

**Untersuchungen zur Struktur und Interaktion  
funktioneller Domänen ionotroper  
Glutamatrezeptoren**

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr.rer.nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol.

Nathalie Strutz

geboren am 30.01.1971, in Göttingen

2001

Referent: PD. Dr. W.H. Müller  
Korreferent: Prof. Dr. M. Hollmann  
Tag der Promotion: 21. 12. 2000

## Inhaltsverzeichnis

### Seite

I. Abkürzungsverzeichnis.....	V
0. Abstract.....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Erregungsleitung im Zentralnervensystem.....	1
1.2. Ionenkanäle.....	2
1.3. Die Rolle der Glutamatrezeptoren.....	3
1.4. Die Glutamatrezeptoren.....	4
1.5. Die Glutamatrezeptorunterfamilien.....	10
1.5.1. Kainat (KA)-Rezeptoren.....	10
1.5.2. Kainatbindeproteine (KBP).....	12
1.6. Ziel der vorliegenden Arbeit.....	13
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Geräte.....	16
2.2. Chemikalien.....	18
2.3. Enzyme.....	20
2.4. Verbrauchsmaterial.....	20
2.5. Tiere.....	21
2.6. Vektoren und Bakterienstämme.....	22
2.7. Standardlösungen.....	23
2.7.1. Lösungen für molekularbiologische Arbeiten.....	23
2.7.1.1. DNA-Puffer.....	23
2.7.1.2. Lösungen für die "alkalische Lyse" zur Gewinnung von kleinen DNA-Mengen.....	24
2.7.1.3. Lösungen für Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	24
2.7.2. Lösungen für elektrophysiologische Methoden.....	25
2.7.3. Nährmedien.....	25
2.8. Molekularbiologische Methoden.....	26
2.8.1. Reinigung von Nukleinsäuren.....	26
2.8.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	27
2.8.3. Restriktionsverdau von DNA.....	27
2.8.4. Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.8.5. Fragmentisolierung.....	29
2.8.6. Gezielte Mutagenese durch Polymerase-Kettenreaktion.....	29

2.8.7. Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA.....	33
2.8.8. Auffüllen von überhängenden Enden mit Klenow-Fragment.....	34
2.8.9. Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
2.8.10. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien für die Transformation mit Plasmiden.....	36
2.8.11. Chemische Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA.....	37
2.8.12. Isolierung von Plasmid-DNA aus 2 ml Bakterien-Kulturen....	37
2.8.13. Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA.....	38
2.8.14. <i>In vitro</i> -Synthese von cRNA.....	39
2.8.15. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	42
2.9. Das <i>Xenopus laevis</i> Oozyten-Expressionssystem.....	43
2.9.1. Operative Entnahme der Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i> .....	44
2.9.2. Präparation der Oozyten.....	45
2.9.3. Mikroinjektion von RNA in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	47
2.10. Elektrophysiologische Messungen mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	48
2.11. Proteinbiochemische Methoden.....	52
2.11.1. Proteinisolierung aus <i>Xenopus</i> -Oozyten und spezifische Markierung von Proteinen in der Plasmamembran.....	52
2.11.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	54
2.11.3. Western Blot.....	56
2.11.4. Immunologischer Nachweis der Proteine.....	57
2.11.5. Mehrfachnutzung eines Western Blots.....	59
2.12. Zellkultur.....	59
2.12.1. Haltung von HEK 293-Zellen.....	59
2.12.2. Trypsinierung der HEK 293-Zellen.....	60
2.12.3. Transfektion von HEK 293-Zellen nach der CaPO <sub>4</sub> -Methode.....	60
2.12.4. [ <sup>3</sup> H]Kainat-Bindung an HEK 293-Zellmembranen.....	61
2.13. Erstellung der dreidimensionalen (3D) Modelle der Ligandenbindungsdomänen von GluR6 und GluR7.....	62
3. Ergebnisse.....	64
3.1. Vergleichende Struktur-Funktions-Analyse der Kainatrezeptoren GluR7 und GluR6.....	64
3.1.1. Domänenaustausch zwischen Glutamatrezeptoren.....	64

3.1.1.1.	Domänen austausch zwischen GluR6 und GluR7: Herstellung der Chimären (I).....	65
3.1.1.2.	Charakterisierung der Chimären zwischen GluR6 und GluR7 (I).....	68
3.1.1.3.	Domänen austausch zwischen GluR6 und GluR7: Herstellung der Chimären (II).....	71
3.1.1.4.	Charakterisierung der Chimären zwischen GluR6 und GluR7 (II).....	72
3.1.1.5.	Domänen austausch zwischen GluR6 und GluR7: Herstellung der Chimären (III).....	75
3.1.1.6.	Charakterisierung der Chimären zwischen GluR6 und GluR7 (III).....	75
3.1.1.7.	Untersuchung der Proteinexpression von Chimären zwischen GluR6 und GluR7 mittels Western Blot.....	77
3.1.1.8.	Erstellung von Dosis-Wirkungskurven und Ermittlung von Agonistenaffinitäten.....	78
3.1.2.	Punktmutationen in GluR6 und GluR7.....	80
3.1.3.	Koexpression von GluR7-Mutanten.....	88
3.1.4.	Koexpression von GluR6-Wildtyp mit GluR7-Chimären oder Punktmutanten.....	92
3.1.5.	GluR7-Mutanten zeigen einen signifikanten Anstieg des Verhältnisses von glutamat- und kainatinduzierten Amplituden nach Behandlung mit Concanavalin A.....	95
3.2.	Struktur-Funktionsanalyse des Kainatbindeproteins.....	97
3.2.1.	Domänen austausch zwischen KBP und GluR6.....	97
3.2.1.1.	Domänen austausch zwischen KBP und GluR6: Herstellung der Chimären.....	99
3.2.1.2.	Charakterisierung der Chimären zwischen KBP und GluR6.....	101
3.2.1.3.	Transplation der GluR6-Linkerregionen in das nicht-funktionelle Kainatbindeprotein.....	103
4.	Diskussion.....	110
4.1.	Domänentransplantationen zwischen Glutamatrezeptoren: Ein sinnvoller, erfolgversprechender Ansatz?.....	110
4.2.	Neue Erkenntnisse über die Struktur-Funktionsbeziehung der Kainatrezeptoren GluR6 und GluR7 anhand von Chimären und Punktmutanten.....	111

4.3.	Verknüpfung der Meßdaten mit einem dreidimensionalen Modell der Ligandenbindungsdomänen von GluR6 und GluR7.....	114
4.4.	Heteromere Expression: Koexpression von GluR6-Wildtyp mit GluR7-Mutanten.....	116
4.5.	Untersuchungen der Struktur-Funktionsbeziehung der Kainatbindeproteine anhand von Chimären.....	121
4.6.	Neue Erkenntnisse über die Funktion der Linkerdomänen aus Experimenten an nicht-funktionellen Kainatbindeproteinen.....	123
4.7.	Überlegungen zur physiologischen Bedeutung der nicht-funktionellen Glutamatrezeptoren, insbesondere der Kainatbindeproteine und des GluR7-Rezeptors.....	125
5.	Zusammenfassung.....	127
6.	Literaturverzeichnis.....	130

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
A	Ampère; Maßeinheit für den elektrischen Strom
Abb.	Abbildung
AMPA	a-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
[a <sup>32</sup> P]-UTP	Uridintriphosphat ( <sup>32</sup> P-markiert)
Barth's	Froschoozytenmedium nach Barth
bidest.	"bidestillata"; zweifach destilliert
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius; Einheit für Temperatur
Ca	Kalzium
cDNA	<i>complementary</i> DNA (komplementäre DNA)
Ci	Curie; Maßeinheit für radioaktive Strahlungsaktivität
cm	Zentimeter
ConA	Concanavalin A
cpm	<i>counts per minute</i> ; Maßeinheit für radioaktive Strahlung
delta1	Glutamatrezeptoruntereinheit mit unbekannter Funktion
Da	Dalton; Masseneinheit (1D ≈ Masse eines Wasserstoffatoms)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease, DNA-abbauendes Enzym
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DOM	Domoat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
g	Gramm
Glu	Glutamat
GluR1	Glutamatrezeptor 1
GluR2	Glutamatrezeptor 2
GluR3	Glutamatrezeptor 3
GluR4	Glutamatrezeptor 4
GluR5	Glutamatrezeptor 5
GluR6	Glutamatrezeptor 6
GluR7	Glutamatrezeptor 7
h	Stunde
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2- ethansulfonsäure]
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich- Peroxydase)
Hz	Hertz; Maßeinheit für die Frequenz
IgG	Immunglobulin der Klasse G
k	Kilo-; Faktor tausend für Maßeinheiten
KA	<i>kainic acid</i> (Kainat)
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KBP	Kainatbindeprotein
l	Liter
l	[Lambda], Symbol für die Wellenlänge
LB	Luria-Bertani-Nährmedium für Bakterien
M	molar; Konzentrationsangabe
m	Milli-; der tausendste Teil einer Maßeinheit



$\mu$	Mikro-; der millionste Teil einer Maßeinheit
m <sup>7</sup> GpppG	methyliertes Diguanosintriphosphat ( <i>cap</i> -analoges Nukleotid für mRNA- Transkription)
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
n	Nano-; der milliardste Teil einer Maßeinheit
n	Symbol für die Anzahl der Meßwerte
NFR	"normaler Frosch Ringer" (Amphibiensaline) (physiologische Froschsaline nach Ringer)
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NMDAR1-1a	NMDA-Rezeptor 1 (Spleißvariante 1a)
NR	NMDA-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Glutamin (Aminosäure)
QBT	Säulenäquilibrierungspuffer für Plasmid- Präparation der Firma Qiagen
QC	Säulenwaschpuffer für Plasmid-Präparation der Firma Qiagen
QF	Elutionspuffer für Säulen für Plasmid- Präparation der Firma Qiagen
rATP	Adenosin-5'-Triphosphat
rCTP	Cytosin-5'-Triphosphat
rGTP	Guanosin-5'-Triphosphat
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease, RNA-abbauendes Enzym
RNAsin	RNase-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
rUTP	Uridin-5'-triphosphat
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat

---

T1-1	polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen KBP von <i>Rana pipiens</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Elektrophorese-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung)
TBS-TR	TBS mit Triton X-100
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypoly-ethoxyethanol
U	unit (Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt; Maßeinheit für die elektrische Spannung
W	Watt; Maßeinheit für die elektrische Leistung
YT	<i>Yeasttrypton</i> (Nährmedium für Bakterien)
ZNS	Zentralnervensystem
13-2	polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen GluR6/7

## Abstract

Ionotropic glutamate receptors (GluRs) are the prevalent excitatory neurotransmitter receptors in the central nervous system of vertebrates. They can be pharmacologically classified in three distinct classes:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) receptors, kainate (KA) receptors, and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Most of these subunits have been characterized to form functional ion channels. In addition to these functional subunits, several subunits do not form functional homomeric receptors or heteromeric complexes with other subunits. It is not known what physiological function those subunits have. It is speculated that they may serve some modulatory. This study is a structure-function analysis of two of the non-functional subunits, namely GluR7 from rat and a kainate binding protein (KBP) from frog, with the aim to find clues to the non-functionality of these subunits.

Since lack of protein expression or ligand binding, as well as problems with the ion pore domains itself had previously been ruled, it was speculated that there might be a defect in the gating mechanism, i.e. the translation of ligand binding into pore opening. Domain transplantation between GluR7 and GluR6, as well as between KBP and GluR6, led to the identification of those domains that are responsible for the lack of ion channel function in GluR7 and KBP.

Although the kainate receptors GluR6 and GluR7 are 86% identical at the amino acid sequence level and belong to the same receptor subfamily, they have very different electrophysiological properties. When expressed in *Xenopus* oocytes GluR6 conducts large agonist-evoked currents whereas GluR7 lacks measurable currents. In this study the determinants which are responsible for the functional differences between GluR6 and GluR7 were localized to the extracellular loop domain L3. In addition, several GluR7 point mutants which are able to conduct currents that can be readily measured in *Xenopus* oocytes were generated.

In GluR6, glutamate- and kainate-evoked maximal currents are of the same magnitude when desensitization is inhibited with the lectin concanavalin

A. By contrast, all functional GluR7 mutants were found to have glutamate current amplitudes significantly larger than those evoked by kainate. The domain which determines the relative agonist efficacies was localized to the C-terminal half of the L3 domain of GluR7.

The data show that EC<sub>50</sub>s for glutamate (but not for kainate) in GluR7 mutants or chimeras between GluR6 and GluR7 tend to be increased in comparison to the EC<sub>50</sub>s in GluR6. The high EC<sub>50</sub> for wild type GluR7 reported in the literature appears to be linked to the S1 portion of the agonist binding domain.

Finally, the C-terminal half of the L3 domain plus the FC domain of GluR7 were determined to be responsible for the recently reported reduction of current amplitude seen when GluR7 is coexpressed with GluR6.

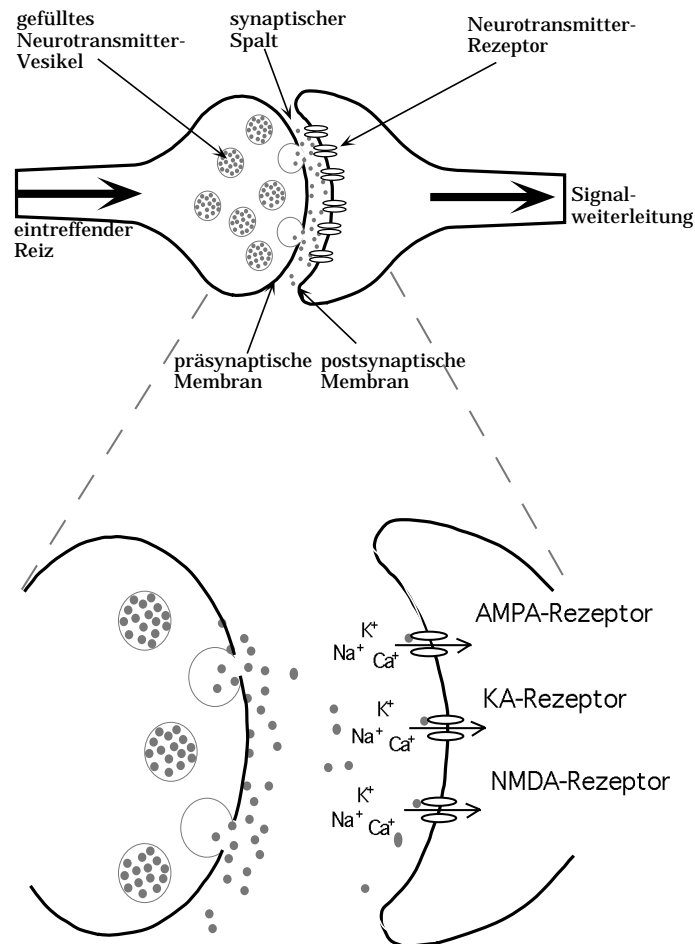
With the same domain transplantation strategy functional chimeric subunits between KBP and GluR6 were generated which could be activated by physiological concentrations of glutamate and kainate in the *Xenopus* oocyte expression system as well as in HEK 293 cells. Furthermore, the linker domains of KBP were found to be involved in gating. In particular, the linker domains A and B seem to be responsible for the lack of function of KBP as it was possible to obtain functional KBP subunits when parts of linker domains A and B were derived from GluR6.

Keywords: glutamate receptors, kainate binding proteins, kainate receptor

## 1. Einleitung

### 1.1. Erregungsleitung im Zentralnervensystem

Das Nervensystem der Wirbeltiere setzt sich aus dem Zentralnervensystem und dem peripheren Nervensystem zusammen. Das Zentralnervensystem umfaßt das Gehirn und das Rückenmark. Es gibt zwei große Zellklassen im Nervensystem: die Neuronen und Gliazellen. Die Neuronen lassen sich wiederum weiter unterteilen in sensorische Neuronen, motorische Neuronen und Interneuronen. Neuronen sind die fundamentalen Signalübertragungseinheiten des Nervensystems. Von dem Zellkörper der Neurone gehen lange Fortsätze, die Axone aus, die z.T. beträchtliche Entfernungen im Gehirn zurücklegen. Die Enden der Axone stehen mit dem nachgeschalteten Neuron über Verbindungen, die sogenannten Synapsen, in Kontakt. Das menschliche Gehirn enthält ungefähr  $10^{11}$  Neurone, die ca.  $10^{14}$  synaptische Verbindungen miteinander eingehen. Ein typisches Neuron bildet rund 1000 Synapsen und empfängt noch mehr synaptische Eingänge. Man unterscheidet die chemische von der elektrischen Synapse. Bei der chemischen Synapse sind die Neurone durch einen ca. 20-40 nm großen Spalt, den synaptischen Spalt, voneinander getrennt. Die Kommunikation zwischen beiden Zellen erfolgt durch die Ausschüttung eines Neurotransmitters durch das präsynaptische (vor dem Spalt liegende) Neuron. Das präsynaptische Neuron speichert den Neurotransmitter in Vesikeln, die nach Eintreffen eines elektrischen Signals mit der präsynaptischen Membran fusionieren und dadurch die Ausschüttung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt einleiten. Die Anlagerung der Neurotransmitter an die Rezeptoren der postsynaptischen Membran führt entweder zur Öffnung von Ionenkanälen und/oder zum Start einer sekundären Vermittlerkaskade in der postsynaptischen Nervenzelle. Die Folge beider Ereignisse ist die Bildung eines neuen elektrischen Signals, wodurch die Signalweiterleitung sichergestellt wird.



**Abb 1.1.:** Darstellung einer chemischen Synapse und der synaptischen Transmission. Nach Eintreffen eines elektrischen Signals fusionieren die mit Neurotransmitter gefüllten Vesikel mit der präsynaptischen Membran, was die Ausschüttung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt zur Folge hat. Rezeptoren an der postsynaptischen Membran werden durch die Bindung des Transmitters aktiviert. Durch die Bindung wird die Erregungsweiterleitung initiiert.

## 1.2. Ionenkanäle

Ionenkanäle in Nervenzellen leiten Ionen mit enorm hoher Geschwindigkeit durch die Zellmembran. Durch einen Kanal können bis zu 100 Millionen Ionen pro Sekunde fließen und so einen signifikanten, von Ionen getragenen Strom verursachen. Ionenkanäle zeichnen sich nicht nur durch ihre hohe Leitfähigkeit aus, sondern sie sind darüber hinaus auch selektiv für bestimmte Ionen. Der Schlüssel für die große Vielseitigkeit neuronaler Signalvermittlung ist demnach die Aktivierung verschiedener Klassen von Ionenkanälen, von denen jede für bestimmte Ionen selektiv ist. Weitere Variabilität wird durch Regulation der an neuronaler Signalleitung beteiligter Kanäle erzeugt. Kanäle können auf drei Arten

reguliert werden: durch Spannung (spannungsgesteuerte Kanäle), durch chemische Substanzen (transmitter- oder ligandengesteuerte Kanäle) und durch Druck oder Dehnung (mechanisch gesteuerte Kanäle). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Kanälen, die der zweiten Klasse, den ligandengesteuerten Kanälen, zugeordnet werden.

### 1.3. Die Rolle der Glutamatrezeptoren

Der am weitesten verbreitete exzitatorische (erregende) Neurotransmitter im Zentralnervensystem der Wirbeltiere ist die Aminosäure Glutamat. Die Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die durch Glutamat aktiviert werden. Sie stellen die Hauptmediatoren des exzitatorischen Neurotransmittersystems im Zentralnervensystem dar (Monaghan et al., 1989). Sie spielen eine entscheidene Rolle bei der synaptischen Transmission und synaptischen Plastizität, die die Veränderung der synaptischen Stärke, die auf eine Phase der Aktivität folgt, beschreibt. Es deutet einiges darauf hin, daß die synaptische Plastizität einen entscheidenden Einfluß auf Lernvorgänge hat (Collingridge und Bliss, 1987) (Collingridge und Lester, 1989; Ben-Ari et al., 1992; Bliss und Collingridge, 1993; Collingridge und Bliss, 1995). Die sog. Langzeitpotenzierung (LTP) gilt als mutmaßlicher Hauptmechanismus für das Speichern von Erlerntem im Gehirn. Die zu den Glutamatrezeptoren gehörenden NMDA-Rezeptoren spielen nachweislich eine wichtige Rolle bei diesem Prozeß. Glutamatrezeptoren werden zudem mit der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten in Zusammenhang gebracht (Choi und Rothman, 1990; Dingledine et al., 1990; Meldrum und Garthwaite, 1990; Advokat und Pellegrin, 1992; Storey et al., 1992; Appel, 1993). Beispiele dafür sind Ischämie, Rasmussen's Encephalitis, Alzheimer Krankheit, Huntington's Krankheit, Parkinson's Krankheit und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Die Toxizität entsteht meistens durch Übererregung eines Neurons. Dies ist z.B. auch bei Ischämie und Rasmussen's Encephalitis der Fall.

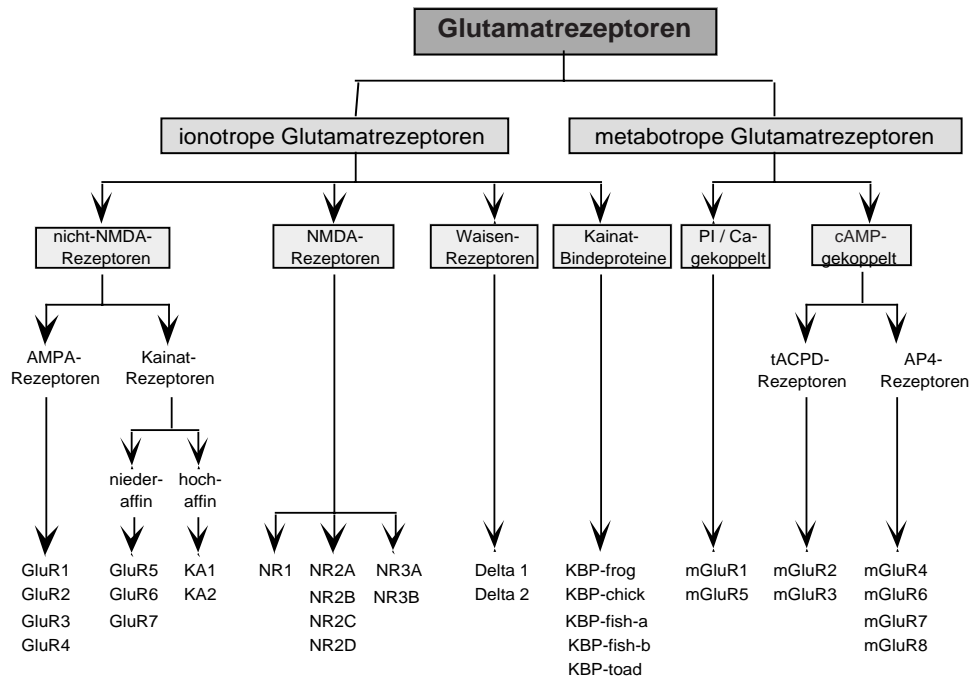
Der durch Ischämie ausgelöste neuronale Zelltod entsteht durch einen Anstieg an Glutamat während der ischämischen Periode. Der Glutamatanstieg wird durch die Kombination von gesteigerter Freisetzung und reduzierter Aufnahme verursacht. Das wiederum resultiert in einer exzessiven Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren, die den Zelltod des Neuron einleitet.

Rasmussen's Encephalitis ist eine Autoimmunerkrankung, bei der Antikörper gegen einen Glutamatrezeptor (GluR3) gebildet werden. Die Antikörper agieren als Ligand, wodurch eine dauerhafte neuronale Erregung erzeugt wird. Dadurch wird der exzitatorische Zelltod eingeleitet. Glutamat selbst ist als Nahrungsadditiv weit verbreitet. Exzessive Aufnahme von Glutamat kann zu dem bekannten China-Restaurant-Syndrom führen, das durch Kopfschmerz, Übelkeit und Schwindel charakterisiert wird. Studien an normalen Tieren haben gezeigt, daß die Aufnahme von Glutamat mit neuronalem Tod assoziiert ist, und daß neuroendokrine Zellen, die außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegen, teilweise verletzt sind. Daher bleibt der Verdacht bestehen, daß auch Neuroendokrinopathien mit Glutamat und deren Rezeptoren in Verbindung gebracht werden können.

#### **1.4. Die Glutamatrezeptoren**

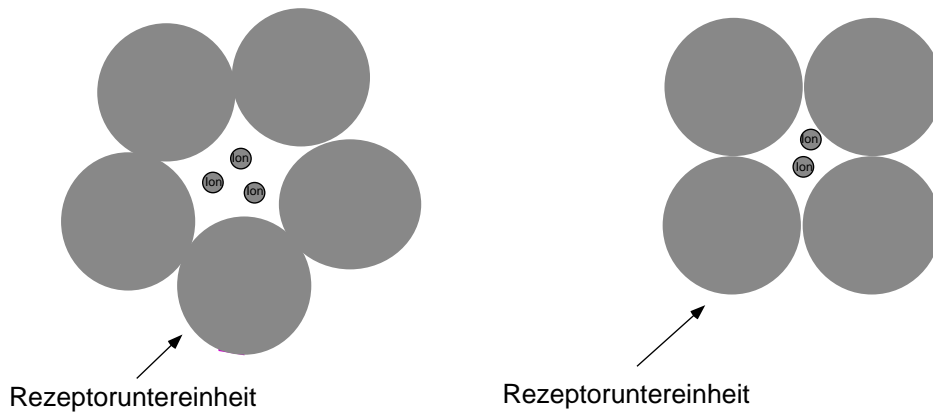
Aufgrund ihrer Struktur und ihrer Funktionsweise werden zwei Hauptklassen unterschieden. Zum einen gibt es die Klasse der ionotropen Glutamatrezeptoren, die nach der Bindung eines Liganden einen für Kationen permeablen Kanal öffnen, zum anderen die Klasse der metabotropen Glutamatrezeptoren, die intrazellulär mit G-Proteinen gekoppelt sind und nach Bindung eines Liganden eine sekundäre Signalkaskade einleiten. Die ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren sind jedoch nicht sequenzverwandt. Innerhalb dieser Hauptklassen werden auf der Basis von Sequenzhomologien, pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften sowie der gekoppelten sekundären Signalkaskade die verschiedenen Glutamatrezeptoruntereinheiten in Familien unterteilt.



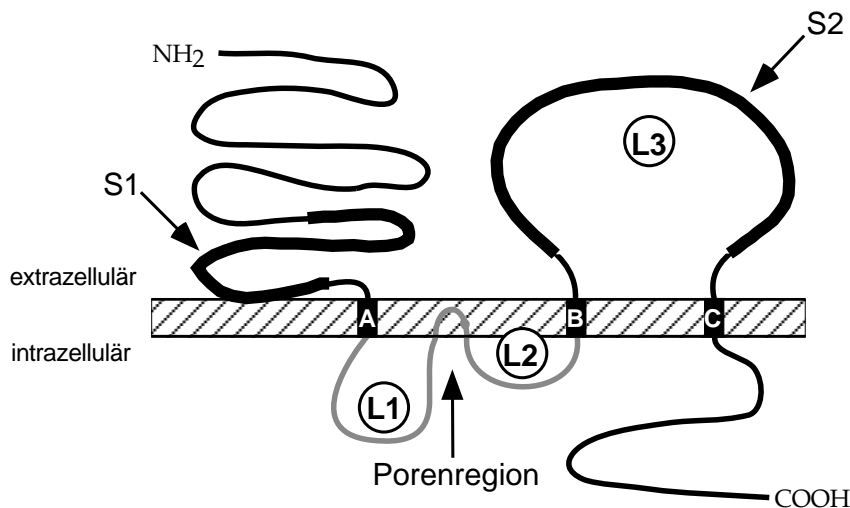


**Abb. 1.2.:** Familie der Glutamaterezeptoren. Die Klassifizierung der Glutamaterezeptoren basiert auf Sequenzhomologien, sowie pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften. Ionotrope und metabotrope Glutamaterezeptoren sind nicht sequenzverwandt.

Zur Familie der ionotropen Glutamaterezeptoren gehören Rezeptoren mit besonderer Spezifität für AMPA (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat) (Hollmann et al., 1989), Kainat (KA) (Bettler et al., 1990; Egebjerg et al., 1991) und NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) (Moriyoshi et al., 1991), Kainatbindeproteine (KBP) (Gregor et al., 1989; Wada et al., 1989; Henley, 1994; Ishimaru et al., 1996), sowie die sog. Waisenrezeptoren, die ihren Namen aufgrund ihrer bislang völlig unbekanntem Liganden erhalten haben (Yamazaki et al., 1992; Araki et al., 1993; Lomeli et al., 1993). Die AMPA- und KA-Rezeptoren werden oft als Nicht-NMDA-Rezeptoren zusammengefasst (Monaghan et al., 1989; Watkins et al., 1990). Die Waisenrezeptoren und Kainatbindeproteine wurden den ionotropen Glutamaterezeptoren aus Homologiegründen zugeordnet. Bei beiden Gruppen konnte bisher keine Ionenkanalfunktion nachgewiesen werden. Die Stöchiometrie eines Rezeptorkomplexes ist bislang unbekannt. Es gibt experimentelle Hinweise sowohl für eine tetramere als auch eine pentamere Anordnung der Untereinheiten zu einem Rezeptorkomplex.



**Abb. 1.3.:** Vermutete Stöchiometrie der Glutamaterezeptoren. Es gibt Hinweise sowohl für eine pentamere als auch für tetramere Stöchiometrie.



**Abb. 1.4.:** Topologie eines typischen ionotropen Glutamaterezeptors. Dargestellt sind der extrazelluläre N-Terminus, der intrazelluläre C-Terminus und die Transmembrandomänen (TMD) A, B und C. Die Porenregion ragt von der intrazellulären Seite in die Membran hinein und wird zu beiden Seiten hin mit den Transmembrandomänen A und B durch die Schleifen L1 und L2 verbunden. Eine große extrazelluläre Schleife (= L3-Domäne) verbindet TMDs B und C. S1 und S2 sind zwei extrazelluläre Domänen, die homolog zu bakteriellen aminosäurebindenden Proteinen sind. Die S1 Domäne ist N-terminal von Linker A lokalisiert. Die S2-Domäne reicht vom Ende des Linkers B bis Anfang des Linkers C. Als Linker A, B und C sind die verbindenden Sequenzen zwischen der S1- und S2-Domäne, sowie den Transmembrandomänen A, B und C definiert.

Nachdem der erste Glutamaterezeptor 1989 kloniert worden war (Hollmann et al., 1989), wurde zunächst eine Transmembrantopologie angenommen, wie sie bei anderen ligandenabhängigen Ionenkanälen, z.B. dem nikotinischen Azetylcholinrezeptor, dem GABA-, oder dem Glyzinrezeptor, vorkommt. Für diese Rezeptoren war bekannt, daß sie vier

Transmembrandomänen besitzen, und daß der C-Terminus und der N-Terminus extrazellulär liegen. Die Analyse von Hydrophobizitätsplots des ersten Glutamatrezeptors (GluR1) schien die vermutete Transmembrantopologie zu unterstützen. Der erste experimentelle Beweis gegen eine 4-Transmembrandomänen-Topologie wurde durch gegen den C-Terminus gerichtete Antikörper erzielt. Diese Antikörper zeigten nur Bindung nach Permeabilisierung der Zellen, was auf eine intrazelluläre Lage des C-Terminus hinweist (Petrulia und Wenthold, 1992; Craig et al., 1993; Martin et al., 1993; Molnar et al., 1993; Molnar et al., 1994). Mit der gleichen Methode konnte zudem eindeutig die extrazelluläre Lage des N-Terminus gezeigt werden. Untersuchungen des Glykosylierungsmusters von ionotropen Glutamatrezeptoren bestätigten, daß die Region zwischen den hypothetischen Transmembrandomänen 3 und 4 extrazellulär, der C-Terminus jedoch intrazellulär liegen muß (Hollmann et al., 1994; Roche et al., 1994; Taverna et al., 1994). Gestützt auf diese Daten entstand ein neues Topologiemodell (Hollmann et al., 1994; Wo und Oswald, 1994; Wood et al., 1995), das heute allgemein akzeptiert ist. Nach diesem Modell gibt es nur drei Transmembrandomänen A, B und C. Der N-Terminus ist extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. Die Domäne, die ursprünglich als Transmembrandomäne 2 deklariert wurde, durchquert nicht die Zellmembran, sondern ragt als Haarnadelschleife von innen in diese hinein und verläßt sie auf derselben Seite wieder. Eine derartige Struktur ist von den membranspannungsabhängigen Kaliumkanälen her bekannt. Es wird angenommen, daß diese Schleife, wie bei den Kaliumkanälen, die Ionenporenregion bildet. Für diese Annahme spricht a) die Tatsache, daß für die Ionenselektivität des Kanals kritische Aminosäuren in diesem Bereich lokalisiert worden sind (Hume et al., 1991; Dingedine et al., 1992), b) ein Transplantationsexperiment, bei dem die gesamte Porenregion eines Glutamatrezeptors (Donor) in einen anderen (Rezeptor) transplantiert worden ist, der dann wiederum die Kanaleigenschaften des Donorrezeptors aufwies (Villmann et al., 1997; Villmann, 1998; Villmann et al., 1999), c) daß die Haarnadelschleifenstruktur durch Cystein-Scanning-Mutagenese am NMDA-Rezeptor bestätigt wurde (Kuner et al., 1996) und d) daß Aminosäuresequenzhomologien zu der Porendomäne von Kaliumkanälen gefunden wurden (Wo und Oswald, 1995; Hollmann, 1996). Es gibt drei Scheifen, die die drei Transmembrandomänen mit der Porendomäne verbinden (L1, L2 und L3, Abb. 1.4.). Die große L3-Schleife liegt extrazellulär, während L1 und L2 intrazellulär lokalisiert sind. Im ursprünglichen Modell

war die N-terminale Domäne die einzige große extrazelluläre Domäne, so daß die Bindestelle für Agonisten in dieser Region vermutet wurde. Untersuchungen im Jahr 1994 widerlegten jedoch diese Annahme. Die Eigenschaften chimärer Rezeptoren, die aus dem AMPA-Rezeptor GluR3 und dem KA-Rezeptor GluR6 gebildet wurden, bewiesen, daß in Glutamatrezeptoren zwei nicht miteinander verbundene Domänen an der Bildung der Agonistenbindestelle beteiligt sind (Stern-Bach et al., 1994). Eine Domäne (S1) ist Bestandteil der N-terminalen Domäne und schließt über eine kurze Sequenz an die Transmembrandomäne A an, die andere (S2) liegt zwischen den Transmembrandomänen B und C. Stern-Bach et al. griff eine frühere Beobachtung von Nakanishi et al. (Nakanishi et al., 1990) auf und zeigte, daß zwischen den S1- und S2-Domänen der Glutamatrezeptoren und den N- und C-terminalen Hälften von bakteriellen periplasmatischen Bindeproteinen Homologie besteht (Stern-Bach et al., 1994). Diese Proteine, besonders das Glutaminbindeprotein (QBP, (Nohno et al., 1986)) und das Lysin-Arginin-Ornithin-Bindeprotein (LAOBP, (Kang et al., 1991)) zeigen beträchtliche Sequenzidentität zu Sequenzbereichen ionotroper Glutamatrezeptoren. Sie stellen ein Transportsystem mit hoher Affinität dar, das unter anderem auch Aminosäuren transportiert (Tam und Saier, 1993). Die dreidimensionale Struktur einiger dieser bakteriellen Aminosäurebindeproteine ist durch Röntgenstrukturanalysen bekannt. Seit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Ligandenbindungsdomänen eines Glutamatrezeptors (GluR2) durch Röntgenstrukturanalyse (Armstrong et al., 1998; Chen et al., 1998) ist die Ähnlichkeit beider Strukturen auch experimentell nachgewiesen. Auch funktionell bestehen Ähnlichkeiten. Analog zu der von den periplasmatischen Bindeproteinen geformten Tasche, in der die Aminosäuren gebunden werden, sind es die LAOBP-homologen Bereiche, die die Ligandenbindungsstelle in Glutamatrezeptoren ausbilden (Nakanishi et al., 1990; Stern-Bach et al., 1994; Kuusinen et al., 1995). Die Kristallisation der Ligandenbindungsdomänen von GluR2 stützte sich auf ein zuvor an anderen Rezeptoren durchgeführtes elegantes Domänen-Deletionsexperiment. In dem Experiment wurden Konstrukte gebildet, die lediglich aus den S1- und S2-Domänen von AMPA oder KA-Rezeptoren bestanden. Die S1- und S2-Domänen wurden durch hydrophile Aminosäuren direkt miteinander verbunden, so daß in den Konstrukten weder Transmembrandomänen noch die Porendomäne vorkamen. Diese Konstrukte waren lösliche Proteine mit voll funktionsfähigen Agonisten-

Bindestellen (Kuusinen et al., 1995; Arvola und Keinänen, 1996; Keinänen et al., 1997; Keinänen et al., 1998). Solch ein aus den Ligandenbindungsdomänen von GluR2 entwickeltes lösliches Konstrukt wurde mit gebundenem Kainat kristallisiert (Chen et al., 1998) und die Röntgenstruktur analysiert (Armstrong et al., 1998). Anhand dieser Struktur konnten die an der Bindung des Agonist Kainat beteiligten Aminosäuren identifiziert werden.

Das Endstück der N-terminalen Domäne weist ebenfalls hohe Homologie zu einer Klasse von bakteriellen periplasmatischen löslichen Bindeproteinen auf, den sogenannten Leucin-Isoleucin-Valin-Bindeproteinen (LIVBP, (O'Hara et al., 1993)). Dieser Bereich des N-Terminus liegt bei allen ionotropen Glutamatrezeptoren vor, mit Ausnahme der kürzeren Kainatbindeproteine, bei denen diese Region fehlt. Diese LIVBP-homologe Domäne scheint eine Gemeinsamkeit zwischen den ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren zu sein. Letztere weisen in ihrer gesamten N-terminalen Domäne Homologie zu den LIV-Bindeproteinen auf, und es scheint, daß in dieser Domäne die Glutamatbindestelle lokalisiert ist (O'Hara et al., 1993). In ionotropen Glutamatrezeptoren jedoch ist die LIVBP-homologe Domäne nicht konserviert, und es wurden bislang auch noch keine Ligandenbindungseigenschaften dieser Domäne gefunden (Stern-Bach et al., 1994). Die Funktion der Domäne ist daher noch unbekannt. Ebenfalls unbekannt sind Herkunft und Funktion des C-Terminus.

Aufgrund der Aminosäuresequenz-Homologien und funktionellen Ähnlichkeiten der ionotropen Glutamatrezeptoren zu bakteriellen periplasmatischen Bindeproteinen (im Bereich der Ligandenbindungsdomänen) und Kaliumkanälen (im Bereich der Porendomäne) wurde eine Theorie erstellt, die versucht, die evolutionäre Entwicklung der Glutamatrezeptoren zu erklären. Danach könnte man sich die Glutamatrezeptoren evolutionär als Mosaikprotein vorstellen, bei dem durch die Einlagerung einer Porendomäne (evtl. aus einem ursprünglichen Kaliumkanal) in die Ligandenbindungsdomäne eines periplasmatischen Bindeproteins der Mechanismus der Umwandlung von Bindungsenergie in Ionenkanalöffnung ermöglicht wurde.

## 1.5. Die Glutamatrezeptorunterfamilien

In Abschnitt 1.4. wurden bereits alle bisher bekannten Glutamatrezeptorunterfamilien erwähnt. In diesem Abschnitt soll näher auf diejenigen Unterfamilien eingegangen werden, die Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind.

### 1.5.1. Kainat (KA)-Rezeptoren

Die KA-Rezeptoren werden in Kainat-Rezeptoren mit geringer Kainat-Affinität und Kainat-Rezeptoren mit hoher Affinität unterteilt.

Die Kainat-Rezeptoren GluR5, GluR6 und GluR7 besitzen ca. 74-81% Aminosäuresequenzidentität untereinander. Zudem sind sie sich strukturell sehr ähnlich. Daher zählt man sie zu einer Rezeptorunterfamilie.

Zu den Kainat-Rezeptoren werden sie aufgrund ihrer im Vergleich zu anderen Glutamatrezeptorunterfamilien hohen Affinität zu KA und vergleichsweise geringen Affinität zu Glutamat gezählt. Alle drei Rezeptoren besitzen Bindestellen für Kainat, mit Affinitäten, die zwischen 60 und 95 nM liegen (Lomeli et al., 1992; Sommer et al., 1992) und wurden daher Rezeptoren mit geringer KA-Affinität genannt ("low affinity KA-receptors").

Zu den Kainat-Rezeptoren sind zudem die beiden Untereinheiten KA1 und KA2 zu zählen, die weit größere Affinitäten für KA aufweisen (KA1:  $K_D$  für KA = 4,7 nM; (Werner et al., 1991)) (KA2:  $K_D$  für KA = 15 nM; (Herb et al., 1992; Sakimura et al., 1992)). KA1 und KA2 bilden eine separate Unterfamilie (Kainat-Rezeptoren mit hoher Affinität) und zeigen 69% Aminosäure-Sequenzidentität untereinander, sowie 42-44% zu den Kainat-Rezeptoren mit geringer Affinität (GluR5-7).

Alle Kainat-Rezeptoren können in Oozyten und HEK 293-(Human Embryonic Kidney) Zellen exprimiert werden; nicht alle hingegen zeigen Ströme. GluR5 und GluR6 können durch Glutamat, Kainat, Domoat und Quisqualat, nicht aber durch AMPA oder NMDA aktiviert werden. Nach Aktivierung wird eine kationenleitende, kalziumpermeable Pore geöffnet (Egebjerg et al., 1991; Morita et al., 1992; Sakimura et al., 1992; Sommer und Seeburg, 1992). Es wurde einmal von einer schwachen Aktivierung von GluR5-2a durch AMPA, aber mit einem  $EC_{50}$  von 3 mM berichtet (Sommer et al., 1992). Für GluR7 lassen sich keine Ströme in *Xenopus*-Oozyten



messen (Bettler et al., 1992; Lomeli et al., 1992). Erst vor kurzem wurde allerdings für diese Untereinheit gezeigt, daß sie Ionenkanalfunktion in HEK-Zellen aufweist, wenn sie mit Kainat- oder Glutamat-Konzentrationen von größer als 10 mM aktiviert wird (Schiffer et al., 1997). Solch hohe Konzentrationen können in *Xenopus*-Oozyten nicht verwendet werden, da sie unspezifische Hintergrundströme verursachen, die ebenso in Kontrolloozyten gesehen werden (Hollmann, 1999). Alle meßbaren Glutamatrezeptoren zeigen in Oozyten nach Aktivierung durch Agonisten eine schnelle Desensitisierung, die es unmöglich macht, Maximalstromamplituden zu bestimmen. Für GluR6 läßt sich die Desensitisierung durch Inkubation mit Concanavalin A (ConA) vor Zugabe des Agonisten blockieren, was zu einer Potenzierung der Stromantwort um das 1000-6000fache führt (Everts et al., 1997). Für GluR7 hingegen wurde durch ConA-Behandlung eine maximale Potenzierung der Stromamplituden um das 2fache festgestellt (Schiffer et al., 1997).

KA1 und KA2 bilden keine funktionellen Ionenkanäle bei homomerer Expression, weder in Oozyten noch in Säuger-Zellen (Werner et al., 1991; Herb et al., 1992; Kamboj et al., 1992; Sakimura et al., 1992). Sie sind aber in der Lage, funktionelle Heteromerkomplexe mit GluR5 und GluR6 zu bilden.

Bis jetzt wurden KA-Rezeptoren aus Ratte (GluR5-GluR7, KA1, KA2), Maus (GluR5-7, KA), Mensch (GluR5-7, KA1, KA2) und Kröte (GluR6) kloniert. Die Sequenzidentität zwischen den Arten beträgt über 96%.

