

# 1 Einleitung

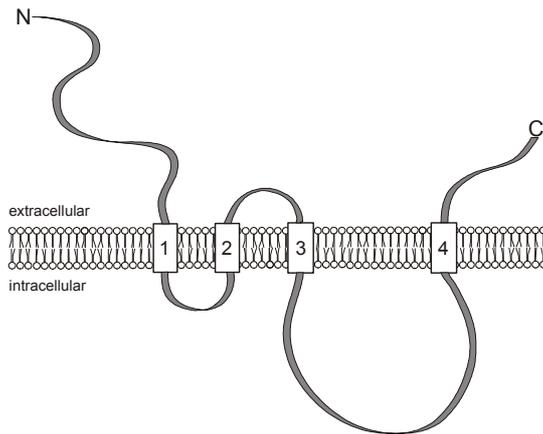
## 1.1 Synaptische Signaltransduktion

Die Signalübertragung zwischen Zellen erfolgt im Nervensystem an den Synapsen. Im Fall der chemischen Synapsen erfolgt die Weiterleitung eines Signals über den synaptischen Spalt hinweg durch chemische Botenstoffe, die Neurotransmitter. Der an der präsynaptischen Membran ausgeschüttete Neurotransmitter diffundiert durch den Spalt zur postsynaptischen Zelle und bindet dort an den entsprechenden Rezeptor. Wenn dieser Rezeptor gleichzeitig ein Ionenkanal ist, öffnet sich dieser und lässt je nach Selektivität Ionen ein- oder ausströmen. Die Selektivität des einsetzenden Ionenstroms definiert die Antwort der postsynaptischen Zelle. Erregende Neurotransmitter wie Acetylcholin, Glutamat oder Serotonin öffnen Kationenkanäle, die eine Depolarisierung der postsynaptischen Membran verursachen, während hemmende Transmitter wie  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin Anionenkanäle öffnen, die eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran bedingen. Das entsprechende Signal kann abgeschaltet werden, indem der Transmitter auf verschiedene Weisen aus dem synaptischen Spalt entfernt wird: entweder durch enzymatische Inaktivierung des Moleküls oder durch Wiederaufnahme in die Nervenendigung oder in umgebende Gliazellen. Beide Mechanismen gewähren sowohl die räumliche als auch die zeitliche Präzision der Signalübertragung.

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR) ist ein Ionenkanal, der nach Bindung von Acetylcholin eine Depolarisation der Zellmembran verursacht und so eine Umwandlung des chemischen in ein elektrisches Signal ermöglicht. Der nAChR ist ein Prototyp der Familie der sog. Cys-Loop-Rezeptoren, zu denen Glycin-, GABA<sub>A</sub>- und Serotonin(5HT<sub>3</sub>)-Rezeptoren gehören, die eine hohe Übereinstimmung bezüglich Struktur und Funktion aufweisen.<sup>[1]</sup> Je nach Lokalisierung unterscheidet man zwischen „zentralen“ und „peripheren“ nAChRs. Der periphere nAChR stellt die Verbindung eines Motoneurons zum Muskel an der neuromuskulären Endplatte her, die zentralen Rezeptoren befinden sich in den Ganglien des Zentralnervensystems. Aufgrund der starken Anreicherung im elektrischen Gewebe bestimmter Fische (z. B. *Electrophorus electricus* oder *Torpedo californica*) ist er der bisher am besten untersuchte ligandengesteuerte Ionenkanal.

## 1.2 Struktur des nikotinischen Acetylcholinrezeptors

Um die Funktionsweise eines Rezeptors besser verstehen zu können, muss man seine Struktur möglichst genau kennen. Es ist bekannt, dass der nAChR aus dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* aus fünf Untereinheiten aufgebaut ist, zwei  $\alpha$ -, je einer  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Polypeptidkette. Diese Stöchiometrie entspricht der des Acetylcholinrezeptors im menschlichen Muskel während der embryonalen Entwicklung. Während der Entwicklung des Säugetiermuskels wird die  $\gamma$ - durch die  $\epsilon$ -Untereinheit



ersetzt. Für die neuronalen Acetylcholinrezeptoren in Vertebraten sind wesentlich mehr Untereinheiten bekannt, die als  $\alpha$ - bzw. non- $\alpha$ - (auch  $\beta$ -) Untereinheiten bezeichnet werden. Bisher sind neun neuronale  $\alpha$ - ( $\alpha 2$  bis  $\alpha 10$ ) und drei neuronale  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta 2$  bis  $\beta 4$ ) identifiziert worden.<sup>[2]</sup>

Abbildung 1: Topologie einer Untereinheit.

Diese Untereinheiten haben ähnliche Primärstrukturen mit homologer vorhergesagter Transmembrantopologie (siehe Abb. 1).

An eine große hydrophile N-terminale Region mit mehreren Consensus-Sequenzen für N-Glykosylierungen schließen sich drei hydrophobe Sequenzen an, die als M1 bis M3 bezeichnet werden und jeweils lang genug sind, die Membran in Form einer  $\alpha$ -Helix zu durchspannen. Diesen folgt eine lange intrazelluläre Schleife. Den Abschluss bilden eine vierte hydrophobe Sequenz (M4) und ein kurzer C-Terminus. N- und C-Terminus des Moleküls befinden sich außerhalb der Zelle.

