

Laue, T.M., Rhodes, D. G. (1990) *Methods in Enzymology*, **182**, 566-586.

Lenhard, T., Reiländer, H. (1997) *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **238**, 823-30.

Leuschner, W.D., Hoch, W. (1999) *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 16907-16.

Li, Z., Wo, Z. G., Oswald, R. E. (1999) *Molecular Brain Reserach*, **67**, 211-220.

Liao, D., Hessler, N. A., Malinow, R. (1995) *Nature*, **375**, 400-404.

Lipton, S.A., Rayudu, P. V., Choi, Y. B., Sucher, N. J., Chen, H. S. (1998) *Progress in Brain Research*, **118**, 73-82.

Liu, D.T., Tibbs, G. R., Paoletti, P., Siegelbaum, S. A. (1998) *Neuron*, **21**, 235-48.

Lledo, P.-M., Zhang, X., Südhof, T. C., Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1998) *Science*, **279**, 399-403.

Loddenkötter, B., Kammerer, B., Fischer, K., Flugge, U. I. (1993) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **90**, 2155-59.

Lomeli, H., Sprengel, R., Laurie, D. J., Köhr, G., Herb, A., Seeburg, P. H., Wisden, W. (1993) *FEBS Letters*, **315**, 318-22.

Luckow, V.A., Lee, S. C., Barry, G. F., Olins, P. O. (1993) *Journal of Virology*, **67**, 4566-79.

Lund, S., Orlowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M., Møller, J. V. (1989) *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 4907-15.

MacDermott, A.B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., Barker, J. L. (1986) *Nature*, **321**, 519-22.

Mahanty, S.K., Rao, U. S., Nicholas, R. A., Scarborough, G. A. (1994) *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 17705-12.

Malenka, R.C. (1994) *Cell*, **78**, 535-538.

Mano, I., Teichberg, V. I. (1998) *Neuroreport*, **9**, 327-31.

Mao, Q., Scarborough, G. A. (1997) *Biochimica et Biophysica Acta*, **1327(1)**, 107-18.

Maricq, A.V., Peterson, A. S., Brake, A. J., Myers, R. M., Julius, D. (1991) *Science*, **254**, 432-7.

Maricq, A.V., Peckol, E., Driscoll, M., Bargmann, C. I. (1995) *Nature*, **378**, 78-81.

Martin, M.D., Karlin, A. (1997) *Biochemistry*, **36**, 10742-50.

Matthews, R.E.F. (1982) *Intervirology*, **17**, 4-&.

McCarroll, L., King, L. A. (1997) *Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 590-94.

McDermott, G., Prince, S. M., Freer, A. A., Hawthornthwaite, A. M., Papiz, M. Z., Cogdell, R. J., Isaacs, N. W. (1995) *Nature*, **374**, 517-21.

McGehee, D.S., Role, L. W. (1995) *Annual Reviews in Physiology*, **57**, 521-46.

Miroux, B., Walker, J. (1996) *Journal of Molecular Biology*, **260**, 289-98.

Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M., Unwin, N. (1999) *Journal of Molecular Biology*, **288**, 765-86.

Mody, I., De Koninck, Y., Otis, T. S., Soltesz, I. (1994) *Trends in Neurosciences*, **17**.

Mohraz, M. (1999) *Journal of Structural Biology*, **125**, 76-85.

Molnar, E., McIlhinny, R. A., Somogyi, P. (1994) *Journal of Neurochemistry*, **63**, 683-93.

Moor, H., Mühlethaler, K. Waldner, H., Frey-Wyssling, A. (1961) *Journal of Biophysic and Biochemistry in the Cytosol*, **10**, 1-13.

Müller, S. A., Goldie, K. N., Bürki, R., Häring, R., Engel, A. (1992) *Ultramicroscopy*, **46**, 317-34.

Nagai, K., Thogersen, H. C. (1987) *Methods in Enzymology*, **152**, 461-81.

Nakanishi, N., Shneider, N. A., Axel, R. (1990) *Neuron*, **5**, 569-81.

