Affinitätsaufreinigung von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren aus nativen mikrosomalen Zellmembranfragmenten von *Tetronarce californica* mittels immobilisiertem α-Bungarotoxin

Affinity Purification of Nicotinic Acetylcholine Receptors from native microsomal cell membrane Fragments of *Tetronarce californica* Using immobilized α-bungarotoxin

Fabian Springer^{a,b}, Antonia Brüser^a, Thomas Seeger^a, Franz Worek^a, Lorenz Meinel^b, Karin Veronika Niessen^a

Zusammenfassung

Trotz ihrer weltweiten Ächtung sind chemische Waffen auch heute noch eine aktuelle Bedrohung. Die direkte Folge einer Nervenkampfstoffintoxikation ist eine cholinerge Krise, die unbehandelt zum Tod führt. Bei der Anwendung der Standardtherapeutika (Obidoxim, Atropin) gibt es immer noch therapeutische Lücken. Eine neue mögliche Therapieoption sind Wirkstoffe, welche direkt am nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) interagieren. Hierdurch kann dessen Dysfunktion beseitigt und die Funktion der Atemmuskulatur wiederhergestellt werden.

Für ein effektives Screening von Wirkstoffkandidaten werden *in vitro*-Experimente, wie beispielsweise Bilayer-basierte Elektrophysiologie mit hochreinen nAChR in biomimetischen Membranen, benötigt. In diesem Projekt wurde eine Methode entwickelt, hochreine nAChR mittels Affinitätsaufreinigung aus nativen Membranfragmenten zu gewinnen.

Nach einer vorangeschalteten Aufarbeitung des nativen Gewebes wurde für die weitere Anreicherung nAChRhaltiger Membranfragmente eine Affinitätschromatographie entwickelt. Als stationäre Phase diente der nAChR-Antagonist α -Bungarotoxin (α -Bgtx), der auf SilicaBond[®] Carboxylic Acid-Beads immobilisiert wurde. Die Charakterisierung der aufgereinigten, nAChRhaltigen Membranfragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese (SDS-Page).

Es konnte gezeigt werden, dass die Solubilisierung der Membranproteine der entscheidende Schritt zur Aufreinigung des Rezeptors ist. Die Methodik ermöglicht die Gewinnung von nAChR für Einzelkanalmessungen, die besonders reines Material erfordern. Diese können parallel zu den bisher etablierten Affinitäts- und Funktionalitätsassays eingesetzt werden. Somit kann das Screening hinsichtlich der nAChR-Aktivität weiter ausgebaut werden und entscheidend zur Suche neuartiger Wirkstoffe für die Behandlung von Nervenkampfstoffen beitragen.

Schlüsselwörter: Rezeptor, Affinitätschromatografie, Solubilisierung, Detergenz, in vitro

Summary

Despite their worldwide ban, chemical warfare agents still pose a threat today. The direct consequence of nerve agent intoxication is a cholinergic crisis, leading to death if left untreated. There are still therapeutic gaps with the standard therapeutic regime (obidoxime, atropine). A possible therapeutic option are agents which directly interact with the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). This could eliminate its dysfunction and restore the activity of the respiratory muscles. Effective screening of drug candidates requires in vitro experiments, such as bilayer-based electrophysiology with highly purified nAChR in biomimetic membranes. In this project, a method was developed to obtain high purity nAChR from native membrane fragments by affinity purification.

After upstream processing of the native tissue, affinity chromatography was developed to enrich nAChR-containing membrane fragments further. The nAChR antagonist α -bungarotoxin (α -Bgtx) immobilized on Silica-Bond[®] Carboxylic Acid beads served as the stationary phase. Characterization of purified nAChR-containing membrane fragments was performed by gel electrophoresis (SDS-Page).

Solubilization of the membrane proteins is the crucial step for purifying the receptor. The methodology allows the recovery of nAChR for previously inaccessible single-channel measurements. These can be used in parallel with various affinity and functionality assays. Thus, screening for nAChR activity can be further extended and contribute crucially to the search for drugs to treat nerve agent poisoning.