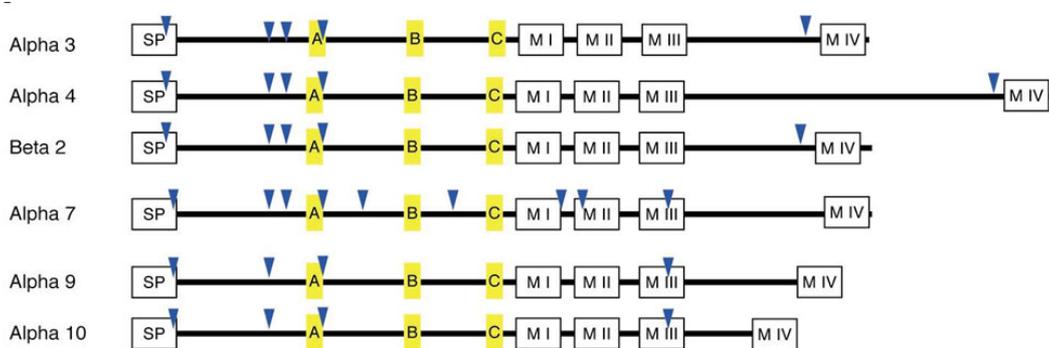
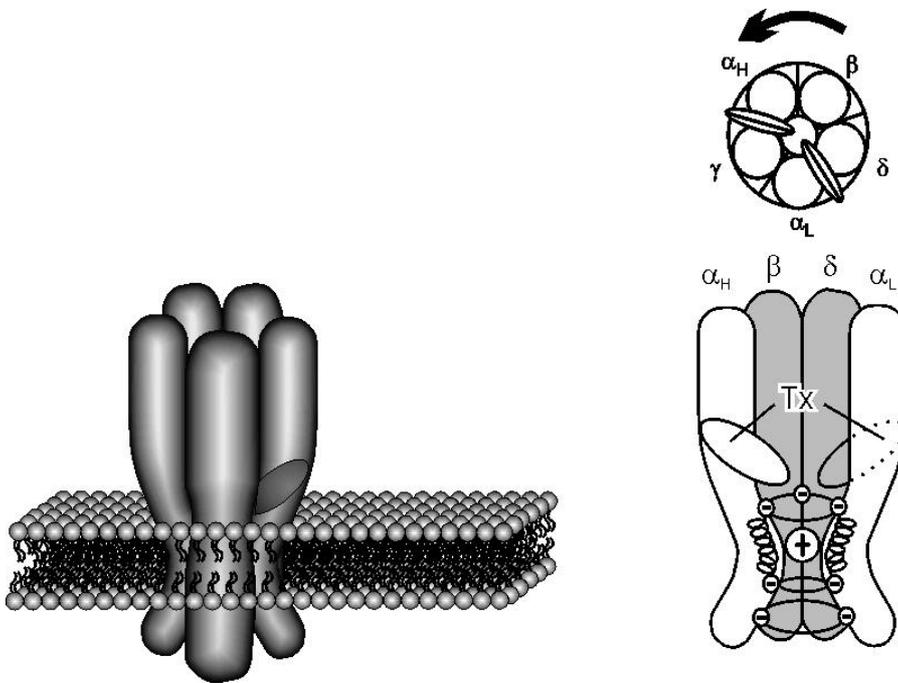


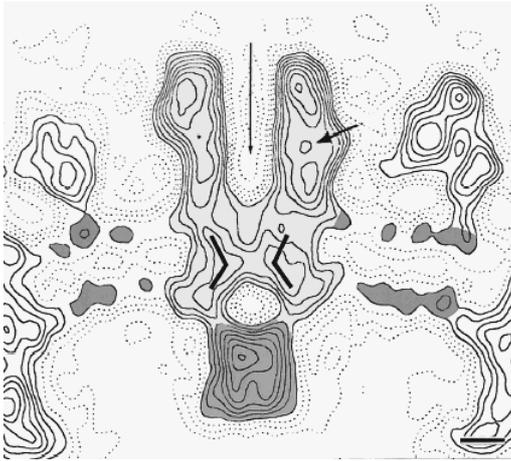
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Splice-Regionen der Gene von neuronalen AChR-Untereinheiten. SP: Signalpeptid; M I bis M IV: Membrandurchspannende Regionen 1 bis 4; A, B, C: drei Bereiche der ACh-Bindungsstelle. Die blauen Pfeile zeigen die Introns.<sup>[2]</sup>

Alle Untereinheiten des nAChR sind homolog, werden aber von unterschiedlichen Genen kodiert. Auf diesen Genen variiert die Lage der Exons und Introns sehr stark (siehe Abb. 2).<sup>[2]</sup> Trotzdem besitzen die Untereinheiten bis zu 19 % Identität innerhalb einer Spezies und 35 % Ähnlichkeit unter Einbeziehung des konservativen Aminosäureaustausches in ihrer Primärstruktur. Die Aminosäuresequenzen sind auch im Vergleich zwischen verschiedenen Spezies sehr stark konserviert (bis zu 80 % Identität bei neuronalen Untereinheiten).<sup>[3]</sup> Die starken Ähnlichkeiten beziehen sich vor allem auf die extrazelluläre Domäne und die Transmembransequenzen des Rezeptors. Die intrazelluläre Schleife ist der Teil des Proteins, der die größten Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies und Untereinheiten aufweist, was sich in unterschiedlicher Länge, Aminosäuresequenz und auch in den verschiedenen vermuteten Aufgaben dieser Domäne zeigt.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Rezeptors in der Aufsicht (oben rechts), im Längsschnitt (unten rechts) und in der Membran (unten links). Tx: Bindungsstelle von  $\alpha$ -Bungarotoxin,  $\alpha_H$  und  $\alpha_L$ : unterschiedliche Bindungsaffinität an den Kontaktstellen zur benachbarten Untereinheit („high“ und „low“).

Die Untereinheiten sind um eine pseudosymmetrische fünfzählige Achse angeordnet, in deren Mitte der Ionenkanal liegt, der durch die Helices M2 der fünf Untereinheiten gebildet wird. Verantwortlich für die Ionenselektivität sind ebenfalls Aminosäuren im Transmembranbereich M2.<sup>[4]</sup> Die Ligandenbindungsstelle liegt extrazellulär an den Kontaktstellen jeweils zweier Untereinheiten ( $\alpha_H/\gamma$  und  $\alpha_L/\delta$ , siehe Abb. 3).



**Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme des nAChR mit 4,6 Å Auflösung im Längsschnitt.<sup>[5]</sup>**

Die Länge des Moleküls beträgt ungefähr 120 Å, wobei der extrazelluläre Bereich 60 Å und die Transmembranregion 30 Å einnehmen. Der extrazelluläre Eingang der Pore hat einen Durchmesser von etwa 25 Å.<sup>[5]</sup>

Bisher gibt es vom nAChR elektronenmikroskopische Aufnahmen, die eine Auflösung von bis zu 4,6 Å zeigen. Diese sehr hochauflösenden Aufnahmen wurden unter Verwendung von tubulären Kristallen aus rezeptorreichen Membranen hergestellt.

Die Bilder einzelner Rezeptoren wurden addiert und aus ihnen mit Hilfe komplexer Bildauswertungsverfahren das in Abb. 4 gezeigte Bild erstellt.<sup>[6, 7]</sup> Bei dieser Auflösung ist allerdings die räumliche Anordnung einzelner Aminosäure-Reste noch nicht zu erkennen. Erkennbar sind jedoch die großen extrazellulären Domänen der im Längsschnitt zu sehenden Untereinheiten im oberen Drittel des Rezeptors (siehe Abb. 4). Darunter sind die Membran-durchspannenden Bereiche mit der Ionenkanalpore zu sehen, die sich in der Mitte stark verengt und nach unten hin wieder etwas weitet. Unterhalb der Pore ist eine hohe Elektronendichte zu sehen, die in der Abbildung etwas dunkler gefärbt wurde. Dort könnten sich die intrazellulären Domänen der Untereinheiten zusammengelagert haben und einen Korb bilden, der die einströmenden Ionen zu den Seiten in das Zytosol treten lässt.<sup>[5]</sup> Allerdings könnte es sich hier auch um ein weiteres Protein handeln, das an den Rezeptor angelagert vorliegt. Dieses Protein wird Rapsyn („receptor associated protein at synapses“) genannt.