Nakanishi, S., Masu, M. (1994) *Annual Reviews in Biophysical and Biomolecular Structure*, **23**, 329-48.

Newbolt, A., Stoop, R., Virginio, C., Surprenant, A., North, R. A., Buell, G., Rassendren, F. (1998) *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 15177-82.

Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., Schmalzing, G. (1998) *EMBO Journal*, **17(11)**, 3016-28.

Nikaido, K., Ames, G. F. L. (1992) *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 20706-12.

Oakley, B.R., Kirsch, D. R., Morris, N. R. (1980) *Analytical Biochemistry*, **105**, 361.

Oh, B.H., Pandit, J., Kang, C. H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G. F. L., Kim, S. H. (1993) *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 11348-55.

O'Hara, P.J., Sheppard, P. O., Thogersen, H., Venezia, D., Haldeman, B. A., McGrane V., Houamed, K. M., Thomsen, C., Gilbert, T. L., Mulvihill, E. R. (1993) *Neuron*, **11(1)**, 41-52.

O'Reilly, D.R., Miller, L. K., Luckow, V. A. (1992) *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. W. H. Freeman and Company, New York.

Ostrove, S., Weiss, S. (1990) *Methods in Enzymology*, **182**, 371-79.

Paas, Y., Eisenstein, M., Medevielle, F., Teichberg, V. I., Devillers-thiery, A. (1996) *Neuron*, **17**, 979-90.

Paas, Y. (1998) *Trends in Neuroscience*, **21(3)**, 117-125.

Palma, E., Maggi, L., Barabino, B., Eusebi, F., Ballivet, M. (1999) *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 18335-40.

Peng, X., Katz, M., Gerzanich, V., Anand, R., Lindstrom, J. (1993) *Molecular Pharmacology*, **45**, 546-54.

Pfeifer, T.A. (1998) *Current Opinion in Biotechnology*, **9**, 518-21.

Picot, D., Loll, P. J., Garavito, R. M. (1994) *Nature*, **367**, 243-49.

Pos, K.M., Bott, M., Dimroth, P. (1994) *FEBS Letters*, **347**, 37-41.

Premkumar, L.S., Auerbach A. (1997) *Journal of General Physiology*, **110**, 485-502.

Racher, K.I., Voegele, R. T., Marshall, E. V., Culham, D. E., Wood, J. M. (1999) *Biochemistry*, **38**, 1676-84.

Radford, K.M., Virginio, C., Suprenant, A., North, R. A., Kawashima, E. (1997) *Journal of neuroscience*, **17(17)**, 6529-33.

Radha, C., Muralidhara, B. K., Kumar, P. K., Tasneem, R., Prakash, V. (1998) *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, **35**, 76-85.

Richard, P., Rigaud, J.-L., Graber, P. (1990) *European Journal of Biochemistry*, **193**, 921-25.

Rigaud, J.-L., Bluzat, A., Büschlen, S. (1983) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **111**, 373-82.

Rigaud, J.-L., Pitard, B., Levy, D. (1995) *Biochimica and Biophysica Acta*, **1231**, 223-46.

Rigaud, J.-L., Levy, D., Mosser, G., Lambert, O. (1998) *European Biophysical Journal*, **27**, 305-19.

Ringler, P., Heymann, B., Engel, A. (1999) *Unveröffentliche Ergebnisse*.

Riquelme, G., Lopez, E., Garcia-Segura, L. M., Ferragut, J. A., Gonzalez-Ros, J. M. (1990) *Biochemistry*, **29**, 11215-22.

Robson, R.J., Dennis, E. A. (1977) *Journal of Physical Chemistry*, **81**, 1075-78.

Roche, K.W., Lynn, A., Blackstone, R. C., Huganir, R. L. (1994) *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 11679-82.

Roche, K.W., O'Brien, R. J., Mammen, A. L., Bernhardt, J., Huganir, R. L. (1996) *Neuron*, **16**, 1179-88.

