

**Untersuchungen zur Quartärstruktur
neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren
von *Drosophila melanogaster***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Kathrin Chamaon, geb. Langer

geb. am 02.07.1967

Gutachter: Prof. Dr. E.D. Gundelfinger
Prof. Dr. V. Höllt
PD Dr. A. Baumann

Eingereicht am: 28.2.01

Verteidigung am: 06.11.01

DANKSAGUNG

Zuallererst danke ich dem Betreuer meiner Arbeit, Prof. Dr. E.D. Gundelfinger, nicht allein für die Überlassung des Themas sondern vor allem für das Interesse zum Gelingen derselben. Es war ein angenehmes Gefühl, immer mit seiner Hilfsbereitschaft und seinen wertvollen praktischen und theoretischen Hinweisen rechnen zu können.

Danken möchte ich ebenfalls Dr. Uli Thomas, der mich bei den ersten Schritten in die Molekularbiologie begleitete und der mir zeigte, dass Fliegen mehr können als fliegen.

Dr. Karl-Heinz Smalla möchte ich für seine unendliche Hilfsbereitschaft bei vielen biochemischen Fragestellungen danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Rainer Pielot, der meine Hilferufe am Computer erhörte und oft Abhilfe schaffen konnte.

Ich danke Dr. Werner Zuschratter für die Einweisung am konfokalen Mikroskop.

Für die praktische Unterstützung, vom Fliegenbrei bis Western-Blot, danke ich Ilona Linke und Heidi Wickborn.

Ich danke meinem Mann Nabil für seine Geduld und sein Verständnis, wenn ich Abende oder Wochenenden im Institut verbrachte. Ich danke auch meiner Tochter Elisa, die sehr früh lernte, sich verständnisvoll nickend zurückzuziehen, wenn die Mama wieder ein Seminar vorbereitete.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern für ihre grenzenlose Unterstützung; sie waren da, wann immer ich sie brauchte.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der nikotinische Acetylcholinrezeptor	2
1.2	Zielsetzung der Arbeit	12
2	MATERIALIEN	15
2.1	Antikörper	15
2.2	Enzyme und Standardmarker	15
2.3	Vektoren und rekombinante DNA	17
2.4	Chemikalien	18
2.5	Verbrauchsmittel	21
2.6	Verwendete Geräte	22
2.7	Bakterien und Tiermaterial	23
3	METHODEN	24
3.1	Tierzucht	24
3.2	Allgemeine Klonierungstechniken	24
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	24
3.2.1.1	Minipräparation	24
3.2.1.2	Midi- bzw. Maxipräparation	25
3.2.2	Enzymatische Modifikationen von DNA	26
3.2.2.1	Restriktionsverdau	26
3.2.2.2	Dephosphorylierung	26
3.2.2.3	Ligation	27
3.2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	28
3.2.3.1	Elution von DNA-Molekülen aus Agarosegelen	28
3.3	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	29
3.3.1	Herstellung transformationskompetenter Zellen	29
3.3.2	Transformation von Bakterien	29

3.4	Proteinbiochemische Methoden	30
3.4.1	Minipräparation von Fusionsprotein	30
3.4.2	Aufreinigung von Fusionsprotein	32
3.4.2.1	Aufreinigung von GST-gekoppelten Fusionsproteinen	32
3.4.2.2	Aufreinigung von MS-gekoppelten Fusionsproteinen	33
3.4.2.3	Aufreinigung von Polyhistidin-gekoppelten Fusionsproteinen	34
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.4.3.1	Färbung von Proteingelen	35
3.4.3.2	Trocknen der Gele	35
3.4.4	Western-Blot-Verfahren	36
3.4.4.1	Elektrotransfer	36
3.4.4.2	Färbung der Nitrozellulosemembran	36
3.4.4.3	Nachweis der Proteine durch Immunreaktion auf Western-Blots	36
3.4.4.4	„Stripping“ von Western-Blot-Membranen	38
3.4.5	Proteinbestimmung	38
3.4.6	Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der Antiseren	38
3.4.7	Immobilisieren von Antikörpern an Protein G	39
3.4.8	Immobilisieren von α-Bungarotoxin	40
3.4.8.1	Immobilisieren von α -Bungarotoxin an Tresyl-aktivierte Agarose	40
3.4.8.2	Immobilisieren von α -Bungarotoxin an Acti-Gel	41
3.4.9	Rezeptorpräparation aus <i>Drosophila</i>-Köpfen	41
3.4.9.1	Membranpräparation	41
3.4.9.2	Solubilisieren von Membranproteinen	42
3.4.9.3	Bindungstest mit [¹²⁵ I] α -Bungarotoxin	42
3.4.10	Immunpräzipitation	44
3.4.11	Affinitätschromatographie	45
3.4.11.1	Affinitätschromatographie an gekoppeltem α -Bungarotoxin	45
3.4.11.2	Affinitätschromatographie an gekoppelten Antikörper	46
3.5	Immunhistochemie an Gefrierschnitten adulter <i>Drosophila</i>-Köpfe	46

4	ERGEBNISSE	48
4.1	Herstellung und Charakterisierung von nAChR-Antiseren	48
4.1.1	Herstellung SBD-spezifischer Antiseren	48
4.1.2	Charakterisierung der Antiseren	50
4.1.2.1	Überprüfung von Antikörpern auf Kreuzreaktivität	50
4.2	Nachweis von [¹²⁵ I]α-Bungarotoxin-Bindungsstellen in <i>Drosophila</i> -Kopf-Membranen und Solubilisat	53
4.3	Nachweis von nAChR-Untereinheiten in den Eluatn der α-Bgt-Säule und Bestimmung der Molekulargewichte	56
4.4	Nachweis verschiedener Subtypen neuronaler nAChRen in <i>Drosophila melanogaster</i>	58
4.4.1	Nachweis eines Rezeptortyps, der ALS, Dα2 und SBD enthält	58
4.4.1.1	ALS und Dα2 - Untereinheiten desselben Rezeptorkomplexes	58
4.4.1.2	Die SBD-Untereinheit im ALS/Dα2-Rezeptor	64
4.4.2	Nachweis eines Rezeptortyps, der Dα3 und ARD enthält	72
4.4.3	Nachweis eines Rezeptortyps, der ARD und SBD enthält	79
4.5	Affinitätschromatographie an monoklonalen Antikörper-Säulen	81
4.5.1	Aufreinigung von ALS-enthaltenden nAChRen an der ALS- D4-Säule	81
4.5.2	Aufreinigung von ARD-enthaltenden nAChRen an der ARD-3d2-Säule	83
5	DISKUSSION	84
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	ABKÜRZUNGEN	99
8	LITERATURVERZEICHNIS	102

1 EINLEITUNG

Der Wunsch, die Welt zu verstehen, ist untrennbar damit verbunden, das Gehirn und seine Funktion gänzlich zu begreifen. Das menschliche Gehirn besteht aus etwa 100 Milliarden Nervenzellen (Neuronen). Die Nervenzellen sind die Bauelemente des Gehirns, und ihre Zahl liegt in der Größenordnung der Zahl der Sterne in unserer Milchstraße.

Neuronen besitzen die Fähigkeit, Signale zu empfangen, umzuformen und weiterzuleiten. Sie treten durch spezialisierte Strukturen miteinander in Kontakt - den Synapsen (griech. *synapsis* = Verbindung). Die axonale Nervendingung (Präsynapse) und die Kontaktstelle der ihr nachgeschalteten Nervenzelle (Postsynapse) sind durch den synaptischen Spalt getrennt. Ein eintreffendes Aktionspotential führt zu einem Kalziumeinstrom in die präsynaptische Nervendingung. Dadurch kommt es zur Ausschüttung eines in Vesikeln angereicherten Botenstoffs (Neurotransmitter) in den synaptischen Spalt. Der Neurotransmitter diffundiert dann zur postsynaptischen Membran, welche Rezeptoren für den Neurotransmitter enthält.

Je nach Art der Signalweiterleitung dieser ligandengesteuerten Rezeptoren unterscheidet man ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Metabotrope Rezeptoren sind über transduzierende G-Proteine an *second messenger*-Kaskaden gekoppelt. Zu diesen Rezeptoren gehört beispielsweise der muskarinerge Acetylcholinrezeptor, der durch das Rißpilzalkaloid Muskarin aktiviert wird. Ionotrope Rezeptoren sind Ionenkanäle, die sich durch die Bindung von Liganden öffnen und so für Ionen durchlässig werden. Bei einem exzitatorischen Neurotransmitter führt der Kationenfluss durch den Kanal zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran, was zur Erregung der postsynaptischen Zelle führt. Der hauptsächliche exzitatorische Neurotransmitter des ZNS von Vertebraten ist Glutamat, welches an drei Klassen unterschiedlicher ionotroper sowie an metabotrope Glutamatrezeptoren binden kann. Ein weiteres Beispiel für exzitatorische ionotrope Rezeptoren ist der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR). Er gilt als Prototyp einer Familie von Neurotransmitter-aktivierten Rezeptoren,

zu denen auch der 5-HT₃-Rezeptor und die inhibitorischen Glycin- und GABA_A-Rezeptoren gehören.

1.1 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor

Der nAChR an der neuromuskulären Synapse als Modell-Rezeptor

Der nAChR ist besonders gut an der neuromuskulären Synapse (NMS) aus Vertebraten und den elektrischen Organen einiger Fische charakterisiert (Raftery et al., 1980; Noda et al., 1983).

Der muskuläre nAChR ist ein Pentamer, gebildet aus zwei ligandenbindenden Untereinheiten α und den strukturellen Untereinheiten β , γ und δ , wobei im adulten Organismus die γ -Untereinheit durch eine ϵ -Untereinheit ersetzt wird.

Die Untereinheiten bilden wie die Dauben eines Fasses einen Kanal, der die Zellmembran durchspannt (Unwin, 1993) (Abb. 1).

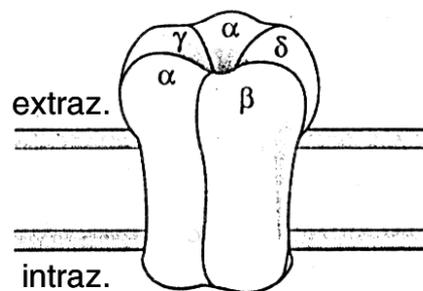


Abb. 1: Pentamere Struktur des muskulären nikotinischen Acetylcholinrezeptors

Der muskuläre nAChR besteht aus vier homologen Polypeptidketten α , β , γ und δ , die sich in der Zellmembran zu einem Pentamer aus α γ α δ β anordnen. Dabei bilden sie eine durch Acetylcholin gesteuerte wässrige Pore, die für Kationen durchlässig ist.

Die nAChR-Untereinheiten gehören zu einer Proteinfamilie; sie haben eine ähnliche Sequenz und Verteilung hydrophober membrandurchspannender Segmente (Abb. 2).

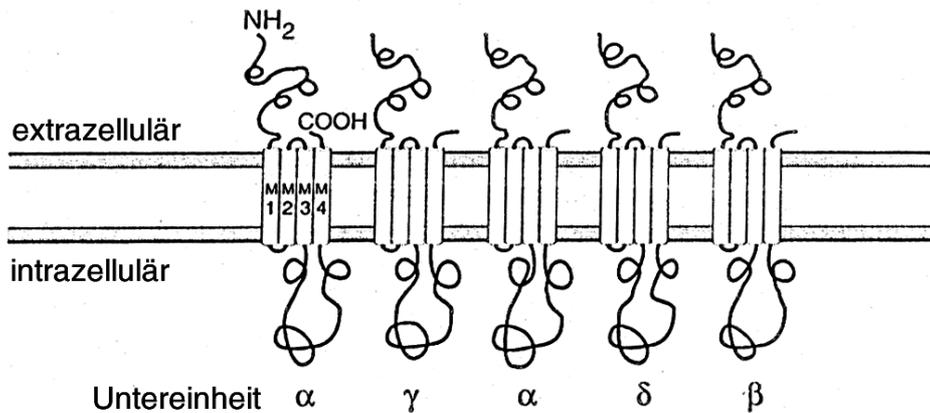


Abb. 2: Aufbau der nAChR-Untereinheiten

Jede Untereinheit durchzieht viermal die Plasmamembran, wobei die NH_2 - und COOH -Enden der Polypeptidkette extrazellulär liegen. Zwischen den Transmembranregionen 3 und 4 bildet das Polypeptid jeder Untereinheit eine große zyttoplasmatische Schleife, die die geringste Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Untereinheiten aufweist. Der Ionenkanal wird durch die Transmembranregion 2 einer jeden der fünf Untereinheiten gebildet (Akabas et al., 1994).

Zwei Moleküle Acetylcholin (ACh) binden am Rezeptormolekül und zwar an ganz bestimmten Schleifen der extrazellulär liegenden Domäne jeweils einer α - und einer δ - bzw. einer α - und einer γ -Untereinheit. Die meisten an der Ligandenbindung beteiligten Komponenten sind neben einem Cysteinpaar an den Positionen 192 und 193 einige aromatische Aminosäuren in drei schleifenförmigen Bindungsdomänen (*loops A – C*) der α -Untereinheiten. Andere Aminosäurereste wie die negativ geladenen Aspartat und Glutamat (*loop D*), Threonin oder Tyrosin (*loop E*) und Tryptophan (*loop F*) werden von den *non- α* -Untereinheiten gebildet (zusammengefasst bei Hucho et al., 1996). Nach dem Öffnen der Kanalpore und dem Ionenfluss desensitiviert der Rezeptor und der Kanal wird auch in Gegenwart von weiterem Liganden wieder geschlossen. Das Gleichgewicht zwischen diesen physiologischen Zuständen kann durch die Einwirkung bestimmter Pharmaka gestört werden. Neben Agonisten wie ACh lassen sich kompetitive und nichtkompetitive Inhibitoren unterscheiden. Kompetitive Antagonisten konkurrieren mit ACh

um seine Bindungsstelle am Rezeptormolekül und können so die Öffnung des Ionenkanals verhindern. Zu dieser Art von Antagonisten gehört die Schlangengiftkomponente α -Bungarotoxin, die fast irreversibel an Muskelrezeptoren bindet. Nichtkompetitive Inhibitoren beeinflussen den Ionenfluss und erhöhen die Desensitivierungsrate des Kanals (Arias, 1997).

Diversität neuronaler nAChRen

Nikotinische Rezeptoren sind auch im Gehirn nachgewiesen worden, wo ihre Häufigkeit jedoch weit unter der der hauptsächlich vorkommenden exzitatorischen Glutamaterezeptoren liegt (McQuarrie et al., 1976; Salvaterra et al., 1976). Der Aufbau und die Funktion dieser neuronalen nAChRen im Gehirn von Vertebraten und Invertebraten sind nicht vollständig geklärt. Man nimmt an, dass die neuronalen nAChRen ebenso wie der muskuläre Rezeptortyp Pentamere darstellen (Anand et al., 1991; Cooper et al., 1991).

Der neuronale nAChR besteht aus zwei verschiedenen Typen von Untereinheiten: den ligandenbindenden α -Untereinheiten ($\alpha 2$ - $\alpha 9$) und den strukturellen β -Untereinheiten ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Claudio et al., 1989; Deneris et al., 1991). Die Expressionsmuster einzelner Untereinheiten innerhalb des Gehirns sind bisher gut untersucht; sie sind unterschiedlich verteilt, überlappen sich jedoch teilweise (Boyd, 1997; Arroyo-Jim et al., 1999).

Die Struktur und Stöchiometrie sowie das Ausmaß der Diversität neuronaler nAChRen *in vivo* ist nach wie vor teilweise ungeklärt. Die verschiedenen Untereinheiten können theoretisch über Tausend unterschiedliche pentamere Kombinationen bilden. Es scheint aber so, dass *in vivo* nur bestimmte Rezeptortypen exprimiert werden (Quick et al., 1999).

In den meisten elektrophysiologischen *in vitro*-Studien wurden paarweise Kombinationen der mRNAs verschiedener Untereinheiten in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* injiziert. In den Oozyten wurden die Rezeptorproteine translatiert und in die Plasmamembran eingebaut. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ -Untereinheiten funktionelle Rezeptoren bilden können, wenn sie in paarweisen Kombinationen mit den $\beta 2$ - oder $\beta 4$ -Untereinheiten exprimiert werden

(Conroy et al., 1995). Man nimmt an, dass nur die $\alpha 7$ -, $\alpha 8$ - und $\alpha 9$ -Untereinheiten in der Lage sind, homomere Kanäle zu bilden. (Couturier et al., 1990; Drisdell und Green, 2000; Gotti et al., 1994; Elgoyhen et al., 1994).

Im Säugerhirn lassen sich durch Bindungsstudien mit radioaktiven Liganden die nAChR in vier Hauptklassen mit unterschiedlicher regionaler Verteilung einteilen: eine hochaffine [^3H]-Nikotin-Bindungsstelle, die die $\alpha 4$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten enthält (Flores et al., 1992) und einen niedrig affinen nikotinischen Rezeptor, der α -Bungarotoxin (α -Bgt)-sensitiv ist (Clarke et al., 1995; Seguela et al., 1993) und die $\alpha 7$ -Untereinheit enthält. $\alpha 4\beta 2$ -enthaltende Rezeptoren stellen den Hauptanteil nikotinischer Bindungsstellen dar; während $\alpha 7$ -enthaltende Rezeptoren den Großteil an α -Bgt-Bindungsstellen im Vertebratengehirn bilden. In einer dritten Hauptklasse können zwei Rezeptoren unterschieden werden, die durch [^3H]-Epibatidin (Epibatidin wurde aus der Haut des Frosches *Epipedobates tricolor* isoliert.) markiert werden und unterschiedlich sensitiv gegenüber Cytisin sind. Sie enthalten wahrscheinlich die $\alpha 3$ - und $\beta 4$ -Untereinheiten (Perry und Kellar, 1995; Marks et al., 1998; Zoli et al., 1998). $\alpha 3\beta 4$ -enthaltende Rezeptoren sind vor allem im peripheren Nervensystem anzutreffen. Ein vierter Rezeptortyp desensitiviert bei hohen Nikotindosen schneller als der Typ 3. Neuere Untersuchungen mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierung und *patch-clamp*-Ableitungen an Schnitten der $\beta 2$ -knock-out-Maus bestätigten diese Einteilung der nikotinischen Rezeptoren in 4 Hauptklassen (Zoli et al., 1998). In Abb. 3 sind zusammenfassend wichtige unterschiedliche nAChR-Subtypen der Vertebraten dargestellt, welche aus bisherigen Untersuchungen am ZNS und PNS bekannt sind.

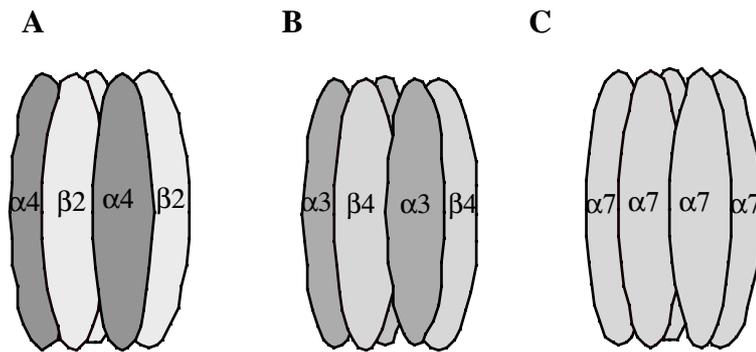


Abb. 3: Unterschiedliche Rezeptorsubtypen aus dem ZNS und PNS von Vertebraten

A: Der am stärksten exprimierte Subtyp $\alpha 4\beta 2$ stellt den Hauptanteil nikotinischer Bindungsstellen im Gehirn von Vertebraten dar. **B:** Der $\alpha 3\beta 4$ -Subtyp ist hauptsächlich im peripheren Nervensystem anzutreffen; er kann zusätzlich die $\beta 2$ -, aber auch die $\alpha 5$ -Untereinheit enthalten. **C:** Homomere Rezeptortypen aus 5 identischen Untereinheiten werden von $\alpha 7$, $\alpha 8$ oder $\alpha 9$ gebildet und stellen α -Bungarotoxin-sensitive Kanäle dar.

Einige neuronale Untereinheiten werden interessanterweise auch in nicht-neuronalem Gewebe exprimiert, z. B. im Thymus (Mihovilovic et al., 1993a, 1993b) oder T-Lymphozyten (Battaglioli et al., 1998), in PC12-Zellen (Rogers et al., 1992; Blumenthal et al., 1997) und in sich entwickelnden Muskeln (Corriveau et al., 1995), Sehnen und Periostum des Hühnchens (Romano et al., 1997) sowie im sich entwickelnden Muskel des Säugers (Fischer et al., 1999). $\alpha 9$ -enthaltende Rezeptoren sind in den feinen Haarzellen der Hörschnecke von Säugern gefunden worden. Sie spielen dort eine entscheidende Rolle bei der Innervierung des Innenohrs (Vetter et al., 1999). Funktionelle $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren konnten in der Retina des Huhns (Vailati et al., 1999) und in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra nachgewiesen werden (Göldner et al., 1997; Charpantier et al., 1998). Neuronale Rezeptoren sind ebenfalls in den Ganglien des vegetativen Nervensystems exprimiert, wobei die $\alpha 3$ -Untereinheit die dort am stärksten exprimierte Untereinheit zu sein scheint.

Ansätze zur funktionellen Charakterisierung von nAChRen

Es gibt Hinweise dafür, dass neuronale nAChRen an synaptischen Prozessen, die Lern- und Gedächtnisvorgängen zu Grunde liegen, beteiligt sind. Kerne des ZNS mit ACh-enthaltenden Neuronen (z. B. *Nucleus interpeduncularis pontis*, *Nucleus septi medialis* und *Nucleus basalis MEYNERT*) projizieren weitverzweigt in viele Regionen des Gehirns. Krankheiten des Menschen, die mit kognitiven Störungen einhergehen und mit Fehlregulationen des Neurotransmitters Acetylcholin verbunden sind, sowie eine Vielzahl tierexperimenteller Untersuchungen deuten auf eine Rolle nikotinischer AChRen bei Lern- und Gedächtnisvorgängen hin. Eine quantitative Abnahme der Rezeptoren im Gehirn sind in neurodegenerativen Krankheiten wie Schizophrenie (Court et al., 1999, Guan et al., 1999) oder Alzheimerkrankheit (Martin-Ruiz et al., 1999, Wang et al., 2000a und 2000b) gezeigt, jedoch sind bisher keine direkten funktionellen Bezüge bewiesen worden. Funktionsstörungen des nAChR, z. B. durch die Mutation einer einzelnen Untereinheit, sind in einer Form von Schlafepilepsie nachgewiesen worden (Steinlein, 1995). Weiterhin werden nAChRen Funktionen im zirkadianen System zugeschrieben, deren genaue Wirkungsweise im Suprachiasmatischen Kern jedoch kontrovers diskutiert wird (O'Hara et al., 1998 und 1999).

Neuere Ergebnisse zeigen, dass neuronale nAChRen auch in Funktionen, die nicht unmittelbar mit der synaptischen Transmission zu tun haben, involviert sein können. In der Arbeit von Pugh und Margiotta (2000) wird berichtet, dass die Aktivierung einer Klasse α -Bgt-inhibierbarer nAChRen ein Überleben von Neuronen des PNS fördert, da der Prozess der Apoptose reduziert wird. Der α 7-Untereinheit, die auch in Motoneuronen exprimiert wird, wird eine solche Rolle beim programmierten Zelltod zugeschrieben. So ist der Kalziumeinstrom durch α 7-Rezeptoren ausreichend, um eine Vielzahl von kultivierten Motoneuronen vor der Apoptose durch Entzug von Wachstumsfaktoren zu bewahren (Messi et al., 1997). Andererseits wird nAChRen auch eine gegenteilige Bedeutung beigemessen: So kann die Aktivierung von α -Bgt-Rezeptoren durch niedrige Nikotingaben den

apoptotischen Zelltod in hippocampalen Vorläuferzellen hervorrufen (Berger et al., 1998).

Mäuse, bei denen Gene für die Untereinheiten des nAChRs fehlen, sogenannte *knock-out*-Tiere, können Aufschluss über die funktionelle Bedeutung der nAChR-Untereinheiten geben. So konnte gezeigt werden, dass Tiere, bei denen die $\alpha 3$ -Untereinheit eliminiert wurde, einen Phänotyp ähnlich einer menschlichen Krankheit (Megazystis-Syndrom) haben und in den ersten Lebenswochen sterben (Xu et al., 1999a). Vom superioren Zervikalganglion abgeleitete Ströme dieser Mäuse zeigten eine verminderte ACh-induzierte Kanalaktivität im Vergleich zu Wildtypmäusen, was die Bedeutung der $\alpha 3$ -Untereinheit als essentielle Komponente des autonomen Nervensystems deutlich macht. Während die $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Mutanten allein keine äußerlichen Auffälligkeiten zeigten, offenbart die $\beta 2/\beta 4$ -Doppelmutante ähnliche Symptome wie die $\alpha 3$ -*knock-out*-Maus (Xu et al., 1999b).

Die $\alpha 7$ -Untereinheit ist im Säugerhirn weit verbreitet und, wie bei der Ratte untersucht, in einigen Hirnregionen besonders während der Synaptogenese exprimiert (Broide et al., 1996). Jedoch entwickelten sich $\alpha 7$ -*knock-out*-Mäuse phänotypisch völlig normal. Daraus wurde geschlossen, dass diese Untereinheit keine lebensnotwendige Untereinheit darstellt oder ihre Funktion durch andere Untereinheiten kompensiert werden kann (Orr-Urtreger et al., 1997).

Es gibt pharmakologische Studien, die über die Wirkungsweise analgetischer Substanzen durch Modulation von nAChRen berichteten, was neue Ansätze in der Schmerzbehandlung bieten kann (Bannon et al., 1998). Nikotin selbst besitzt antinozizeptive Effekte, ebenso die Agonisten Epibatidin und ABT-594 (eine synthetische Substanz, die auf Grundlage von Epibatidin entwickelt wurde), welche an akuten Schmerzmodellen hundertmal potenter als Morphin sind. Mäuse, bei denen die $\alpha 4$ -Untereinheit eliminiert worden war, besaßen keine hochaffinen $^3\text{[H]}$ -Nikotin- und $^3\text{[H]}$ -Epibatidin-Bindungsstellen, was zeigt, dass diese Untereinheiten entscheidend bei der nikotinerhöhten Antinozizeption sein können (Marubio et al., 1999).

Es verstärken sich Hinweise darauf, dass nAChRen in neuronalen Signalwegen, die mit Prozessen der Suchtentstehung in Verbindung gebracht werden, eine Rolle spielen. So berichteten Lena und Changeux (1998) über eine Aktivierung von β 2-enthaltenden Rezeptoren dopaminergischer Neurone bei Nikotinabhängigkeit. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es β 2-enthaltende Rezeptoren sind, die eine entscheidende Rolle bei der Übertragung der verstärkenden Eigenschaften von Nikotin spielen, indem sie die Ausschüttung des Neurotransmitters Dopamin in des ventrale Striatum stimulieren (Picciotto et al., 1998).

NACHRen in Insekten

Das cholinerge System stellt evolutionsgeschichtlich ein sehr altes System dar. So konnte Acetylcholin in niederen Tieren, in Pflanzen und sogar in Bakterien nachgewiesen werden. Ursprünglich hatte das cholinerge System eher eine trophische Funktion, und man nimmt an, dass Neuronen das schon vorhandene System zur Informationsübertragung zwischen den Zellen weiterentwickelten.

Die Bedeutung von Acetylcholin in Insekten ist bereits in den 60er Jahren bei der Stubenfliege *Musca domestica* beschrieben worden. (Winteringham, 1966). In den Ganglien der Arthropoden sind extrem hohe Konzentrationen an Acetylcholin gefunden worden, vergleichbar mit Größenordnungen, wie sie in den elektrischen Organen einiger Fische anzutreffen sind. Über eine weite Verteilung wurde auch von anderen Komponenten des cholinergen Systems, wie dem Acetylcholin synthetisierenden Enzym, der Cholinacetyltransferase (ChAT), und dem Acetylcholin degradierenden Enzym, der Acetylcholinesterase (AChE), in verschiedenen Insektenspezies berichtet (Smallman und Mansingh, 1969). Im Gegensatz zu Vertebraten, bei denen Glutamat der hauptsächlich exzitatorische Neurotransmitter darstellt, die neuromuskuläre Synapse jedoch cholinerg ist, ist die Situation in Insekten umgekehrt. Hier ist die neuromuskuläre Synapse glutamaterg, während Acetylcholin ein wichtiger Neurotransmitter an den Synapsen des ZNS ist

(Gerschenfield et al., 1973; Breer und Sattelle, 1987; Restifo und White, 1990). Die spezifische Wirkungsweise einer Reihe von cholinergen Agonisten und Antagonisten gab Hinweise darauf, dass im zentralen Nervensystem von Insekten funktionelle nAChRen vorhanden sind (Sattelle, 1977; Blagburn und Sattelle, 1987, Sattelle et al., 1989). Zum Beispiel ließen vergleichende Bindungsanalysen cholinergischer Liganden am Gehirn der Stubenfliege und an elektrischen Organen vom Zitterrochen *Torpedo californica* auf das Vorhandensein von nAChRen in Insekten schließen (Eldefrawi et al., 1971). Bindungsstudien mit [¹²⁵I]α-Bgt an Kopfhomogenaten und Schnittpräparationen von *Drosophila melanogaster* zeigten das Vorhandensein putativer nAChRen in den synaptischen Neuropilregionen (Dudai, 1977 und 1978; Dudai und Amsterdam, 1977; Schmidt-Nielsen et al., 1977; Rudloff, 1978).

In Insekten sind nAChRen hauptsächlich in Synapsen, aber auch auf Zellkörpern zentraler Ganglien lokalisiert und können sowohl α-Bgt-sensitiv als auch insensitive sein (Zusammenfassungen bei Marshall et al., 1988; Gundelfinger und Hess, 1992; Gundelfinger und Schulz 2000); jedoch haben sie andere physiologische Eigenschaften als alle bisher untersuchten Vertebraten-nAChRen (Sattelle, 1988). Lee und O'Dowd (1999) demonstrierten, dass kultivierte embryonale Neuronen aus *Drosophila* spontan synaptische Verbindungen eingehen und dass zwischen diesen Neuronen neben einer GABAergen eine schnelle exzitatorische, durch nAChRen vermittelte synaptische Transmission stattfindet. Elektrophysiologische Untersuchungen an kultivierten Neuronen der amerikanischen Küchenschabe *Periplaneta americana* zeigten, dass neben nikotinischen Rezeptoren auch Rezeptoren mit nikotinisch-muskarinergen Eigenschaften existieren (Lapied et al., 1990).

Einige Arbeiten berichteten über Einzelkanalableitungen ACh-aktivierbarer Kanäle in dissoziierten Neuronen, in Primärkulturen oder definierten Neuronen *in situ* von verschiedenen Insektenspezies. Mindestens drei Hauptklassen ACh-aktivierbarer Kanäle mit den Leitfähigkeiten 9 - 25 pS, 30 - 48 pS und 59 - 80 pS wurden dabei gemessen (Wu et al., 1983; Albert

und Lingle, 1993; Goldberg et al., 1999; zusammengefasst bei Leech and Sattelle, 1993; Gundelfinger und Schulz, 2000).

Frühere Untersuchungen ließen darauf schließen, dass nAChRen in Insekten eher „einfach“ aufgebaut sind, indem sie homomere Kanäle, also Kanäle aus nur einer Untereinheit, bilden (Breer et al., 1985).

Jedoch sind bei verschiedenen Insektenspezies bereits mehr als eine Untereinheit gefunden worden (Zusammenfassungen in Gundelfinger, 1992; Gundelfinger und Hess, 1992; Gundelfinger und Schulz, 2000). Hermsen und Mitarbeiter (1998) berichteten von fünf cDNA-Klonen, die Untereinheiten des nAChR in der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* kodieren.

Aus der Blattlaus *Myzus persicae* sind bereits fünf verschiedene α -Untereinheiten (Sgard et al., 1998; Huang et al., 1999) und eine β -Untereinheit (Huang et al., 2000) bekannt.

Aus der Taufliege *Drosophila melanogaster* sind bisher 6 unterschiedliche nAChR-Untereinheiten kloniert worden. Dazu gehören vier ligandenbindende (α)-Untereinheiten und zwei strukturelle (β)-Untereinheiten (Tab.1).

Untereinheit	Eigenschaft, Referenz
ALS α -like subunit	Ligandenbindende Untereinheit (Bossy et al., 1988)
Dα2/SAD <i>Drosophila</i> - α -like subunit 2	Ligandenbindende Untereinheit (Baumann et al., 1990; Jonas et al., 1990; Sawruk et al., 1990a)
Dα3 <i>Drosophila</i> - α -like subunit 3	Ligandenbindende Untereinheit (Schulz et al., 1998)
Dα4 <i>Drosophila</i> - α -like subunit 4	Ligandenbindende Untereinheit (Lansdell und Millar, 2000a)
ARD nAChR-protein from <i>Drosophila</i>	Strukturelle Untereinheit (Hermans-Borgmeyer et al., 1989; Sawruk et al., 1988)
SBD second β -subunit for <i>Drosophila</i>	Strukturelle Untereinheit (Sawruk et al., 1990b)

Tab. 1: Bisher klonierte nAChR-Untereinheiten von *Drosophila melanogaster*

Die Existenz weiterer Untereinheiten wurde durch Sequenzanalyse im Rahmen des *Drosophila*-Genomprojekts vorhergesagt (Littleton und Ganetzky, 2000).

Die Verteilung der ALS-, D α 2- und ARD-Transkripte und -Proteine im ZNS aus *Drosophila* sind gut untersucht (Hermans-Borgmeyer et al., 1989; Schuster et al., 1993; Jonas et al., 1994). In Membranextrakten aus *Drosophila*-Köpfen wurden α -Bgt-Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten gefunden, was auf die Existenz unterschiedlicher Rezeptorklassen schließen ließ (Schloß et al., 1988).

Verschiedene α -Untereinheiten von *Drosophila* wurden in *Xenopus*-Oozyten funktionell exprimiert und charakterisiert. Jedoch bildet keine der drei ligandenbindenden Untereinheiten ALS, D α 2 und D α 3 physiologisch relevante funktionelle homomere Rezeptoren. Außerdem werden zusammen mit den bekannten *Drosophila*- β -Untereinheiten keine funktionellen Rezeptoren exprimiert. Jedoch in Kombination mit der β 2-Untereinheit des Hühnchens konnte gezeigt werden, dass in der Oozyte funktionelle Rezeptoren aus ALS/ β 2, D α 2/ β 2 und D α 3/ β 2 mit unterschiedlichen physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften entstehen. Außerdem wurde die Bildung einer Rezeptormischpopulation aus ALS/D α 2/ β 2 beschrieben, die Eigenschaften sowohl der ALS- als auch der D α 2-Untereinheit aufweist (Bertrand et al., 1994; Schulz et al., 1998; Schulz et al., 2000).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind im zentralen und peripheren Nervensystem von Vertebraten weit verbreitet. Neben ihrer Rolle bei der exzitatorischen Signalübertragung können sie besonders im ZNS modulierende Funktionen übernehmen; so regulieren sie z. B. die Transmitterausschüttung glutamaterger oder GABAerger Synapsen.