Für die KA-Rezeptoren GluR5 und GluR6, nicht jedoch für GluR7, wurde "RNAediting", ein Ediermechanismus, der zu noch größerer Rezeptor-Diversität führt, nachgewiesen. Die Edierposition Q/R befindet sich in der Porendomäne und entscheidet über elektrophysiologische Eigenschaften wie z.B. die Form der Strom-Spannungskurve und die Kalzium-Permeabilität des Rezeptors. Der Austausch einer Base in der Nukleotidsequenz (CAG - CGG) entscheidet, ob letztendlich die edierte R-Variante des Rezeptors oder die nicht edierte Q-Variante vorliegt. GluR5 und GluR6 kommen *in vivo* in beiden Varianten vor. GluR5 liegt zu 39%, GluR6 zu 75% in der edierten R-Variante vor (Sommer et al., 1991). Für GluR6 wurden zwei weitere Edierpositionen in der Transmembrandomäne A gefunden (Köhler et al., 1993). Der Ediermechanismus ist nur dann möglich, wenn eine spezifische Adenosin-RNA-Deaminase und eine Sequenz in einem Intron, die zum zentralen Bereich in der nicht-edierten Porendomäne komplementär ist, vorliegen (Higuchi et al., 1993). Da ein

Intron eine Rolle beim "RNA-editing" spielt, muß dieser Prozeß vor dem Spleißen der RNA stattfinden. Das Spleißen der RNA ist ein weiterer bei einigen Glutamatrezeptoren vorkommender Mechanismus, der zu größerer Diversität führt. Unter den KA-Rezeptoren wurden bisher lediglich für GluR5 Spleißvarianten gefunden. Die Spleißpositionen liegen hier entweder in der N- oder C-terminalen Domäne des Rezeptors. *In vivo* kommen beide, N- und C-terminale Spleißvarianten, vor (Sommer et al., 1992).

### 1.5.2. Kainatbindeproteine (KBP)

Kainatbindeproteine sind bisher ausschließlich in Nichtsäuger-Vertebraten gefunden worden. Sie besitzen 35-41% Aminosäuresequenzidentität mit AMPA- und KA-Rezeptoren und ca. 55% Identität zueinander. Bislang wurden folgende KBP-Gene gefunden: KBP-chick aus *Gallus domesticus* (Huhn) (Gregor et al., 1989), sowie aus *Anas domestica* (Ente) (Kimura et al., 1993), KBP-frog aus *Rana pipiens berlandieri* (Leopardenfrosch) (Wada et al., 1989), KBP-fish- $\alpha$  (GFKAa) und KBP-fish- $\beta$  (GFKAb) aus *Carassius auratus* (Goldfisch) (Wo und Oswald, 1994) sowie KBP-toad (auch: XenU1) aus *Xenopus laevis* (südafrikanischer Krallenfrosch) (Ishimaru et al., 1996).

Alle KBPs binden Kainat mit hoher Affinität. KBP-frog besitzt einen  $K_D$ -Wert für KA von 5,5 nM (Wada et al., 1989), während der  $K_D$ -Wert für KA für KBP-chick nur bei 560 nM liegt (Gregor et al., 1992). KBP-fish- $\alpha$ , KBP-fish- $\beta$  und KBP-toad binden KA mit hohen Affinitäten: 47 nM, 25 nM und 9,1 nM (Ishimaru et al., 1996; Wo und Oswald, 1996). Des weiteren binden sie die typischen Glutamatrezeptoragonisten Domoat, Glutamat, Quisqualat und KBP-toad zudem auch AMPA. Trotz der hohen Affinität zum Liganden KA, exprimiert keines der KBP funktionelle Ionenkanäle in homomerer Expression in *Xenopus*-Oozyten oder Säugerzellen. Die Porendomäne der KBPs ist an sich funktionell, wie anhand eines Porentransplantationsexperimentes, bei dem die Porendomänen der KBPs in einen KA-Rezeptor (GluR6) oder AMPA-Rezeptor (GluR1) transplantiert wurden, gezeigt werden konnte (Villmann et al., 1997).

Die Funktion der KBPs ist nicht bekannt. Es wird vermutet, daß die KBPs rein modulatorische Untereinheiten sind. Diese Vermutung wird durch ein Experiment gestützt, in dem KBP-toad mit einer NMDAR1-Untereinheit aus *Xenopus laevis* koexprimiert wurde. Bei dieser Koexpression entstanden funktionelle Kanäle mit einzigartigen pharmakologischen



Eigenschaften. Die heteromeren Komplexe konnten sowohl mit KA, AMPA als auch NMDA aktiviert werden, was ihnen den Namen "unitary" Glutamatrezeptoren verschafft hat. Alle agonist-aktivierten Antworten waren glyzinabhängig und konnten durch Magnesium und den nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Kanalblocker MK-801 gehemmt werden (Soloviev et al., 1996; Soloviev et al., 1998). Der strukturell größte Unterschied zwischen KBPs und den anderen ionotropen Glutamatrezeptoren ist die bei KBPs verkürzte N-terminale Domäne. Dies scheint jedoch nicht der Grund für die Nicht-Funktionalität der KBPs zu sein, wie durch ein Domänentransplantationsexperiment, bei dem der fehlende Bereich aus GluR6 entnommen und in ein KBP transplantiert wurde, gezeigt werden konnte (Villmann, 1998).

KBP(frog) wird primär neuronal exprimiert. Bislang ist er nur in einigen Neuronenpopulationen nachgewiesen worden. Erstaunlicherweise ist nur ein geringer Prozentsatz an den Synapsen lokalisiert, wo Neurotransmitterrezeptoren überwiegend anzutreffen sind (Wenthold et al., 1990). Die extrasynaptische Lokalisation, die Nicht-Funktionalität, sowie eine hohe Expressionsdichte deuten nicht auf eine typische Neurotransmitter-Rezeptor-Funktion des KBP(frog) hin. Was letztendlich die Funktion der KBPs ist, bleibt noch zu klären.

### **1.6. Ziel der vorliegenden Arbeit**

Innerhalb der ionotropen Glutamatrezeptorfamilie gibt es neben funktionellen Rezeptoren auch nicht-funktionelle Rezeptoren. Durch Expressionsstudien ist bekannt, daß nicht nur die funktionellen Rezeptoren im Gehirn exprimiert werden, sondern auch die nicht-funktionellen Rezeptoren, deren Funktion allerdings bislang gänzlich unbekannt ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, am Beispiel von zwei nicht-funktionellen Untereinheiten, GluR7 und KBP(frog), die Ursache für die Nicht-Funktionalität zu finden, um damit eine Basis zu schaffen, die Funktion dieser Untereinheiten zu verstehen. Als Ursache für Nicht-Funktionalität kommt prinzipiell Folgendes in Betracht: a) Der Rezeptor wird nicht exprimiert, b) es erfolgt keine oder zu schwache Bindung der Liganden an den Rezeptor, c) die Porendomäne ist nicht funktionell, c) es liegt eine Störung des Informationsübertragungsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Ionenkanalöffnung ("gating") vor. Die Möglichkeiten a-c kommen für die zu untersuchenden Rezeptoren nicht in

Frage, da sie durch Experimente von anderen Arbeitsgruppen, sowie der eigenen bereits eingehend untersucht wurden und als Ursache für Nicht-Funktionalität ausgeschlossen werden konnten (O'Hara et al., 1993; Stern-Bach et al., 1994; Kuusinen et al., 1995; Villmann et al., 1997; Villmann et al., 1999). Es bleibt als Möglichkeit eine Störung des gating-Mechanismus bestehen. Über den gating-Mechanismus gibt es bislang nur grobe Vorstellungen. Welche Domänen dabei eine Rolle spielen, ist nicht bekannt. Ein Austausch von Domänen zwischen nicht-funktionellen und funktionellen Rezeptoren sollte daher Hinweise bringen, welche Regionen

- a) für die Nicht-Funktionalität der zu untersuchenden Untereinheiten verantwortlich sind, und daraus folgend

- b) welche Regionen für den gating-Mechanismus eine Rolle spielen.

Um Domänen zwischen verschiedenen Untereinheiten ohne Funktionsverlust austauschen zu können, müssen die auszutauschenden Regionen deutliche Homologien aufweisen. Daß eine Ionenporendomänentransplantation innerhalb der ionotropen Glutamatrezeptorfamilie ohne Funktionsverlust möglich ist, ist bereits gezeigt worden (Villmann et al., 1997; Villmann et al., 1999). Ebenso erfolgreich war ein Austausch der S1- und S2-Domänen der Ligandenbindungsstelle zwischen GluR3 und GluR6 unter Erhalt der Funktion (Stern-Bach et al., 1994). Es sollte daher auch möglich sein, andere Domänen innerhalb der ionotropen Glutamatrezeptoren ohne Funktionsverlust auszutauschen. Im Idealfall soll durch den Domänenaustausch der nicht-funktionelle Rezeptor in einen funktionellen umgewandelt werden, so daß dieser Domäne eine Rolle im gating-Mechanismus zugeordnet werden kann. Dadurch wäre es zudem möglich, den nicht-funktionellen Rezeptor besser zu charakterisieren, und eventuell auf eine mögliche Funktion *in vivo* zu schließen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit soll der bis vor kurzem zu den nicht-funktionellen Rezeptoren gezählte KA-Rezeptor GluR7 unter Berücksichtigung der oben genannten Zielsetzung näher untersucht werden. GluR7 ist deshalb von besonderem Interesse, weil er trotz sehr hoher Aminosäuresequenzhomologie zu GluR6 sich von diesem funktionell grundlegend unterscheidet. Aufgrund der hohen Homologien beider Rezeptoren ist ein Domänenaustausch ohne dadurch verursachten Funktionsverlust wahrscheinlich.

Im zweiten Teil soll das nicht-funktionelle Kainatbindeprotein aus dem Frosch (KBP-frog (Rp)) mit der gleichen Zielsetzung untersucht werden. In

der Gruppe der Kainatbindeproteine sind alle Untereinheiten nicht-funktionell, sodaß in diesem Fall als funktioneller Austauschpartner für Domänen eine Untereinheit aus einer anderen Unterfamilie gewählt werden muß. Da die oben erwähnte Porendomänentransplantation zwischen den Kainatbindeproteinen und GluR6 erfolgreich waren (Villmann et al., 1997), wurde auch für das vorliegende Projekt GluR6 als funktioneller Austauschpartner gewählt.

Die vorliegende Arbeit soll die Basis schaffen, die Bedeutung der nicht-funktionellen Glutamatrezeptoren zu verstehen. Da die Glutamatrezeptoren im Zentralnervensystem weit verbreitet sind, und den experimentell leicht zu untersuchenden funktionellen Glutamatrezeptoren eine wichtige Rolle in der Erregungsweiterleitung zugesprochen wird, ist es wahrscheinlich, daß auch die nicht-funktionellen Glutamatrezeptoren eine wichtige Rolle spielen. Der Name "nicht-funktionell" bezieht sich dabei lediglich auf Funktionalität der Ionenkanalpore. Kanäle können aber auch regulatorische oder modulierende Eigenschaften aufweisen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Voraussetzung zu schaffen, um die Funktion dieser Kanäle in Zukunft besser untersuchen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte

Autoklav:	Varioklav, Dampfsterilisator Typ 400
Blotting-Kammer:	Hoefler TE 42
Brutschrank:	Heraeus
Elektrodenziehgerät:	L/M-3P-A, List Medical Electronic, Darmstadt
Entwicklungsmaschine:	Curix 60, AGFA-Gevaert, Leverkusen
Gelkammern:	Horizontal Mini Gel Kit, Modell #MGU-200T, CBS Scientific Co., Del Mar, CA, USA
Geltrockner:	Modell 224, Biorad, München Maxidry, Modell Nr. 041-300, Biometra, Göttingen
Heizblock:	Techne DRI-Block, Thermo Dux, Wertheim
Inkubator:	Typ: B6120, Best.Nr. 51001847, Heraeus, Karlsruhe
Magnetrührer:	MEC11, IDL, beheizbarer Magnetrührer, Cenco Instruments, Niederlande
Mikromanipulatoren:	Märzhäuser, Wetzlar
Mikroskop:	IDO3 und Stemi 2000, Zeiss, Jena
Mikrowelle:	Moulinex FM411, Köln
PCR:	PTC-100 <sup>100</sup> , MJ Research Inc., Watertown, MA, USA
Photometer:	UV-160, Shimadzu, Kyoto, Japan
pH-Meter:	pH-Meter 761, Calimatic, Knick, Berlin
Reinstwasseranlage:	Seralpur PR090 CN, Seral Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach

Schüttler:	Thermostar 5432 und 5320, Eppendorf, Hamburg VF2, VX2, VX2E, IKA-Vibrax-VXR, IKA- Combimag-MCO, Staufen i. Breisgau Lab Therm, Kühner AG, Schweiz
Folienschweißgerät:	Polystar 245 <sup>R</sup> , Rische & Herfurth GmbH, Hamburg
Schwingungsgedämpfter Tisch:	Modell Nr.: 9102-11-00, Physik Instrumente, Waldbronn Modell Nr.: 390088-01-0013, Vibralane, Kinematic Systems, USA
Spannungsquellen:	Electrophoresis Constant Power Supply (ECPS) 3000/150, Pharmacia, Uppsala, Schweden Power Pac 3000, Biorad, München
Spektrophotometer:	Shimadzu, UV-160, Corporation, Kyoto, Japan
Szintillationszähler:	TRI-CARB® 2000CA, United Technologies Packard, Frankfurt
UV-Illuminator mit Kamera, Bildschirm und Drucker:	INTAS, Göttingen
Vakuumzentrifuge:	Speed Vac SC110, Savant, Bierbeek, Belgien
Verstärker:	Turbo Tec-10CD Verstärker mit ITC 16 Platine, npi electronic GmbH, Tamm
Videodokumentations- anlage:	Video Monitor WV-BM 900, Panasonic, Cybertec CS1, Steuergerät, Cybertech Berlin, Video Copy Processor P67E, Mitsubishi
Waagen:	MC1, LC2200 S, Sartorius, Göttingen, 2004 MP, Sartorius, Göttingen
Wasserbäder:	Julabo U3, 5A, 6A, Seelbach

Western Blot-Apparatur: TE Series Transphor Electrophoresis Unit, Serva, Heidelberg  
Transphor Power Lid Modell No. TE 50x, Hoefer, San Fransisco, CA, USA

Zentrifugen: Hermle Z230M, BHG, Gosheim  
3K30, Sigma, Deisenhofen  
Sorvall® RC-5B, Du Pont Instruments  
mit Rotoren HB-4, SS-34, Bad Homburg  
Biofuge 13, Heraeus, Karlsruhe  
Model TJ-6 Centrifuge, Beckman, München  
Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg

## 2.2. Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt wurden Chemikalien von den Firmen Biomol Feinchemikalien GmbH (Hamburg), Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf), Merck (Darmstadt), Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) und Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG (Heidelberg) bezogen. Sie entsprachen dem Reinheitsgrad "p.A." oder "für die Molekularbiologie".

Für einige Arbeitsgänge wurden Komplett-Systeme ("Kits") verwendet. Die Qiagen GmbH (Hilden) lieferte das „Plasmid Midi Kit“, das "Plasmid Maxi Kit" und das "QIAquick Gel Extraction Kit".

Oligonukleotide wurden auf Bestellung von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert.

### Chemikalien für Elektrophysiologie (Rezeptorliganden):

AMPA	RBI, über Biotech Köln
Concanavalin A	Sigma, München
Domoat	RBI, über Biotech Köln
L-Glutamat	Sigma, München
Glyzin	Merck, Darmstadt
Kainat	Sigma, München

Philantotoxin 343                      Tocris Cookson, Bristol, England

Radiochemikalien:

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP                      Amersham (Braunschweig)

Antibiotika:

Ampicillin                              Sigma, München

Chloramphenicol                      Merck, Darmstadt

Gentamycinsulfat                      Sigma, München

Penicillin-G                             Sigma, München

Streptomycinsulfat                      Sigma, München

Antikörper:

Erstantikörper:

Polyklonaler Kaninchen-Antikörper T1-1 mit der Erkennungssequenz: KSPTSNSCDEVKA (C-terminale Sequenz) für KBP

Affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchen-Antikörper 13-2 mit der Erkennungssequenz: TFNDRLLPGKETMA (C-terminale Sequenz) für GluR6 und GluR7

Beide Erstantikörper wurden freundlicherweise von Dr. Bob Wenthold, NIH, Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt.

Zweitantikörper:

Peroxidase-gekoppeltes affinitätsgereinigtes Esel-anti-Kaninchen IgG:

Jackson ImmunoResearch Laboratories,  
über Dianova, Hamburg

### 2.3. Enzyme

#### Restriktionsenzyme:

Die Restriktionsverdauungen wurden mit Enzymen der Firmen New England BioLabs (Schwalbach/Taunus), Boehringer (Mannheim), Promega (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) durchgeführt.

#### RNA-Polymerase:

T7 RNA-Polymerase	Stratagene
-------------------	------------

#### DNA-Polymerasen:

Klenow-Fragment	Promega
-----------------	---------

<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega
---------------------------	---------

<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Qiagen
---------------------------	--------

<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
---------------------------	-------------------------

<i>Taq plus long</i>	Stratagene
----------------------	------------

#### DNasen:

RQ1 RNase-freie DNase I	Promega
-------------------------	---------

#### Ligase:

T4 DNA-Ligase	Promega
---------------	---------

#### Phosphatase:

alkalische Phosphatase	Promega
------------------------	---------

### 2.4. Verbrauchsmaterial

Röntgenfilme:	Fuji Medical X-ray Filme, 18x24 cm, Tokio, Japan
	Kodak X-OMAT AR, Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA

Petrischalen aus Plastik: Greiner, Frickenhausen



Petrischalen mit 4

Kompartimenten: Becton Dickinson, New Jersey, USA

Reaktionsgefäße: 1,5 ml, Biozym, Hess. Oldendorf

1,5 ml, sterile Gefäße, Biozym, Hess. Oldendorf

2,0 ml, Schraubgefäße, Sarstedt, Nümbrecht

14 ml, Polystyrol, Greiner, Frickenhausen

14 ml, Polypropylen, Greiner, Frickenhausen

50 ml, Blue Max™, konische Gefäße, Becton Dickinson, New Jersey, USA

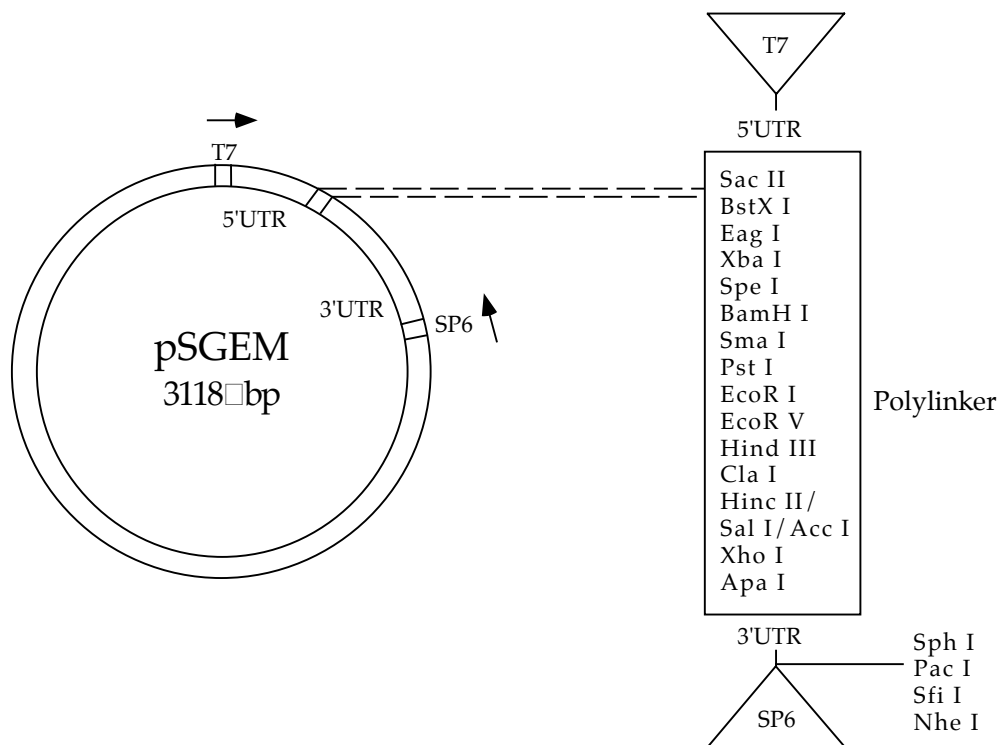
Szintillationsröhrchen: Plastik, 5 ml, Packard Frankfurt

## 2.5. Tiere

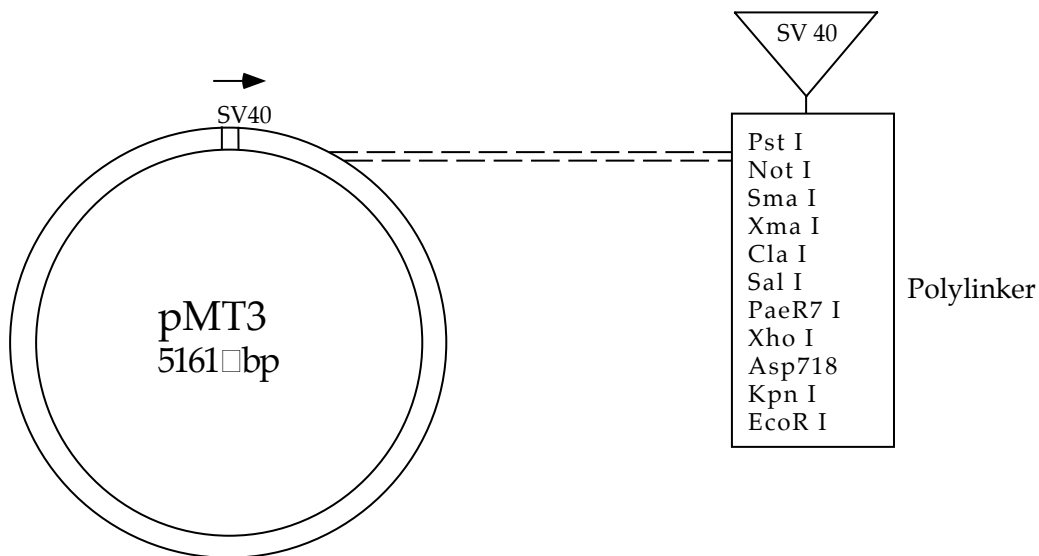
Membranständige Rezeptorproteine wurden in Oozyten des südamerikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimiert. Die weiblichen Spenderfrösche wurden von der Firma Nasco (Fort Atkinson, WI, USA) bezogen.

## 2.6. Vektoren und Bakterienstämme

Um DNA-Fragmente in Bakterien oder Zellen vermehren zu können, müssen sie in geeignete, zirkuläre DNA-Trägermoleküle (Vektoren) eingesetzt werden. Als Vektoren für Klonierungen von DNA-Fragmenten wurden die Plasmide pSGEM und pMT3 verwendet.



**Abb. 2.1.:** Der Vektor pSGEM basiert auf dem Vektor pGEM-HE (Liman et al., 1992; Villmann et al., 1997), der wiederum aus dem Vektor pGEM<sup>®</sup>3Z (Promega, Mannheim) hervorgegangen ist. Der Polylinker, welcher aus pBluescript stammt, befindet sich zwischen einem T7- (5'-Ende) und einem SP6-Promotor (3'-Ende). PSGEM besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen. Stromaufwärts vom SP6-Promotor sind vier Restriktionsschnittstellen zusätzlich eingebaut, die für die Linearisierung der Plasmid-DNA, z.B. zur *in vitro*-Transkription, benutzt werden können. 5' und 3'UTR: 5' bzw. 3'-untranslatierte Regionen des Globin-Gens des Frosches, die die Expressionseffizienz steigern.



**Abb. 2.2.:** Der Vektor pMT3 basiert auf dem Vektor pMT2. In die 'multiple cloning site' von pMT2 wurde zwischen den Restriktionsschnittstellen Pst I und EcoR I eine Oligonukleotidsequenz kloniert, die auf der 'multiple cloning site' von pBluescript (Stratagene) basiert.

In den Plasmid-Vektor pSGEM inserierte DNA-Fragmente wurden in *Escherichia coli*- Bakterien des Stammes GM 2163 (New England Biolabs) vermehrt. Dieser Stamm ist *dam*-negativ (*dam*<sup>-</sup>), d.h. er besitzt im Gegensatz zu vielen anderen keine DNA-Adenin-Methylase. Dieses Enzym transferiert eine Methylgruppe auf Adenin-Reste in der Sequenz GATC (Hattmann et al. 1978), was die Aktivität einiger Restriktionseendonukleasen hemmt, deren Erkennungssequenz von der Methylierung betroffen ist. Die Verwendung dieses *dam*<sup>-</sup>-Stammes hat den Vorteil, daß auch diese methylierungssensitiven Restriktionseendonukleasen uneingeschränkt einsetzbar sind. Das *dam*<sup>-</sup>-Gen liegt gemeinsam mit einem Resistenzgen gegen das Antibiotikum Chloramphenicol extrachromosomal auf einem Episom. Daher können sich in Gegenwart von Chloramphenicol nur *dam*<sup>-</sup>-Individuen vermehren.

## 2.7. Standardlösungen

### 2.7.1. Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

#### 2.7.1.1. DNA-Puffer

TE-Puffer: 10 mM Tris pH 7,4

1 mM EDTA

TBE-Puffer (10x): 108 g Tris  
55 g Borsäure  
40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

### 2.7.1.2. Lösungen für die "alkalische Lyse" zur Gewinnung von kleinen DNA-Mengen

Puffer 1: 25 mM Tris-HCl pH8,0  
50 mM Glukose  
10 mM EDTA

Puffer 2: 200 mM NaOH  
1% SDS

Puffer 3: 60 ml 5M Kaliumazetat  
11,5 ml Eisessig  
28,5 ml destilliertes Wasser

### 2.7.1.3. Lösungen für Midi-und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Puffer P1: 50 mM Tris-HCl pH 8,0  
10 mM EDTA  
100 µg/ml RNase A

Puffer P2: 200 mM NaOH  
1% SDS

Puffer P3: 3 M Kaliumazetat pH 5,5

QBT: 50 mM MOPS pH 7,0  
0,75 M NaCl  
15% (v/v) Isopropanol

0,15% Triton<sup>®</sup>X- 100

QC: 50 mM MOPS pH 7,0

1 M NaCl  
15% Isopropanol  
QE: 50 mM Tris-HCl pH 8,5  
1,25 M NaCl  
15% (v/v) Isopropanol

### 2.7.2. Lösungen für elektrophysiologische Methoden

NFR (Normal frog Ringer): 10 mM HEPES-NaOH pH 7,2  
115 mM NaCl  
1,8 mM CaCl<sub>2</sub>  
2,5 mM KCl  
pH 7,2

### 2.7.3. Nährmedien

LB-Medium (Luria Bertani): 10 g/l Trypton (DIFCO)  
5 g/l Hefeextrakt (DIFCO)  
5 g/l NaCl  
pH 7,2  
für LB-Agar-Platten werden 14 g/l Bacto-Agar (DIFCO) zugefügt

2xYT-Medium: 16 g/l Trypton (DIFCO)  
10 g/l Hefeextrakt (DIFCO)  
5 g/l NaCl  
pH 7,4

SOB-Medium: 20 g/l Trypton (DIFCO)  
5 g/l Hefeextrakt (DIFCO)  
0,6 g/l NaCl

0,5 g/l KCl

5  $\mu$ l/ml 1 M MgCl<sub>2</sub>

10  $\mu$ l/ml 0,5 M MgSO<sub>4</sub>

MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> erst vor Gebrauch zufügen

## 2.8. Molekularbiologische Methoden

### 2.8.1. Reinigung von Nukleinsäuren

Durch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion lassen sich Nukleinsäuren aus einem Nukleinsäure-Proteingemisch vom Protein trennen. Phenol denaturiert die Proteine, die an der Grenze zwischen der organischen und wässrigen Phase ausfallen. Isoamylalkohol soll ein Aufschäumen während der Reaktion verhindern und Chloroform führt zu einer besseren Phasentrennung. Alle Versuchsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die wässrige DNA-Probe wurde mit dem gleichen Volumen verschiedener organischer Lösungsmittel ausgeschüttelt. Nach dem Mischen der wässrigen und der organischen Phase wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 x g herbeigeführt. Anschließend wurde die organische Phase (unten) verworfen, während die wässrige Phase (oben) in ein neues Reaktionsgefäß zur weiteren Behandlung überführt wird. Die DNA wurde mit folgenden Lösungen ausgeschüttelt:

1. Phenol (Tris gesättigt)
2. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)
3. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)

In Gegenwart von Alkoholen und hohen Konzentrationen von anorganischen Salzen verlieren Nukleinsäuren ihre Hydrathülle. Die dehydratisierten Moleküle koagulieren und lassen sich durch Zentrifugation gewinnen.

DNA ist eine schwache Säure und unterliegt in wässriger Lösung einer autokatalytischen Degradierung, wenn keine puffernden Agenzien anwesend sind. Daher wird gefällte DNA, wenn sie über längere Zeit

gelagert werden soll, häufig in Pufferlösungen wie TE-Puffer aufgenommen.

Da RNA leicht von den allgegenwärtigen RNA-abbauenden Enzymen (RNasen) angegriffen wird, müssen alle für RNA-Arbeiten verwendeten Chemikalien und Lösungen so weit wie möglich RNase-frei sein. Das ddH<sub>2</sub>O wird zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC), einem starken RNase-Inhibitor versetzt (0.1%), gut geschüttelt und anschließend autoklaviert, wodurch das DEPC in H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> zerfällt, also wieder inaktiviert wird.

Es kam folgende Fällungsmethode zur Anwendung:

1. Zu einer wässrigen Lösung von Nukleinsäuren wurde 1/4 des Volumens an 10 M NH<sub>4</sub>-Acetat-Lösung und das dreifache Volumen an 100%igem Ethanol gegeben und gründlich durchgemischt. Die Fällung wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min bei 13000 x g zentrifugiert. Das weißliche Pellet wurde zur Entfernung von Salzen mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut wie oben zentrifugiert und dann ca. 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. DNA-Pellets wurden in TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O, RNA-Pellets in DEPC-behandeltem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.8.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht. Daher kann die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen photometrisch bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum liegt bei 260 nm. Da Proteine in einem ähnlichen Wellenlängenbereich absorbieren (Maximum bei 280 nm), kann man durch die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 bzw. bei 280 nm Aufschluß über die Reinheit der Nukleinsäurepräparation erhalten. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> soll möglichst nahe bei 2 liegen und 1.7 nicht unterschreiten (Delodow et al, 1993), anderenfalls liegt eine erhebliche Kontamination mit Proteinen oder Phenol vor.

### **2.8.3. Restriktionsverdau von DNA**

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-Moleküle an enzymespezifischen Erkennungssequenzen spalten. Dadurch entstehen bei bekannter Sequenz der DNA Spaltprodukte mit genau vorhersagbaren Längen und Enden. Je nach Enzymart können zwei verschiedene Enden

entstehen. "Stumpfe" (nicht überhängende) Enden erhält man, wenn beide Stränge der doppelsträngige DNA exakt an derselben Position geschnitten werden. Überhängende, sog. kohäsive Enden, entstehen dadurch, daß das Enzym die beiden Stränge um eine oder mehrere Basen versetzt schneidet. Einige Restriktionsenzyme benötigen für ihre volle Aktivität die Gegenwart von Rinder-Serumalbumin (BSA). Daher wurde standardmäßig zu jedem Restriktionsansatz BSA hinzugegeben.

Für analytische Zwecke wurde ca. 1  $\mu\text{g}$  DNA in einem Endvolumen von 10  $\mu\text{l}$  mit 1  $\mu\text{g}$  BSA-Lösung (1 mg/ml) und einem 10x Reaktionspuffer-Konzentrat (Endkonzentration 1x) versetzt. Diese Konzentrate werden von den Herstellern der Enzyme mitgeliefert und stellen die für die jeweilige Endonuklease optimalen Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration) ein. Bei präparativen Ansätzen wurde mehr DNA in einem größeren Volumen eingesetzt (bis zu 20  $\mu\text{g}$ ). Um einen vollständigen Verdau der DNA zu gewährleisten, wurde das Restriktionsenzym im Überschuß zugesetzt (ca. 5 U/ $\mu\text{g}$  DNA). Der Verdau wurde anschließend für mindestens 2 h am Temperaturoptimum der Enzyms inkubiert (meist 37°C).

Wenn DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden sollte, wurde mit beiden Enzymen gleichzeitig verdaut, sofern ihre Reaktionsbedingungen übereinstimmten. War dies nicht der Fall, so wurde die DNA nach dem Verdau mit dem ersten Enzym aus dem Ansatz gefällt, das Pellet im Reaktionspuffer des zweiten Enzyms aufgenommen und dann mit diesem verdaut.

#### **2.8.4. Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Gelelektrophorese wandern Nukleinsäure-Fragmente aufgrund ihrer negativen Nettoladung durch ihre Phosphatgruppen im elektrischen Feld zum Pluspol. Legt man an ein Agarose-Gel mit konstanter Porengröße ein elektrisches Feld an und läßt Nukleinsäure-Moleküle verschiedener Länge darin zum Pluspol wandern, so werden größere Moleküle durch das Netzwerk des Gels stärker zurückgehalten als kleinere. Je kleiner das Netzwerk (d.h. je höher die Konzentration der Agarose) ist, desto besser ist die Effektivität der Trennung von kleinen Fragmenten. In der Regel wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 0,8-3% (meist 1%) verwendet. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer vorsichtig aufgeköcht.



Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde dem Gel Ethidiumbromid, ein DNA-interkalierendes Agens, im Verhältnis 1:10000 (4  $\mu$ l auf 40 ml) zugesetzt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Vor dem Auftrag der Proben wurde zu den Ansätzen das gleiche Volumen an Auftragspuffer zugegeben. Es wurde eine Spannung von 120 mV angelegt. Die Trennstrecke wurde anhand der Position des Markerfarbstoffs Bromphenolblau kontrolliert. Auf einem UV-Illuminator wurden die aufgetrennten Fragmente durch das eingelagerte, fluoreszierende Ethidiumbromid als Banden sichtbar gemacht und fotografiert. Durch Vergleich mit den Fragmenten des Längenstandards konnte auf die Größe der DNA-Fragmente geschlossen werden. Als Längenstandards wurden der 1 kb Marker und der 100 bp Marker der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot, benutzt.

#### Auftragspuffer:

Glycerol	40% (v/v)
Bromphenolblau	0.25% (w/v)

#### **2.8.5. Fragmentisolierung**

Die Fragmentisolierungen wurden mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraktion Kits" der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Gefäß gewogen. Danach wurde das 3fache Volumen QX1 Puffer zugegeben (z.B. bei 100 mg isolierter Agarose Zugabe von 300  $\mu$ l Puffer) und für 10 min bei 50°C inkubiert. Die Lösung mit dem geschmolzenem Gel wurde auf eine Ionenaustauscher-Säule aufgetragen und für 1 min zentrifugiert, wobei die DNA auf der Säule ionisch gebunden blieb. Die durchzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule mit 750  $\mu$ l PE-Puffer gewaschen. Zur Elution der DNA wurde die Säule auf ein Eppendorfgefäß überführt, 50 $\mu$ l destilliertes Wasser auf die Säule aufgetragen und das Ganze erneut 1 min bei 10000 x g zentrifugiert, so daß sich die in Wasser gelöste DNA schließlich im Eppendorfgefäß befand.

#### **2.8.6. Gezielte Mutagenese durch Polymerase-Kettenreaktion**

Die PCR-Methode ("Polymerase chain reaction") bietet die Möglichkeit, eine enorme Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz herzustellen.

(SAIKI et al. 1985, FALOOKA und MULLIS (1987). Diese Amplifikation von DNA wird durch den wiederholten Ablauf von programmierten Zyklen erreicht, die jeweils durch drei Prozesse gekennzeichnet sind: Denaturierung, Anlagern ("annealing") spezifischer Oligonukleotide (Primer) und Elongation der Zielsequenz. Der amplifizierte Bereich wird durch Zugabe der Primer festgelegt. Die Primer sind komplementär zu Sequenzen, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren. Die Elongation wird durch eine DNA-Polymerase gewährleistet. Die Primer hybridisieren mit der vorgelegten DNA und definieren damit den Ansatzpunkt der DNA-Polymerase. Man unterscheidet "Sense"- und "Antisense"-Primer. Der "Sense"-Primer dient als Startpunkt für die Synthese des kodierenden Stranges der DNA-Vorlage, der "Antisense"-Primer initiiert die Synthese des nicht-kodierenden Stranges.

Die Denaturierung von DNA erfolgt bei sehr hohen Temperaturen von 95°C. Daher werden thermostabile DNA-Polymerasen verwendet. Es standen die Pfu-DNA-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase, bzw. TaqPlus Long-Polymerase (eine Mischung aus Pfu- und Taq-Polymerase) zur Verfügung. Diese kommerziell erhältlichen Enzyme werden aus den thermophilen Bakterien *Pyrococcus furiosus* und *Thermophilus aquaticus* gewonnen. Die Enzyme unterscheiden sich deutlich in ihrer Fehlerrate, die während der Kettenverlängerung (Elongation) auftreten kann. Die Pfu-Polymerase baut je  $7,5 \times 10^5$  Nukleotide ein falsches Nukleotid ein, während ein falscher Einbau bei der Taq-Polymerase schon etwa alle  $1,3 \times 10^5$  Nukleotide erfolgt. Daher ist die Pfu-Polymerase der Taq-Polymerase vorzuziehen. Erfahrungsgemäß arbeitet die Taq-Polymerase jedoch effizienter als die Pfu-Polymerase. In den Fällen, in denen der Einsatz der Pfu-Polymerase nicht oder nicht in ausreichender Menge zur Amplifikation der DNA geführt hat, wurde die Reaktion mit der Taq-Polymerase wiederholt. Auch die TaqPlus Long-Polymerase wurde zur Amplifikation schwieriger DNA-Fragmente eingesetzt. Abgesehen von der DNA-Polymerase hängt die Effizienz der DNA-Synthese von vielen weiteren Faktoren ab, wie z.B. "annealing"-Temperatur und Magnesium-Konzentration. Die optimale "annealing"-Temperatur für einen PCR-Ansatz richtet sich nach der Länge der Primer und kann nach folgender Formel ungefähr abgeschätzt werden:

$$T_{\text{anneal.}} = 4x (\text{Anzahl von C+G}) + 2x (\text{Anzahl von A+T})$$

Wählt man die Primer ausreichend lang, binden sie auch dann an die gewünschten Stellen der DNA, wenn einzelne ihrer Nukleotide nicht zu dieser Sequenz komplementär sind. Da diese Primer mit der DNA hybridisieren und in die entstehenden DNA-Moleküle eingebaut werden, können so gezielt im Reaktionsprodukt bestimmte Nukleotide mutiert werden. Durch eine zweite PCR wird das so veränderte DNA-Fragment in beide Richtungen bis zu Schnittstellen geeigneter Restriktionsendonukleasen verlängert. Dadurch wird das Klonieren des DNA-Fragments mit eingebauter Mutation in einen geeigneten Expressionsvektor ermöglicht.

Die Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes war wie folgt:

1 $\mu$ l	Ausgangs-DNA (100 ng/ $\mu$ l)
1 $\mu$ l	Primer 1 ("Sense"-Primer)
1 $\mu$ l	Primer 2 ("Antisense"-Primer)
2 $\mu$ l	dNTPs (10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
10 $\mu$ l	Polymerase-Puffer (10x)
1 U	DNA-Polymerase
auf 100 $\mu$ l mit destilliertem Wasser auffüllen	

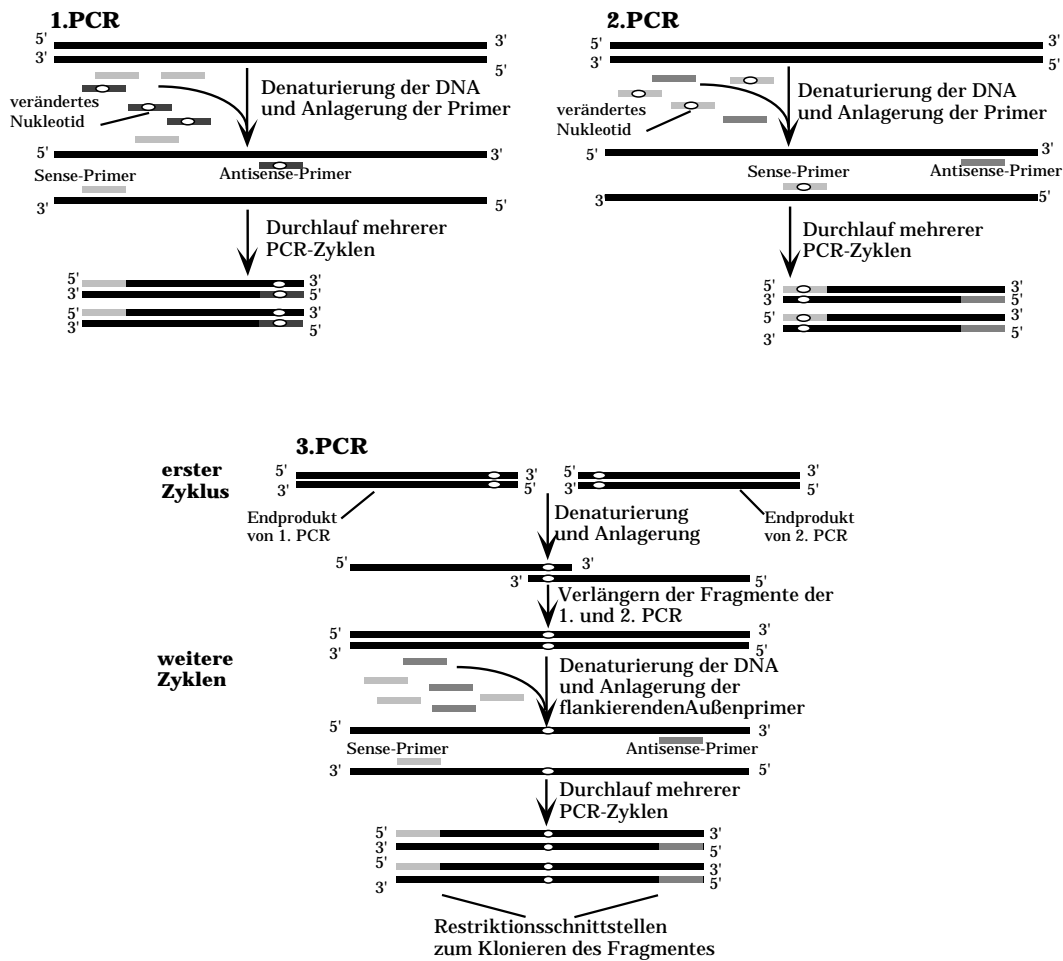
Im Rahmen dieser Arbeit kam folgende PCR-Methode zur Anwendung:

"Overlap extension reaction" (Verlängerung durch Überlappung)

Im ersten Schritt wurden zwei separate PCRs ausgeführt, in denen die gleiche Mutation in einem Fall durch den "Sense"-Primer, im anderen Fall durch den "Antisense"-Primer eingeführt wird. Die Reaktionsprodukte aus beiden PCRs überlappen im Bereich der Mutageneseprimer. In einer anschließenden dritten PCR läßt man die erhaltenen Fragmente miteinander hybridisieren, indem vor der eigentlichen PCR-Reaktion ein Zyklus mit je 5 min Denaturierung (95°C), "annealing" (50°C ) und Elongation (72°C) erfolgte. Durch Zugabe zweier äußerer, flankierender Primer am 3' und 5' Ende des in der Vorabreaktion entstandenden DNA-Fragmentes wird dieses verlängert und vervielfältigt. Das resultierende

mutierte DNA-Konstrukt diente als Ausgangsmaterial für die sich anschließende Klonierung.

1.+2. PCR	1. Zyklus	Denaturierung	95°C	5 min	
		Annealing	50°C	5 min	
		Verlängerung	72°C	5 min	
	2.-19. Zyklus	Denaturierung	95°C	1 min	
		Annealing	50°C	2 min	
		Verlängerung	72°C	5 min	
	20. Zyklus	Denaturierung	95°C	1 min	
		Annealing	50°C	2 min	
		Verlängerung	72°C	10 min	
3. PCR	1. Zyklus	Denaturierung	95°C	5 min	
		Annealing	50°C	5 min	
		Verlängerung	72°C	15 min	
	Zugabe der flankierenden Primer:				
	2.-19. Zyklus	Denaturierung	95°C	1 min	
		Annealing	50°C	2 min	
		Verlängerung	72°C	5 min	
	20. Zyklus	Denaturierung	95°C	1 min	
		Annaeling	50°C	2 min	
Verlängerung		72°C	10 min		



**Abb. 2.3.:** Schema der Mutagenese nach der "Overlap extension reaction". Die Mutation wird in zwei separaten PCR-Reaktionen sowohl in "Sense-" als auch in "Antisense-" Richtung durch "Sense-" und "Antisense-" Mutageneseprimer eingeführt. In der dritten PCR-Reaktion läßt man die Produkte beider Reaktionen in einem ersten Zyklus aneinander anlagern und durch die Polymerase verlängern. Die verlängerten Fragmente dienen in den folgenden Zyklen den Außenprimern als Vorlage. Als Produkt entsteht ein mutiertes Fragment, das zudem die für die Klonierung geeigneten Restriktionsschnittstellen enthält. Schema modifiziert nach (Everts, 1998).

