
Untersuchung von Sub-Millisekunden Dynamiken und allosterischer Kommunikation in Ligandenbindedomänen ionotroper Glutamatrezeptoren

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN
DOKTORGRADES DER JULIUS-
MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

vorgelegt von

Suhaila Rajab

geboren in Marburg

Würzburg, 2021



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Hannes Neuweiler

Gutachter: Prof. Dr. Georg Nagel

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Proteine sind dynamisch.

Hannes Neuweiler

Zusammenfassung

Ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluRs) sind ligandengesteuerte Ionenkanäle und vermitteln den Großteil der exzitatorischen Signalweiterleitung im gesamten zentralen Nervensystem. Darüber hinaus spielen iGluRs eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Entwicklung und Funktion, einschließlich Lernprozessen und Gedächtnisbildung. Da eine Fehlfunktion dieser Rezeptoren mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen verbunden ist, stellen iGluRs zudem wichtige Zielproteine für die pharmakologische Wirkstoffentwicklung dar. Im Allgemeinen wird zwischen drei Untergruppen ionotroper Glutamatrezeptoren unterschieden, welche aufgrund ihrer Selektivität für einen bestimmten Liganden benannt sind: AMPA-, Kainate-, und NMDA-Rezeptoren. Die iGluRs jeder dieser Untergruppen bestehen in der Regel aus vier Untereinheiten, welche wiederum aus vier semiautonomen Domänen aufgebaut sind: (i) die aminoternale Domäne (ATD), (ii) die Ligandenbindedomäne (LBD), (iii) die Transmembrandomäne (TMD) und (iv) die carboxyterminale Domäne (CTD).

Die Ligandenbindedomäne, welche wiederum aus zwei Lobes (D1 und D2) besteht und in ihrer Struktur einer Muschelschale ähnelt, vollzieht bei Bindung eines Neurotransmitters eine Konformationsänderung, wobei sie sich um den gebundenen Agonisten herumschließt. Diese Konformationsänderung der LBD wird auf die Transmembrandomäne, welche den membranüberspannenden Ionenkanal ausbildet, übertragen, was in einer Umlagerung der Transmembranhelices und infolgedessen der Öffnung des Ionenkanals resultiert. Die Konformationsänderung der LBD ist demnach die treibende Kraft, welche dem Öffnen und Schließen des Ionenkanals zugrunde liegt. Aus diesem Grund stellt die isolierte Ligandenbindedomäne, welche als lösliches Protein hergestellt werden kann, ein etabliertes Modellsystem zur Untersuchung der strukturellen und funktionellen Zusammenhänge innerhalb des Funktionsmechanismus ionotroper Glutamatrezeptoren dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Konformationsdynamiken der in *Escherichia coli*-Bakterien exprimierten isolierten Ligandenbindedomänen der drei homologen Untergruppen – AMPA-, Kainate- und NMDA-Rezeptoren – sowohl als Monomer

als auch als Dimer untersucht. Hierbei wurden im ungebundenen Apo-Zustand der Proteine signifikante Kinetiken im Bereich von Nanosekunden bis Mikrosekunden festgestellt, welche bei Bindung eines Agonisten sowie bei Dimerisierung erheblichen Veränderungen zeigen. Darüber hinaus wurde allosterische Kommunikation zwischen den LBDs der NMDA-Untergruppe untersucht, wobei in der Tat ein deutlicher allosterischer Effekt in Bezug auf die Konformationsdynamiken der Proteine gemessen werden konnte. Weiterhin wurde ein PET-FCS-basiertes Verfahren zur Messung der Dissoziationskonstante der Bindung eines Liganden an die LBD eines AMPA-Rezeptors entwickelt. Zuletzt wurde außerdem ermittelt, ob ein Unterschied zwischen vollen und partiellen Agonisten hinsichtlich ihres Einflusses auf die Konformationsdynamiken einer AMPA-Rezeptor LBD besteht, was nachgewiesenermaßen nicht der Fall ist.

Alle Messungen wurden auf Einzelmolekülebene auf Zeitskalen von Nanosekunden bis Millisekunden basierend auf Fluoreszenzfluktuationen unter Verwendung des photoinduzierten Elektronentransfers (PET) in Kombination mit Korrelationsspektroskopie (PET-FCS) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden PET-basierte Fluoreszenzsonden entwickelt, um Konformationsänderungen auf einer räumlichen Skala von einem Nanometer zu detektieren.

Durch die Experimente innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PET-FCS-Methode eine vielversprechende Ergänzung zu allen bisher bestehenden Methoden zur Untersuchung der Konformationsdynamiken der Ligandenbindedomäne ionotroper Glutamatrezeptoren darstellt und daher eine aussichtsreiche Möglichkeit zur Erweiterung des zukünftigen Verständnisses der Funktionsweise von iGluRs bietet.

Summary

Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) are ligand-gated ion channels that mediate most of the excitatory signal transmission throughout the central nervous system. In addition, iGluRs play a crucial role in neural development and function, including learning and memory. Since receptor malfunction contributes to a variety of neurological diseases, iGluRs are key targets for drug development in pharmacology. Furthermore, ionotropic glutamate receptors are divided into three major subgroups, all of which are named due to their selectivity for a certain ligand: AMPA, Kainate and NMDA. Members of each subgroup usually consist of four subunits, which in turn comprise four semi-autonomous domains: (i) the amino terminal domain (ATD), (ii) the ligand binding domain (LBD), (iii) the transmembrane domain (TMD), and (iv) the carboxy terminal domain (CTD).

Upon binding a neurotransmitter the ligand binding domain, which adopts a clamshell-like structure consisting of two domains (D1 and D2), undergoes a conformational change by closing around the ligand and trapping it within the binding cleft. The conformational change of the LBD is then transferred to the transmembrane domain which forms the membrane-spanning ion channel, which results in rearrangement of the transmembrane helices and consequently in opening of the ion channel. Accordingly, the conformational change of the LBD is the driving force underlying opening and closing of the ion channel. The isolated ligand binding domain can be produced as soluble protein and represents a well-established model system for exploring structural and functional relationships within the functional mechanism of ionotropic glutamate receptors.

As part of this thesis, ligand binding domains of all three homologues – AMPAR, KainateR and NMDAR – have been expressed in *Escherichia coli* bacterial cells and conformational dynamics of the proteins both as monomer and as dimer have been investigated. In the unbound apo state of the proteins, significant kinetics have been observed in the nanosecond to microsecond time range which undergo considerable changes upon agonist binding or dimerization. In addition, allosteric communication between LBDs of the NMDA subgroup has been investigated, whereby a distinct allosteric effect regarding the conformational dynamics of the

protein could actually be measured. Furthermore, a PET-FCS-based tool for measuring the dissociation constant of a ligand for an AMPA receptor LBD has been developed. Finally, it has been investigated whether full and partial agonists have different effects on the conformational dynamics of an AMPA receptor LBD, which has been found clearly not to be the case.

All measurements have been performed at the single-molecule level on time scales from nanoseconds to milliseconds based on fluorescence fluctuations using photoinduced electron transfer (PET) fluorescence quenching in combination with correlation spectroscopy (PET-FCS). To this end, PET-based fluorescence probes have been engineered to monitor conformational changes on the one-nanometer scale.

The experiments that have been carried out within this thesis introduce PET-FCS as a promising tool to complement all previously existing methods for studying conformational dynamics of ionotropic glutamate receptor ligand binding domains and hence offer a promising opportunity to expand future understanding of how iGluRs work.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren	1
1.2 Aufbau, Struktur und Funktion.....	3
1.3 Die Ligandenbindedomäne	6
1.4 Mechanismus zum Öffnen und Schließen des Ionenkanals.....	12
1.5 AMPA-Rezeptoren	16
1.6 Kainate-Rezeptoren	17
1.7 NMDA-Rezeptoren.....	18
1.8 Bindung von vollen und partiellen Agonisten	21
2. Theoretische Grundlagen	25
2.1 Fluoreszenzlöschung durch den photoinduzierten Elektronentransfer (PET) .	25
2.2 Messmethoden	27
2.2.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS).....	27
2.2.2 PET-FCS.....	31
3. Material und Methoden	34
3.1 Puffer und Nährmedien.....	34
3.2 Herstellung von Punktmutanten homologer Ligandenbindedomänen ionotroper Glutamatrezeptoren.....	36
3.3 Synthese isolierter homologer Ligandenbindedomänen ionotroper Glutamatrezeptoren in kompetenten <i>E.coli</i> -Bakterien.....	41
3.4 Aufreinigung der Ligandenbindedomänen	43
3.5 Farbstoffmarkierung der Ligandenbindedomäne.....	45
3.6 Das FCS-Setup.....	46
3.7 PET-FCS-Experimente: Probenpräparation, Datenerfassung und Datenauswertung	48
3.8 Expression ionotroper Glutamatrezeptoren als intakte Vollängen-Konstrukte in Säugetierzellen und Farbstoffmarkierung mittels Klick-Chemie	51

4. Ergebnisse	52
4.1 Vergleich der Dynamiken der Ligandenbindedomänen von Vertretern der drei iGluR-Subtypen AMPAR, KainateR und NMDAR.....	52
4.2 Untersuchung der Dimerisierung der homologen Ligandenbindedomänen	65
4.3 Untersuchung der allosterischen Kommunikation zwischen isolierten Ligandenbindedomänen von NMDA-Rezeptoren	75
4.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante von Glutamat für die Bindung an die Ligandenbindedomäne der GluR2-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors.....	81
4.5 Untersuchung der Dynamiken einer Ligandenbindedomäne bei Bindung von vollen und partiellen Agonisten.....	82
5. Diskussion	85
5.1 Konformationsdynamiken der isolierten Ligandenbindedomänen.....	86
5.2 Konformationsdynamiken der LBDs innerhalb eines Dimers.....	94
5.3 Allosterische Kommunikation zwischen iGluR LBDs.....	96
5.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante von Glutamat	100
5.5 Auswirkungen von vollen und partiellen Agonisten auf die Dynamiken der LBD	101
6. Fazit und Ausblick	104
7. Literaturverzeichnis.....	109
Publikationsliste	XV
Danksagung	XVI
Eidesstattliche Erklärung.....	XVIII
Lebenslauf	XIX

Abkürzungsverzeichnis

A ⁻	<i>Akzeptor</i>
ACF	<i>Autokorrelationsfunktion (engl. autocorrelation function)</i>
AMP	<i>Ampicillin</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxazolepropionic acid</i>
APD	<i>Lawinen-Photodioden (engl. avalanche photodiode)</i>
ATD	<i>Aminoternale Domäne</i>
BSA	<i>Rinderalbumin (engl. bovine serum albumin)</i>
C	<i>Coulomb-Wechselwirkungsenergie</i>
Ca ²⁺	<i>Calcium</i>
Cl ⁻	<i>Chlorid</i>
CO ₂	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
Co ²⁺	<i>Cobalt</i>
CTD	<i>C-terminale Domäne</i>
CTZ	<i>Cyclothiazid</i>
D ⁺	<i>Donor</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DNAse	<i>Desoxyribonuklease</i>
DOL	<i>Labelgrad (engl. Degree of labeling)</i>
dNTP	<i>Nukleosidtriphosphat</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
E _{ox}	<i>Oxidationspotential</i>
E _{red}	<i>Reduktionspotential</i>
F	<i>Fluorophor</i>

Abkürzungsverzeichnis

FCS	<i>Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (engl. fluorescence correlation spectroscopy)</i>
FRET	<i>Förster-Resonanzenergietransfer (engl. fluorescence resonance energy transfer)</i>
fs	<i>Femtosekunden</i>
G	<i>Guanin</i>
GFP	<i>grün fluoreszierendes Protein (engl. green fluorescent protein)</i>
GT	<i>Glycin-Threonin</i>
HA-966	<i>1-hydroxy-3-aminopyrrolidin-2-on</i>
HCl	<i>Chlorwasser</i>
HEK293T	<i>menschliche embryonale Nierenzellen (engl. human embryonic kidney cells)</i>
HOMO	<i>Höchstes besetztes Molekülorbital (engl.. highest occupied molecular orbital)</i>
HW	<i>Willardiin</i>
iGluR	<i>ionotroper Glutamatrezeptor</i>
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>
IW	<i>Iodowillardiin</i>
K ⁺	<i>Kalium</i>
KA	<i>Kainate</i>
KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
K _d	<i>Dissoziationskonstante</i>
KNF	<i>Koshland-Nemethy-Filmer</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
LBD	<i>Ligandenbindedomäne</i>
L-Glu	<i>L-Glutamat</i>
LSM	<i>Laser-Scanning-Mikroskop (engl. laser scanning microscope)</i>
LUMO	<i>Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (engl. lowest unoccupied molecular orbital)</i>
MD	<i>Molekulardynamik</i>
mGluR	<i>metabotroper Glutamatrezeptor</i>

Abkürzungsverzeichnis

Mg ²⁺	<i>Magnesium</i>
MgCl ₂	<i>Magnesiumchlorid</i>
ms	<i>Millisekunde</i>
MgSO ₄	<i>Magnesiumsulfat</i>
mM	<i>Millimolar</i>
MWC	<i>Monod-Wyman-Changeux</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
Na ²⁺	<i>Natrium</i>
NA	<i>Numerische Apertur</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
nM	<i>Nanomolar</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-Aspartat</i>
NMR	<i>Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)</i>
NTD	<i>N-terminale Domäne</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)</i>
PET	<i>Photoinduzierter Elektronentransfer (engl. photoinduced electron transfer)</i>
pM	<i>Pikomolar</i>
PMSF	<i>Phenylmethylylsulfonylfluorid</i>
ps	<i>Pikosekunden</i>
Q	<i>Löschmolekül (engl. Quencher)</i>
QRN	<i>Glutamin-Arginin-Asparagin</i>
Quis	<i>Quisqualat</i>
R _g	<i>Gyrationsradius</i>
R _h	<i>Hydrodynamischer Radius</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
SDS-PAGE	<i>Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)</i>

Abkürzungsverzeichnis

SEC	<i>Größenausschlusschromatographie (engl. size-exclusion chromatography)</i>
smFRET	<i>Einzelmolekül-FRET (engl. single-molecule FRET)</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TCEP	<i>Tris(2-carboxyethyl)phosphin</i>
TIRFM	<i>Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (engl. total internal reflection fluorescence microscopy)</i>
TMD	<i>Transmembrandomäne</i>
TRIS	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
TRP	<i>Tryptophan</i>
WT	<i>Wildtyp</i>
Zn ²⁺	<i>Zink</i>