Da sich der gesamte Rezeptor als Membranprotein bisher jedem Kristallisationsversuch entzogen hat, bietet es sich an, einzelne Domänen getrennt zu analysieren. Domänen sind einzelne stabile globuläre Einheiten einer langen Polypeptidkette. Innerhalb dieser Substruktur bestehen mehr Interaktionen als zu anderen Teilen des Proteins. Unterschiedliche Domänen haben oft verschiedene Funktionen innerhalb des Proteins. Dabei geht man davon aus, dass sich eine Proteindomäne autonom korrekt faltet und auch sonst dieselben Eigenschaften entwickelt, die sie im nativen Zustand im Zusammenhang des gesamten Polypeptides besitzt. Bisher wurden vor allem die extrazellulären Bereiche des nAChR mit verschiedenen biochemischen Methoden

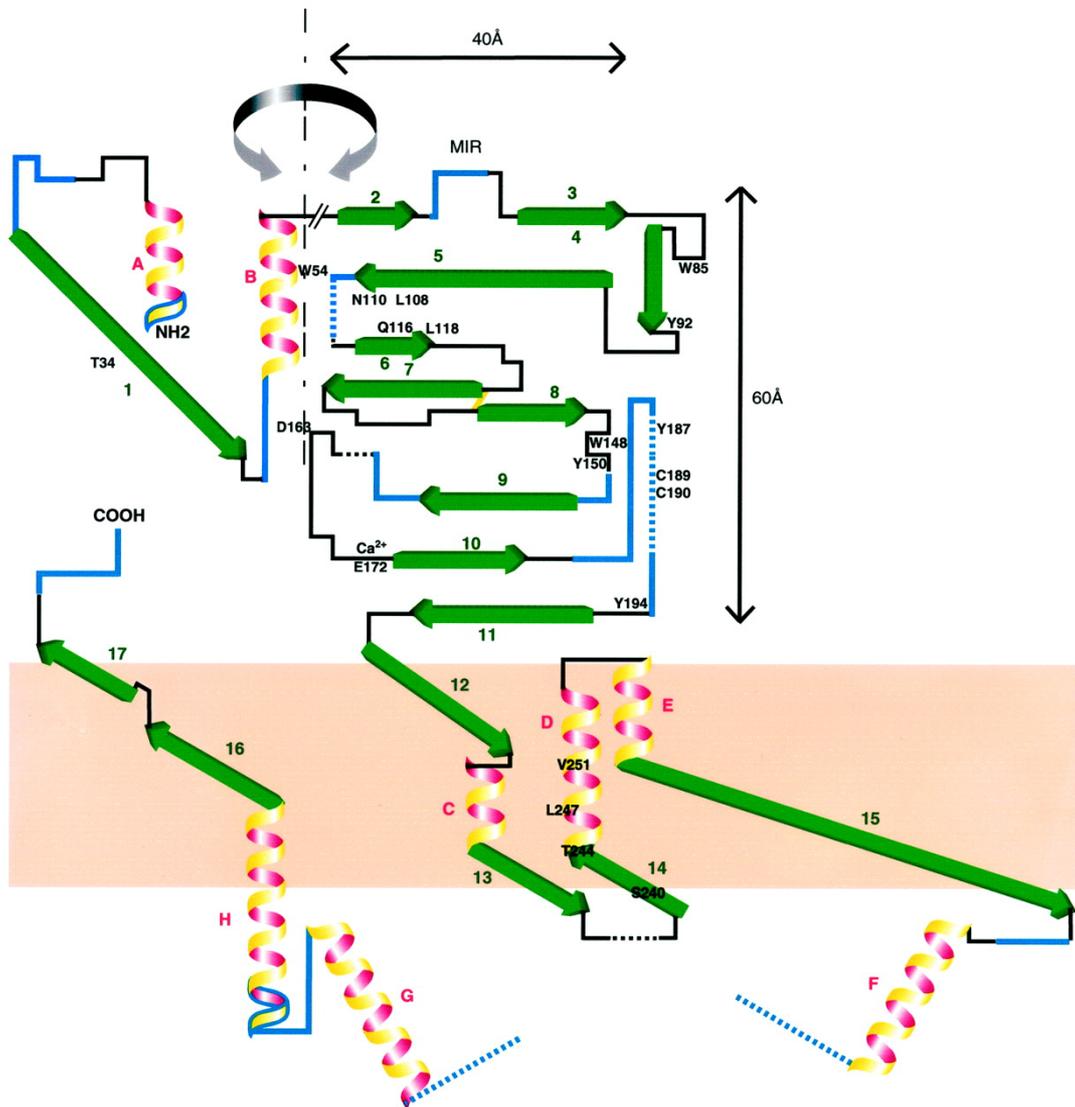
untersucht. Dieser Proteinabschnitt wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen meist in Bakterien überexprimiert und seine Struktur und Bindungseigenschaften wurden unter verschiedenen Bedingungen untersucht.<sup>[8-11]</sup> Eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle.

Lit.	Konstrukt	Expressionssystem	Aufarbeitung	Ausbeute	Untersuchungen
[8]	$\alpha 1$ ( <i>Torpedo marmorata</i> ) AS 1-209 in pET-3a	<i>E. coli</i> , inclusion bodies	6 mol/l GuCl, DTE, mehrere Dialyseschritte	10 mg/ml, 400 $\mu\text{mol/l}$ ,	MS, CD, $\alpha$ -Bgt- Bindungstest
[9]	$\alpha 1$ ( <i>Torpedo californica</i> ) AS 1-209 m. His <sub>6</sub> -Tag	<i>E. coli</i> , inclusion bodies	8 mol/l Harn- stoff, mehrere Dialyseschritte	Ca. 10 mg/ml	MS, Edman- Sequenzierung, CD, <sup>125</sup> I- $\alpha$ -Bgt- Bindungstest
[10]	$\alpha 7$ (Ratte) AS 1-196 m. 17 AS Lin- ker, MBP	<i>E. coli</i>	Reinigung über Amylo- sesäule, $\alpha 7$ - Domäne allein unlöslich	1-5 mg/l Kultur, 3 mg/ml Fusions- protein	CD nur als Fu- sionsprotein möglich
[11]	$\alpha 1$ ( <i>Torpedo californica</i> ) AS 143-210 m. His <sub>6</sub> -Tag	<i>E. coli</i>	French Press, EDTA, DTT, NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> -Fäl- lung	12 mg/l Kultur, 20 $\mu\text{mol/l}$ als Monomer, 200 $\mu\text{mol/l}$ als Aggre- gate	CD, NMR, Lichtstreuung, <sup>125</sup> I- $\alpha$ -Bgt-Bin- dungstest
[12]	$\alpha 1$ (Maus) AS 1-211 m. FLAG- u. His <sub>6</sub> -Tag	Hefe <i>Pichia pastoris</i>	Löslich in das Kulturmedium sekretiert, gly- kosyliert	>3 mg/l Kultur, 30 mg/ml als Monomer im Sucrose- gradienten	CD, Edman, $\alpha$ -Bgt-Bin- dungstest, <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-NMR
[13]	$\alpha 1$ ( <i>Torpedo californica</i> ) AS 1-210 m. GPI-Tag	CHO-Zellen	Aus der Plas- mamembran isoliert	Monomer	CD, Acetylcho- lin Bindung
[7]	Extrazelluläre Domänen von <i>Torpedo californica</i>	Sf9 Insektenzellen			EM