NACHRen werden im ZNS von Insekten in großer Dichte exprimiert und übernehmen dort eine Schlüsselstellung bei der synaptischen Transmission. Jedoch sind die genauen Mechanismen der Funktionsweise neuronaler

nikotinischer Rezeptoren in Vertebraten und Invertebraten noch weitgehend unbekannt.

Für die Beantwortung der Frage nach der funktionellen Bedeutung von nAChRen ist es notwendig, deren Aufbau zu entschlüsseln, insbesondere die Anordnung verschiedener Untereinheiten in unterschiedlichen Rezeptorkomplexen zu identifizieren. Während die Stöchiometrie des nAChR an der neuromuskulären Synapse bekannt ist, und dieser Rezeptor als Prototyp einer ganzen Klasse ligandengesteuerter Rezeptoren angesehen wird, ist über den Aufbau neuronaler nikotinischer Rezeptoren in Vertebraten und Invertebraten bisher wenig bekannt. Überhaupt ist für keinen einzigen ligandengesteuerten Ionenkanal von Invertebraten bisher die Quartärstruktur entschlüsselt.

In dieser Arbeit wurde der Frage nach dem Aufbau neuronaler nAChRen in *Drosophila melanogaster* nachgegangen.

Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche der bekannten Untereinheiten in *Drosophila melanogaster* in nativen Rezeptorkomplexen vorkommen. Es sollte geklärt werden, welche verschiedenen Rezeptortypen in *Drosophila* existieren. In Abbildung 4 ist diese Fragestellung schematisch dargestellt.

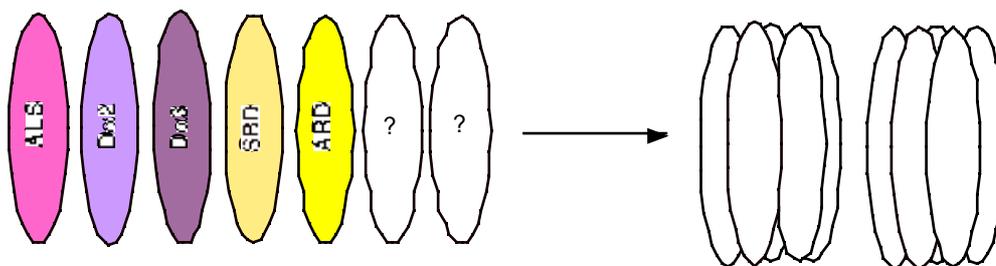


Abb. 4: Arbeitsmodell: Welche der fünf bekannten nAChR-Untereinheiten bilden native Rezeptormoleküle in *Drosophila* ?

Warum wurde gerade *Drosophila melanogaster* gewählt ?

Nähere Untersuchungen zum nAChR von *Drosophila* erscheinen aus verschiedenen Gründen angebracht. Zum einen ist dieser gut untersuchte Modellorganismus zugänglich für eine Vielzahl verschiedenster Techniken, die es u. a. erlauben, die Zusammensetzung und Funktion von nAChRen im

ZNS *in vivo* zu adressieren. Zum anderen werden nAChRen im ZNS der Fliege in großer Zahl exprimiert. Hieraus lassen sich möglicherweise allgemeingültige Erkenntnisse zur Rolle dieser Rezeptoren für die Signalverarbeitung im Gehirn ableiten. Darüber hinaus können anwendungsrelevante Ergebnisse erwartet werden. Da zu den Insekten auch zahlreiche Schädlinge und Krankheitsüberträger gehören, ist ein eingehendes Verständnis des cholinergen Systems als potentieller Angriffspunkt für die Entwicklung wirksamer Insektizide notwendig. Ein Beispiel für an nAChRen angreifende Insektizide aus der Gruppe heterozyklischer Nitromethylene und Nitroimine ist Imidachloprid, welches für Vertebraten relativ gering toxisch ist (Moffat, 1993; Narahashi, 1996; Zwart et al., 1992, 1994).

Um die Verteilung der einzelnen Untereinheiten in den Neuropilregionen des ZNS der Fliege miteinander vergleichen zu können, sollten zu bereits vorhandenen Daten aus früheren Arbeiten (Schuster et al., 1993; Jonas et al., 1994) weitere immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Ko-Verteilung der ALS- und D α 2-Untereinheiten in Neuropilregionen des ZNS gab Hinweise darauf, dass beide Untereinheiten in ein und demselben Rezeptorkomplex vorkommen könnten (Schuster et al., 1993). Außerdem konnte in *Xenopus*-Expressionsstudien mit beiden α -Untereinheiten und einer β -Untereinheit aus dem Huhn die Bildung funktioneller Rezeptoren, die beide α -Untereinheiten enthielten, abgeleitet werden (Schulz et al., 2000). Ein Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob in der Fliege tatsächlich solche aus zwei unterschiedlichen α -Untereinheiten zusammengesetzte Rezeptoren vorkommen. Zu diesem Zweck sollten funktionelle Rezeptoren aus *Drosophila*-Köpfen isoliert werden. Die Antikörper sollten gegen die einzelnen Untereinheiten auf ihre Spezifität geprüft werden. Außerdem sollte ein spezifischer Antikörper gegen die SBD-Untereinheit hergestellt werden, um die Verteilung von SBD in Neuropilregionen der Fliege mit anderen Untereinheiten zu vergleichen und um Immunpräzipitation durchzuführen. Zusätzlich sollten Untersuchungen zu den Rezeptorkomplexen, welche die D α 3-Untereinheit enthalten, durchgeführt werden. Dazu stand der Antikörper D α 3-85 zur Verfügung.

2 MATERIALIEN

2.1 Antikörper

Antikörper	Firma	Katalog-Nummer
anti-Kaninchen IgG + IgM	DIANOVA	111-005-045
anti-Maus IgG + IgM	DIANOVA	115-006-068
Kaninchen-PAP	DIANOVA	323-005-024
Ratte-PAP	DIANOVA	423-005-024
anti-Maus Peroxidase-gekoppelt	Amersham	NIF 931
anti-Kaninchen Peroxidase-gekoppelt	Amersham	NIF 824
anti-Ratte Peroxidase-gekoppelt	Amersham	NA 932
anti-Maus Cy ^{TM2}	DIANOVA	115-225-044
anti-Kaninchen Cy ^{TM3}	DIANOVA	111-165-045
anti-Maus Cy ^{TM5}	DIANOVA	115-175-071
anti-Kaninchen Cy ^{TM5}	DIANOVA	111-175-045

2.2 Enzyme und Standardmarker

Enzym	Firma	Katalog-Nummer
BstE II	GIBCO	15225-014
Cla I	GIBCO	15416-050
Eco RI	GIBCO	15202-013
Hind III	GIBCO	15425-010

Alkalische Phosphatase (Calf Intestine)	Boehr./Mannh.	713023
Benzon Nuclease	Boehr/Mannh.	1.01654.0001
Lysozym	Eurogentec	-
RNase A	Sigma	R-5503
Taq Polymerase	Promega	M1661
T4 DNA Ligase	Boehr./Mannh.	481220

Standardmarker für Proteine

Molekulargewichtsmarker	Firma	Katalog-Nummer
10-kD-Leiter Proteinmarker	GIBCO	10064-012
vorgefärbter Marker für Proteine	Amersham	RPN-800
vorgefärbter Marker für Proteine	Sigma	P1677

2.3 Vektoren und rekombinante DNA

Vektor	Firma
pGEX1 λ T	Pharmacia
pTrcHisB1	Invitrogen
pEx34b; pEx34c	Strebel et al., 1986

Die Karten dieser Expressionsvektoren sind auf den Seiten 22 - 23 dargestellt.

Ausgangs-cDNA

laborinterne Klonbezeichnung	cDNA-Konstrukt
D1s1	ARD-cDNA in pBluescript
D3	ALS-cDNA in pSP64 (Bossy et al., 1988)
D5s1	D α 2 in pTZ 19 R
D7	D α 3 in pBluescript SK ⁺
D11s1	SBD in pBluescript KS

Zur Herstellung von Fusionproteinen

laborinterne Klonbezeichnung	Konstrukt
D1e1	ARD-LAC/Phe ³⁰⁵ - Pro ⁴⁴⁴ -Region in pEX 3
D1e5	ARD-MS/Ser ³¹³ - Ser ⁴³⁹ - Region in pEx34b
D3e1	ALS-MS/Ala ¹ - Glu ¹³³ - Region in pEx34c
D3e3	ALS-MS/Ile ³²⁷ - Gly ⁴⁶³ - Region in pEx34c
D3e4	ALS-LAC/Ile ³²⁷ - Gly ⁴⁶³ - Region in pEX 2
D5e1	D α 2-LACAsn ³⁵⁰ - Asp ⁴⁷³ - Region in pEX 2
D5e2	D α 2-MSAsn ³⁵⁰ - Asp ⁴⁷³ - Region in pEx34c
D7e1	D α 3-GST/Glu ³⁹³ - Ser ⁵⁶¹ - Region in pGEX1 λ T
D7e2	D α 3-His/Glu ³⁹³ - Ser ⁵⁶¹ - Region in pTrcHis B1
D11e1	SBD-GST/Ile ³⁰⁶ - Ala ⁴³⁶ - Region in pGEX1 λ T
D11e2	SBD- MS/Ile ³⁰⁶ - Ala ⁴³⁶ - Region in pEx34c

Die Fragmente enthalten folgende Fusionsanteile: **LAC**: cro- β -Galaktosidase, **MS**: MS2-Polymerase, **GST**: Gluthation-S-Transferase und **His**: sechs aufeinanderfolgende Histidine

2.4 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Katalog-Nr.
Acrylamidstammlösung 40 %	Roth	3030
Acrylamidstammlösung 30%	Roth	3029.1
Agarose UP	Gibco BRL	540-5510 UB
Agarose MP	Boehr./Mannh.	1388983
Amidoschwarz 10 B	Merck	1167
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck	K13401231
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad	7727-54-0
α -Bungarotoxin	Sigma	V 6625
Bromphenol blau	Roth	A 512.1
Carbachol	Sigma	C 4382
Chloroform	Serva	35050
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva	18865
Deoxycholsäure	Calbiochem	264101
3,3'-Diaminobenzidin-hydrochlorid (DAB)	Sigma	D-5637
Diazabicyclol-(2.2.2)-oktan (DABCO)	Sigma	D-2522
Dimethylformamid	Roth	A529.1
Dimethylpimelimidat (DMP)	Sigma	D-8388
Dithiothreitol (DTT)	Serva	20710
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Serva	20760
Glyzin	Merck	1.12008
Glyzerin	Roth	3783.2
Essigsäure, 100%	Merck	100063
Ethidiumbromid	Merck	1.11615.0001
Ethanol	Roth	7917.1
Ethanolamin	Sigma	E-9508
EGTA	Roth	3054.2
Gluthation, reduziert	Boehr./Mannh.	127744
Harnstoff	Merck	1.08488
Isoamylalkohol	Merck	818969
Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG)	Roth	2316.1
Kaliumacetat	Merck	1.048301000

Chemikalie	Firma	Katalog-Nr.
Kaliumchlorid	Merck	4936.1000
Manganchlorid	Merck	105917
2- β -Mercaptoethanol	Sigma	M-6250
Methanol	Merck	31.03.03
MOPS	Serva	29836
Natriumacetat	Merck	TA 461268
Natriumazid	Merck	822335
Natriumchlorid	Merck	1.06404
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Merck	1.06580
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	1.03090
Natrium- <i>m</i> -Periodate	Sigma	S-1878
Nitrotetrazoliumblauschlorid (NBT)	Boehr./Mannh.	1383213
Paraformaldehyd <i>pure</i>	Serva	31628
Phenol	Roth	0038.1
Phenol Rot-Konzentrat	Sigma	P-8421
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma	P-7626
Polyethylenimin, 50% (w/v) wässrig	Sigma	P-3143
Ponceau S <i>pure</i>	Serva	33429
2-Propanol	Roth	6752.4
Propionsäure	Merck	800.605
Proteaseinhibitor-Cocktailtabletten	Boehr./Mannh.	1836145
Rubidiumchlorid	Fluka	83980
Saccharose	Serva	35580
Salzsäure, 37 %	Merck	1003172500
TEMED p.a.	Roth	2367.5
Triethanolamin (TEA)	Sigma	T-1377
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth	4855.3
Triton® X-100	Serva	37240
Triton X-100, <i>ultrapure</i>	Sigma	T-9284
5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz (BCIP-p-Toluidinsalz)	Boehr./Mannh.	1383221
Tween 20®	Serva	37470

2.5 Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Firma	Katalog-Nr.
Actigel	Sterogene	
Cellophan-Folien (24 x 24 cm)	Roth	K 423.1
Dialyseschlauch	Serva	44145
Einbettmedium <i>tissue-tek</i>	Miles	
Filter <i>Glass fibre type C</i>	Millipore	APFC 02500
Filter Zelluloseacetat HA (0,45µm)	Millipore	HAWP02500
ECL- Detektionskit	Amersham	RPN 3134
Gamma Bind™ Plus Sepharose™	Amers. Pharm.	17-0886-02
Gluathione Sepharose® 4B	Biotech AB Pharmacia Biotech AB	17-0756-01
Haushaltsfolie		
Hyperfilm ECL	Amersham	RPN 3103K
Kaiser`s Glyceringelantine	Merck	1.09242.0100
LB Broth Base	Gibco	12780-052
Magermilchpulver	Milchwerke Stendal	
Ni-NTA-Sepharose	Qiagen	1000630
Nitrocellulosemembran Protran	Schleicher & Schuell	10401196
Parafilm	American national Can	
Polypropylen-Säulen	Bio-Rad	731-1550
Ziegennormalserum	Sigma	G-9023

2.6 Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Polyacrylamid-Elektrophoresekammer	Hofer
Elisa-Reader Titertek Plus MS 212	ICN FLOW
FPLC-Apparatur	Pharmacia
Homogenisator Potter S	B. BRAUN Melsungen
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf
Laserscanmikroskop TCS 4D	Leica
Megafuge 3.0	Heraeus Sepatech
Mikrotom HM 500OM	MICROM
Sonificator	Bandelin
Spektrophotometer DU-64	Beckmann
Tankblotapparatur TE 22 <i>Mighty Small</i>	Hofer
Vakuumfiltrationsgerät	Millipore
Zentrifuge RC5C	Sorvall® Instruments
Rotoren: SLA-1500; HB-6; SS-34	

2.7 Bakterien und Tiermaterial

E.coli-Stämme

DH5 α : zur Expression von His-Fusionsproteinen

XL-Blue: zur Expression von GST-Fusionsproteinen

POP: zur Expression von MS- und β -Gal-Fusionsproteinen

Drosophila melanogaster, Canton S

D. melanogaster, w¹¹¹⁸ (*white* Mutante)

Karten verwendeter Expressionsvektoren

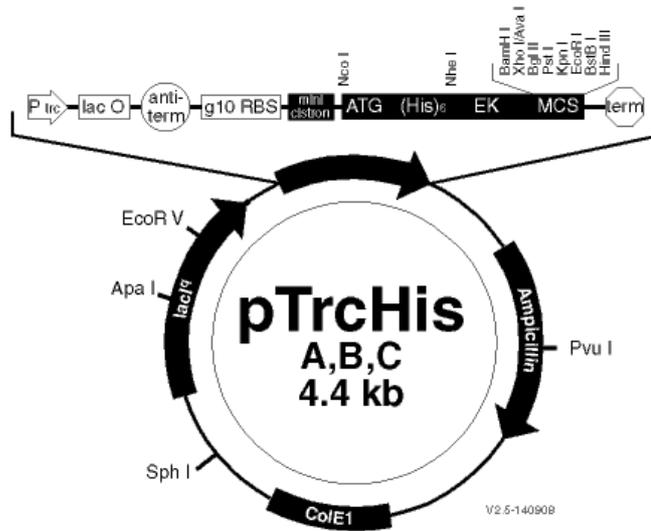


Abb. 5: Expressionsvektor pTrcHis (Invitrogen) zur Expression von HIS-gekoppelten Fusionsproteinen

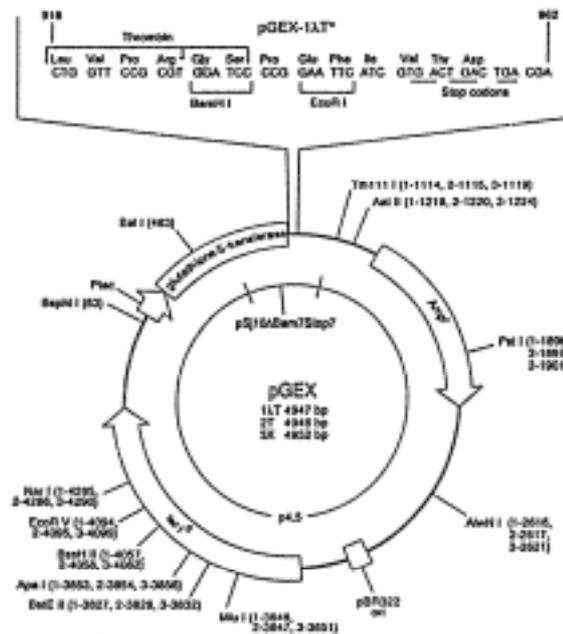


Abb. 6: Expressionsvektor pGEX (Pharmacia) zur Expression von GST-gekoppelten Fusionsproteinen

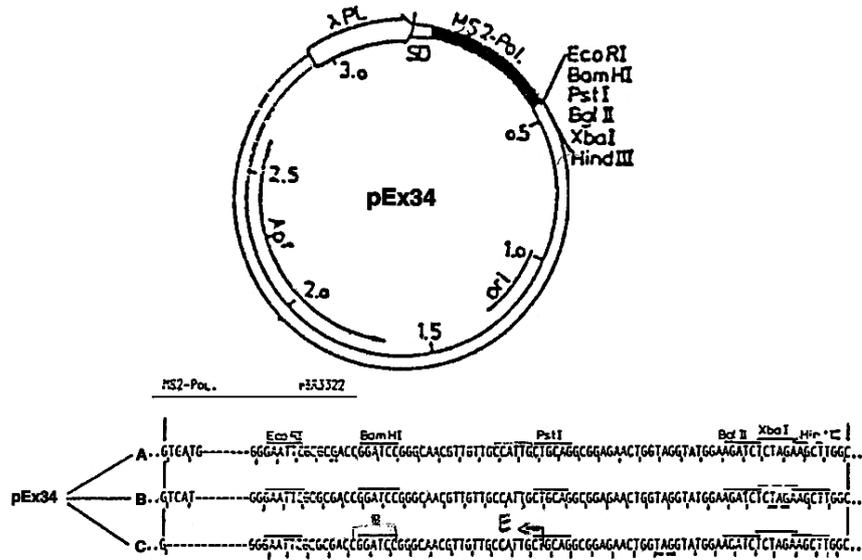


Abb. 7: Expressionsvektor pEx34 (Strebel et al., 1986) zur Expression von MS2-Polymerasegekoppelten Fusionsproteinen

3 METHODEN

3.1 Tierzucht

Für die Immunhistochemie wurden Wildtyp-Fliegen von *Drosophila melanogaster*, Canton S, und für die Präparation von Rezeptorprotein der weißäugige Fliegenstamm *D. melanogaster*, w¹¹¹⁸, verwendet.

Fliegensubstrat: (6 l) 50 g Agar-Agar, 240 g pürierte Rosinen, 360 g Bäckerhefe, 230 g Grieß, 160 g Zuckerrübensirup oder Honig, 20 ml Propionsäure

Weißäugige Fliegen wurden in größeren Behältnissen (Ø: 20 cm, h: 10 cm) gehalten. Zum Ablegen der Eier wurden die Fliegen in Flugkäfige (50x50x40 cm) umgesetzt, welche mit Substrat gefüllte Petrischalen enthielten. Nach 6 - 24 h wurden die Substratplatten aus den Petrischalen entnommen und zur vollständigen Entwicklung der Fliegen in größere, mit Fliegensubstrat gefüllte Gefäße gelegt. Die geschlüpften Fliegen wurden wiederum zur Eiablage verwendet und danach mit einem Handstaubsauger eingesammelt. Dann wurden die Fliegen in Falcon-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

3.2 Allgemeine Klonierungstechniken

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

3.2.1.1 Minipräparation

Bei der Plasmid-Präparation aus einer Bakterienkultur in kleinerem Maßstab (Minipräparation) werden aus dem Zellysat basierend auf der Molekülgröße die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA getrennt.

Reagenzien: **S1-Puffer:** 8 % Saccharose; 50 mM EDTA;
50 mM Tris-HCl, pH 8,0

S2-Puffer: wie S1 mit 10 % Triton X-100

S3-Puffer: 0,5 M NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

Lysozym; 70 % Ethanol; Isopropanol

TE-Puffer: 10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0

1,5 ml-Bakterien-Übernachtskulturen wurden in Eppendorfgläser übertragen und 30 s bei 13000 rpm (Biofuge, Heraeus) zentrifugiert. Die Pellets wurden in 25 µl S1-Puffer mit einer kleinen Spatelspitze Lysozym (in 10 ml S1-Puffer gelöst) resuspendiert. Danach wurden die Proben mit 25 µl S2-Puffer versetzt. Nach dem Kochen der Proben (1 min) wurden sie für 3 min auf Eis abgekühlt und dann je 300 µl S3-Puffer hinzupipettiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei RT wurden die Überstände in neue Gefäße überführt und die DNA durch Zugabe von je 300 µl Isopropanol gefällt, 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert und mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen. Die Minipräparationen wurden nach dem Trocknen in 60 µl dest. Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

3.2.1.2 Midi- bzw. Maxipräparation

Die Plasmidpräparation in größerem Maßstab (Midi- bzw. Maxipräparation) beruht auf Alkalidenaturierung. Dabei wird innerhalb eines kleinen pH-Bereichs nichtüberspiralisierte DNA denaturiert, überspiralisierte Plasmide hingegen nicht.

benötigt: **P1-Puffer:** 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

pH 8,0

P2-Puffer: 0,2 M NaOH; 1 % SDS

P3-Puffer: 2,8 M Kaliumacetat pH 5,5

QBT-, QC- und QF-Lösungen der Firma Qiagen

TIP-Säulen 100 (500) der Firma Qiagen

Eine 100 ml (250 ml)*-Bakterien-Übernachtskultur wurde 15 min bei 4 °C und 6000 g (SLA-1500 Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 4 ml (10 ml) P1-Puffer resuspendiert. Danach wurde 4 ml (10 ml) P2-Puffer dazugegeben und die Proben 5 min stehen gelassen. Nach Zugabe von P3-Puffer wurde die Suspension vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis gestellt. Dann wurden die Proben 30 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert (RC5C-Zentrifuge, SS-34-Rotor). Währenddessen wurde eine Qiagen-Säule TIP 100 (TIP 500) mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert und anschließend der Zentrifugationsüberstand über die Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml (30 ml) QC-Puffer gewaschen und mit 5 ml (15 ml) QF-Puffer eluiert. Die Eluatfraktion wurden mit 3,5 ml (10,5 ml) Isopropanol gefällt und danach 30 min bei 10000 g zentrifugiert

* In Klammern angegebene Mengen beziehen sich auf Maxipräparationen.

(RC5C, HB 6-Rotor). Das Pellet wurde mit 500 µl kaltem 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl dest. Wasser aufgenommen.

3.2.2 Enzymatische Modifikation von DNA

3.2.2.1 Restriktionsverdau

Mit gereinigten Restriktionsendonucleasen lassen sich DNA-Moleküle an spezifischen Nukleotidsequenzen präzise und reproduzierbar schneiden.

Die Restriktionsansätze wurden je nach Enzym 30 min bis 2 h oder über Nacht in dem vom Hersteller empfohlenem Puffer bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von Probenpuffer für die DNA-Gelelektrophorese (3.2.3) wurde die enzymatische Reaktion gestoppt.

3.2.2.2 Dephosphorylierung

Eine Dephosphorylierung freier 5'-Enden der DNA-Stränge wird durchgeführt, um eine Selbstligation von restriktionsverdauten Plasmidvektoren zu verhindern.

Reagenzien: **Puffer:** nach Herstellerangaben

20mM EGTA; Phenol; Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

3 M Natriumacetat

Isopropanol; 70 % Etanol

Alkalische Phosphatase

Die Dephosphorylierung von 1 - 2 pmol DNA-Enden erfolgte mit Alkalischer Phosphatase (1 U). Dazu wurde nach dem Restriktionsverdau der DNA 1 µl Alkalische Phosphatase zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EGTA (Endkonzentration 5 mM) und 10-minütiges Erhitzen bei 65 °C gestoppt. Dann wurden die Ansätze zunächst mit Phenol und anschließend mit einem Gemisch von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Danach wurden die Proben mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat versetzt und dann mit einem Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet in dest. Wasser aufgenommen.

3.2.2.3 Ligation

Bei der Ligation werden das Vektormolekül und das zu klonierende DNA-Fragment durch die DNA-Ligase miteinander verknüpft.

Ligationspuffer: 66 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM MgCl₂;
5 mM DTT; 1 mM ATP

25 fmol linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA und ein zweifacher molarer Überschuss an DNA-Fragment wurden durch 1 U T4-Ligase im Ligationspuffer verknüpft. Die Reaktion wurde über Nacht bei 14 °C durchgeführt.

3.2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR kann ein ausgewähltes Stück eines DNA-Moleküls durch spezifische Oligonukleotide (Primer) und hitzebeständige Enzyme, wie die *Taq*-Polymerase, wirksam amplifiziert werden.

benötigt: **Reaktionspuffer:** nach Herstellerangaben

Oligonukleotide: Speziallabor Dr. W. Tischmeyer, IfN
dNTP-Mix (je 10 mM)

Die PCR-Amplifikationen erfolgten in einem Volumen von 50 µl. Die Reaktionsansätze enthielten 50 ng *template* DNA, 0,8 µM eines dNTP-Mixes, je 0,5 µM beider Primer und 0,5 U der *Taq*-DNA-Polymerase. Die *annealing*-Temperatur betrug für die verwendeten Primer 55 °C.

Das amplifizierte SBD-cDNA-Fragment wurde nach der Aufreinigung mit Phenol/Chloroform (Sambrook et al., 1989) mit dem Restriktionsenzym Eco RI verdaut und erneut aufgereinigt (Bertram & Gassen, 1991).

Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass flankierende Eco RI-Schnittstellen entstanden (Primer I: CCGAATTCAGATCTCCATCTACGCAC AATATG und Primer II: TAGAATTCAGCACCATCGATACGAACTTCA). Der Expressionsvektor pGEX1λT wurde ebenfalls mit Eco RI geschnitten, dephosphoryliert (siehe 3.2.2.2) und schließlich das SBD-Fragment in den Vektor ligiert (3.2.2.3). Das gleiche SBD-Fragment wurde außerdem über Eco RI in den Expressionsvektor pEx34b inkloniert. Die richtige Orientierung des SBD-Fragments wurde durch Restriktionskartierung festgestellt. Dafür wurde das SBD-

pGEX-Konstrukt mit Eco RI oder Cla I und BstE II verdaut. Für das SBD-pEx34b-Konstrukt wurden die Restriktionsenzyme Hind III und Cla I verwendet. Schließlich wurde die Identität der Konstrukte durch DNA-Sequenzierung überprüft (siehe ERGEBNISSE Abb. 8).

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Bei der Gelelektrophorese wandern negativ geladene DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld zum positiven Pol. Verschieden große DNA-Moleküle haben unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten durch die Poren des Agarosegels und werden so nach ihrer Größe getrennt.

benötigt: **Probenpuffer:** 0,25 % Bromphenol blau; 0,25 % Xylen cyanol FF;

30 % Glycerin; 50 mM EDTA

10x TBE-Puffer: 0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure;

0,02 M EDTA pH 8,0

50x TAE: 242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 186,15 g EDTA

auf 1 l dest. Wasser

Agarose ultra pure

Der in Wasser oder TE-Puffer gelösten DNA oder dem Restriktionsansatz wurden 1/10 des Volumens Probenpuffer zugesetzt. Die Gelelektrophorese wurde in 0,7%igen 1x TBE-Agarosegelen und 1x TBE-Laufpuffer bei 120 V durchgeführt, wobei dem Agarosegel vorher Ethidiumbromid in einer Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt wurde.

Sollten aus dem Gel DNA-Fragmente ausgeschnitten werden, wurden die Proben in einem 1%igen Agarosegel in 1x TAE bei 80 V und 1x TAE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.3.1 Elution von DNA-Molekülen aus Agarosegelen

benötigt: Dialyseschlauch

Schlauchklammern

Nach dem oben beschriebenen gelelektrophoretischen Auftrennen der DNA wurden die Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die

Gelstückchen vorsichtig in einen Dialyseschlauch transferiert. In den Dialyseschlauch wurden je nach DNA-Menge 100 - 250 µl TE-Puffer hinzupipettiert und der Schlauch durch Klammern verschlossen. In einer mit TAE-gefüllten Elektrophoresekammer wurde dann die DNA bei 100 mV für 1 h eluiert. Danach wurde die Kammer für 1 min umgepolt, um eventuell am Dialyseschlauch absorbierte DNA zu entfernen. Zum Schluss wurde der die DNA enthaltende TE-Puffer abgesaugt und in ein Eppendorfgefäß überführt.

3.3 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.3.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Kompetente Zellen lassen sich nach der Kalziumchlorid/Rubidiumchlorid-Methode herstellen. Hierbei entstehen transformationskompetente *E.coli*-Zellen, die durch Hitzeschock Fremd-DNA aufnehmen können.

Lösungen: **TFBI:** 10 mM CaCl₂; 30 mM Kaliumacetat; 15 % Glycerin;

100 mM RbCl₂; 50 mM MnCl₂; pH 5,8

TBFII: 10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM RbCl₂; 75 mM CaCl₂;

15 % Glycerin

Mit einer 5 ml-Bakterienübernachtkultur wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und bis zur OD₅₅₀ von ca. 0,5 bei 37 °C (XL-Blue-Zellen) oder 30 °C (POP-Zellen) unter Schütteln inkubiert. Dann wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C für 5 min sedimentiert, das Pellet in 30 ml TFBI resuspendiert und anschließend 20 min auf Eis inkubiert.

Danach wurden die Bakterien wie oben beschrieben pelletiert, in 4 ml TBFII aufgenommen und als 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -70 °C gelagert.

3.3.2 Transformation von Bakterien

Von einer auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterienkultur wurden 25 µl in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 µl Plasmid-DNA (Ligationsansatz, siehe

3.2.2.3.) hinzupipettiert. Der Ansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das DNA-Gemisch im vorgewärmten Wasserbad bei 42 °C für 2 min erwärmt und sofort 3 - 4 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 0,5 ml LB-Medium und einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C (bzw. 30 °C) wurden die Bakterien auf Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Minipräparation von Fusionsprotein

Expressionsvektoren machen eine induzierbare, hohe Expression von inklonierten Genen oder Genfragmenten als Fusionsanteile möglich. Die Genexpression und nachfolgende Proteinsynthese wird in Bakterien induziert, welche mit dem rekombinanten Expressionsvektor transformiert wurden. Das Fusionsprotein kann angereichert und anschließend über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

Der Vektor pEx34b bzw. pEx34c besitzt eine Promotor/Operator-Sequenz des Phagen Lambda (P_L bzw. P_R), die von einem temperatursensitiven Repressor kontrolliert wird. Durch Temperaturerhöhung auf 42 °C löst sich der Repressor vom Operator und die Expression des Polymerase 2 (MS)-Fusionsproteins wird ausgelöst.

Im Falle des Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins wird die Expression unter Kontrolle des *tac*-Promotors und des *lacP*-Gens durch das Laktoseanalog Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG) induziert. In Bakterien exprimierte und angereicherte GST-Fusionsproteine können dann über eine Glutathion-4B-Sepharose-Matrix aufgereinigt werden.

Die GST- und MS-Fusionsproteine liegen nach ca. 2-stündiger Induktion häufig in Form unlöslicher Aggregate, sogenannter „inclusion bodies“, vor.

Der pTrcHis-Vektor besitzt einen *trc* (*trp-lac*)-Promotor und eine Kopie des *lacP*-Gens, das für ein *lac*-Repressorprotein kodiert. IPTG induziert die Transkription des klonierten Fragments. Der pTrcHis-Vektor enthält die Sequenz für sechs aufeinanderfolgende Histidinreste, welche an immobilisiertes Nickel binden.

Lösungen: **LB-Medium:** 5 g Hefe-Extrakt; 10 g Bacto-Trypton; 10 g NaCl
ad 1 l dest. H₂O

LB-Amp: LB-Medium mit 100 µg/ ml Ampicillin

Isopropyl β-D-thiogalaktosid (IPTG) 0,1 M

5fach SDS-Probenpuffer 250 mM Tris pH 6,8; 7,5 % SDS
30 % Glycerin; 1 % β-Mercaptoethanol;
0,25 Bromphenol blau

SDS-Probenpuffer 0,25 M Tris-HCl pH 8,0; 4 % SDS; 20 %
Glycerin; 3 mM EDTA; 8 mg/ml DTT

GST-Fusionsproteine

Von einer 2 ml-Bakterienübernachtskultur, die bei 37 °C inkubiert wurde, wurden 50 µl zum Animpfen von 2 ml LB-Amp verwendet und diese bei einer OD₆₀₀ von 0,4 zur Induktion der Fusionsproteinsynthese mit 40 µl 0,1 M IPTG versetzt und bei 37 °C für 2 - 3 h inkubiert.

Anschließend wurden von den Proben 200 µl abgenommen, abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Für die Kontrolle nichtinduzierter Proben wurden 100 µl Bakterienkultur pelletiert.

MS-Fusionsproteine

Von einer 5 ml-Bakterienübernachtskultur (30 °C), wurde 1 ml entnommen und zum Animpfen von 4 ml, auf 42 °C vorgewärmtes, LB-Amp verwendet. Die Kultur wurde dann zur Induktion der Fusionsproteinsynthese 2 h bei 42 °C inkubiert.

Von der induzierten Kultur wurden 500 µl abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Für die Kontrolle nichtinduzierter Proben wurden 250 µl der Bakterienkultur pelletiert.