1. Einleitung

1.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren

Zur Ausübung der vielfältigen und komplexen Funktionen des Gehirns ist ein Informationsaustausch zwischen Neuronen erforderlich, wobei derartige funktionelle Wechselwirkungen an bestimmten Zellregionen, den so genannten Synapsen, auftreten¹. An chemischen Synapsen erfolgt die Weitergabe von Informationen durch die Ausschüttung eines Neurotransmitters durch eine Nervenzelle, welcher dann von angrenzenden Nervenzellen wahrgenommen wird¹. In nahezu allen Synapsen des zentralen Nervensystems fungiert Glutamat (auch als Glutaminsäure bezeichnet) – eine einfache Aminosäure – als primärer Neurotransmitter²⁻⁴. Glutamat wird an präsynaptischen Endknöpfchen in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und bindet anschließend an Glutamatrezeptoren, welche sich überwiegend in der postsynaptischen Zelle befinden^{2,5,6}. Als Reaktion auf die Bindung eines Liganden vollziehen Glutamatrezeptoren eine Konformationsänderung, wodurch es zur Öffnung eines transmembranen Ionenkanals kommt (Aktivierung)^{2,6}. Dies hat wiederum zur Folge, dass Kationen wie Na⁺, K⁺ und in unterschiedlichem Ausmaß auch Ca²⁺ über die Zellmembran in die postsynaptische Zelle strömen^{2,5,7}. Infolgedessen kommt es zu einer schnellen Depolarisierung des postsynaptischen Membranpotentials, wodurch die Signalweiterleitung entlang des postsynaptischen Neurons ausgelöst wird^{2,5,6}. Im Anschluss daran schließt der Ionenkanal wieder, entweder in stetiger Anwesenheit des Glutamats (Desensitisierung) oder nach Dissoziation des Liganden (Deaktivierung)⁶. Aufgrund unterschiedlicher Mechanismen der Signalweiterleitung wird zwischen ligandengesteuerten ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs) und metabotropen, G-Protein-gekoppelten Glutamatrezeptoren (mGluRs) unterschieden^{7,8}. Ionotrope Glutamatrezeptoren sind in allen Klassen von Wirbeltieren sowie in Insekten, Nematoden und primitiven eukaryotischen Organismen zu finden und vermitteln den Großteil der schnellen exzitatorischen Signalweiterleitung im Gehirn von Vertebraten^{2,6,9-11}. Innerhalb dieser Gruppe von Glutamatrezeptoren wird basierend auf pharmakologischen und

kinetischen Eigenschaften sowie Sequenz-Homologie, Funktionalität und biologischer Funktion weiterhin zwischen vier Untergruppen unterschieden: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxazolepropionic acid-(AMPA)-Rezeptoren (GluR1-4 bzw. GluA1-4) (benannt aufgrund ihrer Sensitivität für den synthetischen Agonisten AMPA), Kainate-(KA)-Rezeptoren (GluR5-7, KA1 und KA2 bzw. GluK1-5) (benannt aufgrund ihrer Sensitivität für das natürlich vorkommende Neurotoxin Kainate), N-methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren (NR1, NR2A-D und NR3A-B) (benannt aufgrund ihrer Selektivität für den synthetischen Agonisten NMDA) und δ -Rezeptoren^{2,7,10,12}. Grundsätzlich spielen alle Arten ionotroper Glutamatrezeptoren eine wichtige Rolle beim Hervorrufen exzitatorischer postsynaptischer Potentiale, allerdings unterscheiden sich die einzelnen Untergruppen aufgrund ihrer divergierenden Kinetiken hinsichtlich des Öffnen und Schließens des Ionenkanals (Gating)¹³. Dabei tragen AMPA- und Kainate-Rezeptoren hauptsächlich zur Auslösung eines schnellen exzitatorischen synaptischen Stroms bei, was eine Depolarisierung des postsynaptischen Potentials auf einer Zeitskala von Millisekunden zur Folge hat, wohingegen NMDA-Rezeptoren die langsame Komponente der synaptischen Übertragung auf Zeitskalen von zehn bis hunderten von Millisekunden vermitteln¹³⁻¹⁵. Zudem zeigen AMPA- und Kainate-Rezeptoren eine sehr schnelle Desensitisierung, welche ebenfalls auf einer Zeitskala von Millisekunden nach Aktivierung durch Glutamat erfolgt, während NMDA-Rezeptoren wesentlich langsamer in ihren desensitisierten Zustand übergehen¹³. Auf dieser Grundlage lassen sich iGluRs zum einen in die Klasse der NMDA-Rezeptoren mit langsamem Gating-Verhalten und zum anderen in die Klasse der nicht-NMDA-Rezeptoren – bestehend aus AMPA- und Kainate-Rezeptoren – mit schnellem Gating-Verhalten unterteilen¹³. NMDA-Rezeptoren wirken zudem gewissermaßen wie Sensoren für eine Reihe zufälliger Ereignisse, indem sie eine Depolarisierung des Membranpotentials, die damit einhergehende Auflösung der Magnesium-Blockade sowie die Gegenwart von Glutamat und Glycin im synaptischen Spalt wahrnehmen und darüber hinaus zur Aktivierung benötigen^{15,16}. Im Wesentlichen spielen ionotrope Glutamatrezeptoren eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung und Funktion sowie bei neuronaler Plastizität, was Lernprozessen wie auch der Gedächtnisbildung zugrunde liegt^{10,17,18}. Eine übermäßige Aktivierung oder generelle Fehlfunktion von iGluRs führt zu Exzitotoxizität (Tod einer Nervenzelle durch eine andauernde Reizüberflutung) und ist daher mit zahlreichen chronischen neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Alzheimer^{3,5,10}, Parkinson^{3,10}, Chorea Huntington^{7,10} und Epilepsie^{5,7} verbunden. iGluRs stehen darüber hinaus im

Zusammenhang mit psychischen Störungen wie beispielsweise Schizophrenie, Autismus und Depression^{3,5}, können aber auch eine Reihe akuter Erkrankungen wie Hirntraumata und Schlaganfall hervorrufen^{10,18}. Aus diesem Grund gelten iGluRs als wichtige Zielproteine für die Wirkstoffentwicklung gegen derartige Störungen und Erkrankungen⁵.

1.2 Aufbau, Struktur und Funktion

Trotz ihrer Diversität weisen ionotrope Glutamatrezeptoren einen einheitlichen modularen Aufbau und eine analoge Domänentopologie auf^{2,19}. iGluRs sind grundsätzlich als Tetramere organisiert, wobei sie aus vier ähnlichen oder identischen Untereinheiten (A-D) bestehen, und daher sowohl homo- als auch heterotetramere Komplexe ausbilden^{2,5,6,8,10,19,20} (Abb. 1). Die Untergruppe der NMDA-Rezeptoren liegt hierbei obligatorisch als Heterotetramere – bestehend aus mindestens zwei unterschiedlichen Untereinheiten – vor, wohingegen nicht-NMDA-Rezeptoren entweder Homo- oder Heterotetramere ausbilden können, wenn auch native Rezeptoren nahezu ausschließlich als Heterotetramere vorliegen^{3,15}. Die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt hierbei wichtige Eigenschaften des intakten Rezeptors, wie beispielsweise die Selektivität für Liganden oder die Permeabilität für Calcium-Ionen, aber auch die Leitfähigkeit sowie die Kinetiken hinsichtlich der Öffnung, Schließung und Desensibilisierung des Ionenkanals²¹. Jede der Untereinheiten innerhalb eines Tetramers besteht wiederum aus vier in Schichten organisierten semiautonomen Domänen, welche durch flexible Linker miteinander verbunden sind^{2,22}. Diese vier Subdomänen lassen sich in zwei extrazelluläre muschelschalenähnliche Domänen, (i) die N-terminale Domäne (NTD) (auch bezeichnet als aminoternale Domäne (ATD)) und (ii) die Ligandenbindedomäne (LBD), (iii) eine intrazelluläre carboxyterminale Domäne (CTD), (iv) drei Transmembrandomänen (TMD) und eine wiedereintretende Porenschleife unterteilen, wobei sowohl die ATDs als auch die LBDs als Dimere von Dimeren organisiert sind^{5-7,9,10,19,22} (Abb. 1).

Die aminoterminalen Domänen, welche aus zwei Hälften (R1 und R2) bestehen, spielen einerseits eine wichtige Rolle beim tetrameren Zusammenbau des Rezeptors, aber auch beim intrazellulären Transport sowie der funktionalen Regulation des Rezeptors^{2,8,9,18,22}. Innerhalb der ATDs bilden sich Dimerpaare zwischen den Untereinheiten A und B und den Untereinheiten C und D durch Wechselwirkungen zwischen den oberen R1-Lobes sowie den unteren R2-Lobes.

Der Kontakt zwischen den beiden Dimeren wird wiederum durch Wechselwirkungen zwischen den unteren Lobes der B und D-Untereinheiten ausgebildet, wodurch sich die ATDs zu einem Tetramer zusammenschließen^{2,9}. Innerhalb der Untergruppe der NMDA-Rezeptoren wechselwirken die beiden Heterodimere der ATDs an zwei Kontaktflächen, den oberen Lobes der GluN1-Untereinheiten und den unteren Lobes der GluN2-Untereinheiten²³.

Die Ligandenbindedomäne, welche sich unterhalb der ATD befindet, enthält die Bindestelle für Agonisten sowie Antagonisten und ist für die Aktivierung, Modulierung und auch Antagonisierung des Rezeptors verantwortlich^{2,18}. Die LBD wird aus zwei Polypeptidsegmenten, welche als S1 und S2 bezeichnet werden, gebildet, wobei S1 die Aminosäurereste zwischen der aminoterminalen Domäne und der ersten Transmembranhelix (M1) umfasst und S2 die Aminosäurereste zwischen der dritten (M3) und vierten (M4) Transmembranhelix beinhaltet^{6,7,22}. Das Ergebnis ist eine Struktur mit zwei getrennten Lobes (D1 und D2), wobei S1 die obere Hälfte (D1), welche mit der ATD verbunden ist, und S2 die untere Hälfte (D2), welche mit der TMD verbunden ist, ausbilden^{5,22,24,25} (vergleiche Abschnitt 1.3 Abb.2). Innerhalb der LBD-Schicht bilden sich die „back-to-back“ angeordneten Dimere zwischen den Untereinheiten A und D sowie zwischen den Untereinheiten B und C durch Kontakte, welche ausschließlich durch die oberen D1-Lobes vermittelt werden^{6,9,24,26}. Die Ausbildung von Dimeren zwischen den LBDs spielt hierbei eine entscheidende Rolle beim Prozess der Aktivierung und Desensibilisierung²⁷. Die vergleichsweise instabile Verbindungsfläche zwischen den beiden Dimerpaaren wird hier zwischen den Untereinheiten A und C gebildet^{2,9,15}.

Die Transmembrandomänen, welche sich unterhalb der extrazellulären Domänen (ATD und LBD) befinden, bilden einen membranüberspannenden Ionenkanal aus, durch welchen Kationen über die postsynaptische Membran fließen können^{2,18}. Eine Transmembrandomäne besteht dabei aus drei transmembranen Helices (M1, M3 und M4) und einer intrazellulären Porenschleife (M2), welche sich zwischen Helix M1 und Helix M3 befindet und auf der zytoplasmatischen Seite in die Plasmamembran eintritt und sie auch wieder verlässt^{2,9,21} (vergleiche Abschnitt 1.3 Abb.2). Während die M3-Segmente den inneren Teil des Ionenkanals auskleiden, umgeben die M1- und M4-Segmente die M3-Helices und bilden die Peripherie des Ionenkanals^{2,15,28}. Eine Bündelkreuzung der M3-Helices, welche nahe der extrazellulären Seite der Membran lokalisiert ist, stellt eine Barriere für die Permeation von Ionen durch den Kanal dar. Zudem befindet sich innerhalb der M3-Segmente ein konserviertes SYTANLAAF-Motiv, wobei bestimmte Reste innerhalb dieses Motivs ebenfalls den Permeationsweg für Ionen verschließen^{9,15}.

Zudem stellen die Verbindungsflächen zwischen den einzelnen Transmembrandomänen die größten Kontaktflächen in der gesamten Struktur dar, wodurch der Ionenkanal möglicherweise auch einen großen Teil zur Stabilität des gesamten Aufbaus der iGluRs beiträgt¹⁸.

Die zytoplasmatische carboxyterminale Domäne (CTD), welche in ihrer Sequenz und Größe zwischen den verschiedenen iGluR-Untereinheiten stark variieren kann (von ca. 20 bis um die 500 Aminosäuren)¹⁶, spielt bei der Lokalisation, Beweglichkeit und Stabilisierung sowie bei posttranslationalen Modifikationen und der Regulierung des Rezeptors, aber auch beim intrazellulären Transport eine wichtige Rolle und umfasst zahlreiche Bindestellen für intrazelluläre Proteine^{2,18,22}. Bislang war eine Bestimmung der Struktur der CTD nicht möglich, allerdings wird vermutet, dass sie vorwiegend unstrukturiert vorliegt^{2,19,26}.

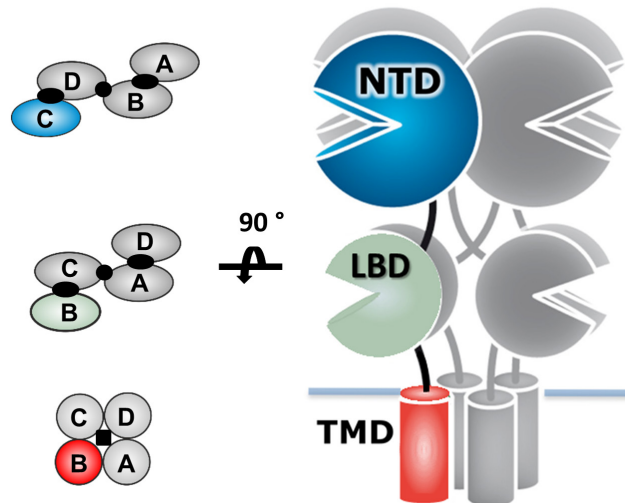


Abbildung 1: Struktureller Aufbau eines ionotropen Glutamaterezeptors. Rechts: Tetramere Anordnung der Untereinheiten innerhalb eines iGluRs. Jede der Untereinheiten ist in vier Schichten semiautonomer Domänen organisiert, bestehend aus einer N-terminalen Domäne (NTD) (blau), Ligandenbindedomäne (LBD) (grün), Transmembrandomäne (TMD) (rot) und C-terminalen Domäne (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt). Die einzelnen Domänen sind durch flexible Polypeptid-Linker miteinander verbunden. Die Ebene der Membran ist durch eine horizontale Linie dargestellt. Links: Anordnung der Domänen innerhalb der einzelnen Schichten. Die lokalen zweifachen Symmetrieachsen innerhalb der Dimere der NTDs und LBDs sind als große schwarze Ovale dargestellt. Die Gesamtsymmetrieachsen der zweifachen Rotationssymmetrie innerhalb der NTD- und LBD-Schicht sind als kleine schwarze Ovale dargestellt. Die vierfache Symmetrieachse innerhalb der TMD-Schicht ist als schwarzes Quadrat dargestellt. (Abbildung modifiziert übernommen aus Jensen et al. 2011)

Über die drei Schichten der Struktur (ATD, LBD und TMD) hinweg kommt es zu einem Wechsel der Interaktionspartner sowie der Symmetriepartner^{2,23}. Im Allgemeinen weisen iGluRs innerhalb der ATD und der LBD eine zweifache

Rotationssymmetrie und innerhalb des Ionenkanals eine vierfache Rotationssymmetrie auf^{2,9,22} (Abb. 1). Die zweifache Rotationssymmetrie ist hierbei außergewöhnlich und einzigartig für tetramere Ionenkanäle, da die Rotationssymmetrie für gewöhnlich mit der Anzahl der Untereinheiten korreliert, was bedeutet, dass Ionenkanäle mit n Untereinheiten pro Oligomer eine n-fache Rotationssymmetrie besitzen^{2,18,22}. Innerhalb der aminoterminalen Domäne bilden sich lokale Dimere zwischen den Untereinheiten A und B und zwischen den Untereinheiten C und D auf beiden Seiten der zweifachen Rotationssymmetrieachse aus, wobei die Untereinheiten B und D proximal und die Untereinheiten A und C distal zur Symmetrieachse liegen^{9,15}. Zwischen der ATD- und der LBD-Schicht kommt es dann zu einem Domänen-Austausch, was zur Folge hat, dass die Dimerpartner innerhalb der LBD-Schicht wechseln, wobei in diesem Fall die Dimerpaare durch die Untereinheiten A und D und die Untereinheiten B und C ausgebildet werden^{3,9,18,22}. Dadurch befinden sich innerhalb der LBDs die Untereinheiten A und C proximal und die Untereinheiten B und D distal zur zweifachen Symmetrieachse¹⁵ (Abb. 1). Bei den NMDA-Rezeptoren bilden die Untereinheiten GluN1 und GluN2 diagonale Paare aus, wobei in diesem Fall die GluN1-Untereinheiten proximal und die GluN2-Untereinheiten distal zur zweifachen Symmetrieachse liegen^{9,15}. Dieser Austausch von Domänen wird hauptsächlich durch einen ATD-S1-Aminosäurelinker vermittelt, welcher die ATD mit der LBD verbindet^{15,22}. Zudem ist die Ligandenbindedomäne über kurze, flexible Polypeptidlinker ebenfalls mit den Transmembrandomänen verbunden (Abb. 1). Dabei wird zwischen insgesamt drei Arten von Polypeptidlinkern unterschieden: der S1-M1-Linker, der M3-S2-Linker und der S2-M4-Linker^{2,9}. Während die Linker-Region noch eine zweifache Rotationssymmetrie aufweist, sind die membranständigen TMDs nahezu vierfach rotationssymmetrisch, wodurch vermutlich die Linker den Wechsel zwischen zweifacher und vierfacher Rotationssymmetrie zwischen LBD und Ionenkanal vermitteln und darüber hinaus als Zugangsweg für Ionen und Porenblocker dienen^{2,9}.