Keywords: receptor; affinity chromatography; solubilization; detergent; in vitro

Einleitung

Am 29. April 1997 trat das "Übereinkommen über das Verbot der Entwicklung, Herstellung, Lagerung und des Einsatzes chemischer Waffen und über die Vernichtung solcher Waffen (CWÜ)" in Kraft [2]. In der Folge wurden ca. 99% der globalen Bestände an chemischen Waffen vernichtet [3]. Dennoch konnte deren Einsatz im Rahmen von Anschlägen, beispielsweise bei Sergei W. und Julia

^a Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, München

^b Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg



Abb. 1: Konformation des nAChR in Abhängigkeit von Acetylcholin: Die Bindung von zwei Einheiten Acetylcholin an den orthosterischen Bindungsstellen katalysiert die Öffnung des nAChR. Die Desensitisierung kann nach einem Übergangszustand (schnell reaktivierbar) in einen nicht reaktivierbaren Zustand überführt werden. (Eigene Darstellung, abgeleitet aus [1])

Skripal im März 2018 oder Aleksej Nawalny im August 2020, nachgewiesen werden [12, 13]. Zahlreiche phosphororganische Verbindungen, wie etwa die hierbei eingesetzten Nervenkampfstoffe aus der Novichok-Gruppe, werden den chemischen Waffen zugeordnet. Nervenkampfstoffe hemmen die Acetylcholinesterase (AChE) im synaptischen Spalt [20]. Die Akkumulation des endogenen Agonisten Acetylcholin im synaptischen Spalt führt zur Desensitisierung und damit zur Dysfunktion von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Die durch Nervenkampfstoffe vermittelte cholinerge Krise kann unbehandelt zum Tod durch Atemversagen führen (Abbildung 1) [9, 20].

Die etablierte Antidottherapie (z. B. Obidoxim, Pralidoxim) soll die Reaktivierung der AChE bewirken. Limitierend sind jedoch postinhibitorische Veränderungen am AChE-Nervenkampfstoff-Komplex, sodass die Wirkung der Oxime beeinträchtigt wird. Zudem sind einige Enzym-Kampfstoff-Komplexe einer Reaktivierung durch Oxime aufgrund chemischer Gegebenheiten nicht zugänglich [19]. Aufgrund dieser Limitierung der etablierten Therapeutika, insbesondere bei Vergiftungen mit Soman, Tabun oder auch Novichok-Derivaten, bedarf es neuer Ansatzpunkte [10, 20]. Eine hochinteressante Therapieoption sind pharmakologisch aktive Substanzen, die direkt am nAChR interagieren und dessen Dysfunktion beseitigen [10]. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind ligandengesteuerte, hochkomplexe Ionenkanäle aus fünf Untereinheiten (UE). Die UE werden mit den griechischen Buchstaben α , β , γ , δ und ϵ benannt (Abbildung 2) [10]. Beruhend auf dem Expressionsort erfolgt die Einteilung in den Muskel- bzw. den Neuronalen-Subtyp [5]. Mangels Verfügbarkeit des humanen nAChR-Subtyps (2α1β1δε) wurde für die vorliegende Arbeit der nAChR-Muskelsubtyp 2αβδγ aus dem elektrischen Organ (Elektroplax) des kalifornischen Zitterrochens (Tetronarce californica) gewonnen. Dieser ist aufgrund genetisch hochkonservierter Areale dem humanen Rezeptor sehr ähnlich.

Neben der Affinität potenziell pharmakologisch aktiver Substanzen ist auch deren Funktion an der Zielstruktur



Abb. 2: Struktur des MuskeltypnAChR in Tetronarce californica, Seitansicht und Draufsicht auf die 3D-Struktur des pentameren nAChR (Auflösung 2,7 Å): Die extrazellulare (ED) und die intrazellulare Domäne (ID) wurden in der Seitansicht hervorgehoben. Die Transmembrandomäne (TD) vermittelt über hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung in der Zellmembran. (Eigene Darstellung, abgeleitet aus RCSB PDB ID: 7SMR, 102210/pdb7smr/pdb [14]). von entscheidender Bedeutung. Zum Screening dieser potenziellen Wirkstoffkandidaten werden elektrophysiologische Versuche mit hochreinen nAChR in künstlich erzeugten Lipidmembranen dringend benötigt. Vorversuche haben gezeigt, dass sich zu wenig aufgereinigte Membranpräparationen nur unzureichend in biomimetischen Membranen stabilisieren lassen. Hieraus leitet sich die Notwendigkeit der Gewinnung von hochreinen nAChR ab. In dem vorliegenden Projekt wurde eine Methode zur Aufreinigung von nAChR aus mikrosomalen Membranfragmenten mittels Affinitätsaufreinigung an immobilisiertem α -Bungarotoxin erarbeitet. Als Grundlage wurde hierbei die Methode von Gotti et al. verwendet [4].