Allerdings wurden noch keine ausreichenden Mengen zur Kristallisation und damit Röntgenstrukturanalyse erhalten. Es zeigte sich aber, dass diese Domäne in größeren Mengen herstellbar ist und recht gut autonom faltet. Diese Methode kann also über eine lösliche Domäne respektable Auskünfte über die genaue Struktur liefern.

Über die Sekundärstruktur des gesamten Rezeptormoleküls gibt es Daten zum Anteil an  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die aus spektroskopischen Untersuchungen ermittelt wurden. Als Durchschnittswerte für den gesamten Rezeptor wurden 36 % Helix-Anteil und 34 % Faltblatt-Anteil ermittelt. Allerdings schwankten die Angaben

stark in Abhängigkeit von der verwendeten Methode.<sup>[14-18]</sup> Durch Computerberechnungen wurden unter Einbeziehung der bisher vorliegenden Ergebnisse Vorhersagen über die Sekundärstruktur des Proteins getroffen. Demnach soll es neun  $\alpha$ -Helices und 17  $\beta$ -Stränge in jeder Untereinheit geben. Der extrazelluläre Bereich besteht bis auf zwei größere Helices aus Faltblatt-Strukturen (siehe Abb. 5).

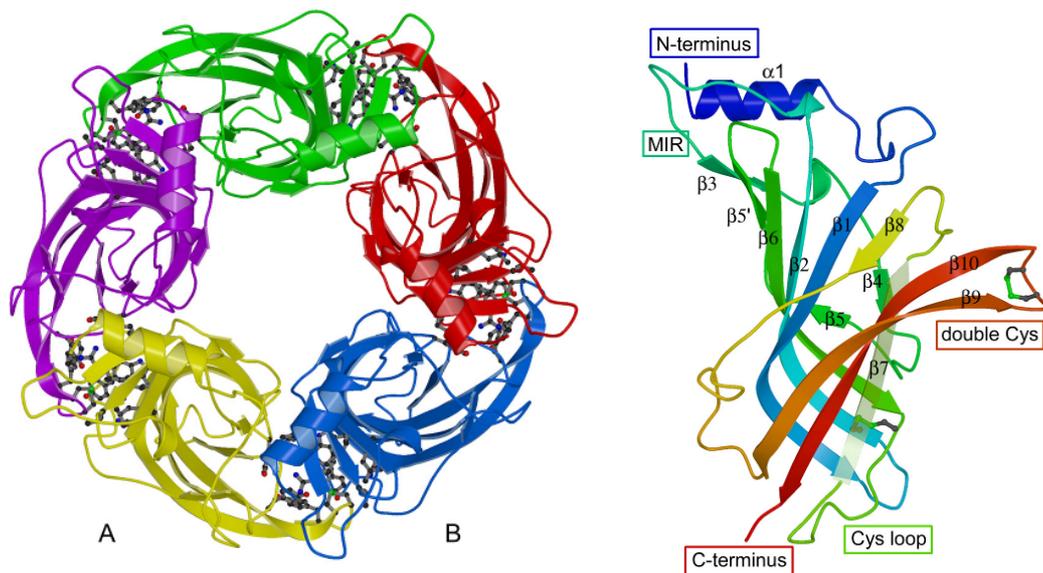


**Abbildung 5: 2D-Modell der Sekundärstruktur einer typischen Rezeptoruntereinheit.** Die Ansicht erfolgt von innerhalb der Pore des Rezeptors.  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter sind im selben Maßstab dargestellt. Die Plasmamembran ist als orangefarbener Balken angedeutet. Im Bereich des grauen Doppelpfeils müssen sich die beiden Bereiche der extrazellulären Domäne zueinander drehen. Blaue Bereiche sind dem Solvent zugewandt. Gelbe Linie: Disulfidbrücke, MIR: Main immunogenic region.<sup>[14]</sup>

Die vier Transmembransequenzen wurden mit unterschiedlich hohem Helix-Anteil berechnet. Die große intrazelluläre Domäne soll bis auf zwei Helices keine festgelegte Sekundärstruktur besitzen und komplett wasserlöslich sein. Diese Helices sind als amphipatisch vorhergesagt, das heißt, eine Seite der Helix soll dem Lösungsmittel (hier Wasser) zugewandt sein, die andere nicht. Beide Helices zeigen ein Muster, das

dem sog. Leucin-Zipper entspricht. Dabei handelt es sich um ein Motiv, bei dem in regelmäßigen Abständen in diesen Helices Leucinreste eingebaut sind, die miteinander interagieren können. Diese zytoplasmatischen Helices könnten sich also eng aneinander lagern, innerhalb einer Untereinheit oder zwischen verschiedenen Untereinheiten. Eventuell ist dieses Motiv wichtig für die Oligomerisierung der Rezeptoruntereinheiten.<sup>[14, 19]</sup>

In der Mollusken-Spezies *Lymnaea stagnalis* wurde kürzlich ein Acetylcholin-bindendes Protein (AChBP) gefunden, das von Gliazellen in den synaptischen Spalt sekretiert wird. Dort moduliert es wahrscheinlich die synaptische Transmission durch die Bindung von Acetylcholin. Dieses Protein besitzt Homologie zur extrazellulären Domäne des nAChR (24 % Sequenzidentität und dieselbe Glykosylierung im Vergleich zur neuronalen  $\alpha 7$ -Untereinheit) und ähnliche Bindungseigenschaften. Es ist wasserlöslich und wurde kristallisiert. Durch Röntgenstruktur-Analyse dieser Kristalle mit einer Auflösung von 2,7 Å konnte ein Modell mit pentamerer Symmetrie erstellt werden, das wahrscheinlich der nativen Struktur der extrazellulären Domäne des Acetylcholinrezeptors sehr ähnlich ist (siehe Abb. 6).<sup>[20, 21]</sup> Das Protein formt einen Zylinder mit etwa 80 Å Durchmesser und 62 Å Höhe. Jede der fünf identischen Untereinheiten besetzt einen Sektor des Zylinders. Zusammen umschließen sie einen Kanal mit etwa 18 Å Durchmesser.