### 2.8.7. Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Bei einer Ligationsreaktion wird der 5'-Phosphatrest eines Nukleotids mit der 3'-Hydroxylgruppe eines anderen Nukleotids über eine Phosphodiesterbindung verknüpft. Um zu verhindern, daß bei der Ligation eines DNA-Fragmentes (Insert) in einen Vektor die aufgeschnittenen Vektorarme wieder mit sich selbst ligieren, ohne das Insert aufgenommen zu haben, werden die 5'-Phosphatreste an den Vektorarmen zuvor dephosphoryliert. Dadurch können nur zwei der vier Kontaktstellen der doppelsträngigen Fragmente verknüpft werden, nämlich dort, wo die 5'-Phosphatreste des Inserts noch vorliegen. Es ist somit gewährleistet, daß das

Insert-Fragment in den Vektor eingeschlossen wird. Die aufgrund fehlender Phosphatreste nicht verknüpften Kontaktstellen werden nach der Transformation von bakterieneigenen Reparaturmechanismen geschlossen. Die Dephosphorylierung ist notwendig, wenn es sich um stumpfe ("blunt") Enden oder überhängende ("sticky") Enden handelt, die mit demselben Enzym erzeugt wurden. Bei Fragmenten, die sich in ihren überhängenden Enden unterscheiden, ist eine Dephosphorylierung durch Phosphatase nicht nötig, wird jedoch standardmäßig durchgeführt.

Der den linearisierten Vektor enthaltene Restriktionsansatz wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese von anderen Fragmenten getrennt und mit dem "Gel Extraction Kit" (Qiagen) aus dem Gel isoliert (siehe 2.8.5). Die eluierte Vektor-DNA wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen. Davon wurde 1  $\mu\text{l}$  entnommen und auf mit Ethidiumbromid versetzte Agarose pipettiert, auf der sich Standard-DNA-Proben in unterschiedlichen Konzentrationen befanden. Der Vergleich unter UV-Licht der Vektor-DNA mit den Standard-DNA-Proben diente zur Einschätzung der Konzentration für die anschließende Ligation. Mit der Insert-DNA wurde ebenso verfahren. Die restlichen 9  $\mu\text{l}$  der Vektor-DNA-Lösung wurden mit 1,1  $\mu\text{l}$  eines 10 x Dephosphorylierungspuffers (United States Biochemical Co.) und 1  $\mu\text{l}$  (= 1 U) alkalischer Phosphatase SAP ("shrimp alkaline phosphatase") (United States Biochemical Co.) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. SAP wurde statt der üblichen Phosphatase CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase) gewählt, da sie hitzeinaktivierbar ist. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 15 min auf 65°C erhitzt, um die Phosphatase zu inaktivieren.

Reagenzien:

10 x SAP-Puffer:	200 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>

### 2.8.8. Auffüllen von überhängenden Enden mit Klenow-Fragment

Diese Methode wird angewandt, um Fragmente, die überhängende ("sticky") Enden besitzen, aufzufüllen, so daß diese schließlich stumpfe ("blunt") Enden haben und in stumpfe Restriktionsschnittstellen kloniert

werden können. Auf diese Weise können auch unerwünschte Restriktionsschnittstellen beseitigt werden, wobei allerdings in der Regel Leserahmenverschiebungen entstehen. Die geschnittene DNA wurde im Reaktionsansatz mit 1  $\mu$ l Nukleotiden (2 mM dNTPs) und 1 U Klenow-Fragment (DNA-Polymerase) versetzt und anschließend eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Die DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) arbeitet in fast allen Puffern der Restriktionsenzyme. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ l EDTA, pH 8,0 abgestoppt. Für den Fall, daß die DNA-Polymerase nicht in dem Puffer der Restriktionsenzyme aktiv ist, kann der Restriktionsansatz mit Ethanol gefällt werden, um die Reaktion im Klenow-Fragment-Puffer ablaufen zu lassen.

### 2.8.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten ist nur möglich, wenn entweder jeweils identische Überhänge oder stumpfe Enden vorliegen. Überhängende Enden sind wesentlich effizienter ligierbar als stumpfe Enden. Die Ligationen wurden mit T4-Ligase, einer ATP-abhängigen Ligase, durchgeführt. Für Ligationen mit überhängenden Enden wurde der von der Firma mitgelieferte Optimal-Puffer verwendet. Als Energieträger für die Reaktion ist im Ansatz eine Mindestkonzentration von Ribosyl-ATP (rATP) enthalten. Die Ligation von stumpfen Enden wird durch dieses Nukleotid jedoch gehemmt. Aus diesem Grund wurde ein Puffer nach Maniatis (Sambrook et al., 1989) mit reduziertem rATP-Gehalt hergestellt. Bei der Ligation von überhängenden und stumpfen Enden wurde zunächst der Puffer für stumpfe Enden verwendet. Nach einer Übernachtinkubation des Ansatzes wurde 1  $\mu$ l 10 mM ATP zugegeben und erneut für 6-8 Stunden inkubiert. Sämtliche Ligationen wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

Ligase-Puffer ("sticky ends"):	0,5 M	Tris-HCl, pH 7,6
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	100 mM	DTT
	500 $\mu$ g/ml	Rinderserumalbumin
Ligase-Puffer ("blunt ends"):	0,66 M	Tris-HCl, pH 7,6
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	DTT



1 mg/ml	Rinderserumalbumin
10 mM	Hexaminkobaltchlorid
2 mM	ATP
5 mM	Spermidin

Für die Ligation wurde geschnittene, dephosphorylierte Vektor-DNA mit dem zu inserierenden DNA-Fragment im Stoffmengenverhältnis 1:1 gemischt. Die Gesamtmenge an DNA in einem Ligationsansatz betrug höchstens 200 ng. Zu dem Reaktionsansatz wurden weiterhin 1  $\mu$ l Ligationspuffer-Konzentrat (10x), 1 U T4 DNA-Ligase und im Falle einer Ligation von kohäsiven Enden 1  $\mu$ l rATP zugegeben. Von einem 10  $\mu$ l Ligationsansatz wurden 5  $\mu$ l direkt in die Transformation eingesetzt.

#### 2.8.10. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien für die Transformation mit Plasmiden

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde zunächst eine Stammkultur von *E. coli* GM 2163 auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert. 250 ml SOB-Medium mit 5 mg Chloramphenicol wurden mit 10-12 Kolonien in einem 2 l-Kolben angeimpft und bei 18°C bis zu einer OD von 0,45-0,6 wachsen gelassen. Nach 20-30 Stunden war diese OD erreicht. Die Kultur wurde nun 10 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 4°C und 2500 x g zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 2500 x g wurde das Pellet in 20 ml Transformationspuffer resuspendiert. Unter ständigem Schwenken wurden 1,4 ml DMSO (Endkonzentration 7%) zugegeben. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde die fertige Bakteriensuspension in 200  $\mu$ l Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C verwahrt.

Transformationspuffer:	0,45 g	PIPES
	2,25 ml	1 M CaCl <sub>2</sub>
	37,5 ml	1 M KCl
		in 100 ml Wasser lösen
		pH 6,7 mit KOH



1,63 g                       $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  zufügen,  
auf 150 ml mit Wasser  
auffüllen und sterilfiltrieren

### **2.8.11. Chemische Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA**

Als Transformation wird die Aufnahme von Fremd-DNA (z.B. Plasmid-DNA) durch Bakterien bezeichnet. Die DNA wird durch die Bakterien im Verlauf der eigenen Replikation mitvermehrt, wodurch größere Mengen von einem Plasmid produziert werden. 50  $\mu\text{l}$  chemisch kompetenter *E. coli* GM 2163-Zellen wurden in der Hand aufgetaut und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden aus dem Ligationsansatz 5  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA mit den kompetenten Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 45 s einem 42°C Hitzeschock ausgesetzt, bei dem die Aufnahme der DNA in die Bakterien erfolgt. Nach 2-minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurde der Ansatz auf 1 ml mit 2xYT-Medium aufgefüllt und bei 37°C für 45 min geschüttelt, damit sich die Bakterien regenerieren können. Für die Anzucht der Bakterien wurden antibiotikahaltige (Ampicillin 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Agarplatten verwendet. Je nach zu erwartender Effizienz der Transformation wurden 10-1000  $\mu\text{l}$  des Ansatzes auf den Agarplatten ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.8.12. Isolierung von Plamid-DNA aus 2 ml Bakterien-Kulturen**

Die Methode zur Gewinnung von kleinen DNA-Mengen ist auch als "alkalische Lyse" bekannt und wurde zuerst von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) beschrieben. Die im folgenden beschriebene Prozedur ist etwas abgewandelt. Die Methode erlaubt es, in kurzer Zeit Plasmid-DNA vieler Bakterienkolonien zu präparieren. Der Name "alkalische Lyse" beruht auf der Tatsache, daß durch Detergenzien (SDS) in Gegenwart von EDTA und Alkali bakterieneigene DNA irreversibel denaturiert, während die kleineren Plasmide ihre ursprüngliche Konformation wiedererlangen. Durch Zentrifugation kann denaturierte Bakterien-DNA von den Plasmiden getrennt werden. Es kann dann mittels gezieltem Restriktionsverdau überprüft werden, ob es sich um die richtigen Plasmide handelt. Bei dieser Methode lassen sich jedoch starke Verunreinigungen mit Proteinen und RNA nicht verhindern. Für weitere

Experimente muß daher eine andere Methode der Plasmid-Präparation, mit der sauberere DNA gewonnen wird, angewandt werden.

2xYT-Medium wurde mit 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin und 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chloramphenicol versetzt und davon je 2 ml in Kulturröhrchen pipettiert. Mit jeweils einer durch Transformation erhaltenen Kolonie wurde angeimpft. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von der Übernachtskultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min abzentrifugiert (16000 x g, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  eiskaltem Resuspensionspuffer (siehe 2.7.1.2), dem zuvor 4 mg/ml Lysozym beigelegt worden war, versetzt. Zur vollständigen Resuspension wurden die Gefäße 5 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden dem Ansatz 400  $\mu\text{l}$  Lysispuffer zugefügt, das Ganze durch Schwenken gemischt und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  Neutralisationspuffer und weiterer Inkubation auf Eis für 5 min wurden die Ansätze bei 4°C und 16000 x g für 5 min zentrifugiert. 800  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden in neue Eppendorfgefäße überführt, die Plasmid-DNA durch Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  Isopropanol gefällt und 10 min bei Zimmertemperatur stehengelassen.

### **2.8.13. Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA**

Die durch "alkalische Lyse" gewonnene DNA wurde durch Restriktionsanalyse untersucht. Wurde das gesuchte Plasmid nachgewiesen, mußte für weitere molekularbiologische Arbeiten von dieser DNA eine neue Präparation durchgeführt werden, die sowohl eine höhere Ausbeute als auch eine reinere Qualität der DNA liefert. Zur Gewinnung von DNA-Mengen bis zu 100  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurde der "Qiagen-Pack 100 Plasmid-Isolierungskit" der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Zur Gewinnung von DNA-Mengen bis zu 500  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurde von derselben Firma das "Qiagen-Pack 500 Plasmid-Isolierungskit" verwendet. In der Versuchsvorschrift unterscheiden sich beide Kits lediglich bezüglich der einzusetzenden Mengen. Im folgenden wird die Versuchsvorschrift für die Plasmid-DNA Präparation im mittleren Maßstab (bis 100  $\mu\text{g}$ ) beschrieben und abweichende Mengen- und Inkubationszeitangaben für die Präparation im großen Maßstab (bis 500  $\mu\text{g}$ ) in Klammern vermerkt. Die Reagenzien sind in 2.7.1.3 aufgeführt.

50 ml 2x YT-Medium (siehe 2.7.3.) wurden mit Ampicillin (Endkonzentration 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und Chloramphenicol (Endkonzentration 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) versetzt und mit einer Übernachtskultur oder einer Kolonie des entsprechenden Bakterienklons angeimpft. Die Kultur wurde für 12-16 h bei 37°C geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 4°C und 3500 x g sedimentiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 4 (10) ml Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 (10) ml Puffer 2 wurde die Lösung nach gründlichem Mischen für 5 (10) min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Überführung durch Abkippen der nun zähflüssigen Lösung in ein kleineres Gefäß wurden 4 (10) ml Puffer 3 hinzugefügt und das Ganze für 15 (20) min auf Eis gestellt. Danach wurden denaturierte Proteine und bakterielle DNA 30 min bei 4°C und 27000 x g abzentrifugiert. Aufschwimmende Partikel wurden mit einer Plastikspitze abgehoben und der klare Überstand auf eine Ionenaustauschersäule, die zuvor mit 4 (10) ml QBT-Puffer äquilibriert worden war, gegeben. Die Ionenaustauschersäulen wurden mit dem Kit mitgeliefert. Nach Durchlaufen der Flüssigkeit wurde die Säule 2 x mit je 10 (20) ml QC-Puffer gewaschen und anschließend die DNA mit 5 (7,5) ml QF-Puffer von der Säule eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 3,5 (5) ml Isopropanol. Das durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 15000 x g gewonnene DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-70 (100-120)  $\mu\text{l}$  TE-Puffer (siehe 2.7.1.1) aufgenommen. Die DNA-Ausbeute wurde anschließend photometrisch bestimmt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.8. 14. *In vitro*-Synthese von cRNA

cRNA wurde mit dem Ziel synthetisiert, durch Injektion der RNA in *Xenopus laevis*-Oozyten die Proteinbildung und Expression des zu untersuchenden Konstrukts zu ermöglichen. Der Vektor, in dem die cDNA inseriert ist, enthält Promotor-Regionen, die die cDNA flankieren. Die Promotoren entstammen den Bakteriophagen aus *Salmonella typhimurium* (SP6-Promotor) und *E.coli* (T7-Promotor) und werden von speziellen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen als Startsequenz für die Transkription erkannt. Der Vektor pSGEM ist bidirektional. Es ist daher möglich, bei Bedarf die inserierte cDNA in beide Richtungen zu transkribieren.

Um die cRNA vor Degradierung zu bewahren, insbesondere nach der Injektion in Oozyten, wird die RNA bei der *in-vitro* Transkription mit

$m^7$ GpppG versetzt. Dies führt zum "capping" des 5'-Endes der RNA mit einer RNase-resistenten Schutzgruppe. Die RNA wird während der Synthese mit Spuren von  $^{32}$ P-UTP markiert, um später durch Bestimmung der Einbaurate und Ausbeute die genaue RNA-Konzentration einstellen zu können. RNA ist äußerst empfindlich gegenüber RNasen, die ubiquitär vorkommen. Daher müssen alle Gefäße steril und Lösungen RNase-frei sein oder mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt werden. Dem *in-vitro* Transkriptionsansatz wird zudem RNasin (Promega, Mannheim), ein RNase-Inhibitor, zugefügt. Um den Einbau des Kappen-Nukleotids  $m^7$ GpppG zu fördern, wird die Menge an rGTP gegenüber den anderen Nukleotiden auf 25% reduziert.

Vor der Transkriptionsreaktion wurden 10-20  $\mu$ g der Matrizen-DNA in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Das Restriktionsenzym wurde unter dem Kriterium gewählt, daß es hinter dem 3'Ende des klonierten DNA-Fragmentes schneidet. Um die Restriktionsendonuklease nach 2-4 Stunden Aktivität zu zerstören, wurde der Restriktionsansatz mit 2,5  $\mu$ l Proteinase K (4  $\mu$ g/ $\mu$ l) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf 300  $\mu$ l mit TE-Puffer aufgefüllt und die Proteine mit Phenol/Chloroform extrahiert (siehe 2.8.1). 1  $\mu$ g der linearisierten DNA wurde in einem Reaktionsgefäß mit DEPC-Wasser auf 21  $\mu$ l aufgefüllt und mit folgendem Reaktionsansatz vermischt:

cDNA (1 $\mu$ g)	21 $\mu$ l	0,02 $\mu$ g/ $\mu$ l
Transkriptionspuffer (5x)	10 $\mu$ l	1x
rATP (10 mM)	4 $\mu$ l	800 $\mu$ M
rCTP (10 mM)	4 $\mu$ l	800 $\mu$ M
rUTP (10 mM)	4 $\mu$ l	800 $\mu$ M
rGTP (10 mM)	1 $\mu$ l	200 $\mu$ M
$m^7$ GpppG (10 mM)	2 $\mu$ l	400 $\mu$ M
DTT (750 mM)	2 $\mu$ l	30 mM
RNasin (36 U/ $\mu$ l)	1,4 $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l

$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP	0,1 $\mu\text{l}$	50 nM
RNA-Polymerase (50 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$	0,5 U/ $\mu\text{l}$
	Gesamtvolumen = 50 $\mu\text{l}$	

Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert. Nach den ersten 90 min Inkubation wurden erneut 0,5  $\mu\text{l}$  RNA-Polymerase hinzugegeben, um die Transkriptionsausbeute zu erhöhen. Zur Bestimmung der Nukleotid-Einbaurate wurden 2  $\mu\text{l}$  dem Ansatz entnommen und mit 18  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser verdünnt. Je 9  $\mu\text{l}$  dieser Probe wurden auf zwei DE 81 Whatman-Rundfilter pipettiert und bei Zimmertemperatur getrocknet. Die verbleibenden 2  $\mu\text{l}$  wurden für die analytische Gelelektrophorese zur Überprüfung der RNA-Qualität aufgehoben. Nachdem die Filter getrocknet waren, wurde einer der beiden Filter wie folgt gewaschen:

6 x 5 min	0,5 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
2 x 1 min	destilliertes Wasser
1 x 1 min	100%iger Ethanol

Das Waschen diente dazu, die nicht in die RNA eingebauten  $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP-Nukleotide zu entfernen. Nach Trocknung des gewaschenen Filters wurden Filter beide in einem Szintillationsgefäß mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit ("Aquasol", Du Pont) versetzt und die Radioaktivität in einem NaJ-Kristall-Szintillationszähler gemessen. Die Ausbeute an cRNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Waschwert} - \text{Leerwert cpm}}{\text{Totalwert} - \text{Leerwert cpm}} \times n \text{ nmol UTP} \times 4 \times 330 \frac{\text{ng}}{\text{nMol}} = \text{ng mRNA}$$

In einem Standardexperiment wurden 40 nmol UTP eingesetzt, demnach ist  $n=40$ .

Die verbliebenen 48  $\mu\text{l}$  wurden mit DNase-Puffer auf 300  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und nach Zugabe von 1 U RQ-DNase (Promega, Mannheim) pro  $\mu\text{g}$  DNA für 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNase baut die Matrizen-DNA ab.

DNase-Puffer:	40 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	6 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	NaCl

Die Enzyme wurden anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die Phenolextraktion von RNA unterscheidet sich von der Phenolextraktion von DNA insofern, als daß RNA nicht mit gesättigtem Phenol ausgeschüttet werden darf, da RNA in die organische Phase übergeht. Daher wurde die Extraktion 2 x mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und 1 x mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Die RNA wurde danach mit 75 µl 10 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 938 µl Ethanol gefällt und 30 min bei 4°C und 16000 x g sedimentiert. Das Pellet wurde in 300 µl DEPC-Wasser gelöst und erneut wie beschrieben gefällt. Anschließend wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Durch vorherige Bestimmung der Ausbeute wurde die getrocknete RNA in DEPC-Wasser zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/µl augenommen und bei -80°C gelagert.

#### 2.8.15. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Durch Auftrennung der RNA auf einem Agarose-Gel kann überprüft werden, ob während der *in-vitro* Transkription vorzeitiger Kettenabbruch oder Degradierung der RNA durch RNasen vorgekommen ist.

Gellösung:	1,2 g	Agarose
	10 ml	10 x MOPS-Puffer
	84,6 ml	destilliertes Wasser

Die Gellösung wurde in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Abkühlung auf ca. 40°C wurden 5,3 ml Formaldehyd (37%) zugegeben. Die Lösung wurde in eine RNase-freie Gelwanne gegossen und die Taschen zum Auftragen der Proben mit einem Kamm, der nach dem Polymerisieren entfernt wurde, ausgespart. Da Formaldehyd kanzerogen ist, wurde das Gießen unter dem Abzug durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet.



MOPS-Puffer:	200 mM	MOPS
	50 mM	Natriumazetat
	10 mM	EDTA
		pH 6,5

Die RNA-Probe (2  $\mu$ l aus Reaktionsansatz siehe 2.8.14) wurde mit 8  $\mu$ l RNA-Auftragspuffer versetzt und 15 min bei 65°C erhitzt.

RNA-Auftragspuffer:	7,2 ml	Formamid
	1,6 ml	10 x MOPS-Puffer
	2,6 ml	Formaldehyd (37%)
	2,6 ml	DEPC-Wasser
	1 ml	Glyzerin

Um die Trennstrecke abschätzen zu können, wurde in einer freien Tasche neben der RNA-Probe mit 0,25% Bromphenolblau versetzter RNA-Auftragspuffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V. Anschließend wurde das Gel auf drei Lagen "Whatman 3MM"-Filterpapier gelegt, mit Folie abgedeckt und in einem Vakuum-Geltrockner bei Zimmertemperatur getrocknet. Danach wurde das Gel in eine Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) bedeckt und bei -80°C für 1-5 Tage exponiert.

## 2.9. Das *Xenopus laevis* Oozyten-Expressionssystem

Das Oozyten-Expressionssystem ist ein sehr häufig verwendetes System, da es viele Vorteile aufweist. Zum einen sind die Oozyten durch ihre Größe (> 1 mm) leicht in ihrer Handhabung, zum anderen modifizieren die Oozyten die von ihnen synthetisierten Proteine effizient posttranslational. Dazu gehört das Abspalten von Signalpeptiden, die Prozessierung von Vorläufer-Proteinen, Phosphorylierung und Glykosylierung (Coleman, 1984; Snuth, 1988). Die Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchlaufen in ihrer Entwicklung eine Phase verstärkter Proteinsynthese. In dieser Phase werden auch fremde mRNA-Moleküle, die auf künstlichem Weg in die Oozyte gebracht werden, effizient translatiert. Die gebildeten Proteine werden in der Oozyte korrekt an ihren Bestimmungsort geleitet: Cytosolische Proteine verbleiben im Zellinneren, sekretorische Proteine werden sezerniert und

membranständige Proteine werden ordnungsgemäß in die Zellmembran eingebaut. Das Translationssystem Oozyte kann als *in vivo*-System zur Charakterisierung und für Topologiestudien der translatierten Proteine verwendet werden: 1) Ionenkanäle, Rezeptoren oder Transport-Proteine können exprimiert und ihre Funktion mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme, oder auch der "Patch-Clamp"-Technik analysiert werden (Goldin, 1991). 2) Ligandenbindung der in der Oozyte exprimierten Rezeptoren kann *in vivo* studiert und die Einflüsse verschiedener Liganden auf das System gemessen werden. 3) Das exprimierte Protein kann isoliert und biochemisch charakterisiert werden.

Von Nachteil ist, daß der Experimentator relativ lange warten muß, bis die injizierte mRNA translatiert und in die Plasmamembran eingebaut worden ist. Die Oozyte hat eine hohe endogene Translationsaktivität, d.h. die injizierten Baupläne konkurrieren mit denen der Oozyte, wobei die funktionelle Expression von Fremdproteinen durch endogene Proteine, die im gleichen Vektor lokalisiert sind (z.B. Globulin), erhöht wird. Darüber hinaus können jahreszeitliche Rhythmik oder Variationen innerhalb der Weibchen aus Laborzuchten die Konditionierung der Oozytenpopulation erschweren.

### 2.9.1. Operative Entnahme der Oozyten aus *Xenopus laevis*

Zur Betäubung wurde der Frosch für 20 min in 2,3 g/l "Triacine"-Lösung (3-Aminobenzolsäureethylester, Sigma-Aldrich Chemie) gesetzt. Das völlig betäubte Tier wurde rücklings in eine Wanne mit Eis gelegt. Um ein vorzeitiges Erwachen des Frosches zu verhindern, wurden Kopf und Beine mit Triacine-getränkten Tüchern bedeckt und lediglich die Leistengegend feigelassen. Mit einer Pinzette wurde die obere Bauchdecke angehoben und in der Leistengegend mit einem Skalpell eine ca. 5 mm lange Öffnung in die Haut geschnitten. Danach wurde die Bauchdeckenmuskulatur durch einen ca. 1 cm langen Schnitt durchtrennt. Durch die entstandene Öffnung wurde ein Teil des Ovars mit einer feinen Pinzette herausgezogen, abgeschnitten und bis zur Weiterbehandlung in eine mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Barth's Medium gefüllte Petrischale überführt. Der Rest des Ovars wurde vorsichtig in den Bauchraum zurückgedrückt und anschließend die Bauchdecke mit Operationsnähseide mit 2-3 Stichen geschlossen. Danach wurde mit der Haut ebenso verfahren. Der Frosch wurde mit sterilem Leitungswasser abgespült, um Restbestände des Betäubungsmittels zu entfernen. Bis zum



Erwachen wurde er in eine Wanne mit sterilem Leitungswasser gelegt, wobei sein Kopf so gestützt wurde, daß die Nasenlöcher nicht unter Wasser lagen.

Die Operationen wurden stets von einer geschulten Mitarbeiterin, die eigens dafür eine Genehmigung erhalten hat, durchgeführt.

Barth`s Medium ohne $\text{Ca}^{2+}$ :	10,3 g	NaCl
	2 ml	1 M KCl
	0,4 g	$\text{NaHCO}_3$
	0,4 g	$\text{MgSO}_4$
	2,4 g	Tris-HCl

in 2 l Wasser lösen  
pH 7,4 mit NaOH einstellen



**Abb. 3.4.:** *Xenopus* Frosch mit Oozyten. In der rechten Ecke oben ist eine Oozyte mit Elektroden dargestellt (siehe dazu 2.10.)

### 2.9.2. Präparation der Oozyten

Der entnommene Ovarlappen wurde in Fragmente von ca. 10 Oozyten geschnitten. Um sie vom Bindegewebe des Ovars und den einhüllenden Follikelepithelzellen zu befreien, wurden die Ovarfragmente anschließend

für 2-3 h in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Barth`s Medium mit 580 U/ml (2,3 mg/ml) Collagenase I (Worthington) bei Zimmertemperatur geschwenkt. Zum Abstoppen des Collagenase-Verdau wurden die Collagenaselösung dekantiert und die Oozyten mehrmals mit Barth`s Medium gewaschen. Unter dem Mikroskop wurden solche Oozyten selektioniert, die sich in den Entwicklungsstadien VI und V befanden und intakt aussahen. Die selektierten Oozyten wurden in Barth`s Medium (siehe unten) bei 17°C aufbewahrt.

Collagenaselösung:	28 mg Collagenase (291 Einheiten/mg spezifische Aktivität)
	in 10 ml Barth`s Medium, $\text{Ca}^{2+}$ -frei
Barth`s Medium mit $\text{Ca}^{2+}$ :	40 ml Stammlösung A
	40 ml Stammlösung B
	1 ml Stammlösung C
	1 ml Stammlösung D
	auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen und sterilfiltrieren
Stammlösung A:	128 g NaCl
	2 g KCl
	5 g $\text{NaHCO}_3$
	89 g HEPES
	in 1 l Wasser lösen, pH 7,6 mit NaOH einstellen
Stammlösung B:	1,9 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
	1,5 g $\text{CaCl}_2$
	5 g $\text{MgSO}_4$
	in 1 l Wasser lösen
Stammlösung C:	63 mg/ml Penicillin-G Na-Salz (= 100.000 Einheiten/ml)
Stammlösung D:	100 $\mu\text{g}$ /ml Gentamyzin
	in Wasser lösen

40 mg /ml Streptomyzinsulfat  
(= 30.000 Einheiten/ml)  
in Wasser lösen

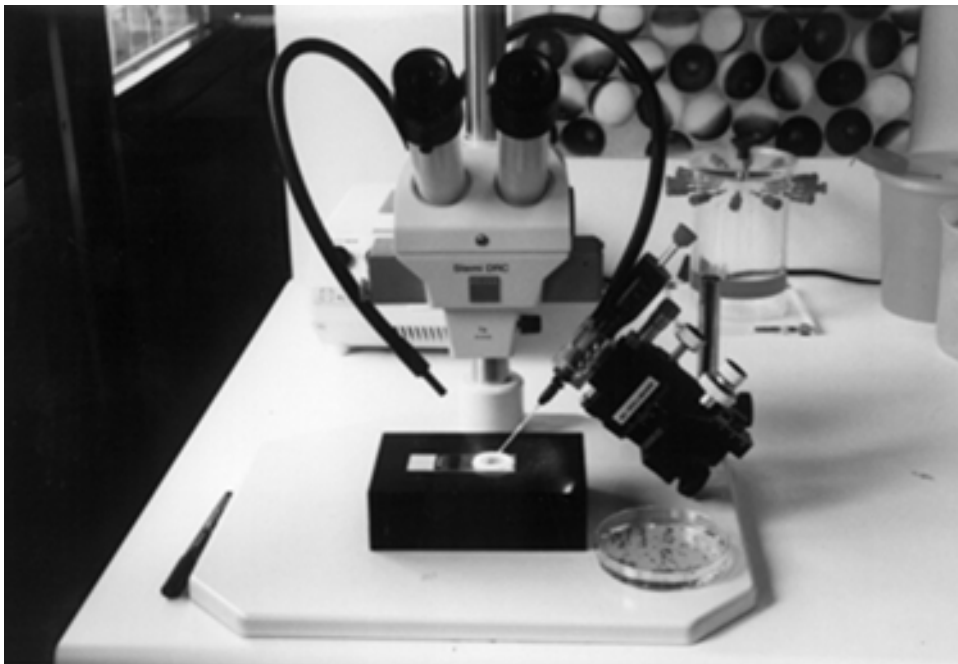
Alle Stammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

### 2.9.3. Mikroinjektion von RNA in *Xenopus*-Oozyten

Für die Injektion von RNA in Oozyten wurden Präzisionskapillaren (Transferpettor-Caps, Präzisionskapillaren mit Ringmarke, Qualität Blaubrand, 10  $\mu$ l, Länge 100 mm, Krannich Glasbläserei, Göttingen) verwendet. Die Kapillaren wurden mit Hilfe eines Vertikal-Glaselektrodenziehers L/M-3P-A durch zwei aufeinanderfolgende Schmelzströme unterschiedlicher Dauer und Stärke in einer Glühdrahtwendel zu sehr feinen Spitzen ausgezogen. Die Spitzen wurden daraufhin unter einem Mikroskop an einem Glasblock zu einem Öffnungsdurchmesser von ca. 10-15  $\mu$ m zurückgebrochen. Die fertigen Injektionspipetten wurden am Ende mit einer Mischung aus leichtem und schweren Mineralöl (1:1) luftblasenfrei gefüllt, um eine Sperrschicht zu schaffen, und dann auf den Pistill des Mikropipettors (Drummond, USA) geschoben, wodurch das Öl in die Pipettenspitze gedrückt wurde und diese luftblasenfrei ausfüllte.

Die RNA-Lösung, die zuvor 2 min bei 16000 x g zentrifugiert wurde, um Schwebeteilchen zu sedimentieren, wurde in einen sterilen Eppendorf-Gefäß-Deckel pipettiert und durch die Spitze in die Injektionskapillare gesaugt. Es sollte stets in die vegetative Polhälfte (hell) der Oozyte injiziert werden, da bei Injektion in die animale Polhälfte der darunter liegende Nukleus der Oozyte leicht verletzt werden kann, was unter Umständen zum Absterben der Oozyte führen kann. Die Oozyten wurden auf ein mit Barth's Medium bedecktes feinmaschiges Kunststoffnetz gelegt, damit sie beim Injizieren nicht weggleiten konnten. Der auf einem Mikromanipulator fixierte Mikroinjektor wurde so an die Oozyte herangeführt, daß die Spitze der mit RNA gefüllten Injektionspipette die Oberfläche der Oozyte gerade berührte. Die Membran wurde vorsichtig durch leichten Druck durchstoßen und 50 nl (= 10 ng RNA) oder gegebenenfalls 100 nl (= 20 ng RNA) in die Oozyte injiziert. Die Aufbewahrung der Oozyten erfolgte bei 17°C in Barth's Medium. Nach 4-6 Tagen war

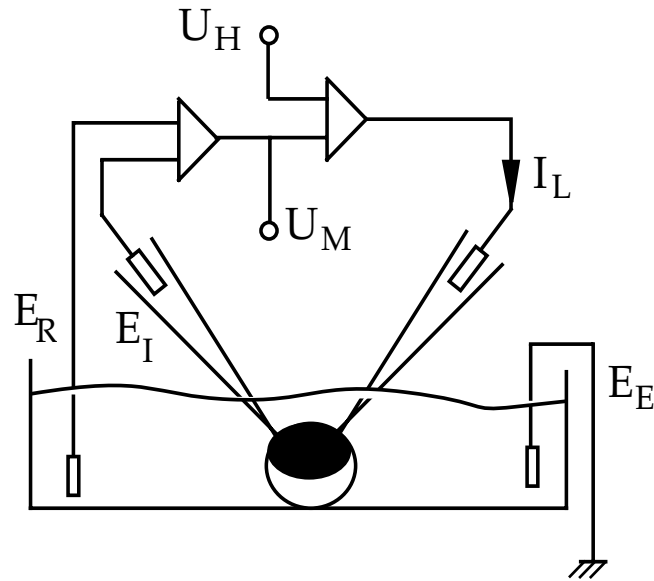
erfahrungsgemäß genug RNA in Protein translatiert, so daß die Oozyten für elektrophysiologische Messungen verwendet werden konnten.



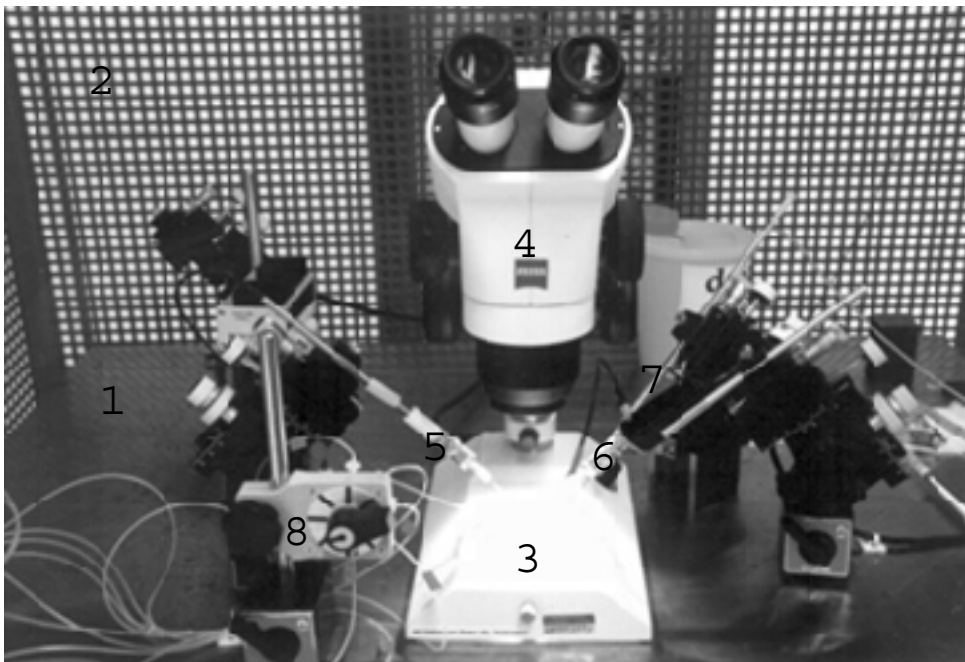
**Abb. 2.5.:** Injektionsarbeitsplatz. Abgebildet ist das Auflichtmikroskop und die Injektionsapparatur mit Mikrodispenser (Drummond), auf den eine Glaskapillare mit 12-15  $\mu\text{m}$  Durchmesser an der Spitze aufgezogen ist. Mit der Spitze wird die cRNA aufgezogen und daraufhin in Oozyten injiziert. Die Oozyten befinden sich auf einem speziell angefertigten Objektträger, auf dem ein Nylonnetz montiert ist, damit die mit Barth's Medium bedeckten Oozyten in den Löchern des Netzes fixiert sind und nicht wegschwimmen können. Foto: Carmen Villmann

## 2.10. Elektrophysiologische Messungen mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Um Ströme einer gesamten Oozyte unter unveränderten intrazellulären Bedingungen zu messen, bietet sich die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode ("Two-Electrode-Voltage-Clamp-Method") an (Smith et al, 1985, Standen et al., 1987). Bei dieser Methode wird eine erste Elektrode (Spannungselektrode) dazu verwendet, das Membranpotential gegen eine Referenzelektrode im Bad zu messen. Eine zweite Elektrode (Stromelektrode) dient dazu, Strom zu injizieren ("Leckstrom"), der nötig ist, um ein vom Experimentator gewünschtes Potential zu halten ("Haltestrom") (Abb. 6).



**Abb. 2.6.:** Schematische Darstellung der Meßanordnung bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Die Potentialdifferenz (= Membranpotential)  $U_M$  zwischen der intrazellulären Spannungselektrode  $E_i$  und der Bad-Referenzelektrode  $E_R$  wird mit dem gewünschten Potential (= Haltepotential)  $U_H$  verglichen. Ein Unterschied wird durch den Kompenström (= Leckstrom)  $I_L$  ausgeglichen.  $E_E$ : Erdungselektrode. Modifiziert nach Everts, PhD, 1998.



**Abb. 2.7.:** Meßplatzanordnung geeignet für Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Der Meßplatz befindet sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch (1), umrahmt vom Faradayschen Käfig (2). Abgebildet sind die Oozytenmeßkammer (3) unter dem Mikroskop (4), Strom (5)- und Spannungselektrode (6) mit Vorverstärkern, Sauger (7), der den Flüssigkeitsspiegel in der Meßkammer reguliert und das Verteilerventil (8). Foto von Carmen Villmann, modifiziert.



Werden die in der Oozyte exprimierten Ionenkanäle aktiviert, fließt ein Ionenstrom durch die Zellmembran. Dieser Ionenstrom wird durch eine Änderung der von der Stromelektrode in die Zelle injizierten Strommenge kompensiert, um das Potential konstant zu halten. Die zur Kompensation der Kanalöffnung zusätzlich benötigte Strommenge entspricht dem durch die Membran fließenden Ionenstrom und stellt daher eine indirekte Meßgröße für diesen dar. Dabei bedeutet die Erhöhung eines negativen Kompensationsstroms (= Strom negativer Ladung in die Oozyte) eine größere positive Ladungsdichte im Oozyteninneren, also einen Kationen-Einstrom oder Anionen-Ausstrom.

Der Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemmen-Meßplatz war auf einem schwingungsgedämpften Experimentiertisch aufgebaut. Eine stählerne Tischplatte ruhte auf einem Untergestell mit druckluftgefüllten Dämpfungspuffern, um eine Messung ohne Störungen durch mechanische Erschütterungen und Schwingungen zu ermöglichen. Ein Faradayscher Käfig, der den kompletten Meßstand umgab, minimierte elektrische Störungen während der Messung. In der Mitte des Experimentiertisches befand sich eine speziell angefertigte Meßkammer aus Plexiglas (Volumen ca. 50  $\mu$ l), in der die Oozyte während der Messung ständig mit der jeweiligen Lösung umspült wurde. Mit Hilfe hydrostatischen Drucks wurde die Oozyte ständig aus Vorratsbehältnissen mit den jeweiligen Lösungen mit einer Flußrate von 10-12 ml/min umspült. Der Verbindungsschlauch hatte einen Innendurchmesser von 1,4 mm. Über einen Mehrweghahn konnte zwischen acht verschiedenen Vorratsbehältnissen umgeschaltet werden. Auf beiden Seiten der Meßkammer stand jeweils ein manueller Mikromanipulator (World Precision Instruments, Berlin), der mittels Magnetstativen auf der Stahltischplatte fixiert war. An jedem Mikromanipulator war eine HS-2A-Headstage (Firma Axon Instruments Inc., Foster City USA) mit Elektrodenhalter und Ag/AgCl-Elektroden Draht befestigt. Die intrazellulären Elektrodenspitzen wurden an einem Vertikal-Glaselektrodenziehgerät aus Filament-Kapillaren hergestellt. Das Glasfilament im Inneren der Elektrode (Kapillare) sorgt dafür, daß die in die Kapillare eingeführte Elektrolytlösung bis in die äußerste Spitze gelangen kann. Je nach Einstellung des Elektrodensziehgerätes wiesen die Öffnungsdurchmesser 1-5  $\mu$ m auf, was in elektrischen Widerständen von 0,5-3 M $\Omega$  resultierte. Die Spannungselektrode wurde mit 3 M KCl-Lösung, die Stromelektrode mit 3 M CsCl-Lösung gefüllt. CsCl blockiert die

endogenen spannungsabhängigen Kaliumkanäle der Oozyten (Dascal, 1987). Zwei Ag/AgCl klemmten das Potential der Badlösung. Über der Meßkammer diente ein Stereomikroskop (Firma Zeiss, Jena) dazu, das Einstechen in die Oozyte zu kontrollieren. Standardmessungen von Glutamatrezeptorströmen erfolgten bei einem Haltepotential von -70 mV (physiologischer Bereich für Nervenzellen) mit Agonistkonzentrationen im Sättigungsbereich. Glutamat und Kainat wurden in Konzentration von 300  $\mu$ M appliziert. Für Domoat-Applikationen wurden 10  $\mu$ M-Lösungen hergestellt. Wurden Messungen in Gegenwart von Cyclothiazid durchgeführt, so wurde dieses in Konzentrationen von 100  $\mu$ M den Agonistenlösungen beigemischt und mit ihnen gemeinsam appliziert. Die Inkubation der Oozyte vor Agonistapplikation mit dem Lektin Concanavalin A (ConA) erfolgte für 8 min bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M. Die ConA-Lösung wurde wie auch die Agonisten-Lösungen in NFR-Puffer angesetzt. Die Applikation des Lektins wurde durch Einpipettieren von 100  $\mu$ l Lektinlösung direkt in die Meßkammer bei gestopptem NFR-Fluß durchgeführt. Nach der Inkubation wurde nicht gebundenes Lektin mit NFR-Puffer ausgewaschen. Diese Technik erlaubte es, Stromantworten vor und nach Lektinbehandlung zu vergleichen, ohne die Oozyte mehrfach anstechen zu müssen.

Die Textverarbeitung erfolgte mit "Microsoft Word 5.1" der Firma Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA. Zur Graphik-Bearbeitung wurde mit den Programmen "Canvas 3.5.4." (Deneba Software, Miami, FL, USA) und "Adobe Photoshop 3.0" (Adobe Systems, Inc. Pantone, Mountain View, CA, USA) gearbeitet. Für die Erstellung von Graphen wurde das Programm "CA-Cricket Graph III" (Computer Associates International Inc., Islandia, NY, USA) verwendet.

Sämtliche Daten wurden mit einem Apple Macintosh Computer (Power PC 8100/100, G3 oder G4) verarbeitet. Die Aufnahme-Auswertung und Bearbeitung der Daten erfolgte mit dem PulseFit 7.62 Programm (HEKA Electronics, Lambrecht).

Dosis-Wirkungskurven wurden durch Applikation von 10-11 verschiedenen Agonistenkonzentrationen (0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 1000; 300; 1000; 3000  $\mu$ M) erstellt und mit dem "Sigma Plot 4.11."-Programm (Jandel Scientific) nach der Formel  $I = I_{\max} / [1 + (EC_{50}/A)^{n_H}]$  ausgewertet.  $I_{\max}$  steht dabei für den Maximalstrom,  $n_H$  für den Hill-Koeffizienten, A für die

jeweils eingesetzte Agonistenkonzentration und  $EC_{50}$  für die Agonistenkonzentration, die halbmaximale Ströme liefert. Vor und nach jeder Messung wurde eine Standardkonzentration ( $300 \mu\text{M}$ ) appliziert. Die bei den unterschiedlichen Konzentrationen gemessenen Stromwerte wurden darauf mit Hilfe der Standardkonzentration nach der unten angegebenen Formel normiert und jeder Meßpunkt aus mindestens drei Messungen gemittelt.

$$I_{\text{normiert}} [\%] = I_x \times I_{\text{Standard1}} + I_{\text{Standard2}} / 2 \times 100$$

## 2.11. Proteinbiochemische Methoden

### 2.11.1. Proteinisolierung aus *Xenopus*-Oozyten und spezifische Markierung von Proteinen in der Plasmamembran

Um die gemessenen Ströme von mutierten oder modifizierten Proteinen mit denen der entsprechenden Wildtypen vergleichen zu können, mußte zuvor der Expressionslevel der Proteine in der Plasmamembran kontrolliert werden. Dazu wurden folgende proteinbiochemische Methoden angewandt, die Aussagen darüber erlauben, ob ein Protein synthetisiert, transportiert und in der Oozytenmembran exprimiert wurde.