Methode

Gewinnung und Anreicherung von Zellmembranfragmenten

Mikrosomale Zellmembranfragmente, welche reich an nativem nAChR-Muskelsubtyp 2a1β1δy sind, werden gemäß Springer et al. hergestellt [18]. Der Proteingehalt der Suspension wird mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Assay bestimmt [17]. Zunächst werden die Zellmembranfragmente mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation weiter angereichert. Hierzu werden 2 ml homogenisierte Plasmamembransuspension zu einer 70%-igen (w/w) Saccharoselösung (70% Saccharose in 10mM Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS = 10mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7,4)) hinzugefügt. Die endgültige Saccharosekonzentration beträgt 51% (w/w). Diese 51%-ige Phase wird unter einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (7,0 ml 45% (w/w), 7,0ml 9% (w/w)) in einem 39,4ml-Polycarbonatröhrchen geschichtet. Die Zentrifugation erfolgt mit einem Beckman SE 41 Ti-Ausschwingrotor (3h, 100 000 g, 4 °C). Vorversuche hatten gezeigt, dass eine optimale Belegung des Dichtegradienten mit 2 ml der Proteinsuspension erreicht wird. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt, resuspendiert und zentrifugiert (30 min, 100 000 g, 4 °C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in einem Verhältnis von 1:2 Volumenteilen in 10 mM PBS resuspendiert. Mittels BCA-Assay wird der Proteingehalt der angereicherten Suspension erneut bestimmt.

Solubilisierung

Unter Solubilisierung wird die Erhöhung der Löslichkeit eines Stoffes in der umgebenden Phase durch einen Lösungsvermittler beschrieben. In diesem Fall wird Natriumcholat, ein anionisches Detergenz, zum Herauslösen der in der Biomembran verankerten Transmembranproteine, z. B. nAChR, genutzt. Hierzu werden 1,5ml resuspendiertes Membranpellet in 18,5ml Solubilisierungspuffer (2 % Natriumcholat, 5mg/ml L- α -Phosphatidylcholin (L- α -PC), 10mM PBS, pH 7,4) aufgenommen. Das Röhrchen wird zum Schutz vor Oxidation des nativen Lipidgemisches mit Stickstoff begast und am Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) inkubiert (30 min, 300 U/min, 4 °C). Das solubilisierte Material wird zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen erneut zentrifugiert (30 min, 100 000 g, 4 °C). Der Überstand wird abgenommen und bis zur Auftragung auf die Affinitätschromatografiesäule bei 4 °C gelagert.

Affinitätsaufreinigung

Als stationäre Phase werden 2 mg des nAChR-Antagonisten α -Bungarotoxin (α -Bgtx, $K_D \sim 10^{-9} - 10^{-11}$ M [11]) mittels N-Hydroxysuccinimid-Esterkopplung auf 4,00g SilicaBond® Carboxylic Acid-Beads immobilisiert. Nach der Kopplung werden die Beads mit dem Überstand aus der Solubilisierung inkubiert (1 h, 300 U/min, 20 °C). Die vorinkubierte stationäre Phase wird mit 10 mM PBS in die Säule (HiScale[™] 16/20, Cytiva, Freiburg) eingeschlämmt. Zelluläre Verunreinigungen und weitere solubilisierte Transmembranproteine werden mittels Solubilisierungspuffer über 260 min unter sukzessiver Steigerung der Flussrate (0,1-2,5 ml/min) von der Säule gespült. Zur Detektion proteinhaltiger Banden wird die Absorption kontinuierlich bei 280 nm gemessen. Nach Absenkung des Hintergrundrauschens auf Ausgangsniveau erfolgt die Eluation. Diese erfolgt mittels Eluationspuffer (100 mM Carbamoylcholinchlorid, 10 mM PBS, pH 7,4) und Inkubation auf der Säule (30 min). Der Agonist Carbamoylcholinchlorid wird aufgrund der vergleichsweisen niedrigeren Affinität in hoher Konzentration zugesetzt, um eine ausreichende Dissoziation des nAChR vom α-Bgtx zu ermöglichen. Das Eluat wird in einen Spectra-Por® Float-A-Lyzer® G2 MWCO 20 kDa (Merck, Darmstadt) weiter verarbeitet. Das Carbamoylcholinchlorid wird durch anschließende Übernacht-Dialyse bei 4 °C gegen 10 mM PBS entfernt.