Rosenberger, R.F., Carr, A. J., Hipkiss, A. R. (1990) *FEMS Microbiology Letters*, **56**, 19-25.

Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., Stevens, C. F. (1998) *Science*, **280**, 1596-99.

Ryan, S.E., Demers, C. N., Chew, J. P., Baenziger, J. E. (1996) *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 24590-97.

Saba, R.I., Bollen, A., Herchuelz, A. (1999) *Biochemical Journal*, **338**, 139-45.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saper, M.A., Quiocho, F. A. (1983) *Journal of Biological Chemistry*, **258(18)**, 11057-62.

Sargent, P., Wilson, H. (1995) In P. Clarke (ed.) *Distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunit immunoreactivities on the surface of chick ciliary ganglion neurons*. Birkhäuser, Basel, pp. 355-61.

Sato, C., Sato, M., Iwasaki, A., Doi, T., Engel, A. (1998) *Journal of Structural Biology*, **121(3)**, 314-25.

Savage, H., Cyrklaff, M., Montoya, G., Kühlbrandt, W., Sinning, I. (1996) *Structure*, **4**, 243-52.

Schäfer, K. (1998) *Analytica Chimica Acta*, **358**, 69-77.

Schiffer, H.H., Swanson, G. T., Heinemann, S. F. (1997) *Neuron*, **19**, 1141-49.

Schirmer, T., Keller, T. A., Wang, Y.-F., Rosenbusch, J. P. (1995) *Science*, **267**, 512-14.

Schlotmann, M., Beyreuther, K. (1979) *European Journal in Biochemistry*, **95**, 39-49.

Schuster, C.M., Ultsch, A., Schloss, P., Cox, J. A., Schmitt, B., Betz, H. (1991) *Science*, **254**, 112-14.

Seeburg, P.H. (1993) *Trends in Neurosciences*, **16**, 359-365.

Séguéla, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A., Patrick, J. W. (1993) *Journal of Neuroscience*, **13**, 596-604.

Sigma-Aldrich (1999) *Product Information Sheet*, **11145**.

Silman, I., Millard, C. B.m Ordentlich, A., Greenblatt, H. M., Harel, M., Barak, D., Shafferman, A., Sussman, J. L. (1999) *Chemico-Biological Interactions*, **119**, 43-52.

Skerjanc, I.S., Toyofuku, T., Richardson, C., MacLennan, D. H. (1993) *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 15944-50.

Slack, J.M., Kuzio, J., Faulkner, P. (1995) *Journal of General Virology*, **76**, 1091-98.

Smith, C.J., Grigorieff, N., Pearse, B. M. F. (1998) *EMBO Journal*, **17**, 4943-53.

Smith, G.B., Olsen, R. W. (1995) *Trends in Pharmacological Sciences*, **16**, 162-7.

Smith, G.E., Summers, M. D., Fraser, M. J. (1983) *Molecular & Cellular Biology*, **3**, 2156-65.

Smith, P.K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, E. K., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) *Analytical Biochemistry*, **150**, 76.

Sodeoka, M., Larson, C. J., Chen, L., LeClair, K. P., Verdine, G. L. (1993) *Bioorganic & Medicinical Chemistry Letters*, **3**, 1089-94.

Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1990) *Science*, **249**, 1580-85.

Sommer, B., Burnashev, N., Verdoorn, T. A., Keinänen, K., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1992) *EMBO Journal*, **11**, 1651-56.

Sprengel, R., Seeburg, P. H. (1995) In R. A. North (ed.) *Ionotropic Glutamate Receptors*. CRC Press, Boca Raton, Fla, pp. 213-263.

Stauffer, K.A., Kumar, N. M., Gilula, N. B., Unwin, N. (1991) *Journal of Cell Biology*, **115**, 141-50.

Stein, B.H. (1992) *Molecular Pharmacology*, **42**, 864-71.