Polyhistidin-Fusionsproteine

500 µl einer 1,5 ml-Bakterienübernachtskultur wurden in 1,5 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Amp überführt. Die Kultur wurde nach ca. 30 min bei einer OD₆₀₀ von 0,7 - 0,9 mit 2 mM IPTG induziert. Nach 3 - 5 h bei 37 °C wurden die Bakterien abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und SDS-Probenpuffer hinzupipettiert.

3.4.2 Aufreinigung von Fusionsprotein

3.4.2.1 Aufreinigung von GST-gekoppelten Fusionsproteinen

Reagenzien: **Puffer A:** 8 M Harnstoff; 1 % Triton X-100

Dialysepuffer: 1 4 M Harnstoff; 1 % Triton X-100

Dialysepuffer: 2 1 M Harnstoff; 1 % Triton X-100

Dialysepuffer: 3 PBS mit 1 % Triton X-100

Dialysepuffer: 4 0,25 % Ammoniumhydrogencarbonat

Waschpuffer: I PBS mit 1 % Triton X-100

Waschpuffer: II 1 M NaCl

Waschpuffer: III PBS

GST-Sepharose 4B (Pharmacia); **Gluthation**

Induktion

100 ml LB wurden über Nacht bei 37 °C mit einer 2 ml-Bakterienvorkultur inkubiert. Die 100 ml-Bakterienkultur wurde dann zum Animpfen von 1 l LB-Amp verwendet und die Kultur bei einer OD₅₆₀ von 0,5 - 0,6 mit 10 ml 0,1 M IPTG induziert. Nach einer 2 - 3 stündigen Induktion bei 37 °C unter kräftigem Schütteln wurde die Bakterienkultur 10 min bei 5000 rpm (RC5C-Zentrifuge, SLA-Rotor) zentrifugiert und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

Anreicherung

Das Pellet einer induzierten 1 Liter-Bakterienkultur wurde auf Eis aufgetaut und in 50 ml PBS aufgenommen. Die Suspension wurde 5 min mit Ultraschall behandelt (50 % max. Leistung) bevor sie bei 8000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert wurde. Danach wurde das Pellet in 1 - 2 ml PBS aufgenommen, auf 30 ml mit Puffer A aufgefüllt und kurz in einem Potter homogenisiert. Zu dieser Lösung wurde bis zum Aufklaren langsam Puffer A zugegeben. Dann wurde die Lösung bei RT 0,5 - 2 h auf einem Taumler geschüttelt und anschließend bei RT gegen Dialysepuffer 1 dialysiert. Nach jeweils 2 h Dialyse wurde der Dialysepuffer 1 gegen Dialysepuffer 2 und dann gegen Dialysepuffer 3 ausgetauscht. Anschließend wurde die Lösung bei 13000 rpm 30 min zentrifugiert (RC5C-Zentrifuge, SS-34-Rotor). Eine weitere Aufreinigungsprozedur erfolgte über 1 ml GST-gekoppelte Sepharose

(Pharmacia), die zuvor mit 20 ml PBS äquilibriert wurde. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde mit der GST-Sepharose inkubiert, dann die Matrix nacheinander mit den Waschpuffern I, II, III gewaschen und letztendlich mit 20 ml 20 mM Glutathion eluiert. Die Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und gegen Dialysepuffer 4 dialysiert. Anschließend wurden die Fraktionen lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

3.4.2.2 Aufreinigung von MS-gekoppelten Fusionsproteinen

Lösungen: **Puffer 1:** 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 2 mM EDTA, 2 mM β -Mercaptoethanol; 100 μ g/ml PMSF, 1 μ M Pepstatin, 1 μ M Leupeptin

Puffer 2: 8 M Harnstoff; 0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA

Puffer 3: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 10 % (w/v) Glycerin; 100 μ g/ml PMSF

Saccharosekissen: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 200 mM NaCl; 40 % Saccharose

1M MgCl₂; Benzonase; 10 % Triton X-100

Induktion

100 ml LB wurden über Nacht bei 30 °C mit einer 2 ml-Bakterienvorkultur inkubiert. Die 100 ml Bakterienkultur wurde zum Animpfen von 1 l LB-Amp verwendet. Die Kultur wurde bei einer OD₅₆₀ von 0,5 - 0,6 in einem auf 42 °C vorgewärmten Wasserbad inkubiert und nach 10 min in einem Schüttler bei 42 °C weiter induziert. Nach einer 2 - 3-stündigen Induktion wurde die Bakterienkultur 10 min bei 5000 rpm (RC5C-Zentrifuge, SLA 1500-Rotor) zentrifugiert und das Pellet bei -70 °C eingefroren.

Anreicherung

Das Pellet einer induzierten 1 Liter-Bakterienkultur wurde auf Eis aufgetaut, in 40 ml Puffer 1 mit 80 mg Lysozym resuspendiert und dann 30 min bei RT stehengelassen. Danach wurde 4 ml 10%iges Triton X-100 zugegeben und das Lysat 15 min bei RT inkubiert. Dann folgte die Zugabe von 1 M MgCl₂ und 1250 U Benzonase (5 μ l) und eine 30-minütige Inkubation, um einen DNA-

Abbau zu bewirken. Anschließend wurde das Lysat zusätzlich dreimal 15 s mit Ultraschall behandelt (50 % max. Leistung).

Je 20 ml-Aliquots des Lysats wurden über 10 ml Saccharosekissen bei 13000 rpm 30 min zentrifugiert (RC5C-Zentrifuge, HB 6-Rotor). Das Pellet wurde in 2 ml PBS resuspendiert und langsam Puffer 2 bis zum Aufklaren der Lösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung gegen Puffer 3 mit abnehmenden Glyzeringehalt (10 %; 5 %; 2,5 %) 2-stündlich dialysiert. Zum Schluss wurde das Dialysat 30 min bei 20000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (RC5C-Zentrifuge, SS-34- Rotor) und der erhaltene Überstand durch Lyophilisieren konzentriert.

3.4.2.3 Aufreinigung von Polyhistidin-gekoppelten Fusionsproteinen

Lösungen: **Basispuffer:** 8 M Harnstoff; 0,1 M Natriumphosphat;

0,01 M Tris-HCl, pH 8,0

Waschpuffer: Basispuffer mit pH: 6,3; 5,9; 4,5

Elutionspuffer: Basispuffer, pH 4,0

Ni-NTA-Sepharose (Qiagen)

Induktion

10 ml einer Bakterienübernachtskultur wurden auf 1l LB-Amp überführt und bei 37 °C unter kräftigen Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Kultur mit 10 ml 0,1 M IPTG induziert, weitere 3 - 5 h inkubiert und zum Schluss 10 min bei 5000 rpm (RC5C-Zentrifuge, SLA-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -70 °C eingefroren.

Anreicherung

Das Pellet wurde in 10 ml Basispuffer aufgenommen und 1 - 3 h bei RT langsam geschüttelt bis die Suspension transparent wurde. Dann wurde die Suspension unter Eis dreimal durch Ultraschall homogenisiert (sonifiziert) (50 % max. Leistung) und bei 3000 rpm (Megafuge 3.0 R) bei RT für 20 - 30 min abzentrifugiert. Der lysierte Überstand wurde eingefroren oder sofort weiter verwendet. 4 ml Lysat wurden mit 1 ml Ni-NTA-Sepharose inkubiert, welche vorher mit dem Basispuffer äquilibriert wurde. Nach der Inkubation, die bei 4 °C über Nacht erfolgte, wurde die Ni-NTA-Sepharose bei 3000 rpm (Megafuge)

20 - 30 min abzentrifugiert. Die Sepharose wurde zweimal mit 4 ml Waschpuffer pH 6,3, einmal mit 4 ml pH 5,9 und einmal mit 4 ml Waschpuffer pH 4,5 gewaschen. Die Elution erfolgte mit dem Puffer bei pH 4,0 in 0,5 ml Fraktionen.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde das diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidsystem nach Laemmli (Laemmli et al., 1970) verwendet. Dazu wurden 5 - 20%ige Polyacrylamid-Trenngele mit 5%igen Acrylamid-Sammelgelen hergestellt.

Reagenzien: **Trenngelpuffer** 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Laufpuffer 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 1 % (w/v) SDS

3.4.3.1 Färbung von Proteingelen

Lösungen: **Färbelösung:** 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250;

50 % Methanol; 10 % Essigsäure

Entfärber: 7 % Essigsäure; 50 % Methanol

Die Gele wurden nach der Gelelektrophorese 30 min in der Färbelösung geschwenkt. Nach 10-minütigem Spülen in schon gebrauchter Entfärberlösung wurden die Proteinbanden mit frischer Lösung sichtbar gemacht.

3.4.3.2 Trocknen der Gele

Konservierungslösung 5 % Glyzerin; 50 % Methanol

Die Gele und Cellophan-Folien (Roth) wurden für 10 min in der Konservierungslösung inkubiert. Dann wurde das Gel zwischen zwei Folien über Nacht in einer Fotopresse getrocknet.

Alternativ dazu wurden Gele in Polyethylen-Folie (Haushaltsfolie) bei 4 °C gelagert (Kurien und Scofield, 1998).

3.4.4 Western-Blot-Verfahren

3.4.4.1 Elektrotransfer

Bei der Western-Blot-Technik lassen sich elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus Polyacrylamidgelen auf eine Membran, meist Nitrocellulose, übertragen. Auf dieser Membran sind die Proteine für den immunologischen Nachweis durch spezifische Antikörper gut zugänglich.

Blotpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20 % (v/v) Methanol;
0,01 % (w/v) SDS

Die Proteinbanden in den SDS-PAGE-Gelen wurden in einer Blotkammer (Hoefer Scientific Instruments) im Tankblotverfahren elektrophoretisch bei 200 mA und bei 4 °C für 1,5 h auf Nitrocellulose übertragen.

3.4.4.2 Färbung der Nitrocellulosemembran

Färbelösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S; 3 % (w/v) Essigsäure

Die Proteinbanden wurden nach dem Blotten auf der Nitrocellulose sichtbar gemacht. Dazu wurden die Blotmembranen 5 min in die Färbelösung gelegt. Nicht gebundenes Färbereagenz wurde dann durch Spülen mit dest. Wasser entfärbt.

3.4.4.3 Nachweis der Proteine durch Immunreaktion auf Western-Blots

Reagenzien: **TBS:** 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl

TBSA: TBS mit 0,02 % Natriumazid

TBST: TBS mit 0,1 % Tween-20

Blockierungslösung: 5 % Magermilchpulver in TBST

Unter Schütteln wurden die Membranen zuerst 2 h in der Blockierungslösung und dann für 1 h oder über Nacht bei 4 °C mit Erstantikörper in TBSA inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch 5-, 15-, und nochmals 5-minütige Waschstschritte mit TBST entfernt. Danach wurden die Membranen 0,5 bis 1 h mit dem Zweitantikörper (POD- oder AP-gekoppelt) in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde ungebundener Zweitantikörper durch die oben

beschriebenen Waschschrirte entfernt. Die spezifische Immunreaktion wurde durch Farbreaktion oder Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Immunodetektion durch Farbreaktion

Reagenzien: **AP-Puffer:** 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl;
5 mM MgCl₂

AP-Färbelösung: 50 mg/ml NBT- Lösung
in 70 % Dimethylformamid
50 mg/ml BCIP-Toluidinsalz-Lösung in 100 %
Dimethylformamid

Nach der Inkubation mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppeltem Zweitantikörper und dem letzten Waschschrirte wurde der Western-Blot 10 min in AP-Puffer geschüttelt und dann im Dunkeln mit AP-Färbelösung (66 µl NBT und 33 µl BCIP in 10 ml AP-Puffer) gefärbt.

Immunodetektion durch Chemolumineszenz (ECL-System)

benötigt: **ECL-Western-Blot-Detektkit (Amersham)**
Hyperfilm für ECL, Haushaltsfolie

Nach der Inkubation der Nitrocellulosefolie mit einem Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper und den sich anschließenden Waschschrirten wurde die Blotmembran für 1 min in ECL-Lösung inkubiert und danach in Frischhaltefolie gewickelt. Der Blot wurde in eine Filmkassette gelegt und mit einem Film bedeckt.

3.4.4.4 „Stripping“ von Western-Blot-Membranen

Zur Wiederverwendung schon entwickelter Western-Blots ist es möglich, durch Denaturierung den Erst- und Zweitantikörper (nur bei POD-gekoppelten Antikörpern) zu entfernen .

Stripping-Puffer: 0,2 M Glyzin; 0,1 % SDS; 1,0 % Tween-20; pH 2,2 mit HCl

Die Antikörper wurden durch eine zweimal 60-minütige Inkubation in Stripping-Puffer unter starkem Schütteln entfernt. Danach wurden die Membranen zweimal 10 min mit TBST gewaschen und ca. 2 h in Blockierungslösung inkubiert.

3.4.5 Proteinbestimmung

Die Amidoschwarz-Proteinbestimmung wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt, wobei Rinderserumalbumin als Standard diente (Popov, 1975). Die Bradford-Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt, wobei ebenfalls Rinderserumalbumin als Standard diente.

3.4.6 Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der Antiseren

Herstellung

Für die Gewinnung eines Antiserums gegen die SBD-Untereinheit wurden zwei Kaninchen mit dem D11e1 (SBD-GST/Ile³⁰⁶ – Ala⁴³⁶- Region in pGEX1λT)-Antigen (je Kaninchen insgesamt 600 µg Fusionsprotein) nach dem Standardprotokoll der Firma Eurogentec immunisiert. Von der Firma BioScience in Göttingen wurde das D11e1-Fusionsprotein zur Immunisierung dreier Ratten verwendet, wobei pro Ratte insgesamt 250 µg Antigen eingesetzt wurden.

Aufreinigung

Für die Aufreinigung von Zellkulturüberständen monoklonaler Antikörper und polyklonaler Antiseren wurde die FPLC (schnelle Proteinflüssigkeits-Chromatographie) eingesetzt. Diese kann als eine spezialisierte Form der HPLC (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie) angesehen werden, mittels derer Oligopeptide und Proteine getrennt werden können. Die Zellkulturüberstände der drei monoklonalen Antikörper (D4, 3d2, C3/1) wurden an Protein G-Säulen durch FPLC gereinigt. Die Kaninchenserum 11881, 9877, 85 und 4596 wurden über Protein A ebenfalls durch FPLC gereinigt.

Charakterisierung

Die Subtypenbestimmung der Immunglobuline wurde entsprechend der Herstellerangaben (Boehr./Mannh.) mit einem Kit durchgeführt, bei dem durch Farbreaktion der entsprechende Typ ermittelt wurde. Außerdem wurden die verwendeten monoklonalen Antikörper und polyklonalen Antiseren auf ihre Spezifität getestet. Als Antigene wurden bakteriell exprimierte Fusionsproteine und durch α -Bgt-Chromatographie aufgereinigtes Rezeptorprotein verwendet.

3.4.7 Immobilisieren von Antikörpern an Protein G

Die Kopplung der Antikörper an Protein G-Säulen erfolgte nach einer Methode aus *Selected Methods for Antibody and Nucleic Probes* (Hockfield et al., 1993).

Lösungen: **DMP-Lösung:** 20 mM DMP (Dimethyl-Pimelimidat) in

0,2 M TEA, pH 8,2

Elutionslösung: 0,1 M Glyzin pH 2,3

TNT-TX Puffer: 10 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl;

1 % Triton X-100, pH 8,0

Ethanolamin 0,2 M, pH 8,2;

TEA 0,2 M, pH 8,2

PBS; PBSA: PBS mit 0,02 % NaN_3

0,8 - 1 ml Protein G-Sepharose wurden dreimal mit TNT-TX-Puffer gewaschen. 100 ml Zellüberstand eines monoklonalen Antikörpers wurde gegen PBS dialysiert und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Drehen mit der Protein G-Sepharose inkubiert. Die bei 200 g für 5 min abzentrifugierte Matrix (Heraeus, Megafuge 3.0 R) wurde fünfmal mit 40 ml PBS und zweimal mit TEA gewaschen. Um den Antikörper mit dem Protein G zu vernetzen, wurde die Antikörper-Matrix 45 min bei RT in der frisch hergestellten DMP-Lösung getaumelt. Durch nachfolgendes Waschen mit TEA-Lösung wurden ungesättigte „*cross-linking*“-Stellen inaktiviert. Dann erfolgte eine 10-minütige Inkubation der Matrix bei RT in Ethanolamin. Anschließend wurde das Gel fünfmal mit der Elutionslösung gewaschen. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurde die Matrix bei 4 °C in PBSA gelagert.

3.4.8 Immobilisieren von α -Bungarotoxin (α -Bgt)

3.4.8.1 Immobilisieren von α -Bgt an Tresyl-aktivierter Agarose

Die Kopplung erfolgte nach Angaben des Herstellers Schleicher & Schuell, jedoch bei pH 9,0.

Reagenzien: **Kopplungspuffer:** 0,1 M NaHCO₃ pH 9,0

Waschpuffer I: 0,2 M Natriumacetat; 0,5 M NaCl, pH 4,5

Waschpuffer II: 0,2 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl, pH 8,5

Ethanolamin: 1,0 M pH 8,5

PBSA: PBS mit 0,02 % NaN₃

Für die Kopplung von 10 mg Toxin wurden 5 ml Tresyl-aktivierte Agarose entnommen und über eine Glasfritte mit 150 ml kaltem dest. Wasser gewaschen. Das Toxin wurde in 1 ml Kopplungspuffer aufgenommen und über Nacht zusammen mit dem gewaschenen Gel in einem Falcon-Gefäß in Kopplungspuffer bei 4 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Die Kopplungsausbeute wurde durch Bradford bestimmt. Danach wurde das Gel mit 50 ml Kopplungspuffer gewaschen und bei RT 1 h in Ethanolamin geschüttelt, um noch freie Tresylgruppen zu inaktivieren. Anschließend wurde die Agarosematrix mit 50 ml Waschpuffer I, 50 ml Waschpuffer II und schließlich mit 50 ml PBS gewaschen. Die α -Bgt-Agarose wurde in PBSA bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.8.2 Immobilisieren von α -Bgt an Acti-Gel

Die Kopplung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Sterogene) bei pH 9,0.

Reagenzien: **Kopplungspuffer** 0,1 M Natriumborat pH 9,0

Waschpuffer 0,5 M NaCl

PBSA PBS mit 0,02 % NaN₃

Kopplungslösung (Sterogene)

Zum Koppeln von 10 mg α -Bungarotoxin wurden 5 ml der Gelsuspension (Sterogene) eingesetzt. Diese wurde mit 15 ml Kopplungspuffer über eine Fritte gewaschen und danach in ein Falconröhrchen überführt. Dann wurde das Toxin mit demselben Volumen an Kopplungspuffer aufgenommen, in der auch die Matrix suspendiert wurde (4 ml). Zu diesem Ansatz wurde 800 μ l (2 ml/ml Matrix) Kopplungslösung hinzugefügt und bei RT 2 - 3 h getaumelt. Das Gel wurde 1 min bei 1000 g (Megafuge) abzentrifugiert, und es wurde durch Proteinbestimmung die Kopplungsausbeute bestimmt. Danach wurde das Gel mit 50 ml Waschpuffer gewaschen und bei 4 °C in PBSA aufbewahrt.

3.4.9 Rezeptorpräparation aus *Drosophila*-Köpfen

Die Methoden für Membranpräparationen aus *Drosophila*-Köpfen, das Solubilisieren der Membranproteine sowie die Bindungstests mit α -Bgt basieren auf den Arbeiten von P. Schloß (Schloß et al., 1988; Dissertation, 1989).

3.4.9.1 Membranpräparation

benötigt: **Homogenisierungspuffer**: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 280 mM

Saccharose; 0,01 % NaN₃; 0,1 M PMSF

Waschpuffer: 5 mM Tris-HCl pH 8,0

Geologische Prüfsiebe: Maschenweite: 1 mm; 0,71 mm; 0,1 mm

In 50 ml Falconröhrchen tiefgefrorene adulte weißäugige Fliegen wurden so lange geschüttelt, bis sich die Köpfe vom Thorax trennten. Durch fraktioniertes Sieben sammelten sich die Köpfe im Sieb der kleinsten Maschengröße (0,1 mm) und

wurden dann in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das Pulver wurde in Homogenisierungspuffer (10ml/mg Köpfe) aufgenommen und anschließend in einem Potter (Potter S, Braun) unter Kühlung weiter zerkleinert. Danach wurde das Homogenat zweimal bei 1000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um Zellkerne und -reste zu entfernen. Die Membranen wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 20000 g sedimentiert, in Waschpuffer aufgenommen und abermals bei 20000 g für 30 min zentrifugiert. Alle Membranpräparationen wurden nach der Bradford-Proteinbestimmung auf 4 mg/ml eingestellt.

3.4.9.2 Solubilisieren von Membranproteinen

Reagenzien: **Solubilisierungspuffer:** 50 mM Tris-HCl pH 8,5; 220 mM NaCl;
1,8 % Triton-X-100; 0,6 % Deoxycholat;
10 % Glycerin

Proteaseinhibitoren- Stammlösung: 1 Tabl. (Boehr./Mannh.)
in 2 ml PBS

Der Membransuspension wurden auf 10 mg Protein 1 ml Solubilisierungspuffer (mit 40 µl Proteaseinhibitor-Stammlösung) zugesetzt. Dann wurde die Suspension unter Kühlung in einem Potter homogenisiert und anschließend 1 h bei 4 °C geschüttelt. Danach wurde das Solubilisat 1 h bei 4 °C und 40000 g zentrifugiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

3.4.9.3 Bindungstest mit [¹²⁵I]α-Bungarotoxin

Filterbindungstests ermöglichen die Trennung verschieden großer Moleküle oder Verbindungen. Kleine Moleküle, z. B. ungebundene Liganden (α-Bgt: 8 kD) passieren die Poren der Filtermembran, die großen Liganden-Rezeptor-Komplexe (ca. 250 kD) verbleiben auf der Membran. Die Durchführung für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Filterbindungstests basiert auf der Methode von P. Schloß (Schloß et al., 1988; Schloß, 1989).

Membranen

benötigt: **Bindungspuffer**: PBS mit 0,01 % Triton X-100

Zelluloseacetat-Filter: HA 0.45 µm (Millipore)

Die Reaktionen für den Bindungstest wurden in 12 ml-Polystyrolröhrchen durchgeführt.

Bei gleichbleibender Toxinmenge wurde die Membrankonzentration erhöht, wobei das Reaktionsvolumen 200 µl betrug. Nach 2-stündiger Inkubation des Ansatzes wurde er mit 4 ml Bindungspuffer verdünnt und über Zelluloseacetat-Filter in einem Vakuumfiltrationsgerät abgesaugt. Anschließend wurden die Filter mit 4 ml Bindungspuffer nachgewaschen. Die Filter wurden in Polystyrolröhrchen überführt und die Radioaktivität im γ -Counter bestimmt.

Solubilisat

benötigt: **TNT-Puffer** 100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 0,2 % Triton X-100

Polyethylenimine (PEI) 0,3 %

GF/C-Filter (Millipore)

Die Bindung von [125 I] α -Bgt an Solubilisat erfolgte prinzipiell wie die Bindung an Membranen. Als Bindungspuffer wurde TNT-Puffer verwendet und die Testansätze wurden über GF/C-Filter abgesaugt, die zuvor in PEI gesättigt wurden.

3.4.10 Immunpräzipitation

Bei einer Immunpräzipitation wird aus einem Proteingemisch das für den Antikörper spezifische Antigen gebunden.

Reagenzien: **Puffer A:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM NaCl;
1 % Triton X-100

Waschpuffer I: Puffer A mit 1 M NaCl

Waschpuffer II: 50 mM Tris-HCl pH 6,8

SDS-Probenpuffer: 0,25 M Tris-HCl pH 8,0; 4 1% SDS;
20 % Glycerin; 3 mM EDTA; 8 mg/ml DTT

Elutionspuffer: 0,1 M Glyzin pH 2,3

Neutralisieren: Tris-HCl pH 9,0

In ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß wurden 50 µl Protein G Sepharose pipettiert und diese dreimal mit jeweils 1 ml Puffer A gewaschen (Eppendorfszentrifuge). 10 µl polyklonales Antiserum in 1 ml Puffer A oder 1 ml Zellüberstand monoklonaler Antikörper wurden 1 h bei 4 °C unter Drehen inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die Sepharose mit Puffer A gewaschen, wiederum abzentrifugiert und über Nacht bei 4 °C mit 1 bis 1,5 ml Solubilisat (2,5 mg Protein) unter Drehen inkubiert. Danach wurde die Antikörper-Sepharose wie folgt gewaschen: zweimal mit Puffer A, zweimal mit Waschpuffer I, einmal mit Puffer A und einmal mit Waschpuffer II.

Anschließend wurde das Pellet in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 3 min gekocht und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Alternativ dazu wurde die Elution auch durch einen niedrigen pH-Wert durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 40 µl Elutionspuffer versetzt, geschüttelt und nach kurzem Abzentrifugieren mit 2 µl Tris-HCl pH 9,0 neutralisiert. Zum Schluss wurden die Eluate mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und durch SDS-PAGE analysiert.

3.4.11 Affinitätschromatographie

3.4.11.1 Affinitätschromatographie an gekoppeltem α -Bungarotoxin

Reagenzien: **Puffer 1:** 50 mM Tris-HCl pH 8,5; 220 mM NaCl;

1 % Triton X-100; 0,6 % Deoxycholat; 10 % Glycerin

Waschpuffer 1: PBS mit 0,5 % Triton X-100

Waschpuffer 2: Waschpuffer 1 mit 0,5 M NaCl

Elutionspuffer A: 1 M Carbachol in PBS mit 0,1 % Triton X-100

Elutionspuffer B: 1 % SDS in PBS

Chromatographie

1 ml α -Bgt-gekoppelte Matrix (Tresyl-aktivierte Agarose oder Acti-Gel) wurde dreimal mit jeweils 10 ml Puffer 1 äquilibriert. Das solubilisierte Rezeptormaterial wurde über Nacht bei 4 °C über eine mit der Matrix geladenen Polypropylen-Säule (Bio-Rad) gegeben oder in einem 50 ml-Falconröhrchen unter Drehen inkubiert (*batch*-Verfahren). Die Affinitätsmatrix wurde dann nacheinander mit 20 ml Waschpuffer 1, 20 ml Waschpuffer 2 und nochmals 10 ml Waschpuffer 1 gewaschen. Ansätze im *batch*-Verfahren wurden an dieser Stelle in Polypropylen-Säulen transferiert und der Proteinkomplex wurde durch Carbachol oder SDS eluiert, wobei danach die Eluate in 1 ml-Fraktionen gesammelt wurden.

Proteinkonzentrierung

Den lyophilisierten Eluatfraktionen wurde jeweils 1 ml 12%iges TCA zugesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Fraktionen wurden bei 14000 rpm und 4 °C für 1 h zentrifugiert (RC5C-Zentrifuge, SS-34-Rotor) und danach zweimal mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, wobei jedesmal 30 min zentrifugiert wurde. Die Proben wurden lyophilisiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

3.4.11.2 Affinitätschromatographie an gekoppelten Antikörpern

Lösungen: **Puffer A:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM NaCl; 1 % Triton X-100

Waschpuffer I: Puffer A mit 1 M NaCl

Elutionslösung: 0,1 M Glyzin pH 2,3

Die Antikörper-Protein G-Matrices wurden in Polypropylen-Säulen (BioRad) überführt und mit 30 ml Puffer A äquilibriert. Das Solubilisat des nAChR wurde über Nacht bei 4°C mit einer Pumpe (Fließgeschwindigkeit 0,3 ml/min) über die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer A, 20 ml Waschpuffer I und dann mit 10 ml Puffer A gewaschen. Eluiert wurde in 0,5 ml-Fractionen, wobei die Eluate sofort durch Lyophilisieren eingengt wurden.

Die Proben wurden genau wie bei der α -Bgt-Affinitätschromatographie konzentriert und einer SDS-PAGE unterzogen.

3.5 Immunhistochemie an Gefrierschnitten adulter *Drosophila*-Köpfe

Lösungen: **Ringer-Lösung:** 182 mM KCl; 46 mM NaCl; 3 mM CaCl₂;
10 mM Tris-HCl pH 7,2

Fixierlösung: 10 mM Natrium *m*-Periodate; 75 mM Lysin-HCl;
2 % Paraformaldehyd;
6,8 mM NaH₂PO₄; 30,7 mM Na₂HPO₄; pH 7,4

Zuckerlösung: 25 % Saccharose in Ringers-Lösung

TBS für IHC: 1 Teil 0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 9 Teile PBS

Blockierungslösung: 5 % Ziegennormalserum;
0,2 % Triton X-100 in TBS

Lösung A: 1 % Ziegennormalserum; 0,2 % Triton X-100 in TBS

Färbelösung: 0,5 mg/ml DAB in TBS; 0,01 % H₂O₂

Kaiser`s Glyzeringelatine

Eindeckelmedium für Immunfluoreszenz: 0,1 % DABCO in
PBS/Glyzerin 1 : 1,
pH 8,0

DAB-Färbung

Für die Fixierung wurden adulte Wildtyp-Fliegen auf dem Rücken liegend mit ihren Flügeln auf doppelseitiges Klebeband geklebt. Die Fliegen wurden mit Ringer-Lösung überschichtet, die Saugrüssel entfernt und die Luftsäcke durchstoßen.

Nach 2-stündiger Inkubation in der Fixierlösung bei 4 °C wurden die Fliegen über Nacht bei 4 °C in die Zuckerlösung gelegt. Die Fliegen wurden in *tissue-tek* (Miles) eingebettet und aus den Köpfen im Microtom bei -23 °C (Objekt) und -27 °C (Box) 10 µm dicke Schnitte gefertigt. Letztere wurden mit gelatinisierten Objektträgern aufgenommen und bei 40 °C auf einer Heizplatte getrocknet. Die Schnitte wurden 30 min in der Blockierungslösung und über Nacht bei 4 °C mit gereinigtem Antiserum (1 : 500) in Lösung A inkubiert. Die Schnitte wurden zur Stärkung der Antigen-Antikörper-Bindung zusätzlich 2 h bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte zuerst 30 min in Lösung A und schließlich mit dem Zweitantikörper anti-Kaninchen 1 : 50 in Lösung A inkubiert. Durch zweimal 10-minütiges Waschen mit PBS wurde ungebundener Antikörper entfernt. Danach wurden die Schnitte 30 min mit dem Kaninchen-Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex (PAP) 1 : 500 in Lösung A inkubiert, deren ungebundener Anteil ebenfalls durch zweimal 10-minütiges Waschen mit PBS entfernt wurde. Die Immunreaktion wurde durch Färbung mit DAB/H₂O₂ sichtbar gemacht. Die gefärbten Schnitte wurden in dest. H₂O gewaschen und nach dem Trocknen in Kaiser's Glyzeringelatine eingedeckelt.

Immunfluoreszenz

Bis zur Inkubation der Schnitte im Erstantikörper wurden alle Schritte wie bei der Färbung mit DAB durchgeführt. Es wurde für die gereinigten Antiseren eine Verdünnung von 1 : 500 in Lösung A und für den aufgereinigten monoklonalen Antikörper 20 µg/ml in Lösung A eingesetzt. Nach dem Entfernen von ungebundenen Erstantikörper durch zweimal 10-minütiges Waschen in PBS wurden alle weiteren Schritte im Dunkeln durchgeführt. Die Schnitte wurden 30 min mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper inkubiert, dessen Konzentration je nach Herstellerangaben mit Lösung A verdünnt wurde. Die kurz angetrockneten Schnitte wurden im entsprechenden Medium eingedeckelt und bei -20 °C gelagert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung und Charakterisierung von nAChR-Antisera

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Arbeitsmittel zu etablieren, die es ermöglichen, die einzelnen Untereinheiten spezifisch zu detektieren. Daher wurden im ersten Teil dieser Arbeit vorhandene Antisera und mAk auf ihre Untereinheitenspezifität getestet. Zusätzlich wurde gegen eine zytoplasmatische Region der SBD-Untereinheit Antisera produziert.

Fusionsproteine der 5 bekannten Untereinheiten wurden in Bakterien exprimiert, angereichert und anschließend aufgereinigt. Die Fusionsproteine wurden a) als Antigen für die Herstellung von Antisera (im Falle der SBD-Untereinheit), b) zum Nachweis der Spezifität der Antisera und mAk und c) zur Konkurrenz bei Immunpräzipitationen verwendet.

Die Konstrukte für die Fusionsproteine von ALS, D α 2, D α 3 und ARD lagen als in Bakterien transformierte Klone vor (siehe Abb. 9).

4.1.1 Herstellung SBD-spezifischer Antisera

Um ein spezifisches SBD-Antiserum zu erhalten, wurde eine Sequenz des intrazellulären Polypeptidanteils (zwischen den Transmembrandomänen M3 und M4) gewählt, da hier die höchste Sequenzvariabilität zwischen den einzelnen Untereinheiten besteht (Gundelfinger und Hess, 1992).

Das SBD-Fragment, das den Bereich Ile³⁰⁶ bis Ala⁴³⁶ kodiert, wurde durch PCR amplifiziert und in Expressionsvektoren kloniert (siehe METHODEN 3.2.2) (Abb. 8).

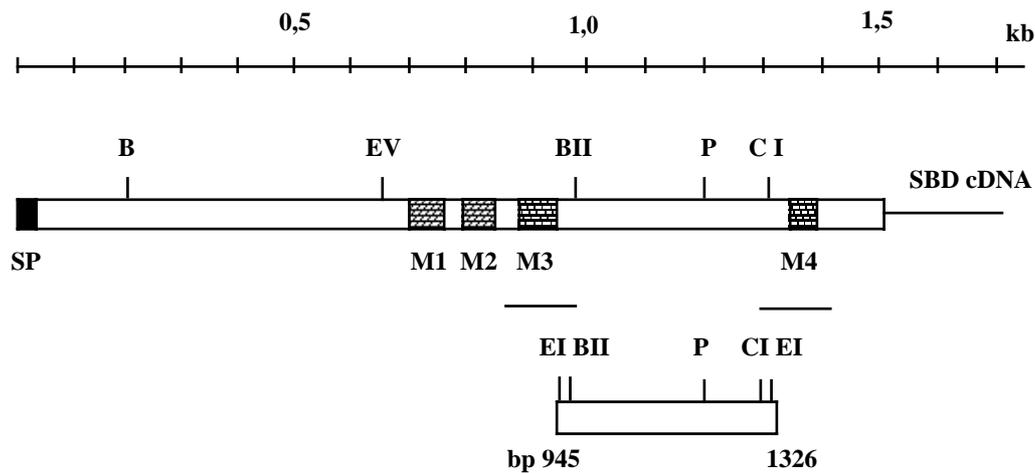


Abb. 8: Generierung eines zytoplasmatischen SBD-Fragments zur nachfolgenden Klonierung in Expressionsvektoren

Durch PCR mit spezifischen Primern wurde ein SBD-Fragment generiert, das neben intrinsischen Schnittstellen flankierende Eco RI-Schnittstellen enthielt. B: Bam HI; BII: Bgl II; CI: Cla I; EI: Eco RI; EV: Eco RV; P: Pst I

Die Anreicherung des GST-SBD-Fusionsproteins erfolgte wie in 3.4.2.1 beschrieben. Das aufgereinigte Fusionsprotein wurde zur Herstellung von polyklonalen Rattenserum an die Firma Bioscience (Göttingen) gesandt.