Charakterisierung

Die Charakterisierung der gewonnenen Proteinsuspension erfolgt mittels Gelelektrophorese (SDS-Page). Die nach der Dialyse gewonnene Suspension wird über eine Säulenzentrifugation angereichert. Hierzu werden sukzessive 2,0 ml in einen mit 10 mM PBS vorgewaschenen Amicon[®] Ultra Zentrifugeneinsatzfilter 0,5 ml/MWCO 10 kDa (Merck, Darmstadt) überführt und zentrifugiert (5 min, 10 000 g, 20 °C). Der Überstand wird abgenommen und nach Inkubation (5 min, 95 °C) mit 1 M Dithiothreitol zur Trennung der Disulfidbrücken auf ein Bis-Tris 4-12% Gel aufgetragen (50 min, 200 V). Dieses wird mit Coomassie-Farbstoff (0,1%) gefärbt. Ein weiteres Gel mit Eluat wird auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran geblottet. Die Membran wird anschließend mit einem gegen die δ-UE gerichteten Antikörper (AK) (mMouse ab233758, Abcam, Cambridge, United Kingdom) inkubiert (1 h, 20 °C). Als Sekundär-AK wird ein AntiMouse Goat AK mit rotem Fluorophor über Nacht inkubiert.

43



Abb. 3: Kyte-Doolittle-Hydrophobizitätsplot der α-UE (T. californica):

Die Transmembrandomäne besteht aus 4 Domänen (M1-4) Der Hydrophobizitäts-Plot erlaubt die Vorhersage und grafische Darstellung von lipophilen Wechselwirkungen (z. B. M1 Position 242-264). Diese resultieren aus den hohen Anteilen lipophiler Aminosäurereste, Je größer der Wert auf der y-Achse desto größer die Hydropathie im Bereich um die Aminosäureposition. Die Sekundärstruktur entspricht dabei immer einer α-Helix. Hierzu werden den 20 proteinogenen Aminosäuren anhand von experimentellen Daten Werte zugeordnet [6]. (Eigene Darstellung, UniProt Acession ID P02711, geplottet mit Expasy, ProtScale)

Die Messung erfolgt in beiden Fällen am Auswertesystem Odyssey[®] DLx (Licor, Lincoln, USA) bei 700 und 800 nm.

Ergebnisse und Diskussion

Ausgehend von den in Abbildung 3 ermittelten theoretischen physikochemischen Parametern konnte gezeigt werden, dass nur durch Einsatz entsprechender Detergenzien (hier: Natriumcholat) eine Aufreinigung des Rezeptors möglich war [16]. Die Stärke der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren in den 4 Domänen der Transmembrandomäne muss mittels Detergenz überwunden werden. Zusätzlich wurde mittels L- α -PC in der Solubilisierungslösung eine stabilisierende Lipidumgebung für die extrahierten Proteine geschaffen. Die Solubilisierung und weitgehende Abtrennung der Lipidumgebung, in welcher weitere Transmembranproteine verankert sind, ist ein essenzieller Schritt [7, 16].