1.3 Die Ligandenbindedomäne

Die Ligandenbindedomäne ist innerhalb der unterschiedlichen Klassen ionotroper Glutamatrezeptoren hoch konserviert²². Trotz der geringen Sequenzübereinstimmung von nur ca. 20 % zwischen den LBDs von NMDA-Rezeptoren und denen von nicht-NMDA-Rezeptoren weisen diese dennoch

ähnliche Strukturen wie auch Funktionen auf³. Im Jahr 2015 waren über 268 Kristallstrukturen von LBDs verschiedener Untereinheiten von jeder der iGluR-Untergruppen sowohl im Komplex mit Agonisten als auch partiellen Agonisten, Antagonisten, und allosterischen Modulatoren verfügbar³. Im Jahr 1998 gelang es, die erste Kristallstruktur eines wasserlöslichen Konstruktes, welches der Ligandenbindedomäne der GluR2-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors entsprach, aufzulösen und dadurch zu zeigen, dass die Struktur der LBD im Allgemeinen einer „Muschelschale“ ähnelt, bei welcher sich die Bindestelle für Agonisten in der Schnittstelle zwischen der oberen (S1 bzw. D1) und der unteren (S2 bzw. D2) Domäne befindet^{2,22,25,29–31}. Sowohl in ihrem ungebundenen (Apo)-Zustand als auch im Antagonist-gebundenen Zustand sind die beiden Lobes räumlich voneinander getrennt, wodurch die LBD eine offene Konformation einnimmt²². Bei Bindung eines vollen oder partiellen Agonisten an die Ligandenbindestelle vollzieht die LBD eine Konformationsänderung, wobei sie von ihrem offenen Zustand in einen Agonist-gebundenen Zustand wechselt, bei dem die D1 und D2-Domänen eine geschlossene Konformation annehmen^{14,22,25}. Hierbei kommt es zunächst zu einer schnellen Bindung eines Liganden, gefolgt von einer langsameren Konformationsänderung der Ligandenbindedomäne, wodurch der Ligand tief in der Bindetasche des Proteins eingeschlossen wird. Dieser Vorgang ähnelt dem Mechanismus einer Venusfliegenfalle und ist in allen Untereinheiten der ionotropen Glutamatrezeptoren konserviert, da alle Agonist-gebundenen LBDs eine – wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß – geschlossene Konformation einnehmen, verglichen mit ihrem Apo-Zustand^{8,14,22,25,32}.

Die extrazelluläre Ligandenbindedomäne kann zudem als lösliches Protein, bestehend aus der isolierten S1- und S2-Domäne (S1S2) verbunden durch einen Glycin-Threonin-Linker (GT), in Bakterien hergestellt werden^{8,10,33,34}. Der GT-Linker schließt hierbei die Lücke, welche an der Stelle entsteht, an der innerhalb des Volllängenrezeptors Segment 1 der LBD in Membranregion 1 übergeht und Segment 2 der LBD mit Membranregion 3 verbunden ist^{2,35} (Abb. 2). Da das S1S2-Konstrukt nicht nur Eigenschaften besitzt, die im Wesentlichen identisch mit denen der entsprechenden Domäne im intakten, membrangebundenen Rezeptor sind, sondern auch mittels Kristallstrukturanalyse und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) untersucht werden kann, wurde es zu einem Modellsystem für das Verständnis der Beziehung zwischen Struktur und Funktion der Ligandenbindedomäne^{10,18,33,36,37}. Die Annahme, dass das isolierte S1S2-Protein ein repräsentatives Modell für die entsprechende Domäne im Volllängenrezeptor ist, beruht vor allem auf Untersuchungen, die zeigten, dass das S1S2-Konstrukt in

der Lage ist, verschiedene Agonisten und Antagonisten zu binden und dabei ähnliche Eigenschaften aufweist wie die LBD innerhalb eines intakten Rezeptors^{8,17}. Auf dieser Grundlage war es möglich, eine Vielzahl struktureller und funktioneller Informationen bezüglich des Aktivierungsmechanismus des Rezeptors in Erfahrung zu bringen¹⁰.

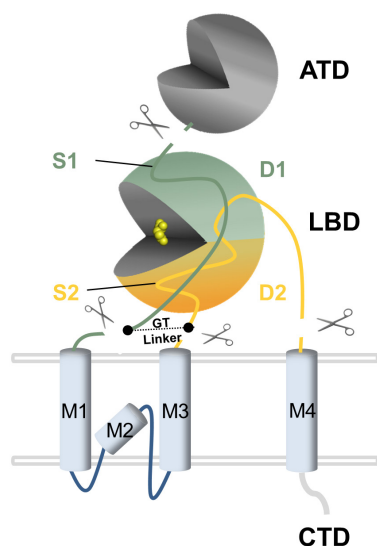


Abbildung 2: Herstellung eines löslichen Konstruktes der Ligandenbindedomäne, bestehend aus den isolierten S1 und S2-Polypeptidsegmenten verbunden durch einen Glycin-Threonin (GT)-Linker. Anordnung der Domänen innerhalb einer iGluR-Untereinheit, bestehend aus aminoterminaler Domäne (ATD), Ligandenbindedomäne (LBD), drei membranüberspannenden Transmembranhelices (M1, M3 und M4) und einer Porenschleife (M2). Die D1-Domäne bzw. das S1-Segment und die D2-Domäne bzw. das S2-Segment der LBD sind jeweils in Hellgrün und Orange dargestellt. Innerhalb der LBD ist der Glutamat-Ligand als gelbe Sphären dargestellt. Die ATD und die TMD wurden von der LBD entfernt, wobei die entsprechenden Schnittstellen in Form von Scheren angedeutet sind. Der GT-Linker schließt hierbei die Lücke, welche an der Stelle entsteht, an der S1 der LBD mit dem ersten Transmembransegment (M1) und S2 der LBD mit dem dritten Transmembransegment (M3) verbunden ist. (Abbildung teilweise erstellt mit BioRender.com)

Die beiden Domänen der LBD können sich unabhängig voneinander bewegen, wofür eine Gelenkregion, welche aus zwei antiparallel verlaufenden β -Strängen besteht, verantwortlich ist³⁵. Dabei liegt die isolierte LBD weder in ihrer ungebundenen Apo-Form noch in ihrem gebundenen Zustand (an Agonisten oder Antagonisten) vollkommen starr vor, sondern nimmt eine Reihe unterschiedlicher Konformationen an, wobei die Apo-Form in dieser Hinsicht im Vergleich zu der relativ starren Agonist-gebundenen Form eine wesentlich größere Flexibilität aufweist^{5,24,25,29,38}. Diesbezüglich wird vermutet, dass sich die Ligandenbindedomäne in ihrem ungebundenen Zustand in einem dynamischen

Gleichgewicht befindet, wobei sie fortlaufend zwischen der offenen und geschlossenen Konformation wechselt^{5,6}. Dabei wird die geöffnete Konformation der LBD aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen den beiden Lobes energetisch präferiert^{25,39}. Zudem nimmt die ungebundene LBD in Lösung weiter geöffnete Konformationen an als auf Grundlage von Kristallstrukturen zuvor vermutet wurde^{5,38}.

Die LBD der GluR2-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors wird durch Wechselwirkungen innerhalb des S2-Lobes in ihrem geöffneten Apo-Zustand stabilisiert, indem die Ligandenbindespalte durch eben diese Wechselwirkungen teilweise besetzt vorliegt und die geschlossene Form der LBD aufgrund dessen mit geringerer Wahrscheinlichkeit eingenommen wird⁶. Durch Bindung eines Agonisten verschiebt sich das Gleichgewicht von der offenen Form hin zum geschlossenen Zustand der LBD, wobei der Klammerschluss durch eine Konformationsänderung innerhalb der Gelenkregion des Proteins erfolgt^{6,33,35}. Die geschlossene Konformation der LBD wird dann durch Wechselwirkungen zwischen Glutamat und Resten beider Domänen sowie durch Wechselwirkungen zwischen den Domänen stabilisiert. Dabei werden Wasserstoffbrückenbindung zwischen Resten der S1-Untereinheit mit Resten der S2-Untereinheit quer über die Bindepalte des S1S2-Proteins ausgebildet, was dadurch ermöglicht wird, dass entsprechende Reste durch die Konformationsänderung der LBD in räumliche Nähe zueinander kommen^{4,6,31}. Zudem treten zusätzlich Van-der-Waals-Wechselwirkungen in der Verbindungsstelle zwischen S1 und S2 auf, die ebenfalls eine stabilisierende Wirkung auf die geschlossene Form der LBD haben⁶. FRET-Messungen eines Konstruktes der GluR4-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors, welches die Eigenschaften eines voll funktionsfähigen Rezeptors besitzt, zeigten, dass die Ligandenbindedomäne innerhalb eines funktionellen Rezeptors nach Bindung eines Agonisten dieselben Konformationsänderungen (Klammerschluss) durchläuft, die auch im isolierten S1S2-Protein beobachtet wurden¹⁷.

Innerhalb eines Dimers, bestehend aus LBDs in einem ungebundenen Zustand, zeigen die oberen Lobes eine deutlich geringere Beweglichkeit verglichen mit den unteren Lobes, was vermutlich damit einhergeht, dass die oberen Lobes den Großteil der Wechselwirkungen zwischen den beiden LBDs vermitteln, wodurch ihre Beweglichkeit im Vergleich zu den „freien“ unteren Lobes enorm eingeschränkt ist^{24,40}. Wiederum weisen beide Lobes im ligandengebundenen Zustand eine mehr oder weniger identische Beweglichkeit auf²⁴.

Das elektrostatische Potential der Ligandenbindespalte ist vorwiegend positiv, während Liganden üblicherweise ein negatives elektrostatisches Potential besitzen^{6,8}. In ihrer ungebundenen, offenen Form weitet die LBD ihr positives elektrostatisches Potential in die Lösung aus⁸. Nähert sich ein Ligand durch Diffusion der Ligandenbindestelle innerhalb eines Radius von 5 Å (die Distanz, bei der elektrostatische Interaktionen zwischen ionisierten Molekülen in wässriger Umgebung stattfinden), wird er aufgrund des komplementären elektrostatischen Potentials zu der Ligandenbindestelle hingezogen^{6,8,25}. Durch einen solchen Mechanismus kommt es zu einer Erhöhung der relativen Konzentration von Liganden in der Umgebung der Ligandenbindedomäne, wodurch wiederum die Wahrscheinlichkeit einer Bindung deutlich erhöht wird⁸. Zudem wird vermutet, dass geladene Reste außerhalb der LBD-Bindespalte metastabile Wechselwirkungen mit dem Glutamat-Liganden eingehen und dadurch ebenfalls dazu beitragen, den Liganden in die Ligandenbindetasche zu steuern^{5,41}. Darüber hinaus setzen die metastabilen Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand die Energiebarriere der Ligandenbindung herab, was zur Entstehung eines Signalwegs für eine optimierte, schnelle Reaktion der iGluRs an Synapsen des zentralen Nervensystems beigetragen hat^{5,41}. In Anlehnung an den mutmaßlichen Venusfliegenfallenmechanismus erfolgt die Bindung eines Agonisten an die LBD in drei Schritten^{8,42}. In einem ersten Schritt kommt es zum Andocken des Liganden an die S1-Untereinheit in der offenen Konformation der LBD sowie zur Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und Resten der S1-Domäne, woraufhin die LBD in einem zweiten langsameren Schritt ihre Konformation ändert und sich vollständig um den Liganden schließt, gefolgt von der Ausbildung zahlreicher Wechselwirkungen mit der S2-Domäne sowie einem Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und beiden Domänen in einem dritten Schritt^{6,8,38,42}.

Innerhalb der unterschiedlichen Untereinheiten der iGluRs besitzt D1 der LBD eine einheitliche Form und identische chemische Eigenschaften, was mit ihrer Funktion – der Bindung der α -Aminogruppe und der α -Carboxylgruppe von Agonisten – einhergeht^{9,16}. In jeder der drei iGluR-Untergruppen – der AMPA-, Kainate- und NMDA-Rezeptoren – bildet die Seitenkette eines konservierten Arginin-Restes die Hauptbindestelle für die α -Carboxylgruppe der Liganden aus und ist daher essentiell für die hohe Affinität der Bindung von Agonisten an die LBD^{16,34,43}. Zudem kommt es in allen Untereinheiten der AMPA- und Kainate-Rezeptoren zu Wechselwirkungen der α -Aminogruppe des Liganden mit der Seitenkette eines konservierten Glutamat-Restes, wobei dieser Glutamat-Rest in NMDA-Rezeptoren

durch ein Aspartat ersetzt ist¹⁶. Die Unterschiede in der Selektivität für Agonisten zwischen den iGluR-Untereinheiten entstehen durch Aminosäure-Unterschiede innerhalb der D2-Domäne, welche Größe und chemische Eigenschaften der Ligandenbindetasche bestimmt und zudem mit der γ -Carboxylgruppe der Agonisten interagiert^{9,16}. Dabei tragen vor allem sterische Effekte maßgeblich zu der selektiven Bindung von Agonisten an die iGluR-Untereinheiten bei¹⁶. Zusätzlich schließt die Ligandenbindespalte neben Agonisten auch Wassermoleküle ein, aufgrund derer neben den direkten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen LBD und Ligand auch weitere, über Wassermoleküle vermittelte, Wechselwirkungen ausgebildet werden, wobei diese möglicherweise eine Schlüsselfunktion bei der Bindung und Stabilisierung von Liganden haben^{8,16,31,34}.

Obwohl sich Domäne 2 der LBD innerhalb eines NMDAR-Dimers, ähnlich wie bei AMPA- und Kainate-Rezeptoren, beim Wechsel zwischen Apo-Zustand und Agonist-gebundenem Zustand frei bewegt, wurden bei den NMDA-Rezeptoren zusätzliche Kontakte zwischen Domäne 1 und Domäne 2 der beiden LBD-Untereinheiten festgestellt, welche auf eine allosterische Kopplung zwischen der Glutamat- und Glycin-Bindestelle hindeuten¹⁶. Dabei konnte innerhalb der Gruppe von NMDA-Rezeptoren eine negative Kooperativität zwischen der Bindung von Glycin und der Bindung von NMDA an denselben Rezeptor festgestellt werden. Auf Grundlage der Beobachtung einer wesentlich höheren Affinität für die Bindung von Glycin an einen ungebundenen Rezeptor verglichen mit der Interaktion von Glycin mit einem Rezeptor, der bereits von NMDA besetzt ist, kann die Annahme getroffen werden, dass die Bindung von NMDA die Affinität für Glycin verringert und umgekehrt (negative allosterische Wechselwirkung)⁴⁴.

Alles in allem nimmt die Ligandenbindedomäne innerhalb der ionotropen Glutamatrezeptoren eine Schlüsselrolle dahingehend ein, dass sie dem Rest des Rezeptors – insbesondere der TMD – vermittelt, ob ein Agonist anwesend ist oder nicht, wobei die Schließung der LBD um einen Agonisten der erste Schritt in der Reihe von Ereignissen ist, welche letztlich zur Öffnung des Ionenkanals führen^{2,38}.