Das angereicherte und in PBS aufgenommene MS-SBD-Fusionsprotein (siehe 3.4.2.2) wurde zur Immunisierung von Kaninchen an die Firma Eurogentec (Belgien) verschickt und für Kompetitionen bei Immunpräzipitations-Experimenten verwendet.

Der Nachweis der Spezifität der erhaltenen SBD-Antiseren ist unter 4.1.2.1 beschrieben.

4.1.2 Charakterisierung der Antiseren

4.1.2.1 Überprüfung der Antikörper auf Kreuzreaktivität

Gegen die Untereinheiten ARD, ALS und D α 2 von nAChRen aus *Drosophila* wurden in früheren Arbeiten verschiedene Antiseren hergestellt und beschrieben (Schloß et al., 1988, 1991; Schuster et al., 1993; Jonas et al., 1994). Das Antiserum gegen D α 3 wurde von Regine Schulz hergestellt und ist in Chamaon et al. (2000) beschrieben. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tab. 2 und Abb. 9 zusammengestellt. Die cDNA-Konstrukte der Fusionsproteine sind auch in MATERIALIEN unter 2.3 näher beschrieben.

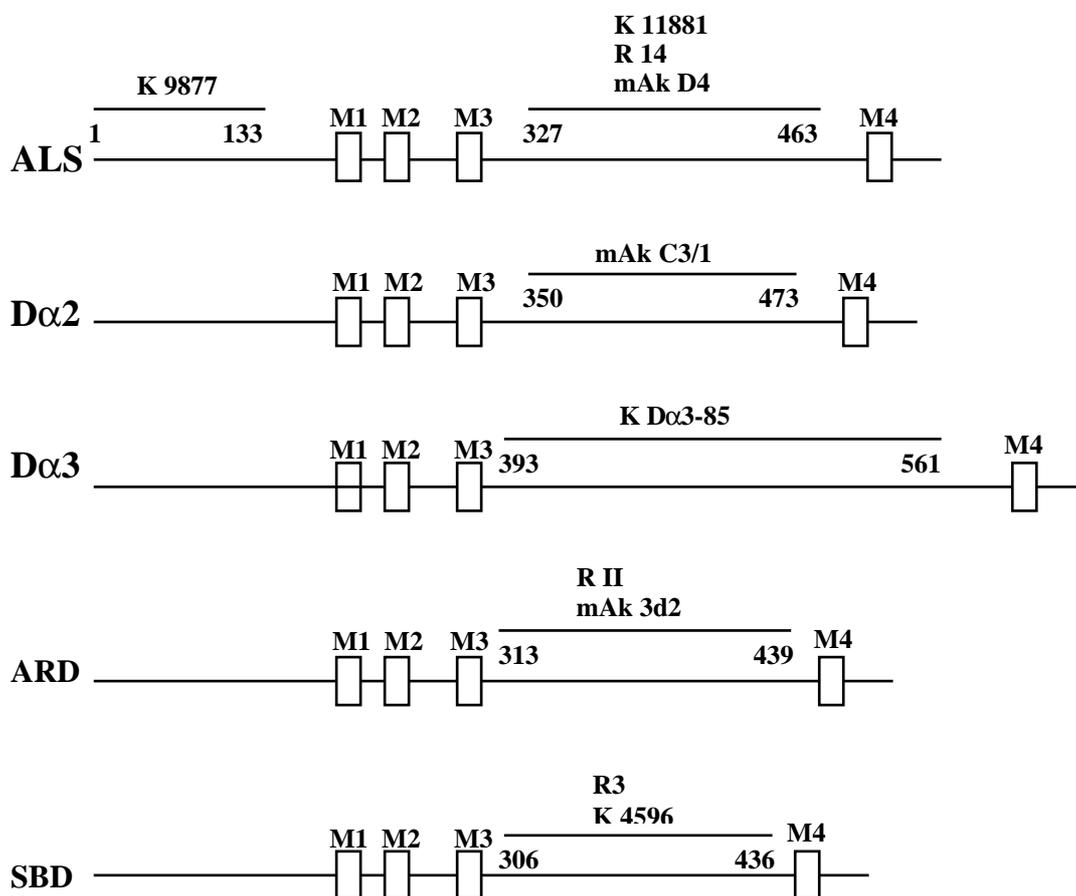


Abb. 9: Zusammenfassung der Lokalisation der Antigenregion entsprechender Antiseren auf den verschiedenen *Drosophila*-nAChR-Untereinheiten. Die Antigenregion ist durch die begrenzenden Aminosäuren gekennzeichnet (AS – AS). Die Transmembransegmente M1 - M4 sind eingezeichnet.

Antigen	Fusionsprotein	Antikörper	Western-Blots
ALS	D3e3	11881 (Kaninchen), Boost 4,5	1:250
	D3e1	9877* (Kaninchen), Boost 2,3	1:500
	D3e3	D4 (monoklonal)	10 µg/ml
	D3e3	R14 (Ratte), Boost 1	1:500
Dα2	D5e2	C3/1 (monoklonal)	10 µg/ml
Dα3	D7e2	85 (Kaninchen), Boost 1,2	1:500
ARD	D1e5	3d2 (monoklonal)	10 µg/ml
	D1e5	RII (Ratte), Boost 1	1:500
SBD	D11e2	4596 (Kaninchen), Boost 3	1:500
	D11e1	R3 (Ratte), Boost 1	1:500

Tab. 2: Verwendete monoklonale Antikörper bzw. Antiseren zum Nachweis bekannter nAChR-Untereinheiten in *Drosophila melanogaster*

Die Antiseren und die Zellüberstände monoklonaler Antikörper wurden durch FPLC über Protein A- bzw. Protein G-Säulen gereinigt. Die Aufreinigungsprozedur wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Karl-Heinz Smalla durchgeführt. Die monoklonalen Antikörper D4, C3/1 und 3d2 sowie die polyklonalen Kaninchenserum ALS-11881 und ALS-9878 wurden von Christiane Schröder hergestellt (Schuster et al., 1993). Das Fusionsprotein Dα3-85 wurde von Regine Schulz (Chamaon et al., 2000) und das dazugehörige Serum von der Firma Eurogentec hergestellt. Die Antiseren RII, R14 und die monoklonalen Antikörper D4, C3/1 sowie 3d2 wurden zum Nachweis der nAChR-Untereinheiten bereits in der Immunhistochemie verwendet (Schuster et al., 1993). Der Antikörper ALS-11881 wurde für die Präzipitation radioaktiv markierter α-Bgt-Bindungsstellen eingesetzt und ist bei Schloß et al. (1991) beschrieben.

* Antikörper ist im Gegensatz zu allen anderen hier aufgelisteten Antikörpern gegen eine extrazelluläre Region des N-terminalen Bereichs der Untereinheit gerichtet (vgl. Abb. 9).

Die verwendeten Antikörper wurden auf Western-Blots getestet, welche mit Fusionsproteinen der verschiedenen Untereinheiten beladen waren. Untereinheitenspezifische Antiseren sollten nur die „eigenen“ Fusionsproteine erkennen, nicht aber Fusionsproteine der anderen Untereinheiten. Nicht vorhandene Immunreaktivität oder Kreuzreaktivität der Antiseren untereinander musste ausgeschlossen werden. Außerdem sollte die geeignete Antikörperkonzentration für den Western-Blot ermittelt werden (Abb. 10).

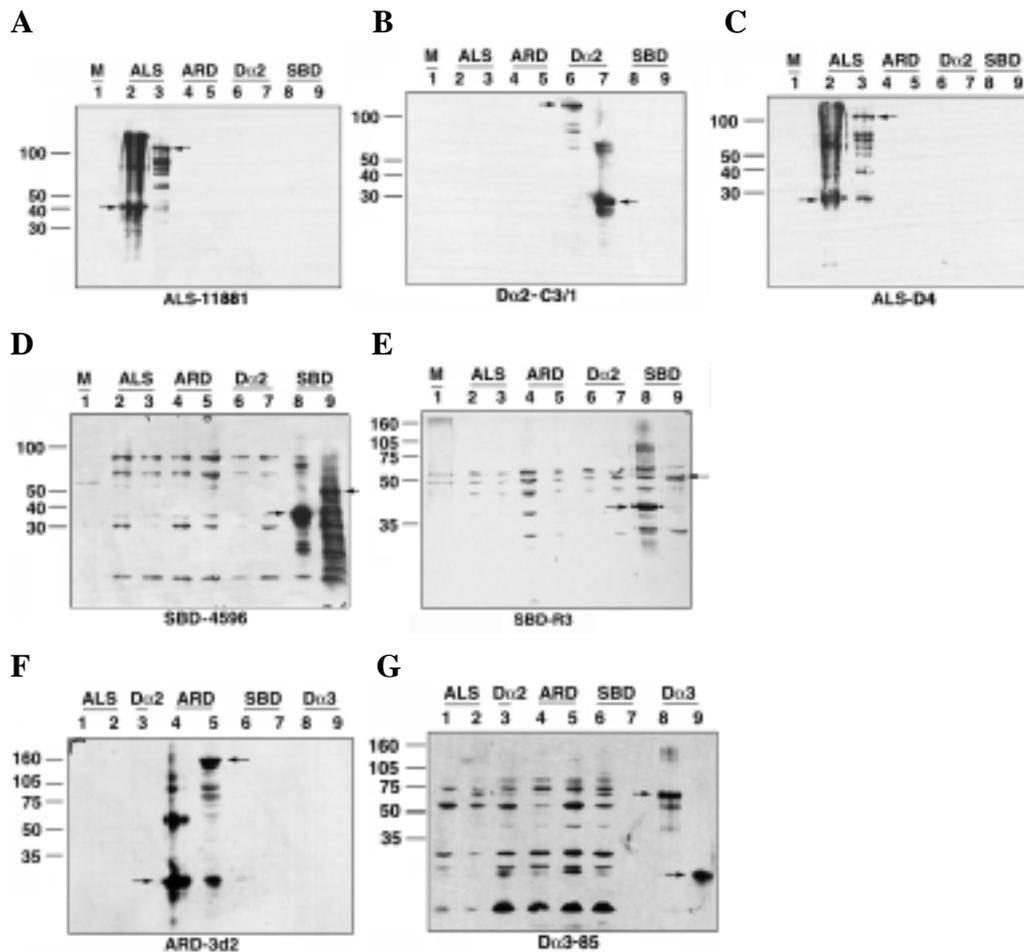


Abb. 10: Kontrolle der Antikörper auf Kreuzreaktivität

Die Antikörper wurden gegen Fusionsproteine auf Western-Blots getestet. **A – E:** **1:** Proteinmarker; **2, 3:** ALS-Fusionsproteine ALS-MS/Ile³²⁷ - Gly⁴⁶³-Region in pEx34c (D3e3) und ALS-LAC/Ile³²⁷ - Gly⁴⁶³-Region in pEX 2 (D3e4); **4, 5:** ARD-Fusionsproteine ARD-MS/Ser³¹³ - Ser⁴³⁹-Region in pEx34b (D1e5) und ARD-LAC/Phe³⁰⁵ - Pro⁴⁴⁴-Region in pEX 3 (D1e1); **6, 7:** Dα2-Fusionsproteine Dα2-LAC/Asn³⁵⁰ - Asp⁴⁷³-Region in pEX 2 (D5e1) und Dα2-MS/Asn³⁵⁰ - Asp⁴⁷³-Region in pEx34c (D5e2); **8, 9:** SBD-Fusionsproteine SBD-MS/Ile³⁰⁶ - Ala⁴³⁶-Region in pEx34c (D11e2) und SBD-GST/Ile³⁰⁶ - Ala⁴³⁶-Region in pGEX1λT (D11e1); **F und G:** **1, 2:** ALS-Fusionsproteine ALS-MS/Ile³²⁷ - Gly⁴⁶³-Region in pEx34c und ALS-LAC/Ile³²⁷ - Gly⁴⁶³-Region in pEX 2; **3:** Dα2-Fusionsprotein Dα2-MS/Asn³⁵⁰ - Asp⁴⁷³-Region in pEx34c; **4, 5:** ARD-Fusionsproteine ARD-MS/Ser³¹³ - Ser⁴³⁹-Region in pEx34b und ARD-LAC/Phe³⁰⁵ - Pro⁴⁴⁴-Region in pEX 3; **8, 9:** Dα3-Fusionsproteine Dα3-GST/Glu³⁹³ - Ser⁵⁶¹-Region in pGEX1λT (D7e1) und Dα3-His/Glu³⁹³ - Ser⁵⁶¹-Region in pTrcHis B1 (D7e2).

Die Western-Blots wurden mit folgenden Antikörpern inkubiert: **A:** ALS-11881; **B:** Dα2-C3/1; **C:** ALS-D4; **D:** SBD-4596; **E:** SBD-R3; **F:** ARD-3d2; **G:** Dα3-85

In Abb. 10 ist die Immunreaktivität der getesteten Antikörper gegen Fusionsproteine gezeigt. Der polyklonale ALS-11881- und der monoklonale ALS-D4-Antikörper erkennen beide die ALS-Fusionsproteine (Pfeile). Sie erkennen nicht die Fusionsproteine (Pfeile) der anderen Untereinheiten. Das Gleiche lässt sich für die anderen getesteten Antikörper sagen: Sie erkennen jeweils ihre eigenen Fusionsproteine, nicht aber die der anderen Antikörper. Häufig erkennen die Antikörper weitere Proteinprodukte aus dem Bakterienstamm, in dem sie exprimiert wurden. Vermutlich handelt es sich dabei um Degradationsprodukte oder um Oligomere bzw. Addukte des Antigens an bakterielle Proteine. Die Antiseren D α 3-85 und SBD-4596 sind nicht in aufgereinigter Form verwendet worden und kreuzreagieren daher mit einigen bakteriellen Proteinen. Alle getesteten Antikörper erkennen nur die ihrer Spezifität entsprechenden Fusionsproteine; sie kreuzreagieren nicht untereinander und sind daher für die Identifikation der einzelnen Untereinheiten verwendbar. Eine IgG-Subtypenbestimmung der drei verwendeten monoklonalen Antikörper ergab, dass alle drei vom IgG1-Subtyp sind (siehe 3.4.6). Da Immunglobuline des Subtyps G1 hochaffin an Protein G, jedoch weniger gut an Protein A binden, wurde für Immunpräzipitations-Experimente und Affinitätschromatographien Protein G-Sepharose benutzt.

4.2 Nachweis von [¹²⁵I] α -Bgt-Bindungsstellen in *Drosophila*-Kopf-Membranen und Solubilisat

Die Solubilisierungsmethode für nAChRen von *Drosophila* wurde von P. Schloß (1989) entwickelt. An dieser Stelle sollte überprüft werden, ob sich die Methode auch in dieser Arbeit zur Solubilisierung von nAChRen aus *Drosophila*-Köpfen anwenden lässt. Dazu wurden als Vorversuche Filterbindungstests mit α -Bgt durchgeführt (siehe METHODEN 3.4.9).

Es wurden keine ausführlichen Bindungsanalysen durchgeführt, da diese bereits bei Schloß (1988) beschrieben sind. In den Bindungstests sind mindestens fünf unabhängige Experimente durchgeführt worden, wobei jeder Messwert dreifach bestimmt wurde. Ein Experiment ist paradigmatisch in

Abb.11 dargestellt.

Bindung von [¹²⁵I]α-Bgt an *Drosophila*-Kopf-Membranen

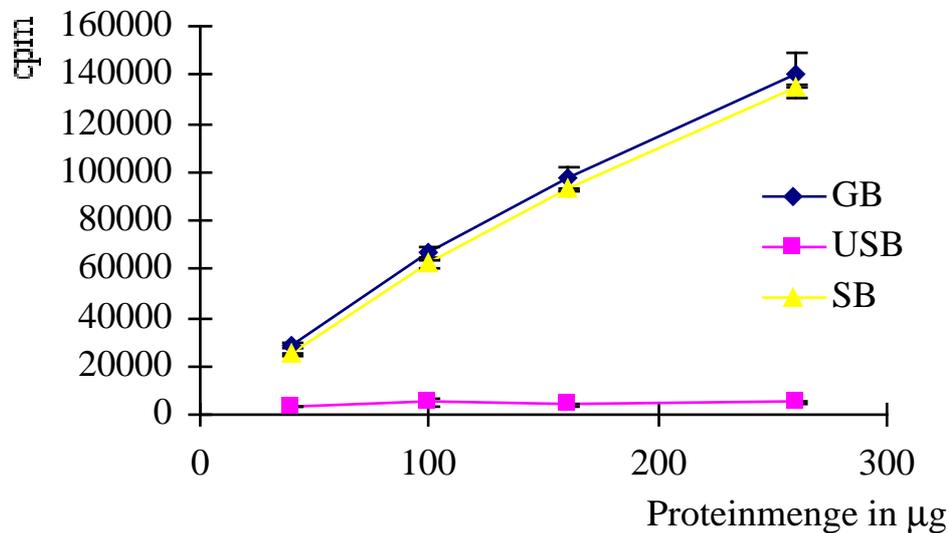


Abb. 11: Nachweis von α-Bgt-Bindungsstellen in der Membranfraktion

Verschiedene Mengen an Membranprotein wurden für 2 h bei RT in 5 nM [¹²⁵I]α-Bgt inkubiert. Anschließend wurden die Gesamtbindung (GB, ◆) und die unspezifische Bindung (USB, ■) bestimmt und die daraus resultierende spezifische Bindung (SB, ▲) errechnet. Alle Werte sind gegen die eingesetzte Membranproteinmenge aufgetragen. Es wurden jeweils 3fach-Messungen durchgeführt.

In Abbildung 11 hat die Kurve der spezifischen Bindung (SB, ▲) im gemessenen Bereich einen annähernd linearen Verlauf, das heißt, die α-Bgt-Bindungsstellen nehmen mit steigenden Proteinmengen proportional zu. Das stimmt gut mit den von Schloß et al. (1988) gefundenen Daten überein und zeigt dass in der Membranfraktion spezifische α-Bungarotoxin-Bindungsstellen und damit nikotinische Acetylcholinrezeptoren vorhanden sind. Das wie unter Abschnitt 3.4.9 beschrieben aufgearbeitete Fliegenmaterial wurde daher für die Herstellung von Rezeptorextrakten verwendet.

Bindung von [¹²⁵I]α-Bungarotoxin an Solubilisat aus *Drosophila*-Kopf-Membranen

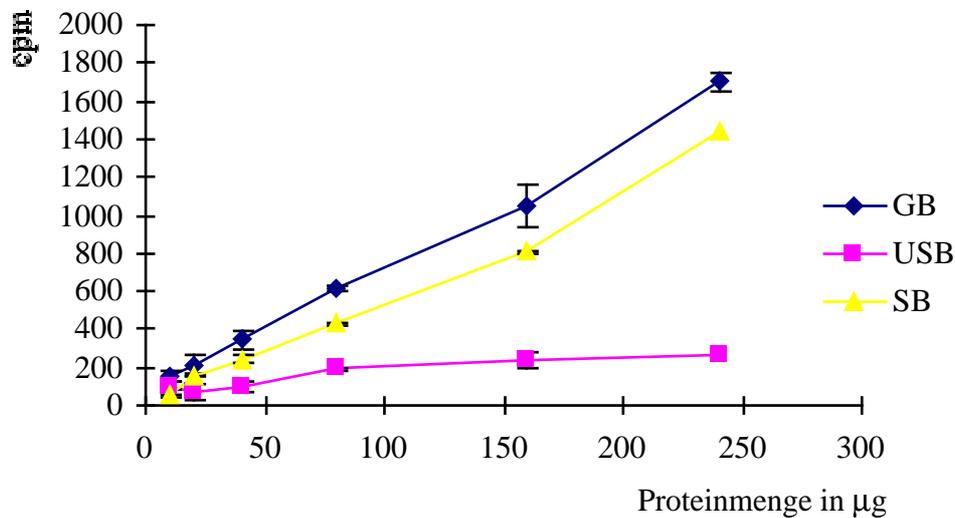


Abb. 12: Nachweis von α-Bgt-Bindungsstellen im Solubilisat

Verschiedene Mengen an solubilisiertem Rezeptorprotein (Solubilisat) wurden für 2 h bei RT in 5 nM [¹²⁵I]α-Bgt inkubiert. Anschließend wurden die Gesamtbindung (GB, ◆) und die unspezifische Bindung (USB, ■) bestimmt und die daraus resultierende spezifische Bindung (SB, ⚡) errechnet. Alle Werte sind gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen. Es wurden jeweils 3fach-Messungen durchgeführt.

Das Solubilisat wurde wie bereits erwähnt, aus der Membranfraktion gewonnen (siehe Methoden 3.4.9.2) und ebenfalls auf den Gehalt von α-Bgt-Bindungsstellen untersucht.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass sich die gemessenen Bindungsaktivitäten deutlich unterscheiden (vgl. Abb. 11 und 12). Dies liegt zum einen daran, dass das hier eingesetzte [¹²⁵I] α-Bgt zum Zeitpunkt der benutzung nur noch ca. 12 % der ursprünglichen Aktivität besaß. Ferner ist die Solubilisierungsrate sehr niedrig. Sie lag in den versuchen von Schloß (1989) bei ca. 10 – 20 % der gesamten Toxinbindungsstellen Die Kurve der spezifischen Bindung in Abbildung 12 hat einen annähernd linearen Verlauf. Die Linearität zwischen eingesetzter Proteinmenge und gebundener Radioaktivität lässt auf das Vorhandensein von α-Bgt-Bindungsstellen und damit funktionellen Rezeptoren

in der Präparation schließen. Obwohl sich aus Experimenten (nicht gezeigt) eine Solubilisierungsrate von ca. 10 % schätzen ließ, wurden keine weiteren Versuche unternommen, die Solubilisierungseffizienz zu erhöhen, weil bereits frühere derartige Versuche in der Arbeitsgruppe von Prof. Gundelfinger gezeigt hatten, dass dies allenfalls mit sehr teuren Detergenzien möglich ist. Der lösliche Rezeptorextrakt (Solubilisat) war demnach für Anwendungen wie Immunpräzipitation oder Affinitätschromatographie einsetzbar.

4.3 Nachweis von nAChR-Untereinheiten in Eluaten der α -Bgt-Säule und Bestimmung der Molekulargewichte

Die Antikörper zeigten auf Membranpräparationen und Solubilisaten keine Immunreaktivität, woraus geschlossen wurde, dass entweder die Affinität der Antikörper zu gering oder das Antigen in einer zu niedrigen Konzentration vorliegen könnte. Mittels Liganden-Affinitätschromatographie sollten daher zumindest die Rezeptorkomplexe, die den Liganden (α -Bungarotoxin) binden, aufgereinigt werden (siehe METHODEN 3.4.11). α -Bungarotoxin (α -Bgt) ist die Komponente eines Schlangengifts des Kraits *Bungarus multicinctus*, die hochaffin an den muskulären sowie einige neuronale nAChRen bindet. α -Bgt wurde erfolgreich zum Nachweis und zur Aufreinigung nikotinischer Rezeptoren verwendet (Raftery et al., 1980). Im Coomassie-gefärbten Gel ließen sich nur wenige Proteinbanden im Eluat der α -Bgt-Säule erkennen (nicht gezeigt). Im Western-Blot waren mit spezifischen Antikörpern die einzelnen Untereinheiten jedoch gut detektierbar. In Abb. 13 ist der Nachweis aller bisher bekannten Untereinheiten im Eluat der α -Bgt-Säule dargestellt.

Wurden die Blotstreifen nur mit den Zweitantikörpern (anti-Ratte, -Maus, -Kaninchen) inkubiert, war keine Immunreaktivität nachweisbar.

Auf diese Weise konnten die apparenten Molekulargewichte (M_r) der einzelnen Untereinheiten bestimmt werden, welche in Tabelle 3 zusammengefasst sind. Hier ist anzumerken, dass die apparenten Molekulargewichte zum Teil deutlich von den berechneten M_r abwichen. Mögliche Ursachen dieser Diskrepanz sind ausführlich unter DISKUSSION (S. 87 - 88) erläutert.

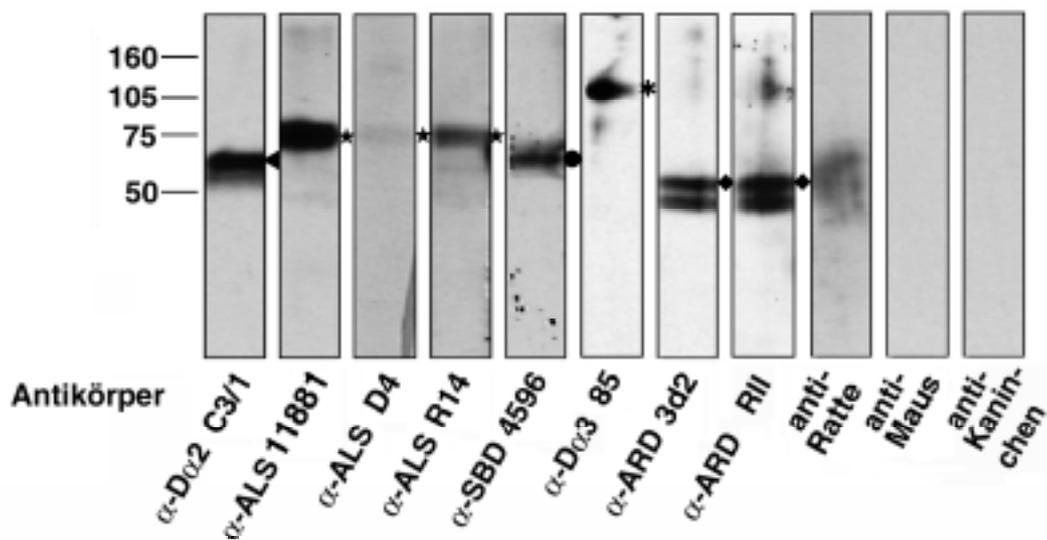


Abb. 13: Western-Blots von Eluaten nach α -Bgt-Affinitätschromatographie des Solubilisats

Nachweis aller bisher bekannten nAChR-Untereinheiten aus *Drosophila melanogaster* auf dem Western-Blot. 200 ml (ca. 250 mg solubilierte Proteine) wurden über 0,5 ml α -Bgt-Tresyl-aktivierte Agarose (bzw. α -Bgt-Acti-Gel) gegeben. Nach dem Waschen wurde der Rezeptorkomplex mit 1 % SDS eluiert und anschließend die Proteinfractionen durch TCA-Fällung konzentriert.

▼: D α 2; ★: ALS; ●: SBD; ★: D α 3; ◆: ARD

Untereinheit	Symbol	apparentes M_r in kD (Western-Blots)	berechnetes M_r in kD des Proteinanteils
ALS	★	80	62
D α 2	▼	65	61
D α 3	★	105	85
SBD	●	60	57
ARD	◆	(45 und) 50	57

Tab. 3: Apparente und berechnete Molekulargewichte der nAChR-Untereinheiten

Die Proteine des SDS-Eluats der α -Bgt-Säule wurden durch SDS-PAGE getrennt und anschließend auf Western-Blots mit unterschiedlichen Antiseren und monoklonalen Antikörpern detektiert.

4.4 Nachweis verschiedener Subtypen neuronaler nAChRen in *Drosophila melanogaster*

4.4.1 Nachweis eines Rezeptortyps, der ALS, D α 2 und SBD enthält

4.4.1.1 ALS und D α 2 - Untereinheiten desselben Rezeptorkomplexes

Aus Experimenten, bei denen die beiden ligandenbindenden Untereinheiten ALS bzw. D α 2 in Froschoozyten exprimiert wurden, war bekannt, dass jede der beiden Untereinheiten mit der strukturellen β 2-Untereinheit aus dem Huhn funktionelle Rezeptoren bilden kann (Bertrand et al., 1994). Neben dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, die zeigten, dass in der Froschoozyte funktionelle ALS/D α 2/ β 2-Rezeptoren exprimiert werden (Schulz et al., 2000).

Deshalb sollte untersucht werden, ob diese beiden Untereinheiten auch *in vivo* im selben Rezeptorkomplex vorkommen. Hierfür wurden Immunpräzipitationen durchgeführt, bei denen jene Rezeptorkomplexe isoliert wurden, die die antikörpererkennende Untereinheit enthalten. Wenn in einem Rezeptorkomplex eine weitere Untereinheit vorhanden ist, wird diese ko-präzipitiert und kann ebenfalls nachgewiesen werden. In den folgenden Abschnitten wiederholen sich Abkürzungen, die immer für die gleiche Bedeutung verwendet wurden und daher nicht unter jeder Abbildung neu erläutert sind: IP: Immunpräzipitat; IP+: Kompetition mit Fusionsprotein; K: Western-Blot ohne Erst-, sondern nur mit Zweitantikörper entwickelt; K1: Kontrollpräzipitation ohne 1. Ak; K2: Kontrollpräzipitation ohne solubilisierten Rezeptor; S: Rezeptorsolubilisat; Ü: Überstand (siehe auch Lesezeichen).

In den Abbildungen 14 A – C ist das Ergebnis einer Immunpräzipitation unter Verwendung des pAk ALS-11881 und der Nachweis von ALS gezeigt. Das ca. 80 kD-große ALS-Protein wurde im Immunpräzipitat (IP) mit verschiedenen ALS-Antisera detektiert: in **A** mit dem mAk D4, in **B** mit

dem pAk 9877 und in **C** mit dem pAk R14. Außerdem ließ sich, wie in **C** gezeigt, die Bindung des Rezeptors an den immobilisierten Antikörper ALS-11881 mit einem 1000fachen molaren Überschuss (gegenüber dem Antikörper) an ALS-Fusionsprotein kompetieren. Dadurch verschwindet die ALS-Bande fast vollständig (**IP+**). Im Rezeptorsolubilisat (**S**) und im Überstand (**Ü**) (Abb. 14 **A**, **B**) ist keine Immunreaktivität erkennbar. In den Kontrollen sind unspezifische Banden zu beobachten, die durch Kreuzreaktivitäten zum einen des präzipitierenden Ak mit der Protein G-Sepharose (**K2**) und zum anderen des Solubilisats mit der Protein G-Sepharose (**K1**) herrühren.

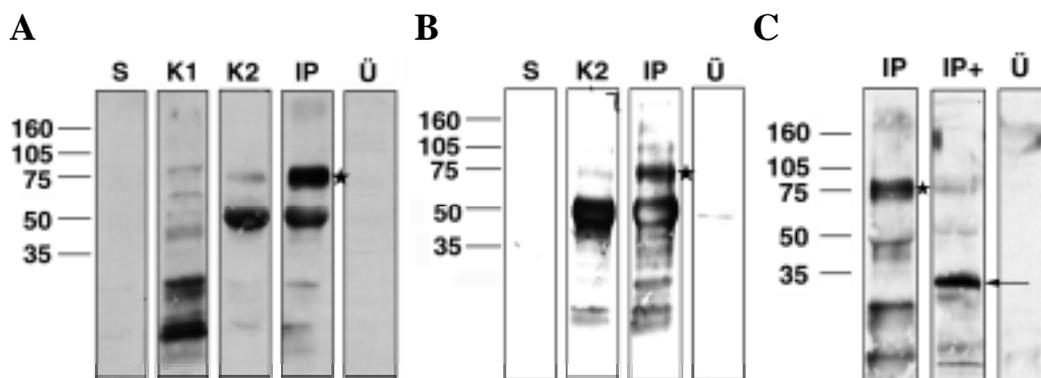


Abb. 14: Immunpräzipitation mit ALS-11881; Nachweis der ALS-Untereinheit

Die ALS-Untereinheit (★) wurde im ALS-11881-Immunpräzipitat (IP) durch drei verschiedene ALS-Antikörper als eine ca. 80 kD-Bande nachgewiesen. **A**: Nachweis von ALS mit dem mAk ALS-D4; **B**: mit dem pAk 9877; **C**: Detektion mit dem pAk R14 (IP), in IP+: Kompetition durch Zugabe von ALS-Fusionsprotein (Á). Der auf den Western-Blot eingesetzte anti-Maus-Zweitantikörper in **A** kreuzreagiert mit dem Kaninchen IgG (K2, IP). Da mit einem Kaninchen Antikörper präzipitiert, wurde, sind in **B** in der Kontrolle K2 und im IP die schwere Kette des IgGs bei 50 kDa sichtbar.

IP: Immunpräzipitat; IP+: Kompetition mit Fusionsprotein; K1: Kontrollpräzipitation ohne Erstantikörper; K2: Kontrollpräzipitation ohne solubilisierten Rezeptor; S: Rezeptorsolubilisat; Ü: Überstand

Im nächsten Schritt sollte festgestellt werden, ob im Immunpräzipitat mit ALS-11881 die D α 2-Untereinheit ko-präzipitiert wird. Dafür wurde die Detektion auf dem Western-Blot mit dem mAk D α 2-C3/1 durchgeführt. In Abb. 15 ist die D α 2-Bande bei ca. 65 kD im Immunpräzipitat (**IP**) deutlich erkennbar. Durch die Kooperation mit einem Überschuss an ALS-Fusionsprotein verschwindet die D α 2-Bande, was die Assoziation von D α 2 mit ALS untermauert.

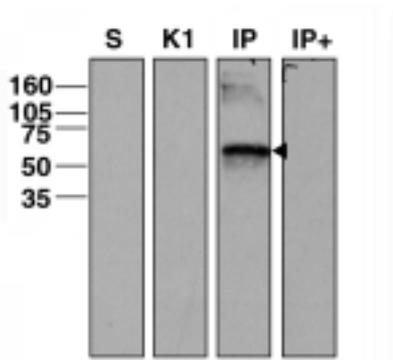


Abb. 15: Immunpräzipitation mit ALS-11881; Nachweis der D α 2-Untereinheit

Im ALS-11881-Immunpräzipitat lässt sich die D α 2-Untereinheit (**3**) als eine Bande von ca. 65 kD nachweisen (IP). Die Ko-Präzipitation von D α 2 ist durch die Zugabe von ALS-Fusionsprotein kompetierbar (IP+). Im Ausgangsmaterial (S) und in der Kontrolle (K1) ist keine Immunreaktivität für D α 2 nachweisbar.