**Abbildung 6: Modell des Acetylcholin-bindenden Proteins.**

Links: Aufsicht auf die fünf Untereinheiten, rechts: eine Untereinheit von der Seite.<sup>[16]</sup>

Am Aminoterminus beginnen die Untereinheiten mit einer kurzen  $\alpha$ -Helix, danach folgen zehn  $\beta$ -Faltblätter mit entsprechenden Verbindungsschleifen. Durch diese Anordnung liegt der sog. Cys-Loop direkt neben dem C-Terminus der Untereinheit am „Boden“ des Zylinders. Im Acetylcholinrezeptor geht dieser Bereich, der hier dem C-Terminus entspricht, unmittelbar in die erste Transmembransequenz M1 über. Der Aminoterminus liegt am anderen Ende des Moleküls, sehr weit von der Membran entfernt.

Diese Vermutungen werden durch neuere Berechnungen der Struktur der extrazellulären Domäne des nAChR im Vergleich zur Struktur des AChBP bestätigt. In der Arbeitsgruppe von Jean-Pierre Changeux wurden die extrazellulären Domänen von drei Haupttypen des Acetylcholinrezeptors auf der Basis der AChBP-Struktur modelliert.<sup>[22]</sup> Dazu wurden die Aminosäuresequenzen von  $(\alpha 7)_5$ -,  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ - und  $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ -Rezeptoren miteinander verglichen. Die dreidimensionalen Modelle wurden entsprechend der wahrscheinlichen Konformation des desensitvierten Zustandes des Rezeptors berechnet. Dabei wurde gemäß der Ähnlichkeiten der Sequenzen der homomere  $\alpha 7$ -Rezeptor (Huhn) auf der Basis der Kristallstruktur von AChBP modelliert (siehe Abb. 7). Der heteromere neuronale  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ -Rezeptor (Ratte) und der Muskel-Rezeptor  $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$  (*Torpedo*) wurden anschließend auf der Basis des

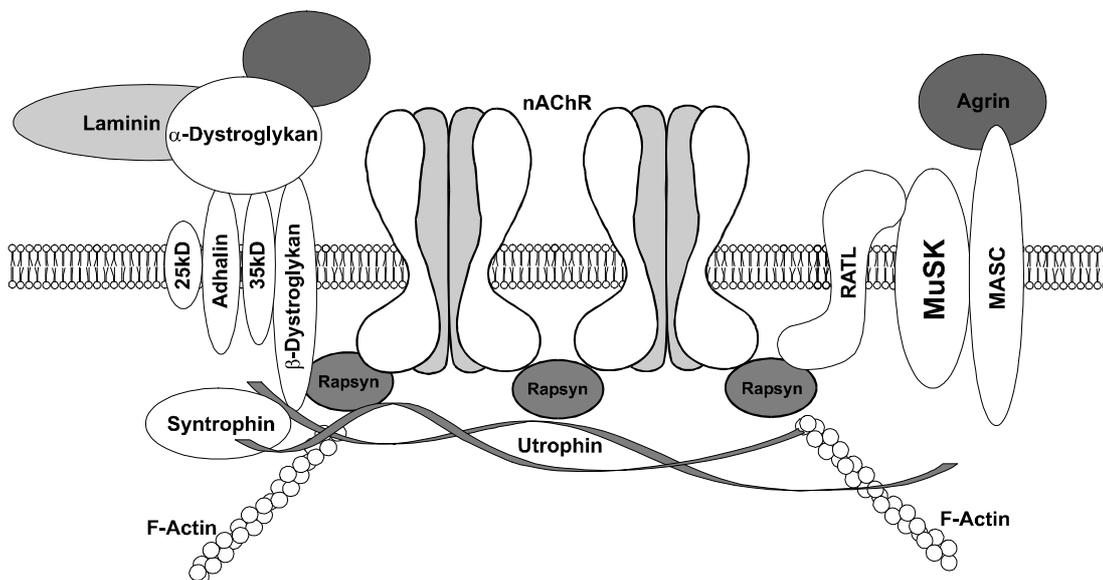


**Abbildung 7:** Überlagerung der berechneten Modelle von zwei benachbarten Untereinheiten des AChBP (grün) und zwei benachbarten extrazellulären  $\alpha 7$ -Domänen

$\alpha 7$ -Modells berechnet. Die berechneten Strukturen zeigten eine sehr hohe Übereinstimmung untereinander (deutlich über 60 %). Der Aminoterminus ist wahrscheinlich als  $\beta$ -Sandwich angeordnet und hat damit eine ähnliche Struktur wie viele Immunglobulin-Domänen. Der 13 Aminosäuren lange sog. Cys-Loop, der in allen Rezeptoren der Superfamilie konserviert und es-

sentiell für die Faltung ist, ist in der Sequenz des AChBP stark verändert.

Es gibt eine weitere interessante Domäne, über deren Struktur und Funktion bisher sehr wenig bekannt ist. Der intrazelluläre Bereich des Rezeptors wird durch eine relativ lange Schleife gebildet, die die beiden Transmembranbereiche M3 und M4 verbindet. Je nach Untereinheit ist sie verschieden lang, z. B. 110 Aminosäurereste (AS) bei  $\alpha 1$  (*Torpedo californica*), 151 AS bei  $\alpha 7$  (Ratte bzw. Maus) und 143 AS bei  $\delta$  (*Torpedo californica*). Bei neuronalen menschlichen Rezeptoruntereinheiten gibt es noch größere Längen-Unterschiede bei den intrazellulären Domänen: von  $\alpha 5$  mit 92 bis zu  $\alpha 4$  mit 269 Aminosäuren. Die intrazelluläre Schleife enthält sämtliche Phosphorylierungsstellen des Rezeptors (je nach Untereinheit), scheint also für die Regulierung und Synaptogenese wichtig zu sein.<sup>[23-27]</sup> Die Phosphorylierung der Domäne hat aber keinen großen Einfluss auf die Gesamtstruktur des Rezeptormoleküls.<sup>[28]</sup> Da dort zytosolische Proteine angelagert gefunden wurden, wie z. B. das „Receptor associated protein at synapses“ (Rapsyn),<sup>[29-34]</sup> ist eine Verbindung über diese Schleife zum Zytoskelett und eine Aufgabe in der Signaltransduktion sehr wahrscheinlich (siehe Abb. 8).



