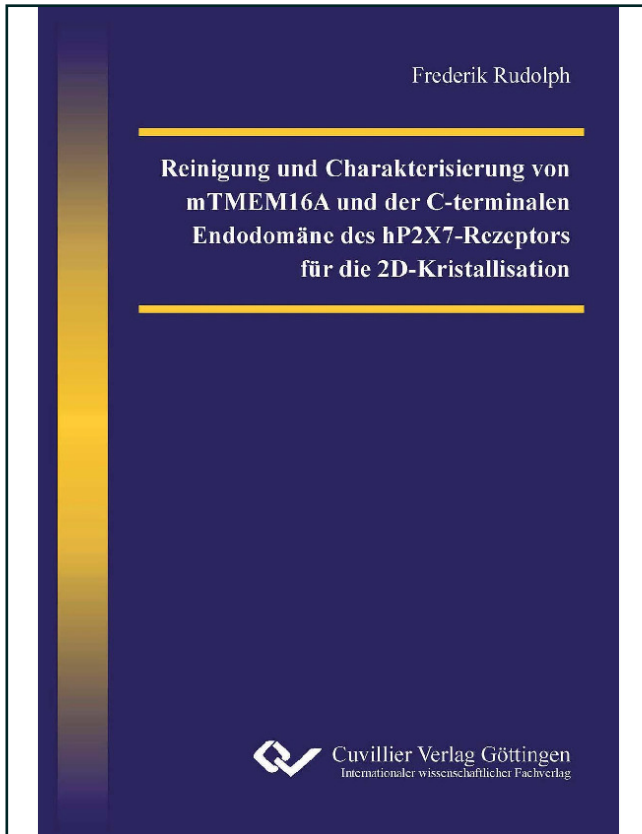




Frederik Rudolph (Autor)

**Reinigung und Charakterisierung von mTMEM16A  
und der C-terminalen Endodomäne des hP2X7-  
Rezeptors für die 2D-Kristallisation**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/182>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Membranproteine.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Solubilisierung von Membranproteinen .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Heterologe Expressionssysteme für Membranproteine.....</b>	<b>3</b>
1.3.1. <i>Pichia pastoris</i> als heterologes Expressionssystem .....	4
1.3.2. Insektenzellen als Expressionssystem .....	5
1.3.3. HEK293-Zellen als Expressionssystem .....	6
<b>1.4. Ligandengesteuerte Ionenkanäle .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5. Purinerge Rezeptoren .....</b>	<b>9</b>
1.5.1. Topologie und Struktur von P2X-Rezeptoren.....	9
1.5.2. Sonderstellung der P2X7-Rezeptoren in der P2X-Familie .....	13
1.5.3. Topologie und Struktur des P2X7-Rezeptors.....	14
1.5.4. Die C-terminale Domäne des P2X7-Rezeptors als Gating-Modul .....	15
<b>1.6. Relevanz von Anionenkanälen .....</b>	<b>18</b>
1.6.1. Struktur von Anionenkanälen.....	20
1.6.2. Die TMEM16/Anoctamin-Familie.....	22
<b>2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Strukturelle Charakterisierung der C-terminalen Endodomäne des hP2X7- Rezeptors .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Expression und Reinigung von TMEM16A für 2D-Kristallisationsexperimente</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Material.....</b>	<b>26</b>
3.1.1. Wasser .....	26
3.1.2. Chemikalien .....	26
3.1.3. Detergenzien.....	26
3.1.4. Oligonukleotide .....	26
3.1.5. Enzyme.....	26
<b>3.2. Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>27</b>
3.2.1. Verwendete Plasmide und Vektoren .....	27
3.2.2. Transformation und Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> .....	27
3.2.3. Phenol/Chloroform-Reinigung der DNA .....	28
3.2.4. Ethanol-Natriumacetat-Präzipitation von Plasmid-DNA.....	28
3.2.5. Zielgerichtete Mutagenese zur Modifikation von Plasmid-cDNA .....	28
3.2.6. PCR-Amplifikation und Ligation zur Subklonierung von cDNA.....	29
3.2.7. Gateway®-Klonierung .....	30
3.2.8. DNA-Sequenzierung .....	30
3.2.9. Übersicht der hergestellten cDNA-Konstrukte .....	31