Die Ko-Präzipitation der D α 2-Untereinheit im ALS-Immunpräzipitat spricht für das Vorhandensein beider Untereinheiten in einem Rezeptorkomplex.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde reziprok eine Immunpräzipitation mit dem mAk D α 2-C3/1 durchgeführt. In Abb. 16 ist in **A** im Immunpräzipitat (**IP**) mit D α 2-C3/1 der Nachweis der D α 2-Untereinheit gezeigt. Da mit dem mAk D α 2-C3/1 sowohl immunpräzipitiert, als auch detektiert wurde, sind die schwere und leichte Kette des IgGs im **IP** und auch in der Kontrolle **K2** sichtbar. In **B** wurde die ALS-Untereinheit mit dem pAk ALS-R14 detektiert.

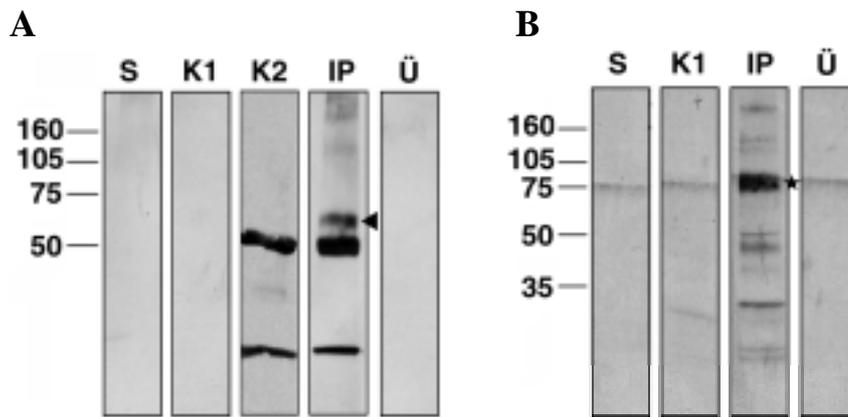


Abb. 16: Immunpräzipitation mit Dα2-C3/1; Nachweis von Dα2 und ALS

A: Nachweis der Dα2-Untereinheit (♣). Da mit dem monoklonalen Dα2-C3/1-Antikörper sowohl immunpräzipitiert, als auch detektiert wurde, sind die schwere und leichte Kette des IgGs im IP und auch in der Kontrolle K2 sichtbar. **B:** Nachweis von ALS (★) mit R14. Im Dα2-Immunpräzipitat ist die ALS-Untereinheit als eine Bande von ca. 80 kD detektierbar (IP).

Aus der Ko-Präzipitation von ALS und Dα2 lässt sich ableiten, dass beide Untereinheiten gemeinsam in einem Rezeptormolekül vorliegen.

Experimente von Schloß et al. (1991) ließen vermuten, dass 20 % der Bindungsstellen, die hochaffin an α-Bgt binden, ALS und ARD ko-präzipitieren. Aus diesem Grunde wurde angenommen, dass ALS und ARD in einem Rezeptorkomplex vorkommen. Daher sollte geklärt werden, ob im ALS/Dα2-Rezeptorkomplex die strukturelle Untereinheit ARD vorhanden ist. Hierzu wurde eine Immunpräzipitation unter Verwendung von ARD-3d2 durchgeführt. In Abb. 17 wurde in **A** ARD mit ARD-3d2 und in **B** mit ARD-RII detektiert. Die Spezifität der ARD-Bande (◆) ließ sich außerdem durch die Kontrolle ohne 1. Ak auf dem Western-Blot (**K**) bekräftigen, da die verwendeten Zweitantikörper gar nicht (**B**) oder nur unspezifisch (**A**) kreuzreagierten. In **B** kreuzreagierte der ARD-RII- oder Zweitantikörper mit einer unspezifischen Bande im Solubilisat (**S**), die aber nicht präzipitiert wurde (**Ü**). ARD läuft in der Höhe der schweren Kette des IgGs; die Bedeutung einer weiteren, kleineren Bande ist unklar, wohlmöglich handelt es sich hier um ein proteolytisches Abbauprodukt von ARD (**IP**).

In Abb. 17 C und D ist dargestellt, dass sich die ALS-Untereinheit mit dem mAk ARD-3d2 nicht ko-präzipitieren lässt, sodass die Annahme, dass ALS und ARD im selben Rezeptorkomplex vorkommen, mit diesen Experimenten nicht bestätigt werden konnte.

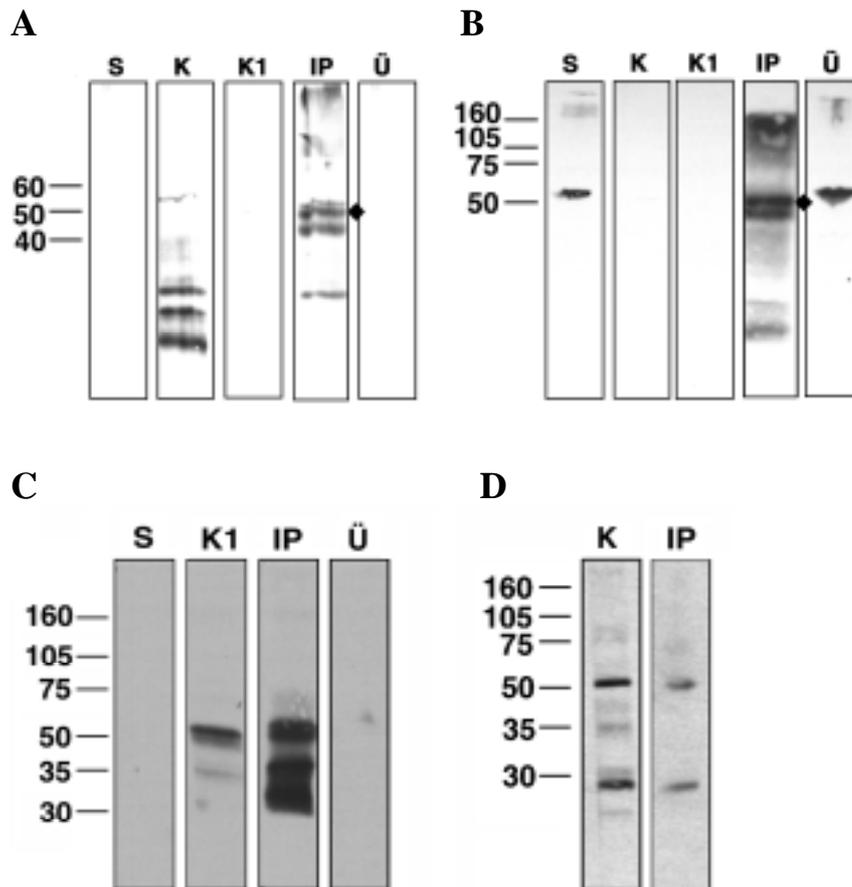


Abb. 17: Immunpräzipitation mit ARD-3d2; Nachweis von ARD, aber nicht von ALS

Nachweise von ARD (◆) im Immunpräzipitat (IP) A: Detektion mit ARD-3d2. Die Bande der ARD-Untereinheit läuft auf gleicher Höhe mit dem IgG, daher wurde die ARD-Bande zusätzlich mit RII (B) gezeigt. Es ist keine spezifische Immunreaktivität sowohl in den Kontrollen K (Western-Blot ohne Erstantikörper) und K1 (Kontrollpräzipitation ohne Zugabe von 1. Ak) als auch im Ausgangsmaterial (S) und Überstand (Ü) vorhanden. Die Bedeutung einer weiteren, kleineren Bande bei ca. 45 kD ist unklar, da sie nicht in allen Experimenten reproduziert werden konnte C: im ARD-Immunpräzipitat (IP) mit ARD-3d2 ist keine ALS-Bande bei ca. 80 kD detektierbar; Western-Blot mit ALS-11881; D: keine Ko-Präzipitation von ARD und ALS;

Western-Blot mit ALS-D4

Als nächstes wurde überprüft, ob umgekehrt die ARD-Untereinheit mit einem ALS-Antikörper präzipitierbar ist. Für die Immunpräzipitation wurden der mAk ALS-D4 (**A**) und der pAk ALS-11881 (**B**) und zum Nachweis von ARD der pAk ARD-RII eingesetzt. In Abb. 18 **A** und **B** ist für ARD keine Immunreaktivität erkennbar, was die oben beschriebenen Ergebnisse, dass sich im Immunpräzipitat mit anti-ARD kein ALS nachweisen lässt, bestätigt. Insgesamt kann man aus der „Nicht-Ko-Präzipitation“ von ALS und ARD ableiten, dass beide Untereinheiten entweder nicht zusammen in einem Rezeptorkomplex vorkommen, bzw. deren Population unter der Nachweisgrenze mit dieser Methode liegt.

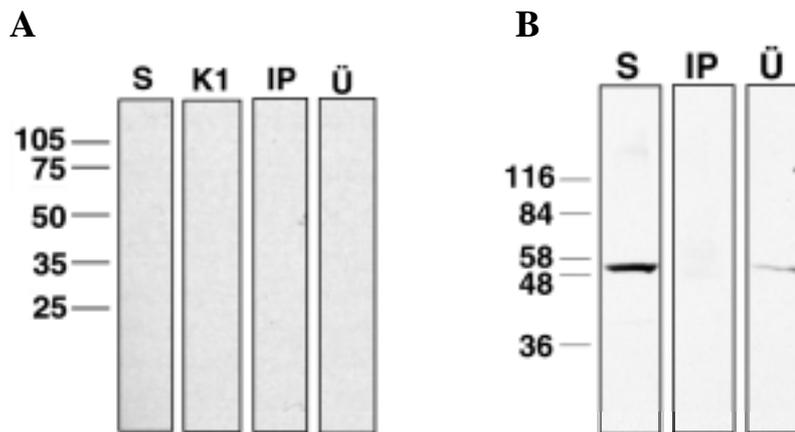


Abb. 18: Immunpräzipitation mit ALS-D4 und ALS-11881; kein Nachweis von ARD möglich

A: Immunpräzipitation mit dem mAk ALS-D4; keine Immunreaktivität in der Kontrolle (K1), im Ausgangsmaterial (S), Überstand (Ü) oder im Immunpräzipitat (IP) mit pAk ARD-RII nachweisbar; **B:** Im Immunpräzipitat (IP) mit ALS-11881 ist mit ARD-RII ebenfalls keine ARD-Immunreaktivität nachzuweisen. Eine erkannte ca. 55 kD-Bande wird nicht präzipitiert (vgl. auch Abb. 17 B)

4.4.1.2 Die SBD-Untereinheit im ALS/D α 2-Rezeptor

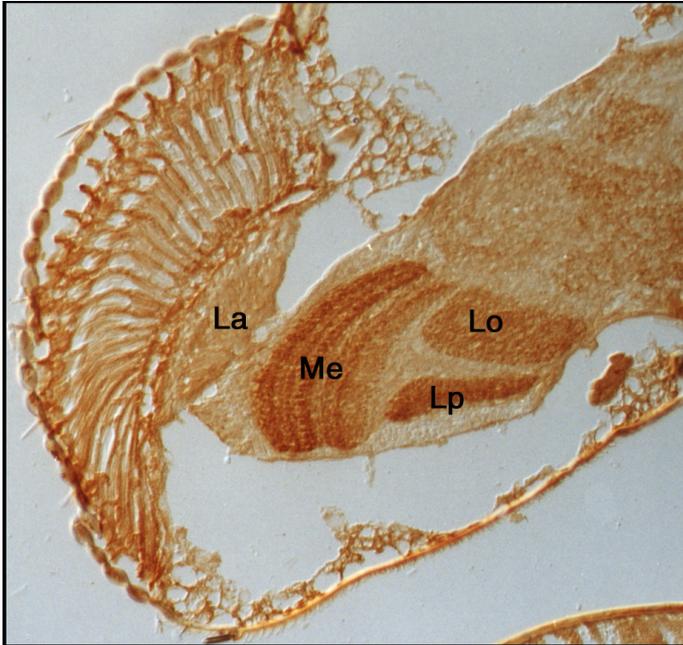
Neben ARD ist aus *Drosophila* eine weitere strukturelle Untereinheit - SBD - kloniert worden (Sawruk et al., 1990b). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation der SBD-Untereinheit im visuellen System der Fliege zu zeigen. Außerdem sollte die SBD-Immunreaktivität mit den Färbungen der anderen Untereinheiten (Schuster et al., 1993; Jonas et al., 1994) verglichen und mittels Immunpräzipitation bestimmt werden, ob SBD mit anderen bekannten Untereinheiten in einem Rezeptorkomplex integriert ist.

Die SBD-Untereinheit im visuellen System der Fliege

Mit dem pAk SBD-4596 konnte die SBD-Untereinheit in den Neuropilregionen der Medulla, Lobula und Lobulaplatte der optischen Loben des visuellen Systems nachgewiesen werden (Nomenklatur nach Fischbach und Dittrich, 1989). Die Lamina war ungefärbt. Gut erkennbar waren die einzelnen Schichten der Medulla, die eine unterschiedliche Sensitivität der Färbung aufwiesen. Die Lobula war deutlich schwächer gefärbt (Abb. 19 A und B). Das Präimmunserum zeigte keine Färbung (C).

SBD-Immunreaktivität in den optischen Loben der Taufliege

A



B

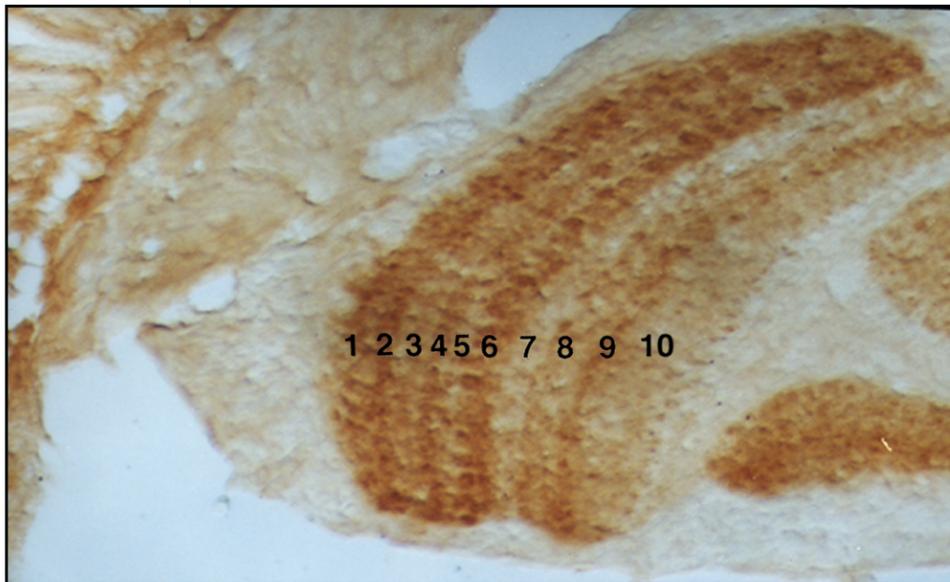


Abb. 19: Immunhistochemie an *Drosophila*-Kopf-Schnitten; Färbung mit SBD-4596

A: Gesamtansicht der optischen Loben. Erkennbar sind die unter dem Auge liegenden Ganglien:
 La: Lamina, Me: Medulla, Lo: Lobula, Lp: Lobulaplatte. **B:** vergrößerter Ausschnitt der

Medulla. Durch die spezifische Färbung des Antikörpers sind die einzelnen Schichten der Medulla deutlich erkennbar.

C



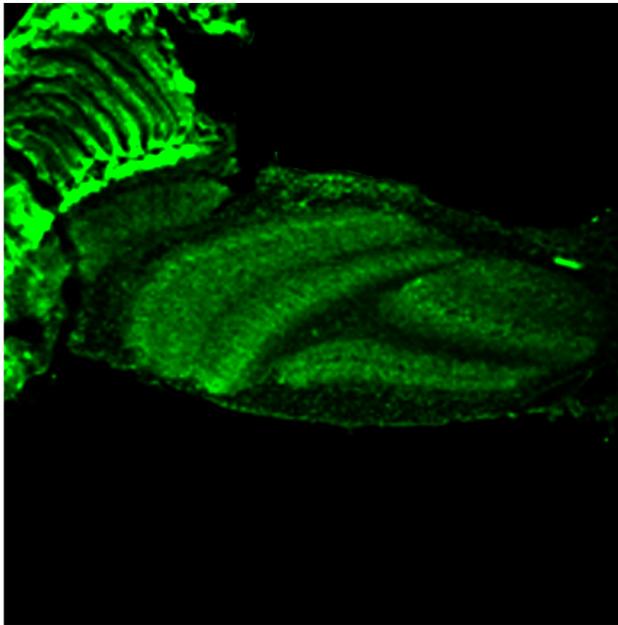
Abb. 19 C: Immunhistochemie an *Drosophila*-Kopf-Schnitten; Färbung mit dem SBD-4596-Präimmunserum

Es ist keine spezifische SBD-Immunreaktivität erkennbar.

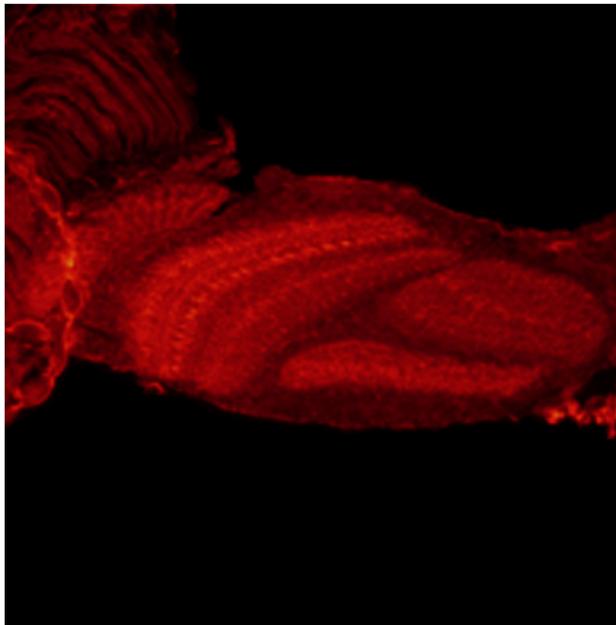
Vergleicht man die Verteilung der SBD-Färbung mit der von ALS aus der Arbeit von Schuster et al. (1993) lässt sich eine große Übereinstimmung beider Muster feststellen. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten adulter *Drosophila*-Köpfe sollte die Ko-Verteilung von SBD und ALS miteinander verglichen werden. So waren die Untereinheiten ALS und SBD in mehreren Neuropilregionen ähnlich verteilt (Abb. 20 A - C). Mit beiden Antikörpern blieb die Lamina ungefärbt. In den Schichten 1 - 8 der Medulla (Me) und in der Lobulaplatte (Lp) sind ALS und SBD ko-lokalisiert. Die überlappenden Expressionsmuster könnten auf ein gemeinsames Vorkommen von ALS und SBD im selben Rezeptorkomplex hindeuten. Jedoch waren auch Neuropilregionen erkennbar, in denen ALS und SBD nicht ko-lokalisiert vorkamen, z. B. sehr deutlich in den Schichten 9 und 10 der Medulla. Möglicherweise sind hier beide Untereinheiten in unterschiedliche Rezeptorkomplexen integriert.

Kolokalisation von ALS und SBD in den optischen Loben

A



B



C

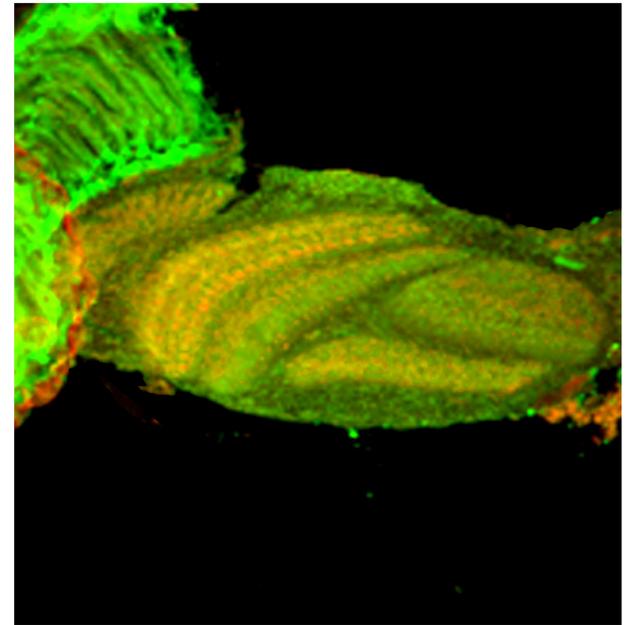


Abb. 20: Kolokalisation der ALS- und SBD-Untereinheiten

A: Immunfluoreszenz mit ALS-D4 und Cy3-markiertem Zweitantikörper; **B:** Immunfluoreszenz mit SBD-4596 und Cy2-markiertem Zweitantikörper;
C: Doppelfärbung mit beiden Antikörpern. Die ALS- und SBD-Untereinheiten sind besonders in Teilen der Medulla und Lobulaplatte ko-lokalisiert.

Ko-Immünpräzipitation von SBD mit ALS und D α 2

Aus der Ko-Lokalisation von ALS und SBD konnte die Vermutung abgeleitet werden, dass es ALS/D α 2-Rezeptorkomplexe gibt, die SBD enthalten. Um dieser Annahme nachzugehen, wurde im ersten Schritt eine Immunpräzipitation mit dem pAk SBD-4596 durchgeführt. In Abb. 21 **A - C** ist dieses Experiment gezeigt. In **A** ist mit dem gleichen Antikörper (SBD-4596) die SBD-Untereinheit (**I**) als eine Bande von ca. 60 kD im Immunpräzipitat (**IP**) nachgewiesen. Diese Bande ist mit einem 1000fachen molaren Überschuss an SBD-Fusionsprotein (\sphericalangle) kompetierbar (**IP+**), was die Spezifität der SBD-Bande unterstreicht. Im Ausgangsmaterial (**S**), im Überstand (**Ü**) und in der Kontrolle, in der ohne 1. Ak „präzipitiert“ wurde (**K1**), ist keine Immunreaktivität detektierbar. Gut erkennbar ist die schwere Kette des IgGs (ca. 50 kD) in der Kontrolle **K2** und auch im Immunpräzipitat und im Konkurrenzexperiment, da mit demselben Antikörper sowohl präzipitiert als auch detektiert wurde.

In der Abb. **B** ist der Nachweis der ALS-Untereinheit mit dem mAk D4 im Immunpräzipitat von SBD-4596 gezeigt. Im Immunpräzipitat (**IP**) ist die ca. 80 kD-Bande von ALS deutlich erkennbar, welche durch Zugabe eines 1000fachen molaren Überschusses an SBD-Fusionsprotein kompetierbar ist (**IP+**). Der Zweitantikörper anti-Maus kreuzreagiert mit den Kaninchen IgG, daher sind die 50 kD-Banden in der Kontrolle **K2**, im Immunpräzipitat (**IP**) und im Konkurrenzexperiment (**IP+**) sichtbar. In **C** ist der Nachweis der D α 2-Untereinheit mit dem mAk D α 2-C3/1 dargestellt. Im Immunpräzipitat (**IP**) lässt sich D α 2 als eine ca. 65 kD-Bande gut erkennen und auch in diesem Falle wurde die Bindung des Rezeptormoleküls an den Antikörper SBD-4596 kompetitiv inhibiert, wonach die D α 2-Bande auf dem Western-Blot nicht mehr nachweisbar ist.

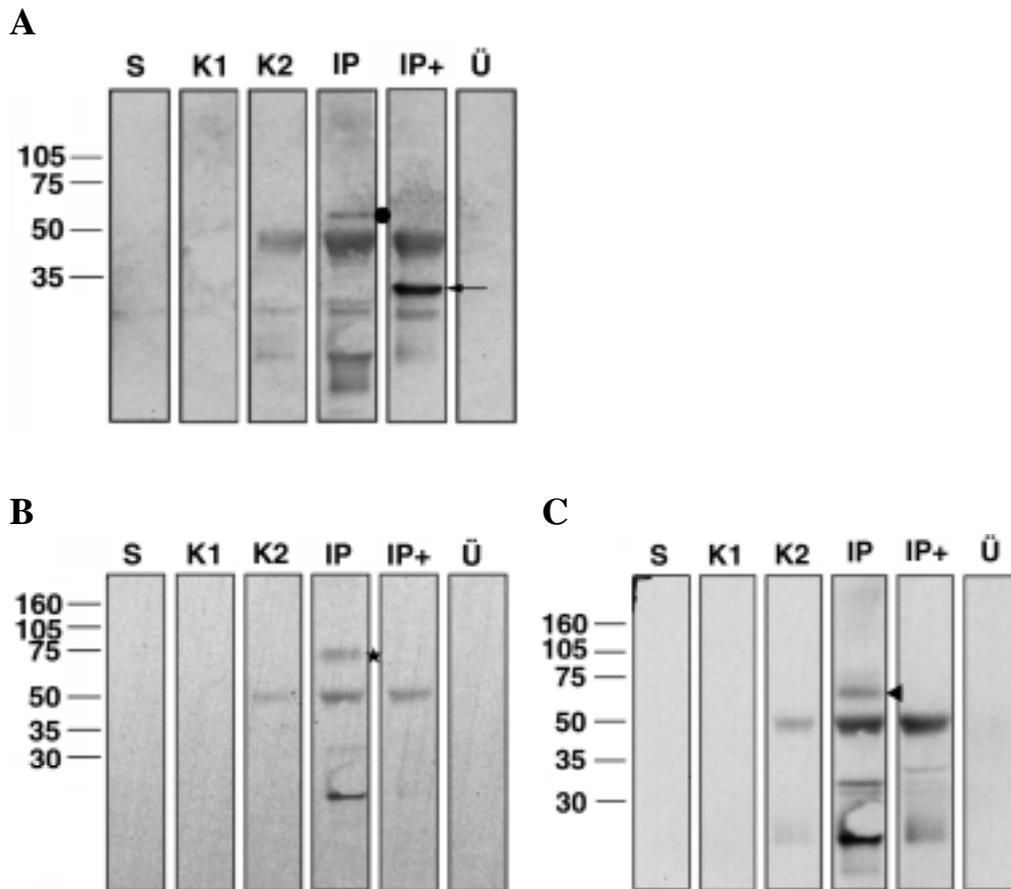


Abb. 21: Immunpräzipitation mit SBD-4596; Nachweis von SBD, ALS und D α 2

A: Im Immunpräzipitat (IP) ist SBD (●) mit SBD-4596 als eine einzelne Bande von ca. 60 kD detektierbar, welche durch das SBD-Fusionsprotein kompetierbar ist (IP+). Im IP+ wird außerdem das Fusionsprotein detektiert (→). Die Ketten des IgGs sind in K2, IP und IP+ deutlich zu sehen, da mit dem gleichen Antikörper sowohl präzipitiert als auch detektiert wurde;

B: Im Immunpräzipitat mit 4596 lässt sich die ALS-Untereinheit (★) mit dem mAk ALS-D4 detektieren. Der Zweitantikörper anti-Maus kreuzreagiert mit dem Kaninchen IgG;

C: Im Immunpräzipitat mit 4596 lässt sich die D α 2-Untereinheit (○) mit D α 2-C3/1 als ca. 65 kD-Bande detektieren. Der Zweitantikörper anti-Maus kreuzreagiert mit dem Kaninchen IgG.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die SBD-Untereinheit im ALS/D α 2-Rezeptorkomplex enthalten ist. Um diese Aussage zu bestätigen, wurde mit Antikörpern gegen ALS und D α 2 immunpräzipitiert und die SBD-Untereinheit sollte nachgewiesen werden. Abb. 22 A zeigt die Immunpräzipitation mit ALS-11881 und den Nachweis von SBD mit SBD-4596 als eine ca. 60 kD-Bande im Immunpräzipitat (**IP**). Neben der SBD-Bande ist die schwere Kette des IgGs bei ca. 50 kD zu sehen, da mit anti-Kaninchen sowohl immunpräzipitiert als auch detektiert wurde. Außerdem lässt sich im Immunpräzipitat (**IP**) eine schwächere, etwas größere Bande als SBD erkennen, deren Identität nicht klar ist, da sie in einigen Experimenten nicht erscheint. Im Solubilisat (**S**) und im Überstand (**Ü**) wird zusätzlich eine Bande erkannt, die jedoch nicht spezifisch präzipitiert wird. SBD lässt sich außerdem mit dem mAk ALS-D4 immunpräzipitieren, wie in **B** mit SBD-4596 dargestellt (**IP**, **I**). Auch hier ist eine größere Bande über der eigentlichen SBD-Bande erkennbar. Die SBD-Bande ist durch einen Überschuss an ALS-Fusionsprotein kompetierbar (**IP+**), was ihre Identität bestätigt. In den Kontrollen (**K1**, **K2**) und im Überstand (**Ü**) sind mehrere Banden zu sehen, die unspezifisch vom SBD-4596-Antikörper detektiert werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Kreuzreaktivität des nachweisenden Antikörpers mit nicht präzipitierten Proteinen. In der Abb. **C** ist die Immunpräzipitation mit dem D α 2-C3/1-Antikörper und der Nachweis von SBD mit dem SBD-R3-Antikörper als ca. 60 kD-Bande gezeigt (**IP**). In der Kontrolle **K1**, im Solubilisat (**S**) und im Überstand (**Ü**) ist keine Immunreaktivität erkennbar.

Diese Daten bestätigen die Hypothese, dass die SBD-Untereinheit im ALS/D α 2-Rezeptorkomplex vorkommen kann.

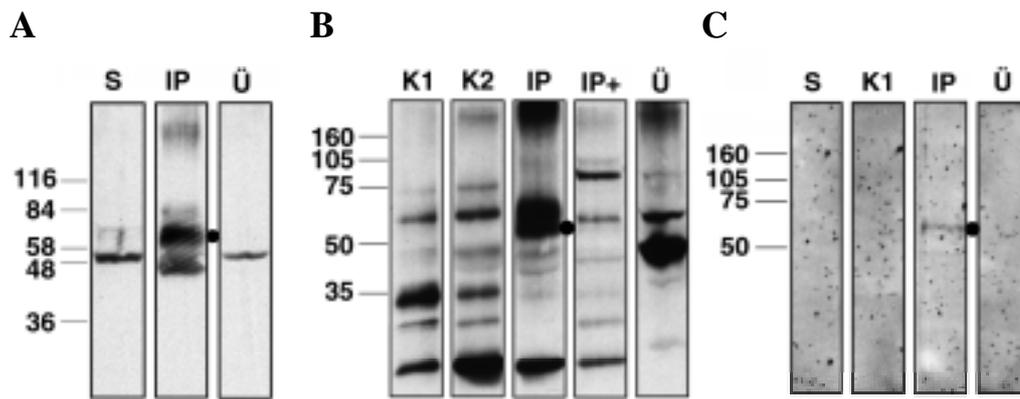


Abb. 22: Immunpräzipitationen mit ALS-11881, ALS-D4 und D α 2-C3/1; Nachweis von SBD

A: Im Immunpräzipitat mit ALS-11881 ist SBD (●) als ca. 60 kD-Bande detektierbar, wobei das darunterliegende IgG ebenfalls sichtbar ist, da mit anti-Kaninchen präzipitiert und detektiert wurde. Der SBD-4596-Antikörper erkennt im Solubilisat (S) außerdem ein weiteres immunreaktives Protein bei ca. 50 kD, das nicht ko-präzipitiert wird (Ü); **B:** Immunpräzipitation mit ALS-D4; Nachweis der SBD-Untereinheit mit SBD-4596. Neben der 60 kD-Bande ist eine größere Bande sichtbar. Der SBD-4596-Antikörper erkennt außerdem unspezifisch eine Reihe weiterer Banden, da kein aufgereinigtes Antiserum für den Western-Blot verwendet wurde; **C:** Es wurde mit dem mAk D α 2-C3/1 präzipitiert und mit dem pAk SBD-R3 die SBD-Untereinheit (●) als eine Bande von ca. 60 kD detektiert (IP). Im Ausgangsmaterial (S), im Überstand (Ü) und in der Kontrolle (K1) ist keine Immunreaktivität für SBD nachweisbar.

4.4.2 Nachweis eines Rezeptortyps, der D α 3 und ARD enthält

In den Immunpräzipitaten der ligandenbindenden Untereinheit ALS ist die strukturelle Untereinheit ARD nicht nachweisbar. Die Frage war daher, ob die dritte bekannte ligandenbindende Untereinheit D α 3 zusammen mit ARD in einem Rezeptorkomplex vorliegen könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Expressionsmuster von D α 3 und ARD im visuellen System der Fliege mit Hilfe von Immunhistochemie miteinander verglichen.

Abbildung 23 A zeigt die Verteilung von D α 3 in den optischen Loben der Fliege, die ähnlich der Verteilung von ALS, D α 2 oder ARD ist (Schuster et al., 1993; Jonas et al., 1994). Interessanterweise erkannte der D α 3-Antikörper in der distalen Lamina des visuellen Systems sehr deutlich punktierte Strukturen, die ebenfalls nur mit dem ARD-Antikörper (Abb. 23 C und D), nicht aber mit Antikörpern gegen ALS, D α 2 oder SBD gefärbt wurden.