Um die membranständigen Proteine von den löslichen Proteinen zu trennen, wurden die Oozyten mit dem Lektin ConA, das an Glutamatrezeptoren mit hoher Affinität irreversibel bindet, inkubiert. An das ConA ist Biotin gekoppelt. Mit Hilfe von an Sepharose-Kügelchen gebundenem Streptavidin, das mit hoher Affinität wiederum an das Biotin bindet, können die membranständigen Proteine dann nach Homogenisierung durch Zentrifugation aus dem Oozyten-Homogenat gewonnen werden.

6-8 Tage nach RNA-Injektion wurden 20 Oozyten mit 1 ml  $10 \mu\text{M}$  biotinyliertem Concanavalin A (ConA) (Sigma C-2272) für 30 min bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Bei diesem Schritt wurden die membranständigen Rezeptoren sowie alle anderen membranständigen ConA-bindenden Proteine markiert. Anschließend wurden die Oozyten 5 x mit steriler NFR-Lösung für jeweils 10 min unter leichtem Schütteln gewaschen, um nicht gebundenes biotinyliertes ConA zu entfernen. Bei diesem Waschvorgang wurde jede Oozyte einzeln in die Petrischale umgesetzt, da die Oozyte durch die ConA-Behandlung



mechanisch sehr empfindlich geworden sind und zudem leicht aneinander kleben, was zur Zerstörung der Oozytenmembran führen würde. Wenn dennoch die Membran beschädigt wurde, mußte die entsprechende Oozyte verworfen werden, da ansonsten intrazelluläre Proteine markiert werden. Nach dem Waschen wurden 12 Oozyten mit 20 µl H-Puffer/Oozyte mit einem Teflon-Pistill in einem Eppendorf-Gefäß homogenisiert und 60 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde für 2 min bei 16000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und ein zweites Mal zentrifugiert. Von diesem Überstand wurde ein Aliquot (20 µl, entsprechend einer Oozyte) als "Totalfraktion" abgenommen. Zum verbleibenden Rest des Überstandes wurden 20 µl Streptavidin-Sepharose-Kügelchen (Sigma S-1638) pipettiert, die vorher 4x in H-Puffer gewaschen worden waren. Streptavidin bindet mit hoher Affinität an Biotin. Dadurch konnten nun die mit biotinyliertem ConA markierten Oberflächenproteine durch Zentrifugation aus dem Oozyten-Homogenisat separiert werden. Die Proben wurden dazu für 3 h auf einem rotierenden Schüttler bei 4°C inkubiert. Die beladenen Streptavidin-Sepharose Kügelchen wurden durch 2-minütige Zentrifugation pelletiert. Vom Überstand wurde ein Aliquot von 20 µl (entsprechend einer Oozyte) als "Überstandsfraktion" abgenommen. Der Rest des Überstandes wurde aufgehoben. Die pelletierten Kügelchen wurden nun 3 x mit H-Puffer gewaschen und anschließend direkt in Probenpuffer für Proteingele aufgenommen (normalerweise in 40 µl, entsprechend 10 Oozyten).

H-Puffer:	100 mM	NaCl
	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	1%	Triton X-100
	1 mM	PMSF
	1 Tablette/50 ml Puffer:	Protease-Inhibitoren (Complete™, Boehringer)

Probenauftragspuffer:

GluRs (2x):	0,8 M	β-Mercaptoethanol
	6%	SDS
	20%	Glyzerin

	25 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	0,1%	Bromphenolblau
KBPs (2x):	62 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2,5%	SDS
	10%	Glyzerin
	0,1%	Bromphenolblau
	115 mM	DTT

### 2.11.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Durch die Behandlung der aufzutrennenden Proteine mit dem stark anionischen Detergenz SDS in Kombination mit reduzierenden Agenzien bei hohen Temperaturen zerfallen die Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten. Die denaturierten Proteine binden SDS und erhalten dadurch negative Überschlußladung. Diese beladenen Teilchen wandern bei der hier beschriebenen Methode in einem elektrischen Feld durch ein Netz aus Polyacrylamid. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen in dem Netzwerk richtet sich nach dessen Größe.

Untergel:	24,4 ml	Protogel (Acrylamid-Stammlösung, siehe unten)
	36,6 ml	1 M Tris-HCl, pH 8,8
	0,98 ml	10% SDS
	34,6 ml	destilliertes Wasser
	1,25 ml	10% APS
	65,0 $\mu$ l	TEMED; erst kurz vor dem Gießen zugeben
Obergel:	8,0 ml	Protogel
	5,0 ml	1 M Tris-HCl, pH 6,8
	0,4 ml	10% SDS
	29,6 ml	destilliertes Wasser

	400 $\mu$ l	10% APS
	100 $\mu$ l	5% Bromphenolblau
	64 $\mu$ l	TEMED; erst kurz vor dem Gießen zugeben
Acrylamid-Stammlösung:	30% (w/v)	Acrylamid
	8% (w/v)	Bisacrylamid
Laufpuffer (10x):	30 g	Tris
	144 g	Glyzin
	10 g	SDS
	pH 8,8 mit HCl einstellen	
	in 1 l Wasser lösen	

Das Polyacrylamid-Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Platten wurden zuvor gründlich mit destilliertem Wasser, Ethanol und Azeton gereinigt, damit sie staub- und fettfrei sind. Beide Platten wurden mit Klebeband und Klammern aufeinander befestigt und alle Kanten mit Ausnahme der oberen abgedichtet, wobei am Rand zwischengelegte Abstandhalter eine Distanz von 0,75 mm zwischen den Platten hielten. Zuerst wurde das Untergel vom offenen, oberen Rand her zwischen die Glasplatten bis ca. 5 cm unter den Rand gegossen. Um eine gerade Oberkante zu bekommen, und um das Gel vor Austrocknung zu schützen, wurde sofort mit 1 ml eines Butanol:Wasser-Gemisches (2:1) überschichtet. Nachdem das Untergel auspolymerisiert war, wurde das Butanol:Wasser-Gemisch abgegossen und die Gelkante mit Wasser abgespült. Verbleibende Wasserreste wurden mit dünnen Filterstreifen zwischen den Glasplatten entfernt. Anschließend wurde das Obergel gegossen und sofort der Probenauftragskamm luftblasenfrei aufgesteckt, um Taschen zum Auftragen der Proben auszusparen. Nachdem auch das Obergel polymerisiert war, wurde das Klebeband vom unteren Rand der Glasplatten entfernt, das Gel in die Apparatur gespannt und das obere und untere Reservoir mit insgesamt 2 l Gel-Laufpuffer gefüllt.

Die mit Probenpuffer versetzten Proteinproben wurden zur Denaturierung 5 min auf 100°C erhitzt. Parallel wurde ein Molekulargewichtsmarker

("High molecular weight", Biorad, München) als Standard auf 40°C erhitzt. Anschließend wurden Proben und Marker vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde für 4-5 h bei 30 mA und 4°C durchgeführt.

### 2.11.3. Western Blot

Um die auf dem Gel aufgetrennten Proteine spezifisch mittels Antikörpern nachweisen zu können, wurden sie auf Nitrozellulose überführt (Towbin et al., 1979). Dieser Vorgang wird als "Western blotting" bezeichnet. Für einen Western Blot stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. In diesem Fall wurde die "halb-trockene"-Methode angewandt. Die Apparatur dazu wurde von Transphor Electrophoresis Unit, Serva, München bezogen. Durch das elektrische Feld, das zwischen zwei Elektroden entsteht, wandern negative Teilchen (z.B. mit SDS beladene Proteine) zur Anode und werden auf diesem Weg auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond™ ECL™ Nitrozellulose Membran für ECL Western Blot, Amersham Lifescience, Braunschweig) übertragen.

Transferpuffer (10x):	30,3 g	Tris
	144 g	Glyzin
	5 g	SDS
	20%	Methanol

erst vor Gebrauch zusetzen  
auf 1 l mit Wasser auffüllen

Nach Beendigung der Elektrophorese, wurde die vordere Platte abgehoben und das Gel mit Hilfe von angefeuchtetem, leicht angedrücktem "Whatman 3 MM"-Filterpapier von der Glasplatte abgezogen und das Ganze in eine mit etwas 1x Transferpuffer gefüllte Wanne gelegt. Auf das Gel wurde nun luftblasenfrei ein zugeschnittenes Stück Nitrozellulose und ein weiteres angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Die Nitrozellulose war zuvor 10 min in demineralisiertem Wasser und 30 min in 1x Transferpuffer äquilibriert worden. Dieses "Sandwich" wurde, von zwei porösen Kunststoffmatten umgeben und in einem Blotrahmen fixiert, in eine mit 1x Transferpuffer gefüllte "Blotting"-Kammer überführt, wobei die

Nitrozellulose zur Anode hin orientiert war. Der Transfer fand bei 4°C und 200 mA über Nacht statt.

#### 2.11.4. Immunologischer Nachweis der Proteine

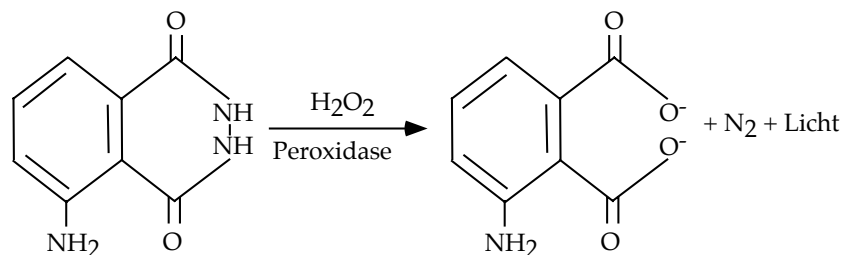
Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte durch spezifische Antikörperbindung. Zunächst bindet ein spezifisch gegen das nachzuweisende Protein gerichteter Erstantikörper. Der eigentliche Nachweis erfolgt dann über einen gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper, der wiederum an ein Enzym gekoppelt ist. In diesem Fall handelte es sich bei dem Enzym um eine "horse raddish peroxidase" (HRP), eine Peroxidase aus Meerrettich. Die Peroxidase katalysiert eine lichtgebende Reaktion, wenn Luminol als Substrat zur Verfügung steht (siehe Abb.8). Diese Entwicklung eines Western Blots ist als ECL-Methode ("Enhanced Chemiluminescence") bekannt. Die ECL-Reagenzien wurden von der Firma Amersham Buchler GmbH & Co. KG bezogen. Als Blockierungspuffer zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde Roti-Block® (Roth GmbH & Co.) verwendet.

TBS (10 x):	200 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	1,4 M	NaCl
TBS-TR:	1 x	TBS
	0,1%	Triton X-100
	0,1 x	Roti-Block®
Block-Puffer:	1 x	Roti-Block®

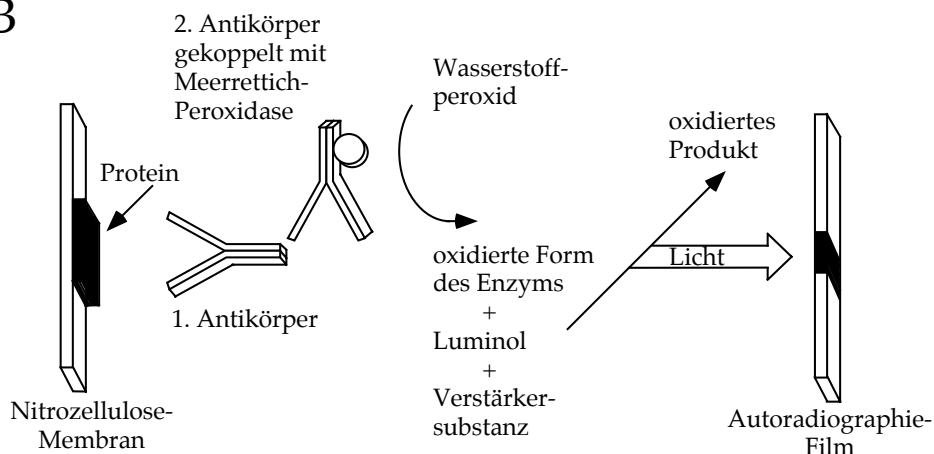
Die Nitrozellulosemembran wurde zunächst mit einem kleinen Volumen Block-Puffer abgespült und anschließend für 2 h mit Block-Puffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Nitrozellulose in Schlauchfolie eingeschweißt, wobei zunächst eine Seite offen blieb. Hier wurde der Erstantikörper, der in TBS-TR verdünnt wurde, appliziert. Mit Hilfe einer Glaspipette wurden durch Rollen mit einer Pipette Luftblasen aus der Tüte gedrückt und zum Schluß die offene Seite zugeschweißt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C, wobei die Tüte mittels angeklammerter Glasplatte auf einem Schwenkschüttler flach fixiert war.

Nach 5 x Waschen mit TBS-TR-Puffer für jeweils 5 min bei Zimmertemperatur wurde nach dem gleichen Verfahren verdünnter Zweitantikörper (Esel-anti-Maus/Kaninchen IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories) zugegeben und für 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Daran schloß sich eine weitere Waschfolge von 4 x Waschen mit TBS-TR-Puffer und 2 x Waschen mit 1 x TBS für jeweils 5 min an. Für die Lumineszenzreaktion wurden anschließend die ECL-Reagenzien (SuperSignal 1 und 2) im Verhältnis 1:1 in einer Glasschale gemischt. Die Nitrozellulose wurde für genau 5 min in der Lösung inkubiert, sofort danach in Folie geschweißt und gegen einen Fuji Medical Röntgenfilm oder Kodak X-OMAT AR für 1 oder 5 min oder über Nacht, je nach Affinität des Erstantikörpers, exponiert.

A



B



**Abb. 2.8:** Die Oxidation des Substrates Luminol, die durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird, führt zur Emission von Licht. B: Prinzip der ECL-Reaktion. Das durch Western Blot transferierte Protein wird durch den Erstantikörper erkannt. An den Erstantikörper bindet wiederum der Zweitantikörper, welcher mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Durch die Oxidation von Luminol wird Licht abgegeben, und das gewünschte Protein auf einem Autoradiographie-Film sichtbar gemacht. Modifiziert nach einer Abbildung aus einem Produktinformationsheft von Pierce.





als einschichtiger Zellrasen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Das Nährmittel enthält einen pH-Farbindikator (rot), der anzeigt, wann das Medium gewechselt werden muß. Bei beginnender Orangefärbung des Mediums wurden von den 10 ml vorsichtig 8 ml abgesaugt und durch 8 ml frisches Medium ersetzt.

### 2.12.2. Trypsinierung der HEK 293-Zellen

Die HEK-293 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion durch Trypsinieren (Zugabe von 0,025% Trypsin) von der Platte abgelöst und im 1:5-Verhältnis auf 10 Platten verteilt. Es wurden jeweils 8 ml DMEM mit 10% FCS pro Platte vorgelegt und 2 ml der Zellsuspension dazupipettiert. Die Platten wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Transfektion inkubiert. Für die Transfektion sollten die Zellen 40-50% konfluent sein.

### 2.12.3. Transfektion von HEK 293-Zellen nach der CaPO<sub>4</sub>- Methode

Lösung A:                    8750 µl dd H<sub>2</sub>O  
(für 20 Platten)            250 µl DNA (2 µg/µl)  
                                  1000 µl CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) (zuletzt zugeben)

Lösung B  
(HEPES 2x):                4,1 g NaCl  
                                  3,0 g HEPES (sauer)  
                                  0,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                  auf 250 ml mit dd H<sub>2</sub>O auffüllen, pH-Wert mit 1200 µl  
                                  2 M NaOH auf pH 6,8 einstellen

Die Lösung B muß sterilfiltriert werden.

In ein transparentes 14 ml Polystyrol-Gefäß wurden 0,5 ml der Lösung A und dazu tröpfchenweise 450-500 µl der Lösung B gegeben. Während der Zugabe von Lösung B wurde das Gefäß permanent geschüttelt. Die Zugabe der Lösung B wurde in dem Moment gestoppt, als der Gesamtansatz erste Anzeichen von einer Trübung zeigte. Die gebildeten Kristalle wurden nun durch siebenmaliges schnelles Auf- und Abpipettieren der gesamten Lösung mit einer 1 ml-Pipette (Gilson blue tip) zerbrochen. Dieser Schritt ist entscheidend für das Gelingen der Transfektion, da die Größe der Kristalle



einen großen Einfluß auf die Transfektionsrate hat. Die Kristalle sollten eine Größe haben, die denen der Bakterien entsprechen. Von dieser DNA enthaltenden Lösung wurden 950-1000  $\mu\text{l}$  unter ständigem Schwenken der HEK-293-Lösung tröpfchenweise zu den HEK-293-Zellen in die Petrischale pipettiert und diese im Inkubator bei 5%  $\text{CO}_2$ , 37°C wachsen gelassen.

#### 2.12.4. [ $^3\text{H}$ ]Kainat-Bindung an HEK 293-Zellmembranen

Um [ $^3\text{H}$ ]Kainat-Bindung zu untersuchen, wurden Membranen von transfizierten HEK-293 Zellen verwendet. Adhäsive HEK-293 Zellen (ATCC No. CRL 1573), die nach der Methode der Kalzium-Phosphat-Präzipitation transfiziert wurden (siehe 2.12.3.), wurden in eiskaltem 0,5 mM EDTA, 100  $\mu\text{M}/\text{ml}$  AEBSF (4-2-Aminoethyl Benzolsulfonyl Fluorid) und PBS geerntet. Nach Zentrifugation bei 4000 x g, wurden die pelletierten Zellen (von 10-30 Platten, 10 cm Durchmesser) mit einem Teflon-Glas-Homogenisierer in eiskaltem 50 mM Tris-Azetat-Puffer homogenisiert und bei 8000 x g 30 min zentrifugiert.

PBS (10x):	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	14,4 g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,4 g
	pH 7,4 mit NaOH einstellen	
Tris-Azetat-Puffer:	Tris-Azetat	50 mM
	EDTA	10 mM
	AEBSF	100 $\mu\text{M}$
	Leupeptin	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	Aprotinin	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	Pepstatin A	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Der Überstand wurde anschließend bei 600 000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Membranen in NaCl-freiem Tris-Azetat-Puffer, pH 7,3 resuspendiert, mit dem Homogenisierer homogenisiert und anschließend 30 min bei 8000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die so gelösten Membranen wurden mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C bis zum späteren Gebrauch gelagert.

Für den [<sup>3</sup>H]Kainat-Bindungsversuch wurden 50-150 µg des Proteins eingesetzt. Die Konzentration des Proteins wurde nach der Standard-BCA Methode (BCA Protein Assay reagent Kit, Pierce, Rockfort, IL, USA) bestimmt. Für die Ermittlung der K<sub>D</sub>-Werte wurde die Verdrängung von [<sup>3</sup>H]Kainat-Bindung durch steigende Mengen von unmarkiertem Kainat herangezogen. Eine Konzentrationsreihe von nicht radioaktiv markiertem Kainat (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM) wurde als Kompetitor angesetzt. Als kompetitiv zu verdrängende Substanz wurden je 80 nM [<sup>3</sup>H]Kainat (58 Ci/nmol) eingesetzt. Jeder Ansatz (1,5 ml Reagenzgefäß) enthielt demnach 80 nM [<sup>3</sup>H]Kainat, x nM nicht radioaktives kompetitierendes Kainat und 50-150 µg Protein (Membransuspension), sowie 50 mM Tris-Azetat-Puffer, pH 7,3 in einem Gesamtvolumen von 250 µl. Nach 60 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze für 1 h bei 12000 x g zentrifugiert und die Pellets in 100 µl 0,5 M NaOH resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation der Ansätze bei 37°C für 1 h wurden zur Neutralisation des Ansatzes 75 µl 12% Essigsäure zugegeben. Die Deckel der Reagenzgefäße wurde abgeschnitten, die Gefäße mit einer Pinzette in Szintillationsgefäße gegeben und dazu 20 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumax-Xylen) pipettiert. Die Radioaktivität wurde in einem NaJ-Kristall-Szintillationszähler gemessen. Die spezifische [<sup>3</sup>H]Kainat-Bindung wurde definiert als Totalbindung minus unspezifische Bindung, in Anwesenheit bei einer Konzentration von 1 mM Kainat gemessen wird. Alle Experimente wurden dreifach ausgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm PRISM (GraphPad Inc., San Diego).

### **2.13. Erstellung der dreidimensionalen (3D) Modelle der Ligandenbindungsdomänen von GluR6 und GluR7**

Die 3D-Modelle der Ligandenbindungsdomänen von GluR6 und GluR7 wurden von Miri Eisenstein (Weizman Institute of Science, Rehovot, Israel) erstellt. Sämtliche Sequenzvergleiche, die zur Erstellung der Modelle erforderlich waren, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit mit dem Program "MegAlign" von DNASTAR Inc. Madison, WI 53715, USA, durchgeführt. Die 3D-Modelle der Ligandenbindungsdomänen von GluR6 und GluR7 basieren auf den Vergleich mit der Ligandenbindungsdomäne von GluR2. Die Struktur der Ligandenbindungsdomäne von GluR2 in Anwesenheit von gebundenem Agonisten (Kainat) ist bereits durch

Röntgenstrukturanalyse bekannt (Armstrong et al., 1998). Die Aminosäure-Sequenzen von GluR6 und GluR7 sind denen von GluR2 ähnlich. Sie wiesen im Bereich der 249 Aminosäuren umfassenden Ligandenbindungsdomänen 51,2% (GluR6), bzw. 51% (GluR7) Identität zu GluR2 auf. Die 3D-Modelle wurden mit dem Homologie-Modul von MSI (MSI Inc., San Diego, CA, USA) erstellt. Sie wurden anschließend mit dem "Discover"-Modul energetisch minimiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vergleichende Struktur-Funktions-Analyse der Kainatrezeptoren GluR7 und GluR6

Die Kainatrezeptoren GluR6 und GluR7 gehören zu derselben Glutamatrezeptorunterfamilie und weisen eine 86%ige Aminosäure-Identität auf (Bettler et al., 1992). Trotzdem zeigen beide Rezeptoren, wenn sie in *Xenopus*-Oozyten exprimiert werden, elektrophysiologisch grundsätzlich verschiedene Eigenschaften. GluR6 zeichnet sich dadurch aus, daß er sehr hohe Ströme nach Agonistenapplikation zeigt, während bei GluR7 durch Applikation von Agonisten keine Stromantworten ausgelöst werden können. Bis vor kurzem wurde GluR7 daher zu den nicht-funktionellen Rezeptoren gezählt. Die Ursachen für einen nicht-funktionellen Rezeptor können fehlende Proteinexpression, fehlende Ligandenbindung, eine nicht-funktionelle Pore oder eine Fehlfunktion im Informationsübertragungsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Ionenkanalöffnung sein (= "gating"). Proteinexpression, Ligandenbindung und die Untersuchung auf Funktionalität der Pore wurden bereits von anderen Wissenschaftlern untersucht (Lomeli et al., 1992; Sommer et al., 1992; Schiffer et al., 1997; Villmann et al., 1999) und kommen als Begründung für die Nicht-Funktionalität des GluR7-Rezeptors nicht mehr in Frage. Es bleibt lediglich die Möglichkeit einer Störung des "gating"-Mechanismus zwischen Ligandenbindung und Ionenkanalöffnung bestehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eingehend untersucht, ob eine Störung im "gating"-Mechanismus bei GluR7 als Erklärung für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 dienen kann. Des weiteren wurde versucht, die Region in GluR7 zu identifizieren, die für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurden Domänen zwischen GluR6 und GluR7 ausgetauscht und somit sogenannte Chimären geschaffen, die auf Funktionalität getestet wurden.

##### 3.1.1. Domänenaustausch zwischen Glutamatrezeptoren

Aufgrund der hohen Homologie von GluR6 und GluR7 war es ohne größere Aminosäuresequenzveränderung möglich, an homologen Positionen in den Sequenzen der beiden Klone gleiche Restriktionsschnittstellen einzufügen. Um einen einfachen

Domänen austausch zu ermöglichen, sollten die eingefügten Restriktionsschnittstellen in beiden Klonen möglichst nur einmal vorkommen. Um gleiche Klonierungsvoraussetzungen vorliegen zu haben, wurden beide Klone in denselben Expressionsvektor pSGEM (Abb. 2.1) kloniert. In den Fällen, in denen im Polylinker des Vektors Restriktionsschnittstellen vorkamen, die für den Domänen austausch in der cDNA benötigt wurden, wurden diese durch Auffüllen mit Klenow-Fragment und Religieren beseitigt. Die so veränderten Wildtyp-Klone (WT $\Delta$ EcoRI, WT $\Delta$ NdeI, WT $\Delta$ ClaI, WT $\Delta$ KpnI) wurden elektrophysiologisch auf ihre Funktion im Oozytenexpressionsystem überprüft, um auszuschließen, daß diese Veränderung in der Vektorsequenz einen Einfluß auf die Funktion des jeweiligen Glutamatrezeptors ausübt.

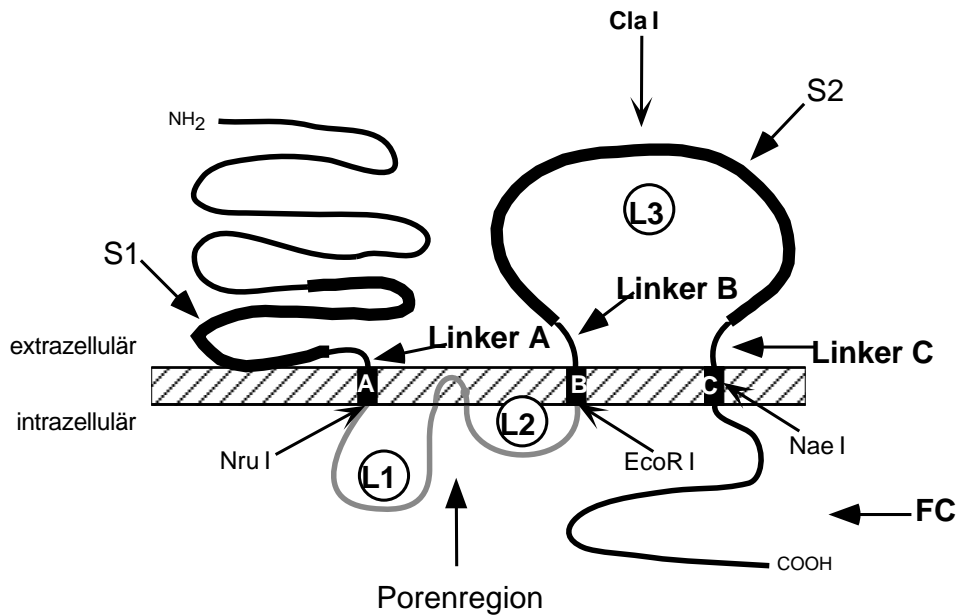
#### **3.1.1.1. Domänen austausch zwischen GluR6 und GluR7: Herstellung der Chimären (I)**

Als Ausgangskonstrukte für die Herstellung von Chimären dienten GluR6-PCS und GluR7-PCS. GluR6-PCS lag für die Klonierung bereits vor, da er als Ausgangsstruktur für einen Porenaustausch (Porendomäne und die angrenzenden intrazellulären Schleifen L1 und L2, siehe Abb. 3.1) zwischen Glutamatrezeptoren vor einiger Zeit hergestellt worden war (Villmann, 1998). Aus diesem Grund wurde auch der Name PCS für diese Ausgangskonstrukte gewählt: PCS steht für "pore cassette small". Diese "kleine" Porenregion umfaßt die eigentliche Pore plus die intrazellulären Schleifen L1 und L2. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird auf die Konstrukte PCL ("pore cassette large") und PXL ("pore cassette extra large") eingegangen, die zusätzlich zur "kleinen" Porenregion die angrenzenden Transmembrandomänen A und B (PCL) sowie die Linkerregionen A und B (PXL) enthalten. Für die Herstellung der im Folgenden beschriebenen Chimären wurden aus dieser Reihe lediglich die PCS-Konstrukte verwendet. Diese Klone gleichen den Wildtyp-Klonen mit der Ausnahme, daß C-terminal an der Transmembrandomäne A und N-terminal an der Transmembrandomäne B an homologen Positionen in beiden Klonen jeweils eine Restriktionsschnittstelle (NruI bzw. EcoRI) eingebaut wurde (siehe Tab.1). Die Restriktionsschnittstellen wurden durch PCR-Mutagenese in die jeweilige Klonsequenz eingeführt (siehe 2.8.6).

**Tabelle 3.1.** Übersicht über Aminosäure-Sequenzen, in die Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden oder die natürlich vorkommende Restriktionsschnittstellen für einen Domänen austausch enthalten

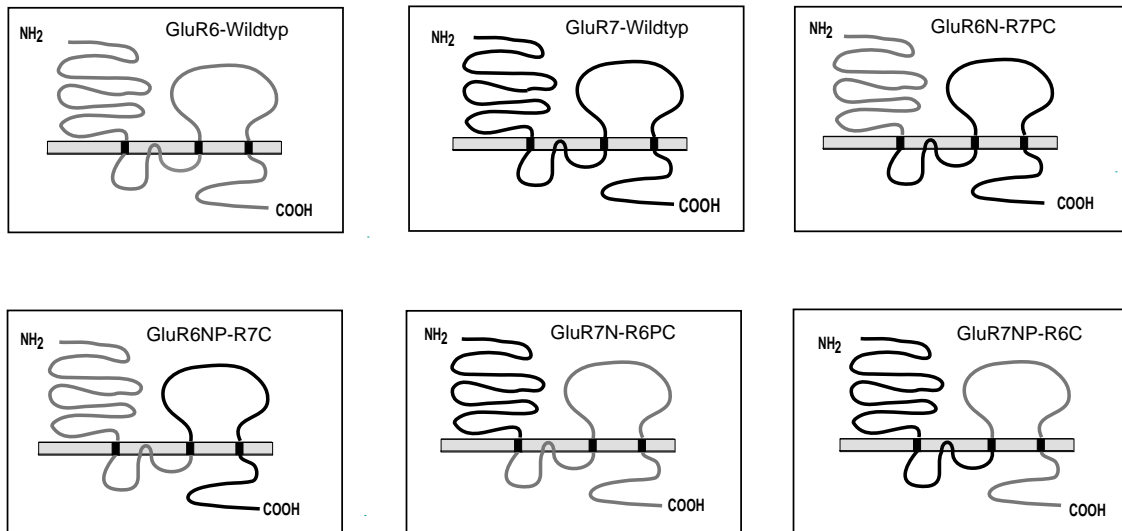
Untereinheit	Ausgangskonstrukte zum Domänen-Austausch zwischen GluR6 und GluR7			
	Restriktionsschnittstelle	Aminosäureposition und - Veränderung	ASA	
GluR6	Nru I	FVI (548-550) → FAI	2	PCS
GluR7	Nru I	FVI (549-551) → FAI	1	
GluR6	EcoR I	RIV (603-605) → RIL	1	
GluR7	EcoR I	RII (605-607) → RIL	1	
GluR6	Nae I	AG (798-799) → AG	0	TMD C
GluR7	Nae I	AG (768-769) → AG	0	
GluR6	Cla I	ID (728-729) → ID	0	L3
GluR7	Cla I	ID (698-699) → ID	0	

Dargestellt sind die Aminosäureveränderungen, die zur Einführung der Schnittstellen nötig sind (jeweils für die Untereinheiten GluR6 und GluR7 im Vergleich). ASA steht für die Anzahl der Aminosäureaustausche. Die PCS-Restriktionsschnittstellen sind die zur Transplantation der Porenregion eingebauten Schnittstellen. Die natürlich vorkommende Nae I- Schnittstelle befindet sich in der TMD C, die Cla I- Schnittstelle mittig in der L3-Domäne.



**Abb. 3.1.:** Topologie eines typischen ionotropen Glutamaterezeptors. Dargestellt sind der extrazelluläre N-Terminus, der intrazelluläre C-Terminus und die Transmembrandomänen (TMD) A, B und C. Die Porenregion ragt von der intrazellulären Seite in die Membran hinein und wird zu beiden Seiten hin mit den Transmembrandomänen A und B durch die Schleifen L1 und L2 verbunden. Eine große extrazelluläre Schleife (= L3-Domäne) verbindet die TMDs B und C. S1 und S2 sind zwei extrazelluläre Domänen, die homolog zu bakteriellen aminosäurebindenden Proteinen sind. Die S1 Domäne ist N-terminal von Linker A lokalisiert. Die S2-Domäne reicht vom Ende des Linkers B bis Anfang des Linkers C. Als Linker A, B und C sind die verbindenden Sequenzen zwischen der S1- und S2-Domäne, sowie den Transmembrandomänen A, B und C definiert. FC (= Far C-terminal) beschreibt die C-terminale Sequenz beginnend hinter TMD C. Nru I, EcoR I, Cla I und Nae I sind die eingebauten Restriktionsschnittstellen, die für die Herstellung der Chimären zwischen GluR6 und GluR7 verwendet wurden. Die Cla I Restriktionsschnittstelle halbiert die L3 Domäne in einen N-terminalen Bereich (= L3N) und einen C-terminalen Bereich (L3C) (siehe Text).

Um zu ermitteln, ob die N-terminale oder die C-terminale Hälfte des Rezeptorproteins für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 verantwortlich ist, wurden Chimären konstruiert, die entweder die N-terminale- sowie die Porendomäne (NP) oder lediglich die N-terminale Domäne (N) von GluR6 enthielten, während der Rest des Proteins (C) von GluR7 stammte. Ebenso wurden die reversen Konstrukte (mit der N-terminalen oder N-terminalen plus Porendomäne von GluR7 und der C-terminalen Domäne von GluR6) hergestellt. Für diese Klonierungen wurden die Restriktionsschnittstellen Nru I und EcoR I verwendet (siehe Abb. 3.1.). Die vier resultierenden Chimären wurden GluR6N-GluR7PC, GluR6NP-GluR7C, GluR7N-GluR6PC und GluR7NP-GluR6C genannt (siehe Abb 3.2.).



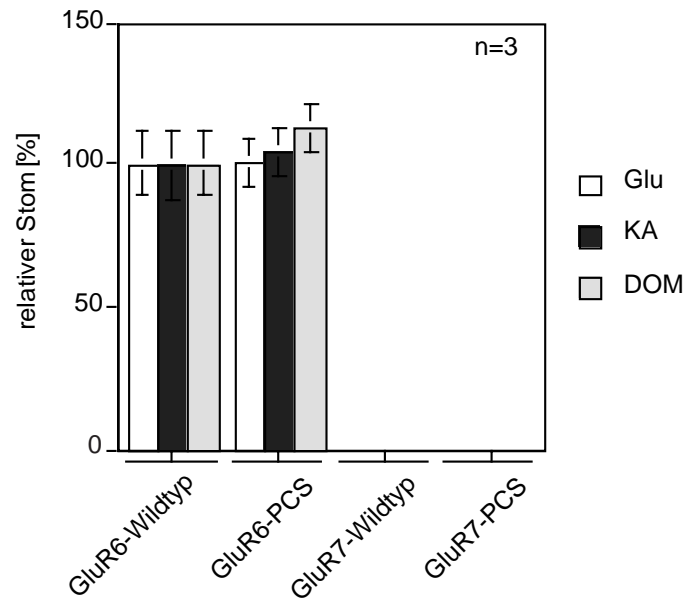
**Abb. 3.2.:** Schematische Darstellung der Chimären GluR6N-GluR7PC, GluR6NP-GluR7C, GluR7N-GluR6PC und GluR7NP-GluR6C sowie GluR6 und GluR7-Wildtyp. Graue Linien = GluR6, schwarze Linien = GluR7.

### 3.1.1.2. Charakterisierung der Chimären zwischen GluR6 und GluR7 (I)

Zunächst wurde untersucht, ob sich die GluR6- und GluR7-PCS-Ausgangskonstrukte elektrophysiologisch wie Wildtyp GluR6 und GluR7 verhalten. Dazu wurden die Maximalamplituden der agonisteninduzierten Ströme der Konstrukte und der Wildtypen miteinander verglichen. Im Folgenden sind Stromangaben in % als absolute Maximalamplituden normiert auf GluR6-Wildtyp-Strom (100%) zu verstehen. Sämtliche Stromamplituden-Angaben beziehen sich auf nach Behandlung der Oozyte mit ConA gemessene Ströme, wobei die ConA-Behandlung die Desensibilisierung des Rezeptors minimiert, sodaß Maximal-Ströme gemessen werden können (siehe 2.10).

Für beide PCS-Konstrukte konnte gezeigt werden, daß durch die Mutationen elektrophysiologisch keine Veränderung hervorgerufen wurden (siehe Abb 3.3.). GluR6-PCS zeigt ca. 100% des Wildtyp-Stroms, und GluR7-PCS zeigt ebenso wie GluR7-Wildtyp keinen Strom. Daher konnten die aus diesen Konstrukten hervorgegangenen Chimären GluR6N-GluR7PC, GluR6NP-GluR7C, GluR7N-GluR6PC und GluR7NP-GluR6C mit GluR6-Wildtyp verglichen werden.





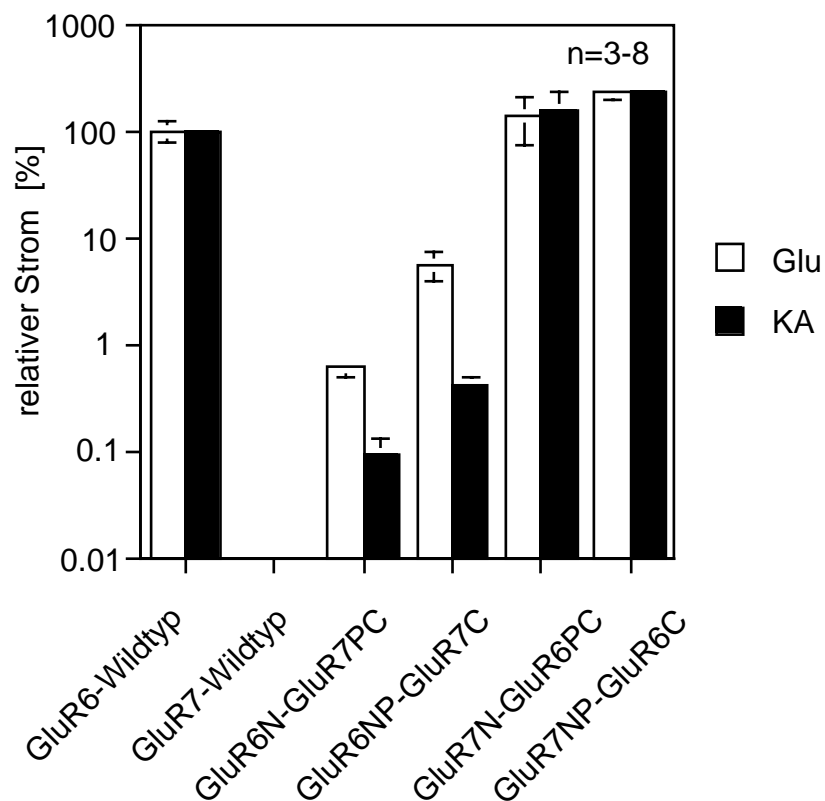
**Abb. 3.3.:** Vergleich der relativen Stöme von Wildtyp und PCS-Konstrukten. Es wurden 300  $\mu\text{M}$  Glutamat (Glu), 300  $\mu\text{M}$  Kainat (KA) und 10  $\mu\text{M}$  Domoat (DOM) appliziert. Angegeben sind die Prozentwerte der durch Agonist vermittelten Ströme für die PCS-Konstrukte im Vergleich zu GluR6-Wildtyp-Strom.

**Tab. 3.2.** Relative Stromamplituden für Chimären zwischen GluR6 und GluR7 (I)

Rezeptor-Untereinheit	Strom KA [%]	Strom Glu [%]	n
GluR6(Q)	100.0 $\pm$ 17.9	100.0 $\pm$ 21.6	34
GluR7(Q)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	3
GluR6N-GluR7PC	0.09 $\pm$ 0.04	0.6 $\pm$ 0.1	3
GluR6NP-GluR7C	0.4 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 1.6	8
GluR7N-GluR6PC	155.0 $\pm$ 76.1	137.0 $\pm$ 64.4	7
GluR7NP-GluR6C	235.0 $\pm$ 40.6	228.0 $\pm$ 38.2	4

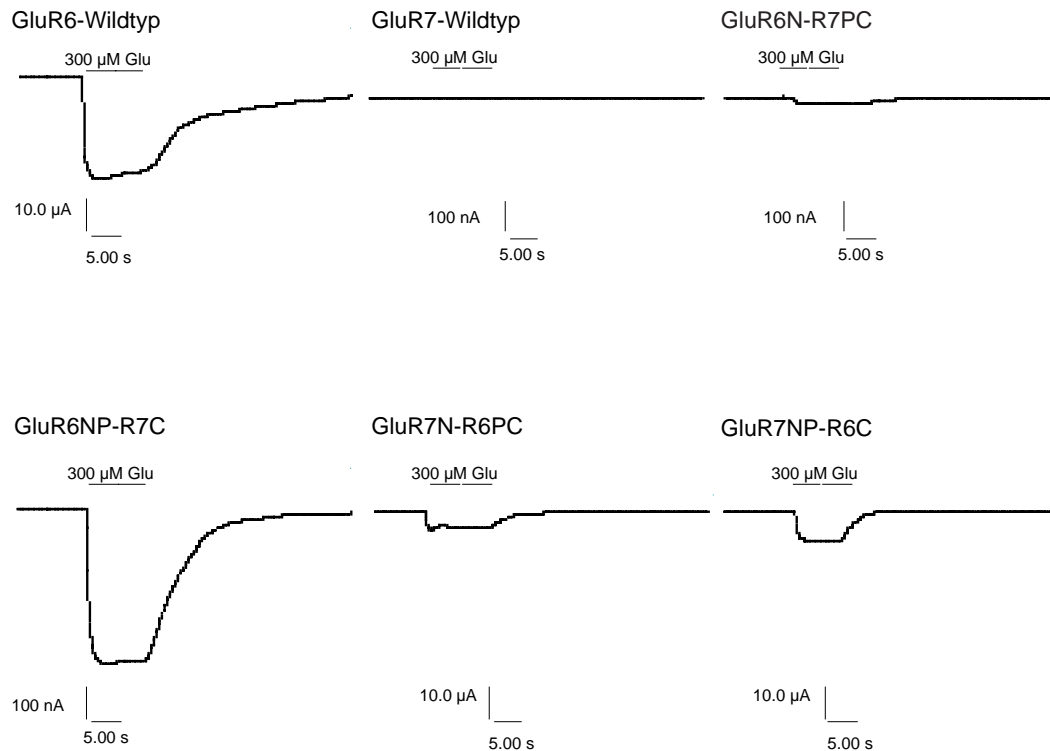
Die Rezeptoren wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Agonisten Kainat und Glutamat wurden jeweils in Konzentrationen von 300  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Anzahl der getesteten Oozyten ist als n angegeben. Alle Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) dar. Alle Stromamplituden geben den Maximalstrom in % vom Wildtyp GluR6 nach Behandlung der Oozyte für 8 min mit ConA an. 0 = keine Stromantwort meßbar.

Alle vier Chimären sind funktionelle Ionenkanäle, die durch Kainat und Glutamat aktiviert werden konnten (siehe Tab. 3.2, Abb. 3.4. + 3.5.). Die Maximal-Stromamplituden von GluR6N-GluR7PC und GluR6NP-GluR7C waren deutlich gegenüber denen von GluR6-Wildtyp reduziert (~0.1-5.5%). Die reversen Konstrukte GluR7N-GluR6PC und GluR7NP-GluR6C hingegen zeigten Ströme, die mit GluR6-Wildtyp-Strömen vergleichbar sind (138-235%).



**Abb. 3.4.:** Vergleich der relativen Stöme von Wildtyp und Chimären zwischen GluR6 und GluR7. Es wurden 300  $\mu$ M Glutamat (Glu) und 300  $\mu$ M Kainat (KA) appliziert. Angegeben sind die Prozentwerte der durch Agonist vermittelten Ströme für die Chimären im Vergleich zu GluR6-Wildtyp-Strom (100%).