<b>3.3.</b>	<b>Expression rekombinanter Proteine in <i>P. pastoris</i> .....</b>	<b>31</b>
3.3.1.	Transformation von <i>P. pastoris</i> durch Elektroporation .....	31
3.3.2.	Selektion von <i>P. pastoris</i> -Klonen mit mehrfach Vektorinsertionen .....	31
3.3.3.	Heterologe Expression in <i>P. pastoris</i> .....	32
3.3.4.	Mechanischer Zellaufschluss von <i>P. pastoris</i> -Zellen .....	32
<b>3.4.</b>	<b>Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen .....</b>	<b>32</b>
3.4.1.	Das Bac-to-Bac®-System .....	32
3.4.2.	Klonierungsstrategie für das mTMEM16A(ac)-Protein .....	33
3.4.3.	Rekultivierung eingefrorener Zellen .....	34
3.4.4.	Kultivierung einer Adhäsionskultur .....	34
3.4.5.	Kultivierung einer Suspensionskultur .....	34
3.4.6.	Transfektion von Insektenzellen .....	34
3.4.7.	Infektion einer Adhäsionskultur .....	35
3.4.8.	Infektion einer Suspensionskultur .....	35
3.4.9.	Ernten einer infizierten Kultur .....	35
<b>3.5.</b>	<b>Expression rekombinanter Proteine in HEK293-Zellen.....</b>	<b>35</b>
3.5.1.	Kultivierung als Monolayerkultur .....	35
3.5.2.	Rekultivierung eingefrorener Zellen .....	36
3.5.3.	Kultivierung als Suspensionskultur.....	36
3.5.4.	Induktion der Proteinexpression der HEK293-Zellen.....	36
<b>3.6.</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>37</b>
3.6.1.	Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie.....	37
3.6.2.	Strep-Tactin®-Affinitätschromatographie .....	38
3.6.3.	Verwendung des ÄktaPrimes mit einer Ni-NTA-Superflow Säule .....	38
3.6.4.	Chromatographische Aufreinigung unter Benutzung einer Gravity-Flow-Säule	39
3.6.5.	Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenproteinen mittels Cy5-Mono-NHS-Ester .....	39
3.6.6.	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mittels Alexa488-NHS-Ester .....	40
3.6.7.	Enzymatische Deglykosylierung.....	40
3.6.8.	Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels der BCA-Methode .....	40
3.6.9.	Erzeugung eines oxidativen zytosolischen Milieus durch Diamid zur artifiziellen Quervernetzung von Proteinen über Disulfidbrücken.....	41
<b>3.7.</b>	<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....</b>	<b>41</b>
3.7.1.	Reduzierende und nicht-reduzierende denaturierende SDS-PAGE .....	41
3.7.2.	Blaue-Native-PAGE.....	43
<b>3.8.</b>	<b>FACE®-Technologie .....</b>	<b>44</b>
3.8.1.	Enzymatische Abspaltung von N-Oligosacchariden von Glykoproteinen für die FACE-Analyse .....	45
3.8.2.	ANTS-Markierung der isolierten Oligosaccharide .....	45
3.8.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese ANTS-markierter Glykanstrukturen .....	45
3.8.4.	Identifizierung der isolierten Glykanstrukturen anhand des DP-Wertes .....	46
<b>3.9.</b>	<b>Detektion der Proteine .....</b>	<b>47</b>
3.9.1.	Typhoon-FluoreszenzImaging .....	47
3.9.2.	Entfärbung von BN-PAGE-Gelen zur Fluoreszenz-Detektion .....	48
3.9.3.	Immunodetektion durch Western-Blot-Analyse .....	48
3.9.4.	Coomassie-Brillant-Blue-Färbungen .....	49