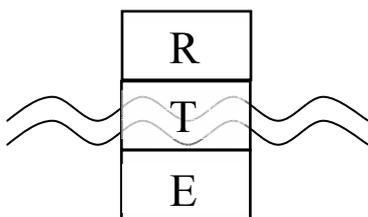
**Abbildung 8: Schematische Darstellung einiger wahrscheinlicher Proteinbeziehungen an der postsynaptischen Membran.** nAChR: nikotinischer Acetylcholinrezeptor, Rapsyn: Receptor associated protein at synapses, MuSK: Muscle-specific Kinase, MASC: MuSK assessorly specific component, RATL: Rapsyn associated transmembrane link

Für den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure) ist eine Verankerung am Zytoskelett über das zytosolisch angelagerte Protein GABARAP (GABA-Rezeptor-assoziiertes Protein) bereits nachgewiesen worden.<sup>[35]</sup> Das Protein Gephyrin verankert den Glycinrezeptor am Zytoskelett und ist auch wahrscheinlich an der Regulation von intrazellulären Signalwegen beteiligt.<sup>[36, 37]</sup> Bisher sind die umfangreichsten

Untersuchungen der postsynaptischen Komplexe für den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor und die dort angelagerten Proteine durchgeführt worden. Am NMDA-Rezeptor ist das Protein PSD-95 über zwei PDZ-Domänen angelagert. Dieses Protein sorgt für die Verankerung des Rezeptors am Zytoskelett und für die dichte räumliche Anordnung von für weitere Signalwege wichtigen Proteinen.<sup>[38, 39]</sup> Für den Acetylcholinrezeptor liegen die intrazellulären Vorgänge noch im Unklaren. Für die  $\delta$ -Untereinheit des AChR wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung der intrazellulären Schleife die Oberflächenverteilung des Rezeptors an der postsynaptischen Membran reguliert.<sup>[40]</sup>

### 1.3 Bisher bekannte Teilstrukturen von anderen Ionenkanälen

Bisher gibt es keine Daten über komplette Strukturen von ligandengesteuerten Ionenkanälen. Als große membranständige Proteine haben sich diese Moleküle der Strukturaufklärung z. B. durch Kristallisation entzogen. Eine Möglichkeit, den Vorgängen an den Ionenkanälen näher zu kommen, stellt, wie oben ausgeführt, die separate Untersuchung der wichtigen Domänen des funktionellen Proteins dar. Vereinfacht kann man sich einen ligandengesteuerten Ionenkanal in drei funktionelle Bereiche aufgeteilt vorstellen. Am Rezeptor (R) bindet der Ligand, über den sog. Transduktor (T) wird das Signal weitergegeben, das schließlich zum Effekt (E) führt, z. B. dem Öffnen der Pore.

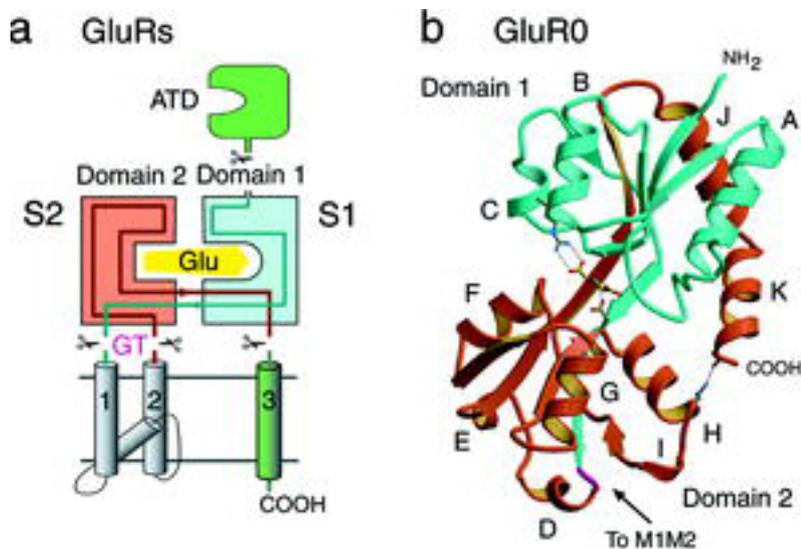


Dieses stark vereinfachte Schema soll die drei funktionellen Bereiche eines ligandengesteuerten Ionenkanals in der Membran veranschaulichen.

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, gibt es derzeit Daten zur Struktur des extrazellulären Bereiches des Acetylcholinrezeptors. Diese extrazelluläre Domäne ist auch bei anderen Rezeptormolekülen interessant, da sich hier meist die Ligandenbindungsstelle befindet.

Kürzlich wurde die Struktur der Ligandenbindungsstelle des Glutamaterezeptors aufgeklärt.<sup>[41-43]</sup> In den Untersuchungen wurden die extrazellulären Domänen von verschiedenen Glutamaterezeptor-Untereinheiten ohne Transmembranbereiche und intrazelluläre Bereiche in Bakterien exprimiert und zusammen mit einem Liganden kris-

tallisiert. Man konnte mit Hilfe dieser Konstrukte die Ligandenbindung und die Einflüsse verschiedener Liganden untersuchen. Eine schematische Darstellung des extrazellulären Bereichs und ein Modell der ligandenbindenden Domänen zeigt Abb. 9.

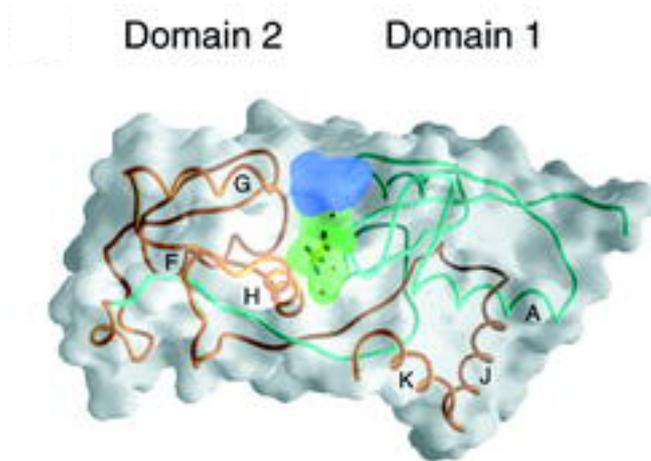


**Abbildung 9: Domänen-Struktur des Glutamaterezeptors (GluR).**<sup>[39]</sup>

a) Schematische Darstellung der extrazellulären Ligandenbindungsdomänen S1 und S2. Die Scherensymbole zeigen die Schnittstellen, an denen die Peptidsequenz zur Expression der Bindungsdomänen unterbrochen wurde. S1 und S2 wurden durch zwei Aminosäuren verbunden (GT), und der Aminoterminus wurde entfernt (ATD: Aminoterminal Domäne).

b) Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomänen der GluR0-Untereinheit.