Aufgrund dieser Daten liegt die Vermutung nahe, daß für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 die Sequenz C-terminal von der Transmembrandomäne B verantwortlich ist. Es scheint nicht von Bedeutung zu sein, aus welchem der beiden Rezeptoren die Pore stammt, da diese keine Auswirkung auf Maximal-Stromamplituden hat.

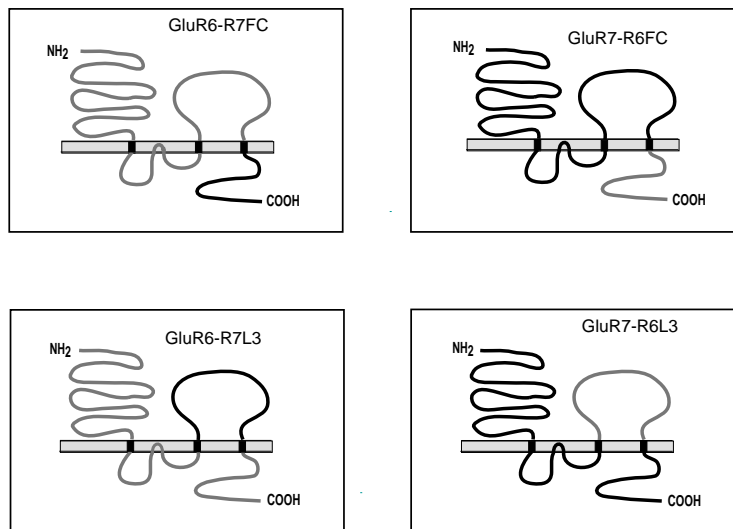


**Abb. 3.5.:** Typischer Verlauf der Stromspuren für Chimären zwischen GluR6 und GluR7. Alle Messungen wurden nach Präinkubation der Oozyten mit 10 μM ConA für 8 min durchgeführt. Als Agonist wurde Glutamat (300 μM) verwendet.

### 3.1.1.3. Domänenaustausch zwischen GluR6 und GluR7: Herstellung der Chimären (II)

Aufgrund der Meßergebnisse der Chimären GluR6N-GluR7PC, GluR6NP-GluR7C, GluR7N-GluR6PC und GluR7NP-GluR6C war es von Interesse, die C-terminale Hälfte der Rezeptoren näher zu untersuchen. Die C-terminale Hälfte besteht aus der L3- und FC-Domäne (= **f**ar **C**-terminal domain) (siehe Abb. 3.1.). Zunächst wurde ein Austausch der FC-Domäne vorgenommen. Die resultierenden Rezeptoren wurden GluR6-GluR7FC (ein GluR6-Rezeptor mit der FC-terminalen Domäne von GluR7) und GluR7-GluR6FC (ein GluR7-Rezeptor mit der FC-terminalen Domäne von GluR6) genannt. Die Klonierungen waren ohne Mutationen möglich, da die in beiden Klonen natürlich vorkommende Nae I-Schnittstelle (siehe Tab.1, Abb 3.1.) in der Sequenz der Transmembrandomäne C und Sal I in der Polylinker-Region des Vektors verwendet werden konnten.

Der Austausch der Domäne L3 erfolgte durch die Verwendung der Restriktionsschnittstellen EcoR I und Nae I (siehe Tab. 3.1). Die so konstruierten Proteine waren ein GluR6-Rezeptor mit der L3 Domäne aus einem GluR7-Rezeptor (GluR6-GluR7L3), bzw. ein GluR7-Rezeptor mit der L3 Domäne aus GluR6 (GluR7-GluR6L3).



**Abb. 3.6.:** Schematische Darstellung der Chimären GluR6GluR7FC, GluR7-GluR6FC, GluR6-GluR7L3 und GluR7-GluR6L3. Graue Linien = GluR6, schwarze Linien = GluR7

#### 3.1.1.4. Charakterisierung der Chimären zwischen GluR6 und GluR7 (II)

Für alle vier Chimären (GluR6-GluR7FC, GluR7-GluR6FC, GluR6-GluR7L3, GluR7-GluR6L3) konnten nach Agonistapplikation (Kainat und Glutamat) Ionenströme gemessen werden. Die Stromamplituden unterschieden sich jedoch erheblich. GluR6-GluR7FC zeigte Ströme, die mit denen von GluR6-Wildtyp vergleichbar waren, während das reverse Konstrukt GluR7-GluR6FC stark reduzierte Ströme aufwies (0.02%-0.12% von GluR6-Wildtyp-Strom) (siehe Tab. 3.3). Die FC-Domäne scheint daher für die funktionellen Unterschiede beider Rezeptoren keine Rolle zu spielen. Demnach blieb nur noch die L3-Domäne als Träger der Funktionsunterschiede übrig.

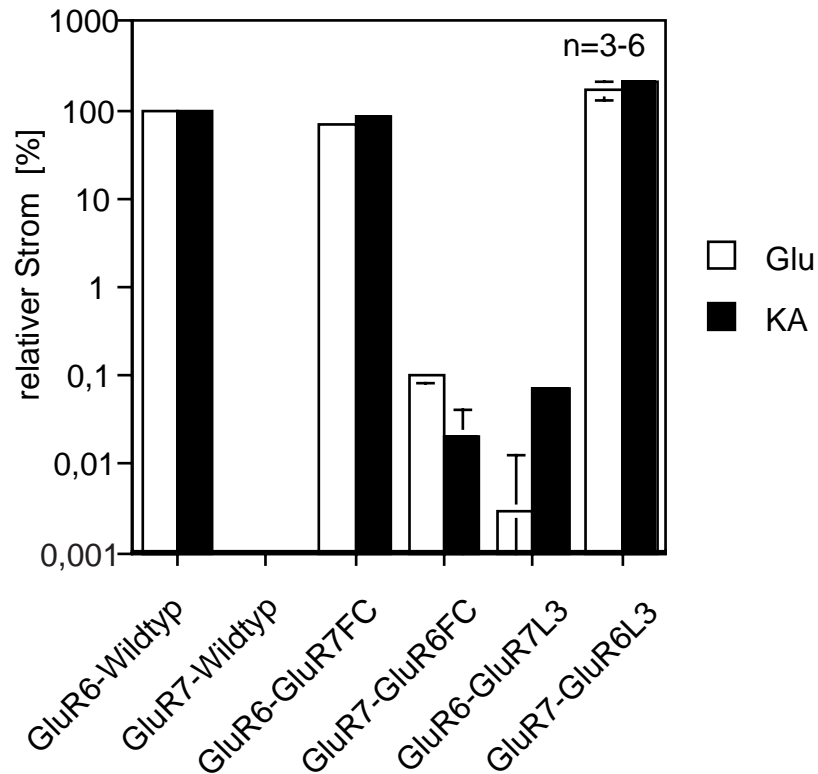
**Tab. 3.3.** Relative Stromamplituden für Chimären zwischen GluR6 und GluR7 (II)

Rezeptor-Untereinheit	Strom KA [%]	Strom Glu [%]	n
GluR6(Q)	100.0 ± 17.9	100.0 ± 21.6	34
GluR7(Q)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3
GluR6-GluR7FC	83.7 ± 5.1	68.6 ± 4.2	3
GluR7-GluR6FC	0.02 ± 0.02	0.1 ± 0.1	4
GluR6-GluR7L3	0.07 ± 0.01	0.003 ± 0.002	6
GluR7-GluR6L3	207.0 ± 39.3	166.3 ± 34.8	4

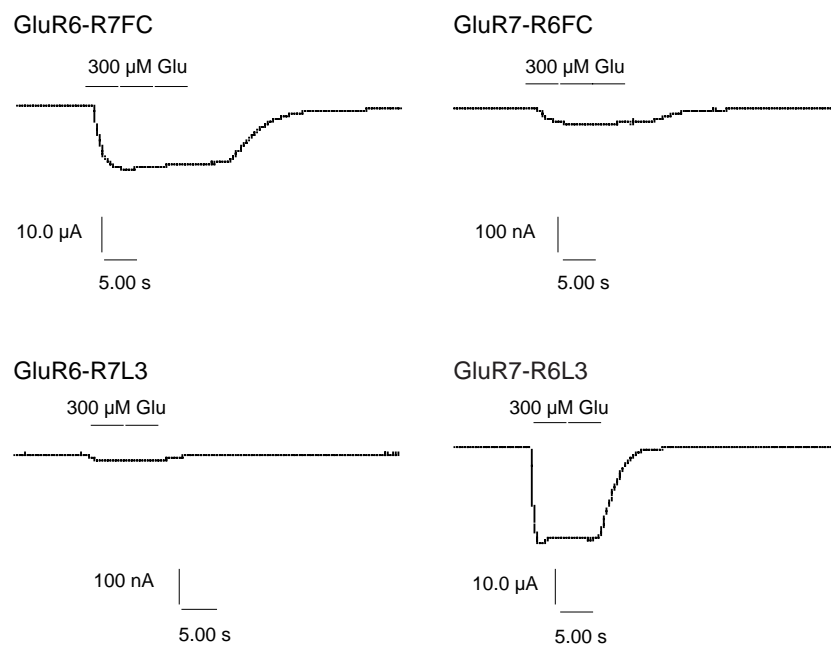
Die Rezeptoren wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Agonisten Kainat und Glutamat wurden jeweils in Konzentrationen von 300  $\mu$ M eingesetzt. Die Anzahl der getesteten Oozyten ist als n angegeben. Alle Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) dar. Alle Stromamplituden geben den Maximalstrom in % vom Wildtyp GluR6 nach Behandlung der Oozyte für 8 min mit ConA an. 0 = keine Stromantwort meßbar.

GluR6-GluR7L3 zeigte ebenfalls stark reduzierte Ströme im Vergleich zu GluR6 (0.003-0.07%). Für GluR7-GluR6L3 war hingegen das umgekehrt Bild zu beobachten. Dieses Konstrukt zeigte Amplituden, die vergleichbar mit GluR6-Wildtyp-Strömen sind (166-207%).

Demnach ist lediglich die L3 Domäne für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 verantwortlich.



**Abb. 3.7.:** Vergleich der relativen Ströme von Wt und Chimären zwischen GluR6 und GluR7. Es wurden  $300 \mu\text{M}$  Glutamat (Glu) und  $300 \mu\text{M}$  Kainat (KA) appliziert. Angegeben sind die Prozentwerte der durch Agonist induzierten Ströme im Vergleich zu GluR6-Wildtyp-Strom (100%).



**Abb. 3.8.:** Typischer Verlauf der Stromspuren für Chimären zwischen GluR6 und GluR7. Alle Messungen wurden nach Präinkubation mit  $10 \mu\text{M}$  ConA für 8 min durchgeführt. Als Agonist wurde Glutamat ( $300 \mu\text{M}$ ) verwendet.

### 3.1.1.5. Domänenaustausch zwischen GluR6 und GluR7: Herstellung der Chimären (III)

Um Aussagen darüber machen zu können, ob die Ursache für den funktionellen Unterschied zwischen GluR6 und GluR7 auf der N-terminalen oder C-terminalen Hälfte der L3-Domäne lokalisiert ist, wurden zwei weitere Chimären konstruiert. Eine der Chimären ist ein GluR7-Rezeptor, der lediglich die C-terminale Hälfte der L3 Domäne plus die FC-Domäne von GluR6 enthält (GluR7-GluR6L3C/FC) (siehe Abb. 3.9.). Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde eine Cla I-Schnittstelle (siehe Tab. 3.1) in die Mitte der L3-Domäne von GluR6 eingeführt. Dieser Klon bekam den Namen GluR6-Cla I. An homologer Position liegt in GluR7 eine Cla I-Schnittstelle natürlich vor, so daß in GluR7 keine Mutation eingefügt werden mußte. Für die Transplantation wurde diese Cla I-Schnittstelle plus eine Cla I-Schnittstelle direkt hinter dem Gen im Vektor verwendet. Des weiteren wurde ein GluR7-Rezeptor konstruiert, der ausschließlich die vordere Hälfte der L3-Domäne von GluR6 besaß, der Rest entstammte GluR7. Diese Chimäre bekam den Namen GluR7-GluR6L3N (siehe Abb. 3.9.).

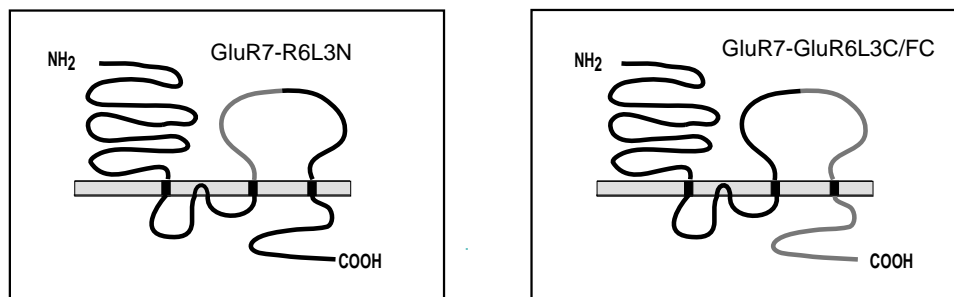


Abb. 3.9.: Schematische Darstellung der Chimären GluR7-GluR6L3N und GluR7-GluR6L3C/FC. Graue Linien = GluR7, schwarze Linien = GluR6.

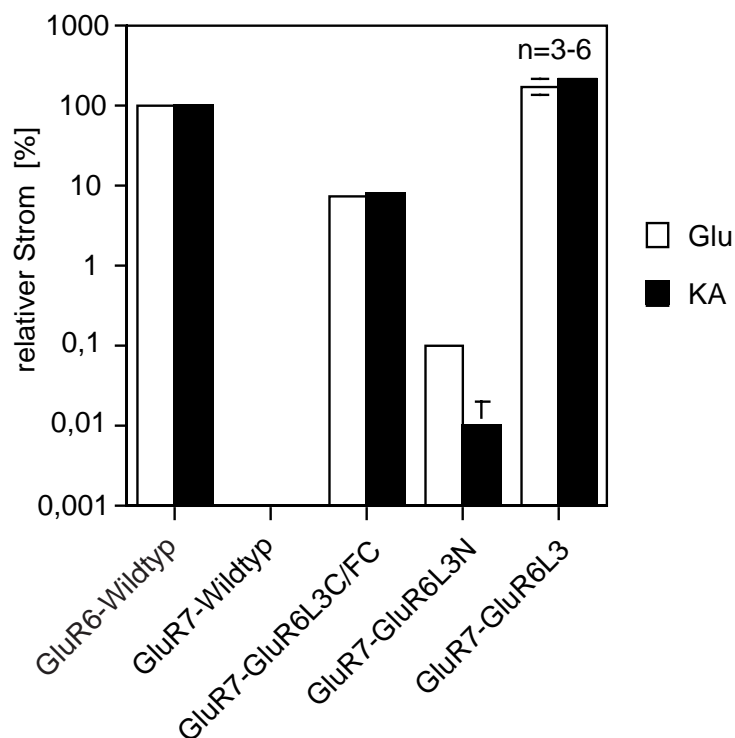
### 3.1.1.6. Charakterisierung der Chimären zwischen GluR6 und GluR7 (III)

Interessanterweise waren bei beiden Chimären reduzierte Stromamplituden zu beobachten. GluR7-GluR6L3C/FC zeigte 7-8% Wildtyp Strom. Im Vergleich zu der Chimäre GluR7-GluR6L3, die die gesamte L3 Domäne von GluR6 enthält, betrug die maximale Stromamplitude 3.8-4.2%. Für GluR7-GluR6L3N waren sogar nur 0.01-0.1% im Vergleich zu GluR6-Wildtyp oder 0.005-0.06% im Vergleich zu GluR7-GluR6L3 zu beobachten (siehe Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4.** Relative Stromamplituden für Chimären zwischen GluR6 und GluR7 (III)

Rezeptor-Untereinheit	Strom KA [%]	Strom Glu [%]	n
GluR6(Q)	100.0 ± 17.9	100.0 ± 21.6	34
GluR7(Q)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3
GluR7-GluR6L3C/FC	7.9 ± 0.5	7.0 ± 0.7	9
GluR7-GluR6L3N	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.03	5
GluR7-GluR6L3	207.0 ± 39.3	166.3 ± 34.8	4

Die Rezeptoren wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Agonisten Kainat und Glutamat wurden jeweils in Konzentrationen von 300  $\mu$ M eingesetzt. Die Anzahl der getesteten Oozyten ist als n angegeben. Alle Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) dar. Alle Stromamplituden geben den Maximalstrom in % vom Wildtyp GluR6 nach Behandlung der Oozyte für 8 min mit ConA an. 0 = keine Stromantwort meßbar.



**Abb. 3.10:** Vergleich der relativen Stöme von Wildtyp und Chimären zwischen GluR6 und GluR7. Es wurden 300  $\mu$ M Glutamat (Glu) und 300  $\mu$ M Kainat (KA) appliziert. Angegeben sind die Prozentwerte der durch Agonist induzierten Ströme für die Chimären im Vergleich zu GluR6-Wildtyp-Strom (100%).



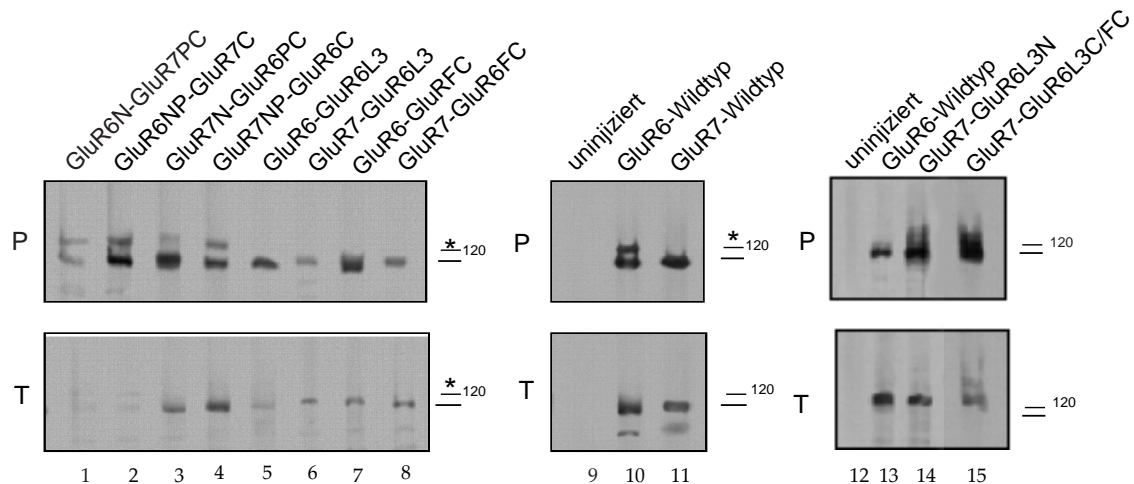
Dieses Ergebnis zeigt, daß es offensichtlich zwei Determinanten auf beiden Hälften der L3-Domäne gibt, die miteinander interagieren. Diese Determinanten - das können Punktmutationen sein, aber auch benachbarte Mehrfachmutationen - scheinen sich bei den Rezeptoren GluR6 und GluR7 zu unterscheiden (siehe GluR6-GluR7L3 und GluR7-GluR6L3). Nur wenn beide Determinanten der L3-Domäne von GluR6 in GluR7 vorliegen, wird GluR7 in einen mit GluR6 vergleichbaren funktionellen Rezeptor verwandelt.

### **3.1.1.7. Untersuchung der Proteinexpression von Chimären zwischen GluR6 und GluR7 mittels Western Blot**

Zur Untersuchung der Expression wurden die Proteine wie unter 2.11.1 beschrieben mit biotinyliertem ConA markiert und durch Streptavidin-Sepharose-Kügelchen präzipitiert. Als spezifischer Erstantikörper wurde der affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper 13-2 verwendet, der ein C-terminales Peptid sowohl in GluR6 als auch in GluR7 erkennt (freundlicherweise von Bop Wenthold, NIH, Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt) (siehe 2.2).

Die Proteinexpression der Chimären war im allgemeinen vergleichbar mit der Proteinexpression der Wildtyp-Rezeptoruntereinheiten (siehe Abb. 3.11.). Lediglich bei den Konstrukten GluR7-GluR6L3 (Abb. 3.11., Spur 6) und GluR6N-GluR7PC (Abb. 3.11., Spur 1) ist eventuell ein reduzierter Einbau in die Oozytenmembran zu erkennen. Im Vergleich zu den beobachteten großen funktionellen Unterschieden kann jedoch die leicht reduzierte Expression dieser beiden Konstrukte für weitere Interpretationen der Daten vernachlässigt werden.

Da gezeigt wurde, daß die Chimären sich nicht signifikant in ihrer Expression von der der Wildtypen unterscheiden, ist die Interpretation der Ergebnisse aus 3.1.1.6 erlaubt.



**Abb. 3.11.:** Vergleich der Proteinexpression von GluR6-Wildtyp, GluR7-Wildtyp und Chimären zwischen GluR6 und GluR7. P = Pelletfraktion (11 Oozyten/Gelspur), T = Totalfraktion (1 Oozyte/Gelspur), (\*) weist auf eine unspezifische Proteinbande hin, uninjiziert = Oozyten ohne cRNA-Injektion. Die Striche unterhalb der 120 kD Marke zeigen auf die erwartete ~ 115 kD Bande von GluR6-Wildtyp und Chimären.

### 3.1.1.8. Erstellung von Dosis-Wirkungskurven und Ermittlung von Agonistenaffinitäten

Die Ligandenbindungsstelle von ionotropen Glutamatrezeptoren setzt sich aus zwei interagierenden, nicht direkt linear miteinander verbundenen Domänen zusammen: der S1-Domäne, N-terminal von Transmembrandomäne A, und der S2-Domäne in der extrazellulären Schleife L3 zwischen den Transmembrandomänen B und C (siehe Abb. 3.11). Die Ligandenbindung erfolgt in einer Tasche, die durch Interaktion der beiden Ligandenbindungsdomänen gebildet wird. Die Affinität, mit der ein Ligand an der entsprechenden Ligandenbindungsstelle haftet, wird durch den sog.  $K_D$ -Wert angegeben. Der  $K_D$ -Wert beschreibt die Konzentration, bei der die halb-maximale Bindung eines Agonisten an seine Bindestelle erreicht ist. Der  $EC_{50}$ -Wert hingegen ist ein Maß für die Wirkung der Bindung eines Agonisten. Er wird als Konzentration, bei der eine halbmaximale Stromantwort hervorgerufen wird, angegeben. Wird der  $EC_{50}$ -Wert durch eine Mutation in einem Rezeptor verändert, kann dieses an einer veränderten Ligandenbindungsaffinität oder an einem veränderten Translationsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Ionenkanalöffnung liegen. Um demnach definitive Aussagen über die Ligandenaffinität treffen zu können, muß in diesen Fällen der  $K_D$ -Wert durch Bindungsstudien (siehe 2.13) ermittelt werden. Unterscheidet sich dieser nicht vom Wildtyp, so kann davon ausgegangen werden, daß der

veränderte  $EC_{50}$ -Wert von einem modifiziertem Translationsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Ionenkanalöffnung herrührt ("gating"). Der  $K_D$ -Wert wird in der Literatur oft fälschlicherweise mit dem  $EC_{50}$ -Wert gleichgesetzt. Die Ermittlung beider Werte ist in den Abschnitten 2.10 und 2.13 beschrieben.

**Tabelle 3.5.**  $EC_{50}$ -Werte für alle Chimären zwischen GluR6 und GluR7

Rezeptor-Untereinheit	$EC_{50}$ KA [ $\mu$ M]	$EC_{50}$ Glu [ $\mu$ M]	n
GluR6(Q)	$1.7 \pm 0.7$	$45.6 \pm 15.2$	3
GluR7(Q)	nm	nm	
GluR6N-GluR7PC	nm	$20.0 \pm 3.5$	3
GluR6NP-GluR7C	$3.7 \pm 1.0$	$47.2 \pm 4.2$	3
GluR7N-GluR6PC	$1.7 \pm 0.2$	$223.0 \pm 65.8$	3
GluR7NP-GluR6C	$1.7 \pm 0.3$	$103.0 \pm 12.5$	3
GluR6-GluR7FC	$1.5 \pm 0.1$	$45.3 \pm 9.0$	4
GluR7-GluR6FC	nm	nm	
GluR6-GluR7L3	nm	nm	
GluR7-GluR6L3	$2.4 \pm 0.6$	$314.0 \pm 92.5$	3
GluR7-GluR6L3C/FC	$2.5 \pm 0.1$	$129.1 \pm 5.0$	3
GluR7-GluR6L3N	nm	$307.3 \pm 16.1$	3

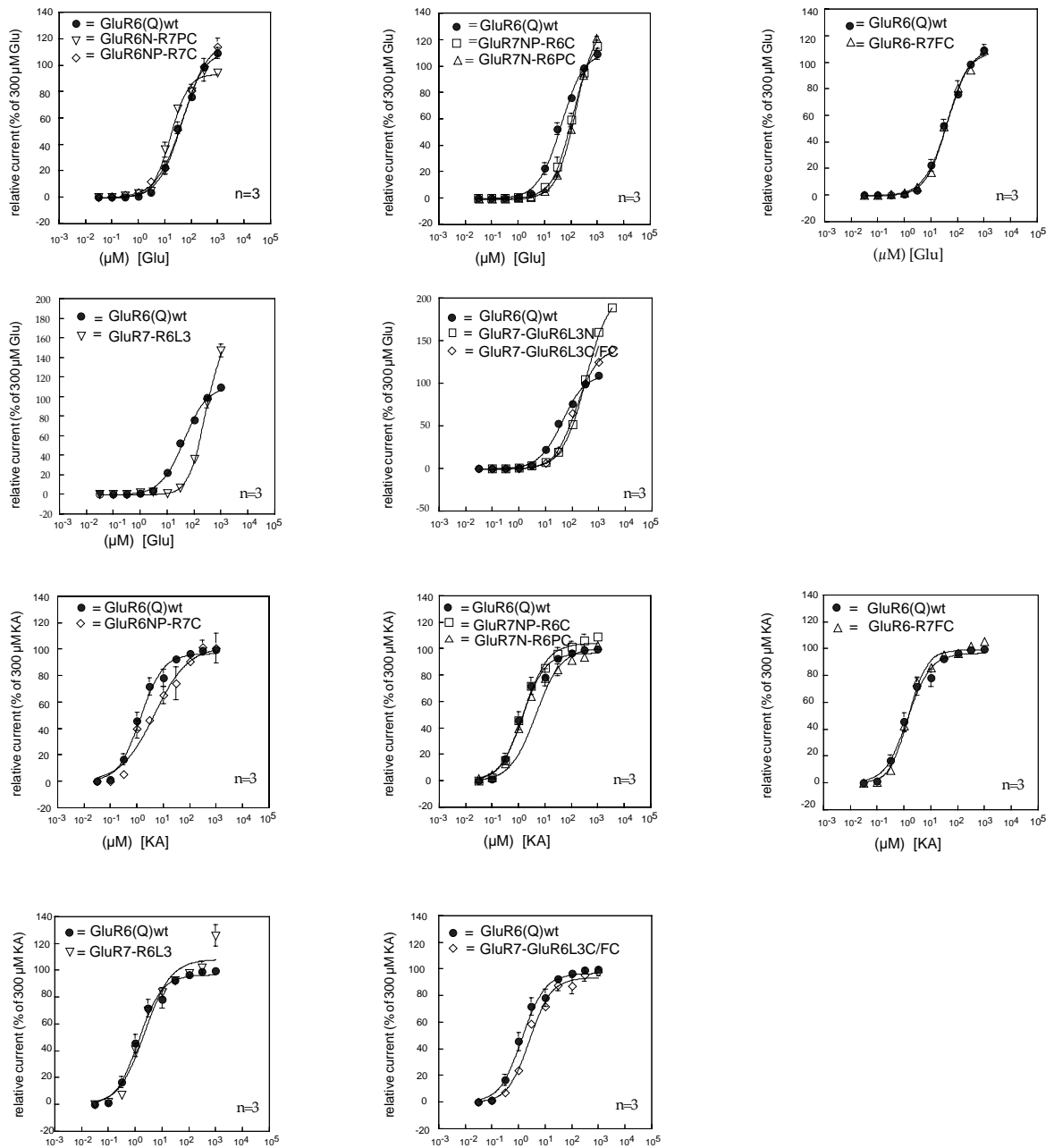
$EC_{50}$ -Werte sind angegeben als Mittelwerte aus n Oozyten  $\pm$  SEM. nm = nicht meßbar

Bei einem Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte der Chimären mit den  $EC_{50}$ -Werten von GluR6-Wildtyp ( $EC_{50}$  für Glu:  $45.6 \pm 15.2$ ;  $EC_{50}$  für KA:  $1.7 \pm 0.7$ ) fällt auf, daß Chimären, die mindestens die L3 Region von GluR6 (GluR7NP-GluR6C, GluR7N-GluR6PC, GluR7-GluR6L3) enthalten, eine 2-6fache Zunahme des  $EC_{50}$ -Wertes für Glutamat zeigen, während der Wert für Kainat unverändert bleibt. Die gleiche Tendenz wurde bei GluR7-GluR6L3C/FC und GluR7-GluR6L3N (2.8fache und 6.7fache Zunahme für Glutamat im Vergleich zu GluR6-Wildtyp) beobachtet. Die erhöhten  $EC_{50}$ -Werte für Glutamat scheinen von der N-terminalen Domäne von GluR7

determiniert zu werden, da keine der Chimären mit der N-terminalen Domäne von GluR6  $EC_{50}$ -Werte aufzeigen, die sich von GluR6-Wildtyp unterscheiden. GluR6- und GluR7-Wildtyp zeigen ähnliche  $K_D$ -Werte (95 nM für GluR6, 77 nM für GluR7) (Bettler et al., 1992). Für die Chimären kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Agonistenbindestelle verändert ist (siehe oben) und die Chimären daher unterschiedliche  $K_D$ -Werte aufweisen, die sich eventuell in den unterschiedlichen  $EC_{50}$ -Werten widerspiegeln. Daher wurden GluR6, GluR7 und GluR7-GluR6L3, die auf GluR7 basierende Chimäre mit den deutlichsten funktionellen Unterschieden, in HEK 293-Zellen exprimiert und die  $K_D$ -Werte für Kainat ermittelt (siehe 2.13). Die  $K_D$ -Werte für Kainat waren 33 nM (GluR6-Wildtyp), 47 nM (GluR7-Wildtyp) und 61 nM (GluR7-GluR6L3). Diese Daten zeigen, daß es im Falle von GluR7-GluR6L3 nicht eine Veränderung des  $K_D$ -Wertes ist, die für die Funktionalität des Ionenkanals verantwortlich ist. Im Gegenteil, die Daten liefern einen weiteren Hinweis dafür, daß der Translationsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Ionenkanalöffnung bei GluR7 verändert ist.

### 3.1.2. Punktmutationen in GluR6 und GluR7

Die aus der Analyse der Chimären gewonnenen Daten zeigten eindeutig, daß die L3-Domäne für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 verantwortlich ist. Dies ist um so überraschender, als gerade in der L3-Domäne die Aminosäuresequenzidentität zwischen beiden Rezeptoren besonders groß ist (88%). Lediglich 20 Aminosäuren unterscheiden sich. Um zu untersuchen, ob die Mutation einer oder mehrerer dieser Aminosäuren in der L3-Domäne GluR7 in einen funktionellen Rezeptor verwandeln kann, wurden die Aminosäure-Positionen mit den auffälligsten Unterschieden ausgewählt und reziproke Punktmutationen in GluR6 und GluR7 getestet. Einige der Aminosäuren konnten im Vorfeld ausgeschlossen werden, da Swanson et al. 1997 diese bereits unter einer anderen Zielsetzung mutiert hatte. Bei diesen Aminosäuren handelte es sich um die Positionen E655, D672, R682, V685, S689, S701, and F705 in GluR6 (siehe Abb. 3.13), die von Swanson R6(E686R), R6(D703E), R6(R713Q), R6(V716A), R6(S720N), R6(S731T) und R6(F735L) genannt wurden, da eine andere Nummerierung gewählt worden war, bei der das Signalpeptid mitgezählt wurde.



**Abb. 3.12.:** EC50s wurden durch Applikation von 10-11 verschiedenen Agonistenkonzentrationen (0.03; 0.1; 0.3; 1; 3; 10; 30; 100; 300; 1000; 3000 μM) für Glutamat und Kainat erstellt. Als Standardkonzentration zur Normierung wurden vor und nach jeder Messung 300 μM Agonist appliziert.





Von den restlichen Aminosäuren wurden die folgenden für reziproke Punktmutationen ausgewählt:

GluR6(E655K) und GluR7(K626E),

GluR6( $\Delta$ R681/R682K/Q683P) und GluR7(insR651a/K652R/P653Q),

GluR6(M762I) und GluR7(I731M),

GluR6(V733I) und GluR7(I704V),

GluR6(S762N) und GluR7(N748S),

GluR6(N772K) und GluR7(K758N).

Von diesen Punktmutanten waren alle GluR6-Mutanten, sowie GluR7(K626E), GluR7(insR651a/K652R/P653Q), GluR7(N748S) und GluR7(K758N) in der Lage, funktionelle Rezeptoren zu bilden, die mit 300  $\mu$ M Agonist (Glu oder KA) aktiviert werden konnten. Zum ersten Mal konnte eine GluR7-Punktmutante mit physiologischen Agonistenkonzentrationen gemessen werden. Die Maximalströme variierten unter den Punktmutanten: Für GluR6(E655K), GluR6( $\Delta$ R681/R682K/Q683P), GluR6(V733I) und GluR6(S762N) waren die Ströme mit denen von GluR6-Wildtyp vergleichbar (78%-151%). Im Gegensatz dazu waren die glutamat- und kainat-induzierten Stöme für GluR6(N772K) um ca. 50% reduziert, für GluR6(M762I) sogar um ca. 90% (siehe Tabelle 3.6). Bei der Untersuchung der Oberflächenexpression der Rezeptoren fällt für GluR6(M762I) jedoch eine verminderte Inkorporation in die Oozytenplasmamembran auf, die zumindest zum Teil die reduzierten Stromamplituden erklären könnte (siehe Abb. 3.14., Spur 6). Die vier GluR7-Punktmutanten GluR7(K626E), GluR7(N748S), GluR7(K758N) und GluR7(insR651a/K652R/P653Q) zeigten glutamat- und/oder kainat-induzierte Ströme, wobei GluR7(K758N) mit 2% Wildtyp-Strom die größten Stromamplituden aufwies (siehe Tab. 3.6).

Die Punktmutanten GluR7(N748S) und GluR7(K758N) sind beide in der kurzen Sequenz lokalisiert, die die S2 Domäne mit der Transmembrandomäne C verbindet (= Linker C). Da beide

Punktmutanten funktionelle Rezeptoren gebildet haben, schien es lohnenswert, die gesamte Linker C-Sequenz zwischen den Proteinen auszutauschen, um zu testen, ob so der GluR7-Rezeptor in Bezug auf die Maximalamplitude in einen GluR6-Rezeptor umgewandelt werden kann. Der Linker C unterscheidet sich in GluR7 und GluR6 außer in den Aminosäurepositionen N748 und K758 zusätzlich noch an Position I756, da an homologer Stelle in GluR6 ein Valin vorliegt. Die Linker-Konstrukte wurden mittels PCR hergestellt und GluR6-GluR7(Linker C) (= GluR6 Klon mit der Linker C-Region von GluR7) und GluR7-GluR6(Linker C) (= GluR7 Klon mit der Linker C-Region von GluR6) genannt. Interessanterweise ergab der Austausch der gesamten Linkerregion für beide Konstrukte keine Veränderung der Stromamplituden im Vergleich zu den Einzel-Punktmutanten GluR7(K758N) oder GluR6(N772K) (siehe Tab. 3.6). Die Effekte der Punktmutationen in Linker C sind demnach nicht additiv.

Eine weiteres vielversprechendes Konstrukt schien eine Kombination des GluR7-GluR6(Linker C) mit der ebenfalls funktionellen GluR7 Punktmutante GluR7(K626E) zu sein. Das resultierende Konstrukt wurde GluR7-GluR6(Linker C)/(K626E) genannt. Auch diese Kombinationsmutante zeigte keine signifikanten Unterschieden in ihrer Stromamplitude im Vergleich zu GluR7-GluR6(Linker C).



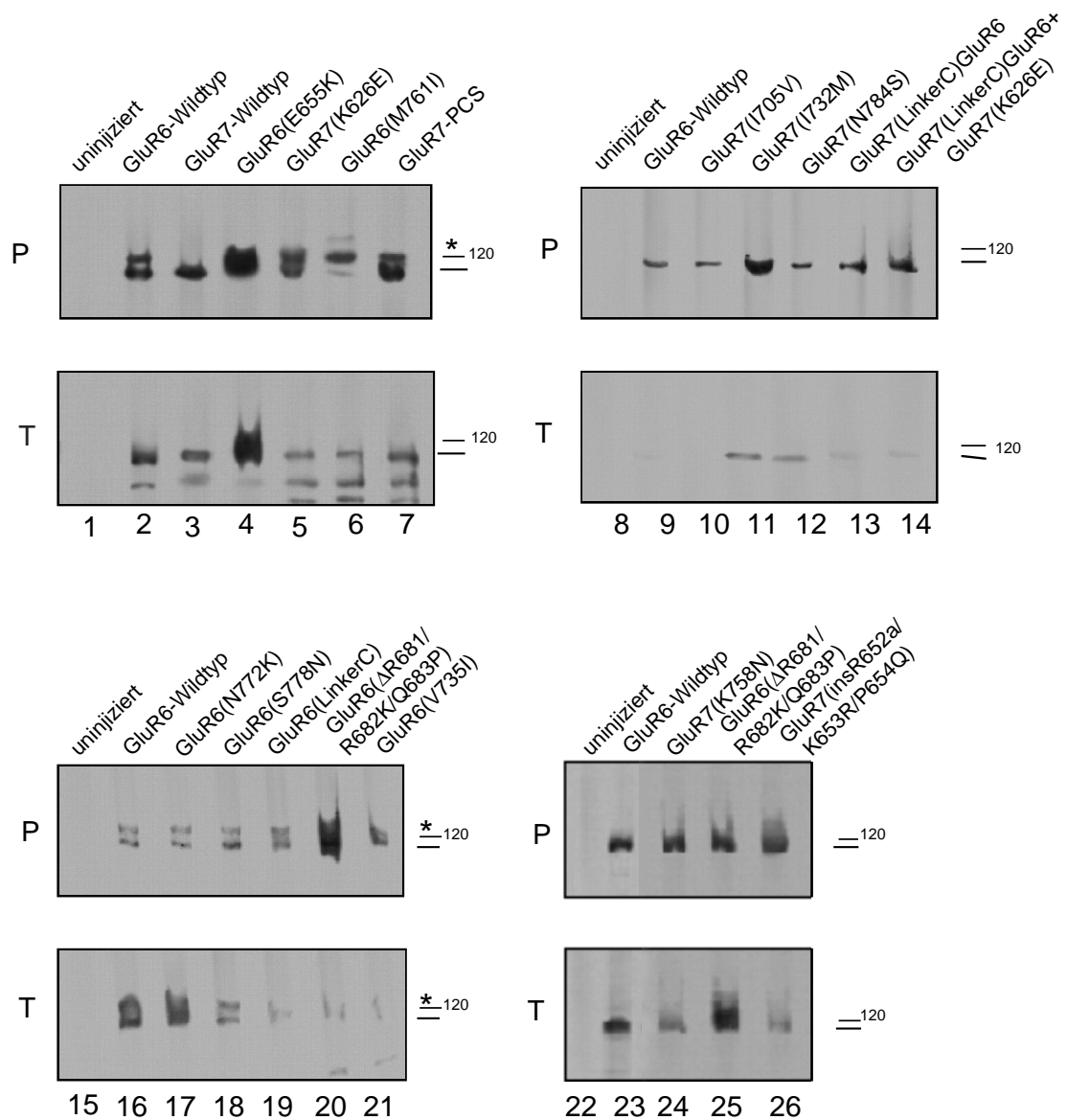
**Tabelle 3.6.** Relative Stromamplituden für GluR6- und GluR7-Punktmutanten

Rezeptor-Untereinheit	Strom KA [%]	Strom Glu [%]	n
GluR6(Q)	100.0 ± 17.9	100.0 ± 21.6	34
GluR7(Q)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3
GluR6(E655K)	101.5 ± 23.8	94.8 ± 22.2	3
GluR7(K626E)	0.0 ± 0.0	0.02 ± 0.01	3
GluR6(N772K)	41.6 ± 16.9	49.5 ± 21.6	14
GluR7(K758N)	0.16 ± 0.06	1.8 ± 0.9	14
GluR6(S762N)	77.8 ± 3.5	78.8 ± 1.9	3
GluR7(N748S)	0.0 ± 0.0	0.03 ± 0.01	8
GluR6(V735I)	151.0 ± 41.0	136.8 ± 38.4	3
GluR7(I705V)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3
GluR6(M762I)	9.5 ± 2.7	7.3 ± 1.9	4
GluR7(I732M)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4
GluR6( $\Delta$ R681/ R682K/Q683P)	112.6 ± 5.3	106.3 ± 9.3	3
GluR7(insR651a /K652R/P653Q)	0.0 ± 0.0	0.02 ± 0.01	3
GluR6-GluR7(linkerC)	35.6 ± 6.1	30.2 ± 4.7	7
GluR7-GluR6(linkerC)	0.03 ± 0.01	0.6 ± 0.1	8
GluR7-GluR6(linkerC)/ (K626E)	0.82 ± 0.05	1.2 ± 0.4	4

Die Rezeptoren wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Agonisten Kainat und Glutamat wurden jeweils in Konzentrationen von 300  $\mu$ M eingesetzt. Die Anzahl der getesteten Oozyten ist als n angegeben. Alle Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) dar. Alle Stromamplituden geben den Maximalstrom in % vom Wildtyp GluR6 nach Behandlung der Oozyte für 8 min mit ConA an. 0 = keine Stromantwort meßbar.

Die Analyse von Western Blots beweist, daß sämtliche Mutanten exprimiert und in die Oozytenplasmamembran inkorporiert wurden (Abb. 3.14.).

Lediglich bei dem bereits oben erwähnten GluR6(M762I) und bei GluR6( $\Delta$ R681/R682K/Q683P) waren unterschiedliche Expressionsmuster zu erkennen. Bei GluR6( $\Delta$ R681/R682K/Q683P) war eine sehr viel stärkere Inkorporation zu sehen (siehe Abb. 3.14, Spur 20) als bei den übrigen Klonen. In einem Wiederholungsexperiment hingegen unterschied sich die Expression nicht (siehe Abb. 3.14, Spur 25).



**Abb. 3.14.:** Vergleich der Proteinexpression von GluR6-Wildtyp, GluR7-Wildtyp, GluR6-Mutanten und GluR7-Mutanten. P = Pelletfraktion (11 Oozyten/Gelspur), T = Totalfraktion (1 Oozyte/Gelspur), (\*) weist auf eine unspezifische Proteinbande hin, uninjiziert = Oozyten ohne cRNA-Injektion. Die Striche unterhalb der 120 kD Marker zeigen auf die erwartete ~ 115 kD Bande von GluR6-Wildtyp und Chimären.