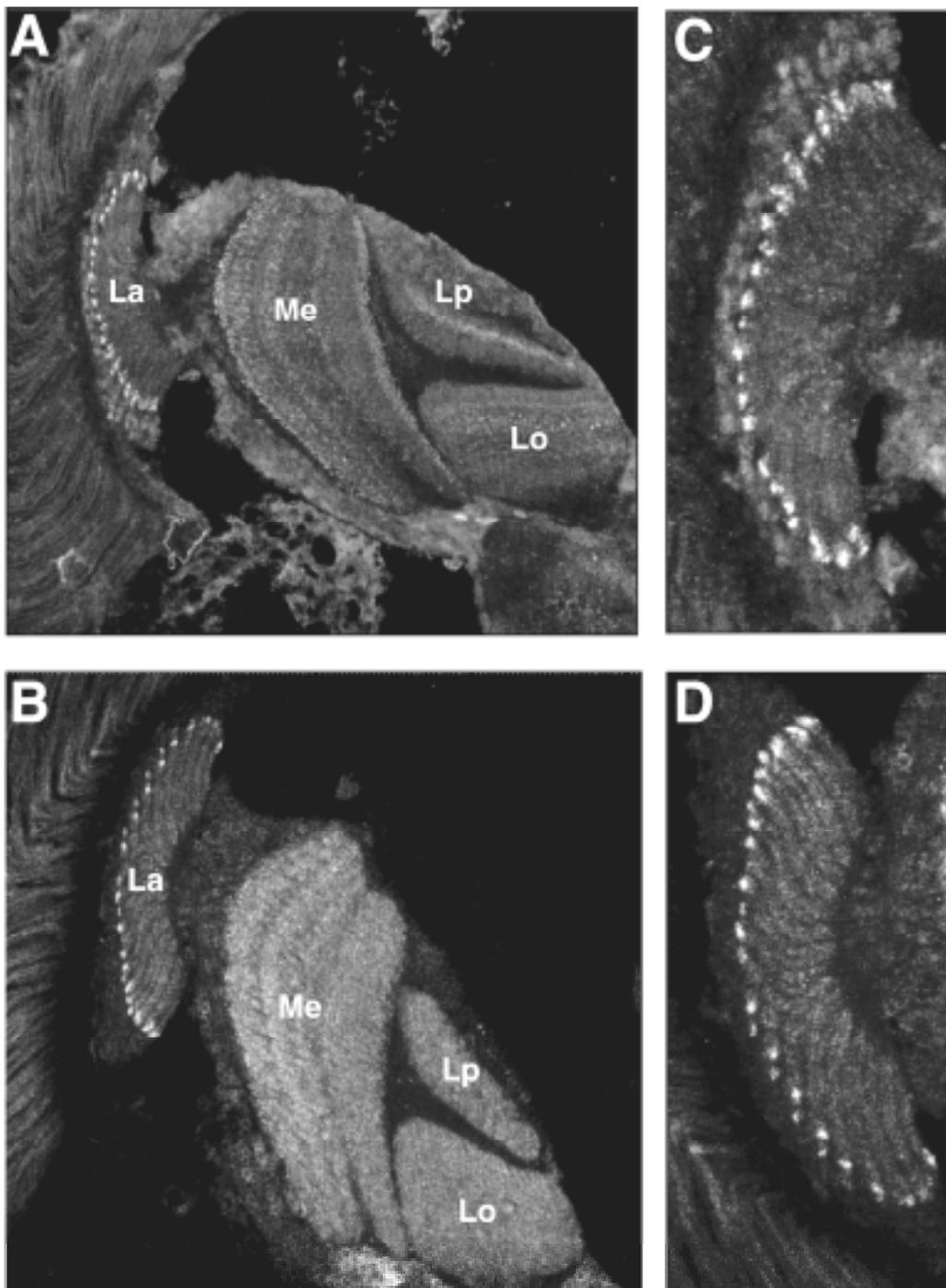


Abb. 23: Immunhistochemie auf *Drosophila*-Kopf-Schnitten. **A:** Immunfluoreszenz mit Dα3-85; **B:** Immunfluoreszenz mit ARD-3d2. Die ARD- und Dα3-Untereinheiten sind in weiten Teilen des visuellen Systems der Fliege ko-lokalisiert. Besonders auffallend ist jedoch die punktierte Färbung in der Lamina, die spezifisch nur mit diesen beiden Antikörpern detektiert wird (**C:**Dα3; **D:** ARD).

Aus der spezifischen Ko-Lokalisation von D α 3 und ARD konnte die Vermutung abgeleitet werden, dass die ARD-Untereinheit zusammen mit der ligandenbindenden Untereinheit D α 3 in einem Rezeptormolekül vorkommt.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Immunpräzipitationen sowohl mit dem monoklonalen ARD-Antikörper 3d2 als auch mit dem polyklonalen Rattenserum RII durchgeführt.

In Abb. 24 **A – D** (siehe auch Abb. 17) ist die Immunpräzipitation mit dem mAk ARD-3d2 dargestellt. Abb. **A** zeigt den Nachweis von ARD (**u**) mit ARD-3d2 (**IP**) als eine ca. 50 kD-Bande in Höhe der schweren Kette des IgGs, wobei eine etwas kleinere, schwächere Bande ebenfalls detektiert wurde, deren mögliche Identität bereits diskutiert wurde. Da mit dem gleichen Antikörper sowohl präzipitiert als auch detektiert wurde, ist in der Kontrolle ohne Solubilisat **K2** das IgG zu sehen. In Abb. **B** wurde ARD mit dem pAk RII nachgewiesen (**IP**). Keine Immunreaktivität ist in den Kontrollen **K1** und **K2** zu sehen.

In Abb. **C** ist der Nachweis von D α 3 (\backslash) im Immunpräzipitat (**IP**) von ARD-3d2 dargestellt, wobei einige unspezifische Banden auftauchen, die auch in den Kontrollen **K1** und **K2** zu sehen sind. Abb. **D** zeigt den Nachweis von D α 3 (D α 3-85) im Immunpräzipitat (**IP**) mit dem pAk ARD-RII und die Kompetition der D α 3-Bande bei ca. 105 kD (**IP+**). Eine schwache Bande ist im Solubilisat (**S**) und im Überstand (**Ü**) zu sehen, die durch Kreuzreaktivität des Erst- oder Zweitantikörpers herrühren kann und nicht präzipitiert wird.

Diese Daten weisen insgesamt daraufhin, dass ARD mit D α 3 in einem Rezeptorkomplex vorkommen könnte.

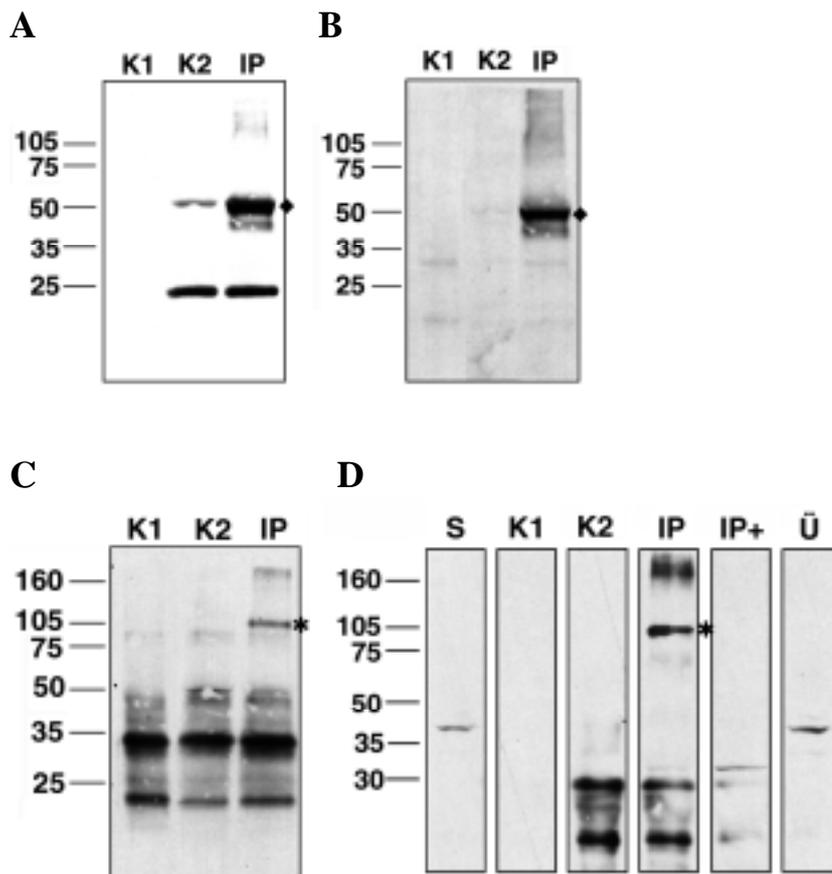


Abb. 24: Immunpräzipitation mit ARD-3d2; Nachweis von ARD und D α 3

A: Nachweis von ARD (◆) im Immunpräzipitat (IP). In der Kontrolle K2 sind die Ketten des Maus-IgGs zu sehen, da mit der gleichen Antikörperspezies präzipitiert und detektiert wurde. Die Bande der ARD-Untereinheit läuft auf gleicher Höhe mit dem IgG, daher wurde die ARD-Bande zusätzlich mit RII (**B**) gezeigt. Die Bedeutung einer weiteren, kleineren Bande bei ca. 45 kD ist unklar, da sie nicht in allen Experimenten reproduziert werden konnte. Sie könnte ein Degradationsprodukt von ARD sein. **C:** im 3d2-Immunpräzipitat (IP) ist D α 3 (★) als eine ca. 105 kD-Bande mit dem Antiserum 85 nachweisbar. In den Kontrollen K1 und K2 ist keine spezifische Immunreaktivität für D α 3 vorhanden; **D:** Immunpräzipitation mit ARD-RII (IP); Nachweis von D α 3 (★), welches durch das ARD-Fusionsprotein kompetiert wird (IP+).

Um die Aussage, dass die Untereinheit ARD gemeinsam mit D α 3 in einem Rezeptorkomplex in der Fliege vorliegt, zu bestätigen, wurde umgekehrt eine Immunpräzipitation mit D α 3-85 durchgeführt. In Abb. 25 **A** ist der Nachweis von D α 3 im Immunpräzipitat (**IP**) mit D α 3-85 als eine ca. 105 kD-Bande gezeigt, welche sich durch einen Überschuss an D α 3-Fusionsprotein kompetieren lässt (**IP+**). Da mit dem gleichen Antikörper sowohl präzipitiert als auch detektiert wurde, sind die Banden des IgGs in **K2**, **IP** und **IP+** sichtbar. Im Überstand (**Ü**) ist, da ein Überschuss an Erstantikörper eingesetzt wurde, IgG ebenfalls vorhanden. In **B** ist die Detektion von ARD mit dem mAk ARD-3d2 im Immunpräzipitat (**IP**) mit D α 3-85 gezeigt. ARD zeigt sich als eine 45/50 kD-Bande (**u**), die durch einen Überschuss an D α 3-Fusionsprotein kompetierbar ist (**IP+**). In den Kontrollen (**K1**, **K2**) und im Solubilisat (**S**) ist keine Immunreaktivität detektierbar.

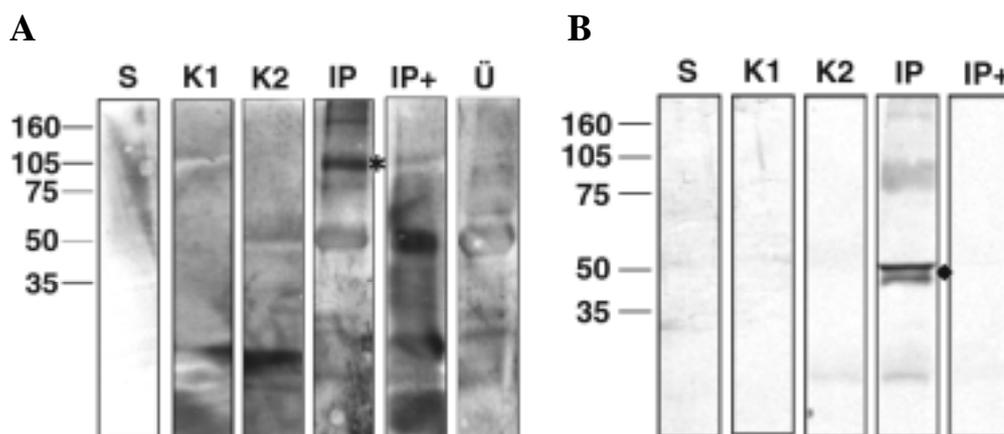


Abb. 25: Immunpräzipitation mit D α 3-85; Nachweis von D α 3 und ARD

A: Im 85-Immunpräzipitat (**IP**) lässt sich D α 3 (**★**) mit D α 3-85 nachweisen. In den Kontrollen ist keine spezifische Immunreaktion detektierbar (**K1**, **K2**). Die D α 3-Bande ist durch einen Überschuss an D α 3-Fusionsprotein kompetierbar (**IP+**). **B:** ARD (**◆**), welches mit 3d2 nachgewiesen wurde, ko-präzipitiert mit der D α 3-Untereinheit (**IP**), was sich durch Zugabe von D α 3-Fusionsprotein verhindern lässt (**IP+**).

An dieser Stelle sollte untersucht werden, ob $D\alpha 3$ mit einer der anderen α -Untereinheiten ko-präzipitiert und eventuell alle drei α -Untereinheiten in einem Rezeptorkomplex vorkommen. In Abb. 26 A ist die Immunpräzipitation mit $D\alpha 3$ -85 gezeigt, wobei im Immunpräzipitat (IP) mittels ALS-D4-Antikörper kein ALS-Protein detektiert wurde. Ähnlich verhält es sich mit der $D\alpha 2$ -Untereinheit. Diese konnte sich im Immunpräzipitat von $D\alpha 3$ -85 mit $D\alpha 2$ -C3/1 ebenfalls nicht nachweisen lassen. Aus den Daten kann man ableiten, dass diese Untereinheiten höchstwahrscheinlich nicht oder nur in einer sehr kleinen Rezeptorpopulation in einem gemeinsamen Rezeptorkomplex vorkommen.

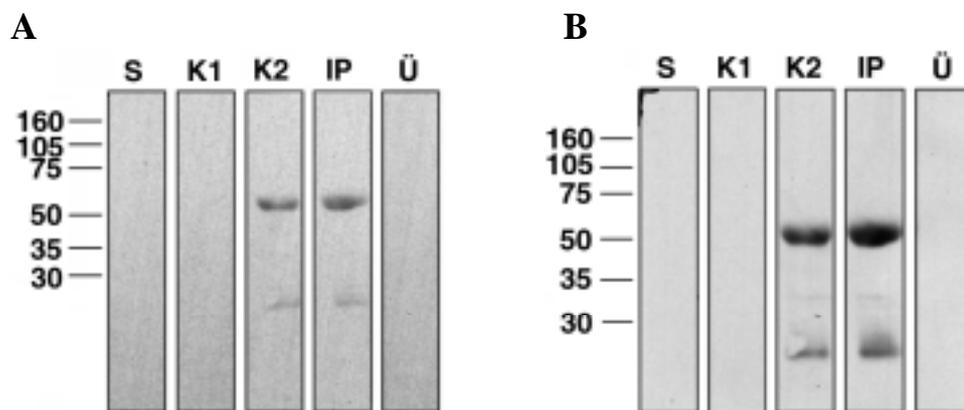


Abb. 26: Immunpräzipitation mit $D\alpha 3$ -85; keine Ko-Präzipitation von ALS und $D\alpha 2$ detektierbar

A: im Immunpräzipitat mit $D\alpha 3$ -85 (IP) ist ALS (mit ALS-D4) nicht nachweisbar. B: im Immunpräzipitat mit $D\alpha 3$ -85 (IP) ist $D\alpha 2$ (mit $D\alpha 2$ -C3/1) nicht detektierbar

Übereinstimmend mit diesem Befund ließ sich, wenn mit ALS-D4 oder D α 2-C3/1 immunpräzipitiert wurde, keine spezifische D α 3-Bande nachweisen (Abb. 27).

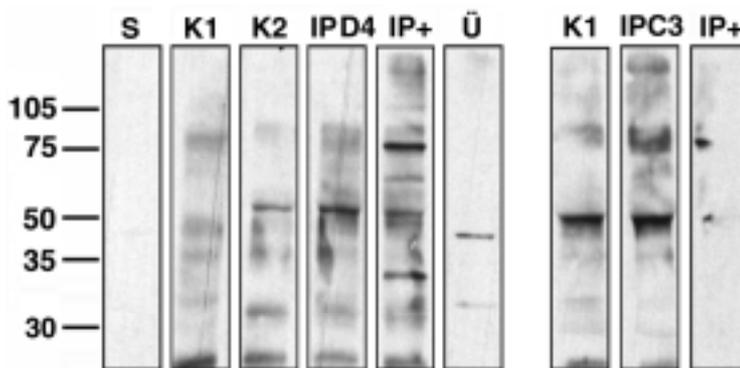


Abb. 27: Immunpräzipitation mit ALS-D4 und D α 2-C3/1 ; keine Ko-Präzipitation von D α 3 nachweisbar

In den Immunpräzipitaten von ALS-D4 (IP D4) und D α 2-C3/1 (IP C3) ist keine spezifische Immunreaktivität für D α 3 im Bereich von 105 kD nachweisbar.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die ligandenbindenden Untereinheiten ALS und D α 2 in einem Rezeptorkomplex vorkommen. Jedoch sind beide α -Untereinheiten nicht in Kombination mit D α 3 gefunden worden, was gegen das Vorkommen eines Rezeptorkomplexes mit allen drei bekannten Untereinheiten spricht.

4.4.3 Nachweis eines Rezeptortyps der ARD und SBD enthält

Wie in den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2 beschrieben, bildet die strukturelle Untereinheit SBD zusammen mit den Untereinheiten ALS und D α 2 einen Rezeptortyp. Es sollte weiterhin geklärt werden, ob die SBD-Untereinheit auch im D α 3/ARD-Rezeptorkomplex vorhanden ist. Bei der Immunpräzipitation mit D α 3-85 ließ sich SBD nicht nachweisen, und umgekehrt wurde bei der Immunpräzipitation mit einem SBD-Antikörper D α 3 nicht ko-präzipitiert (ohne Abb.). Das spricht dafür, dass die Untereinheiten D α 3 und SBD nicht in einem Rezeptorkomplex vorkommen.

Interessanterweise wurde festgestellt, dass sich mit SBD-4596 nicht nur ALS und D α 2, sondern auch die strukturelle Untereinheit ARD (◆) präzipitieren ließ (Abb. 28). Im Immunpräzipitat (IP) ist ARD als ca. 50 kD-Bande gezeigt, welche mit dem mAk ARD-3d2 detektiert wurde. Die Bindung des Rezeptorkomplexes lässt sich durch einen Überschuss an SBD-Fusionsprotein kompetieren; die ARD-Bande verschwindet (IP+). Sowohl im Solubilisat (S), im Überstand (Ü) als auch in der Kontrolle K1 ist keine Immunreaktivität zu erkennen.

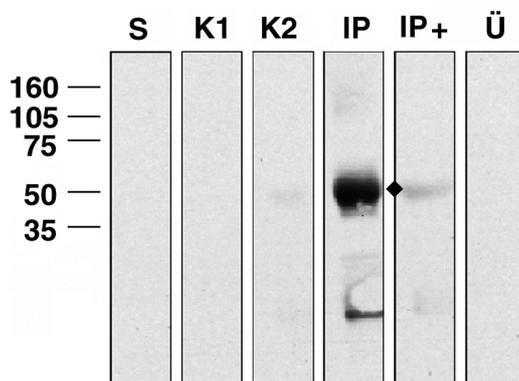


Abb. 28: Immunpräzipitation mit SBD-4596; Nachweis von ARD

Im Immunpräzipitat (IP) mit SBD-4596 ist ARD (◆) detektierbar, nicht jedoch in den Kontrollen (K1, K2) und nach Zugabe von D α 3-Fusionsprotein (IP+).

Als nächstes sollte umgekehrt geprüft werden, ob sich im Immunpräzipitat mit ARD die SBD-Untereinheit ko-präzipitieren lässt. Wenn mit dem mAk ARD-3d2 präzipitiert wurde, konnte SBD (**1**) als eine Bande von ca. 60 kD detektiert werden, wobei zusätzlich eine etwas größere Bande ko-präzipitiert wurde (Abb. 29 **A**). In Abb. **B** ist außerdem der Nachweis von SBD unter Verwendung des Rattenserums gegen SBD (R3) im Immunpräzipitat (**IP**) mit ARD-3d2 erbracht. Im Solubilisat (**S**), im Überstand (**Ü**) und in der Kontrolle (**K1**) ist keine Immunreaktivität vorhanden.

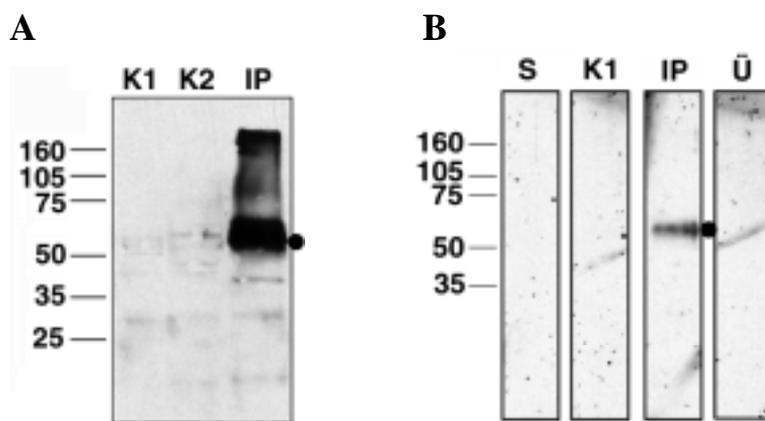


Abb. 29: Immunpräzipitation mit ARD-3d2; Nachweis von SBD

A: Im 3d2-Immunpräzipitat (IP) ist SBD (**1**) mit SBD-4596 als eine Bande von ca. 60 kD nachweisbar, wobei zusätzlich eine etwas größere Bande im IP erkennbar ist. **B:** Im Immunpräzipitat (IP) mit ARD-3d2 ist SBD (**1**) mit SBD-R3 als eine Bande von ca. 60 kD nachweisbar. In den Kontrollen (K1, K2), im Ausgangsmaterial (S) und im Überstand (Ü) ist keine SBD-Immunreaktivität erkennbar.

Da weder D α 3 und SBD (ohne Abb.) noch ARD und ALS ko-präzipitieren (Abb. 17 und 18), ist zu vermuten, dass eine bisher unbekannte α -Untereinheit mit ARD und SBD in einem Komplex vorliegt.

4.5 Affinitätschromatographie an Antikörper-Säulen

Zusätzlich zu Immunpräzipitationsstudien wurde eine weitere biochemische Nachweismethode zur Aufklärung der Rezeptorkomplex-Zusammensetzung verwendet: die Immunaффinitätschromatographie.

Aus früheren Arbeiten über die Aufreinigung des nAChR aus der neuromuskulären Synapse oder aus den elektrischen Organen der Zitterrochen *Torpedo californica* bzw. *T. marmorata* und des Zitteraals ist bekannt, dass der Rezeptor während der Aufreinigungsprozedur als Komplex erhalten bleibt (zusammengefasst bei Hulme, 1990). Durch die kovalente Kopplung untereinheitenspezifischer Antikörper an geeignetes Säulenmaterial ist es möglich, alle Rezeptorkomplexe aufzureinigen, die diese Untereinheit enthalten. Durch die Anreicherung des Proteins sind weitergehende Analysen der Rezeptorkomplexe möglich, z. B. unter Verwendung der Massenspektrometrie.

4.5.1 Aufreinigung von ALS-enthaltenden nAChRn an der ALS-D4-Säule

Um Rezeptorkomplexe aufzureinigen, wurde der mAk ALS-D4 kovalent an das Säulenmaterial gekoppelt. Das Rezeptorsolubilisat wurde über die Säule gegeben, sodass ALS-enthaltende Rezeptorkomplexe an den Antikörper binden konnten. Die Säule wurde gewaschen und die Rezeptorkomplexe mittels pH-Wert-Erniedrigung von der Säule eluiert (METHODEN 3.4.11.2).

In den Eluatfraktionen der D4-Säule wurde die ALS-Untereinheit mit den Antikörpern ALS-D4 und ALS-11881 nachgewiesen. Dieser aufgereinigte Rezeptorkomplex enthält außerdem die D α 2- und SBD-Untereinheiten, was die Ergebnisse aus den Immunpräzipitationen bestätigt (Abb. 30).

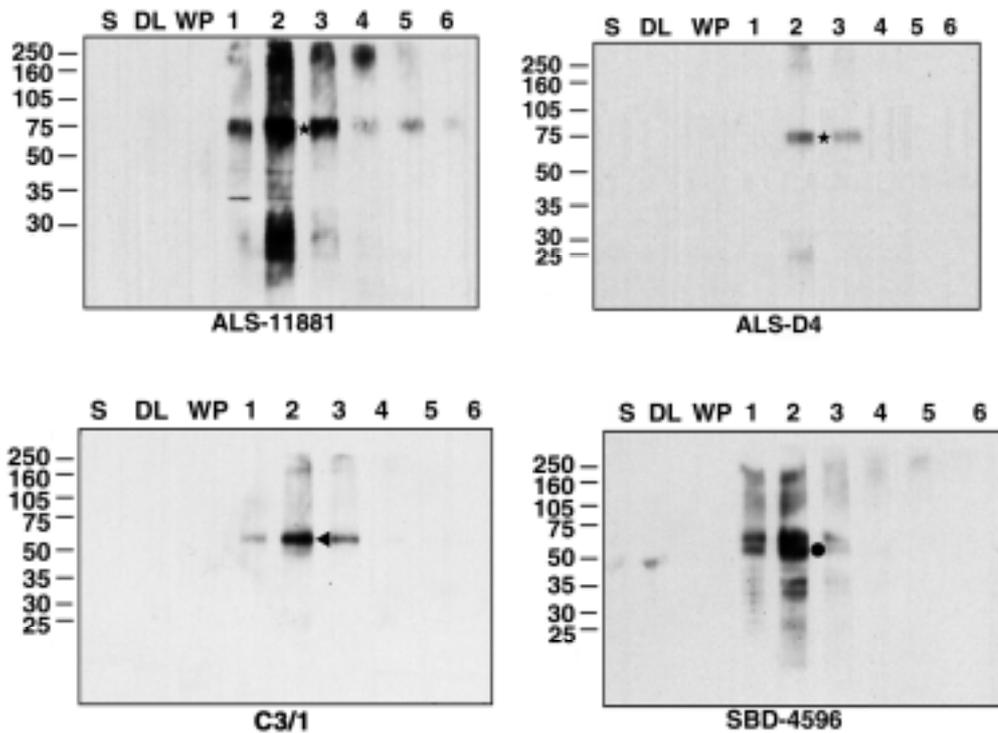


Abb. 30: D4-Affinitätschromatographie; Nachweis von ALS, D α 2 und SBD

200 ml Solubilisat (250 mg solubilierte Proteine) wurden über eine D4-Protein-G-Sepharose-Säule gegeben. Nach dem Waschen wurde der Rezeptorkomplex durch pH-Wert-Erniedrigung eluiert und anschließend die Proteinfractionen durch TCA-Fällung konzentriert.

S: Receptorsolubilisat; DL: Durchlauf; WP: Waschpuffer; 1 – 6: Fraktionen 1 - 6.

4.5.2 Aufreinigung von ARD-enthaltenden nAChRen an der ARD-3d2-Säule

Über eine 3d2-Säule sollten zusätzlich Rezeptorkomplexe aufgereinigt werden, die ARD und mit ARD assoziierte Untereinheiten enthalten. Bei der Affinitätschromatographie wurde prinzipiell wie bei der ALS-D4-Säule vorgegangen. In den Eluaten der 3d2-Affinitätschromatographie wurden ARD, D α 3 und SBD detektiert (Abb. 31).

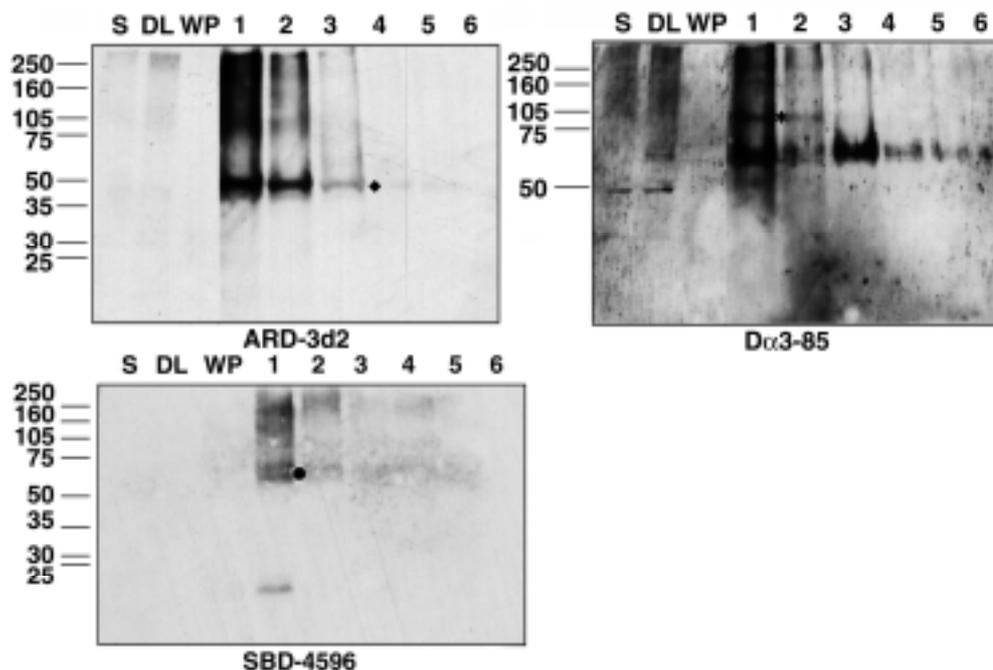


Abb. 31: 3d2-Affinitätschromatographie; Nachweis von ARD, D α 3 und SBD

200 ml Solubilisat (250 mg solubilisierte Proteine) wurden über eine 3d2-Protein-G-Sepharose-Säule gegeben. Nach dem Waschen wurde der Rezeptorkomplex durch pH-Wert-Senkung eluiert und anschließend die Proteinfractionen durch TCA-Fällung konzentriert.

S: Rezeptorsolubilisat; DL: Durchlauf; WP: Waschpuffer; 1 - 6: Fraktionen 1 - 6.

Die Proteine der Eluatfraktionen wurden zusätzlich nach Auftrennung in der SDS-PAGE Coomassie-gefärbt und einige Banden der ALS-D4-Säule wurden mittels Massenspektrometrie untersucht. Diese Technik wurde in Zusammenarbeit mit der Bayer AG Leverkusen durchgeführt. Erste Ergebnisse wiesen jedoch auf zu geringe Konzentrationen an Rezeptorprotein hin. Daher wäre es notwendig, eine bedeutend größere Menge an Solubilisat bzw. Fliegenmaterial einzusetzen.

5 DISKUSSION

Seit der Entdeckung verschiedener Gene, die nAChR-Untereinheiten in Invertebraten kodieren, geht man davon aus, dass nAChRen in Invertebraten aus mehr als einer Untereinheit aufgebaut sind (Gundelfinger, 1992). Jedoch war bisher wenig darüber bekannt, welche Untereinheiten in den verschiedenen nativen Insekten-Rezeptoren gemeinsam vorkommen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Quartärstruktur nativer nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in der Taufliege *Drosophila melanogaster* zu untersuchen.

Es wurde vor allem durch Immunpräzipitationsstudien herausgefunden, dass in der Taufliege mindestens drei verschiedene Rezeptorsubtypen vorkommen, die folgende Untereinheitenkombinationen enthalten: ALS/D α 2/SBD, D α 3/ARD und ARD/SBD (Abb. 32).

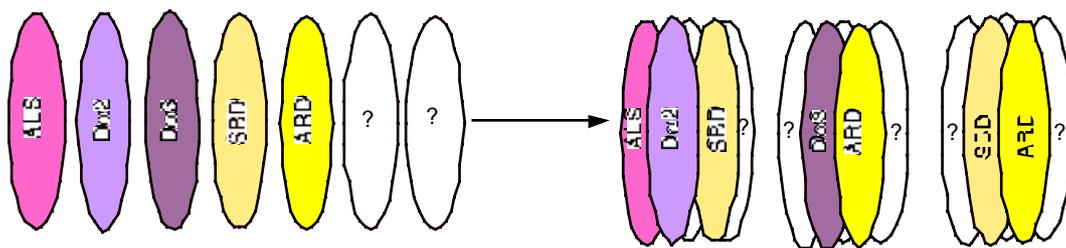


Abb. 32: Rezeptortypen in *Drosophila melanogaster*: Aus den Untersuchungen der Untereinheiten ALS, D α 2, D α 3, ARD und SBD lassen sich mindestens 3 verschiedene Rezeptorkomplexe, die ALS/D α 2/SBD, D α 3/ARD bzw. ARD/SBD enthalten, vorhersagen.

Am Beispiel der Taufliege macht diese Arbeit deutlich, dass in Insekten nAChRen aus unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut sind. Des Weiteren ist der Aufbau der Rezeptoren nicht homogen, d. h. die einzelnen Untereinheiten können miteinander kombiniert sein. So können in einem Rezeptorkomplex zwei unterschiedliche α -Untereinheiten (ALS und D α 2), aber auch zwei unterschiedliche β -Untereinheiten (ARD und SBD) vorliegen. Diese Daten sprechen für eine bemerkenswerte Diversität nikotinischer Rezeptoren in der Taufliege und unterstreichen die funktionelle Bedeutung des cholinergen Systems in Invertebraten.

Gleichwohl lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht die vollständige Stöchiometrie eines Rezeptors ableiten. So bleibt unbeantwortet, ob eine jeweilige Untereinheit mehr als einmal in einem Komplex vertreten ist.

Da nAChRen multimerer transmembraner Proteinkomplexe sind, ist es für biochemische Untersuchungen notwendig, den Rezeptorkomplex aus der Plasmamembran zu extrahieren (solubilisieren). Es bedarf eines relativ aufwendigen Verfahrens, um die Rezeptoren in genügender Menge und als funktionelle Moleküle zu isolieren. P. Schloß (1989) erarbeitete dafür eine Methode, die in der vorliegenden Arbeit leicht modifiziert angewendet wurde, da sie im Vergleich zu anderen Solubilisierungsmethoden, z. B. von Tomizawa et al., 1996, eine höhere Effizienz aufwies. Für den Nachweis von nAChRen aus der Taufliege war außerdem eine große Menge an Tiermaterial nötig, weshalb eine Großzucht des Fliegenstammes w¹¹¹⁸ betrieben werden musste.

Mittels Bindungsanalysen wurden von P. Schloß aus Membranen und Solubilisat von Embryonen und adulten Fliegen mindestens zwei verschiedene Bindungsstellen für [¹²⁵I]α-Bgt entdeckt, was für eine Diversität nAChRen in der Taufliege sprach. In der vorliegenden Arbeit wurden Bindungsanalysen durchgeführt, durch die zu erkennen war, dass in Membranfraktion und Solubilisat von *Drosophila*-Köpfen funktionelle nAChRen vorhanden waren. Das Solubilisat konnte deshalb in biochemischen Untersuchungen wie Immunpräzipitation und Affinitätschromatographie verwendet werden.

Jedoch ließen sich im Solubilisat die einzelnen Untereinheiten mittels Western-Blot nicht detektieren. Es wurde angenommen, dass die Proteinkonzentration für eine Detektion zu gering sein könnte. Ähnlich scheinen die Verhältnisse bei Vertebraten-nAChRen zu sein: So konnte erst nach Aufreinigung an einer mAk-Säule aus Hirnextrakten des Huhns im silbergefärbten SDS-PAGE-Gel und im Western-Blot die Banden der nAChR-Untereinheiten detektiert werden (Whiting und Lindstrom, 1986b). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das Rezeptorprotein mittels α-Bgt-Affinitätschromatographie angereichert. Im SDS-Eluat dieser Säule waren mit spezifischen Antikörpern alle bisher bekannten Untereinheiten

nachweisbar. Jedoch kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Antikörper mit bisher unbekanntem Untereinheiten kreuzreagieren. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Antikörper gegen die zytoplasmatische Region zwischen der 3. und 4. Transmembranregion hergestellt wurden. Diese Region ist hochvariabel (Gundelfinger und Hess, 1992) und die gewonnenen Antikörper sollten deshalb untereinheitenspezifisch sein.

