

## 4 Zusammenfassung

Um die Funktion von ligandengesteuerten Ionenkanälen besser verstehen zu können, muss ihre Struktur in einer Auflösung im Bereich von wenigen Å bekannt sein. Da es sich bei diesen Rezeptoren um sehr komplexe Membranproteine handelt, war eine Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse bisher nicht möglich. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderer Ansatz verfolgt, die Struktur des nikotinischen Acetylcholinrezeptors weiter aufzuklären. Die intrazellulären Domänen der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten des Rezeptors aus *Torpedo californica* und des  $\alpha 7$ -Rezeptors aus Ratte sollten in verschiedenen Systemen exprimiert werden, um die Struktur dieser Domänen untersuchen zu können.

Eine Untersuchung der intrazellulären Domänen ist für die Neurochemie unter anderem deshalb von Bedeutung, weil ihre Beteiligung an der intrazellulären Signalweitergabe wahrscheinlich ist. Bisher gibt es über alle Bereiche des Acetylcholinrezeptors Daten oder zumindest Modelle zu ihrer Struktur, es ist aber noch nichts über die intrazellulären Schleifen bekannt. Diese Schleifen besitzen bei einigen Untereinheiten Phosphorylierungsstellen, und durch Mutationsexperimente wurde ihre Wichtigkeit für das Clustering des Acetylcholinrezeptors an der postsynaptischen Membran gezeigt.

Als eukaryontisches Expressionssystem wurde die Sf9-Insektenzellkultur verwendet. Einerseits über das Baculovirus-System, andererseits über direkte Transfektion wurden verschiedene DNA-Konstrukte in die Zellen gebracht. Die Baculovirus-Expression war für die Herstellung der gesuchten Proteine nicht geeignet, weil die Insektenzellen zu schnell starben, um ausreichende Mengen zu exprimieren. Außerdem sind die Prozeduren zur Herstellung der Baculoviren zu zeitaufwendig, um eine größere Zahl von DNA-Konstrukten für die Optimierung der Proteinexpression zu testen.

Eine stabil transfizierte Zelllinie, die die intrazelluläre Schleife der  $\delta$ -Untereinheit exprimiert, wurde etabliert. Mit diesen Zellen wurde eine Reinigungsprozedur für das exprimierte Protein ausgearbeitet. Diese Methode kann weiter optimiert werden, um ausreichende Mengen des gesuchten Proteins zu erhalten.

Desweiteren wurden mehrere DNA-Konstrukte für verschiedene Fusionsproteine im prokaryontischen Expressionssystem *E. coli* versucht zu exprimieren. Von den intrazellulären Schleifen der  $\delta$ - und der  $\alpha 7$ -Untereinheit wurden trunkierte Versionen in

unterschiedliche Vektoren eingebracht. Für einige der Konstrukte konnte eine gute Expression erreicht werden, allerdings ließ sich das Protein meist nicht ohne Verwendung von hohen Konzentrationen an Detergenz aufreinigen. Das GST-Fusionsprotein der  $\alpha 7$ -Schleife konnte schließlich aus Bakterien mit einer Konzentration von 30  $\mu\text{g/ml}$  isoliert werden.

Als weitere Methode wurde die zellfreie Expression mit zwei *In vitro*-Systemen der Firmen Roche und RiNA getestet. Es wurden mehrere Expressionsversuche mit verschiedenen intrazellulären Schleifen durchgeführt. In einem Ansatz konnte erfolgreich die intrazelluläre  $\delta$ -Schleife in kleiner Menge exprimiert und durch  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie angereichert werden.

Die Ausführungen zeigen, dass die Expression in zellfreien Systemen insbesondere von problematischen Proteinen für weitere Untersuchungen parallel zu anderen Expressions-Methoden in Betracht zu ziehen ist. Um für Strukturuntersuchungen ausreichende Proteinmengen der intrazellulären Domänen des nAChR zu erhalten, sind die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Methoden entsprechend weiter zu optimieren.