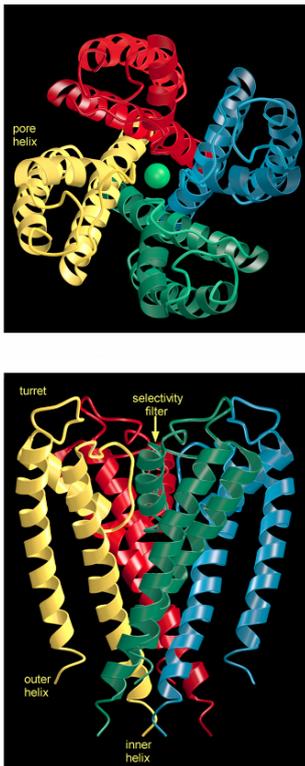
Die Domäne S1 besteht aus etwa 150 Aminosäuren und endet am Transmembranbereich M1; S2 verbindet die Bereiche M2 und M3. S1 und S2 wurden durch zwei Aminosäuren (GT) verbunden, um bei der Kristallisation die räumliche Nähe der beiden Domänen zu gewährleisten. Es entstand ein wasserlösliches Protein, das in großen Mengen exprimiert werden konnte. Der Ligand wird zwischen den beiden Domänen wie in einer Venus-Fliegenfalle „eingefangen“. Um den Liganden zu umschließen, nähern sich die Polypeptide aneinander an. In der Abbildung 10 ist zu erkennen, dass Aminosäurereste aus beiden Domänen an der Ligandenbindung beteiligt sind.



**Abbildung 10: Modell der Oberfläche der Ligandenbindungsstelle zwischen den beiden extrazellulären Domänen.** In grün ist die Ligandenbindungsstelle dargestellt, in blau die Vertiefung, die für Wassermoleküle zugänglich ist und zur Ligandenbindungsstelle führt. Die beiden Domänen S1 und S2 sind mit ihren Peptid-Grundgerüsten eingezeichnet.<sup>[39]</sup>

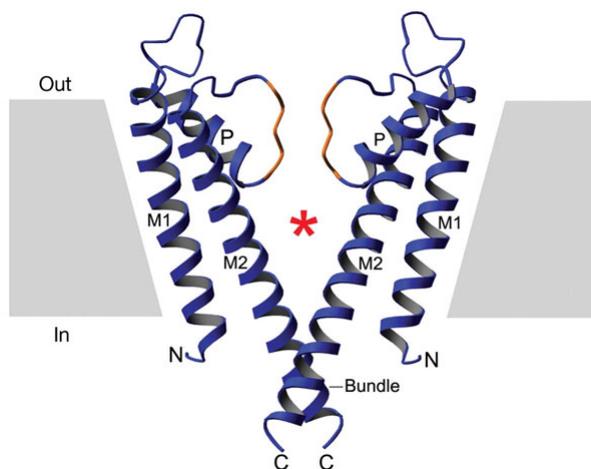
Aus beiden Polypeptidketten werden die positiven Dipolbereiche von  $\alpha$ -Helices zur negativ polarisierten Carboxylgruppe des Liganden positioniert. Dadurch werden beide Proteinteile näher zueinander gezogen und „schließen die Falle“. Abhängig vom Ligand wird die Konformation verschieden stark beeinflusst, so dass dadurch die Selektivität der Liganden-Wirkung entsteht.<sup>[44]</sup> Agonisten verursachen ein Schließen der Konformation und damit wahrscheinlich die Aktivierung des Kanals. Schwache Agonisten haben entsprechend einen schwächeren Effekt, während Antagonisten die Ligandenbindungsstelle wahrscheinlich im offenen Zustand „einfrieren“.

Die bisher erste komplette Struktur eines Ionenkanals wurde vom spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanal KcsA des Bakteriums *Streptomyces lividans* bestimmt.<sup>[45]</sup> Der KcsA-Kanal wird von vier identischen Polypeptiden gebildet, die jeweils zwei Transmembranbereiche und eine Schleife, die in die Membran hineinragt, besitzen (siehe Abb. 11). Ähnlich wie bei den Glutamatrezeptoren bildet diese Schleife, die „P-Loop“ genannt wird, die Pore des Kanals und bestimmt die Ionenselektivität (siehe Abb. 12). Kaliumkanäle sind für  $K^+$ - und weniger für  $Rb^+$ -Ionen permeabel, während die kleineren  $Li^+$ - und  $Na^+$ -Ionen nicht hindurch gelangen können. Die Hydrathülle der Ionen wird beim Eintritt in die Pore abgestreift, so dass neue Bindungen entstehen müssen, um diesen Energieaufwand auszugleichen. Carbonyl-Sauerstoffatome des Selektivitätsfilters des Kanals liegen im richtigen Abstand, um das  $K^+$ -Ion zu komplexieren und damit den energetischen Ausgleich zu schaffen. Bei dem kleineren  $Na^+$ -Ion liegen die Sauerstoffatome zu weit entfernt, um die Wassermoleküle verdrängen zu können.<sup>[45]</sup>



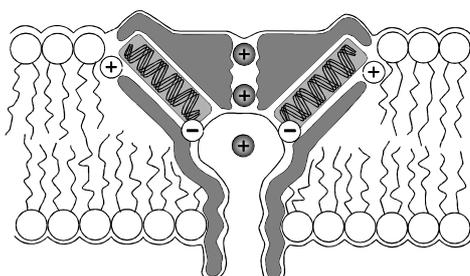
**Abbildung 11: Kristallstruktur des  $K^+$ -Kanals KcsA.**<sup>[41]</sup>

Oben: Extrazelluläre Ansicht des Tetramers. Unten: Ansicht von der Seite.



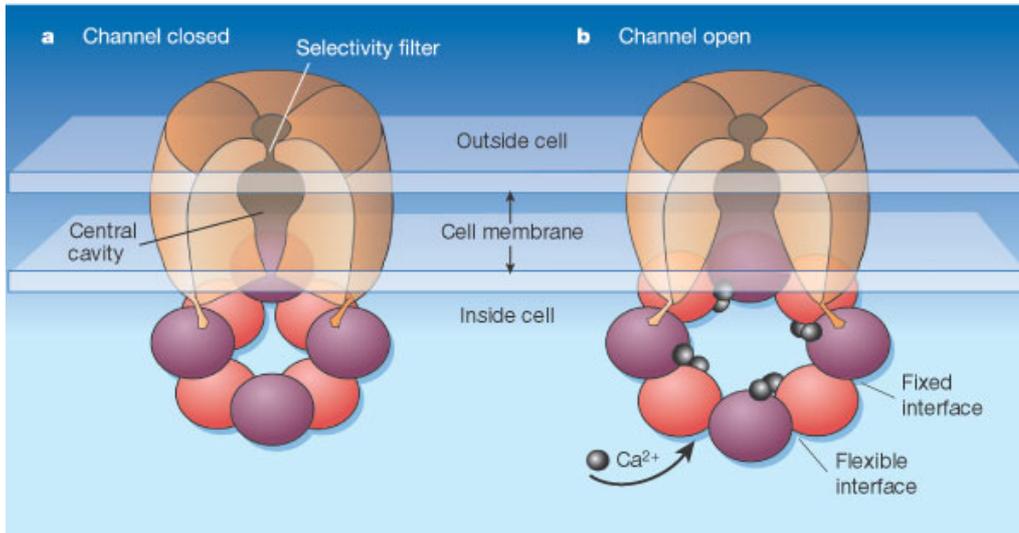
**Abbildung 12: Strukturelemente der  $K^+$ -Kanalpore.**<sup>[42]</sup> Zwei Untereinheiten sind von der Seite gezeigt, die extrazelluläre Seite liegt oben. Der Selektivitätsfilter ist orange gefärbt und der direkte Zugang zur Pore ist mit dem roten Stern markiert. Eine Untereinheit besteht aus einer äußeren Helix (M1), der Porenhelix (P) und der inneren Helix (M2). Beim Eintritt in das Zytoplasma formen die Helices ein Bündel, das das physikalische „Gate“ des Kanals bildet.