Steinlein, O., Mulley, J., Propping, P., Wallace, R., Phillips, H., Sutherland, G., Scheffer, I., Berkovic, S. (1995) *Nature Genetics*, **11**, 201-03.

Stephens, D.B., Androlewicz, M. J. (1997) *FEBS Letters*, **416**, 353-58.

Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P. O., O'Hara, P. J., Heinemann, S. F. (1994) *Neuron*, **13(6)**, 1345-57.

Sukharev, S.I., Martinac, B., Arshavsky, V. Y., Kung, C. (1993) *Biophysical Journal*, **65**, 177-83.

Summers, M.D., Volkman, L. E. (1976) *Journal of Virology*, **17**, 962-72.

Summers, M.D., Smith, G. E. (1978) *Virology*, **84**, 390-402.

Sun, T., Naini, A. A., Miller, C. (1994) *Biochemistry*, **33**, 9992-99.

Sun, Y.-J., Rose, J., Wang, B.-C., Hsaio, C.-D. (1998) *Journal of Molecular Biology*, **278**, 219-29.

Sutcliffe, M.J., Wo, Z. G., Qswald, R. E. (1996) *Biophysical Journal*, **70**, 1575-89.

Sutcliffe, M.J., Smeeton, A. H., Wo, Z. G., Oswald, R. E. (1998) *Biochemical Society Transactions*, **26**, 450-458.

Swanson, G.T., Gereau IV, R. W., Grenn, T., Heinemann, S. (1997) *Neuron*, **19**, 913-926.

Tate, C.G., Blakely, R. D. (1994) *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 26303-10.

Tauboll, E., Gjerstad, L. (1998) *Progress in Brain Research*, **116**, 385-93.

Taverna, F.A., Wang, L. Y., MacDonald, J. F., Hampson, D. R. (1994) *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 14159-64.

Tygesen, C.K., Rasmussen, J. S., Jones, S. V. P., Hansen, A., Hansen, K., Andersen, P. H. (1994) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 13018-22.

Unger, V.M., Schertler, G. F. X. (1995) *Biophysical Journal*, **68**, 1776-86.

Unger, V.M., Kumar, N. M., Gilula, N. B., Yeager, M. (1999) *Science*, **283**, 1176-80.

Unwin, N. (1993) *Journal of Molecular Biology*, **229**, 1101-24.

Valera, S., Hussy, N., Evans, R., Adamy, N., North, R., Suprenant, A., Buell, G. (1994) *Nature*, **371**, 516-19.

van der Does, C., Manting, E. H., Kaufmann, A., Lutz, M., Driessen, A. J. M. (1998) *Biochemistry*, **37**, 201-20.

Verdoorn, T.A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., Sakmann, B. (1991) *Science*, **252**, 1715-18.

Vernallis, A., Conroy, W., Berg, D. (1993) *Neuron*, **10**, 451-64.

Villa, A., Garcia-Simon, M. I., Blanco, P., Sese, B., Bogonez, E., Satrustegui, J. (1998) *Biochimica et Biophysica Acta*, **1373**, 347-59.

Villalba, J.M., Palmgren, M. G., Berberian, G. E., Ferguson, C., Serrano, R. (1992) *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 12341-49.

Villaroel, A., Regalado, M. P., Lerma, J. (1998) *Neuron*, **20**, 329-39.

Volkman, L.E., Summers, M. D., Hsieh, C. H. (1976) *Journal of Virology*, **19**, 820-32.

Wafford, K.A., Kathoria, M., Bain, C. J., Marshall, G., Le Bourdelles, B., Kemp, J. A., Whiting, J. (1995) *Molecular Pharmacology*, **47**, 374-80.

Wall, J.S., Hainfeld, J. F. (1986) *Annual Reviews of Biophysical Chemistry*, **15**, 355-76.

Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, J. B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Smith, B. L., Agre, P., Engel, A. (1997) *Nature*, **387**, 624-27.

Warpman, U., Nordberg, A. (1995) *Neuroreport*, **6**, 2419-23.