Die Eluation folgt der Beschreibung in der Literatur [8, 15]. Zunächst werden proteinogene Verunreinigungen ausgespült. Der erneute Anstieg der UV-Absorption nach etwa 30 min deutet auf das spätere Auftreten einer im Absorptionsbereich von 280 nm detektierbaren Substanz hin, was auf die verwendeten Siliciumoxid-Beads zurückgeführt werden könnte. Diese besitzen im Gegensatz zu den normalerweise verwendeten quervernetzen Agarose- bzw. Sepharose-Beads einen niedrigen Kompressibilitätsfaktor. Durch die hohe Bettdichte könnte es zu einem der Größenausschlusschromatografie vergleichbaren Effekt gekommen sein. Hierdurch könnten kleinere solubilisierte Proteine später als solche mit hohen kDa-Größen eluiert werden, da sich deren Wegstrecke verlängert. Eine alternative Erklärung könnten ionische Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen der verwendeten Lipide und der stationären Phase sein. Vergleichbare Wechselwirkungen können ebenfalls mit den gelösten Proteinbestandteilen auftreten. Es ist zu vermuten, dass beide Effekte additiv sind.

Die Abbildung 4 belegt die Anreicherung der AChR-reichen Membranfragmente durch die Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation (Suc 1). Neben dem Targetprotein nAChR werden allerdings auch weitere Membran- und Transmembranproteine angereichert. Der Versuch einer Affinitätsaufreinigung ohne Solubilisierung (Aff_1) hat keinen Erfolg gezeigt. Dies stimmt mit den zuvor aufgezeigten physikochemischen Parametern überein (Abbildung 3). Ohne Detergenz ist der nAChR fest über die hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäuren der Transmembrandomäne in den kruden Zellmembranfragmenten verankert. Durch die Bindung des nAChR-Antagonisten α -Bgtx an die α -UE wird beim Waschen auch die gesamte Umgebung des Rezeptors auf der Säule zurückgehalten [7, 16]. Es zeigt sich eine Reduzierung der Banden > 100 kDa, allerdings keine Verstärkung der dem Rezeptor zugeordneten Banden. Erst mittels Zugabe von Detergenz kann der nAChR aus der nativen Lipidumgebung herausgelöst werden (Aff 2). Die α-UE (52,7 kDa), β -UE (56,1 kDa), γ -UE (58,1 kDa) und δ -UE (60 kDa) können anhand ihrer Molekularmassen und des externen Referenzmaterials als Positivkontrolle identifiziert werden. Aufgrund des zweifachen Vorkommens der α-UE in einem Rezeptor zeigt die zugehörige Bande ein sehr deutliches Profil [5]. Trotz geringerem Proteineinsatz (1 µg) sind die Banden der PK deutlicher zu erkennen als die des aufgereinigten Materials (Aff 2). Dies deutet auf eine deutlich höhere Verdünnung stärkeren Unreinheiten im eigenen Material hin. Laut Hersteller wurde das Re-



Abb. 4: Verlaufsdiagramm Affinitätsaufreinigung nAChR: Die solubilisierten Membranfragmente wurden nach Inkubation auf der stationären Phase für 260 min mit sukzessiver Steigerung der Flussrate (0.1-2.5 ml/min) gespült. Der Proteinpeak bei 290 min bildet die Eluation des an die stationäre Phase gebundenen nAChR nach 30 min Inkubation mit 100 mM Carbamoylcholin ab. Der kleinere Peak davor wurde als Zeichen der erfolareichen Umpufferung des Säulenvolumens gewertet.

ferenzmaterial über eine Entsalzungssäule dialysiert, wobei es zu einer Anreicherung der Proteinkonzentration kommt.

Als zusätzlicher Nachweis wurde ein immunhistochemischer Nachweis (Western Blot) der δ -UE in den eigenen Membranfraktionen sowie im Referenzmaterial durchgeführt. Vorversuche hatten gezeigt, dass die Affinität des gegen die δ -UE gerichteten Antikörpers die höchste und spezifischste aller zu diesem Zeitpunkt verfügbaren AK ist. Die δ -UE konnte in beiden Materialien bei gleicher Bandenhöhe vergleichend und in Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht des Markers nachgewiesen werden. Der immunhistochemische Nachweis wurde ebenfalls mit dem Ausgangsmaterial, nämlich dem mikrosomalen Zellfragmenten durchgeführt (nicht gezeigt). Auch in diesem Material ist die UE des Rezeptors bereits gut zu identifizieren.