1.4 Mechanismus zum Öffnen und Schließen des Ionenkanals

Im Allgemeinen umfasst die Funktionsweise ionotroper Glutamatrezeptoren drei wesentliche Vorgänge hinsichtlich des Öffnens und Schließens des Ionenkanals: die Aktivierung, die Desensibilisierung und die Deaktivierung² (Abb. 3). Durch Kristallstrukturanalysen sowie durch elektrophysiologische Untersuchungen konnte bislang gezeigt werden, dass die Aktivierung des Ionenkanals membrangebundener iGluRs durch den Klammerschluss der LBD nach Bindung eines Agonisten hervorgerufen wird^{6,20,33,45}. Der grundlegende Aktivierungs- und Desensibilisierungsmechanismus ist innerhalb aller iGluRs derselbe, wobei vorwiegend Konformationsänderungen der LBD- und TMD-Region eine Rolle spielen. Dabei weisen nicht-NMDA-Rezeptoren Aktivierungs-, Deaktivierungs- und Desensibilisierungskinetiken auf einer Zeitskala von Millisekunden auf, während die entsprechenden molekularen Prozesse innerhalb der NMDA-Rezeptoren wesentlich langsamer auf Zeitskalen von zehn bis hin zu hunderten von Millisekunden ablaufen^{13,15,18,46}. In Abwesenheit eines Agonisten verweilt der Rezeptor in einem aktivierbaren, nichtleitenden Ruhezustand, welcher durch eine geöffnete Konformation der LBD, eine geringe Affinität für Agonisten sowie eine geschlossene Konformation des Ionenkanals charakterisiert ist^{2,7,43}. Nach konzentrationsabhängiger Bindung eines Neurotransmitters kommt es aufgrund der dadurch bereitgestellten Energie zunächst zu einer partiellen Schließung der LBD um den Liganden herum, wodurch der Übergang des Rezeptors in einen präaktiven Zwischenzustand erfolgt, in welchem der Ionenkanal weiterhin geschlossen vorliegt^{2,9,47}. Innerhalb dieses instabilen Zustandes kommt es einerseits zu Spannungen innerhalb der D1-D1-Verbindungsfläche zweier LBDs sowie innerhalb der Linker, welche die D2-Domänen der LBDs mit dem Ionenkanal verbinden^{2,47}. Diese Spannungen führen entweder zu Umlagerungen der Transmembranhelices, sodass der Ionenkanal für den einwärtsgerichteten Stromfluss geöffnet wird (Aktivierung), oder zu Umlagerungen der Dimer-Verbindungsfläche, wodurch der Kontakt zwischen den beiden D1-Domänen unterbrochen wird, was darin resultiert, dass die geschlossene Konformation des Ionenkanals beibehalten wird und der Rezeptor in einen aktiven, aber nichtleitenden Zustand übergeht (Desensibilisierung)^{2,43,47,48} (Abb. 3).

Die aktive Form des Rezeptors, in welchem die LBD in einem geschlossenen Zustand vorliegt, ist durch eine höhere Bindeaffinität für Agonisten verglichen mit

dem Ruhezustand sowie durch eine offene Konformation des Ionenkanals charakterisiert. In Abwesenheit eines Agonisten wird dieser Zustand mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit eingenommen⁷. Bei der Aktivierung des Rezeptors erfolgt der Klammerschluss der LBD nach Bindung eines Liganden durch eine Aufwärtsrotation der flexiblen unteren D2-Domänen um 21-26° hin zu den oberen D1-Domänen, was sowohl den Spalt zwischen D1- und D2-Domäne verkleinert als auch zu einer Separierung der D2-Domänen einzelner Untereinheiten voneinander führt^{2,6,9,18,49}. Diese Konformationsänderungen der LBDs resultieren in erheblichen strukturellen Umlagerungen der flexiblen Polypeptidlinker, welche die LBD mit den Transmembrandomänen verbinden, wodurch die Konformationsänderungen der LBD schließlich auf die TMD übertragen werden^{2,18}. Durch die Separierung der D2-Domänen werden Spannungen innerhalb der LBD-TMD-Linker erzeugt, wodurch es zu einer zunehmenden Separierung der Linker-Region kommt. Dies führt wiederum dazu, dass das M3-Helix-Bündel, welches im geschlossenen Zustand des Rezeptors hauptverantwortlich für die Blockierung des Permeationsweges für Ionen ist, auseinandergezogen und der Ionenkanal geöffnet wird^{3,6,9,16,48} (Abb. 3).

Im intakten AMPA-Rezeptor ist das Ausmaß des Klammerschlusses geringer verglichen mit der isolierten LBD, was auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass die LBD im intakten Rezeptor durch die Anbindung an den Ionenkanal in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt ist^{3,48}. Bei AMPA-Rezeptoren wurde zusätzlich dazu beim Aktivierungsprozess eine vertikale Kontraktion der extrazellulären Domänen (ATD und LBD) aufgrund einer Abwärtsbewegung des ATD-Tetramers beobachtet⁴⁶. Gleichzeitig kommt es zu einer Rotation der LBDs entgegen des Uhrzeigersinns und einer vertikalen Verlagerung der Untereinheiten, welche sich in einer Abwärtsbewegung der oberen Domänen äußert, was in einer Art Korkenzieherbewegung resultiert, welche wiederum die treibende Kraft für den Übergang von der geschlossenen zur aktiven Konformation des Rezeptors darstellt⁴⁶. Zudem weiten sich die LBD-Dimere bei Aktivierung des Rezeptors aus, indem sie sich von der zweifach symmetrischen Rotationsachse wegbewegen, was zusätzlich für Spannungen und dadurch für asymmetrische Umlagerungen innerhalb der LBD-TMD-Linker sorgt und zur Öffnung des Ionenkanals beiträgt^{2,16,46}. Obgleich die Dimer-Verbindungsfläche zwischen den „back-to-back“ angeordneten D1-Domänen der LBDs bei der Aktivierung des Rezeptors erhalten bleibt², ist es erwiesen, dass die Stabilität der Wechselwirkungen an der Dimer-Verbindungsstelle in Vollängen-iGluRs beträchtlich verringert wird, sodass es schließlich zu einer Umlagerung der Kontaktfläche kommt^{20,45,49,50}. Dies stützen

auch Untersuchungen der GluR2 LBD mittels NMR-Spektroskopie, welche bei Bindung von Agonisten erhöhte Dynamiken in Bereichen der Dimer-Verbindungsfläche zeigten, wobei in Anwesenheit von partiellen Agonisten eine größere Flexibilität als bei vollen Agonisten festgestellt wurde¹⁰. Somit ist die aktive Konformation des Rezeptors vergleichsweise instabil⁴⁹. Die Umlagerung der D1-D1-Dimerverbindungsfläche erfolgt aufgrund einer Abwärtsrotation der D1-Domänen um 14° , wodurch der Rezeptor in seinen desensitisierten Zustand, welcher durch eine geschlossene Konformation der LBD, eine höhere Bindeaffinität für Agonisten verglichen mit dessen aktivem Zustand, und einen geschlossenen Ionenkanal charakterisiert ist, übergeht^{2,7,9,18,43,45}. Durch die damit einhergehende Separierung der oberen D1-Domänen werden die D2-Domänen wiederum in räumliche Nähe zueinander gebracht, wodurch es ebenfalls zu einer Umlagerung der LBD-TMD-Linker und damit verbunden der Transmembranhelices kommt, welche eine „entspanntere“ Konformation einnehmen, wodurch der Ionenkanal wieder geschlossen vorliegt^{2,9,46,49} (Abb. 3).

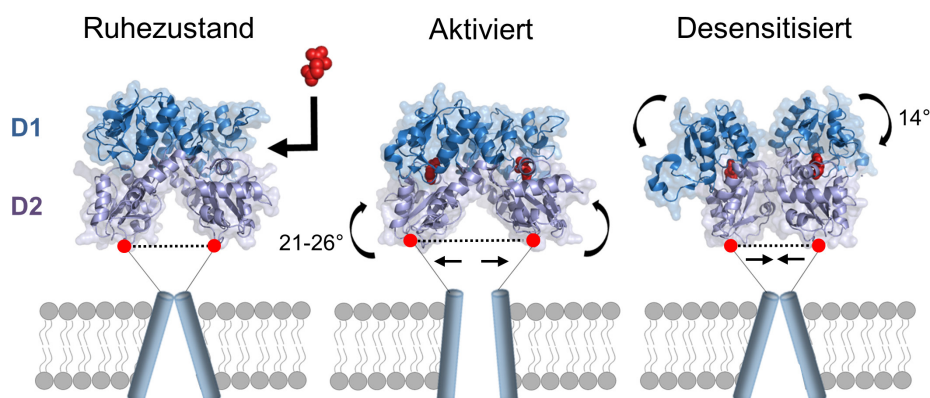


Abbildung 3: Mechanismus zum Öffnen und Schließen des Ionenkanals durch Konformationsänderungen der Ligandenbindedomänen bei der Aktivierung, Desensibilisierung und Deaktivierung von ionotropen Glutamatrezeptoren. Kristallstrukturen des GluR2 LBD-Dimers im Ruhezustand (PDB ID: 1FTO), im Glutamat-gebundenen, aktiven Zustand (PDB ID: 1FTJ) und im Glutamat-gebundenen, desensitisierten Zustand (PDB ID: 2I3V). Die LBDs nehmen dabei eine muschelschalenähnliche Struktur mit einer Ligandenbindestelle zwischen den beiden Lobes D1 (dunkelblau) und D2 (violett) ein. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist zusätzlich nur der membranständige Ionenkanal als Cartoon angezeigt. Der Agonist Glutamat ist als rote Sphären dargestellt. Bei Bindung des Glutamats schließt sich die LBD um den Agonisten herum durch eine Aufwärtsrotation der unteren D2-Domäne um $21-26^\circ$ zu der oberen D1-Domäne hin, wodurch es zu einer Separierung der unteren D2-Domänen kommt. Diese Konformationsänderung der LBDs führt zu einer Separierung der LBD-TMD-Linker und damit einhergehend zu einer Umlagerung der Transmembranhelices, wodurch der Ionenkanal geöffnet wird. Im desensitisierten Zustand wird die D1-D1-Dimerverbindungsfläche durch eine Abwärtsrotation der D1-Lobes um 14° hin zu den D2-Lobes aufgebrochen, was in einer Separierung der D1-Lobes voneinander resultiert. Dadurch treten die D2-Lobes wieder in näheren Kontakt zueinander, wodurch es zu einer erneuten Umlagerung der Transmembranhelices kommt und der Ionenkanal bei andauernder Anwesenheit des Agonisten in seinen geschlossenen, desensitisierten Zustand übergeht.

In AMPA- und Kainate-Rezeptoren kommt es durch die strukturellen Umlagerungen der LBD zusätzlich zum Verlust der zweifachen Rotationssymmetrie zwischen den LBD-Dimeren, woraufhin die LBD-Schicht eine gewissenmaßen vierfach symmetrische Anordnung annimmt, während innerhalb der ATD-Schicht eine zweifache Symmetrie beibehalten wird^{2,46}. Dadurch passt sich die LBD-Schicht dem Ionenkanal mit einer ebenfalls vierfachen Rotationssymmetrie an, wodurch sich die Spannungen innerhalb des Rezeptors zur weiterhin zweifach symmetrischen ATD-Schicht verschieben, was wiederum Spannungen innerhalb der LBD-TMD-Linker entgegenwirkt⁴⁶.

Durch die Desensibilisierung des Rezeptors wird der Domänenschluss der LBD von der Öffnung des Ionenkanals entkoppelt, wodurch der Ionenkanal trotz andauernder Anwesenheit eines Agonisten in einem geschlossenen Zustand verweilt und es zu einer Abnahme des Stromflusses kommt^{2,9,45}. Zudem treten während der Desensibilisierung sowohl erhebliche Umlagerungen der NTDs relativ zu den LBDs als auch Bewegungen innerhalb der NTD-Schicht auf, wobei diese dennoch nicht essentiell für den Vorgang der Desensibilisierung zu sein scheinen^{15,49}. Die Energiebarriere ist für den Eintritt in den desensibilisierten Zustand höher als für die Aktivierung, wodurch der Rezeptor schneller aktiviert als desensibilisiert⁴⁵. Dennoch ist die desensibilisierte Konformation des Rezeptors der energetisch stabilste Zustand, wodurch das Gleichgewicht zwischen den Agonist-gebundenen Zuständen stark zum desensibilisierten Zustand hin verschoben ist und die Mehrheit der Glutamaterezeptoren (95-99 % aller AMPAR) wie der Großteil aller ligandengesteuerten Ionenkanäle nach einer kurzen Zeit im aktiven Zustand in den desensibilisierten Zustand wechseln^{2,7,45,50}. Zudem ist eine Wiederaktivierung in diesem Zustand nicht möglich⁷. Das Modell der Desensibilisierung wurde in zahlreichen Studien getestet, indem Mutationen zur Stabilisierung oder Destabilisierung in die Dimer-Verbindungsfläche der LBDs eingebracht wurden^{45,51-53}. Untersuchungen der isolierten LBDs sowie des Volllängenrezeptors der NMDAR-Untergruppe zeigten, dass die D1-D1-Dimerverbindungsfläche während des Übergangs in den desensibilisierten Zustand anders als bei nicht-NMDA-Rezeptoren intakt bleibt und, dass die Bindung von Agonisten die Verbindungsfläche des LBD-Heterodimers stabilisiert^{28,54}. Alles in allem wird durch die Desensibilisierung die Aktivität der iGluRs auf natürlichem Wege unterdrückt, wodurch sichergestellt wird, dass Neuronen vor den toxischen Folgen eines übermäßigen Einstroms von Calcium geschützt werden¹⁸. Nach Entlassung des Agonisten gehen die Rezeptoren wieder in den geschlossenen Zustand über (Deaktivierung)².

1.5 AMPA-Rezeptoren

AMPA-Rezeptoren sind neben den NMDA-Rezeptoren die am häufigsten auftretende Gruppe von ionotropen Glutamaterezeptoren im gesamten Nervensystem, wobei sie komplementäre Funktionen an Synapsen übernehmen¹⁹. Eine besondere Eigenschaft von AMPA-Rezeptoren, welche sie von Kainate- und NMDA-Rezeptoren unterscheidet, ist, dass alle AMPAR-Untereinheiten in zwei unterschiedlichen Versionen vorkommen, welche durch alternatives Spleißen einer 38 Aminosäure langen Kasette entstehen^{21,22,43}. Das entsprechende Segment, welches innerhalb der extrazellulären Domäne zwischen dem dritten und vierten Transmembransegment lokalisiert ist und als flip/flop-Region bezeichnet wird, hat dabei einen Einfluss auf die pharmakologischen und kinetischen Eigenschaften der Rezeptoren^{7,21}. Die beiden Isoformen der LBD, die dadurch entstehen, werden analog zu der Region als *flip* und *flop* bezeichnet und zeigen unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich Deaktivierung, Desensitisierung und Sensitivität für allosterische Modulatoren^{21,22,43}. Insbesondere hat die flip/flop-Region einen starken Einfluss auf die Rate, mit der der Rezeptor in den desensitisierten Zustand eintritt und wieder austritt, wobei die *flop*-Variante schneller desensitisiert verglichen mit der *flip*-Variante^{35,43}.

Bei AMPA- sowie auch bei Kainate-Rezeptoren kommt es zudem zu posttranslationalem RNA-Editing an der sogenannten Glutamin-Arginin-Asparagin (QRN)-Stelle, welche sich an der Spitze der wiedereintretenden Porenschleife (dem zweiten Transmembransegment (M2)) befindet. Diese ist wiederum der flip/flop-Kasette vorgeschaltet und somit in der Nähe der stärksten Verengung des Permeationsweges für Ionen lokalisiert^{21,22,43}. In der Tat scheint die QRN-Stelle einen starken Einfluss auf die Permeationseigenschaften des Ionenkanals zu haben, da AMPA-Rezeptoren, bei welchen innerhalb der GluA2-Untereinheit das Glutamin (Q) der QRN-Stelle aufgrund von RNA-Editing durch Arginin (R) ersetzt wurde, nur geringe Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen besitzen, wohingegen Rezeptoren, welche aus der unveränderten GluA2-Untereinheit bestehen, stark permeabel für Ca^{2+} sind^{22,43}. Zudem ist GluA2 innerhalb der AMPA-Rezeptoren eine dominante Untereinheit in dem Sinne, dass sie entscheidend für phänotypische Eigenschaften des Ionenkanals innerhalb heteromerer Rezeptoren ist²¹. Bei der Mehrzahl von GluA2-Untereinheiten wird durch posttranskriptionale Modifikation das Glutamin zu Arginin editiert, wodurch AMPA-Rezeptoren weitgehend impermeabel für Ca^{2+} sind^{19,43}.