**Tabelle 3.7.** EC<sub>50</sub>-Werte für alle GluR6- und GluR7-Punktmutanten

Rezeptor- Untereinheit	EC <sub>50</sub> KA [μM]	EC <sub>50</sub> Glu [μM]	n
GluR6(Q)	1.7 ± 0.7	45.6 ± 15.2	3
GluR7(Q)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3
GluR6(E655K)	0.8 ± 0.1	23.4 ± 4.2	3
GluR7(K626E)	0.0 ± 0.0	nm	
GluR6(N772K)	3.0 ± 0.3	71.6 ± 7.4	3
GluR7(K758N)	1.2 ± 0.1	79.5 ± 2.1	3
GluR6(S762N)	1.0 ± 0.2	31.0 ± 1.5	3
GluR7(N748S)	0.0 ± 0.0	184.0 ± 12.8	3
GluR6(V735I)	0.40 ± 0.06	13.9 ± 0.6	3
GluR7(I705V)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
GluR6(M762I)	1.60 ± 0.01	54.9 ± 2.5	3
GluR7(I732M)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
GluR6(ΔR681/ R682K/Q683P)	0.50 ± 0.07	77.8 ± 3.5	3
GluR7(insR651a /K652R/P653Q)	0.0 ± 0.0	nm	3
GluR6-GluR7(linkerC)	1.9 ± 0.4	54.3 ± 4.9	3
GluR7-GluR6(linkerC)	nm	81.4 ± 4.2	3
GluR7-GluR6(linkerC)/ (K626E)	1.2 ± 0.2	61.3 ± 3.7	3

EC<sub>50</sub>-Werte sind angegeben als Mittelwerte aus n Oozyten ± SEM. nm = nicht meßbar

Die EC<sub>50</sub>-Werte der GluR6-Mutanten waren entweder unverändert für Glutamat und Kainat (GluR6(E655K), GluR6(S762N), GluR6(M762I), GluR6-GluR7(Linker C)), leicht verringert (GluR6(V735I)) oder leicht erhöht (GluR6(N772K), GluR6(ΔR651/R682K/Q683P)). Die Unterschiede sind jedoch nicht als signifikant zu bewerten. Anders sieht es für die GluR7-Punktmutanten aus, für die ein Vergleich mit GluR7-Wildtyp allerdings

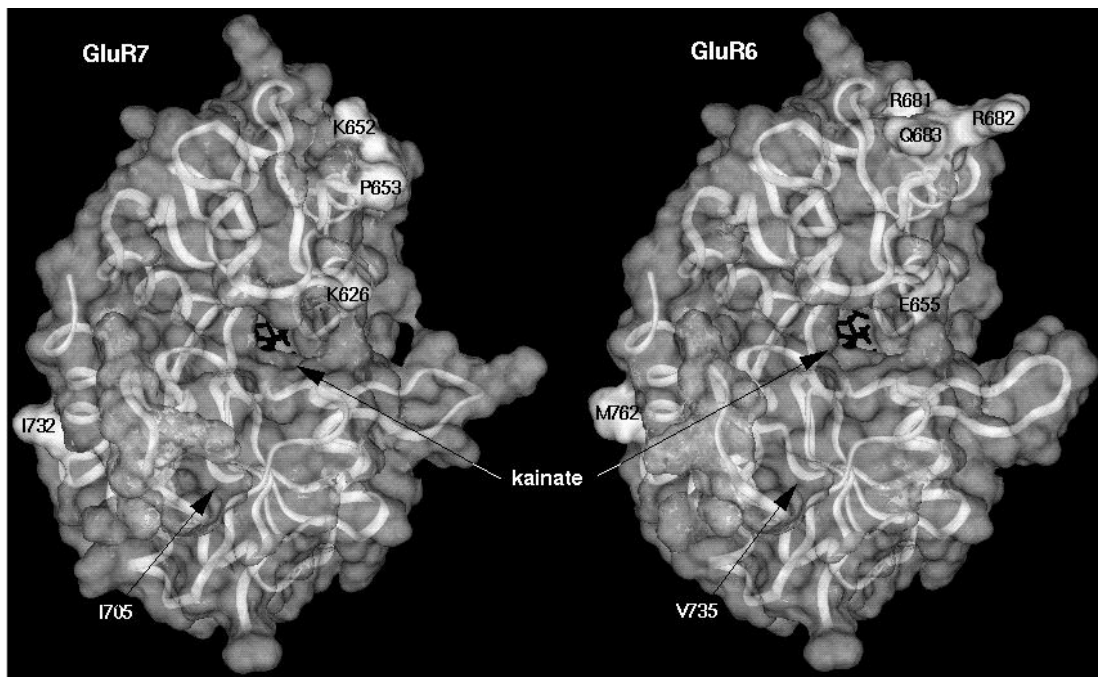
schwierig ist, da es bislang nicht möglich war, GluR7 in Oozyten zu messen. Somit konnten auch keine EC<sub>50</sub>-Werte bestimmt werden. In der Literatur ist lediglich ein EC<sub>50</sub>-Wert von 6 mM für Glutamat für in HEK 293-Zellen exprimierten GluR7-Wildtyp zu finden (Schiffer et al., 1997). Im Vergleich zu diesem EC<sub>50</sub>-Wert zeigen sämtliche GluR7-Punktmutanten erheblich reduzierte EC<sub>50</sub>-Werte für Glutamat (1-5% vom GluR7-Wildtyp EC<sub>50</sub>-Wert). Wenn jedoch ein Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte der GluR7-Punktmutanten zu denen von GluR6-Wildtyp vorgenommen wird, wird eine Tendenz in Richtung gesteigerte EC<sub>50</sub>-Werte für Glutamat deutlich (2-4fach). Für Kainat unterschieden sich die EC<sub>50</sub>-Werte nicht von GluR6-Wildtyp.

### 3.1.3. Koexpression von GluR7-Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die L3-Domäne für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 verantwortlich ist. Das Konstruieren einer GluR7-Chimäre, mit der Folge, daß die L3-Domäne in zwei Hälften geteilt wurde, wobei die vordere Hälfte von GluR7 und die hintere Hälfte von GluR6 stammte, resultierte in einer auffälligen Reduktion der agonisten-induzierten Stromamplituden. Daher spielen sehr wahrscheinlich Aminosäuren in beiden Hälften der L3-Domäne eine Rolle für die Bildung eines hoch funktionellen Kainatrezeptor-Kanals.

Vor kurzem ist die Röntgenkristallstrukturanalyse der Ligandenbindungsdomäne von GluR2 mit gebundenem Kainat gelungen (Armstrong et al., 1998). Mit Hilfe dieser Kristallstruktur war es möglich, Modelle für die Ligandenbindungsdomänen von GluR6 und GluR7 durch Sequenzvergleich zu erstellen (siehe Abb. 3.15. + 3.16.). Diese Modelle sollten Hinweise auf Aminosäuren liefern, die in den beiden Hälften der L3-Domäne lokalisiert sind und miteinander interagieren. Die Analyse der Modelle ergab, daß die Aminosäuren, die in GluR6 und GluR7 unterschiedlich sind, nur mit solchen Aminosäuren direkt interagieren, die in beiden Rezeptoren identisch sind. Die meisten unterschiedlichen Aminosäuren in der S2-Domäne sind zudem vermutlich an der Oberfläche des Proteins positioniert, also nach außen exponiert, und keine der Aminosäuren befindet sich in der Nähe der Ligandenbindungsstelle von Kainat. Dieser Ansatz lieferte demnach keinen Hinweis auf interagierende Aminosäuren in den beiden Hälften der L3-Domäne, die sich in GluR6 und GluR7 unterscheiden und die für die funktionellen Unterschiede verantwortlich sein könnten. Er zeigte jedoch, daß die Funktionalität der

GluR7-Mutanten GluR7(K758N) und GluR7(insR651a/K652R/P653Q) nicht durch eine veränderte Interaktion mit der Kainatbindestelle zu erklären ist. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß es sich bei der Röntgenkristallstruktur der isolierten Ligandenbindungsstelle lediglich um ein Modell des nativen Rezeptors handelt, das zwar wahrscheinlich ist, aber durchaus auch anders aussehen könnte.



**Abb. 3.15.:** Dreidimensionale Modelle der Ligandenbindungsdomänen von GluR6 (rechts) und GluR7 (links). Die Modelle basieren auf der Röntgenkristallstruktur der entsprechenden Ligandenbindungsdomänen von GluR2. Das gebundene Agonistmolekül Kainat ist als schwarze Struktur im Inneren der Modelle dargestellt. Die markierten Aminosäuren sind solche, die sich in beiden Rezeptoren unterscheiden und im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurden. Die Aminosäuren zeigen weder eine Interaktion untereinander, noch mit dem Agonist Kainat.

				383		400
GluR2	Start mit der S1 Domäne			SGNDTSGL		ENKTVVVTTI
GluR6	Start mit der S1 Domäne			PANITDSL		SNRSLIVTTI
GluR7	Start mit der S1 Domäne			GPNVTDSL		TNRSLIVTTL
		401				450
GluR2	LESPYVMMKK	NHEMLEGNER	YEGYCVDLAA	EIAKHCGFKY		KLTIVGDGKY
GluR6	LEEPYVLFKK	SDKPLYGNDR	FEGYCIDLLR	ELSTILGFTY		EIRLVEDGKY
GluR7	LEEPFVMFRK	SDRTLYGNDR	FEGYCIDLLK	ELSTILGFSY		EIRLVEDGKY
		451				500
GluR2	GARDADTKIW	NGMVGELVYG	KADIAIAPLT	ITLVREEVID		FSKPFMSLGI
GluR6	GAQDDVNGQW	NGMVRELIDH	KADLAVAPLA	ITyVREKVID		FSKPFMTLGI
GluR7	GAQDD.KGQW	NGMVKELIDH	KADLAVAPLT	IThVREKAID		FSKPFMTLGV
		501	524			623 630
GluR2	SIMIKKPQKS	KPGVFSFLDP	LAYE	Linker		FLTVERMV
GluR6	SILYRKPNGT	NPGVFSFLNP	LSPD	Linker		FLTVERME
GluR7	SILYRKPNGT	NPSVFSFLNP	LSPD	Linker		FLTVERME
		631				680
GluR2	SPIESAEDLS	KQTEIAYGTL	DSGSTKEFFR	RSKIAVFDKM		WTYMRSAPES
GluR6	SPIDSADDLA	KQTKIEYGAV	EDGATMTFFK	KSKISTYDKM		WAFMSSRRQS
GluR7	SPIDSADDLA	KQTKIEYGAV	KDGATMTFFK	KSKISTFEKM		WAFMSS.KPS
		681				730
GluR2	VFVRTTAEGV	ARVRKSKGKY	AyLLESTMNE	YIEQRKPCDT		MKVGGNLDSK
GluR6	VLVKSNEEGI	QRVLTS..DY	AfLMESTTIE	FVTQRN.CNL		TQIGGLIDSK
GluR7	ALVKNNEEGI	QRTLTa..DY	ALLMESTTIE	YITQRN.CNL		TQIGGLIDSK
		731				780
GluR2	GYGIATPKGS	SLGNAVNLAV	LKLNEOGLLD	KLKNKWWYDK		GECGSGGGDS
GluR6	GYGVGTPMGS	PYRDKITIAI	LQLQEEGKLH	MMKEKWWRGN		G.CPE...EE
GluR7	GYGIGTPMGS	PYRDKITIAL	LQLQEEDKLH	IMKEKWWRGS		G.CPE...EE
		781	790			
GluR2	KEKTSALSLS			Ende nach der S2 Domäne		
GluR6	SKEASALGVQ			Ende nach der S2 Domäne		
GluR7	NKEASALGIQ			Ende nach der S2 Domäne		

**Abb. 3.16.:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der Ligandenbindungsdomänen S1 und S2 von GluR2, GluR6 und GluR7. Der Sequenzvergleich basiert auf der GluR2-Sequenz, wie sie in Armstrong et al., 1998 angegeben ist. Aminosäuren, die sich in dem dargestellten Bereich zwischen GluR6 und GluR7 unterscheiden, sind grau hinterlegt.

Es bestand noch die Möglichkeit, mittels Koexpression von Punktmutanten nach interagierenden Aminosäuren zu suchen. Zu diesem Zweck wurden die cRNAs der Klone, die koexprimiert werden sollten, vor der Injektion in Oozyten zu gleichen Teilen vermischt. Es sollten demnach Komplexe mit gemischten mutierten Untereinheiten entstehen. Als erstes wurden Kombinationen getestet, bei denen eine Punktmutation in der ersten Hälfte der L3-Domäne (GluR7(insR651a/K652R/P653Q) oder GluR7(K626E)) mit GluR7-GluR6L3C/FC koexprimiert wurde, bei dem die gesamte zweite



Hälfte der L3-Domäne plus der Bereich C-terminal von Transmembrandomäne C von GluR6 stammt. Interessanterweise war bei beiden Kombinationen kein signifikanter Anstieg der Stromamplituden im Vergleich zur Einzelexpression von GluR7-GluR6L3C/FC zu erkennen. Die Kombination von GluR7(InsR651a/K652R/P653Q) mit GluR7-GluR6L3C/FC zeigte 9.5% (Glu) und 14.9% (KA), die Kombination von GluR7(K626E) mit GluR7-GluR6L3C/FC zeigte 6.9% (Glu) und 0.7% (KA) GluR6-Wildtyp-Strom. Für sämtliche andere getestete Kombinationen (GluR7(InsR651a/K652R/P653Q) + GluR7(K758N), GluR7(K626E)+GluR7(I731M), GluR7(InsR651a/K652R/P653Q) + GluR7(I731M), GluR7(I731M) + GluR7(K758N)) waren entweder nur winzige oder gar keine Ströme meßbar (siehe Tab. 3.8). Die Koexpression von Punktmutanten lieferte demnach keine verwertbaren Informationen. Interessantere Ergebnisse lieferte jedoch die Koexpression der Chimären GluR7-GluR6L3C/FC und GluR7-GluR6L3N. Auch bei dieser Kombination waren keine größeren Stromamplituden (0.8%) im Vergleich zu den Homomerströmen beider Mutanten (0.01% - 8%) zu verzeichnen. Bei dieser Kombination (GluR7-GluR6L3C/FC und GluR7-GluR6L3N) liegt die komplette L3-Domäne von GluR6 vor, allerdings auf zwei verschiedenen Untereinheiten. Die Chimäre GluR7-GluR6L3 (siehe Tab. 3.4) besitzt ebenfalls die gesamte L3-Domäne von GluR6, wobei in diesem Konstrukt jedoch die L3-Domäne auf ein und derselben Untereinheit liegt. GluR7-GluR6L3 zeigte in homomerer Expression Stromamplituden von 166-207% (siehe Tab. 3.4), während die Koexpression von GluR7-GluR6L3C/FC und GluR7-GluR6L3N lediglich 0.8% Strom (für Glutamat und Kainat) im Vergleich zu GluR6-Wildtyp ergab. Es muß an dieser Stelle berücksichtigt werden, daß neben der unterschiedlichen Lokalisation der L3-Domäne in Bezug auf Untereinheiten, ein weiterer Unterschied zwischen der Chimäre GluR7-GluR6L3 und der Kombination GluR7-GluR6L3C/FC plus GluR7-GluR6L3N vorliegt: Bei der Kombination liegt neben der L3-Domäne zusätzlich die FC-Domäne von GluR6 vor. Die FC-Domäne spielt für die Interpretation der Daten allerdings keine Rolle, wie durch einen Vergleich der Chimären GluR7N-GluR6PC und GluR7NP-GluR6C gezeigt wurde. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, daß die interagierenden Determinanten in der L3-Domäne, die an der Bildung eines hoch funktionellen Ionenkanals beteiligt sind, auf derselben Untereinheit lokalisiert sein müssen.

**Tabelle 3.8.** Relative Stromamplituden für die Koexpression von GluR7-Mutanten

Rezeptor- Untereinheit	Strom KA [%]	Strom Glu [%]	n
GluR6(Q)+H <sub>2</sub> O	100.0 ± 9.7	100.0 ± 8.6	7
GluR7(InsR651a/K652R/P653Q) + GluR7(K758N)	0.2 ± 0.1	1.9 ± 1.0	5
GluR7(InsR651a/K652R/P653Q) + GluR7(I731M)	0.8 ± 0.3	2.1 ± 0.7	5
GluR7(K626E) + GluR7(I731M)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3
GluR7(I731M) +GluR7(K758N)	0.09 ± 0.04	0.90 ± 0.04	6
GluR7(InsR651a/K652R/P653Q) + GluR7-GluR6L3C/FC	14.9 ± 5.8	9.5 ± 3.6	4
GluR7(K626E) + GluR7-GluR6L3C/FC	6.9 ± 4.0	6.7 ± 4.5	4
GluR7-GluR6L3N + GluR7-GluR6L3C/FC	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	3

Die Rezeptoren wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Agonisten Kainat und Glutamat wurden jeweils in Konzentrationen von 300  $\mu$ M eingesetzt. Die Anzahl der getesteten Oozyten ist als n angegeben. Alle Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) dar. Alle Stromamplituden geben den Maximalstrom in % vom Wildtyp GluR6 nach Behandlung der Oozyte für 8 min mit ConA an. 0 = keine Stromantwort meßbar.

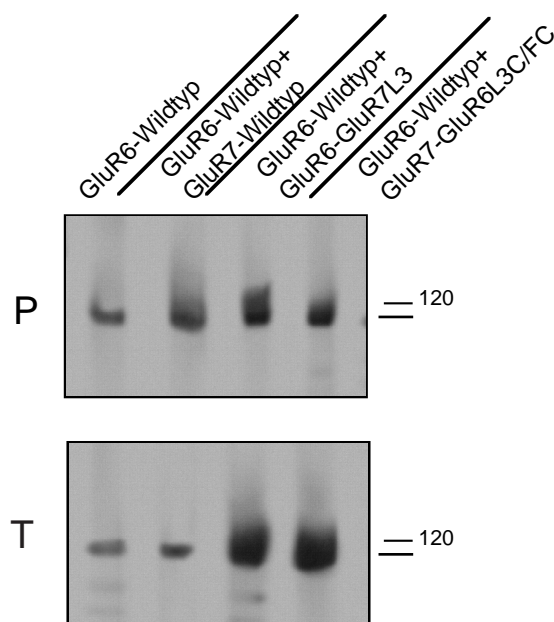
### 3.1.4. Koexpression von GluR6-Wildtyp mit GluR7-Chimären oder Punktmutanten

Vor kurzem konnte von Cui und Mayer (Cui und Mayer, 1999) gezeigt werden, daß in einer Koexpression von GluR7 mit GluR6 eine deutliche Verringerung der Stromamplitude der GluR6-Stromantwort nach Kainat-Applikation auftrat. Es war daher im Rahmen dieses Projektes von Interesse, zu untersuchen, ob die Chimären zwischen GluR6 und GluR7 oder GluR7-Punktmutanten eventuell ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf GluR6-Wildtyp ausüben können, und ob vielleicht die gleiche



Region in GluR7, die für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 verantwortlich ist (= L3-Domäne) auch für den reduzierenden Effekt verantwortlich ist.

Zunächst wurde die Inkorporation der Rezeptoruntereinheiten in die Oozytenplasmamembran für die Expression von GluR6-Wildtyp, GluR6-Wildtyp mit GluR7-Wildtyp, GluR6-Wildtyp mit GluR6-GluR7L3 und GluR6-Wildtyp mit GluR7-GluR6L3C/FC (siehe Abb. 3.17.) gezeigt.



**Abb. 3.17.:** Vergleich der Proteinexpression von GluR6-Wildtyp, GluR7-Wildtyp und Chimären zwischen GluR6 und GluR7. P = Pelletfraktion (11 Oozyten/Gelspur), T = Totalfraktion (1 Oozyte/Gelspur), (\*) weist auf eine unspezifische Proteinbande hin, uninjiziert = Oozyten ohne cRNA-Injektion. Die Striche unterhalb der 120 kD Marke zeigen auf die erwartete ~115 kD-Bande von GluR6-Wildtyp und Chimären.

Für die Koexpression wurden beide Untereinheiten im Verhältnis 1:1 gemischt und 100 nl (= 20 ng) RNA-Lösung in Oozyten injiziert. Für Messungen von Homomerkomplexen wurden 50 nl (= 10 ng) RNA-Lösung injiziert. Da die Relativströme der Heteromerkomplexe später mit denen der Homomerkomplexe verglichen werden sollten, wurde in einem Vorexperiment überprüft, ob der Expressionslevel von Rezeptoren tatsächlich das Doppelte beträgt, wenn 100 nl RNA-Lösung anstelle von 50 nl RNA-Lösung injiziert wird. Nur wenn dies bestätigt werden kann, ist ein direkter Vergleich der relativen Stromamplituden aus Homomer- mit denen aus Heteromereexperimenten erlaubt. Der Versuch wurde mit GluR6-

Wildtyp durchgeführt. Es ergab sich tatsächlich ein lineares Verhältnis der Stromamplituden zur injizierten RNA-Menge. Ein Vergleich der Heteromerströme mit Homomerströmen ist demnach legitim.

**Tabelle 3.9.** Relative Stromamplituden für GluR6-Wildtyp koexprimiert mit GluR7-Wildtyp, Chimären zwischen GluR6 und GluR7, sowie GluR7-Mutanten

Rezeptor-Untereinheit	Strom KA [%]	Strom Glu [%]	n
GluR6(Q) + H <sub>2</sub> O	100.0 ± 9.7	100.0 ± 8.6	7
GluR6(Q) + GluR7(Q)	1.9 ± 0.9	4.0 ± 2.0	8
GluR6 + GluR6N-GluR7PC	6.5 ± 1.0	11.9 ± 1.3	3
GluR6 + GluR6NP-GluR7C	1.3 ± 0.4	3.8 ± 1.6	3
GluR6 + GluR7N-GluR6PC	102.5 ± 7.6	88.8 ± 9.0	3
GluR6 + GluR7NP-GluR6C	125.4 ± 34.4	85.6 ± 26.1	4
GluR6 + GluR6-GluR7FC	104.4 ± 10.2	106.2 ± 10.2	4
GluR6 + GluR7-GluR6FC	3.0 ± 0.9	2.7 ± 0.8	3
GluR6 + GluR6-GluR7L3	44.7 ± 5.4	49.8 ± 5.9	3
GluR6 + GluR7-GluR6L3	79.2 ± 8.9	62.9 ± 8.0	4
GluR6 + GluR7-GluR6L3C/FC	108.0 ± 22.0	98.0 ± 21.8	6
GluR6 + GluR7-GluR6L3N	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.2	4
GluR6 + GluR7(K626E)	12.1 ± 3.4	12.1 ± 4.3	3
GluR6 + GluR7(K758N)	7.3 ± 2.4	14.0 ± 5.4	8
GluR6 + GluR7(N748S)	1.0 ± 0.4	1.5 ± 0.5	3
GluR6 + GluR7(I705V)	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.4	3
GluR6 + GluR7(I732M)	0.8 ± 0.2	1.3 ± 0.2	3
GluR6 + GluR7(InsR651a / K652R / P653Q)	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.3	4

Die Rezeptoren wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Agonisten Kainat und Glutamat wurden jeweils in Konzentrationen von 300 µM eingesetzt. n = Anzahl der getesteten Oozyten. Alle Daten stellen Mittelwerte ± Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) dar. Alle Stromamplituden geben den Maximalstrom in % vom Wildtyp GluR6 nach Behandlung der Oozyte für 8 min mit ConA an. 0 = keine Stromantwort meßbar.

Sämtliche GluR7-Punktmutanten reduzierten GluR6-Wildtyp-Ströme (auf 0.4-12%) im gleichen Maße wie dies GluR7-Wildtyp tut (auf 1.9%-4%) (siehe Tab. 3.9). Interessanterweise ergab die Koexpression der Chimären GluR7-

GluR6L3C/FC, GluR7N-GluR6PC, GluR7NP-GluR6C oder GluR6-GluR7FC mit GluR6-Wildtyp keine Verringerung der GluR6 Stromamplituden (85-125%), während die reversen Chimären (GluR6N-GluR7PC, GluR6NP-GluR7C, GluR7-GluR6FC, GluR7-GluR6L3N) die gleiche Reduktion (auf 0.4-6.5%) wie GluR7-Wildtyp zeigten. Lediglich eine geringe Stromreduktion lag für die Koexpressionen GluR7-GluR6L3 mit GluR6-Wildtyp (auf ~60-80%) und GluR6-GluR7L3 mit GluR6-Wildtyp (auf ~45-50%) vor. Die Stromamplituden-Reduktion, die in einigen Koexpressionsexperimenten gemessen wurde, wurde nicht durch eine verringerte Inkorporation in die Oozytenplasmamembran verursacht, wie anhand des Western Blots gezeigt wurde (siehe oben). Diese vorliegenden Daten deuten stark darauf hin, daß die zweite, C-terminale Hälfte der L3-Domäne sowie die intrazelluläre C-terminale Domäne (FC-Domäne) für die GluR7-vermittelte Reduktion der GluR6 Ströme verantwortlich sind.

### **3.1.5. GluR7-Mutanten zeigen einen signifikanten Anstieg des Verhältnisses von glutamat- und kainatinduzierten Amplituden nach Behandlung mit Concanavalin A**

Die glutamat- und kainatinduzierten Ströme können ins Verhältnis zueinander gesetzt werden. Das Verhältnis von glutamatinduziertem Strom zu kainatinduziertem Strom nach Behandlung mit Concanavalin A beträgt für GluR6-Wildtyp ~1. Für sämtliche GluR6-Punktmutanten wurden ähnliche Raten ermittelt. Für die meßbaren GluR7-Punktmutanten hingegen war das Verhältnis ~10 (siehe Tabelle 3.10). Solche Chimären, die mindestens die erste Hälfte der L3-Domäne von GluR7 aufwiesen (GluR6N-GluR7PC, GluR6NP-GluR7C, GluR7-GluR6FC, GluR6-GluR7L3, GluR7-GluR6L3N), zeigten Glutamat/Kainat-Stromamplitudenverhältnisse, die vergleichbar mit denen von GluR7-Punktmutanten waren, also ~10. Die Amplitudenverhältnisse für die reziproken Chimären (GluR7N-GluR6PC, GluR7NP-GluR6C, GluR6-GluR7FC, GluR7-GluR6L3) betrug ~1, wie für GluR6-Wildtyp. Die Chimäre GluR7-GluR6L3C/FC, bei der die erste Hälfte der L3-Domäne von GluR7 stammt und die zweite Hälfte von GluR6, zeigte ebenfalls ein Amplitudenverhältnis von ~1 (siehe Tab. 3.10). Interessanterweise betrug das Stromamplitudenverhältnis für GluR6-Wildtyp koexprimiert mit verschiedenen Chimären oder GluR7-Mutanten (siehe oben) immer ~1, was eine Dominanz von GluR6 über GluR7 vermuten läßt.

**Tabelle 3.10.** Verhältnis der maximalen Stromamplituden (Glutamat/Kainat)

Rezeptor- untereinheit	n	Glu/KA	Rezeptor- untereinheit	n	Glu/KA
GluR6(Q)	34	0.9 ± 0.1	GluR6(Q)	34	0.91 ± 0.05
GluR7(Q)	3	0.0 ± 0.0	GluR7(Q)	3	0.0 ± 0.0
GluR6N-GluR7PC	3	9.1 ± 2.8	GluR6(E655K)	3	0.91 ± 0.03
GluR6NP-GluR7C	8	13.1 ± 0.9	GluR7(K626E)	3	0.0 ± 0.0
GluR7N-GluR6PC	7	1.0 ± 0.4	GluR6(N788K)	14	1.13 ± 0.05
GluR7NP-GluR6C	4	0.8 ± 0.1	GluR7(K758N)	14	10.8 ± 1.3
GluR6-GluR7FC	3	1.10 ± 0.01	GluR6(S778N)	3	0.95 ± 0.02
GluR7-GluR6FC	4	5.5 ± 1.3	GluR7(N748S)	8	0.0 ± 0.0
GluR6-GluR7L3	6	6.7 ± 0.4	GluR6(V735I)	3	0.93 ± 0.02
GluR7-GluR6L3	4	0.79 ± 0.05	GluR7(I705V)	3	0.0 ± 0.0
GluR7-GluR6L3C/FC	9	1.07 ± 0.06	GluR6(M762I)	4	0.76 ± 0.02
GluR7-GluR6L3N	5	12.5 ± 0.6	GluR7(I732M)	4	0.0 ± 0.0
			GluR6( $\Delta$ R681/ R682K/Q683P)	3	0.94 ± 0.04
			GluR7(insR651a /K652R/P653Q)	3	0.0 ± 0.0
			GluR6-GluR7(linkerC)	7	1.02 ± 0.02
			GluR7-GluR6(linkerC)	8	12.4 ± 1.1
			GluR7-GluR6(linkerC)/ (K626E)	4	8.2 ± 0.3
Rezeptor- untereinheiten	n	Glu/KA	Rezeptor- untereinheiten	n	Glu/KA
GluR6(Q) + H <sub>2</sub> O	7	1.6 ± 0.04	GluR6 + GluR7(K626E)	3	0.9 ± 0.1
GluR6(Q) + GluR7(Q)	8	2.2 ± 0.09	GluR6 + GluR7(K758N)	8	2.0 ± 0.1
GluR6 + GluR6N-GluR7PC	3	1.9 ± 0.09	GluR6 + GluR7(N748S)	3	1.5 ± 0.1
GluR6 + GluR6NP-GluR7C	3	3.7 ± 0.3	GluR6 + GluR7(I705V)	3	1.0 ± 0.1
GluR6 + GluR7N-GluR6PC	3	0.5 ± 0.02	GluR6 + GluR7(I732M)	3	1.5 ± 0.1
GluR6 + GluR7NP-GluR6C	4	0.7 ± 0.06	GluR6 + GluR7(insR651a /K652R/P653Q)	4	1.7 ± 0.1
GluR6 + GluR6-GluR7FC	4	1.00 ± 0.01			
GluR6 + GluR7-GluR6FC	3	1.2 ± 0.02			
GluR6 + GluR6-GluR7L3	3	1.10 ± 0.01			
GluR6 + GluR7-GluR6L3	4	0.8 ± 0.03			
GluR6 + GluR7-GluR6L3C/FC	6	0.8 ± 0.01			
GluR6 + GluR7-GluR6L3N	4	2.1 ± 0.1			

Die Rezeptoren wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Agonisten Kainat und Glutamat wurden jeweils in Konzentrationen von 300  $\mu$ M eingesetzt. n = Anzahl der getesteten Oozyten. Das Verhältnis von glutamatinduzierten zu kainatinduzierten maximalen Stromamplituden (Glutamat/Kainat) wurde für jede Oozyte berechnet und anschließend der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) ermittelt.

### 3.2. Struktur-Funktionsanalyse des Kainatbindeproteins

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der Kainatrezeptor GluR7 nicht, wie bislang geglaubt, zu den nicht-funktionellen Rezeptoren zu zählen ist. Es handelt sich vielmehr um einen Rezeptor mit ungewöhnlich geringer Porenöffnungseffizienz. Mangelnde Proteinexpression, geringe Ligandenaffinität und fehlerhafte Pore kommen als Erklärung für das ineffiziente Porenöffnen bei GluR7 nicht in Frage. Es bleibt somit lediglich die Möglichkeit einer, im Vergleich zu funktionellen Rezeptoren, anderen, evtl. fehlerhaften Informationsübertragung zwischen Ligandenbindungsdomäne und Ionendomäne. Ist dies nun auch bei anderen nicht-funktionellen Rezeptoren der Fall? Welche Rezeptordomänen könnten dafür verantwortlich sein? Diesen Fragen sollte am Beispiel der nicht-funktionellen Kainatbindeproteine (KBP) nachgegangen werden.

#### 3.2.1. Domänenaustausch zwischen KBP und GluR6

Es war bislang nicht möglich, agonisteninduzierte Ionenströme an Kainatbindeproteinen in Oozyten oder in Säugerzellen zu messen, obwohl die Proteine exprimiert werden und Ligandenbindung nachgewiesen wurde (Gregor et al., 1989; Hampson et al., 1989; Wada et al., 1989; Eshhar et al., 1992; Villmann et al., 1997). Durch ein Porentransplantationsexperiment, in dem die Kainatbindeprotein-Pore an homologer Stelle in einen funktionellen GluR6-Rezeptor eingesetzt wurde, konnte die Funktionalität der Pore nachgewiesen werden. Die in Oozyten gemessenen Ströme beliefen sich auf maximal 25 nA in Zweielektroden-Spannungsklemme-Messungen (Villmann et al., 1997). Die Pore scheint demnach eine geringere Ionenpermeabilität als zum Beispiel GluR6, der Ströme im  $\mu$ A-Bereich zeigt, zu besitzen. Auch bei den Kainatbindeproteinen bietet sich somit als Erklärungsmöglichkeit eine ineffiziente Informationsübertragung der Ligandenbindung in Porenöffnung ("gating") bestehen. Bei der Suche nach der verantwortlichen Domäne fielen besonders die Regionen, die die Ligandenbindungsdomänen mit den Transmembrandomänen A, B und C verbinden (Linker A, B und C), ins Auge. Hierbei handelt es sich um kurze Sequenzen (14-16 Aminosäuren), die bisher nicht untersucht wurden.

	401					450
GluR6	LKEEGLE...	.....	.KIG TWDPA	SGLNMTESQK	GKPANITDSL	
KBP		MEKALMLF	LAV...SLLS	LGHTDGKE..	NAETLLKERT	
	451					500
GluR6	S...NRSLIV	TTILEEPYVL	FKKSDKPLYG	NDRFEGYCID	LLRELSTILG	
KBP	KRQIPKTLTV	TTILEKPFAM	.....KTE	SDALEGYAID	LLSELTQSLG	
	501					550
GluR6	FTYEIRLVED	GKYGAQDDVN	.GQWNGMVRE	LIDHKADLAI	APLTITSVRE	
KBP	FNYTLHIVKD	GKYGSKDQ..	EGNWSGMVGE	IIRKEADLAV	APLAITYVRE	
	551		linker A		TMD A	600
GluR6	KVIDFSKPFM	TLGISILYRK	PNGT.NPGVF	SFLNPLSPDI	WMYVLLACLG	
KBP	NAISFTKPFM	QTGIGILLKK	DTAAESSYMF	GFLNPFSKEL	WIGIISYVI	
	601				Pore	650
GluR6	VSCVLFVIAR	FSPYEWYN..	...PHPCNPD	SDVVENNFLT	LNSFWFGVGA	
KBP	TSLCLFLVGR	LSPCEWTEPA	SEQ.....	.....NQFLT	LNSLWYGVGA	
	651		TMD B		linker B	700
GluR6	LMRQGSLEMP	KALSTRIVGG	IWWFFTLIII	SSYTANLAAF	LTVERMESP.	
KBP	LTLQGAEPQP	KALSARIIAV	IWWVFSITLL	AAYIGSFASY	INSNTNQTPN	
	701					750
GluR6	IDSADDLAKQ	TKIEYGAVED	GATMTFFKKS	KISTYDKMWA	FMSSRRQSVL	
KBP	IQSVEDLLKQ	DKLDFGTLSN	SSTLNFFKNS	KNPTFQMIYE	YMDKRKDRVL	
	751					800
GluR6	VKSNEEGIQR	VLTSDYAFLM	ESTTIEFVTQ	R.NCNLTQIG	GLIDSKGYGV	
KBP	VKTFSEGVQR	VRESNYAFLG	ESISQDFVVA	KHCD.LIRAP	EMIGGRGYGI	
	801				linker C	850
GluR6	GTPMGSPYRD	KITIAILQLQ	EEGKLHMMKE	KWWRGNG.C.	.PEEESKEAS	
KBP	AAELDSPLIR	PLTIAILELF	ESGKLEYLRQ	KWWENTCSTQ	DQTGWV....	
	851		TMD C			900
GluR6	linker C	ALGVQNIGGI	FIVLAAGLVL	SVFVAVGEFL	YKSKKNA... ..	QL
KBP		PVQPHTLGGI	FLILGIGLAL	GLIVSFMELM	CKSRSNAEQQ	KKSCCSAFSE
	901					950
GluR6	EK.....	.....	.....	.RSFCSAMVEE	LRMSLKQR	
KBP	EIAQRFGKTQ	NQEGLEKKSP	TSNSCDEVKA*	.....	.....	
	951					
GluR6	RLKHKPQAPV	IVKTEEVINM	HTFNDRRLPGKETMA*			
KBP	.....	.....	.....			

**Abb. 3.18.:** Aminosäuresequenzvergleich zwischen der Kainatrezeptoruntereinheit GluR6 (aus Ratte) und dem Kainatbindeprotein KBP-frog. Die beiden Rezeptoren sind zu 41,2% in ihren Aminosäuren identisch. Die Transmembrandomänen A, B und C sowie die Porendomäne sind durch schwarze Balken markiert. Die Linkerregionen sind an den gestrichelten Balken zu erkennen.

Das oben erwähnte Porentransplantationsexperiment, sowie die in dieser Arbeit vorgestellten Chimären zwischen GluR6 und GluR7, zeigten, daß die Transplantation einzelner Domänen zwischen sequenzverwandten Rezeptoren eine geeignete Methode darstellen kann, um Eigenschaften dieser Domänen zu untersuchen.

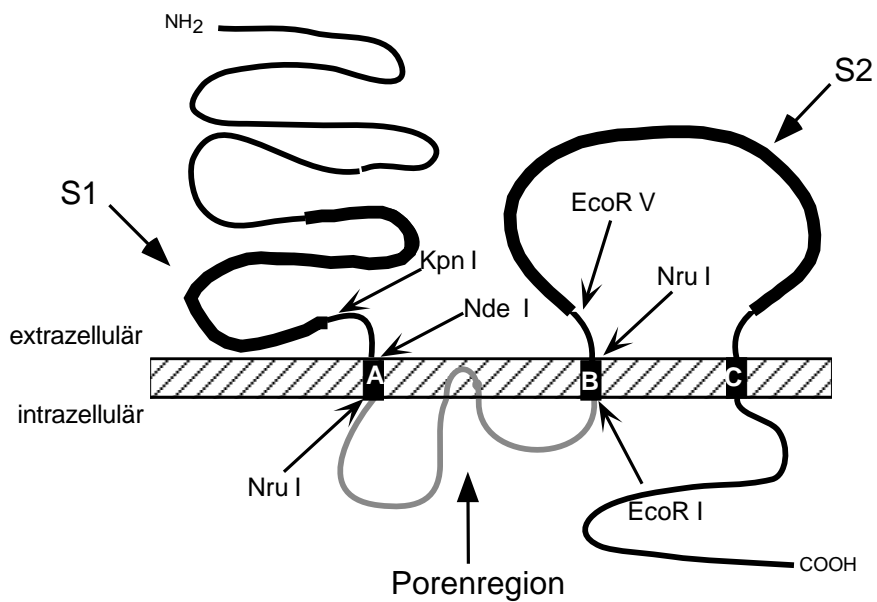
Aufgrund dieser Erfahrungen sollte es möglich sein, den Porenbereich, sowie die Linkerregionen A, B und C ohne dadurch verursachten Funktionsverlust zwischen dem nicht-funktionellen Kainatbindeprotein und dem funktionellen Kainatrezeptor GluR6 auszutauschen, mit dem Ziel, eine Region im KBP zu finden, die für die Nicht-Funktionalität verantwortlich ist. Der Austausch der Linkerregionen zwischen GluR6 und GluR7 wurde im Rahmen des bereits vorgestellten GluR6/GluR7-Projektes beschrieben.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Domänen austausche zwischen GluR6 und KBP vorgestellt.

### **3.2.1.1. Domänen austausch zwischen KBP und GluR6: Herstellung der Chimären**

Als Ausgangsklone für die Herstellung der Chimären dienten GluR6-Wildtyp (aus Ratte) und KBP(Rp) Wildtyp (aus dem Leopardenfrosch *Rana pipiens berlandieri*), sowie die Klone, in die die für die Domänen transplantation erforderlichen Restriktionsschnittstellen eingebaut worden waren: GluR6-PCL, GluR6-PXL, GluR6-PCL-PXL, KBP-PCL, KBP-PXL, KBP-PCL-PXL. PCL steht für "pore cassette large" und ermöglichte den Austausch der Porenregion mit angrenzenden Transmembrandomänen. PXL steht für "pore cassette extra large" und ermöglichte den Austausch der Porenregion mit angrenzenden Transmembrandomänen plus der Linker A und B (siehe auch 3.1.1.1). Die PCL-PXL-Konstrukte enthalten sowohl die PCL- als auch PXL-Restriktionsschnittstellen. Sie ermöglichten den Austausch der Linker A und B. In Abbildung 3.19. sind die Positionen der Schnittstellen schematisch dargestellt.





**Abb. 3.19.:** Schema eines Glutamatrezeptors zur Darstellung der eingebauten Restriktionsschnittstellen EcoR I, EcoR V, Kpn I, Nde I und Nru I für die Herstellung der PCS-, PCL- und PXL-Konstrukte. Dargestellt sind der extrazelluläre N-Terminus, der intrazelluläre C-Terminus und die Transmembrandomänen (TMD) A, B und C. Die Porenregion ragt von der intrazellulären Seite in die Membran. S1 und S2 bilden die Ligandenbindungsdomänen. Die Restriktionsschnittstellen Kpn I und EcoR V ermöglichen den Austausch der PXL-Pore, die Restriktionsschnittstellen Nde I und Nru I den Austausch der PCL-Pore und die Schnittstellen Nru I und EcoR I den Austausch der PCS-Pore (siehe Text).

Eine Reihe von Konstrukten lag zu Beginn dieser Arbeit bereits vor. Sie wurden im Rahmen einer anderen Doktorarbeit (Villmann, 1998) angefertigt. Bei diesen Konstrukten handelt es sich um KBP-PGluR6, KBP-PLGluR6, GluR6-PKBP und GluR6-PLKBP, bei denen entweder die eigentliche Porenregion (P) oder zusätzlich zur Porenregion die angrenzenden Transmembrandomänen (PL) ausgetauscht worden waren. Diese vier Chimären waren ebenfalls mit den oben beschriebenen PCS- und PCL-Restriktionsschnittstellen hergestellt worden.



**Tabelle 3.11.** Übersicht über Aminosäuresequenzen, in die Restriktionsschnittstellen für einen Domänen austausch eingefügt wurden

Untereinheit	Ausgangskonstrukte zum Domänen-Austausch zwischen KBP und GluR6			
	Restriktionsschnittstelle	Aminosäureposition und - Veränderung	ASA	
KBP	Nru I	FLV (163-165) → FAI	2	PCS
GluR6	Nru I	FVI (549-551) → FAI	1	
KBP	EcoR I	RII (211-213) → RIL	1	
GluR6	EcoR I	RII (605-607) → RIL	1	
KBP	Nde I	ELW (146-148) → DIW	2	PCL
GluR6	Nde I	DIW (531-533) → DIW	0	
KBP	Nru I	YIN (233-235) → FAN	2	
GluR6	Nru I	FLT (627-629) → FAT	1	
KBP	Kpn I	AAE (260-262) → GTE	2	PXL
GluR6	Kpn I	GTN (547-549) → GTN	0	
KBP	EcoR V	NQT (258-260) → MIS	3	
GluR6	EcoR V	MES (664-666) → MIS	1	

Dargestellt sind die Aminosäureveränderungen, für die Untereinheiten KBP (Rp) und GluR6 im Vergleich, die zur Einführung der Schnittstellen nötig sind. ASA steht für die Anzahl der Aminosäureaustausche.

### 3.2.1.2. Charakterisierung der Chimären zwischen KBP und GluR6

Die elektrophysiologischen Meßergebnisse der bereits vorliegenden Chimären dienen der weiteren Planung dieses Projektes und werden aus diesem Grund erwähnt und diskutiert.

Interessanterweise war nach Expression in *Xenopus*-Oozyten bei elektrophysiologischen Messungen lediglich das GluR6-PKBP-Konstrukt funktionell. Die Absolutströme beliefen sich auf maximal 25 nA (Villmann et al., 1997). Aufgrund dieses Ergebnisses erschien es von Interesse, einen KBP-Rezeptor mit ausgedehnter GluR6-Porenregion inklusive der TMDs A und B sowie Linker A und B sowie das umgekehrte Konstrukt herzustellen.

Diese Chimären wurden KBP-PXLGluR6 und GluR6-PXLKBP genannt (siehe Abb. 3.20.).

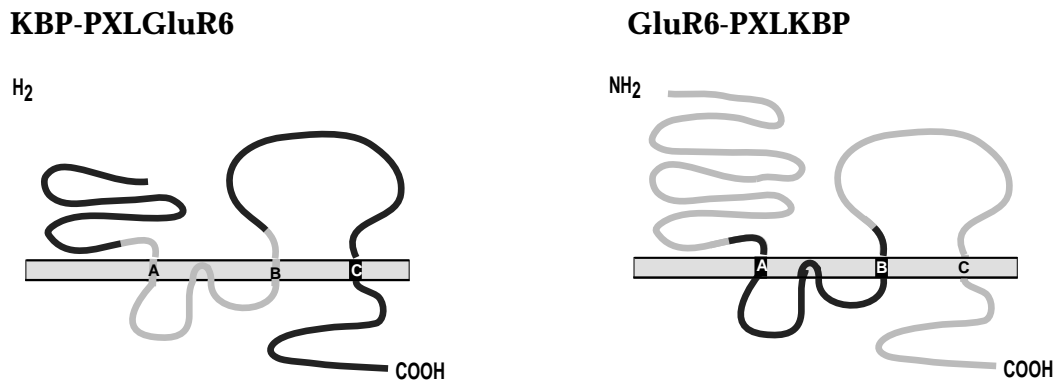


Abb. 3.20.: Schematische Darstellung der Chimären KBP-PXLGluR6 und GluR6-PXLKBP. Schwarze Linien = KBP, graue Linien = GluR6.