Die affinitätsaufgereinigte Probe wurde gegen eine Positivkontrolle (PK) charakterisiert. Das rote Signal liegt auf der zu erwartenden Höhe der δ -UE. Es wurden 5 µg Protein aus der Affinitätschromatografie bzw. 1 µg Protein Referenzmaterial eingesetzt.

Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass die hier entwickelte, speziell für die Anreicherung nAChR-haltiger Membranfragmente konzipierte Affinitätschromatografie reproduzierbar ist. Fehlerquellen wie etwa abweichende Solubilisierungsbedingungen konnten durch Vorversuche minimiert werden. Weitere Optimierungen könnten darin bestehen, dass quervernetze Agarose als stationäre Phase eingesetzt wird. Zusätzlich kann das Carbamoylcholinchlorid anstatt der Dialyse mittels Entsalzungssäule aus dem Eluat entfernt werden. Dennoch ermöglicht die dargestellte Methodik bereits die Gewinnung von ausreichend reinen nAChR-haltigen Membranen, die für elektrophysiologische Screening-Methoden in biomimetischen



Abb. 5: Gelelektrophorese der nAChR-Fraktionen:

Das aus T. californica gewonnene mikrosomale Ausgangsmaterial (TOR) wurden vor und nach Aufreinigung mit Dichtegradientenzentrifugation (Suc_1) mittels SDS-Page aufgetrennt. Die aus der Affinitätschromatografie gewonnenen Proben (Aff 1 ohne Solubilisierung, Aff_2 mit Solubilisierung) wurden gegen Positivkontrolle (PK) (1 µg, Acetylcholin receptor protein, Artikelnummer: 28601, Cube Biotech GmbH) charakterisiert. Es wurden jeweils 5 µg Protein eingesetzt. Als Proteingrößenmarker wurde Chameleon® Duo Pre-stained 260-268 kDa verwendet.

Membranen oder Vesikeln geeignet sind. Bisher unzugängliche Einzelkanalmessungen wären damit durchführbar, die parallel zu verschiedenen Affinitäts- und Funktionalitätsassays eingesetzt werden können. In der Folge kann das Screening hinsichtlich von nAChR-aktiven Substanzen ausgeweitet werden.

Die hier entwickelte Aufreinigungsmethode ist ein wichtiger Schritt, hochreines Material für sehr empfindliche elektrophysiologische Methoden zu generieren, die entscheidend zur Suche von Wirkstoffen für die Behandlung von Nervenkampfstoffen beitragen können.

Kernaussagen

- nAChR sind ligandengesteuerte, hochkomplexe lonenkanäle aus fünf Untereinheiten.
- Die Akkumulation von Acetylcholin im synaptischen Spalt führt zur Desensitisierung und damit zur Dysfunktion von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR).
- Der Kyte-Doolittle-Hydrophobizitätsplot erlaubt die Bewertung der möglichen Interaktionen von Proteinen mit ihrer Umgebung.
- Der Einsatz geeigneter Detergenzien ist zwingend notwendig f
 ür eine erfolgreiche Affinit
 ätsaufreinigung von Transmembranproteinen.
- Mittels Insertion in biomimetische Membranen und geeigneter Aktivierung kann die Funktionalität von Rezeptoren bewertet werden.

Literatur

- Auerbach A, Akk G: Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism. J Gen Physiol 1998; 112(2): 181–197.
- Ausführungsgesetz zum Chemiewaffenübereinkommen vom 2. August 1994 (BGBI. I S. 1954), das zuletzt durch Artikel 6 Absatz 1 des Gesetzes vom 13. April 2017 (BGBI. I S. 872) geändert worden ist, letzter Aufruf am 29.09.2023.
- Auswärtiges Amt: Übereinkommen über das Verbot chemischer Waffen (CWÜ) 2022; >https://www.auswaertiges-amt.de/de/aussenpolitik/themen/abruestung-ruestungskontrolle/uebersicht-bcwaffennode/-/207106>, letzter Aufruf 29. September 2023.
- Gotti C, Ogando AE, Hanke W et al.: Purification and characterization of an alpha-bungarotoxin receptor that forms a functional nicotinic channel. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88 (8): 3258–3262.
- Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V et al.: Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. FEBS J 2007; 274(15): 3799–3845.
- Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 1982; 157(1): 105–132.
- Le Maire M, Champeil P, Moller JV: Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. Biochim Biophys Acta 2000; 1508(1–2): 86–111.
- Lindstrom J, Anholt R, Einarson B et al.: Purification of acetylcholine receptors, reconstitution into lipid vesicles, and study of agonist-induced cation channel regulation. Journal of Biological Chemistry 1980; 255 (17): 8340–8350.
- 9. Niessen KV, Seeger T, Tattersall JEH et al.: Affinities of bispyridinium non-oxime compounds to (3)Hepibatidine binding sites of Torpedo