Obleich isolierte LBDs in Kristallen spontan dimerisierten, bilden sie in Lösung für gewöhnlich keine Dimere aus⁵⁵. Für die Ausbildung eines stabilen Dimers zweier isolierter GluR2 LBDs in Lösung ist die Mutation des Leucin-Restes an Stelle 483 zu einem Tyrosin-Rest innerhalb der Dimer-Verbindungsfläche notwendig^{40,45,51}. Die L483Y-Punktmutation stabilisiert dabei die D1-Dimer-Verbindungsfläche um das 10⁵-fache verglichen mit dem Wildtyp-Protein (WT) der GluR2-Untereinheit ($K_d \sim 6 \text{ mM}$)⁵⁶ und bildet dadurch Dimere mit einer Dissoziationskonstante (K_d) von 30 nM in Lösung aus^{40,45}. Die Dimer-Verbindungsfläche zwischen zwei LBDs wird hierbei durch Wechselwirkungen zwischen dem Tyr483-Rest in dem einen Molekül und den Resten Leu748 und Lys752 in dem anderen Molekül stabilisiert⁴⁵. Bei Rezeptoren, welche die Mutation L483Y in ihrer Dimer-Kontaktfläche aufweisen, ist die Desensitisierung beinahe vollständig blockiert, wodurch der Rezeptor bei Glutamat-Bindung länger in einem aktiven Zustand verweilt^{40,45,51,55}. Zudem zeigt die L483Y-Mutante eine Deaktivierungsrate, welche 18-fach langsamer ist als die des WT-Rezeptors⁴⁵. Vergleichbare Effekte werden außerdem durch den positiven allosterischen Modulator Cyclothiazid (CTZ) hervorgerufen^{6,16,45,49}.

1.6 Kainate-Rezeptoren

Eine Besonderheit der Kainate-Rezeptoren, welche durch Untersuchungen mittels Kristallstrukturen festgestellt wurde, ist die Bindung von Na⁺ und Cl⁻-Ionen an allosterische Stellen innerhalb der Ligandenbindedomäne, wodurch diese die Aktivierung und Desensitisierung des Rezeptors regulieren^{5,9,57}. Dabei wird ein einzelnes Cl⁻-Ion, welches an die D1-Dimer-Kontaktfläche bindet, von einem Paar Na⁺-Ionen (eines in jeder Untereinheit) flankiert^{57,58}. Die allosterischen Anionen und Kationen stellen dabei eine erhebliche Menge an freier Energie bereit, wodurch die an sich schwache Kontaktfläche eines Dimers zweier LBDs enorm stabilisiert wird. Somit werden sowohl Anionen als auch Kationen zur Aktivierung des Rezeptors benötigt^{5,57}. Zudem haben die Ionen untereinander ebenfalls einen allosterischen Einfluss auf ihre gegenseitige Bindung⁵⁷. Hinsichtlich einer derartigen allosterischen Modulation durch Ionen sind Kainate-Rezeptoren einzigartig inmitten der ionotropen Glutamatrezeptoren⁵⁷.

Das Dimer zweier Ligandenbindedomänen der KainateR GluR6-Untereinheit wird durch die Punktmutante D776K, welche mit einem Ladungsaustausch an dieser Position einhergeht und sich im oberen Teil der Dimer-Verbindungsfläche befindet,

stabilisiert⁵⁶. Während das WT-Protein der LBD der GluR6-Untereinheit mit nur sehr geringer Wahrscheinlichkeit dimerisiert ($K_d > 8$ mM), werden Wechselwirkungen innerhalb des Dimers durch die D776K-Mutation um drei Größenordnungen stabilisiert, wobei die D776K-Mutanten mit einem K_d -Wert von $0,9 \mu\text{M}$ dimerisieren⁵⁶. Für die Stabilisierung der Dimer-Verbindungsfläche sind hierbei hauptsächlich die Wechselwirkungen, welche durch den eingebrachten Lys776-Rest zwischen den Protomeren ausgebildet werden, verantwortlich⁵⁸. Durch diese Wechselwirkungen kommt es zu einer Bewegung der LBDs um 4° entlang der Dimer-Kontaktfläche, woraus wiederum eine dichtere Anordnung der beiden Protomere im apikalen Teil des Dimers resultiert⁵⁸. Zudem trägt auch die Interaktion zwischen den Arg775-Resten der beiden Protomere, welche innerhalb der D776K-Mutante in einer antiparallel gestapelten Konformation vorliegen und dadurch Kationen- π -Wechselwirkungen ausbilden, zur Gesamtstabilität des Dimers bei⁵⁸. Obwohl die Wechselwirkung zwischen der D776K-Mutante und dem Glutamat-Liganden unbeeinflusst bleibt, wird der Eintritt in den desensitisierten Zustand infolge der Bindung eines vollen oder partiellen Agonisten gehemmt^{56,58}.

1.7 NMDA-Rezeptoren

Inmitten aller Arten von ionotropen Glutamatrezeptoren nimmt die Untergruppe der NMDA-Rezeptoren eine einzigartige Stellung ein. Eine Voraussetzung für die Aktivierung dieser iGluR-Untergruppe ist die gleichzeitige Bindung von Glutamat und Glycin an jeweils zwei Untereinheiten des tetrameren Rezeptors^{7,22,34}. Alternativ werden die Rezeptoren auch durch die Bindung von NMDA anstelle von Glutamat aktiviert^{6,21}. Hierbei stellen die GluN1 und GluN3A-B-Untereinheiten die Bindestelle für Glycin und die GluN2A-D-Untereinheiten die Bindestelle für Glutamat bereit, weshalb sich innerhalb eines funktionellen NMDA-Rezeptors zwei GluN1-Untereinheiten mit zwei GluN2-Untereinheiten oder alternativ eine Kombination aus GluN2- und GluN3-Untereinheiten zusammenschließen^{7,22,34}. Da die Bindetasche innerhalb der GluN1-Untereinheit gerade groß genug für die Bindung von Glycin ist, wird das wesentlich größere Glutamat aufgrund sterischer Effekte als Agonist für die Bindetasche dieser Untereinheit ausgeschlossen^{16,34}. Demnach bindet Glycin ausschließlich an die GluN1-Untereinheit und Glutamat ausschließlich an die GluN2-Untereinheit, womit für die Aktivierung beide Untereinheiten innerhalb eines Rezeptors benötigt werden^{7,21}. Im Falle eines Zusammenschlusses der GluN1- und GluN3-Untereinheiten können allerdings auch Ionenkanäle ausgebildet werden, welche

ausschließlich durch Glycin aktivierbar sind^{34,43}. Innerhalb eines tetrameren Rezeptors kontrollieren die unterschiedlichen GluN2-Untereinheiten die pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptors wie beispielsweise die Blockierung des Kanals durch Magnesium-Ionen, die Affinität für den Coagonisten Glycin und die Leitfähigkeit des Ionenkanals^{19,21,28,43}. NMDA-Rezeptoren sind permeabel für Ca^{2+} , wobei eine Reihe saurer Reste innerhalb der M3-S2-Linker der GluN1-Untereinheiten – das so genannte DRPEER-Motiv – welches nach der Sequenz der Aminosäuren benannt ist, die Permeation von Ca^{2+} -Ionen reguliert^{3,19,23}. Zudem sind die Transmembrandomänen von NMDA-Rezeptoren spannungsabhängig durch Mg^{2+} -Ionen blockiert³. Da die Aktivierung der AMPA-Rezeptoren durch Glutamat an der postsynaptischen Membran vergleichsweise schnell erfolgt, werden die wesentlich langsamer aktivierenden NMDA-Rezeptoren als Folge der daraus hervorgerufenen Depolarisierung des postsynaptischen Potentials von ihrer Magnesium-Blockade befreit und können anschließend in ihren aktiven Zustand übergehen^{34,42}. Während die AMPA-Rezeptoren daraufhin schnell ihren desensitisierten Zustand einnehmen, bleiben die Ionenkanäle der NMDA-Rezeptoren weiterhin geöffnet⁴². Eine derartige Voraussetzung simultan auftretender chemischer und elektrischer Impulse für die Aktivierung unterscheidet NMDAR von AMPAR und KainatR³⁴.

Eine weitere Eigenschaft der NMDA-Rezeptoren, welche sie von nicht-NMDA-Rezeptoren unterscheidet, ist die Regulierung des Ionenkanals durch die direkte Bindung endogener Liganden wie Polyamine, Protonen und Zn^{2+} oder synthetischer Liganden wie Ifenprodil an ihre aminoterminalen Domäne^{3,9,28}. Durch die Bindung von Zn^{2+} und Ifenprodil an die ATD werden dabei negative allosterische Effekte hinsichtlich der Funktion des Rezeptors hervorgerufen, während Polyamine als positive allosterische Modulatoren wirken und die Funktion des Rezeptors verstärken⁹. Eine derartige allosterische Kooperativität zwischen den extrazellulären ATDs und LBDs ist einzigartig für NMDA-Rezeptoren²⁸. Damit einhergehend liegen die ATDs und LBDs innerhalb der NMDA-Rezeptoren wesentlich näher beieinander, wodurch sie in engerem Kontakt zueinander stehen, was wiederum die effiziente Übertragung von Konformationsänderungen der ATD auf die LBD und umgekehrt ermöglicht^{3,9,23}. In nicht-NMDA-Rezeptoren hingegen befinden sich ATDs und LBDs in zu großer räumlicher Distanz, als dass sie ihre Konformationen oder die Anordnung ihrer Untereinheiten gegenseitig beeinflussen könnten^{3,9}. Die Vermittlung allosterischer Effekte innerhalb der NMDAR wird darüber hinaus auch durch die Ausbildung vergleichsweise schwacher Dimere zwischen den ATDs ermöglicht, wodurch die Schließung der R1-R2-Klammer infolge der Bindung von negativen allosterischen Modulatoren begünstigt wird, was wiederum zu einer Separierung der unteren R2-

Lobes führt^{9,22,28}. Die Spannung, welche dadurch über den ATD-LBD-Linker auf die LBD-Dimere übertragen wird, wodurch diese voneinander getrennt werden, führt schließlich zur Inhibierung des Ionenkanals⁹. Innerhalb der nicht-NMDA-Rezeptoren ist die Verbindungsfläche zwischen den ATDs innerhalb eines Dimers wesentlich stabiler⁹. Durch positive allosterische Modulatoren hingegen wird die offene Konformation der ATDs stabilisiert und der Ionenkanal in einer offenen Konformation gehalten⁹. Alles in allem stellen die ATDs von NMDA-Rezeptoren Bindestellen für Ionen und Moleküle dar und spielen eine zentrale Rolle bei der allosterischen Modulation der Aktivität des Rezeptors^{9,15,19,22}.

Um eine Dimerisierung der isolierten LBDs der GluN1 und GluN2A-Untereinheiten in Lösung zu erreichen, brachte die Gruppe um Furukawa et al., analog zu der L483Y-Mutation in AMPA-Rezeptoren Tyrosin-Reste an entsprechenden Stellen in die LBDs der NMDAR-Untereinheiten ein⁵⁹. Hierbei wurde das Asparagin (N) an Stelle 521 in der LBD der GluN1-Untereinheit zu Tyrosin mutiert (N521Y) und der Glutaminsäure-Rest (E) an Position 516 in der LBD der GluN2A-Untereinheit ebenfalls durch Tyrosin ersetzt (E516Y), was schließlich in der Ausbildung eines Heterodimers durch hydrophobe Wechselwirkungen sowie Kation- π -Wechselwirkungen, ähnlich denen in der L483Y-Mutante, resultierte⁵⁹.

Zudem wurde ein Tyrosin-Rest an Position 535 innerhalb der Dimer-Verbindungsfläche der GluN1-Untereinheit, welcher als endogener allosterischer Modulator wirkt, als ein Grund für die langsame Deaktivierung von NMDA-Rezeptoren identifiziert^{16,59}. Die aromatische Seitenkette des Y535-Restes, welche sich in der Gelenkregion der LBD-Muschelschale der GluN1-Untereinheit befindet, bindet in eine vorwiegend hydrophobe Tasche an die Gelenkregion der LBD der GluN2A-Untereinheit, wodurch die aktivierte Glutamat-gebundene Konformation stabilisiert und die Deaktivierung verlangsamt wird⁵⁹. Aufgrund von Kristallstrukturen wurde beobachtet, dass es dabei zu Van-der-Waals-Wechselwirkungen des planaren aromatischen Rings des Y535-Restes mit konservierten Prolin-Resten (P532 in GluN1 und P527 in GluN2A) kommt⁵⁹. Da in AMPA-Rezeptoren der analoge Rest ein Serin ist und die Rate der Deaktivierung über zwei Größenordnungen höher ist verglichen mit der eines GluN1-GluN2A-Rezeptors, wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Größe und Form des Restes an dieser Position für die Modulierung der Deaktivierungsrate verantwortlich ist⁵⁹. Tatsächlich wurde beobachtet, dass die Mutation des Y535-Restes zu Alanin (A) oder Serin (S) in einer Erhöhung der Deaktivierungsrate um das fünf- bis siebenfache resultierte, welche auch teilweise dadurch zustande kommt, dass die Mutante eine geringere Affinität für Glycin aufweist verglichen mit dem WT-Protein⁵⁹.

1.8 Bindung von vollen und partiellen Agonisten

Mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen ionotroper Glutamatrezeptoren kann zum einen die Zeit, die der Ionenkanal in einem offenen Zustand verbringt, bestimmt und zum anderen die Amplitude des maximalen Stroms, welcher über den Ionenkanal fließt, gemessen werden^{6,16}. Hinsichtlich der Wirkungsweise von Agonisten wird zwischen der „Affinität von Agonisten“ bei der Bindung an die Ligandenbindedomäne des Rezeptors und der „Effizienz von Agonisten“ bei der anschließenden Aktivierung des Rezeptors unterschieden²⁰. Unterschiede in der Affinität zwischen Liganden werden in der Regel durch Unterschiede in der Dissoziationskonstante (K_d) widerspiegelt, da Liganden mit geringer Affinität schneller aus der Bindetasche dissoziieren als Liganden mit hoher Affinität⁴⁴. Hingegen äußert sich die Effizienz eines Agonisten durch das Ausmaß der Reaktion des Rezeptors infolge der Bindung des Liganden⁹. Auf dieser Grundlage wird zwischen vollen Agonisten, welche eine maximale Aktivierung des Ionenkanals erzielen, und partiellen Agonisten, welche auch in Sättigungskonzentration nur eine submaximale Reaktion des Rezeptors hervorrufen, unterschieden^{6,9,16}. Obwohl partielle Agonisten in der Lage sind, dieselben Leitfähigkeitsniveaus hervorzurufen wie volle Agonisten, besetzen sie diese mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten und aktivieren den Ionenkanal vorwiegend bei den niedrigeren Leitfähigkeitsniveaus^{9,20}.