Die nAChR-Untereinheiten im Eluat der α -Bgt-Säule - Bestimmung der Molekulargewichte

SBD und D α 2 zeigten in der SDS-PAGE ein Wanderungsverhalten, welches gut den errechneten Molekulargewichten entsprach: SBD wurde mit den Antisera SBD-4596 und SBD-R3 als ein 60 kD-Protein detektiert, das errechnete Molekulargewicht betrug 57 kD. D α 2 ließ sich als ein 65 kD-Protein detektieren. Das rechnerisch ermittelte M_r des *core*-Proteins ist 61 kD (Baumann et al., 1990). Möglicherweise könnte D α 2 identisch mit einer kürzlich gefundenen 66 kD-Bande aus dem Eluat einer Neonicotinoid-Säule von solubilisierten *Drosophila*-Kopf-Membranen sein (Tomizawa et al., 1996). Das ARD-Protein ließ sich mit zwei verschiedenen Antikörpern (3d2, RII) bei 50 kD detektieren, wobei das Molekulargewicht von ARD bei 57 kD errechnet wurde. Kleinere apparente Molekulargewichte könnten durch Trunkierung, einer besonders kompakten Struktur (selbst bei SDS-Präsenz) oder auf Phosphorylierungen zurückzuführen sein. So besitzt ARD in der zytoplasmatischen Schleife eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die cAMP-abhängige Proteinkinase. Die Bedeutung einer kleineren (bei ca. 45 kD erscheinenden) Bande ist unklar; eventuell handelt es sich hier um ein proteolytisches Abbauprodukt. Eine Diskrepanz zwischen errechnetem Molekulargewicht und Wanderungsverhalten in der SDS-PAGE wurde auch für nAChR-Untereinheiten aus Vertebraten beschrieben. So wandert die α -Untereinheit des nAChR aus *Torpedo californica* in der SDS-PAGE als ein 40 kD großes Molekül, wird rechnerisch jedoch als 60 kD großes Protein ermittelt (Devillers-Thiery et al., 1983).

ALS migrierte in der SDS-PAGE als ein 80 kD-Protein (detektiert mit drei verschiedenen Antikörpern), obwohl das Molekulargewicht des *core*-Proteins rechnerisch bei 62 kD ermittelt wurde (Bossy et al., 1988). Diese Diskrepanz könnte durch eine starke N-Glykosylierung im N-terminalen Bereich an putativen Glykosylierungsstellen des Proteins hervorgerufen sein. Frühere Quervernetzungs-Experimente mit [¹²⁵I]α-Bgt offenbarten zwei Toxin-Addukte von 50 und 90 kD, wobei das 50 kD-Addukt als Dimer aus ALS mit 40 kD und α-Bgt (8 kD) und die 90 kD-Bande als Komplex zweier Untereinheiten mit α-Bgt diskutiert wurde (Schloß et al., 1992). Aus der Sicht der jetzigen Befunde dürfte es sich bei dem 90 kD-Addukt um einen Komplex aus ALS und α-Bgt und bei dem 50 kD-Produkt um ein proteolytisches Abbauprodukt gehandelt haben. Das Dα3-Protein war mit 105 kD in der SDS-PAGE als größtes der 5 Untereinheiten detektierbar und ist auch rechnerisch mit 85 kD die größte bisher bekannte *Drosophila*-Untereinheit (Schulz et al., 1998). Wie bei ALS könnten hier mögliche N-Glykosylierungen (an den Aminosäuren 24, 111, 165 und 212 der extrazellulären Domäne) für die Diskrepanz zwischen errechnetem Molekulargewicht und Migrationsverhalten in der SDS-PAGE eine Rolle spielen.

Spezifische Antiseren

Ein wichtiges Arbeitsmittel zur Aufklärung der Rezeptorstruktur stellten Antikörper dar, die spezifisch die jeweiligen Untereinheiten erkannten.

Verschiedene polyklonale Antiseren und monoklonale Antikörper gegen ALS, Dα2, Dα3 und ARD wurden auf Western-Blots, die mit Fusionsproteinen gegen die Untereinheiten beladen waren, getestet. Die verwendeten Antikörper erkannten spezifisch die „eigenen“ Fusionsproteine, nicht aber die der anderen Untereinheiten. Die Antikörper kreuzreagierten nicht untereinander und konnten daher für die Identifikation der einzelnen Untereinheiten verwendet werden.

Da gegen die SBD-Untereinheit kein spezifischer Antikörper vorhanden war, wurden polyklonale Ratten (R3)- und Kaninchen (4596)-Antiseren gegen die zytoplasmatische Domäne von SBD hergestellt. Diese Antiseren erkannten

spezifisch SBD-Fusionsproteine auf dem Immunoblot und kreuzreagierten nicht mit den Fusionsproteinen der anderen Untereinheiten. Die Antiseren wurden in der Immunhistochemie, auf Western-Blots und für Immunpräzipitationen erfolgreich verwendet. Auf einigen Western-Blots mit R3 und 4596 zum Nachweis von SBD erschien neben dem 60 kD SBD-Protein eine weitere, etwas größere und weniger starke Bande. Die Bedeutung dieser Bande ist unklar, zumal diese Bande nicht kontinuierlich auftrat. Möglicherweise handelte es sich hier um eine Kreuzreaktivität der SBD-Antiseren mit einem anderen Protein.

In der Immunhistochemie erkannte das polyklonale Antiserum SBD-4596 synaptische Strukturen im visuellen System der Fliege auf *Drosophila*-Kopfschnitten. Die Verteilung der 4596-Immunreaktivität stimmte dabei gut mit der Verteilung anderer Untereinheiten überein.

In *Drosophila* gibt es mindestens drei verschiedene nAChR-Komplexe

Wie bereits am Anfang erwähnt, gibt es in *Drosophila* mindestens drei unterschiedliche Rezeptorkomplexe, die die Untereinheiten ALS/D α 2/SBD, D α 3/ARD und SBD/ARD enthalten. Diese sollen im folgenden näher diskutiert werden.

Die ersten Hinweise für das Vorkommen der ligandenbindenden Untereinheiten ALS und D α 2 in einem Rezeptormolekül lieferten immunhistochemische Analysen, die eine Ko-Verteilung beider Untereinheiten in den synaptischen Neuropilregionen des visuellen Systems der Fliege erkennen ließen (Schuster et al., 1993). Außerdem konnten funktionelle nAChRen in *Xenopus*-Oozyten rekonstituiert werden, nachdem Expressionskonstrukte, welche für ALS, D α 2 und für die β 2-Untereinheit aus dem Huhn kodieren, intranukleär injiziert wurden (Bertrand et al., 1994). Wenn alle drei Untereinheiten in derselben Oozyte exprimiert wurden, entstand ein Rezeptortyp ALS/D α 2/ β 2 mit neuen charakteristischen physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften (Schulz, 1998; Schulz et al., 2000).

Dass solch ein Rezeptortyp - bestehend aus zwei verschiedenen α -Untereinheiten - tatsächlich auch in der Fliege existiert, konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden.

Hinweise für die Anwesenheit verschiedener α -Untereinheiten im selben Rezeptorkomplex gibt es ebenfalls bei Vertebraten-Rezeptoren: in transfizierten humanen Zellen ko-assembliert die humane $\alpha 5$ -Untereinheit zu einem $\alpha 3/\beta 4/\alpha 5$ -Rezeptor (Fucile et al., 1997). Im Ziliarganglion des Huhns stellen 80 % der nAChR einen Rezeptor aus $\alpha 3/\beta 4/\alpha 5$ dar (Conroy et al., 1992). Elektrophysiologische Untersuchungen mit $\alpha 6$ -transfizierten Zellen in Kombination mit anderen nAChR-Untereinheiten aus dem Huhn zeigten, dass die Untereinheiten $\alpha 3$, $\beta 4$ und $\alpha 6$ in einem funktionellen Rezeptor lokalisiert sein können (Fucile et. al., 1998).

In einer anderen Arbeit wurden aus den optischen Loben des Huhns neben einem $\alpha 7$ -Rezeptor ein weiterer Rezeptortyp, der die zwei α -Untereinheiten, $\alpha 7$ und $\alpha 8$ enthält, aufgereinigt (Gotti et al., 1994; 1997).

Schloß und Mitarbeiter (1991) hatten gezeigt, dass Antikörper gegen ALS und ARD den gleichen hochaffinen α -Bgt-bindenden Rezeptorkomplex erkennen, woraus gefolgert wurde, dass beide Untereinheiten Bestandteil eines Rezeptorkomplexes sind. Jedoch gaben vorliegende Daten aus Immunpräzipitationen keine weiteren Hinweise auf das Vorkommen von ARD in ALS-enthaltenden Rezeptoren. So ließen sich ARD und ALS nicht gegenseitig ko-präzipitieren (siehe ERGEBNISSE Abb. 17). Ob solche Rezeptoren gar nicht vorkommen, die Affinität der jeweiligen Antikörper für den ALS/ARD-Komplex zu niedrig war, oder ob die Anzahl solcher Rezeptoren in der Fliege unter der Nachweisgrenze auf dem Western-Blot lag, ließ sich an dieser Stelle nicht beantworten.

Alternativ dazu ließ sich vermuten, dass SBD als β -Untereinheit in einem ALS/D $\alpha 2$ -enthaltenden Rezeptorkomplex interagiert ist. Um dieser Vermutung nachzugehen, mussten zunächst SBD-spezifische Antiseren hergestellt werden. Auf Schnittpräparaten adulter Fliegen konnte eine weitgehende Ko-Verteilung der SBD- und ALS-Untereinheiten besonders in den optischen Loben des visuellen Systems nachgewiesen werden. Die Ko-Lokalisation von ALS und SBD wies auf das Vorhandensein beider

Untereinheiten in einem Rezeptormolekül hin. So waren mit beiden Antiseren die meisten Schichten der Medulla identisch gefärbt. Jedoch gab es auch Regionen, in denen eine Ko-Lokalisation nicht beobachtet wurde: Schicht 6 der Medulla ist mit dem SBD-Antikörper und Schicht 9 mit dem ALS-Antikörper wesentlich stärker gefärbt. Außerdem gab es Unterschiede bei der Färbung der Lobula. Möglicherweise sind in diesen Regionen ALS und SBD in unterschiedliche Rezeptorsubtypen integriert.

In weiteren Experimenten (siehe ERGEBNISSE 4.4) konnte gezeigt werden, dass der ALS/D α 2-Rezeptor die strukturelle Untereinheit SBD enthielt:

Interessanterweise befinden sich die Gene für ALS, D α 2 und SBD im Genom in enger Nachbarschaft (chromosomale Region 96A). Ein solches Gen-*Cluster* ist auch für die Vertebraten-Untereinheiten α 3, α 5 und β 4 bekannt (Boulter et al., 1990), bei denen es, wie schon erwähnt, ebenfalls Hinweise gibt, dass sie in einem Rezeptormolekül vorkommen könnten und einen α 3/ β 4/ α 5-Rezeptortyp bilden. Solch ein Gen-*Cluster* würde eine gut regulierte Genexpression sowohl temporal als auch lokal möglich machen. In Oozyten injizierte ALS, D α 2 und SBD- (und auch D α 3 und ARD)-Untereinheiten konnten jedoch keine funktionellen Rezeptoren rekonstituieren, was vermuten lässt, dass entweder eine oder mehrere weitere bisher unbekannte Untereinheit(en) für die Expression fehl(en)t oder dass die Oozyte generell ungeeignet für die heterologe Expression von *Drosophila*-Rezeptoren ohne Vertebraten-Untereinheiten ist (Bertrand et al., 1994; Schulz et al., 1998).

Durch Immunfluoreszenz mit D α 3- und ARD-Antikörpern ließ sich eine Ko-Verteilung beider Untereinheiten in den optischen Loben der Fliege erkennen. Besonders augenfällig war dabei eine punktförmige Färbung in der Lamina, die nur mit Antikörpern gegen diese beiden Untereinheiten nicht aber mit Antikörpern gegen ALS, D α 2 oder SBD nachzuweisen war. Dass es sich bei diesen Strukturen mit hoher Wahrscheinlichkeit um cholinerge Synapsen handelt, wird durch die Färbung eines Antikörpers gegen die ChAT bestätigt, der genau solche Strukturen in der Lamina erkannte (Buchner et al., 1986). Die Ko-Verteilung von ARD und D α 3 ließ vermuten, dass D α 3 und ARD in einem Rezeptormolekül assemblieren. Diese Annahme wurde durch

Immunpräzipitations-Experimente bestätigt. Andererseits wurde in Immunpräzipitaten mit D α 3-85 keine ALS- oder D α 2-Immunreaktivität gefunden und umgekehrt ließ sich D α 3 weder mit ALS- noch mit D α 2-Antikörpern präzipitieren, was die Existenz dieser α -Untereinheiten in mindestens zwei verschiedenen Rezeptorkomplexen unterstreicht. Jedoch gelten auch hier die Einschränkungen, wie sie bereits bei der ALS/ARD-Kombination erläutert worden sind.

Die Ko-Expression von D α 3 mit anderen *Drosophila* nAChR-Untereinheiten einschließlich ARD in *Xenopus*-Oozyten führte nicht zur Bildung funktioneller Rezeptoren, was möglicherweise auf die gleichen Hindernisse, wie im Falle des ALS/D α 2/SBD-Rezeptors zurückzuführen ist.

Vergleicht man die DAB-Färbungen mit Antikörpern gegen SBD (Abb. 19) und ARD (Schuster et al., 1993) lässt sich eine Ko-Verteilung beider Untereinheiten in den optischen Loben, besonders aber in einigen Schichten der Medulla und Lobula-Platte feststellen.

ARD und SBD ließen sich ko-präzipitieren, was nahelegt, dass beide Untereinheiten Bestandteile eines Rezeptormoleküls sein können. Da jedoch weder SBD und D α 3 noch ARD und ALS ko-präzipitieren, ist davon auszugehen, dass eine andere bisher unbekannte α -Untereinheit mit SBD und ARD in dem ARD/SBD-enthaltenden Rezeptorkomplex vorkommt.

Das Vorhandensein unterschiedlicher β -Untereinheiten in einem Rezeptorkomplex ist durchaus nicht ungewöhnlich; es sei z. B. an den muskulären Rezeptortyp erinnert, der drei unterschiedliche strukturelle Untereinheiten enthält. Außerdem ist aus der Literatur über die Rezeptorkombinationen neuronaler nAChRen bekannt, dass im ZNS von Vertebraten durchaus Rezeptortypen mit unterschiedlichen β -Untereinheiten existieren: Immunpräzipitations-Experimente aus Extrakten des Kleinhirns der Ratte und mit transfizierten COS-Zellen zeigten, dass die β 3- und β 4-Untereinheiten nicht nur ko-lokalisiert sind, sondern dass beide Untereinheiten *in vivo* mit einem α 4 β 2-Rezeptor ko-assemblieren (Forsayeth und Kobrin, 1997).

Die Existenz verschiedener nAChR-Subtypen in Insekten ist durch verschiedene Untersuchungen unterlegt. Dazu gehören z. B. Bindungsstudien mit radioaktiven Liganden und elektrophysiologische und pharmakologische

Untersuchungen am Nervengewebe verschiedenster Insekten (Zusammenfassungen bei Marshall et al., 1990; Leech and Sattelle, 1993; Gundelfinger, 1992; Schulz und Gundelfinger, 2000). In diesen Studien wurden neben Bindungsstellen für α -Bgt nikotinische Rezeptoren gefunden, die α -Bgt-insensitiv sind (Lane et al., 1982; Lees et al., 1983; Macallan et al., 1988) und außerdem Rezeptoren, die sich sowohl durch nikotinische als auch muskarinische Liganden blocken ließen (Rezeptoren mit „gemischter“ Pharmakologie) (Eldefrawi und O'Brien, 1970; Jewess et al., 1975; Mansour et al., 1977; Lummis und Sattelle, 1985)

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in *Drosophila* verschiedene Subtypen nikotinischer Acetylcholinrezeptoren vorkommen. Jedoch ist die Frage nach der vollständigen Stöchiometrie eines Insekten-Rezeptormoleküls nach wie vor unbeantwortet. Interessant wäre es festzustellen, ob die kürzlich beschriebene $D\alpha 4$ -Untereinheit (Lansdell und Millar, 2000) oder aber eine andere der im Genomprojekt entschlüsselten Untereinheiten (Littleton und Ganetzky, 2000) in einem der beschriebenen Rezeptorkomplexe integriert ist. Ungeklärt ist ebenfalls, wieviele verschiedene Rezeptortypen in der Taufliede oder überhaupt in Insekten vorkommen und welche funktionelle Bedeutung den einzelnen Rezeptortypen zugeschrieben werden kann. Um die Stöchiometrie eines Insekten-Rezeptors vollständig aufzuklären, müsste dieser z. B. durch Affinitätschromatographie isoliert und analysiert werden (diese konnte im Rahmen dieser Arbeit aber nicht abgeschlossen werden). In der Literatur über Vertebraten-Rezeptoren sind einige erfolgreiche Beispiele dokumentiert: So reinigten Whiting und Mitarbeiter (1986b) mittels Affinitätschromatographie an einer monoklonalen Antikörper-Säule einen nAChR aus Hirnextrakten des Huhns auf, der die $\alpha 4$ - (Whiting et al, 1987a und 1991), die $\beta 2$ - (Nef et al., 1988; Schöpfer et al., 1988) und die $\alpha 5$ -Untereinheit (Conroy et al., 1992) enthielt.

Es wurden einige Versuche zur Aufreinigung von nAChRen aus Insekten unternommen. 1983 wurde von Filbin und Mitarbeitern aus dem supraösophagealen Ganglion der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* ein Acetylcholinrezeptor mit nikotinischen Eigenschaften zum Teil aufgereinigt und charakterisiert. Eine Auftrennung im SDS-PAGE-Gel offenbarte drei

Hauptbanden mit den Molekulargewichten 60, 41 und 25 kD, deren Identität jedoch nicht bestimmt wurde.

Breer und Mitarbeiter (1984, 1985) berichteten über die Isolierung putativer nAChR aus dem ZNS der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* und der amerikanischen Küchenschabe *Periplaneta americana* über eine CNBr-gekoppelte- α -Bgt-Säule. In der SDS-PAGE ließen sich in den *d*-Tubocurarin-Eluaten bei der Küchenschabe eine 65 kD-Bande und im Falle der Heuschrecke zwei Banden von ca. 65 kD und 58 kD nachweisen, die aber ebenfalls keinen Untereinheiten zugeordnet wurden.

Tomizawa und Mitarbeiter (1996) isolierten an einer Neonikotinoid-Säule einen möglichen nAChR aus *Drosophila* und der Stubenfliege *Musca domestica*. Die Größen der erhaltenen Coomassie-Banden im Imidachloprid-Eluat betrugen 69, 66, und 61 kD (Tomizawa et al., 1996). Durch Photoaffinitätsmarkierung mit [¹²⁵I]Azidonicotinoid wurde besonders die 66 kD-Bande markiert und als ligandenbindende Untereinheit eingeordnet (Tomizawa et al., 1997).

Zusammenfassend muss man jedoch feststellen, dass es bisher keinerlei Daten über die Isolierung und nachfolgende Identifizierung eines nAChR aus Insekten gibt. Die vorliegende Arbeit liefert erste Ansätze für die Aufreinigung eines Insekten-Rezeptors mittels Immunitäts-Chromatographie. An einer D4- bzw. 3d2-Säule wurden nAChRen aus dem Solubilisat von Fliegenköpfen aufgereinigt, welche durch anschließendes Immunoblotting nachweisbar waren. Erste Analysen der Eluatfraktionen durch Massenspektrometrie zeigten jedoch, dass die Proteinmengen für den Nachweis einzelner Rezeptoruntereinheiten unter der Nachweisgrenze lagen. Um einen Insekten-Rezeptor erfolgreich aufzureinigen und sowohl bekannte als auch unbekannte Untereinheiten bzw. assoziierte Proteine identifizieren zu können, wäre es an dieser Stelle notwendig, die Menge des eingesetzten Proteins, bzw. die Menge des verwendeten Fliegenmaterials zu erhöhen.

Die Bedeutung verschiedener Rezeptortypen für die Taufleie

Die Diversität der nAChRen in *Drosophila* eröffnet eine Vielzahl von Fragen nach der Lokalisation, den Eigenschaften und der funktionellen Bedeutung der verschiedenen Rezeptorkomplexe.

Wie von Vertebraten-Rezeptoren bekannt, kann ein einzelnes Neuron nicht nur unterschiedliche Subtypen von nAChRen exprimieren, die einzelnen Rezeptortypen können auf der Zellmembran auch unterschiedlich verteilt sein. (zusammengefasst bei Clementi et al., 2000). Eine Vielzahl von Arbeiten dokumentiert eine präsynaptische Lokalisation neuronaler nAChRen, die in dieser Eigenschaft andere Transmittersysteme, wie das glutamaterge (Alkondon et al., 1994), das GABAerge (Alkondon et al., 1997), das dopaminerge (Grady et al., 1994) oder das cholinerge (Wilkie et al., 1996) modulieren können. Gleichzeitig sind neuronale nAChRen in postsynaptischer Lokalisation gefunden worden, wo sie depolarisierende Ströme generieren. So sind nAChRen in nichtcholinergen Zellen in den autonomen Ganglien des peripheren Nervensystems an Zellkörpern und in Dendriten (Zhang et al., 1996; Ullian et al., 1997) aber auch im ZNS als α -Bgt-sensitive Rezeptoren postsynaptisch nachgewiesen worden (Zhang et al., 1996).

Da sich Acetylcholin im ZNS von Insekten als hauptsächlich exzitatorischer Neurotransmitter darstellt, ist die primäre Funktion der nAChRen eher die schnelle synaptische Transmission. Jedoch wäre es durchaus denkbar, dass einige nAChR-Populationen in Insekten ähnlich den neuronalen nAChRen im ZNS der Vertebraten modulatorische Funktionen übernehmen können. In einer Arbeit von Fulton (1982) ist eine glutamaterge neuromuskuläre Synapse der Heuschrecke beschrieben, die möglicherweise präsynaptische nAChRen enthält. Außerdem konnten durch elektrophysiologische Untersuchungen an Interneuronen des Abdominal-Ganglions der Küchenschabe *Periplaneta americana* mögliche synaptische als auch extrasynaptische Lokalisationen nikotinischer Rezeptoren gezeigt werden (Callec, 1974; Callec et al., 1982), die beide α -Bgt-sensitiv sind (Harrow und Sattelle, 1983). In Arbeiten neueren Ursprungs gibt es in der Tat Hinweise, die mögliche modulatorische Funktionen von nAChRen zeigen. So sind z. B.

somatische Rezeptoren präparierter Kenyon-Zellen der Honigbiene (Goldberg et al., 1999), somatische Rezeptoren bestimmter Motoneurone der Küchenschabe (David, 1996) als auch Rezeptoren mit einer „gemischten“ nikotinisch/muskarinischen Pharmakologie dorsaler ungepaarter medialer Neurone der Küchenschabe (Grolleau et al., 1996) Ca^{2+} -durchlässig. Für das Verstehen der Funktionsweise der im ZNS von *Drosophila* gefundenen unterschiedlichen Rezeptortypen müsste die Frage nach der Lokalisation der Rezeptoren geklärt werden. Studien auf ultrastrukturellem Niveau wären dafür erforderlich.

Bemerkenswert ist ebenfalls eine noch nicht näher charakterisierte Bedeutung nAChRen in frühen Entwicklungsstadien der Fliege, bei denen verschiedene Rezeptortypen eine Rolle spielen könnten. So zeigten Baines und Bate (1998), dass Neuronen aus dem frühen Embryo (13 - 14 h) durch Acetylcholin erregt werden können, in einer Entwicklungsphase, in dem ACh noch nicht als klassischer Neurotransmitter agieren dürfte, jedoch in Zellkörpern bereits Transkripte von mindestens ARD anzutreffen sind (Hermans-Borgmeyer et al., 1989).

Die ausgeprägte Diversität neuronaler nAChRen im ZNS und PNS von Vertebraten durch den Einbau unterschiedlicher Untereinheiten in Rezeptoren ermöglicht eine Feineinstellung der physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des jeweiligen Rezeptors. So ist z. B. bekannt, dass der adulte muskuläre Rezeptor, bei dem die γ -Untereinheit durch eine ε -Untereinheit ersetzt ist, stärker Ca^{2+} -durchlässig ist und eine reduzierte Öffnungsdauer des Ionenkanals (*channel open duration*) aufweist als der embryonale Rezeptor (zusammengefasst bei Grassi und Eusebi, 1998). Zusätzlich kann die Komposition der Untereinheiten Einfluss auf metabolische Eigenschaften von nAChRen haben: so werden muskuläre nAChRen, die die ε - statt der γ -Untereinheit exprimieren, schneller degradiert (Sala et al., 1997).

Ähnliche Überlegungen lassen sich auf Insekten-Rezeptoren übertragen: auch hier könnten die verschiedenen Rezeptortypen unterschiedliche Eigenschaften, z. B. in Bezug auf Kanalkinetik oder pharmakologisches Profil, besitzen. Die *Drosophila* α -Untereinheiten ALS, $\text{D}\alpha 2$ und $\text{D}\alpha 3$ kombiniert mit der $\beta 2$ -Untereinheit des Huhns unterschieden sich hinsichtlich

ihrer Affinität gegenüber Nikotin, waren unterschiedlich mit α -Bgt blockierbar und wiesen unterschiedliche Desensitivierungseigenschaften auf (Bertrand et al., 1994; Schulz et al., 1998). Wenn die α -Untereinheiten in Kombination mit β -Untereinheiten der Ratte in Zelllinien stabil exprimiert wurden, zeigten sie unterschiedliche Affinitäten gegenüber Imidachlopid, wobei $D\alpha 3/\beta 2$ die höchste Affinität besaß (Lansdell und Millar, 2000b).

Die vollständige Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms macht es möglich, bisher unbekanntere Untereinheiten zu identifizieren. Durch das *Drosophila*-Genomprojekt sind neben den bereits in Veröffentlichungen beschriebenen Untereinheiten 4 weitere mögliche Untereinheiten in *Drosophila* gefunden worden (Littleton und Ganetzky, 2000).

Die Lokalisation dieser Untereinheiten müsste beschrieben und ihr Vorkommen in den drei vorgestellten oder weiteren bisher unbekannteren Rezeptortypen untersucht werden. *Drosophila*-Mutanten, bei denen ein oder mehrere Gene, die für nAChR-Untereinheiten kodieren deletiert sind, könnten Informationen über mögliche Funktionen dieser Rezeptoruntereinheiten oder -komplexe liefern. Zwar sind in *Drosophila* bisher keine nAChR-Mutanten beschrieben worden (U. Thomas, pers. Mitteilung), aber etablierte Methoden der *Drosophila*-Mutagenese (wie z. B. die P-Element-Mutagenese) und die Entdeckung weiterer nAChR-Gene oder eventueller Gen-Cluster bietet die Verwendung dieser technischen Möglichkeiten an.

Durch Expression der Untereinheiten in Oozyten, Zelllinien oder in neueren, eventuell geeigneteren Expressionssystemen wie z. B. den Internodalzellen der Alge *Chara corallina* (Luhning und Witzemann, 1995) könnten die einzelnen Rezeptortypen physiologisch und pharmakologisch charakterisiert werden. Die α -Untereinheiten $Mp\alpha 1$ und $Mp\alpha 2$ der Blattlaus *Myzus persicae* bilden in *Xenopus*-Oozyten im Gegensatz zu den bisher untersuchten α -Untereinheiten aus *Drosophila* homomere Kanäle (Sgard et al., 1998). In S2-Zellen assembliert die $Mp\beta 1$ -Untereinheit mit den α -Untereinheiten $Mp\alpha 1$ und $Mp\alpha 2$, nicht aber mit $Mp\alpha 3$ oder $Mp\alpha 4$ (Huang et al., 2000). Alternativ zu diesen Expressionssystemen konnte kürzlich durch *whole cell*-Ableitungen an *Drosophila*-Neuronen gezeigt werden, dass es möglich ist, Eigenschaften

der schnellen synaptischen Transmission auch *in vivo* zu beschreiben (Baines und Bate, 1998), jedoch sind diese Untersuchungen bisher nur auf embryonales Gewebe beschränkt. Eine weitere Möglichkeit, die funktionellen Eigenschaften der Transmission an zentralen Synapsen in *Drosophila* zu beschreiben, ist neben Ableitungen an Embryonen *in vivo*, die Verwendung neuronaler Zellkulturen. Sowohl embryonale (Wu et al., 1990; O'Dowd, 1995) als auch larvale (Wu et al., 1983) Neurone differenzierten in dissoziierter Zellkultur. Lee und O'Dowd (1999) charakterisierten funktionelle synaptische Verbindungen embryonaler *Drosophila*-Neuronen in Kultur als hauptsächlich cholinerg und durch nAChR-vermittelt. Vergleiche der synaptischen Ströme mutanter (z. B. durch Fehlen bestimmter nAChR-Untereinheiten oder ganzer Rezeptorsubtypen) mit Wildtyp-Fliegen könnten Schlüsse über mögliche Funktionen dieser Untereinheiten oder Rezeptorsubtypen bei der zentralen synaptischen Transmission zulassen.

Durch die relativ einfache Handhabbarkeit und die Möglichkeit, verschiedenste Methoden auf dem Gebiet der Gentechnik/Molekularbiologie, der Biochemie und Elektrophysiologie an dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* anwenden zu können, werden komplexe Mechanismen, die bei der synaptischen Transmission eine Rolle spielen, unserem Verständnis zugänglich. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Diversität nAChRen in *Drosophila* ist erstaunlich und lässt eine enorme Komplexität des cholinergen Systems in Insekten erahnen. Abgesehen von anwendungsorientierten Bezügen bei der Aufklärung wichtiger Komponenten der Transmission zentraler Synapsen bei Insekten sind Vergleiche mit den molekularen Bausteinen und Mechanismen bei Vertebraten von entscheidender Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit ist durch die Untersuchung der Quartärstruktur neuronaler nAChRen in *Drosophila* eine Grundvoraussetzung geschaffen worden, die Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen Rezeptortypen in *Drosophila* und anderer Insekten zu untersuchen und beschreiben zu können.

7 ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
α -Bgt	α -Bungarotoxin
Ak	Antikörper
ALS	alpha-like-subunit
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
ARD	nAChR protein from <i>Drosophila</i>
Boehr./Mannh.	Boehringer/Mannheim (jetzt Roche)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChAT	Cholin Acetyl-Transferase
CIP	Phosphatase aus Kälberdarm
CNBr	Cyanobromid
cpm	Zerfälle pro Minute
D α 2/SAD	<i>Drosophila</i> α -like subunit 2 second α -like subunit from <i>Drosophila</i>
D α 3	<i>Drosophila</i> α -like subunit 3
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	Diazabicyclo(2.2.2)oktan
dest	destilliert
DMP	Dimethyl-Pimelimidat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> (schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
His	Histidin(e)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IgG	Immunglobulin G

IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
L	Liter
La	Lamina
LB	Lennox L Broth Base
Lo	Lobula
Lp	Lobulaplatte
M	molar
Me	Medulla
min	Minute(n)
MS	Polymerase des MS2-Phagen
M_r	relatives Molekulargewicht
mAk	monoklonaler Antikörper
MOPS	3-N-(Morpholino)-propansulfonsäure
nAChR(en)	nikotinische(r) Acetylcholinrezeptor(en)
NGS	Ziegennormalserum
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure
Nr.	Nummer
NMS	Neuromuskuläre Synapse
OD	Optische Dichte
OL	Optischer Lobus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBT	PBS mit 0,1 – 0,3 % Triton X-100 für IHC
PEI	Polyethylenimin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
SBD	second β -subunit from <i>Drosophila</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEA	Triethanolamin

Taq	thermostabile DNA Polymerase aus <i>thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Trishydroxyaminomethan
ZNS	Zentrales Nervensystem

ZUSAMMENFASSUNG

Im ZNS (Zentralnervensystem) von Insekten ist Acetylcholin im Gegensatz zum glutamatergen System bei Vertebraten der vermutlich wichtigste exzitatorische Neurotransmitter. Nikotinsche Acetylcholinrezeptoren (nAChRen) sind im ZNS von Insekten weit verbreitet und spielen eine bedeutende Rolle bei der schnellen synaptischen Signalübertragung. In dieser Arbeit sollte die Quartärstruktur dieser Rezeptoren an Hand des Modells der Taufliege *Drosophila melanogaster* untersucht werden. Die Erkenntnisse über den Aufbau dieser Rezeptoren sind nicht nur von grundlegender Bedeutung, sondern haben auch anwendungsrelevante Bezüge z. B. bei der Entwicklung von Insektiziden. Durch immunhistochemische Studien und biochemische Methoden konnten in der vorliegenden Arbeit die Existenz von zumindest drei verschiedenen Rezeptorkomplexen bei *Drosophila* gezeigt werden. Folgende Vorarbeiten waren dafür notwendig: 1. Es wurde ein Rezeptorsolubilisat hergestellt, welches durch einen Bindungstest mit [¹²⁵I]α-Bungartoxin auf den Gehalt funktioneller nAChRen überprüft wurde. 2. Gegen die β-Untereinheit SBD (*second β-subunit from Drosophila*) wurden neue Antiseren hergestellt. 3. Verschiedene bereits vorhandene Antikörper gegen die α-Untereinheiten ALS (*α-like subunit from Drosophila*), Dα2 (*Drosophila α2-subunit*), Dα3 (*Drosophila α3-subunit*) sowie gegen die β-Untereinheit ARD (*AChR protein from Drosophila*) wurden auf ihre Untereinheiten-Spezifität getestet. Hierbei wurden auch die apparenten Molekulargewichte der einzelnen Untereinheiten bestimmt.

Durch Immunhistochemie an Gefrierschnitten adulter Fliegen und mit bereits veröffentlichten immunhistochemischen Daten konnte die Verteilung der nAChR-Untereinheiten in den optischen Loben zueinander in Beziehung gestellt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die Verteilung von SBD denen der anderen bisher untersuchten Untereinheiten, insbesondere der ALS-Untereinheit, sehr ähnlich ist. Durch Immunpräzipitations-Experimente konnte zum einen gezeigt werden, dass die α-Untereinheiten ALS und Dα2 in einem Rezeptorkomplex assemblieren und dass die β-Untereinheit SBD eine Komponente desselben Komplexes darstellt. Weiterhin wurde besonders in bestimmten Neuropilregionen (Lamina) eine Ko-Lokalisation von Dα3 und ARD beobachtet. Immunpräzipitations-Experimente bestätigten, dass Dα3 und ARD tatsächlich gemeinsame Bestandteile eines Rezeptorkomplexes sind. Aus weiteren Immunpräzipitations-Experimenten konnte außerdem gefolgert werden, dass in einem dritten Rezeptorkomplex die β-Untereinheiten SBD und ARD zusammen mit noch nicht identifizierten α-Untereinheiten vorkommen. Die vorliegende Arbeit liefert einen wichtigen Beitrag zum Verstehen der Komplexität neuronaler nikotinscher Acetylcholinrezeptoren als wesentlichen Bestandteil der synaptischen Transmission in Insekten.