californica nicotinic acetylcholine receptors depend on linker length. Chem Biol Interact 2013; 206(3): 545–554.

- Niessen KV, Tattersall JEH, Timperley CM et al.: Interaction of bispyridinium compounds with the orthosteric binding site of human α7 and Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Toxicology Letters 2011; 206(1): 100–104.
- Nirthanan S, Gwee MCE: Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. J Pharmacol Sci 2004; 94 (1): 1–17.
- OPCW: Summary of the report on activities carried out in support of a request for technical assistance by the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland (Technical assistance visit TAV/02/18) 2018; https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/S_series/2018/en/s-1612-2018_e_1_.pdf>, letzter Aufruf 29. September 2023.
- OPCW: Summary of the report on activities carried out in support of a request for technical assistance by Germany (Technical assistance visit – TAV/01/20) 2020; https://www.opcw.org/sites/default/ files/documents/2020/10/s-1906-2020%28e%29.pdf, letzter Aufruf 29. September 2023.
- Rahman MM, Basta T, Teng J et al.: Structural mechanism of muscle nicotinic receptor desensitization and block by curare. Nat Struct Mol Biol 2022; 29(4): 386–394.
- Ringler P, Kessler P, Ménez A, Brisson A: Purification of the nicotinic acetylcholine receptor protein by affinity chromatography using a regioselectively modified and reversibly immobilized alpha-toxin from Naja nigricollis. Biochim Biophys Acta 1997; 1324(1): 37–46.
- Seddon AM, Curnow P, Booth PJ: Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. Biochim Biophys Acta 2004; 1666(1-2): 105–117.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry 1985; 150(1): 76–85.
- Springer F, Freisleben M, Seeger T et al.: Hochdruckpräparation und Charakterisierung von mikrosomalen Zellmembranfragmenten zur Gewinnung von nAChR aus T. californica (Poster-Abstract). WMM 2022; 66(2–3): 82–84.
- Worek F, Thiermann H, Szinicz L, Eyer P: Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochemical Pharmacology 2004; 68(11): 2237–2248.
- 20. Worek F, Thiermann H, Wille T: Organophosphorus compounds and oximes: a critical review. Arch Toxicol 2020; 94(7): 2275–2292.

Manuskriptdaten

Zitierweise

Springer F, Brüser A, Seeger T, Worek F, Meinel L, Niessen KV: Affinitätsaufreinigung von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren aus nativen mikrosomalen Zellmembranfragmenten von Tetronarce californica mittels immobilisiertem α -Bungarotoxin. WMM 2024; 68(1-2): 41-46.

DOI: https://doi.org/10.48701/opus4-238

Für die Verfasser

Leutnant (SanOA) Dipl.-Pharm. Fabian Springer Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr Neuherbergstraße 11, 80937 München E-Mail: fabian1springer@bundeswehr.org

Manuscript Data

Citation

Springer F, Brüser A, Seeger T, Worek F, Meinel L, Niessen KV: [Affinity purification of nicotinic Acetylcholine receptors from native microsomal cell membrane fragments of Tetronarce californica using immobilized α -bungarotoxin]. WMM 2024; 68(1-2): 41-46.

DOI: https://doi.org/10.48701/opus4-238

For the Authors

Lieutenant (MC) Dipl.-Pharm. Fabian Springer Bundeswehr Institute for Pharmacology and Toxicology Neuherbergstraße 11, D-80937 München E-Mail: fabian1springer@bundeswehr.org