Tabelle 3.12. Absolute Stromamplituden für Chimären zwischen KBP und GluR6

Rezeptor-Untereinheit	Strom KA [nA]	Strom Glu [nA]	n
KBP-Wildtyp	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8
KBP-PCL*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3
KBP-PXL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3
KBP-PGluR6*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4
KBP-PCLGluR6*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4
KBP-PXLGluR6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3
GluR6-PKBP*	8.2 ± 1.1	6.5 ± 1.9	5
GluR6-PCLKBP*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4
GluR6-PXLKBP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6

Die Rezeptoren wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Agonisten Kainat und Glutamat wurden jeweils in Konzentrationen von 300  $\mu$ M eingesetzt; n = Anzahl der getesteten Oozyten. Alle Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) dar. Die mit Sternchen markierten Konstrukte wurden von C. Villmann hergestellt.

Überraschenderweise zeigte keines der beiden Proteine in elektrophysiologischen Messungen an Oozyten Ströme. Durch diese

Konstrukte konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Linkerregionen eine entscheidene Rolle für die Nicht-Funktionalität spielen, da andere mittransplantierte Sequenzelemente von GluR6 negativ kompensierend auf die Funktionalität wirken könnten. Daher wurden weitere Chimären hergestellt, die speziell die Funktion der Linker aufdecken sollten.

### **3.2.1.3. Transplantation der GluR6-Linkerregionen in das nicht-funktionelle Kainatbindeprotein**

Um zu ermitteln, ob die Linkerregionen als Ursache für die Nicht-Funktionalität des KBP-Rezeptors in Frage kommen, wurden die Linkerbereiche aus dem funktionellen GluR6 in die homologen Positionen in KBP transplantiert. Linker B und C aus GluR6 wurden mittels PCR in den KBP-Klon eingefügt, da dies technisch einfacher durchzuführen war als die Kassettenmethode mit vorbereiteten Restriktionsschnittstellen. Linker A aus GluR6 wurde hingegen auf dem typischen Weg der Domänentransplantation in KBP eingebracht. Hierzu mußten sowohl in GluR6 als auch in KBP die gleichen Restriktionsschnittstellen an homologen Positionen vorliegen (Kpn I und Nde I, siehe Abb. 3.19).

Folgende chimäre Konstrukte wurden generiert (siehe Abb. 3.21):

KBP(Linker A)GluR6

KBP(Linker B)GluR6

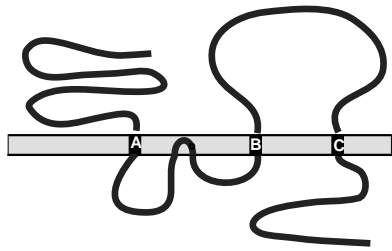
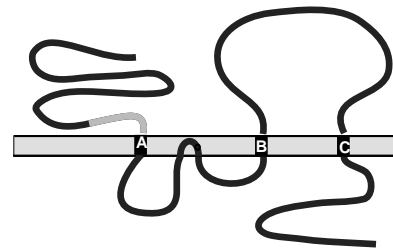
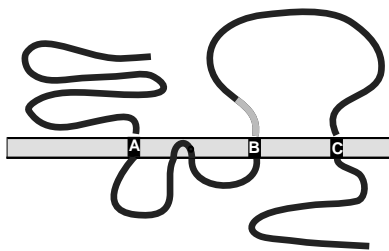
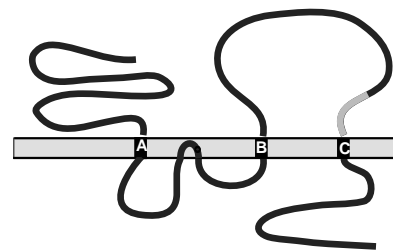
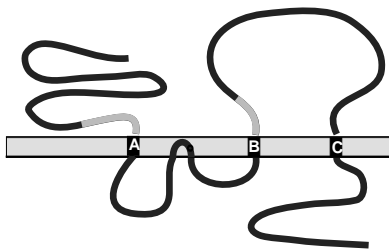
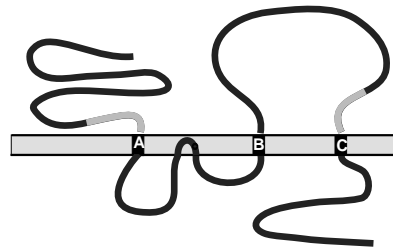
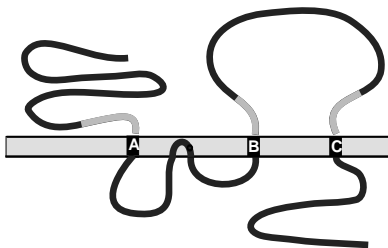
KBP(Linker C)GluR6

KBP(Linker A+B)GluR6

KBP(Linker A+C)GluR6

KBP(Linker A+B+C)GluR6

Da Linker B und C bei diesen KBP-Konstrukten mittels PCR eingebracht wurden, sind die Restriktionsschnittstellen EcoR V und Nru I in diesen Klonen nicht vorhanden. KBP(linker A)GluR6 wurde hingegen mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen Kpn I und Nde I hergestellt. Da für dieses Konstrukt als Ausgangsklon KBP-PCL-PXL diente, liegen zusätzlich zu den beiden genannten Schnittstellen auch noch die Schnittstellen EcoR V und Nru I vor (siehe Abb. 3.19., Tab. 3.11), obwohl an dieser Stelle kein Bereich ausgetauscht wurde.

**KBP-Wildtyp****KBP(linker A)GluR6****KBP(linker B)GluR6****KBP (linker C)GluR6****KBP(linker A+B)GluR6****KBP (linker A+C)GluR6****KBP(linker A+B+C)GluR6**

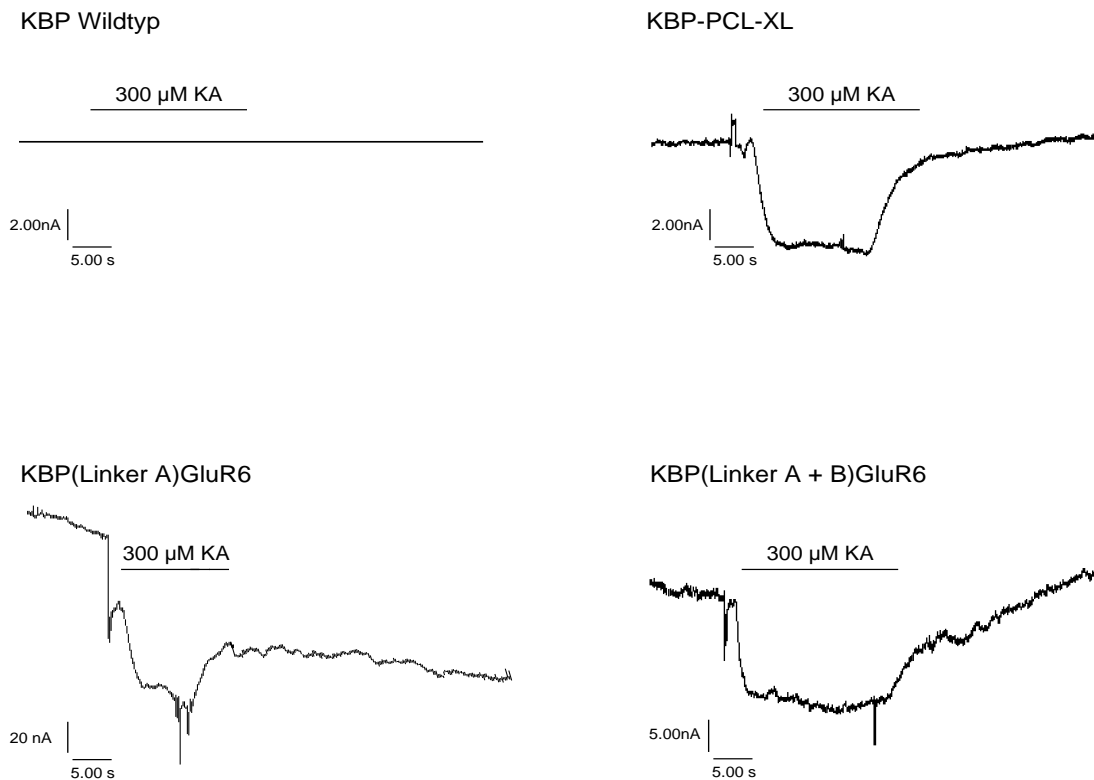
**Abb. 3.21.:** Schematische Darstellung der Chimären zwischen KBP und GluR6. Bei den Chimären handelt es sich um KBP-Rezeptoren, die einen oder mehrere Linker aus GluR6 enthalten. Schwarze Linien = KBP, graue Linien = GluR6.

**Tabelle 3.13.** Absolute Stromamplituden für Linker-Chimären zwischen KBP und GluR6

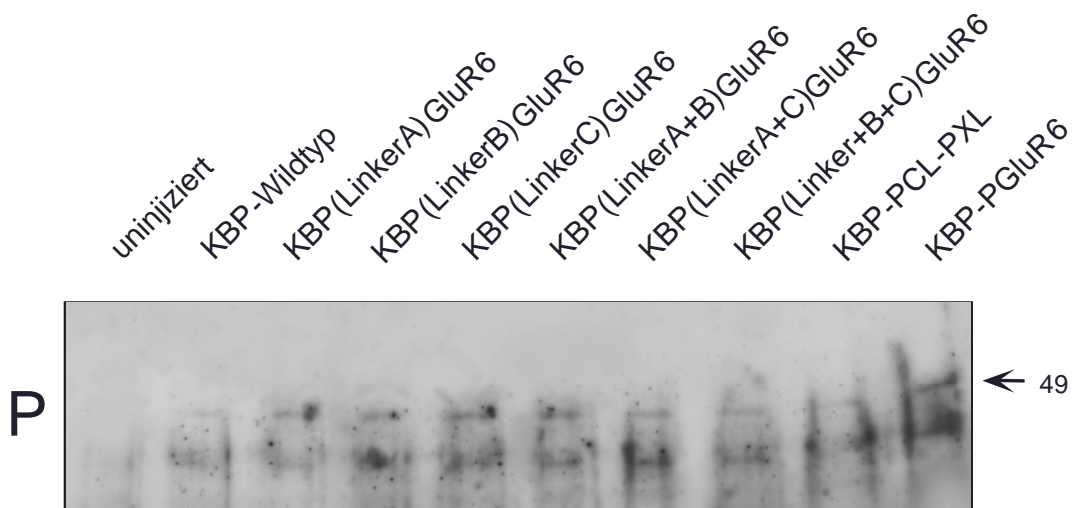
Rezeptor-Untereinheit	Strom KA [nA]	Strom Glu [nA]	n
KBP-Wildtyp	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8
KBP-PCL-PXL	5.2 ± 2.0	2.8 ± 1.2	18
KBP-Linker A GluR6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6
KBP-Linker B GluR6	13.10 ± 2.01	19.30 ± 5.48	9
KBP-Linker C GluR6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6
KBP-Linker A+B GluR6	8.66 ± 1.13	8.39 ± 0.92	12
KBP-Linker A+C GluR6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6
KBP-Linker A+B+C GluR6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5

Die Rezeptoren wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Agonisten Kainat und Glutamat wurden jeweils in Konzentrationen von 300  $\mu$ M eingesetzt; n = Anzahl der getesteten Oozyten. Alle Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) dar.

Alle Konstrukte wurden anschließend elektrophysiologisch getestet. Interessanterweise waren tatsächlich einige Chimären funktionell (Tabelle 3.13) und konnten jeweils durch Kainat und Glutamat aktiviert werden. Bei den funktionellen Rezeptoren handelt es sich um KBP(linker B)GluR6, KBP(linker A+B)GluR6 und KBP-PCL-PXL, ein Protein, das bemerkenswerterweise lediglich die PCL- und PXL-Schnittstellen enthält, nicht aber eine Aminosäuresequenzfolge von GluR6. Die Präinkubation der Oozyten mit 10  $\mu$ M Concanavalin A vor Applikation eines Agonisten lieferte keine Erhöhung der maximalen Stromamplituden. Typische Stromkurven sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Auch hier, wie bei dem ebenfalls funktionellen Konstrukt GluR6-PKBP (siehe Tab. 3.12; Kapitel 3.2.1.2) beliefen sich die Maximalstromamplituden auf 20-25 nA. Je nach Expressionslevel der Proteine waren die gemessenen Ströme meist kleiner als 20 nA und manchmal waren keine Ströme meßbar.



**Abb. 3.22.:** Typischer Verlauf der Stromspuren für Linker-Chimären zwischen KBP und GluR6. Als Agonist wurde Glutamat ( $300 \mu\text{M}$ ) verwendet.



**Abb. 3.23.:** Vergleich der Proteinexpression von KBP-Wildtyp und Chimären zwischen KBP und GluR6. P = Pelletfraktion (11 Oozyten/Gelspur), uniniziert = Oozyten ohne cRNA-Injektion. Der Pfeil weist auf die erwartete  $\sim 49 \text{ kD}$ -Bande von KBP-Wildtyp und Chimären.

Die Expression der Proteine und Insertion in die Oozytenplasmamembran wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Die Membranpräparation wurde

wie unter 2.11.1 beschrieben durchgeführt. Alle Proteine werden in vergleichbarer Menge in die Oozytenplasmamembran integriert (siehe Abb. 3.23.).

Die bisher erwähnten Meßdaten wurden alle mittels Zwei-Elektroden Spannungsmessungen an Oozyten gewonnen. Da die Stromamplituden durchweg relativ klein waren, sollte durch Messungen der gleichen Konstrukte in HEK 293-Zellen untersucht werden, ob in diesem Expressionssystem im Verhältnis höhere Stromamplituden durch Agonistenapplikation erzeugt werden können. Des weiteren könnte ein Vergleich der Meßdaten aus Oozytenmessungen mit HEK-Zellmessungen einen Hinweis liefern, ob eventuell Modulatoren für diesen Rezeptor in dem einen System, nicht aber im anderen vorliegen. Die Messungen an HEK 293-Zellen wurden an der Universität Erlangen von C. Villmann und H. G. Breitingen durchgeführt. Zunächst wurde das in Oozyten funktionelle Konstrukt KBP-PCL-PXL in HEK-Zellen getestet. Dazu mußte die DNA in das Plasmid pMT3 (siehe 2.6.) umkloniert werden. Bei Transfektionen beträgt die Rate der transfizierten Zellen meist deutlich weniger als 100%. Aus diesem Grund ist die Expression eines Proteins in jeder einzelnen Zelle unwahrscheinlich, so daß man sich eines Tricks bedient, um die Chance zu erhöhen, eine Zelle zu messen, die tatsächlich das gewünschte Protein exprimiert. Dazu wird bei der Transfektion nicht nur der zu untersuchende Klon, sondern zusätzlich ein weiteres Plasmid mit einem GFP-Gen (in geringerer Konzentration als das zu untersuchende Gen) transfiziert. GFP (Green Fluoreszent Protein) hat die Eigenschaft, bei geeigneter Anregung grün zu fluoreszieren. Bei einer leuchtenden Zelle ist die Wahrscheinlichkeit, daß sie zusätzlich zu GFP auch das gewünschte Protein enthält, recht groß, wenn auch nicht 100%. Bei Messungen an Zellen muß daher die Anzahl getesteter Zellen erheblich höher sein, als in Oozyten. Deshalb werden im Falle der HEK-Zellen gemessenen KBP-Konstrukte lediglich solche Meßdaten in die Statistik einbezogen, bei denen eindeutige Stromamplituden notiert wurden. Für KBP-PCL-PXL wurden in whole-cell-Messungen Ströme von  $213 \pm 76$  pA gemessen. Die Expression von GluR6-Wildtyp variierte in diesen Experimenten stark, sodaß die KBP-PCL-PXL-Stromamplituden im Vergleich zu GluR6-Wildtyp eine Spanne von 10-80% aufwiesen. Für eine bessere Statistik müßten weitere HEK-Zellmessungen durchgeführt werden. Es kann aber bereits festgehalten werden: Sowohl in Oozyten als auch in HEK 293-Zellen können durch Applikation von

Glutamat oder Kainat Ströme bei dem Konstrukt KBP-PCL-PXL induziert werden.

Die Erstellung von  $EC_{50}$ s war aufgrund der niedrigen Stromamplituden in Oozyten nicht möglich. Für die Interpretation der Daten war es jedoch von Bedeutung, ob eine veränderte Ligandenaffinität zur Funktionalität der drei Chimären geführt hat, oder ob man, wie im Falle von GluR7, auf ein Problem des Informationsübertragungsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Kanalöffnung schließen kann. Daher wurde der  $K_D$ -Wert für die Bindung des Agonist Kainat in Ligandenbindungsexperimenten mit radioaktiv markiertem Kainat ( $^3H$ -Kainat) für die Konstrukte

KBP-Wildtyp,  
KBP-PGluR6,  
KBP-PLGluR6,  
KBP-PCL-PXL,  
KBP(Linker A)GluR6,  
KBP(Linker B)GluR6,  
KBP(Linker C)GluR6,  
KBP(Linker A+B)GluR6,  
KBP(Linker A+C)GluR6,  
KBP(Linker A+B+C)GluR6

bestimmt (siehe 2.12.4.).

Für die getesteten Konstrukte ergaben sich  $K_D$ -Werte, die sich vom  $K_D$ -Wert von KBP-Wildtyp nicht signifikant unterscheiden. Ausnahmen bilden die Konstrukte KBP(Linker B)GluR6 und KBP(Linker C)GluR6, für die erhöhte  $K_D$ -Werte ermittelt wurden (Tab. 3.14). Da für die funktionellen Untereinheiten KBP(linker A+B)GluR6 und KBP-PCL-PXL keine signifikanten Unterschiede der  $K_D$ -Werte im Vergleich zu KBP-Wildtyp vorliegen, kann die Funktionalität nicht mit veränderter Ligandenbindungsaffinität erklärt werden, sondern läßt auf ein Problem des Informationsübertragungsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Kanalöffnung schließen. Für das dritte funktionelle Konstrukt KBP(LinkerB)GluR6 ist der  $K_D$ -Wert signifikant größer. Ein größerer  $K_D$ -Wert bedeutet eine niedrigere Ligandenbindungsaffinität. Daher überrascht die Tatsache, daß das Konstrukt trotz eingeschränkter



Ligandenbindungsaffinität funktionell ist. Für die nicht-funktionelle Untereinheit KBP(Linker C)GluR6 kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Erhöhung des  $K_D$ -Wertes, also niedrigere Ligandenbindungsaffinität, der Grund für die Nicht-Funktionalität ist. Es könnte durchaus sein, daß durch Agonistapplikationen in höheren Konzentrationen Ströme erzeugt werden können. Dies läßt sich jedoch nicht überprüfen, da solch hohe Agonistkonzentrationen in Oozyten Stromartefakte erzeugen. Für sämtliche Untereinheiten konnte die Möglichkeit einer stärkeren Proteinexpression als Ursache für Funktionalität, bzw. schwächeren Proteinexpression als Ursache für Nicht-Funktionalität ausgeschlossen werden (Abb. 3.23.). Demnach scheint auch beim KBP ein inaktiver oder extrem ineffizienter Informationsübertragungsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Ionenkanalöffnung für die apparente Nicht-Funktionalität des Rezeptors verantwortlich zu sein.

**Tab. 3.14.**  $K_D$ -Werte für Linker-Chimären zwischen KBP und GluR6

Rezeptor- Untereinheit	$K_D$ [nM]
KBP Wildtyp	$20 \pm 6$
KBP-PGluR6	wt
KBP-PCLGluR6	wt
KBP-PCL-PXL	wt
KBP(Linker A)GluR6	wt
KBP(Linker B)GluR6	$178 \pm 49$
KBP(Linker C)GluR6	$104 \pm 12$
KBP(Linker A+B)GluR6	wt
KBP(Linker A+C)GluR6	wt
KBP(Linker A+B+C)GluR6	wt

Die  $K_D$ -Werte sind in nM für den Agonist Kainat angegeben. wt =  $K_D$ -Wert unterscheidet sich nicht signifikant vom  $K_D$ -Wert von KBP-Wildtyp.

## 4. Diskussion

### 4.1. Domänentransplantationen zwischen Glutamatrezeptoren: Ein sinnvoller, erfolgversprechender Ansatz?

Als theoretische Basis der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Domänen austausche diente zum einen die sogenannte Mosaiktheorie der Glutamatrezeptoren, zum anderen die Tatsache, daß bereits zuvor von einer Kollegin erfolgreich Porendomänen verschiedener Glutamatrezeptoren untereinander ausgetauscht worden waren. Die Mosaiktheorie besagt, daß sich Glutamatrezeptoren phylogenetisch vermutlich aus Modulen entwickelt haben, die aus anderen Proteinen stammen. Die Zusammenlagerung der Module erinnert an ein Mosaik, daher der Name Mosaiktheorie. Anhand von Sequenzanalysen ergaben sich ausgeprägte Homologien der Ligandenbindungsdomänen von Glutamatrezeptoren zu Bindungsdomänen bakterieller periplasmatischer Aminosäure-Bindeproteine, deren primäre Aufgabe der Transmembrantransport von Aminosäuren ist (Nakanishi et al., 1990; Cockcroft et al., 1993). Insbesondere wurden Homologien zum Leucin-Isoleucin-Valin-Bindeprotein (LIVBP) und zum Lysin-Arginin-Ornithin-Bindeprotein (LAOBP) gefunden (O'Hara et al., 1993; Stern et al., 1994; Kuusinen et al., 1995). Sowohl bei den Glutamatrezeptoren als auch bei den periplasmatischen Bindeproteinen ist die Funktion der homologen Bereiche gleich: Bei den bakteriellen Proteinen werden Aminosäuren als Nährstoffe gebunden, bei Glutamatrezeptoren als Liganden. Nicht nur die Funktion ist ähnlich, sondern auch die Struktur. Sowohl von den LAO-Bindeproteinen (Kang et al., 1991; Oh et al., 1993) als auch von der Ligandenbindungsdomäne eines Glutamatrezeptors (GluR2) (Armstrong et al., 1998) ist inzwischen die Kristallstruktur bekannt. Die Strukturen beider Proteine sind einander so ähnlich, daß kaum noch Zweifel an einer Verwandtschaft bestehen. Bei den LAO-Bindeproteinen sind die Bindungsdomänen durch ein Gelenk verbunden. Dieses Gelenk wurde nach der Mosaiktheorie durch eine inserierte Pore ersetzt. Sequenzvergleiche von Glutamatrezeptorporen und Kaliumkanalporen zeigten hohe Homologien, was die Mosaiktheorie zur phylogenetischen Herkunft der Pore plausibel erscheinen läßt (Wo und Oswald, 1995; Hollmann, 1996).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Domänen zu identifizieren, die

für die Nicht-Funktionalität zweier Glutamatrezeptoruntereinheiten (GluR7 und KBP) verantwortlich sind. Dazu sollten einzelne Domänen zwischen diesen Glutamatrezeptoren ausgetauscht werden. Die Mosaiktheorie sowie die bereits durchgeführten Porentransplantationen sprachen für einen möglicherweise erfolgreichen Ausgang des Projekts.

#### **4.2. Neue Erkenntnisse über die Struktur-Funktionsbeziehung der Kainatrezeptoren GluR6 und GluR7 anhand von Chimären und Punktmutanten**

Lange Zeit wurde angenommen, daß der Kainatrezeptor GluR7 eine nicht-funktionelle Rezeptoruntereinheit ist, da es sowohl in *Xenopus*-Oozyten als auch in transfizierten Zellen nicht möglich war, eine Stromantwort durch Agonistenapplikation hervorzurufen (Bettler et al., 1992; Lomeli et al., 1992; Partin et al., 1993; Nutt et al., 1994). Erst kürzlich gelang es einer Arbeitsgruppe, durch Applikation von Agonisten in extrem hohen, millimolaren Konzentrationen eine Stromantwort von GluR7 nach Transfektion in HEK 293-Zellen zu erhalten (Schiffer et al., 1997). Dies war der direkte Beweis dafür, daß GluR7 an sich eine funktionelle Rezeptoruntereinheit ist. Der EC<sub>50</sub>-Wert für Glutamat für GluR7-Wildtyp exprimiert in HEK 293-Zellen wurde mit ~6 mM angegeben (Schiffer et al., 1997). Solche unphysiologisch hohen Agonisten-Konzentrationen können nicht für Messungen an *Xenopus*-Oozyten eingesetzt werden, da sie Schein-Stromantworten erzeugen, die selbst bei Messungen an uninjizierten Kontroll-Oozyten gesehen werden (Hollmann, 1999), und damit offensichtlich Artefakte sind. Etwas später bewies eine Ionenporentransplantationsstudie, die in unserem Labor durchgeführt wurde, daß GluR7 tatsächlich einen funktionellen Ionenkanal besitzt (Villmann et al., 1999). Die Expression von GluR7 und Inkorporation in die Oozytenplasmamembran (Villmann et al., 1999), sowie intakte Ligandenbindung an den Rezeptor (Bettler et al., 1992) wurden ebenfalls nachgewiesen. Unter Berücksichtigung dieser Daten kommt man zu dem Schluß, daß GluR7 nicht zu den nicht-funktionellen Rezeptoren zu zählen ist, sondern daß es sich vielmehr um einen Rezeptor mit extrem geringer Porenöffnungseffizienz handelt. Der von Schiffer angegebene außergewöhnlich hohe EC<sub>50</sub>-Wert für Glutamat für GluR7-Wildtyp (~6 mM) und die in dieser Arbeit angegebenen vergleichsweise hohen EC<sub>50</sub>-Werte für GluR7-Punktmutanten und Chimären (~80 µM-300 µM) deuten

daher auf eine Störung des Translationsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Porenöffnung hin.

Bei dem für Glutamatrezeptoren vorgeschlagenen Ligandenbindungsmechanismus (Mano et al., 1996) wird zunächst eine Bindung des Liganden mit relativ geringer Affinität an die S1-Domäne postuliert. Bei Rezeptoren mit sehr geringer Affinität für Liganden könnte dieser Schritt kritisch sein. Im zweiten Schritt erfolgt vermutlich die zusätzliche Bindung des Liganden an die S2-Domäne und damit eine Brückenbildung zwischen zwei nicht-konsekutiven Sequenzelementen. In diesem Zustand liegt eine Konformation vor, die sich durch eine hochaffine Bindung des Liganden auszeichnet, und die Desensibilisierung bewirkt. Voraussetzung für diese Konformation ist, daß sich die S1- und S2-Domänen einander annähern, wobei sie wie eine Venusfliegenfalle "zusammenklappen" und dadurch den Liganden einschließen. Dieser hochaffine Zustand wurde bereits durch Ligandenbindungsstudien bewiesen (Bettler et al., 1992). Bei solchen Ligandenbindungsstudien wird methodenbedingt immer der vollständig desensibilisierte Zustand des Rezeptors gemessen. Für GluR6 und GluR7 wurden keine Unterschiede in der Affinität für Agonisten gefunden, was darauf schließen läßt, daß der 2. Schritt der Ligandenbindung bei GluR7 ebenso effizient abläuft, wie bei GluR6. Es bleibt die Möglichkeit, daß der 1. Schritt der Ligandenbindung bei GluR7 gestört ist. Diese Möglichkeit konnte im Rahmen dieser Arbeit durch zwei Experimente ausgeschlossen werden: Chimären, bei denen die S1- und S2-Domänen eines Rezeptors voneinander getrennt wurden (GluR7N-GluR6PC, GluR7NP-GluR6C, GluR7-GluR6L3), zeigten Stromamplituden, die mit GluR6-Wildtyp vergleichbar waren. Wäre die Bindung des Liganden an die S1-Domäne bei GluR7 durch eine zu geringe Affinität eingeschränkt, müßten diese Chimären keine bzw. reduzierte Ströme zeigen, da die Bindung an die S1 Domäne den ersten Schritt darstellt (siehe oben). Zum anderen konnte anhand der Ligandenaffinitätsmessungen gezeigt werden, daß sich die  $K_D$ -Werte zwischen GluR6 und GluR7 nicht signifikant unterscheiden. Die Messung der  $K_D$ -Werte erlaubt es, die Affinität zu bestimmen (siehe auch 3.1.1.8). Wenn die Affinität in beiden Rezeptoren gleich ist, und zudem gezeigt werden kann, daß der Austausch der Ligandenbindungsdomäne S1 zwischen den Rezeptoren keinen Unterschied in den Stromamplituden verursacht, bleibt demnach zur Erklärung der funktionellen Unterschiede nur die Möglichkeit einer Störung des

Translationsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Porenöffnung bei GluR7 übrig.

Die Analyse der Chimären zusammenfassend, kann die Aussage getroffen werden, daß die L3-Domäne für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 verantwortlich ist. Weiterhin scheint der Translationsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Porenöffnung (= "gating") bei GluR7 ineffizient zu sein, was wahrscheinlich zu dem funktionellen Unterschied zwischen beiden Rezeptoren führt. Mit anderen Worten: Die L3-Domäne von GluR7 ist vermutlich entscheidend für die Effizienz des "gating".

Durch die Teilung der L3-Domäne in zwei Hälften sollte versucht werden, die Region innerhalb der L3-Domäne einzugrenzen, die für die Unterschiede im "gating" verantwortlich ist. Die Meßergebnisse dieser beiden GluR7-Chimären, die entweder die vordere Hälfte (GluR7-GluR6L3N) oder die hintere Hälfte (GluR7-GluR6L3C/FC) der L3-Domäne aus GluR6 enthielten, machten deutlich, daß eine weitere Unterteilung der L3-Domäne nicht weiterführt, da offensichtlich beide Hälften dieser Domäne für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 verantwortlich sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier GluR7-Punktmutanten in der L3-Domäne (GluR7(K626E), GluR7(InsR651a/K652R/P653Q), GluR7(N748S), GluR7(K758N)) und verschiedene Chimären identifiziert, die funktionell waren und in *Xenopus*-Oozyten durch Applikation von Agonisten in physiologischen, mikromolaren Konzentrationen aktiviert werden konnten. Die Tatsache, daß von vier getesteten Punktmutationen an verschiedenen Positionen in der L3-Domäne von GluR7 jede einzelne in der Lage war, GluR7 in einen funktionellen Rezeptor zu verwandeln, unterstützt die Aussage, die aus den Analysen der Messungen an Chimären getroffen wurden: Es handelt sich offensichtlich nicht um eine einzelne Determinante in der L3-Domäne, die für die funktionellen Unterschiede in GluR6 und GluR7 verantwortlich ist, sondern um eine komplexe, aus mehreren nicht-linear miteinander verknüpften Determinanten bestehende Struktur.

Bei Mutanten, die keine oder reduzierte Ströme zeigen, besteht stets die Möglichkeit, daß die Proteine nicht exprimiert bzw. nicht in die Oozytenplasmamembran integriert wurden. Daher wurden sämtliche Konstrukte mittels Western Blot auf den Einbau in die Plasmamembran hin untersucht. Bei der hier verwendeten Western Blot-Methode sind nicht nur

qualitative, sondern mit Einschränkung auch quantitative Aussagen über die Integration des jeweiligen Konstruktes in die Oozytenmembran möglich. Daher ist ein optischer Vergleich der Banden von Mutanten mit dem Wildtyp eines Blots durchaus legitim. Mit wenigen Ausnahmen wurden sämtliche Mutanten im gleichen Maße wie Wildtyp in die Membran eingebaut. Obwohl das chimäre Konstrukt GluR7-GluR6L3 eine geringere Expression zeigte, waren die Stromamplituden sogar größer als die von GluR6-Wildtyp. Andererseits waren die Stromamplituden von GluR6N-GluR7PC im Vergleich zu dem nahe verwandeten GluR6NP-GluR7C leicht verringert, was eventuell durch die beobachtete geringere Expression erklärt werden kann.

Ein weiteres interessantes Ergebnis lieferte die Ermittlung des Verhältnisses von glutamatinduzierten zu kainatinduzierten Strömen für Chimären, Punktmutanten und koexprimierte Mutanten. In der Literatur war dieses Verhältnis bisher lediglich für GluR6-Wildtyp nach Behandlung mit Concanavalin A bekannt ( $\sim 1$ ; Everts, 1998). Für den GluR7-Rezeptor, der lediglich in HEK 293-Zellen mit unphysiologisch hohen Agonistenkonzentrationen aktiviert werden konnte (Schiffer et al., 1997), ist dieser Wert bislang nicht ermittelt worden. Durch die funktionellen GluR7-Punktmutanten wurde es nun möglich, auch für den GluR7-Rezeptor das Verhältnis von glutamatinduzierten zu kainatinduzierten Strömen zu bestimmen, wobei allerdings berücksichtigt werden muß, daß es sich bei den betrachteten Rezeptoren nicht um GluR7-Wildtyp handelt. Die Tatsache aber, daß es sich um vier verschiedene GluR7-Mutanten handelt, deren Mutationen an unterschiedlichen Positionen im Rezeptor lokalisiert sind, und die trotzdem alle die gleiche Tendenz zeigen, erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß sich der GluR7-Wildtyp-Rezeptor ebenso wie diese Mutanten verhält. Das Verhältnis von glutamatinduzierten zu kainatinduzierten Strömen betrug für alle meßbaren GluR7-Punktmutanten  $\sim 10$ . Die Untersuchung der Chimären auf dieses Verhältniss hin ermöglichte die Zuordnung der Region in GluR7, die für diesen von GluR6-Wildtyp verschiedenen Faktor verantwortlich ist. Auch hier ist es die L3-Domäne, und zwar der C-terminale Bereich der L3-Domäne, der für den Unterschied zwischen GluR6 und GluR7 verantwortlich ist. Bei der Koexpression von GluR6-Wildtyp mit GluR7-Mutanten betrug das Verhältnis von glutamatinduzierten zu kainatinduzierten Strömen immer  $\sim 1$ , was eine Dominanz von GluR6 über GluR7 vermuten läßt (siehe 3.1.5).



### 4.3. Verknüpfung der Meßdaten mit einem dreidimensionalen Modell der Ligandenbindungsdomänen von GluR6 und GluR7

Die kürzlich publizierte Röntgenkristallstruktur der löslichen Ligandenbindungsdomäne der GluR2-"flop"-Isoform aus Ratte mit gebundenem Kainat diente als Matrize, um Modelle von homologen Glutamatrezeptor-Ligandenbindungsdomänen zu konstruieren. Die Modelle basierten auf Aminosäuresequenzvergleichen zwischen GluR2 und dem entsprechenden zu analysierenden Glutamatrezeptor. In der S1-S2-Röntgenkristallstruktur von GluR2 bindet Kainat in einem Spalt, der zwischen der S1- und S2-Domäne liegt. Dieser Spalt wird durch 4  $\alpha$ -Helices gebildet. Drei dieser Helices enthalten Bereiche (F, H und I), die direkt mit Kainat interagieren, während die vierte Helix (D) die Verbindung zwischen der S1- und S2-Domäne schafft (Armstrong et al., 1998).

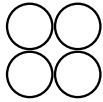
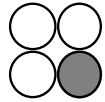
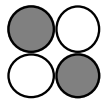
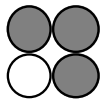
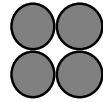
Aufgrund der vorliegenden Röntgenkristallstruktur der S2-Domäne von GluR2, konnten die miteinander interagierenden Aminosäuren in der S2-Domäne von GluR6 und GluR7 aufgefunden gemacht und verglichen werden (siehe Abb. 3.15.). Der Vergleich ergab, daß alle Aminosäuren in der S2-Domäne, die sich in GluR6 und GluR7 unterscheiden, jeweils nur mit solchen Aminosäuren direkt interagieren, die in diesen beiden Rezeptoren identisch sind. Eine direkte Interaktion zwischen zwei Aminosäuren, die sich in GluR6 und GluR7 unterscheiden, liegt demnach nicht vor und kann daher nicht der Grund für die funktionellen Unterschiede zwischen GluR6 und GluR7 sein. Wie jedoch anhand der Messungen von Chimären gezeigt werden konnte, sind mindestens zwei Determinanten in der S2-Domäne an der Ausprägung der funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Rezeptoren beteiligt. Unter Berücksichtigung des Modells muß daher angenommen werden, daß eine komplexe Struktur in der S2-Domäne für das "gating" verantwortlich ist, und nicht lediglich die Interaktion zweier Aminosäuren. Es muß jedoch bedacht werden, daß es sich bei der Röntgenkristallstruktur der Ligandenbindungsstelle lediglich um ein Modell für den nativen kompletten Rezeptor handelt. Aussagen, die ausschließlich auf dem Modell basieren, sind daher vorsichtig zu bewerten. Die Messungen an Chimären (GluR7-GluR6L3, GluR7-GluR6L3C/FC, GluR7-GluR6L3N) sowie die Tatsache, daß an vier verschiedenen Positionen in der L3-Domäne Aminosäuren gefunden wurden, die für die Funktionalität des Rezeptors möglicherweise eine Rolle spielen, unterstützen jedoch die Aussage, die aus den Modellen abgeleitet wurde.

Die Koexpressionen von GluR7-GluR6L3C/FC mit den Mutanten GluR7(K626E) und GluR7(ΔinsR651a/K652R/P653Q), bei denen die Mutationen in der vorderen Hälfte der L3-Domäne lokalisiert sind, führte zu keinem Anstieg der Stromamplituden. Ein Anstieg wäre dann zu erwarten gewesen, wenn diese Punktmutationen in Kombination mit einer weiteren Determinante aus der hinteren Hälfte (aus GluR7-GluR6L3C/FC) allein für die funktionellen Unterschiede verantwortlich wären. Bei diesem Ansatz besteht allerdings die Möglichkeit, daß sich entweder keine Heteromere bilden, oder daß entsprechende Mutationen auf demselben Rezeptormolekül liegen müssen. Bei der Koexpression von GluR7-GluR6L3N mit GluR7-GluR6L3C/FC wären Stromamplituden wie bei dem Homomer GluR7-GluR6L3 zu erwarten gewesen, was jedoch nicht der Fall war (lediglich 0.8%). Dieses Ergebnis zeigte, daß die Koexpressionsstrategie zur Analyse sich additiv verhaltender Mutationen nicht geeignet ist. Es konnte aber zugleich die wichtige Aussage getroffen werden, daß die Determinanten, die GluR7 in einen mit GluR6 vergleichbaren funktionellen Rezeptor verwandeln, auf derselben Rezeptoruntereinheit lokalisiert sein müssen.

#### **4.4. Heteromere Expression: Koexpression von GluR6-Wildtyp mit GluR7-Mutanten**

Werden zwei Untereinheiten koexprimiert, ist anzunehmen, daß sich eine binominale Verteilung der Untereinheiten-Kombinationen ergibt. Demnach existiert je eine 6.25%ige Wahrscheinlichkeit für die Bildung homomerer Rezeptoren und eine 87.5%ige Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Heteromeren, unter der Voraussetzung, daß beide Untereinheiten in gleichen Anteilen vorliegen und eine tetramere Rezeptorstöchiometrie angenommen wird.



<b>Homomer</b>  <b>1</b> <b>mögliche</b> <b>Kombination</b>	<b>Heteromer</b>  <b>4</b> <b>mögliche</b> <b>Kombinationen</b>	<b>Heteromer</b>  <b>6</b> <b>mögliche</b> <b>Kombinationen</b>	<b>Heteromer</b>  <b>4</b> <b>mögliche</b> <b>Kombinationen</b>	<b>Homomer</b>  <b>1</b> <b>mögliche</b> <b>Kombination</b>
<b>6.25 %</b>	<b>25 %</b>	<b>37.5 %</b>	<b>25 %</b>	<b>6.25 %</b>
<b>6.25 %</b>	<b>87.5 %</b>			<b>6.25 %</b>

**Abb. 4.1.:** Berechnung der Wahrscheinlichkeiten (%) für die Bildung von homomeren und heteromeren Rezeptoruntereinheiten, die bei der 1:1 Koexpression zweier Untereinheiten entstehen können.

"Reine" Heteromerstromamplituden können nicht direkt gemessen werden. Um sie zu erhalten, müssen die Homomerstromamplituden vom gemessenen Gesamtstrom subtrahiert werden. Die zu erwartenden Homomerstromamplituden sind aus parallel durchgeführten Kontrollexperimenten mit einzeln exprimierten Untereinheiten (siehe 3.1.) bekannt. Bei Koinjektion zweier funktioneller Untereinheiten ist somit mindestens die Summe der Stromamplituden der beiden homomeren Rezeptoren zu erwarten. Bei dieser Rechnung wird eine stochastische Untereinheitenassoziation angenommen, bei der es keinerlei Untereinheiten-Präferenzen gibt. Die Daten der Koexpression von GluR6-Wildtyp mit GluR7-Mutanten deuten hingegen auf eine nicht-stochastische Verteilung hin, da in vielen Fällen bei einer Koexpression die gemessenen Gesamtstromamplituden geringer waren, als es allein schon dem berechneten Anteil der homomeren Rezeptoren entsprach. Im Speziellen: Für GluR6-Wildtyp koexprimiert mit GluR7-Wildtyp, GluR6N-GluR7PC, GluR6NP-GluR7C, GluR7-GluR6FC, GluR7-GluR6L3C/FC, GluR7(N748S), GluR7(I705V), GluR7(I732M), oder GluR7(InsR651a/K652R/P653Q) waren die gemessenen Ströme durchgehend kleiner als die kalkulierten Stromwerte der zwei homomeren Rezeptor-Populationen. Diese unerwartet niedrigen Werte sind nicht mit verringerter Proteinexpression zu erklären (siehe Abb. 3.17.).

Für einige Kombinationen von Untereinheiten (Koexpression von GluR6 mit GluR7N-GluR6PC, GluR7NP-GluR6C, GluR6-GluR7FC, GluR6-GluR7L3, GluR7-GluR6L3, GluR7-GluR6L3C/FC) war eine Berechnung der

Heteromerstromamplituden möglich, denn die gemessenen Gesamtströme waren größer als die berechneten Ströme der beiden beteiligten homomeren Rezeptor-Populationen. In diesen Fällen wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen gemessenen Gesamtströmen und berechneten Stromamplituden für Heteromere gefunden. Es wäre prinzipiell denkbar, daß die Heteromerbildung für diese Kombinationen gehemmt war, so daß lediglich die Ströme von homomeren Komplexen gemessen wurden. In solch einem Fall hätten jedoch die gemessenen Ströme größer als 100% betragen müssen, da allein GluR6 als Homomer schon 100% Strom liefert. Hinzu kämen die Homomerströme der funktionellen Chimären, die in einigen Fällen zusätzlich 150-200% Strom liefern würden. Da jedoch nur Stromamplituden von ~100% gemessen wurden, ist von der Bildung heteromerer Komplexe auszugehen.

Schlußfolgernd kann zusammengefaßt werden, daß die Koexpression von GluR6 und GluR7 anscheinend zu einer nicht-stochastischen Anordnung der Untereinheiten führt, wobei wahrscheinlich der heteromere Komplex favorisiert wird.

Vor kurzem wurde von der Arbeitsgruppe von Mark Mayer gezeigt, daß die Kainatrezeptoruntereinheiten GluR5, GluR6 und GluR7 nach Koexpression in HEK 293-Zellen funktionelle Heteromere bilden (Cui und Mayer, 1999). Ähnlich den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, wurde die Beobachtung gemacht, daß bei einer Heteromerbildung von GluR7(R) mit GluR6(Q) eine deutliche Stromamplitudenreduktion auftritt. Durch Applikation unterschiedlicher Agonisten und durch das Injizieren der Untereinheiten in variierender Menge konnte eindeutig die Heteromerbildung beider Untereinheiten nachgewiesen werden. Die Reduktion der Stromamplituden bei Koexpression wurde als Indiz dafür genommen, daß die Heteromerbildung von GluR7 mit GluR6 die hohe funktionelle Expression, die für GluR6 typisch ist, einschränkt. Als Begründung wurde spekuliert, daß die Desensitisierung bei GluR7 schon bei geringen Agonistenkonzentrationen erfolgt und bei Koexpression mit GluR6 dominant ist. Unter Berücksichtigung der Beobachtung von Schiffer et al., 1997, daß GluR7, exprimiert in HEK-Zellen, lediglich bei Agonistenkonzentrationen im millimolaren Bereich meßbare Stromamplituden zeigt, hieße dies, daß GluR7 bei geringen Konzentrationen desensitisiert, aber erst bei relativ hohen Konzentrationen Ionenfluß möglich ist. Die Daten der vorliegenden Doktorarbeit hingegen zeigen, daß verschiedene GluR7-Mutanten bei relativ geringen Agonistenkonzentrationen (300  $\mu$ M)

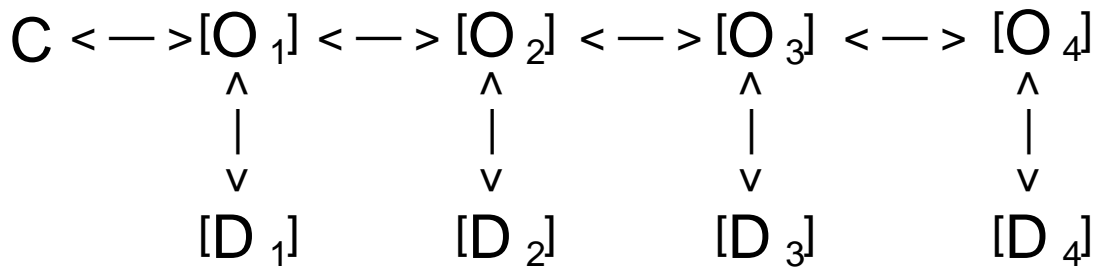
Ionenfluß zeigen. Der Ionenfluß kann in der Regel erst nach Blockieren der Desensitisierung durch das Lektin Concanavalin A gemessen werden. Im folgenden wird eine Hypothese vorgestellt, durch die versucht wird, die im ersten Eindruck widersprüchlichen Daten zu einem Bild zu verknüpfen.