Auch wenn der Mechanismus hinter der Funktionsweise partieller Agonisten bisweilen nicht vollständig verstanden ist, gibt es drei Modelle, welche eine potentielle Wirkungsweise dieser Art von Agonisten beschreiben. Nach dem so genannten Koshland-Nemethy-Filmer (KNF)-Modell durchläuft der Rezeptor eine Reihe sequentiell ablaufender, nicht aufeinander abgestimmter Veränderungen, wobei unterschiedliche Liganden unterschiedliche, spezifische Konformationszustände hervorrufen^{20,60}. Auf Grundlage elektrophysiologischer Untersuchungen in Kombination mit Kristallstrukturen wird basierend auf diesem Modell vermutet, dass die Effizienz von Agonisten direkt abhängig von dem Ausmaß ist, in dem die Ligandenbindedomäne bei Bindung des Agonisten schließt^{16,20,33,61}. Es wird angenommen, dass die Bindung von partiellen Agonisten ein geringeres Maß des Klammerschlusses der LBD verursacht verglichen mit vollen Agonisten, was zur Folge hat, dass eine Umlagerung der Transmembranhelices durch partielle Agonisten weniger häufig oder in geringerem Ausmaß erzielt wird, wodurch eine Öffnung des Ionenkanals mit wesentlich geringerer Wahrscheinlichkeit herbeigeführt

wird^{20,30,33,49,58,61}. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Untersuchung einer Reihe von Derivaten des aus den Gewächsen *Acacia willardiana* und *Mimosa asperata* stammenden chemischen Verbindung Willardiin, bei denen mit zunehmender Größe des Substituenten an fünfter Stelle das Ausmaß des Klammerschlusses der LBD aufgrund sterischer Effekte variiert, wobei eine Zunahme der Größe des Substituenten zu einer Zunahme der Spaltöffnung zwischen Lobe 1 und Lobe 2 der LBD führt²⁰. Obwohl die verschiedenen Willardiin-Varianten ähnliche Wechselwirkungen mit dem Rezeptor aufweisen und ihre Bindung der von Glutamat gleicht, rufen sie unterschiedliche Konformationszustände der LBD hervor, welche wiederum direkt mit dem Ausmaß der Aktivierung und Desensibilisierung des Rezeptors verbunden sind²⁰. Willardiine sind daher partielle Agonisten, welche eine offenere Konformation der LBD stabilisieren²⁰. Die Vermutung, dass der Grad des Klammerschlusses abhängig vom gebundenen Liganden ist, stützen zudem auch Kristallstrukturen der Ligandenbindedomäne der GluR2-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors im Komplex mit den vollen Agonisten AMPA, Quisqualat, und Glutamat, wobei ein Domänenschluss von ca. 20 ° relativ zum Apo-Zustand beobachtet wurde, wohingegen die Bindung des partiellen Agonisten Kainate einen Domänenschluss von lediglich 12 ° verursacht^{33,40,62}. Im Falle des schwachen partiellen Agonisten Kainate kommt es zu einer sterischen Hinderung zwischen der Isopropenylgruppe des Liganden und der Leu650-Seitenkette der LBD der GluR2-Untereinheit, welche die Schließung der Ligandenbindedomäne verhindert^{33,63}. Durch eine Umorientierung des Lobe 2 in der Kainate-gebundenen Konformation der LBD wird die Spalte zwischen den beiden Lobes geöffnet, wodurch ein sterischer Zusammenstoß vermieden wird^{33,63}. Weiterhin zeigten Untersuchungen mittels FRET, dass eine vollständige Schließung der LBD in Anwesenheit des vollen Agonisten Glutamat und eine unvollständige Schließung der Muschelschale bei Bindung des partiellen Agonisten Kainate auch in einem Konstrukt auftritt, welches einem voll funktionsfähigen AMPA-Rezeptor entspricht¹⁷. Dieses Modell hält allerdings nicht immer stand, da bei der GluN1-Untereinheit von NMDA-Rezeptoren kein wesentlicher Unterschied des Klammerschlusses der LBD bei der Bindung an volle Agonisten wie Glycin oder D-Serin verglichen zu der Bindung an partielle Agonisten wie D-Cycloserin festgestellt werden konnte^{9,22,34}. Der partielle Agonist D-Cycloserin bindet nicht so stark wie die vollen Agonisten an die Ligandenbindespalte, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass partielle Agonisten die geschlossene Konformation der LBD und somit die aktive Form des Ionenkanals in geringerem Ausmaß stabilisieren³⁴. Hingegen wurden im Falle der GluN2A-Untereinheit wiederum Unterschiede beim Klammerschluss zwischen vollen und partiellen Agonisten beobachtet⁹.

Daher besteht eine alternative Theorie, die besagt, dass die Stabilität der geschlossenen Konformation der LBD die Effizienz von Agonisten bestimmt^{4,47,64}. Diese Theorie basiert auf dem so genannten Monod-Wyman-Changeux (MWC)-Modell, welches besagt, dass volle und partielle Agonisten dieselben Konformationszustände annehmen können, wobei allerdings partielle Agonisten das Gleichgewicht weniger effizient vom inaktiven Rezeptor hin zu einem aktiven Zustand verschieben als es volle Agonisten tun^{20,65}. Durch leicht unterschiedliche Wechselwirkung verschiedener Liganden innerhalb der Ligandenbindespalte wird möglicherweise die Stabilität der geschlossenen Konformation der LBD beeinflusst, welche wiederum einen wesentlichen Einfluss auf die Rate, mit der der Agonist dissoziiert (Affinität des Agonisten), und somit auf die Deaktivierungskinetiken des Ionenkanals hat^{4,66,67}. Die Stabilität der gebundenen, geschlossenen Konformation ist dabei positiv korreliert mit der Wirksamkeit von Agonisten⁶⁶. Mittels Einzelmolekül-FRET (engl. single-molecule FRET, smFRET)-Experimenten wurde gezeigt, dass die LBD in ihrem geschlossenen Zustand eine Reihe von Konformationen annehmen kann⁶⁸. Somit hängt das Ausmaß der Aktivierung des Ionenkanals und die damit einhergehende Effizienz des Agonisten von der Wahrscheinlichkeit ab, mit der die LBD-Muschelschale eine maximal geschlossene Konformation annimmt und stabilisiert^{18,47}. (S)-Quisqualsäure, welches aus den Samen von *Quisqualis indica* und *Quisqualis fructus* gewonnen wird, wirkt als Anthelminthikum und ist eine exzitatorische α -Aminosäure, welche an der γ -Position einen 1,2,4-Oxadiazol-Ring anstelle der Carboxylatgruppe des Glutamats besitzt⁶². Quisqualat ist ein wirksamerer Agonist als Glutamat, da es eine höhere Affinität für die GluR2-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors besitzt, wodurch der Komplex aus Agonist und Rezeptor stabiler ist als der mit Glutamat, weshalb der Ionenkanal in Anwesenheit von Quisqualat sechsmal langsamer schließt als in Anwesenheit von Glutamat⁶². Zum anderen bindet und aktiviert Quisqualat den GluR2-Rezeptor bei Konzentrationen, welche 10-fach geringer sind als die Glutamatkonzentration, welche für eine vergleichbare Bindung und Aktivierung benötigt wird ($EC_{50} = 1,2 \mu\text{M}$ für Quisqualat; $EC_{50} = 20 \mu\text{M}$ für Glutamat). Demnach ruft Quisqualat ebenso wie Glutamat eine maximale Aktivierung des Rezeptors hervor und gilt somit als voller Agonist für AMPA-Rezeptoren⁶². Obwohl Glutamat der physiologische Agonist für AMPA-Rezeptoren ist, zeigt auch der synthetische Agonist AMPA eine wesentlich höhere Affinität für die GluR2-Untereinheit⁴².

Darüber hinaus kommt es bei Bindung eines vollen Agonisten wie Glutamat, AMPA oder Quisqualat an die AMPAR GluR2 LBD zu einer Drehung der *trans*-Peptidbindung zwischen den Resten Asp651 und Ser652 um 180° verglichen mit der

LBD in ihrer Apo-Konformation oder an partielle Agonisten gebunden^{30,62}. Diese lokale Konformationsänderung innerhalb der Agonist-Bindestelle resultiert in der Ausbildung zweier zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Lobes quer über die Bindspalte der LBD, welche die LBD in ihrer geschlossenen Konformation stabilisiert^{30,33,62,69}. In der GluR5-Untereinheit eines Kainate-Rezeptors nimmt die entsprechende Peptidbindung zwischen den Resten Arg686 und Asp687 ebenfalls eine gedrehte Konformation an³¹. Des Weiteren wird eine Korrelation zwischen der Drehung der Peptidbindung und dem Grad der Schließung der LBD vermutet^{31,62}.

Einem dritten Modell zufolge befinden sich Ligandenbindedomänen, welche partielle Agonisten gebunden haben, möglicherweise in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen zwei oder mehr Konformationen, wobei für die Aktivierung des Ionenkanals die vollständig geschlossene Konformation eingenommen werden muss⁶⁴. Diese Theorie wird aufgrund der Beobachtung einer Reihe unterschiedlicher Grade der Schließung der LBD bei Bindung eines partiellen Agonisten wie Iodowillardiin mittels NMR-Spektroskopie-Messungen⁷⁰ sowie Kristallographie²⁰ unterstützt. Dabei zeigen die Kristallstrukturen lediglich einige unterschiedliche Konformationen innerhalb der Vielzahl an strukturellen Zuständen, welche die LBD annimmt⁷⁰. Auch Molekulardynamik-(MD)-Simulationen zeigten, dass die Bindung eines vollen Agonisten die D2-Domäne der LBD in stärkerem Maße immobilisiert als es die Bindung eines partiellen Agonisten tut²⁹. Untersuchungen der Willardiin-Derivate mittels NMR-Spektroskopie deuten darauf hin, dass durch Bindung von partiellen Agonisten verstärkte Dynamiken im μs -ms-Bereich auftreten, die nicht nur mit spezifischen Bewegungen innerhalb der Ligandenbindestelle zusammenhängen, sondern auch mit umfassenden Bewegungen der beiden Lobes zueinander verbunden sind, welche wiederum einen Einfluss auf den Mechanismus der Aktivierung des Ionenkanals haben^{10,69,71}.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Fluoreszenzlöschung durch den photoinduzierten Elektronentransfer (PET)

Der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) ist ein photochemischer Prozess, bei welchem es zur Löschung der Fluoreszenzemission durch einen Ladungstransfer zwischen einem Fluorophor (F) und einem Löschmolekül (Q) kommt. Für eine effiziente Löschung der Fluoreszenz mittels PET müssen Fluorophor und Löschmolekül in Van-der-Waals-Kontakt treten⁷², was üblicherweise mit einem Abstand von ≤ 1 nm erfolgt. Dabei finden ein Elektronentransfer und die damit einhergehende Löschung der Fluoreszenz nur statt, wenn das Oxidations- und Reduktionspotential von Fluorophor und Löschmolekül zusammenpassen. Abhängig davon fungiert der Fluorophor als Donor, welcher Elektronen abgibt, und das Löschmolekül als Akzeptor, welcher Elektronen aufnimmt, oder umgekehrt. Durch die Übertragung von Elektronen zwischen Donor und Akzeptor kommt es zu einer Ladungstrennung, wodurch die Ausbildung eines Radikationenpaares ($A^- D^+$) erfolgt, welches anschließend mittels Ladungsrekombination strahlungsfrei in den Grundzustand zurückkehrt (Abb. 4). Unter allen natürlich vorkommenden Bausteinen von Proteinen und Nukleinsäuren besitzen nur die aromatische Aminosäure Tryptophan (Trp) und die Nukleinbase Guanin (G) ein Oxidationspotential, das niedrig genug ist, um als effizienter Elektronendonator innerhalb der PET-Reaktion zu fungieren⁷². Grundsätzlich findet PET zwischen Fluorophoren und planaren, aromatischen Ringsysteme statt, wobei der Indolring des Tryptophans und das Pyrimidin-Imidazol-Ringsystem, welches im Guanin vorhanden ist, ein solches darstellen (Abb. 4). PET-Reaktionen sind extrem schnell, wobei sie auf einer Zeitskala von Femtosekunden (fs) bis Pikosekunden (ps) ablaufen. Um die Effizienz der photoinduzierten Ladungstrennung zu berechnen, kann mit Hilfe der Rehm-Weller-Gleichung die damit verbundene Änderung in der freien Energie ΔG_{cs} bestimmt werden:

$$\Delta G_{cs} = E_{ox} - E_{red} - E_{0,0} + C \quad [1]$$

wobei E_{ox} und E_{red} jeweils das erste Oxidationspotential des Donors und das erste Reduktionspotential des Akzeptors in Lösung, $E_{0,0}$ die Energie des Übergangs in den niedrigsten angeregten Singulettzustand und C die vom Lösungsmittel abhängige Coulomb-Wechselwirkungsenergie, welche in mäßig polarer Umgebung vernachlässigt werden kann, beschreiben.

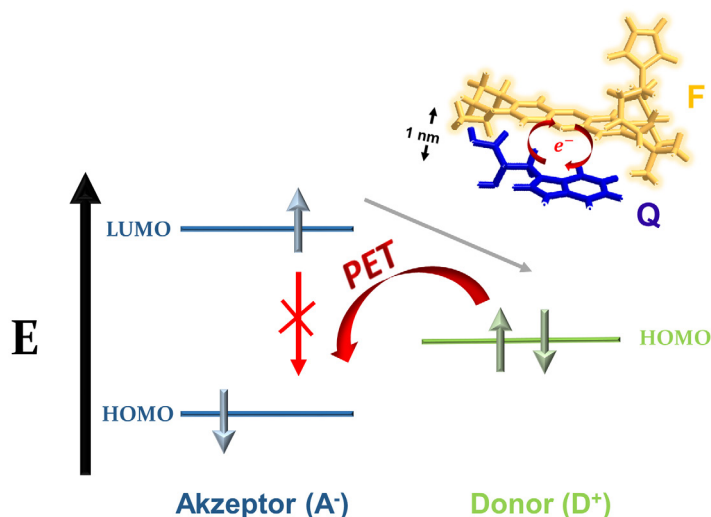


Abbildung 4: Mechanismus des photoinduzierten Elektronentransfers (PET). Vereinfachte Darstellung des reduktiven Elektronentransfers zwischen einem Fluoreszenzfarbstoff (gelb) und der Aminosäure Tryptophan (blau). Aufgrund von Oxidations- bzw. Reduktionspotentialen fungiert das Tryptophan als Elektronendonator und der Fluorophor als Elektronenakzeptor. Nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge wird ein Elektron aus dem Grundzustand (engl.: highest occupied molecular orbital (HOMO)) des Fluorophors in dessen angeregten Zustand (engl.: lowest unoccupied molecular orbital (LUMO)) angehoben. Bevor das Elektron unter Emission eines Photons (Fluoreszenz) in den Grundzustand des Fluorophors zurückkehren kann, wird ein Elektron aus dem Grundzustand des Tryptophans auf den Grundzustand des Fluorophors übertragen, wodurch dieser vollständig besetzt vorliegt. Das Elektron im angeregten Zustand kann nicht mehr in den Grundzustand zurückfallen, wodurch die Fluoreszenz gelöscht wird. Stattdessen geht das angeregte Elektron strahlungslos in den Grundzustand des Tryptophans über (grauer Pfeil)⁷³.

Die Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Löschmolekül kann entweder „dynamisch“ oder „statisch“ sein. Bei einer Kollisionslöschung des Fluorophors kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer sowie der Fluoreszenzintensität („dynamische Löschung“), wohingegen die Ausbildung eines Komplexes zwischen Fluorophor und Löschmolekül eine effiziente „statische Löschung“ zur Folge hat, bei welcher keinerlei Änderung der Fluoreszenzlebensdauer eintritt⁷⁴.

2.2 Messmethoden

2.2.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

In den vergangenen Jahrzehnten hat die Entwicklung neuer Techniken zur Detektion und Analyse einzelner Moleküle gänzlich neue Möglichkeiten in vielen Forschungsbereichen eröffnet. Im Gegensatz zu Methoden, bei welchen zeitgleich eine Vielzahl (Millionen bis Milliarden) an Teilchen gemessen werden, können mittels Einzelmolekülexperimenten Informationen über Verteilungen und zeitliche Abläufe gewonnen werden, welche andernfalls in statistischen Mittelwerten untergehen würden^{74,75}. Mit Hilfe von Einzelmolekülexperimenten ist es möglich, sich verändernde Systeme unter Gleichgewichtsbedingungen zu untersuchen, wodurch Einblicke in einzelne Schritte oder Zwischenprodukte (bio)chemischer Reaktionen gewährt werden. Darüber hinaus lassen sich aus einer heterogenen Population von (Bio-)Molekülen unterschiedliche Subpopulationen identifizieren, klassifizieren und quantitativ vergleichen, wodurch individuelles statisches oder dynamisches Verhalten ersichtlich wird⁷⁵.