Weill, C., Autelitano, F., Guenet, C., Heitz, F., Goeldner, M., Ilien, B. (1997) *European Journal of Pharmacology*, **333(2-3)**, 269-78.

Weiss, H.M., Haase, W., Michel, H., Reiländer, H. (1995) *FEBS Letters*, **377**, 451-56.

Weiss, H.M., Haase, W., Michel, H., Reiländer, H. (1998) *Biochemical Journal*, **330**, 1137-47.

Weiss, M.S., Kreusch, A., Schiltz, U., Nestel, U., Welte, W., Weckesser, J., Schulz, G. E. (1991) *FEBS Letters*, **280**, 379-82.

Wenthold, R.J., Yokotani, N., Doi, K., Wada, K. (1992) *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 501-07.

Westphal, R.S., Tavalin, S. J., Lin, J. W., Alto, N. M., Fraser, I. D. C., Langeberg, L. K., Cheng, M., Scott, J. D. (1999) *Science*, **285**, 93-96.

White, D.A. (1973) *The phospholipid composition of mammalian tissues*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

Whiting, P., Lindstrom, J. (1987) *FEBS Letters*, **213**, 55-60.

Williams, K.A., Geldmacher-Kaufer, U., Padan, E., Schuldiner, S., Kühlbrandt, W. (1999) *EMBO Journal*, **18**, 3558-63.

Wo, Z.G., Oswald, R. E. (1995b) *Trends in Neurosciences*, **18**, 161-68.

Wo, Z.G., Oswald, R. E. (1995a) *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 2000-2009.

Wolosker, H., Blackshaw, S., Snyder, S. H. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**, 13409-14.

Wu, T.Y., Liu, C.-I., Chang, Y. C. (1996) *Biochemical Journal*, **319**, 731-39.

Yao, N.H., Trakhanov, S., Quiocho, F. A. (1994) *Biochemistry*, **33**, 4769-79.

Yellen, G., Migeon, J. C. (1990) *Gene*, **86**, 145-52.

Yi, C.-K., Charalambous, B. M., Emery, V. C., Baldwin, S. A. (1992) *Biochemistry Journal*, **283**, 643-46.

Yu, C.R., Role, L. W. (1998) *Journal of Physiology*, **1998**, 651-65.

Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K. M., Köster, H. J., Borchardt, T., Worley, P., Lübke, J., Frotscher, M., Kelly, P. H., Sommer, B., Andersen, P., Seeburg, P. H., Sakmann, B. (1999) *Science*, **284**, 1805-11.

Zhang, P., Toyoshima, C., Yonekura, K., Green, N. M., Stokes, D. (1998) *Nature*, **392**, 835-39.

Zhuang, J., Privé, G. G., Werner, G E., Ringler, P., Kaback, H. R., Engel, A. (1999) *Journal of structural biology*, **125**, 63-75.

Ziegler, W., Slayman, C. L., Cartwright, C. P. (1993) *General Physiology & Biophysics*, **12**, 429-43.

Ziegra, C.J., Willard, J. M., Oswald, R. E. (1992) *Molecular Pharmacology*, **42**, 203-9.

Zuo, J., De Jager, P. L., Takahashi, K. A., Jiang, W., Linden, D. J., Heintz, N. (1997) *Nature*, **388**, 716-17.

Lebenslauf

Name:	Markus Safferling	
Geburtsdatum:	26. August 1970 in Karlsruhe	
Nationalität:	Deutsch	
Schulbildung:	1976-1980	Grundschule Schifferstadt
	1980-1989	Gymnasium Schifferstadt
		Abitur 1989
Studium:	1990-1992	Grundstudium Chemie, Universität Kaiserslautern
		Vordiplom 1992
	1992-1994	Hauptstudium Chemie, Universität Kaiserslautern
		Mündliche Diplomprüfungen 1994
	1995	Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Faulstich, Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg
		Diplom in Chemie 1995
	1995-1999	Promotion unter Leitung von Dr. Madden am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg
		Promotion in Chemie 15. Mai 2000