- Akabas, M.H., C. Kaufmann, P. Archdeacon, and A. Karlin.** (1994). Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron*. 13:919-927.
- Albert, J.L., and C.J. Lingle.** (1993). Activation of nicotinic acetylcholine receptors on cultured *Drosophila* and other insect neurones. *J Physiol (Lond)*. 463:605-630.
- Alkondon, M., and E.X. Albuquerque.** (1994). Presence of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat olfactory bulb neurons. *Neurosci Lett*. 176:152-156.
- Alkondon, M., E.F. Pereira, C.T. Barbosa, and E.X. Albuquerque.** (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther*. 283:1396-1411.
- Anand, R., W.G. Conroy, R. Schoepfer, P. Whiting, and J. Lindstrom.** (1991). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J Biol Chem*. 266:11192-11198.
- Arias, H.R.** (1997). Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Brain Res Rev*. 25:133-191.
- Arroyo-Jimenez, M.M., J.P. Bourgeois, L.M. Marubio, A.M. Le Sourd, O.P. Ottersen, E. Rinvik, A. Fairen, and J.P. Changeux.** (1999). Ultrastructural localization of the alpha4-subunit of the neuronal acetylcholine nicotinic receptor in the rat substantia nigra. *J Neurosci*. 19:6475-6487.
- Baines, R.A., and M. Bate.** (1998). Electrophysiological development of central neurons in the *Drosophila* embryo. *J Neurosci*. 18:4673-4683.

- Bannon, A.W., M.W. Decker, M.W. Holladay, P. Curzon, D. Donnelly-Roberts, P.S. Puttfarcken, R.S. Bitner, A. Diaz, A.H. Dickenson, R.D. Porsolt, M. Williams, and S.P. Arneric.** (1998). Broad-spectrum, non-opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Science*. 279:77-81.
- Battaglioli, E., C. Gotti, S. Terzano, A. Flora, F. Clementi, and D. Fornasari.** (1998). Expression and transcriptional regulation of the human alpha3 neuronal nicotinic receptor subunit in T lymphocyte cell lines. *J Neurochem*. 71:1261-1270.
- Baumann, A., P. Jonas, and E.D. Gundelfinger.** (1990). Sequence of D alpha 2, a novel alpha-like subunit of Drosophila nicotinic acetylcholine receptors. *Nucleic Acids Res*. 18:3640.
- Berger, F., F.H. Gage, and S. Vijayaraghavan.** (1998). Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci*. 18:6871-6881.
- Bertram, S., and H.G. Gassen.** (1991). *Gentechnische Methoden*. Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Bertrand, D., M. Ballivet, M. Gomez, S. Bertrand, B. Phannavong, and E.D. Gundelfinger.** (1994). Physiological properties of neuronal nicotinic receptors reconstituted from the vertebrate beta 2 subunit and Drosophila alpha subunits. *Eur J Neurosci*. 6:869-875.
- Blagburn, J.M., and D.B. Sattelle.** (1987). Nicotinic acetylcholine receptors on a cholinergic nerve terminal in the cockroach, *Periplaneta americana*. *J Comp Physiol [A]*. 161:215-225.

- Blumenthal, E.M., W.G. Conroy, S.J. Romano, P.D. Kassner, and D.K. Berg.** (1997). Detection of functional nicotinic receptors blocked by alpha-bungarotoxin on PC12 cells and dependence of their expression on post-translational events. *J Neurosci.* 17:6094-6104.
- Bossy, B., M. Ballivet, and P. Spierer.** (1988). Conservation of neural nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems. *Embo J.* 7:611-618.
- Boulter, J., A. O'Shea-Greenfield, R.M. Duvoisin, J.G. Connolly, E. Wada, A. Jensen, P.D. Gardner, M. Ballivet, E.S. Deneris, D. McKinnon, and et al.** (1990). Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J Biol Chem.* 265:4472-4482.
- Boyd, R.T.** (1997). The molecular biology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Toxicol.* 27:299-318.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Breer, H., and G. Jeserich.** (1981). Calcium binding sites of synaptosomes from insect nervous system as probed by trivalent terbium ions. *J Neurochem.* 37:276-282.
- Breer, H., R. Kleene, and D. Behnke.** (1984). Isolation of a putative nicotinic acetylcholine receptor from the central nervous system of *Locusta migratoria*. *Neurosci Lett.* 46:323-328.

- Breer, H., R. Kleene, and G. Hinz.** (1985). Molecular forms and subunit structure of the acetylcholine receptor in the central nervous system of insects. *J Neurosci.* 5:3386-3392.
- Breer, H., and D.B. Sattelle.** (1987). Molecular Properties And Functions Of Insect Acetylcholine Receptors. *J. Insect Physiol.* 33:771-790.
- Broide, R. S. , Robertson, R. T. and Leslie, F. M.** (1996). Regulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the developing rat somatosensory cortex by thalamocortical afferents. *J Neurosci.* 16: 2956-71
- Buchner, E., S. Buchner, G. Crawford, W.T. Mason, P.M. Salvaterra, and D.B. Sattelle.** (1986). Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 246:57-62.
- Callec, J.J.** 1974. Synaptic transmission in the central nervous system of insects. *In Insect Neurobiology.* J.E. Treherne, editor. American Elsevier, Amsterdam & New York, North Holland. 119-178.
- Callec, J.J., J.A. David, and D.B. Sattelle.** (1982). Ionophoretic application of acetylcholine on to the dendrites of an identified giant interneuron (GI1) in the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Physiol.*:1003-1008.
- Charpantier, E., P. Barneoud, P. Moser, F. Besnard, and F. Sgard.** (1998). Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport.* 9:3097-3101.
- Clarke, P.B.** (1995). Nicotinic receptors and cholinergic neurotransmission in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 757:73-83.

- Claudio, T., H.L. Paulson, W.N. Green, A.F. Ross, D.S. Hartman, and D. Hayden.** (1989). Fibroblasts transfected with Torpedo acetylcholine receptor beta-, gamma-, and delta-subunit cDNAs express functional receptors when infected with a retroviral alpha recombinant. *J Cell Biol.* 108:2277-2290.
- Clementi F., F.D., Gotti C.** 2000. Neuronal Nicotinic Receptors. *In Handbook of Experimental Pharmacology.* Vol. 144. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Conroy, W.G., A.B. Vernallis, and D.K. Berg.** (1992). The alpha 5 gene product assembles with multiple acetylcholine receptor subunits to form distinctive receptor subtypes in brain. *Neuron.* 9:679-691.
- Conroy, W.G., and D.K. Berg.** (1995). Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *J Biol Chem.* 270:4424-4431.
- Cooper, E., S. Couturier, and M. Ballivet.** (1991). Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature.* 350:235-238.
- Corriveau, R.A., S.J. Romano, W.G. Conroy, L. Oliva, and D.K. Berg.** (1995). Expression of neuronal acetylcholine receptor genes in vertebrate skeletal muscle during development. *J Neurosci.* 15:1372-1383.
- Court, J., D. Spurden, S. Lloyd, I. McKeith, C. Ballard, N. Cairns, R. Kerwin, R. Perry, and E. Perry.** (1999). Neuronal nicotinic receptors in dementia with Lewy bodies and schizophrenia: alpha-bungarotoxin and nicotine binding in the thalamus. *J Neurochem.* 73:1590-1597.

- Couturier, S., D. Bertrand, J.M. Matter, M.C. Hernandez, S. Bertrand, N. Millar, S. Valera, T. Barkas, and M. Ballivet.** (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron*. 5:847-856.
- David, J.** (1996). Modulation of Ca²⁺ and K⁺ conductances in an identified insect neurone by the activation of an alpha-bungarotoxin-resistant cholinergic receptor. *J Exp Biol*. 199:1921-1930.
- Deneris, E.S., J. Connolly, S.W. Rogers, and R. Duvoisin.** (1991). Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 12:34-40.
- Devillers-Thiery, A., J. Giraudat, M. Bentaboulet, and J.P. Changeux.** (1983). Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80:2067-2071.
- Drisdell, R.C., and W.N. Green.** (2000). Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers. *J Neurosci*. 20:133-139.
- Dudai, Y., and A. Amsterdam.** (1977). Nicotinic receptors in the brain of *Drosophila melanogaster* demonstrated by autoradiography with [125I]alpha-bungarotoxin. *Brain Res*. 130:551-555.
- Dudai, Y.** (1977). Demonstration of an alpha-bungarotoxin-binding nicotinic receptor in flies. *FEBS Lett*. 76:211-213.

- Dudai, Y.** (1978). Properties of an alpha-bungarotoxin-binding cholinergic nicotinic receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta*. 539:505-517.
- Eldefrawi, A.T., and R.D. O'Brien.** (1970). Binding of muscarone by extracts of housefly brain: relationship to receptor for acetylcholine. *J. Neurochem.* 17:1287-1293.
- Eldefrawi, M.E., A.T. Eldefrawi, and R.D. O'Brien.** (1971). Binding of five cholinergic ligands to housefly brain and *Torpedo* electroplax. Relationship to acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 7:104-110.
- Elgoyhen, A.B., D.S. Johnson, J. Boulter, D.E. Vetter, and S. Heinemann.** (1994). Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell.* 79:705-715.
- Filbin, M.T., G.G. Lunt, and J.F. Donnellan.** (1983). Partial purification and characterisation of an acetylcholine receptor with nicotinic properties from the supraoesophageal ganglion of the locust (*Schistocerca gregaria*). *Eur J Biochem.* 132:151-156.
- Fischbach K. F. und Dittrich A.** (1989). The optic lobe of *Drosophila melanogaster*: I. A Golgi analysis of wild-type structure. *Cell Tissue Res.* 25: 441-475
- Fischer, U., S. Reinhardt, E.X. Albuquerque, and A. Maelicke.** (1999). Expression of functional alpha7 nicotinic acetylcholine receptor during mammalian muscle development and denervation. *Eur J Neurosci.* 11:2856-2864.

- Flores, C.M., S.W. Rogers, L.A. Pabreza, B.B. Wolfe, and K.J. Kellar.** (1992). A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol.* 41:31-37.
- Forsayeth, J.R., and E. Kobrin.** (1997). Formation of oligomers containing the beta3 and beta4 subunits of the rat nicotinic receptor. *J Neurosci.* 17:1531-1538.
- Fucile, S., B. Barabino, E. Palma, F. Grassi, C. Limatola, A.M. Mileo, S. Alema, M. Ballivet, and F. Eusebi.** (1997). Alpha 5 subunit forms functional alpha 3 beta 4 alpha 5 nAChRs in transfected human cells. *Neuroreport.* 8:2433-2436.
- Fucile, S., J.M. Matter, L. Erkman, D. Ragozzino, B. Barabino, F. Grassi, S. Alema, M. Ballivet, and F. Eusebi.** (1998). The neuronal alpha6 subunit forms functional heteromeric acetylcholine receptors in human transfected cells. *Eur J Neurosci.* 10:172-178.
- Fulton, B.P.** (1982). Presynaptic acetylcholine receptors at the excitatory amino acid synapse in locust muscle. *Neuroscience.* 7:2117-2124.
- Gerschenfeld, H.M.** (1973). Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol Rev.* 53:1-119.
- Goldberg, F., B. Grunewald, H. Rosenboom, and R. Menzel.** (1999). Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kkenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Aapis mellifera*. *J Physiol (Lond).* 514:759-768.

- Gotti, C., W. Hanke, K. Maury, M. Moretti, M. Ballivet, F. Clementi, and D. Bertrand.** (1994). Pharmacology and biophysical properties of alpha 7 and alpha 7-alpha 8 alpha-bungarotoxin receptor subtypes immunopurified from the chick optic lobe. *Eur J Neurosci.* 6:1281-1291.
- Gotti, C., M. Moretti, R. Maggi, R. Longhi, W. Hanke, N. Klinke, and F. Clementi.** (1997). Alpha7 and alpha8 nicotinic receptor subtypes immunopurified from chick retina have different immunological, pharmacological and functional properties. *Eur J Neurosci.* 9:1201-1211.
- Göldner, F.M., K.T. Dineley, and J.W. Patrick.** (1997). Immunohistochemical localization of the nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha6 to dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport.* 8:2739-2742.
- Grady, S.R., M.J. Marks, and A.C. Collins.** (1994). Desensitization of nicotine-stimulated [3H]dopamine release from mouse striatal synaptosomes. *J Neurochem.* 62:1390-1398.
- Grassi, F., and F. Eusebi.** (1998). Functional Changes Of Fetal Muscle Acetylcholine Receptor During Mouse Development. *News Physiol. Sci.* 13:247-251.
- Grolleau, F., B. Lapied, S.D. Buckingham, W.T. Mason, and D.B. Sattelle.** (1996). Nicotine increases $[Ca^{2+}]_i$ and regulates electrical activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons) via an acetylcholine receptor with 'mixed' nicotinic-muscarinic pharmacology. *Neurosci Lett.* 220:142-146.
- Guan, Z.Z., X. Zhang, K. Blennow, and A. Nordberg.** (1999). Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport.* 10:1779-1782.

- Gundelfinger, E.D.** (1992). How complex is the nicotinic receptor system of insects? *TINS*. 15:206-211.
- Gundelfinger, E.D., and N. Hess.** (1992). Nicotinic acetylcholine receptors of the central nervous system of *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta*. 1137:299-308.
- Gundelfinger, E.D., and R. Schulz.** (2000). Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors: Genes, Structure, Physiological and Pharmacological Properties. *In Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. Vol. 144. F. Clementi, D. Fornasari, and C. Gotti, editors. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 497-521.
- Harrow, I.D., and D.B. Sattelle.** (1983). Acetylcholine receptors on the cell body membrane of giant interneurone 2 in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Exp. Biol.* 105:339-350.
- Hermans-Borgmeyer, I., S. Hoffmeister, E. Sawruk, H. Betz, B. Schmitt, and E.D. Gundelfinger.** (1989). Neuronal acetylcholine receptors in *Drosophila*: mature and immature transcripts of the *ard* gene in the developing central nervous system. *Neuron*. 2:1147-1156.
- Hermsen, B., E. Stetzer, R. Thees, R. Heiermann, A. Schrattenholz, U. Ebbinghaus, A. Kretschmer, C. Methfessel, S. Reinhardt, and A. Maelicke.** (1998). Neuronal nicotinic receptors in the locust *Locusta migratoria*. Cloning and expression. *J Biol Chem*. 273:18394-18404.
- Hockfield, S., S. Carlson, C. Evans, P. Levitt, J. Pintar, L. Silberstein.** (1993). Selected Methods for Antibody and Nucleic Probes. CSHL Press.

- Huang, Y., M.S. Williamson, A.L. Devonshire, J.D. Windass, S.J. Lansdell, and N.S. Millar.** (1999). Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *J Neurochem.* 73:380-389.
- Huang, Y., M.S. Williamson, A.L. Devonshire, J.D. Windass, S.J. Lansdell, and N.S. Millar.** (2000). Cloning, heterologous expression and co-assembly of Mpbeta1, a nicotinic acetylcholine receptor subunit from the aphid *Myzus persicae*. *Neurosci Lett.* 284:116-120.
- Hucho, F., V.I. Tsetlin, J. Machold.** (1996). The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Biochem.* 239:539-557
- Hulme, E.C.** (1990). Purification of nicotinic acetylcholine receptors. *In Receptor biochemistry.* D. Rickwood and B.D. Hames, editors. IRL Press, Oxford University. 163 - 176.
- Jewess, P.J., B.S. Clark, and J.F. Donnelan.** (1975). Isolation of a housefly head protein fraction that exhibits high affinity binding of cholinergic ligands. *Croat. Chem. Acta.* 47:459-464.
- Jonas, P., A. Baumann, B. Merz, and E.D. Gundelfinger.** (1990). Structure and developmental expression of the D alpha 2 gene encoding a novel nicotinic acetylcholine receptor protein of *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* 269:264-268.
- Jonas, P.E., B. Phannavong, R. Schuster, C. Schroder, and E.D. Gundelfinger.** (1994). Expression of the ligand-binding nicotinic acetylcholine receptor subunit D alpha 2 in the *Drosophila* central nervous system. *J Neurobiol.* 25:1494-1508.

- Kurien, B.T., and R.H. Scofield.** (1998). Long-term wet storage of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels in polyethylene bags. *Anal Biochem.* 261:116-118.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lane, N.J., L.S. Swales, J.A. David, and D.B. Sattelle.** (1982). Differential accessibility to two insect neurones does not account for differences in sensitivity to alpha-bungarotoxin. *Tissue Cell.* 14:489-500.
- Lansdell, S.J., and N.S. Millar.** (2000). Cloning and heterologous expression of Dalpha4, a Drosophila neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology.* 39:2604-2614.
- Lapied, B., H. Le Corrionc, and B. Hue.** (1990). Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res.* 533:132-136.
- Lee, D., and D.K. O'Dowd.** (1999). Fast excitatory synaptic transmission mediated by nicotinic acetylcholine receptors in Drosophila neurons. *J Neurosci.* 19:5311-5321.
- Lees, G., Beadle, D. J. and Botham, R. P.** (1983). Cholinergic receptors on cultured neurones from the central nervous system of embryonic cockroaches. *Brain Res.* 288: 49-59
- Leech, C.A., and D.B. Sattelle.** (1993). Acetylcholine receptor/channel molecules of insects. *Comp Mol/Neurobiol.* ed. Y.Pichon 63:81-97.

- Lena, C., and J.P. Changeux.** (1998). Allosteric nicotinic receptors, human pathologies. *J Physiol Paris*. 92:63-74.
- Littleton, J.T., and B. Ganetzky.** (2000). Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron*. 26:35-43.
- Luhning, H., and V. Witzemann.** (1995). Internodal cells of the giant green alga *Chara* as an expression system for ion channels. *FEBS Lett*. 361:65-69.
- Lummis, S.C., and D.B. Sattelle.** (1985). Binding of N-[propionyl-³H]propionylated alpha-bungarotoxin and L- [benzyl-4,4'-³H]quinuclidinyl benzilate to CNS extracts of the cockroach *Periplaneta americana*. *Comp Biochem Physiol C*. 80:75-83.
- Macallan, D.R., G.G. Lunt, S. Wonnacott, K.L. Swanson, H. Rapoport, and E.X. Albuquerque.** (1988). Methyllycaconitine and (+)-anatoxin-a differentiate between nicotinic receptors in vertebrate and invertebrate nervous systems. *FEBS Lett*. 226:357-363.
- Mansour, N.A., M.E. Elderfrawi, and A.T. Eldefrawi.** (1977). Isolation of putative acetylcholine receptor proteins from housefly brain. *Biochemistry*. 16:4126-4132.
- Marks, M.J., K.W. Smith, and A.C. Collins.** (1998). Differential agonist inhibition identifies multiple epibatidine binding sites in mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 285:377-386.
- Marshall, J., M.G. Darlison, G.G. Lunt, and E.A. Barnard.** (1988). Cloning of putative nicotinic acetylcholine receptor genes from the locust. *Biochem Soc Trans*. 16:463-465.

- Marshall, J., S.D. Buckingham, R. Shingai, G.G. Lunt, M.W. Goosey, M.G. Darlison, D.B. Sattelle, and E.A. Barnard.** (1990). Sequence and functional expression of a single alpha subunit of an insect nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J.* 9:4391-4398.
- Martin-Ruiz, C.M., J.A. Court, E. Molnar, M. Lee, C. Gotti, A. Mamalaki, T. Tsouloufis, S. Tzartos, C. Ballard, R.H. Perry, and E.K. Perry.** (1999). Alpha4 but not alpha3 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 73:1635-1640.
- Marubio, L.M., M. del Mar Arroyo-Jimenez, M. Cordero-Erausquin, C. Lena, N. Le Novere, A. de Kerchove d'Exaerde, M. Huchet, M.I. Damaj, and J.P. Changeux.** (1999). Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature.* 398:805-810.
- McQuarrie, C., P.M. Salvaterra, A. De Blas, J. Routes, and H.R. Mahler.** (1976). Studies on nicotinic acetylcholine receptors in mammalian brain. Preliminary characterization of membrane-bound alpha-bungarotoxin receptors in rat cerebral cortex. *J Biol Chem.* 251:6335-6339.
- Messi, M.L., M. Renganathan, E. Grigorenko, and O. Delbono.** (1997). Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor promotes survival of spinal cord motoneurons. *FEBS Lett.* 411:32-38.
- Mihovilovic, M., and A.D. Roses.** (1993a). Expression of alpha-3, alpha-5, and beta-4 neuronal acetylcholine receptor subunit transcripts in normal and myasthenia gravis thymus. Identification of thymocytes expressing the alpha-3 transcripts. *J Immunol.* 151:6517-6524.

- Mihovilovic, M., C. Hulette, J. Mittelstaedt, C. Austin, and A.D. Roses.** (1993b). Nicotinic neuronal acetylcholine receptor alpha-3 subunit transcription in normal and myasthenic thymus. *Ann N Y Acad Sci.* 681:83-96.
- Moffat, A.S.** (1993). New chemicals seek to outwit insect pests. *Science.* 261:550-551.
- Narahashi, T.** (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol.* 79:1-14.
- Nef, P., C. Oneyser, C. Alliod, S. Couturier, and M. Ballivet.** (1988). Genes expressed in the brain define three distinct neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Embo J.* 7:595-601.
- Noda, M., H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, S. Kikuyotani, T. Hirose, M. Asai, H. Takashima, S. Inayama, T. Miyata, and S. Numa.** (1983). Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature.* 301:251-255.
- O'Dowd, D.K.** (1995). Voltage-gated currents and firing properties of embryonic *Drosophila* neurons grown in a chemically defined medium. *J Neurobiol.* 27:113-126.
- O'Hara, B.F., D.M. Edgar, V.H. Cao, S.W. Wiler, H.C. Heller, T.S. Kilduff, and J.D. Miller.** (1998). Nicotine and nicotinic receptors in the circadian system. *Psychoneuroendocrinology.* 23:161-173.

- O'Hara, B.F., E. Macdonald, D. Clegg, S.W. Wiler, R. Andretic, V.H. Cao, J.D. Miller, H.C. Heller, and T.S. Kilduff.** (1999). Developmental changes in nicotinic receptor mRNAs and responses to nicotine in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Brain Res Mol Brain Res.* 66:71-82.
- Orr-Urtreger, A., F.M. Goldner, M. Saeki, I. Lorenzo, L. Goldberg, M. De Biasi, J.A. Dani, J.W. Patrick, and A.L. Beaudet.** (1997). Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci.* 17:9165-9171.
- Perry, D.C., and K.J. Kellar.** (1995). [3H]epibatidine labels nicotinic receptors in rat brain: an autoradiographic study. *J Pharmacol Exp Ther.* 275:1030-1034.
- Picciotto, M.R., M. Zoli, R. Rimondini, C. Lena, L.M. Marubio, E.M. Pich, K. Fuxe, and J.P. Changeux.** (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature.* 391:173-177.
- Popov, N., M. Schmitt, S. Schulzeck, and H. Matthies.** (1975). Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehalts in Gewebehomogenaten. *Acta biol. med. germ.* 34:1441-1446.
- Pugh, P.C., and J.F. Margiotta.** (2000). Nicotinic acetylcholine receptor agonists promote survival and reduce apoptosis of chick ciliary ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci.* 15:113-122.
- Quick, M.W., R.M. Ceballos, M. Kasten, J.M. McIntosh, and R.A. Lester.** (1999). Alpha3beta4 subunit-containing nicotinic receptors dominate function in rat medial habenula neurons. *Neuropharmacology.* 38:769-783.

- Rafferty, M.A., M.W. Hunkapiller, C.D. Strader, and L.E. Hood.** (1980). Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science*. 208:1454-1456.
- Restifo, L.L., and K. White.** (1990). Molecular and genetic approaches to neurotransmitter and neuromodulator systems in *Drosophila*. *Adv. Insect Physiol.* 22:116-219.
- Rogers, S.W., A. Mandelzys, E.S. Deneris, E. Cooper, and S. Heinemann.** (1992). The expression of nicotinic acetylcholine receptors by PC12 cells treated with NGF. *J Neurosci.* 12:4611-4623.
- Romano, S.J., R.A. Corriveau, R.I. Schwarz, and D.K. Berg.** (1997). Expression of the nicotinic receptor alpha 7 gene in tendon and periosteum during early development. *J Neurochem.* 68:640-648.
- Rudloff, E.** (1978). Acetylcholine receptors in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res.* 111:185-190.
- Sala, C., J. O'Malley, R. Xu, G. Fumagalli, and M.M. Salpeter.** (1997). Epsilon subunit-containing acetylcholine receptors in myotubes belong to the slowly degrading population. *J Neurosci.* 17:8937-8944.
- Salvaterra, P.M., and H.R. Mahler.** (1976). Nicotinic acetylcholine receptor from rat brain. Solubilization, partial purification, and characterization. *J Biol Chem.* 251:6327-6334.
- Sambrook, F., Maniatis.** (1989). *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.
- Sattelle, D.B.** (1977). Cholinergic synaptic transmission in invertebrate central nervous systems. *Biochem Soc Trans.* 5:849-852.

- Sattelle, D.B., and H. Breer.** (1985). Purification by Affinity-chromatography of a Nicotinic Acetylcholine Receptor from the CNS of the cockroach *Periplaneta Americana*. *Comp. Biochem. Physiol.* 82C:349-352.
- Sattelle, D.B.** (1988). Synaptic and extrasynaptic neuronal nicotinic receptors of insects. In *Nicotinic acetylcholine receptors in the nervous system* F. Clementi, C. Gotti, E. Sher, NATO ASI Berlin, Springer-Verlag: 241-256
- Sattelle, D.B., U. Madler, H. Heilgenberg, and H. Breer.** (1989). Immunocytochemical localization of nicotinic acetylcholine receptors in the terminal abdominal ganglion of the cockroach (*Periplaneta americana*). *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 238:189-192.
- Sawruk, E., I. Hermans-Borgmeyer, H. Betz, E.D. Gundelfinger** (1988). Characterization of an invertebrate nicotinic acetylcholine receptor gene: the ard gene of *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* 235:40-46.
- Sawruk, E., P. Schloss, H. Betz, and B. Schmitt.** (1990a). Heterogeneity of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptors: SAD, a novel developmentally regulated alpha-subunit. *Embo J.* 9:2671-2677.
- Sawruk, E., C. Udri, H. Betz, and B. Schmitt.** (1990b). SBD, a novel structural subunit of the *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor, shares its genomic localization with two alpha- subunits. *FEBS Lett.* 273:177-181.
- Schloß, P., I. Hermans-Borgmeyer, H. Betz, and E.D. Gundelfinger.** (1988). Neuronal acetylcholine receptors in *Drosophila*: the ARD protein is a component of a high-affinity alpha-bungarotoxin binding complex. *Embo J.* 7:2889-2894.

- Schloß, P.** (1989). Neuronale Acetylcholinrezeptoren in Drosophila. *Dissertation*. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät, Universität Heidelberg
- Schloß, P., H. Betz, C. Schroder, and E.D. Gundelfinger.** (1991). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in Drosophila: antibodies against an alpha-like and a non-alpha-subunit recognize the same high-affinity alpha-bungarotoxin binding complex. *J Neurochem.* 57:1556-1562.
- Schloß, P., W. Mayser, E.D. Gundelfinger, and H. Betz.** (1992). Cross-linking of 125I-alpha-bungarotoxin to Drosophila head membranes identifies a 42 kDa toxin binding polypeptide. *Neurosci Lett.* 145:63-66.
- Schmidt-Nielsen, B.K., J.I. Gepner, N.N. Teng, and L.M. Hall.** (1977). Characterization of an alpha-bungarotoxin binding component from *Drosophila melanogaster*. *J Neurochem.* 29:1013-1029.
- Schöpfer, R., P. Whiting, F. Esch, R. Blacher, S. Shimasaki, and J. Lindstrom.** (1988). cDNA clones coding for the structural subunit of a chicken brain nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron.* 1:241-248.
- Schulz, R.** (1998). Nikotinische Acetylcholinrezeptoren des Nervensystems aus *Drosophila melanogaster*: funktionelle Charakterisierung von Acetylcholin-bindenden Untereinheiten. *Dissertation*. Fakultät für Naturwissenschaften, Universität Magdeburg
- Schulz, R., E. Sawruk, C. Mulhardt, S. Bertrand, A. Baumann, B. Phannavong, H. Betz, D. Bertrand, E.D. Gundelfinger, and B. Schmitt.** (1998). D alpha3, a new functional alpha subunit of nicotinic acetylcholine receptors from Drosophila. *J Neurochem.* 71:853-862.

- Schulz, R., S. Bertrand, K. Chamaon, K.H. Smalla, E.D. Gundelfinger, and D. Bertrand.** (2000). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila*: two different types of alpha subunits coassemble within the same receptor complex. *J Neurochem.* 74:2537-2546.
- Schuster, R., B. Phannavong, C. Schroder, and E.D. Gundelfinger.** (1993). Immunohistochemical localization of a ligand-binding and a structural subunit of nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol.* 335:149-162.
- Seguela, P., J. Wadiche, K. Dineley-Miller, J.A. Dani, and J.W. Patrick.** (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci.* 13:596-604.
- Sgard, F., S.P. Fraser, M.J. Katkowska, M.B. Djamgoz, S.J. Dunbar, and J.D. Windass.** (1998). Cloning and functional characterisation of two novel nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits from the insect pest *Myzus persicae*. *J Neurochem.* 71:903-912.
- Smallman, B.N., and A. Mansingh.** (1969). The cholinergic system in insect development. *Annu Rev Entomol.* 14:387-408.
- Steinlein, O.K., J.C. Mulley, P. Propping, R.H. Wallace, H.A. Phillips, G.R. Sutherland, I.E. Scheffer, and S.F. Berkovic.** (1995). A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet.* 11:201-203.
- Strebel, K., E. Beck, K. Strohmaier, and H. Schaller.** (1986). Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J Virol.* 57:983-991.

- Tomizawa, M., B. Latli, and J.E. Casida.** (1996). Novel neonicotinoid-agarose affinity column for *Drosophila* and *Musca* nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem.* 67:1669-1676.
- Tomizawa, M., and J.E. Casida.** (1997). [125I]Azidonicotinoid photoaffinity labeling of insecticide-binding subunit of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor. *Neurosci Lett.* 237:61-64.
- Ullian, E.M., J.M. McIntosh, and P.B. Sargent.** (1997). Rapid synaptic transmission in the avian ciliary ganglion is mediated by two distinct classes of nicotinic receptors. *J Neurosci.* 17:7210-7219.
- Unwin, N.** (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol.* 229:1101-1124.
- Vailati, S., W. Hanke, A. Bejan, B. Barabino, R. Longhi, B. Balestra, M. Moretti, F. Clementi, and C. Gotti.** (1999). Functional alpha6-containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Mol Pharmacol.* 56:11-19.
- Vetter, D.E., M.C. Liberman, J. Mann, J. Barhanin, J. Boulter, M.C. Brown, J. Saffiotte-Kolman, S.F. Heinemann, and A.B. Elgoyhen.** (1999). Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron.* 23:93-103.
- Wang, H.Y., D.H. Lee, C.B. Davis, and R.P. Shank.** (2000a). Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors [In Process Citation]. *J Neurochem.* 75:1155-1161.
- Wang, H.Y., D.H. Lee, M.R. D'Andrea, P.A. Peterson, R.P. Shank, and A.B. Reitz.** (2000b). beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 275:5626-5632.

- Whiting, P., and J. Lindstrom.** (1986). Pharmacological properties of immunologically isolated neuronal nicotinic receptors. *J Neurosci.* 6:3061-3069.
- Whiting, P.J., and J.M. Lindstrom.** (1986b). Purification and characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from chick brain. *Biochemistry.* 25:2082-2093.
- Whiting, P.J., R. Liu, B.J. Morley, and J.M. Lindstrom.** (1987a). Structurally different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes purified and characterized using monoclonal antibodies. *J Neurosci.* 7:4005-4016.
- Whiting, P., R. Schoepfer, J. Lindstrom, and T. Priestley.** (1991). Structural and pharmacological characterization of the major brain nicotinic acetylcholine receptor subtype stably expressed in mouse fibroblasts. *Mol Pharmacol.* 40:463-472.
- Wilkie, G.I., P. Hutson, J.P. Sullivan, and S. Wonnacott.** (1996). Pharmacological characterization of a nicotinic autoreceptor in rat hippocampal synaptosomes. *Neurochem Res.* 21:1141-1148.
- Winteringham, F.P.** (1966). Metabolism and significance of acetylcholine in the brain of the adult housefly, *Musca domestica* L. *J Insect Physiol.* 12:909-924.
- Wu, C.F., N. Suzuki, and M.M. Poo.** (1983). Dissociated neurons from normal and mutant *Drosophila* larval central nervous system in cell culture. *J Neurosci.* 3:1888-1899.
- Wu, C.F., K. Sakai, M. Saito, and Y. Hotta.** (1990). Giant *Drosophila* neurons differentiated from cytokinesis-arrested embryonic neuroblasts. *J Neurobiol.* 21:499-507.

- Xu, W., S. Gelber, A. Orr-Urtreger, D. Armstrong, R.A. Lewis, C.N. Ou, J. Patrick, L. Role, M. De Biasi, and A.L. Beaudet.** (1999a). Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5746-5751.
- Xu, W., A. Orr-Urtreger, F. Nigro, S. Gelber, C.B. Sutcliffe, D. Armstrong, J.W. Patrick, L.W. Role, A.L. Beaudet, and M. De Biasi.** (1999b). Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the beta2 and the beta4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 19:9298-9305.
- Zhang, Z.W., J.S. Coggan, and D.K. Berg.** (1996). Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to alpha-bungarotoxin. *Neuron.* 17:1231-1240.
- Zoli, M., C. Lena, M.R. Picciotto, and J.P. Changeux.** (1998). Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. *J Neurosci.* 18:4461-4472.
- Zwart, R., M. Oortgiesen, and H.P. Vijverberg.** (1992). The nitromethylene heterocycle 1-(pyridin-3-yl-methyl)-2-nitromethylene-imidazolidine distinguishes mammalian from insect nicotinic receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 228:165-169.
- Zwart, R., D. Abraham, M. Oortgiesen, and H.P. Vijverberg.** (1994). alpha 4 beta 2 subunit combination specific pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Brain Res.* 654:312-318.