Eine solche Einzelmolekültechnik ist die so genannte Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl. fluorescence correlation spectroscopy (FCS)), bei welcher Schwankungen des Fluoreszenzsignals beobachtet und über die Zeit analysiert werden⁷⁴⁻⁷⁶. Obwohl die FCS-Methode bereits in den frühen 1970er Jahren entwickelt wurde, verzögerte sich ihre praktische Anwendung aufgrund experimenteller Schwierigkeiten bis in die 90er Jahre^{75,77,78}. Das Prinzip von FCS basiert darauf, dass Zeitspuren der Fluoreszenzintensität von Molekülen, welche aufgrund der Brownschen Molekularbewegung durch ein räumlich definiertes Anregungs- bzw. Detektionsvolumen diffundieren, erfasst und analysiert werden^{74,79}. Da der Großteil der biologisch relevanten Moleküle nicht von selbst fluoreszieren, ist eine notwendige Voraussetzung, solche Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren bevor sie untersucht werden können. Dafür können autofluoreszierende Proteine, wie zum Beispiel GFP (green fluorescent protein) aus der Qualle *Aequorea victoria*, genutzt werden, die durch gentechnische Verfahren in das zu untersuchende Protein eingebaut werden⁸⁰. Da allerdings alle bisher bekannten autofluoreszierenden Proteine eine beträchtliche Größe (~ 27 kDa) aufweisen, stellen die im Vergleich dazu sehr kleinen organischen Fluorophore (~ 1 kDa) wie Fluorescein und Rhodamine sowie deren verbesserte Derivate⁸⁰ oder auch synthetische Farbstoffe wie Alexa-, ATTO-, und

Cyaninfarbstoffe^{74,81} eine geeignete Alternative dar. Die besten Voraussetzungen für die Durchführung von Fluktuationsanalysen sind gegeben, wenn das zu beobachtende System auf eine geringe Anzahl an Teilchen beschränkt ist und die Hintergrundfluoreszenz effizient minimiert wird. Diese beiden Kriterien können durch eine Kombination aus sehr geringen Probenkonzentrationen und einem sehr kleinen Messvolumen erreicht werden⁷⁵. Dies konnte durch die Kombination von FCS mit einem konfokalen Mikroskop erzielt werden, wodurch die Empfindlichkeit der Technik Einzelmolekülniveau erreichte^{82,83}, weshalb für FCS-Experimente mittlerweile standardmäßig ein konfokales Mikroskop verwendet wird⁷⁹. Das Beobachtungsvolumen, welches definiert ist als das räumliche Anregungs- und Detektionsvolumen und in Bezug auf seine Größe im Subfemtoliter-Bereich ($< 10^{15}$ l) liegt, entsteht durch die Fokussierung eines Laserstrahls auf einen beugungsbegrenzten Punkt durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur ($NA > 0.9$)^{75,76,79}. Zusätzlich kommt es zu einer axialen Beschränkung des Detektionsvolumens durch eine Lochblende, welche sich im Emissionsweg befindet, wodurch die axiale Auflösung verbessert wird^{75,79}. Während eines FCS-Experiments befindet sich nur eine geringe Anzahl von Molekülen (1-100) zur selben Zeit im Detektionsfokus, wodurch üblicherweise Proteinproben mit Konzentrationen von Pikomolar (pM) bis Nanomolar (nM) eingesetzt werden⁷⁴⁻⁷⁶. Die stochastischen Fluktuationen des Fluoreszenzsignals entstehen dadurch, dass Moleküle in das fokale Detektionsvolumen hinein- und wieder herausdiffundieren^{72,74,76,79} und werden bei gleichbleibender Anregungsleistung als Abweichung vom durchschnittlichen Signal über die Zeit beschrieben⁸¹:

$$\begin{aligned}\delta F(t) &= F(t) - \langle F(t) \rangle \\ \langle F(t) \rangle &= \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt\end{aligned}\quad [2]$$

wobei $\delta F(t)$ die Schwankungen des Fluoreszenzsignals, $F(t)$ das Fluoreszenzsignal zu einem Zeitpunkt t , $\langle F(t) \rangle$ das durchschnittliche Fluoreszenzsignal über die Zeit und T die Datenakkumulationszeit beschreibt. Der Faktor $1/T$ normiert den Wert des Produktes $F(t)$ für die Datenakkumulationszeit⁷³.

Dabei wird das Signal der Fluoreszenzfluktuationen eines bestimmten Moleküls zu einem bestimmten Zeitpunkt (t) mit sich selbst zu einem späteren Zeitpunkt ($t + \tau$) korreliert, wodurch die Selbstähnlichkeit eines Signals geprüft wird, was wiederum die Wahrscheinlichkeit widerspiegelt, dass das Signal zu unterschiedlichen

Zeitpunkten nach wie vor zum selben molekularen Ereignis gehört^{76,79}. Auf Grundlage dieser Korrelationsanalyse wird die so genannte Autokorrelationskurve berechnet, welche durch die Autokorrelationsfunktion (engl. autocorrelation function (ACF)) $G(\tau)$ beschrieben wird⁷⁶:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{I(t)^2} \quad [3]$$

wobei $I(t)$ die Fluoreszenzintensität zu einem Zeitpunkt t , $I(t + \tau)$ dieselbe Fluoreszenzintensität nach einer zeitlichen Differenz von τ und $\langle \rangle$ das zeitliche Mittel über den gesamten Beobachtungszeitraum beschreibt⁷⁴. Die Diffusion von Teilchen durch den Laserfokus resultiert in einem Abfall der Autokorrelationsfunktion (ACF) mit einer charakteristischen Zeitkonstante τ_D , was der experimentellen Diffusionszeit entspricht, welche die Zeit widerspiegelt, die das Molekül im Detektionsvolumen verbleibt^{74,79}. Für die genaue quantitative Bestimmung von Parametern ist die Annäherung der experimentell bestimmten Autokorrelationskurve durch eine Modellfunktion – die Korrelationsfunktion – notwendig⁷⁹. Der genaue Ausdruck der Korrelationsfunktion hängt dabei sowohl von der Form des Detektionsvolumens als auch von der molekularen Ursache der Fluktuationen der Fluoreszenzintensität ab⁷⁹. Eine geeignete Annäherung für Moleküle, welche frei durch ein konfokales Detektionsvolumen diffundieren, ist ein dreidimensionales Gauß-Profil:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \quad [4]$$

wobei N die durchschnittliche Anzahl von Partikeln im Detektionsvolumen, τ_D die Diffusionszeit, τ die Korrelationszeit und S den Formfaktor des Detektionsvolumens beschreibt^{79,80,83}. Die Diffusionszeit τ_D befindet sich typischerweise in der Größenordnung von 1 ms, wobei sie neben der Größe des Beobachtungsvolumens auch von der Größe und Form des Moleküls, Temperatur, sowie Viskosität der Lösung abhängig ist⁷⁴. Aus der charakteristischen Diffusionszeit kann der Diffusionskoeffizient D abgeleitet werden⁸¹. Weiterhin wird das Verhältnis des Diffusionskoeffizienten zum hydrodynamischen Radius R_h von (sphärischen) Partikeln in Lösung durch die Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad [5]$$

wobei η die Viskosität des umgebenden Mediums, T die Temperatur und k_B die Boltzmann-Konstante beschreibt^{79,80}. Der Diffusionskoeffizient ist dabei umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Radius der Partikel, welcher wiederum proportional zur Kubikwurzel der molekularen Masse eines sphärischen Partikels ist^{79,80}. Daraus ergibt sich demnach, dass eine Zunahme der Masse eines Partikels um den Faktor 8 lediglich eine Verdoppelung der Diffusionszeit zur Folge hat⁸⁰. Dadurch kann die Größe der Partikel, welche mit einer Rate von $k_d = 1/\tau_D$ in das Beobachtungsvolumen hinein- und wieder herausdiffundieren⁷⁶, bestimmt werden^{79,80}. FCS erfasst dabei Zeitskalen von mehreren Submikrosekunden bis zu mehreren hunderten von Millisekunden⁸¹. Nimmt die Anzahl der Moleküle im Beobachtungsvolumen zu, verringert sich der relative Einfluss eines einzelnen Moleküls auf das gesamte Fluoreszenzsignal, wodurch die Amplitude der normierten Autokorrelationskurve verringert wird⁷⁶. Die Amplitude der Autokorrelationskurve $G(0)$ ist demnach umgekehrt proportional zu der durchschnittlichen Anzahl fluoreszierender Teilchen N im Detektorvolumen V und somit zur Konzentration der fluoreszierenden Partikel C ^{76,79,80}:

$$G(0) = \frac{1}{N} = \frac{1}{VC} \quad [6]$$

Eine Schwierigkeit, welche bei FCS-Experimenten auftreten kann, ist vor allem nicht-korreliertes Hintergrundsignal, welches zu einer verringerten Amplitude der Korrelationskurve und dadurch zu einer Überschätzung der Teilchenkonzentration führt⁷⁹. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist proportional zu $\nu\sqrt{T}$, wobei ν die durchschnittliche Anzahl detektierter Photonen pro Molekül und T die Gesamtmesszeit beschreibt⁷⁴. Aus diesem Zusammenhang ergibt sich, dass eine Maximierung der Anregungsleistung wesentlich effizienter ist als eine Erhöhung der Messzeit, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern^{74,83}. Auch die irreversible photoinduzierte Zerstörung des Fluorophors (Photobleaching) kann – vor allem bei langsam diffundierenden Molekülen und einer hohen Anregungsleistung – ein Problem bei Messungen mittels FCS darstellen. Damit einhergehend können auch sehr helle Ereignisse wie Aggregate oder helle Vesikel eine Deformation der Autokorrelationskurve zur Folge haben, was die Annäherung mit einer Standardmodellfunktion deutlich erschwert⁷⁹. Um derartige Probleme und die zahlreichen experimentellen Grenzen zu überwinden, wurden bislang

Variationen der herkömmlichen FCS-Methode entwickelt, wie beispielsweise Zwei-Photonen-FCS⁸⁴, Zwei-Farben-FCS⁸⁵ oder Zwei-Fokus-FCS⁸⁶, sowie FCS mit Methoden wie STED (STED-FCS)⁸⁷ und TIRFM (TIR-FCS)⁸⁸ kombiniert. Alles in allem ist FCS eine Methode mit hoher räumlicher sowie zeitlicher Auflösung, welche die Bestimmung der lokalen molekularen Konzentration von Partikeln erlaubt^{79,80}. Potentiell lässt sich die Autokorrelationsanalyse von konventioneller FCS für jeden schnellen Prozess, durch welchen die Fluoreszenzkapazität von Molekülen beeinflusst wird, anwenden. Darunter fallen unter anderem Protonen- oder Elektronentransferreaktionen, die Bindung von Sauerstoff oder Ionen sowie der Prozess der Isomerisierung⁷⁵. Zudem wird FCS vor allem auch für Messungen des Koeffizienten der translatorischen Diffusion und damit einhergehend der Diffusionszeit verwendet, welche Informationen über Struktur und Funktion von Biomolekülen liefert^{74,79}. Darüber hinaus findet FCS hauptsächlich Anwendung bei der Untersuchung molekularer Wechselwirkungen, wie zum Beispiel denen zwischen Ligand und Rezeptor, Peptid und Liposom, sowie DNA-Primer und großen komplementären DNA- oder RNA-Strängen^{76,79,80,83}. Dabei können chemische Ratenkonstanten wie Assoziations- und Dissoziationskonstanten von Biomolekülen in unterschiedlichen Systemen sowohl *in vitro* in wässriger Lösung als auch *in vivo* im vollständigen Organismus bestimmt werden^{76,79,83}. Demnach ist auch der Nachweis viraler und bakterieller Krankheitserreger mittels FCS möglich⁷⁶.

2.2.2 PET-FCS

Fluktuationen des Fluoreszenzsignals entstehen nicht nur aufgrund von Diffusion durch den Detektionsfokus, sondern können auch durch inter-oder intramolekulare Reaktionen oder Änderung der Mikroumgebung des Fluorophors während des Aufenthalts von Partikeln im Beobachtungsvolumen hervorgerufen werden^{74,75,89,90}. Das Fluoreszenzsignal wird dabei an verschiedene Zustände eines Systems gekoppelt, wobei spontane Schwankungen innerhalb dieser Zustände Veränderungen des Fluoreszenzsignals hervorrufen^{83,89,90}. Neben molekularen Dynamiken können hierbei auch chemische oder photophysikalische Reaktionen untersucht werden, sofern die Fluktuationen des Fluoreszenzsignals, welche dadurch hervorgerufen werden, auf schnelleren Zeitskalen als die der Diffusionszeit auftreten^{76,80}. Derartige Prozesse sind unter anderem das photoinduzierte Blinken von GFP aufgrund von Protonierung^{91,92}, die Photoisomerisierung, wie sie bei

Cyaninfarbstoffen auftritt, aber auch Übergänge des Fluorophors vom emittierenden Singulett-Zustand in den nicht-fluoreszierenden Triplett-Zustand (Intersystem Crossing)^{79,83,93}.

Um Unterschiede von Abständen auf molekularer Ebene sichtbar zu machen, ist bisweilen der Förster-Resonanzenergietransfer (engl. Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET) die populärste Methode, bei welcher es zu einer strahlungsfreien Übertragung von Energie von einem Donor- auf ein Akzeptorfluorophor in einem Radius von 2 bis 8 nm kommt⁷⁴.

Darüber hinaus ist die Kombination aus PET und FCS ebenfalls eine wirksame Methode, um Gleichgewichtsdynamiken auf Einzelmolekülebene auf Zeitskalen von Nano- bis Millisekunden zu untersuchen^{74,89,90}. Innerhalb dieser von Neuweiler et al. 2002 etablierten Methode, werden durch PET schnelle, ortsspezifische Konformationsdynamiken von Peptiden, Proteinen und Nucleinsäuren in Fluktuationen des Fluoreszenzsignals umgewandelt, indem ein Fluorophor und ein Löschmolekül stellenspezifisch in das jeweilige System eingebracht werden^{74,75,89,90}. Da die Assoziation und Dissoziation von Fluorophor und Löschmolekül zu einem An- und Ausschalten der Fluoreszenz führt, können Änderungen des Abstandes der gewählten Stellen auf einer Skala von 1 nm mittels Korrelationsspektroskopie zeitlich analysiert werden^{74,81,89,90}. PET dient demnach als Reporter für schnelle, lokale Konformationsdynamiken von Biomolekülen, wobei die hohe räumliche Auflösung einen klaren Vorteil gegenüber anderen Lösprozessen darstellt^{74,89}. Da bei Proteinen die Konformationsbewegungen in großem räumlichem und zeitlichem Umfang erfolgen, ist die zeitliche Auflösung von 1 ns bei PET-FCS-Experimenten demnach hoch genug, um alle biologisch relevanten Zeitskalen zu erfassen^{74,90}. Kinetiken von Konformationsbewegungen, welche sich auf schnelleren Zeitskalen ereignen als die Diffusionszeit, äußern sich als zusätzlicher Abfall der Autokorrelationsfunktion mit einer Relaxationszeit τ_r ⁷⁴. Bei Annahme eines Zwei-Zustand-Gleichgewichtsystems enthält τ_r die mikroskopischen Ratenkonstanten der Assoziation (k_1) und Dissoziation (k_{-1})⁷⁴:

$$\tau_r = 1/(k_1 + k_{-1}) \quad [7]$$

Wie bei allen Einzelmolekülexperimenten ist die Auswahl des Fluoreszenzfarbstoffes entscheidend, da auch PET-FCS-Messungen eine bestimmte Helligkeit und Photostabilität des Fluorophors voraussetzen⁷⁴. Je nach photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors gehen Änderungen in der

Mikroumgebung mit Unterschieden der Fluoreszenzeigenschaften wie Spektrum, Quantenausbeute oder auch Lebenszeit einher⁷⁴.

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden alle Materialien sowie Methoden, welche im Rahmen dieser Arbeit zum einen zur Herstellung, Aufreinigung und Farbstoffmarkierung isolierter Ligandenbindedomänen von ionotropen Glutamatrezeptoren und zum anderen für die Probenpräparation und Datenauswertung von FCS-Messungen sowie für die Expression ionotroper Glutamatrezeptoren als intakte Vollängen-Konstrukte in Säugetierzellen verwendet wurden, aufgelistet und spezifiziert. Alle im Folgenden aufgelisteten Puffer und Medien wurden mit ddH₂O (aufgereinigt durch Barnstead™ GenPure™ Pro Water Purification System mit > 18 MOhm (Thermo Fisher Scientific)) hergestellt. Zudem wurden alle in diesem Kapitel aufgelisteten Puffer vor Verwendung durch einen 0,2 µm Zellulose-Acetat Filter (Sartorius) filtriert.

3.1 Puffer und Nährmedien

Alle Medien für Bakterien-Flüssigkulturen wurden durch Autoklavieren (121 °C, 15 min) sterilisiert.

TRIS-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer (Stock: 5x; 0,5 l)

27 g TRIS	(Sigma-Aldrich; T6066)
13,8 g Borsäure	(Merck; 10043-35-3)
10 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)	(Sigma-Aldrich; 60-00-4)

Super Optimal Broth-(SOB)-Medium (Stock 1x; 0,1 l; (pH 7,0))

0,5 g Hefeextrakt	(Melford Biolaboratories Ltd.; Y20025)
2 g Trypton	(Melford Biolaboratories Ltd.; T60065)
0,06 g NaCl	(Sigma-Aldrich; 71380)
0,02 g KCl	(Sigma-Aldrich; P9333)

Nach dem Autoklavieren 1 ml einer 2 M Mg^{2+} -Lösung, bestehend aus 1 M $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (Sigma-Aldrich; M9272) und 1 M $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Sigma-Aldrich; 63138) zugeben.