<b>3.10.</b>	<b>Rekonstitution und 2D-Kristallisation von Membranproteinen .....</b>	<b>50</b>
3.10.1.	Rekonstitution und 2D-Kristallisation .....	50
3.10.2.	Präparation von Kupfer-Drahtnetzen .....	50
3.10.3.	Negativkontrastierung .....	50
3.10.4.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	51
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.</b>	<b>2D-Kristallisation der C-terminalen Endodomäne des hP2X7-Rezeptors .....</b>	<b>52</b>
4.1.1.	Solubilisation der C-terminalen Endodomäne des hP2X7-Rezeptors.....	52
4.1.2.	Einfluss N-terminaler Trunkierungen auf den Quartärzustand des hP2X <sub>7</sub> <sup>355-595</sup> -Proteins .....	53
4.1.3.	Aufreinigung des hP2X <sub>7</sub> <sup>355-595</sup> -Proteins im Großansatz.....	59
4.1.4.	Rekonstitution des hP2X <sub>7</sub> <sup>355-595</sup> -Proteins in eine DMPC-Lipiddoppelschicht.....	63
<b>4.2.</b>	<b>Expression und Reinigung von TMEM16A(ac) für die 2D-Kristallisation .....</b>	<b>73</b>
4.2.1.	Solubilisierung von mTMEM16A(ac)-Protein aus HEK293-Zellen .....	73
4.2.2.	Analyse des Quartärzustandes des mTMEM16A(ac)-Proteins.....	78
4.2.3.	Auswirkungen der Lipide DMPC und DMPG auf den Quartärzustand des mTMEM16A(ac)-Proteins .....	85
4.2.4.	Optimierung der Aufreinigung von mTMEM16A(ac)-Protein aus HEK293- Zellen.....	88
4.2.5.	Aufreinigung des mTMEM16A(ac)-Proteins aus HEK293-Zellen im Großansatz. .....	95
4.2.6.	Expression des mTMEM16A(ac)-Proteins in Insektenzellen.....	98
4.2.7.	Untersuchung der N-Glykosylierung des mTMEM16A(ac)-Proteins aus <i>S. frugiperda</i> .....	102
4.2.8.	Analyse des N-Glykosylierungszustandes des mTMEM16A(ac)-Proteins aus HEK293-Zellen mittels der FACE-Technologie.....	105
<b>4.3.</b>	<b>Expression der rP2X1-Untereinheit in <i>Pichia pastoris</i> .....</b>	<b>107</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>114</b>
<b>5.1.</b>	<b>Expression und Reinigung von TMEM16A für die 2D-Kristallisation.....</b>	<b>114</b>
5.1.1.	Effizienz der Extraktion des mTMEM16A(ac)-Proteins aus HEK293-Zellen und <i>X. laevis</i> -Oozyten ist detergenzabhängig .....	114
5.1.2.	In den meisten Detergenzien liegt mTMEM16A(ac) als Dimer und Monomer vor .....	117
5.1.3.	In DMPG/DMPC-Bizellen liegt mTMEM16A(ac) fast ausschließlich als Monomer vor.....	120
5.1.4.	Effiziente Elution von Strep-getaggten mTMEM16A(ac)-Proteinen bedarf die Erhöhung der Desthiobiotin-Konzentration oder die Verwendung von Biotin .	121
5.1.5.	In Insektenzellen liegt mTMEM16A(ac) als N-glykosyliertes Dimer vor .....	122
5.1.6.	Überlegungen zu der strukturellen Charakterisierung des mTMEM16A(ac)- Protein mit Hilfe der 2D-Kristallisation.....	123

---

<b>5.2. Strukturelle Analyse der C-terminalen Domäne des hP2X<sub>7</sub>-Rezeptors</b> .....	<b>125</b>
5.2.1. Quervernetzung von N-terminal trunkierten hP2X <sub>7</sub> <sup>355-595</sup> -Varianten über Disulfidbrücken .....	125
5.2.2. Ni <sup>2+</sup> -NTA-Chromatographische Aufreinigung von hP2X <sub>7</sub> <sup>355-595</sup> aus <i>P. pastoris</i> in Milligramm-Mengen .....	126
5.2.3. Optimierung von 2D-Kristallisationsparameter zur Rekonstitution von hP2X <sub>7</sub> <sup>355-595</sup> .....	129
<b>5.3. Expression der rP2X<sub>1</sub>-Untereinheit in <i>Pichia pastoris</i></b> .....	<b>134</b>
5.3.1. Variation der Kulturbedingungen verbessert rP2X <sub>1</sub> -Assemblierung in <i>P. pastoris</i> nicht .....	134
5.3.2. Weitere Überlegungen zur Missassemblierung der rP2X <sub>1</sub> -Untereinheit in <i>P. pastoris</i> .....	136
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>139</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>141</b>
<b>8. ANHANG</b> .....	<b>155</b>
8.1. cDNA-Konstrukte .....	155
8.2. Abkürzungsverzeichnis .....	158
<b>9. PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>161</b>
<b>10. LEBENS LAUF</b> .....	<b>162</b>