Die schnelle Leitung der Ionen in die Zelle wird durch einen „Trick“ erreicht: Es sind immer zwei Kationen gleichzeitig im Selektivitätsfilter des Kanals. Die Ionen stoßen sich gegenseitig ab und „schieben“ sich auf diese Weise durch den Kanal (siehe Abb. 13).



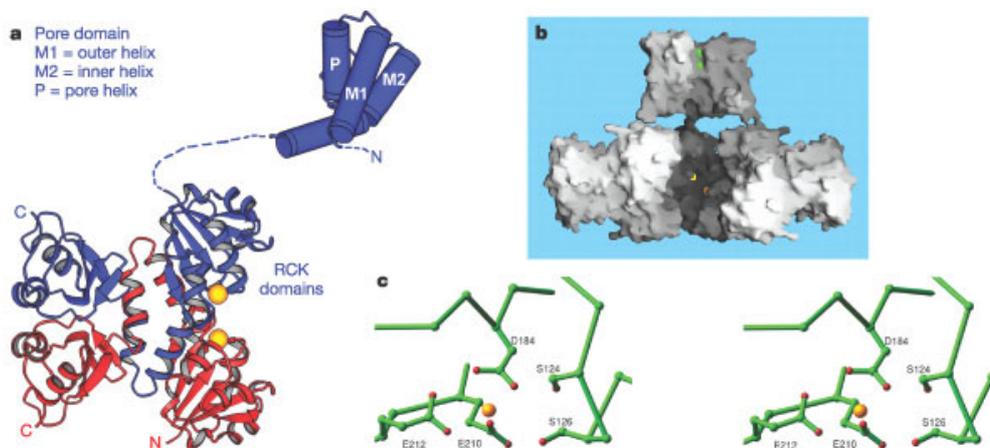
**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Weges der Ionen durch den Kanal.** Abbildung entsprechend der Strukturdaten nach [41].

In neueren Arbeiten wurde die Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerten  $\text{K}^+$ -Kanals aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* MthK durch Röntgenstrukturanalyse der Kristalle aufgeklärt.<sup>[46, 47]</sup>



**Abbildung 14: Modelldarstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerten  $\text{K}^+$ -Kanals.**<sup>[48]</sup> Nach intrazellulärer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird der Kanal geöffnet.

Dieser Kanal besteht ebenfalls aus vier Untereinheiten, die Pore wird durch Helices gebildet und Carbonylgruppen bilden den Selektivitätsfilter. Beim MthK-Kanal liegen intrazellulär aber zusätzlich je Untereinheit zwei RCK-Domänen („regulated conduction of  $\text{K}^+$  ions“). Diese insgesamt acht Domänen formen einen sog. „Gating-Ring“ innerhalb der Zelle (siehe Abb. 14). An den Übergängen zwischen je zwei der RCK-Domänen binden je zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und lösen eine Konformationsänderung aus. Dadurch wird das „Gate“ geöffnet.



**Abbildung 15: Struktur des MthK-Kanals.**<sup>[43]</sup> a) Eine Untereinheit mit den Porendomänen (blaue Zylinder) und zwei RCK-Domänen. b) Oberflächenmodell des Kanals in der Seitenansicht, c) Stereobild der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle. Proteinatome sind in grün und rot dargestellt,  $\text{Ca}^{2+}$  in gelb.

#### 1.4 Aufgabenstellung: Untersuchung der Struktur einer Proteindomäne

Um die Struktur einer Domäne aufklären zu können, muss sie zunächst in ausreichender Menge in einer möglichst nativen Umgebung hergestellt werden. Bisher gab es einige Versuche, die intrazelluläre Schleife des nAChR in Bakterien zu exprimieren, das gereinigte Protein zurückzufalten und die dreidimensionale Struktur zu bestimmen.<sup>[49]</sup>

Es ist in vielen Fällen wünschenswert, ein Protein in eukaryotischen Zellen zu exprimieren, um möglichst native Faltungen und posttranslationale Modifikationen zu erhalten. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Systeme entwickelt und verbessert, mit denen sich für sehr verschiedene Proteine gute Expressionsraten und Reini-gungsausbeuten erzielen lassen. Zum einen sind diverse Stämme von *Escherichia coli* erhältlich, die durch unterschiedliche Codon-Auswahl und Veränderung z. B. am Proteasegehalt variable Expressionsmöglichkeiten bieten. Andererseits gibt es verschiedene Insektenzell-Systeme unterschiedlichen Ursprungs, die je nach Protein sehr gute Ausbeuten von eukaryotisch exprimierten Proteinen liefern können (Sf9, Sf21, HighFive™, S2-Zellen).<sup>[50-52]</sup> In entsprechend gentechnisch veränderten Hefestämmen (z. B. bei *Pichia pastoris*) können mögliche eingeführte Modifikationen für den gewünschten Zweck aktiviert oder deaktiviert sein (z. B. Glykosylierungen). Hefen können in großen Kulturen gehalten werden und dementsprechend größere Mengen Protein herstellen. Auch *In vitro*-Expressionssysteme werden immer weiter verbessert, so dass toxische oder aus anderen Gründen schwierig zu produzierende Proteine in einem Bioreaktor in zellfreien Extrakten mit Hilfe von modifizierten Enzymen entstehen können.<sup>[53]</sup>

Jedes Protein hat andere, schwer vorherzusagende Eigenschaften, die sich erst bei der Herstellung zeigen. Es ist also eine Herausforderung, das optimale Expressionssystem durch Analyse der Aminosäuresequenz zu ermitteln. Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit, einige der aufgezählten Expressionssysteme auf ihre Eignung zur Herstellung einer ausreichenden Menge der intrazellulären Schleife verschiedener Untereinheiten des nAChR zu testen.