Unter der Annahme, daß sich ein funktioneller Glutamatrezeptor aus vier Untereinheiten zusammensetzt und jede Untereinheit die anderen drei durch Konformationsänderung beeinflussen kann, kann folgendes Schema angenommen werden:

Der Rezeptor kann grundsätzlich drei verschiedene Zustände annehmen:

1. geschlossener Zustand
2. geöffneter Zustand
3. desensitisierte Zustand

Nur geöffnete Untereinheiten können in den desensitisierten Zustand übergehen. Der Vorgang der Desensitisierung wird wie folgt angenommen (Mano et al., 1996; Laube et al., 1997): Durch Ligandenbindung an eine Untereinheit findet vermutlich eine Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes statt, die für die Ionenkanalöffnung und damit für die Translation der Ligandenbindung in Porenöffnung entscheidend ist. Diese Konformationsänderung wird auch als "gating" bezeichnet. Den "gating"-Mechanismus hat man sich als eine Art Venusfliegenfalle vorzustellen (siehe auch 4.2.). Nach Ligandenbindung an den einen Teil der zweiteiligen Ligandenbindungsstelle (N-terminal von TMD A) vollzieht sich eine Konformationsänderung, die zur Öffnung der Ionenpore führt. Dabei werden durch Interaktion des Liganden mit dem zweiten Teil der Ligandenbindungsstelle zwischen TMD B und C beide an der Ligandenbindung beteiligten Regionen in engeren Kontakt gebracht, wodurch der Ligand wie die Fliege in der Venusfliegenfalle eingeschlossen wird. Dies hat den Übergang des Rezeptors in den desensitisierten Zustand zur Folge.



**Abb. 4.2.:** "Gating"-Modell: Nach dem Modell gibt es je vier desensitisierte und geöffnete Zustände für die Untereinheiten in einem Rezeptorkomplex. C = geschlossener Zustand, O = offener Zustand, D = desensitisierte Zustand

Die oben vorgestellten Daten ließen sich erklären, wenn Desensibilisierung durch eine Untereinheit möglich wäre, die Öffnung des Rezeptors, so daß Ionenstrom möglich ist, jedoch erst durch Bindung von Liganden an mindestens zwei Untereinheiten. Zu unterscheiden ist hier zwischen geöffneten Zustand einer Untereinheit und geöffneten Zustand des Gesamtkomplexes mit vier Untereinheiten. Insgesamt gäbe es nach der Hypothese je vier Desensibilisierungs- und Öffnungszustände für die Untereinheiten in einem Rezeptorkomplex (siehe Abb. 4.2.). Wenn nun geringe Ligandenkonzentrationen appliziert werden, erfolgt ein Übergang vom geschlossenen Zustand einer Untereinheit in den geöffneten Zustand, dem sofort die Desensibilisierung folgt. Bei Erhöhung der Ligandenkonzentration wird eine weitere Untereinheit geöffnet. Beide geöffneten Untereinheiten gehen in den desensitisierten Zustand über. Der Übergang offen  $\rightarrow$  desensitisiert wird durch benachbarte geschlossene Untereinheiten begünstigt, daher sind bei geringen Konzentrationen keine Ströme meßbar. Benachbarte offene Untereinheiten wiederum begünstigen den Übergang desensitisiert  $\rightarrow$  offen. Diese Tendenz wird durch steigende Liganden-Konzentrationen begünstigt. Dadurch würde das Verhältnis von offen zu desensitisiert größer werden, obwohl mehr Untereinheiten desensibilisieren könnten. Die Porenöffnungseffizienz ist bei GluR7-Wildtyp gering. Bei geringen Konzentrationen wären eventuell nur sehr kleine Ströme zu erkennen. Wenn in diesem Konzentrationsbereich die Desensibilisierung auch noch begünstigt wird, ist leicht zu verstehen, warum in HEK-Zellen GluR7 bei geringen Konzentrationen im mikromolaren Bereich keine Ströme zeigt. Da der geöffnete Zustand bei hohen Ligandenkonzentrationen gegenüber der Desensibilisierung begünstigt würde, würde dies erklären, warum nur ein Potenzierungsfaktor von 2 gefunden wurde. Die hier vorgestellten funktionellen GluR7-Punktmutanten haben

nicht das Desensitisierungsverhalten von GluR7 verändert, sondern nur die Effizienz der Porenöffnung. Demnach ist eventuell schon nach Bindung von zwei Liganden nach Blockierung der Desensitisierung Strom sichtbar. Bei diesen Ligandenkonzentrationen ist aber der Desensitisierungszustand gegenüber dem Öffnungszustand begünstigt, was den veränderten größeren Potenzierungsfaktor erklären würde.

Als Resumé kann festgestellt werden, daß bei Koexpression von GluR6-Wildtyp mit GluR7-Wildtyp oder GluR7-Mutanten, diese funktionelle Heteromere bilden. Die GluR7-Mutanten, koexprimiert mit GluR6-Wildtyp, zeigen einen ähnlich reduzierenden Effekt, wie er bei einer Koexpression von GluR6-Wildtyp mit GluR7-Wildtyp zu beobachten ist. Die Analyse der mit GluR6-Wildtyp koexprimierten Chimären ermöglichte die Zuordnung dieses Effektes zu der C-terminalen Hälfte der L3-Domäne plus der gesamten Region C-terminal von Transmembrandomäne C von GluR7.

#### **4.5. Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung der Kainatbindeproteine anhand von Chimären**

Die Kainatbindeproteine (KBP) werden zu den nicht-funktionellen Glutamatrezeptoren gezählt, weil es bislang nicht möglich war, in homomerer oder heteromerer Expression in *Xenopus*-Oozyten oder Säugerzellen agonisteninduzierte Stromantworten zu erhalten. Wie auch beim GluR7-Rezeptor wurde Proteinexpression und Ligandenbindung für die Kainatbindeproteine eindeutig nachgewiesen (Gregor et al., 1989; Hampson et al., 1989; Wada et al., 1989; Eshhar et al., 1992; Villmann et al., 1997). Ligandenbindung wurde dabei für die Agonisten Kainat, Glutamat und Domoat gezeigt, nicht jedoch für AMPA (Henley, 1994).

Mit Hilfe eines Ionenporentransplantationsexperiments, in dem die Porenregion von verschiedenen Kainatbindeproteinen in den Sequenzhintergrund von GluR6 transplantiert wurde (GluR6-PKBP), konnten die Kainatbindeprotein-Poren auf Funktionalität überprüft werden. Tatsächlich besitzen alle Kainatbindeproteine funktionelle Poren. Anhand der funktionellen Porenkonstrukte war es möglich, die KBP-Poren elektrophysiologisch zu charakterisieren (Villmann et al., 1997). Die Eigenschaften der Kainatbindeprotein-Poren unterschieden sich von denen der AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptor-Poren, wobei jedoch einige

Eigenschaften denen des Kainatrezeptors GluR6 ähneln. Alle Kainatbindeprotein-Poren sind durch einwärts rektifizierende Strom-Spannungskurven charakterisiert, werden durch Zink geblockt und sind kalziumpermeabel (Villmann et al., 1997). Kainatbindeproteine besitzen somit funktionelle Ligandenbindungsstellen, sie werden exprimiert und haben funktionsfähige Ionenporen. Daher ist die Ursache für die Nicht-Funktionalität der Kainatbindeproteine ähnlich wie bei GluR7 wahrscheinlich im "gating"-Mechanismus, d.h. im Translationsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Porenöffnung, zu suchen. Bei der Suche nach möglichen Domänen, die für das "gating" verantwortlich sein könnten, scheiden die Ligandenbindungsdomänen S1 und S2 aus, da intakte Ligandenbindung für mehrere Agonisten gezeigt wurde. Auch die Pore kann aufgrund ihrer Funktionalität ausgeschlossen werden. Die Kainatbindeproteine unterscheiden sich von anderen Glutamatrezeptoren auffällig in ihrer Größe. Sie besitzen im Vergleich zu anderen Glutamatrezeptoren einen wesentlich verkürzten N-Terminus, der, außerhalb der Ligandenbindungsdomäne S1 liegend, als Ursache für die Nicht-Funktionalität in Frage käme. Um die Rolle des kurzen N-Terminus zu untersuchen, wurde der lange N-Terminus von GluR6 auf KBP verpflanzt. Diese Chimäre zeigte jedoch keine Ionenkanalfunktion (Villmann, 1998). Demnach hat offensichtlich auch der kainatbindeproteinspezifische kurze N-Terminus keinen Einfluß auf die Rezeptorfunktion.

Bislang in der Literatur nicht beachtet wurden Regionen, die sich zwischen Ligandenbindungsstelle und der Porendomäne befinden. Nach der Mosaiktheorie sind die Ligandenbindungsdomänen S1 und S2 aus bakteriellen periplasmatischen Bindeproteinen hervorgegangen. Die Pore stammt nach dieser Theorie von Kaliumkanalporen ab. Zwischen diesen Domänen befinden sich kurze Aminosäuresequenzen, die die TMDs mit den Ligandenbindungsdomänen verbinden. Viele Kaliumkanäle sind spannungsabhängige Kanäle. Der Spannungssensor ist in einer Transmembrandomäne (S4) lokalisiert. Bei einer Spannungsänderung wird durch Verschieben einiger positiv geladener Aminosäuren in S4 eine Konformationsänderung des Proteins erzeugt, die gegebenenfalls zur Öffnung der Kanäle führen kann. Die Situation ist bei den Glutamatrezeptoren in der Hinsicht anders, als daß Glutamatrezeptoren ligandenaktivierte Kanäle sind. Unter Berücksichtigung der hohen Homologie der Poren beider Kanaltypen besteht die Wahrscheinlichkeit,



daß auch bei den Glutamatrezeptoren der Bereich, der die Porenöffnung steuert (gating-Region), in oder an den TMDs lokalisiert ist. Die Transmembrandomänen wurden im Vorfeld durch Porentransplantationen, bei denen nicht nur die eigentliche Porenregion, sondern auch die angrenzenden TMD transplantiert wurden, für die Regulierung des gating-Mechanismus ausgeschlossen (Villmann, 1998). Es blieb also noch, zu untersuchen, ob die Regionen, die die TMD mit den Ligandenbindungsdomänen verbinden (sogenannte Linkerregionen), eine Rolle im "gating" spielen. Dazu wurden zwei Transplantationsexperimente durchgeführt. In der ersten Studie wurde analog zu den bereits durchgeführten Porentransplantationen die gesamte Porenregion plus TMDs A und B sowie angrenzende Linker A und B von GluR6 in KBP(Rp) transplantiert (KBP-PXLGluR6) und umgekehrt (GluR6-PXLKBP), mit dem Ergebnis, daß beide Konstrukte nicht-funktionell waren. Auf den ersten Eindruck scheint es, als ob demnach auch die Linker keine Rolle beim "gating"-Mechanismus bei den Kainatbindeproteinen spielen. Für das Konstrukt GluR6-PXL-KBP wurde ohnehin keine Funktionalität erwartet, basierend auf der Überlegung, daß die vermutlich nicht-funktionellen Linker der Kainatbindeproteine eine Öffnung der Pore auch nach Transplantation in GluR6 verhindern. Anders sieht es für das Konstrukt KBP-PXLGluR6 aus. Hier stammen die Linker A und B aus GluR6, so daß eigentlich ein funktionelles Konstrukt erwartet wurde. Bei dieser Chimäre muß allerdings berücksichtigt werden, daß es neben den Linkern A und B von GluR6 auch die TMDs A und B, sowie die Porenregion von GluR6 enthält. Es ist theoretisch möglich, daß sich die Kombination dieser Domänen aus GluR6 in der Kainatbindeprotein-Umgebung nicht additiv in Bezug auf Funktionalität des Kainatbindeproteins auswirkt. Im Gegenteil, die Pore von GluR6 könnte in diesem Falle den "gating"-Mechanismus unterbrechen. Daher wurden im zweiten Transplantationsexperiment lediglich die Linker-Regionen vom Kainatbindeprotein gegen die von GluR6 ausgetauscht.

#### **4.6. Neue Erkenntnisse über die Funktion der Linkerdomänen aus Experimenten an nicht-funktionellen Kainatbindeproteinen**

Die Linkerregionen, die möglicherweise für das "gating" verantwortlich sind, befinden sich zwischen den Ligandenbindungs- und Transmembrandomänen. Diese verbindenden Regionen werden aus



wenigen Aminosäuren gebildet, deren Anzahl unter den Rezeptor-Untereinheiten variiert. Beim KBP (aus *Rana pipiens*), z.B., werden die Linkerregionen durch 9-15 Aminosäuren gebildet. Bei der zweidimensionalen schematischen Darstellung eines typischen Glutamatrezeptors fällt das Augenmerk zunächst auf die beiden Linkerregionen, die die TMD A mit der S1-Domäne (Linker A) und die TMD B mit der S2-Domäne (Linker B) verbinden. Im zweidimensionalen Schema etwas abseits und nicht in der Nähe der Porenregion lokalisiert, befindet sich aber noch eine dritte Linkerregion, die die TMD C mit der S2 Domäne (Linker C) verbindet. In der nativen dreidimensionalen Struktur liegen wahrscheinlich alle drei Linkerregionen räumlich nahe beieinander. Daher wurden alle drei Linkerregionen des Kainatbindeproteins untersucht. Obwohl letztendlich nur Mutationen an den ersten beiden Linkerregionen zu einer Funktionalität geführt haben, heißt das nicht, daß die Linkerregion C keine Rolle spielt. Gerade diese Region unterscheidet sich in ihrer Aminosäuresequenz und deren Anzahl am meisten von der in GluR6: Nicht eine einzige Aminosäure in der Linkerregion C entspricht der in GluR6. Die Tatsache, daß das Konstrukt KBP-PXLGluR6 nicht funktionell ist, KBP(Linker B)GluR6 und KBP(Linker A+B)GluR6 jedoch Ionenstrom zulassen, könnte mit der Linkerregion C erklärt werden, die durch ihre Faltung eventuell nur die Informationsübertragung der Ligandbindung auf eine KBP-Pore, nicht aber eine GluR6-Pore erlaubt. Diese Überlegungen sind natürlich spekulativ, könnten aber durch die Transplantation der Linkerregion C aus GluR6 in das Konstrukt KBP-PXLGluR6 überprüft werden. In diesem Konstrukt lägen alle drei Linkerregionen sowie die Porenregion aus GluR6 vor.

Das funktionelle Konstrukt KBP-PCL-PXL, bei dem insgesamt 9 Aminosäureaustausche in den Linkerregionen A und B vorliegen, zeigt sehr deutlich, daß diese Regionen eine Rolle im "gating"-Mechanismus des Kainatbindeproteins spielen. Die Konstrukte KBP(Linker B)GluR6 und KBP(Linker A+B)GluR6 unterstützen diese Vermutung. Ob auch bei anderen nicht-funktionellen Rezeptoren an dieser Stelle ein Defekt vorliegt, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Die erfolgreiche Transplantation der Linkerregionen am Kainatbindeprotein gibt Hoffnung, daß diese Methode zur Überprüfung der Funktion auch an anderen Rezeptoren zum Erfolg führt. Als weitere nicht-funktionelle Rezeptoren wären die Delta-Rezeptoren Delta 1 und Delta 2, die Kainatrezeptoren KA 1 und KA 2, die NMDA-Rezeptoruntereinheiten (NR3 A und NR2 B), und eventuell die

NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2 A bis NR2 D, die ebenso wie die KA-Rezeptoren nur in Koexpression funktionell sind, zu testen.

#### **4.7. Überlegungen zur physiologischen Bedeutung der nicht-funktionellen Glutamaterezeptoren, insbesondere der Kainatbindeproteine und des GluR7-Rezeptors**

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde untersucht, welche Domänen für die Nicht-Funktionalität der Kainatbindeproteine verantwortlich sind. Aber warum gibt es überhaupt nicht-funktionelle Rezeptoruntereinheiten? Diese Frage beschäftigt schon seit fast 20 Jahren die Wissenschaftler, und für einige dieser Rezeptor-Untereinheiten verdichten sich die Hinweise, daß sie als Modulatoren für andere Rezeptoruntereinheiten wirken. Die Vorstellung, daß einige Untereinheiten als Modulatoren wirken, oder nur in Koexpression mit anderen Untereinheiten Kanalfunktion zeigen, ist nicht abwegig, da dadurch eine neue Möglichkeit der Regulation im Nervensystem geschaffen wird. Bei einer begrenzten Anzahl von Untereinheiten wird somit lediglich durch ein unterschiedliches Expressionsmuster in unterschiedlichen Hirnbereichen eine enorme Variabilität erzeugt. Erst kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, die GluR7 als putativen Modulator für GluR6 postuliert (Cui und Mayer, 1999). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Koexpressionsstudien mit GluR6 und GluR7 unterstützen diese Interpretation. GluR7 koexprimiert mit GluR6 reduziert die Stromamplituden von GluR6 erheblich.

Die Verteilung der Proteinexpression beider Rezeptoren im Hirn ist sehr unterschiedlich. GluR6 und GluR7 kommen sowohl im Cortex als auch im Cerebellum vor. Im Hippocampus hingegen wird lediglich GluR6 in hohen Konzentrationen, nicht aber GluR7 exprimiert. Das gleiche Muster ist in cerebellären Granulazellen zu finden (Hollmann und Heinemann, 1994; Bischoff et al., 1997). Parallelen zur Situation bei GluR6 und GluR7 kann man in fast jeder Glutamaterezeptorfamilie finden. Nur um ein weiteres Beispiel zu nennen: KA1 und KA2 sind für sich alleine nicht in der Lage, funktionelle Ionenkanäle auszubilden. KA2 bildet jedoch funktionelle heteromere Rezeptorkomplexe mit GluR5 und GluR6 (Herb et al., 1992; Hollmann und Heinemann, 1994). Auch hier führt ein unterschiedliches Expressionsmuster in den diversen Hirnregionen zu größerer Funktionsvielfalt. Für die Kainatbindeproteine sind bislang nur für einen

Vertreter Hinweise für eine modulierende Wirkung gefunden worden. 1996 wurde von Soloviev et al. ein Kainatbindeprotein (XenUI = KBP(XI)) aus der Kröte *Xenopus laevis* kloniert. Homomer exprimiert ist auch dieses Protein, wie alle anderen Kainatbindeproteine, nicht in der Lage, einen funktionellen Rezeptor auszubilden. Er scheint jedoch im heteromeren Komplex mit einer ebenfalls aus *Xenopus* klonierten NR1-Untereinheit (XenNR1) funktionelle Kanäle zu bilden, die durch NMDA, Kainat und AMPA (zusammen mit dem Koagonisten Glyzin) aktiviert werden können (Soloviev et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden die funktionellen KBP-Konstrukte sowohl in Oozyten als auch in Säugerzellen gemessen. Grund dafür war die Absicht, den Beweis zu erbringen, daß es sich um reale Ströme und nicht um Artefakte handelt, da die maximalen Stromamplituden in Froschoozyten meistens sehr klein waren. Da auch in HEK-Zellen Ströme gemessen wurden (die Messungen an HEK-Zellen wurden von C. Villmann und H.-G. Breiting in Erlangen durchgeführt), kann angenommen werden, daß es sich um reale Ströme handelt. Außerdem sollte anhand des zweiten Meßsystems untersucht werden, ob es eventuell Modulatoren für das Kainatbindeprotein in dem einen System, aber nicht im anderen gibt. Bei einem negativen Ergebnis der Messungen an Zellen hätte man vermuten können, daß es in *Xenopus*-Oozyten einen Modulator für das Kainatbindeprotein gibt, der in HEK-Zellen nicht vorhanden ist. Die Idee dafür entstand aufgrund der oben erwähnten Studien an XenUI und XenNRI. Für das Vorkommen eines möglichen Modulators, der ausschließlich in Oozyten vorkommt, wurden jedoch bislang keine Hinweise gefunden. Es wurden in beiden Systemen, *Xenopus*-Oozyten und HEK-Zellen, beim KBP-PCL-PXL Ströme gemessen.

Es bleibt die spannende Frage bestehen, welche Funktion die Kainatbindeproteine haben. Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, welche Regionen im Kainatbindeprotein wahrscheinlich für die Nicht-Funktionalität verantwortlich sind. Durch das Konstruieren funktioneller Kainatbindeproteine eröffnen sich nun neue Möglichkeiten, die physiologische Funktion dieser Rezeptor-Untereinheiten zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Innerhalb der ionotropen Glutamatrezeptorfamilie kommen sowohl Rezeptoren mit funktionellen Ionenkanälen als auch nicht-funktionelle Rezeptoren vor. Der Grund für das Vorkommen nicht-funktioneller Glutamatrezeptoren ist nicht bekannt, es werden jedoch modulierende Funktionen vermutet. In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel der nicht-funktionellen Untereinheiten GluR7 und KBP eine Struktur-Funktionsanalyse mit dem Ziel durchgeführt, die Ursache für die Nicht-Funktionalität dieser Rezeptoruntereinheiten zu finden.

Da fehlende Proteinexpression, nicht ausreichende Bindung der Liganden an die Untereinheiten oder nicht-funktionelle Ionenporen durch vorausgehende Experimente als Grund für Nicht-Funktionalität ausgeschlossen werden konnte, wurde vermutet, daß bei diesen Rezeptoruntereinheiten der Informationsübertragungsmechanismus zwischen Ligandenbindungsstelle und Ionenpore (= "gating") fehlerhaft ist. Durch gezielte Domänaustausche zwischen der funktionellen KA-Rezeptoruntereinheit GluR6 und GluR7 bzw. zwischen GluR6 und KBP wurden Domänen in GluR7 und KBP identifiziert, die für deren Nicht-Funktionalität verantwortlich sind.

GluR6 weist sehr hohe Aminosäuresequenzhomologien zu GluR7 auf und zeigt große agonisteninduzierte Stromamplituden, während bei GluR7 trotz der hohen Homologie durch Applikation von Agonisten in physiologischen Konzentrationen keine Ströme erzeugt werden können. GluR7 ist trotz dieser Eigenschaft nicht zu den nicht-funktionellen Rezeptoren zu zählen, sondern es handelt sich vielmehr um einen Rezeptor mit extrem geringer Porenöffnungseffizienz. Dies wiederum führt dazu, daß die Applikation von Agonisten in physiologischen Konzentrationen nicht zur Aktivierung des Rezeptors ausreicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von Chimären zwischen GluR6 und GluR7 gezeigt, daß der Austausch der L3-Domäne aus GluR7 mit der aus GluR6 die Porenöffnungseffizienz von GluR7 in dem Maße erhöht, daß nun Stromamplituden wie bei GluR6-Wildtyp erzielt werden. Demnach ist die L3-Domäne aus GluR7 für dessen ineffiziente Porenöffnung verantwortlich und spielt daher für den "gating"-Mechanismus eine wichtige Rolle.

Die Koexpression von GluR6 und GluR7 hat gezeigt, daß GluR7 einen stark reduzierenden Effekt auf die Maximalstromamplituden von GluR6 ausübt.

Die Reduktion der Stromamplituden bei Koexpression hat eventuell physiologische Bedeutung, da GluR7 bei differentieller Proteinexpression die durch GluR6 erzeugten Ströme regional regulieren könnte. Anhand der Domänenaustausche zwischen GluR6 und GluR7 konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit die hintere Hälfte der L3-Domäne sowie der anschließende C-terminale Bereich für diesen reduzierenden Effekt verantwortlich gemacht werden. Des Weiteren wurden mehrere GluR7-Punktmutanten konstruiert, von denen drei durch physiologische Agonistkonzentrationen aktiviert werden konnten, also funktionell waren. Alle Punktmutationen, die GluR7 in funktionelle Rezeptoruntereinheiten verwandelten, liegen in der L3-Domäne. Für die funktionellen GluR7-Punktmutanten sowie für sämtliche Chimären zwischen GluR7 und GluR6 wurden  $EC_{50}$ -Werte für die Agonisten Kainat und Glutamat bestimmt. Die  $EC_{50}$ -Werte für Kainat sind für alle getesteten Konstrukte nicht signifikant verschieden, für die funktionellen GluR7-Punktmutanten und einige der Chimären sind jedoch die  $EC_{50}$ -Werte für Glutamat erhöht. Die Messungen an Chimären und GluR7-Punktmutanten lassen eine eindeutige Zuordnung dieses Effektes auf die N-terminale Region bis zur Transmembrandomäne A zu. Das Verhältnis von glutamatinduzierten zu kainatinduzierten Strömen (nach Behandlung mit Concanavalin A zur Aufhebung der Desensibilisierung) beträgt bei GluR6-Wildtyp stets  $\sim 1$ . Für alle funktionellen GluR7-Punktmutanten sowie für einige der Chimären beträgt dieses Verhältnis  $\sim 10$ . Die Analyse der Chimären ermöglichte die Zuordnung der verantwortlichen Region in GluR7 ebenfalls zur L3-Domäne.

Bei den nicht-funktionellen Kainatbindeteinen wurde vermutet, daß die Regionen zwischen den Ligandenbindungsdomänen und den Transmembrandomänen (= Linker) für die Nicht-Funktionalität verantwortlich sind. Auch hier führte eine gezielte Domänentransplantation, in diesem Fall der Linker, zum Ziel. Es wurden die Linker aus KBP jeweils gegen die Linker aus GluR6 ausgetauscht. Die Analyse der Linker-Chimären zeigt, daß Linker B in KBP für dessen Nicht-Funktionalität entscheidend ist und im "gating"-Mechanismus der KBPs eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können in Zukunft von Nutzen sein, um die physiologische Rolle der nicht-funktionellen Glutamatrezeptoren untersuchen zu können. Die vorgestellten

funktionellen GluR7- und KBP-Mutanten stellen wertvolle molekulare "Werkzeuge" dar, um diesem Ziel näherzukommen.

Schlagwörter: Glutamatrezeptoren, Kainatbindeproteine, Kainatrezeptoren

## 6. Literaturverzeichnis

- Advokat C, Pellegrin AI (1992) Excitatory amino acids and memory: evidence from research on Alzheimer's disease and behavioral pharmacology. *Neurosci Biobehav Rev* 16:13-24.
- Appel SH (1993) Excitotoxic neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *TINS* 16:3-5.
- Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, Mishina M (1993) Selective expression of the glutamate receptor channel  $\delta 2$  subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1267-1276.
- Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E (1998) Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395:913-917.
- Arvola M, Keinänen K (1996) Characterization of the ligand binding domains of glutamate receptor (GluR)-B and GluR-D subunits expressed in *Escherichia coli* as periplasmic proteins. *J Biol Chem* 271:15527-15532.
- Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Bregestovski P (1992) Protein kinase C modulation of NMDA currents: An important link for LTP induction. *TINS* 15:333-339.
- Bettler B, Egebjerg J, Sharma G, Pecht G, Hermans-Borgmeyer I, Moll C, Stevens CF, Heinemann S (1992) Cloning of a putative glutamate receptor: A low affinity kainate binding subunit. *Neuron* 8:257-265.
- Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann S (1990) Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* 5:583-595.



- Bischoff S, Barhanin J, Bettler B, Mülle C, Heinemann S (1997) Spatial distribution of kainate receptor subunit messenger RNA in the mouse basal ganglia and ventral mesencephalon. *J Comp Neurol* 379: 541-562.
- Bliss TVP, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Chen GQ, Sun Y, Jin RS, Gouaux E (1998) Probing the ligand binding domain of the GluR2 receptor by proteolysis and deletion mutagenesis defines domain boundaries and yields a crystallizable construct. *Prot Sci* 7:2623-2630.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.
- Cockcroft VB, Ortells MO, Thomas P, Lunt GG (1993) Homologies and disparities of glutamate receptors: A critical analysis. *Neurochem Int* 23:583-594.
- Collingridge GL, Bliss TVP (1987) NMDA receptors - their role in long-term potentiation. *TINS* 10:288-293.
- Collingridge GL, Lester RAJ (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.
- Collingridge GL, Bliss TVP (1995) Memories of NMDA receptors and LTP. *TINS* 18:54-56.
- Craig AM, Blackstone CD, Huganir RL, Banker G (1993) The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* 10:1055-1068.
- Cui C, Mayer ML (1999) Heteromeric Kainate Receptors Formed by the Coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7. *JNeurosci* 19:8281-8291.

- Dingledine R, McBain CJ, McNamara JO (1990) Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *TIPS* 11:334-338.
- Dingledine R, Hume RI, Heinemann SF (1992) Structural determinants of barium permeation and rectification in non-NMDA glutamate receptor channels. *J Neurosci* 12:4080-4087.
- Egebjerg J, Bettler B, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* 351:745-748.
- Eshhar N, Hunter C, Wenthold RJ, Wada K (1992) Structural characterization and expression of a brain specific gene encoding chick kainate binding protein. *FEBS Lett* 297:257-262.
- Everts I (1998) Thesis, University of Kiel: N-Glykosylierung an ionotropen Glutamaterezeptoren: Ihre Bedeutung für die Rezeptorfunktion und deren Modulation durch Lektine. Göttingen: Cuvillier Verlag.
- Everts I, Villmann C, Hollmann M (1997) N-glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol* 52:861-873.
- Gregor P, Mano I, Maoz I, McKeown M, Teichberg VI (1989) Molecular structure of the chick cerebellar kainate binding subunit of a putative glutamate receptor. *Nature* 342:689-692.
- Gregor P, Yang XD, Mano I, Takemura M, Teichberg VI, Uhl GR (1992) Organization and expression of the gene encoding chick kainate binding protein, a member of the glutamate receptor family. *Mol Brain Res* 16:179-186.
- Hampson DR, Wheaton KD, Dechesne CJ, Wenthold RJ (1989) Identification and characterization of the ligand binding subunit of a kainic acid receptor using monoclonal antibodies and peptide mapping. *J Biol Chem* 264:13329-13335.

- Henley JM (1994) Kainate binding proteins: Phylogeny, structures and possible functions. *TIPS* 15:182-190.
- Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH (1992) The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 8:775-785.
- Higuchi M, Single FN, Kohler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg PH (1993) RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* 75:1361-1370.
- Hollmann M (1996) The topology of glutamate receptors: Sorting through the domains. In: *The Ionotropic Glutamate Receptors* (Monaghan DT, Wenthold R, eds), pp 39-79. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Hollmann M (1999) Structure of ionotropic glutamate receptors. In: *Ionotropic glutamate receptors in the CNS* (Jonas P, Monyer H, eds), pp 3-98. Berlin: Springer.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hollmann M, Maron C, Heinemann S (1994) N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13:1331-1343.
- Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342:643-648.
- Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253:1028-1031.

- Ishimaru H, Kamboj R, Ambrosini A, Henley JM, Soloviev MM, Sudan H, Rossier J, Abutidze K, Rampersad V, Usherwood PNR, Bateson AN, Barnard EA (1996) A unitary non-NMDA receptor short subunit from *Xenopus*: DNA cloning and expression. *Recept Chann* 4:31-49.
- Kamboj RK, Schoepp DD, Nutt S, Shekter L, Korczak B, True RA, Zimmerman DM, Wosnick MA (1992) Molecular structure and pharmacological characterization of humEAA2, a novel human kainate receptor subunit. *Mol Pharmacol* 42:10-15.
- Kang C-H, Shin WC, Yamagata Y, Gokcen S, Ames GF-L, Kim SH (1991) Crystal structure of the lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium* at 2.7-Å resolution. *J Biol Chem* 266:23893-23899.
- Keinänen K, Jouppila A, Kuusinen A (1998) Characterization of the kainate-binding domain of the glutamate receptor GluR-6 subunit. *Biochem J* 330:1461-1467.
- Keinänen K, Arvola M, Kuusinen A, Johnson M (1997) Ligand recognition in glutamate receptors: insights from mutagenesis of the soluble  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) binding domain of glutamate receptor type D (GluR-D). *Biochem Soc Trans* 25:835-838.
- Kimura N, Kurosawa N, Kondo K, Tsukada Y (1993) Molecular cloning of the kainate-binding protein and calmodulin genes which are induced by an imprinting stimulus in ducklings. *Mol Brain Res* 17:351-355.
- Köhler M, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1993) Determinants of Ca<sup>2+</sup> permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* 10:491-500.

- Kuner T, Wollmuth LP, Karlin A, Seeburg PH, Sakmann B (1996) Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17:343-352.
- Kuusinen A, Arvola M, Keinänen K (1995) Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *EMBO J* 14:6327-6332.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: Analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503.
- Liman ER, Tytgat J, Hess P (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9:861-871.
- Lomeli H, Wisden W, Köhler M, Keinänen K, Sommer B, Seeburg PH (1992) High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Lett* 307:139-143.
- Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Köhr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W (1993) The rat d1 and d2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett* 315:318-322.
- Mano I, Lamed Y, Teichberg VI (1996) A venus flytrap mechanism for activation and desensitization of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors. *J Biol Chem* 271:15299-15302.
- Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Huganir RL, Price DL (1993) AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53:327-358.
- Meldrum B, Garthwaite J (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TIPS* 11:379-387.

- Molnar E, McIlhinney RAJ, Baude A, Nusser Z, Somogyi P (1994) Membrane topology of the GluR1 glutamate receptor subunit: Epitope mapping by site-directed antipeptide antibodies. *J Neurochem* 63:683-693.
- Molnar E, Baude A, Richmond SA, Patel PB, Somogyi P, McIlhinney RAJ (1993) Biochemical and immunocytochemical characterization of antipeptide antibodies to a cloned GluR1 glutamate receptor subunit: cellular and subcellular distribution in the rat forebrain. *Neuroscience* 53:307-326.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989) The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365-402.
- Morita T, Sakimura K, Kushiya E, Yamazaki M, Meguro H, Araki K, Abe T, Mori KJ, Mishina M (1992) Cloning and functional expression of a cDNA encoding the mouse  $\beta 2$  subunit of the kainate-selective glutamate receptor channel. *Mol Brain Res* 14:143-146.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.
- Nakanishi N, Shneider NA, Axel R (1990) A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* 5:569-581.
- Nohno T, Saito T, Hong J-S (1986) Cloning and complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* glutamine permease operon (*glnHPQ*). *Mol Gen Genet* 205:260-269.

- Nutt SL, Hoo KH, Rampersad V, Deverill RM, Elliott CE, Fletcher EJ, Adams SL, Korczak B, Foldes RL, Kamboj RK (1994) Molecular characterization of the human EAA5 (GluR7) receptor: a high-affinity kainate receptor with novel potential RNA editing sites. *Recept Chann* 2:315-326.
- O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL, Mulvihill ER (1993) The ligand binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11:41-52.
- Oh B-H, Pandit J, Kang C-H, Nikaido K, Gokcen S, Ames GF-L, Kim S-H (1993) Three-dimensional structures of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein with and without a ligand. *J Biol Chem* 268:11348-11355.
- Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML, Buonanno A (1993) Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* 11:1069-1082.
- Petralia RS, Wenthold RJ (1992) Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol* 318:329-354.
- Roche KW, Raymond LA, Blackstone C, Huganir RL (1994) Transmembrane topology of the glutamate receptor subunit GluR6. *J Biol Chem* 269:11679-11682.
- Sakimura K, Morita T, Kushiya E, Mishina M (1992) Primary structure and expression of the  $\gamma 2$  subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate. *Neuron* 8:267-274.
- Schiffer HH, Swanson GT, Heinemann SF (1997) Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron* 19:1141-1146.



- Soloviev MM, Abutidze K, Mellor I, Streit P, Grishin EV, Usherwood PN, Barnard EA (1998) Plasticity of agonist binding sites in heterooligomers of the unitary glutamate receptor subunit XenU1. *J Neurochem* 71:991-1001.
- Soloviev MM, Brierley MJ, Shao ZY, Mellor IR, Volkova TM, Kamboj R, Ishimaru H, Sudan H, Harris J, Foldes RL, Grishin EV, Usherwood PNR, Barnard EA (1996) Functional expression of a recombinant unitary glutamate receptor from *Xenopus*, which contains N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor subunits. *J Biol Chem* 271:32572-32579.
- Sommer B, Seeburg PH (1992) Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *TIPS* 13:291-296.
- Sommer B, Köhler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11-19.
- Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinänen K, Sakmann B, Seeburg PH (1992) A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J* 11:1651-1656.
- Stern P, Cik M, Colquhoun D, Stephenson FA (1994) Single channel properties of cloned NMDA receptors in a human cell line: comparison with results from *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* 476:391-397.
- Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard PO, O'Hara PJ, Heinemann SF (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 13:1345-1357.

- Storey E, Kowall NW, Finn SF, Mazurek MF, Beal MF (1992) The cortical lesion of huntingtons disease: further neurochemical characterization, and reproduction of some of the histological and neurochemical features by N-methyl-D-aspartate lesions of rat cortex. *Ann Neurol* 32:526-534.
- Taverna FA, Wang LY, Macdonald JF, Hampson DR (1994) A transmembrane model for an ionotropic glutamate receptor predicted on the basis of the location of asparagine-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 269:14159-14164.
- Towbin H, Stähelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 76:4350-4354.
- Villmann C (1998) Thesis, University of Hannover: Untersuchungen zu Struktur-Funktionsbeziehungen an Porendomänen ionotroper Glutamatrezeptoren. Göttingen: Cuvillier Verlag.
- Villmann C, Bull L, Hollmann M (1997) Kainate binding proteins possess functional ion channel domains. *J Neurosci* 17:7634-7643.
- Villmann C, Strutz N, Morth T, Hollmann M (1999) Investigation by ion channel domain transplantation of rat glutamate receptor subunits, orphan receptors and a putative NMDA receptor subunit. *Eur J Neurosci* 11:1765-1778.
- Wada K, Dechesne CJ, Shimasaki S, King RG, Kusano K, Buonanno A, Hampson DR, Banner C, Wenthold RJ, Nakatani Y (1989) Sequence and expression of a frog brain complementary DNA encoding a kainate-binding protein. *Nature* 342:684-689.
- Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honore T (1990) Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *TIPS* 11:25-33.

- Wenthold RJ, Hampson DR, Wada K, Hunter C, Oberdorfer MD, Dechesne CJ (1990) Isolation, localization, and cloning of a kainic acid binding protein from frog brain. *J Histochem Cytochem* 38:1717-1723.
- Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH (1991) Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351:742-744.
- Wo ZG, Oswald RE (1994) Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by N-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 91:7154-7158.
- Wo ZG, Oswald RE (1995) Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *TINS* 18:161-168.
- Wo ZG, Oswald RE (1996) Ligand-binding characteristics and related structural features of the expressed goldfish kainate receptors: identification of a conserved disulfide bond and 3 residues important for ligand binding. *Mol Pharmacol* 50:770-780.
- Wood MW, VanDongen HMA, VanDongen AMJ (1995) Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 92:4882-4886.
- Yamazaki M, Araki K, Shibata A, Mishina M (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. *Biochem Biophys Res Commun* 183:886-892.

### **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Hollmann für die Bereitstellung des interessanten Themas, für das entgegengebrachte Vertrauen und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten bedanken. Er stand mir stets bei allen Fragen zur Seite, hatte immer ein offenes Ohr für mich und lehrte mich, kritisch mit Daten umzugehen. Das Arbeiten in seiner Gruppe hat mir viel Freude bereitet, und ich möchte diese schöne Zeit nicht missen.

Herrn PD. Dr. W. H. Müller möchte ich für das freundlicherweise übernommene Referat der Dissertation danken.

Meinen Arbeitskollegen Oliver Kohle, Ingo Paarmann, Björn Peters, Agnes Thalhammer, Stefanie Thiel und Markus Werner möchte ich für die gute Zusammenarbeit und anregenden Diskussionen danken. Insbesondere gilt mein Dank Tanja Morth, mit der Hand in Hand-Arbeit besonders gut geklappt und Spaß gemacht hat, und die mir oft durch ihren großen Methoden-Erfahrungsschatz mit vielen technischen Tricks bei schwierigen Konstrukten geholfen hat. Carmen Villmann möchte ich für die gute, nunmehr 3 Jahre währende Zusammenarbeit danken und ihrem Kollegen Hans-Georg Breitinger für sein Engagement.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung "Molekulare Biologie neuronaler Signale" des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. W. Stühmer und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Genregulation" der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von Prof. Dr. Benecke für das angenehme Arbeitsklima. Mein Dank gilt besonders Prof. Dr. W. Stühmer, von dem ich freundlicherweise in für mich wichtigen Situationen Unterstützung erhalten habe.

Mein Dank gilt des weiteren Prof. Dr. V. I. Teichberg, Pablo Kizelsztejn und Miri Eisenstein vom Weizmann Institut, Israel für die erfolgreiche Zusammenarbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch der German Israel Foundation (GIF) danken, die die vorliegende Arbeit durch ein Stipendium finanziert hat.

## Danksagung

---

Besonders danke ich meinen Eltern, die mir während dieser Arbeit eine große Stütze waren.

Meinem lieben Lebensgefährten Gisi gilt ein großes Dankeschön für sein Verständnis, für die vielen Anregungen, die mir bei dieser Arbeit sehr geholfen haben und für seine Geduld und Liebe, die er mir stets gab.

## Lebenslauf

<b>Name</b>	Strutz
<b>Vorname</b>	Nathalie
<b>Adresse</b>	Galenstr. 51, 58452 Witten
<b>Geburtsort</b>	Göttingen
<b>Geburtstag</b>	30.01.1971
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Beruf</b>	Dipl. Biologin
<b>Bildungsweg</b>	
<b>1977-1981</b>	Grundschule Steinhude
<b>1981-1990</b>	Hölty-Gymnasium Wunstorf
<b>Sept. 1990-Okt. 1990</b>	Praktikum am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtung
<b>1990-1991</b>	Au-pair in San Luis Obispo, Kalifornien
<b>1991-1993</b>	Biologie-Studium an der Georg-August Universität zu Göttingen
<b>1993-1994</b>	Biologie-Studium an der 'University of California' in San Diego (UCSD), Kalifornien
<b>Okt. 1993-Jan. 1994</b>	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Biochemie, UCSD (Prof. Dr. Saltman)
<b>Febr. 1994-April 1994</b>	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Immunologie, UCSD (Prof. Dr. Dutton)
<b>Okt. 1993-Aug. 1994</b>	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Meeresbiologie, SCRIPPS Institute of Oceanography (Prof. Dr. Kooyman)
<b>1994-1996</b>	Biologie-Studium an der Georg-August Universität zu Göttingen
<b>März 1995-Juni 1995</b>	Assistentin im Biochemie-Praktikum an der Georg-August Universität zu Göttingen
<b>Nov. 1996</b>	Diplomprüfungen in den Fächern: Mikrobiologie, Immunologie, Physikalische Chemie

**Jan. 1997-Febr. 1998**

Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Immunchemie, (Prof. Dr. N. Hilschmann) Göttingen

Thema: Studien zur Primärstruktur des Vogelporins und zu seiner Reaktivität gegenüber Cibacron Blau

**März 1998-April 2000**

Dissertation am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Arbeitsgruppe Molekularbiologie der Glutamatrezeptoren, (Priv. Doz. Dr. Hollmann), Göttingen  
Thema: Untersuchungen zur Struktur und Interaktion funktioneller Domänen ionotroper Glutamatrezeptoren  
*Umzug des Labors an die Ruhr-Universität Bochum*

**Seit April 2000**

Fortsetzung der Dissertation an der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Biochemie I-Rezeptor Biochemie, (Prof. Dr. Hollmann), Bochum



Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit  
selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel  
vollständig angegeben habe.

Nathalie Strutz  
Hannover, den 28.09.2000

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß die vorliegende Arbeit nicht schon  
als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit  
verwendet worden ist.

Nathalie Strutz  
Hannover, den 28.09.2000