Terrific-Broth-(TB)-Medium (Stock 1x; 1 l)

24 g Hefeextrakt

12 g Trypton

4 ml Glycerol (Sigma-Aldrich; G5516)

100 ml Phosphatlösung (0,17 M Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich; 1.04873) und 0,72 M Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) (Sigma-Aldrich; 1.05104))

Luria Bertani-(LB)-Medium (Stock 1 x; 1 l; (pH 7,0))

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

LB-Agarplatten (Stock 1x; 0,5 l; (pH 7,0))

5 g Trypton

2,5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

7,5 g Agar (Sigma-Aldrich; A5306)

3.2 Herstellung von Punktmutanten homologer Ligandenbindedomänen ionotroper Glutamatrezeptoren

Die Gene für die isolierten Ligandenbindedomänen der GluR2-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors, der GluR5-Untereinheit eines Kainate-Rezeptors und der GluN1-Untereinheit eines NMDA-Rezeptors befinden sich jeweils in einem pET22b(+)-Vektor und die isolierte Ligandenbindedomäne der GluN2A-Untereinheit eines NMDA-Rezeptors befindet sich in einem pET22b(+)-Vektor mit Sumo-Fusionsprotein (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ingo Greger, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England). Einzelpunktmutationen wurden mithilfe des QuickChange-Mutageneseprotokolls (entwickelt durch Stratagene) eingebracht. Zu diesem Zweck wurden Primer-Paare, bestehend aus einem einzelsträngigen Forward-Primer und einem einzelsträngigen Reverse-Primer mit sich überschneidenden Nukleotidsequenzen, welche die einzubringende Mutation enthalten, entworfen. Alle innerhalb dieser Arbeit verwendeten Primer wurden bei Sigma-Aldrich bestellt und sind im Folgenden aufgeführt (Tab. 1).

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen der Primer zur Einbringung von Punktmutationen durch eine QuickChange-Mutagenese. f=forward, r=reverse

Mutation	Nukleotidsequenz des Primers
L483Y_f	5'-CCATTA ACTATCACTTATGTGAGAGAAGAGGTG-3'
L483Y_r	5'-CACCTCTTCTCTCACATAAGTGATAGTTAATGG-3'
K503C_f	5'-GGTTCCTGATGGCTGCTATGGAGCACAGAATGA CAAAGG-3'
K503C_r	5'-CCTTTGTCATTCTGTGCTCCATAGCAGCCATCAG GAACC-3'
K734W_f	5'-GCGCACTGGTTTGG AACAGTGACGAGG-3'
K734W_r	5'-CCTCGTCACTGTTCCAAACCAGTGCGC-3'
D791K_f	5'-CGTTAGCATTA AAAAAAAGGCCATTCCCCTCG-3'
D791K_r	5'-GCAATCGTAATTTTTTTCCGGTAAGGGGAGC-3'
A480C_f	5'-GGTGCACCTGGTGTGCGATGGCAAGTTTG-3'
A480C_r	5'-CAA ACTTGCCATCGCACACCAGGTGCACC-3'
W498F_f	5'-GGTAAACAACAGCAACAAAAAGGAGTTTAACGGA ATGATGGG-3'

3 Material und Methoden

W498F_r	5'-CCCATCATTCCGTTAAACTCCTTTTTGTTGCTGTTG TTTACC-3'
Y703F_f	5'-GGAGTTGAGTACCATGTTTCGGCACATGGAAAAA CACAATTACG-3'
Y703F_r	5'-CGTAATTGTGTTTTTCCATGTGCCGAAACATGG TACTCAACTCC-3'
Y711F_f	5'-GCACATGGAAAAACACAATTTTGAGAGCGCAGCT GAGG-3'
Y711F_r	5'-CCTCAGCTGCGCTCTCAAATTTGTGTTTTTCCATGT GC-3'
W731F_f	5'-GCACGCCTTTATCTTTGACTCGGCCGTGC-3'
W731F_r	5'-GCACGGCCGAGTCAAAGATAAAGGCGTGC-3'
N521Y_f	5'-CCACTGACCATCAACTATGAGCGTGCGC-3'
N521Y_r	5'-GCGCACGCTCATAGTTGATGGTCAGTGG-3'
Y535S_f	5'-GCCCTTCAAGTCTCAGGGCCTGACC-3'
Y535S_r	5'-GGTCAGGCCCTGAGACTTGAAGGGC-3'
T481C_f	5'-CCTCTACCTGGTGTGCAATGGGAAGCATGG-3'
T481C_r	5'-CCATGCTTCCCATTGCACACCAGGTAGAGG-3'
E521Y_f	5'-GCTCACTCACCATCAATTATGAGCGTTCGG-3'
E521Y_r	5'-CCGAACGCTCATAATTGATGGTGAGTGAGC-3'
K487TAG_f	5'-GGAGGATGGGTAGTATGGAGCCCAGG-3'
K487TAG_r	5'-CCTGGGCTCCATACTACCCATCCTCC-3'
K719W_f	5'-CAGTCTGTGCTTGTCTGGAGCAATGAGGAAGG-3'
K719W_r	5'-CCTTCCTCATTGCTCCAGACAAGCACAGACTG-3'

Der Reaktionsansatz für die QuickChange-Mutagenese wurde wie im Folgenden beschrieben hergestellt (Tab. 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine PCR-Reaktion nach dem QuickChange-Mutageneseprotokoll mit einem Gesamtvolumen von 50 µl.

Bestandteile	50 µl Reaktionsansatz	Endmenge/- konzentration
5x Reaction Buffer (New England Biolabs® Inc.; M0491S)	10 µl	1 x
dNTPs (25 mM) (Sigma-Aldrich; D7295)	1 µl	500 µM
Template DNA	variabel	75 ng

3 Material und Methoden

Forward Primer	1 μ l	125 ng
Reverse Primer	1 μ l	125 ng
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs® Inc.; M0491S)	1 μ l	2 U
mit ddH ₂ O auf 50 μ l auffüllen		

Die PCR-Reaktion wurde anschließend in einem Thermo-Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) mittels eines Programms mit den im Folgenden aufgeführten Parametern durchgeführt (Tab. 3).

Tabelle 3: Schritte und Parameter für die Durchführung der PCR-Reaktion zur Einbringung einer Einzelpunktmutation nach dem QuickChange-Mutageneseprotokoll.

Anzahl der Zyklen	Schritte	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	Initial Denaturation	98	1:00
20	Denaturation	98	0:30
	Annealing	55; 65	0:30
	Elongation	72	4:00
1	Final Elongation	72	5:00
	Hold	4	∞

Der Erfolg der PCR wurde anschließend mittels einer Agarose-Gelelektrophorese verifiziert, wobei das PCR-Produkt in einem Agarose-Gel (1 %) laufen gelassen wurde. Das Gel wurde aus 1 g Agarose (Sigma-Aldrich; A9539) + 100 ml TBE-Puffer (0,5x) hergestellt und zudem mit 8 μ l Safeview™ (abm®) versetzt. Die Proben für das Agarose-Gel wurden wie folgt vorbereitet:

DNA-Leiter:

1 μ l Quick-Load 2-log DNA-Ladder (0,1-10 kb)
(New England Biolabs® Inc.; N0468S)

- 9 µl ddH₂O
- 2 µl LoadingDye Purple (6x)
(New England Biolabs® Inc.; B7025S)

PCR-Ansatz:

- 10 µl PCR-Ansatz
- 2 µl LoadingDye Purple (6x)

Das Agarose-Gel wurde dann für ca. 1 h 30 min bei einer Spannung von 120 V, einer Stromstärke von 90 mA und einer Leistung von 5 W laufen gelassen. Anschließend wurde die Template-DNA, welche die eingebrachte Punktmutation nicht trägt, mittels des Enzyms DpnI (New England Biolabs® Inc.; R0176S) verdaut. Dafür wurden zu 40 µl des PCR-Produktes 20 U DpnI zugefügt und der Ansatz 1 h 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die DNA der Punktmutante mit Hilfe eines NucleoSpin® Plasmid-Mini-Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt und mittels einer Sequenzierung (eurofins Genomics) verifiziert.

Die mittels QuickChange-Mutagenese eingebrachten Einzelpunktmutationen und die daraus resultierenden Konstrukte der isolierten Ligandenbindedomänen der AMPA-Rezeptor GluR2-Untereinheit, der Kainate-Rezeptor GluR5-Untereinheit und der NMDA-Rezeptor GluN1- und GluN2-Untereinheiten sind im Folgenden aufgeführt (Tab. 4). Die DNA-Konstrukte mit den Mutationen G446C und T685W wurden durch Simone Schwarze hergestellt⁹⁴.

Tabelle 4: Mittels QuickChange-Mutagenese eingebrachte Einzelpunktmutationen in die isolierte Ligandenbindedomäne der AMPA-Rezeptor GluR2-Untereinheit, der Kainate-Rezeptor GluR5-Untereinheit und der NMDA GluN1- und GluN2A-Untereinheiten mit den daraus resultierenden Konstrukten und deren jeweiliger Funktion.

KONSTRUKTE	MUTATIONEN	FUNKTION
AMPA GLUR2 LBD	G446C	stellenspezifische Farbstoffmarkierung
	G446C-T685W	PET-Reportersystem
	L483Y	Dimerisierungsmutante

KAINATE GLUR5 LBD	G446C-T685W- L483Y	Dimerisierungsmutante mit PET-Reportersystem
	K503C	stellenspezifische Farbstoffmarkierung
	K503C-K734W	PET-Reportersystem
	D791K	Dimerisierungsmutante
NMDA GLUN1 LBD	K503C-K734W- D791K	Dimerisierungsmutante mit PET-Reportersystem
	A480C	stellenspezifische Farbstoffmarkierung
	A480C-W498F	Reportersystem und Mutationen nativer
	A480C-Y703F	Tryptophan- und
	A480C-Y711F	Tyrosin-Reste mit
	A480C-W731F	potentiellem Löscheffekt
	A480C-N521Y	Reportersystem mit Dimerisierungsmutante
A480C-N521Y- Y535S	Reportersystem mit Dimerisierungsmutante und Mutante eines aromatischen Restes in der Dimerverbindungsfläche	

NMDA GLUN2A LBD	T481C	stellenspezifische Farbstoffmarkierung
	E516Y	Dimerisierungsmutante

3.3 Synthese isolierter homologer Ligandenbindedomänen ionotroper Glutamatrezeptoren in kompetenten *E.coli*- Bakterien

Für die Synthese der LBD-Konstrukte der GluR2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors wurde zunächst die DNA, welche für das gewünschte Konstrukt kodiert, mittels einer Transformation in kompetente Origami 2(DE3)-*Escherichia coli*-Bakterien (Novagen) eingebracht. Dafür wurden zu 40 µl kompetenter Bakterienzellen 2 µl der DNA zugegeben und der Ansatz anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C durchgeführt, welcher dafür sorgte, dass die Zellmembran der *E.coli*-Bakterien kurzzeitig durchlässig wurde und die DNA durch die Zellen aufgenommen werden konnte. Der Ansatz wurde dann für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Bakterien in 200 µl SOB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Die transformierten Bakterien wurden dann auf einer Agarplatte mit LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin (AMP) (Sigma-Aldrich; A9518) als Selektionsmarker, ca. 20 h bei 37 °C wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterienzellen in Flüssigkulturen (~ 5-7 l), bestehend aus TB-Medium und ebenfalls versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, vermehrt. Nachdem die Bakterien für 2 h bei 30 °C und nachfolgend bei 18 °C unter Schütteln bis auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,6 bis 0,8 wachsen gelassen wurden, wurden die Bakterienkulturen in einem Eisbad heruntergekühlt und anschließend wurde die Überexpression der Proteinkonstrukte durch Zugabe von 0,4 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Melford; I56000) induziert. Im Folgenden wurden die *E.coli*-Bakterien für ca. 20 h bei 18 °C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien aus der Flüssigkultur für 10 min bei 5000 rpm (~ 2900 g) und 4 °C in einer vorgekühlten Superspeed-Zentrifuge (Sorvall® RC-5B Plus) herunterzentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde dann in Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20

mM Imidazol, pH 8,0) versetzt mit 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat (Sigma-Aldrich; G1149), 3,4 kU DNase (Sigma-Aldrich; DN25), einigen mg Lysozym (Sigma-Aldrich; L6876), 1 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) (Sigma-Aldrich; M9272), einer SIGMAFAST™ Protease-Inhibitor-Tablette (Sigma-Aldrich; S8830) pro 100 ml Flüssigkeit und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich; 78830), resuspendiert. Die resuspendierten Bakterienzellen wurden dann zusätzlich mechanisch mittels Ultraschall-Homogenisierung (36 Pulse je 5 s, dazwischen 20 s Pause, Gesamtpulszeit 2:30 min) (Ultraschall-Homogenisator: Qsonica Sonicators LLC. CL-334) aufgeschlossen. Anschließend wurde der Zellschrott 1 h bei 15000 rpm (~25000 g) und 4 °C in einer vorgekühlten Superspeed-Zentrifuge abzentrifugiert.

Für die Synthese der isolierten Ligandenbindedomäne der GluR5-Untereinheit eines Kainate-Rezeptors sowie der GluN1- und GluN2A-Untereinheiten eines NMDA-Rezeptors wurden Origami B(DE3)-*Escherichia coli*-Bakterien (Novagen) verwendet. In einem ersten Schritt wurde hierbei das Plasmid mit dem Gen, welches für das jeweilige LBD-Konstrukt kodiert, mittels einer Transformation in die Bakterienzellen eingebracht. Dafür wurden ca. 500 ng DNA zu 70 µl kompetenter *E.coli*-Zellen pipettiert und der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min auf Eis wurde der Transformationsansatz in 400 µl SOB-Medium aufgenommen und anschließend für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden 200 µl der transformierten Bakterien auf eine Agarplatte mit LB-Medium versetzt mit 50 µg/ml Ampicillin und 12,5 µg/ml Tetracyclin (Sigma-Aldrich; T7660) pipettiert und ca. 20 h bei 37 °C wachsen gelassen. Die Bakterien wurden dann in Flüssigkulturen (~ 7-10 l), bestehend aus LB-Medium, welches ebenfalls mit 50 µg/ml Ampicillin und 12,5 µg/ml Tetracyclin versetzt wurde, vermehrt. Die Flüssigkulturen wurden hierbei bei 37 °C unter Schütteln bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 1,5 wachsen gelassen. Daraufhin wurden die Bakterienkulturen in einem Eisbad heruntergekühlt, bevor die Überexpression der Proteinkonstrukte durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert wurde. Die Bakterien wurden dann für ca. 20 h bei 15 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien aus dem Flüssigmedium für 10 min bei 5000 rpm (~2900 g) und 4 °C in einer vorgekühlten Superspeed-Zentrifuge herunterzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden dann im Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8,0) mit 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat (im Falle von GluR5 und GluN2A) bzw. Glycin (SAFC®; G5417) (im Falle von GluN1), 1 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO₄) (Sigma-Aldrich;

63138), 0,2 mg/ml Lysozym, 0,17 mg/ml Deoxycholsäure Natriumsalz (Sigma-Aldrich; 30970), 1,33 mM PMSF und einer SIGMAFAST™ Protease-Inhibitor-Tablette pro 100 ml Flüssigkeit versetzt. Im Folgenden wurden die Bakterienzellen zusätzlich auch mechanisch mittels Ultraschall-Homogenisierung (36 Pulse je 5 s, dazwischen 20 s Pause, Gesamtpulszeit 2:30 min) aufgeschlossen und der Zellschrott 1 h bei 15000 rpm (~25000 g) und 4 °C in einer vorgekühlten Superspeed-Zentrifuge herunterzentrifugiert.

3.4 Aufreinigung der Ligandenbindedomänen

Im folgenden Kapitel wurden alle Proteinlösungen vor Aufladen auf eine Chromatographie-Säule durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (Pall® Corporation) filtriert.

Im Falle der isolierten Ligandenbindedomänen der GluR2-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors wurde das Zelllysat durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (Pall® Corporation) filtriert, bevor es mit einer Flussrate von 5 ml/min auf eine Talon® Superflow™ Co²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Merck; GE28-9575-02) geladen wurde. Anschließend wurde die Säule mit darauf gebundenem Protein mit dem dreifachen Säulenvolumen gewaschen, um unspezifische Wechselwirkungen anderer Proteine zu unterbinden. Hierfür wurde ein Waschpuffer bestehend aus 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0 versetzt mit 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat verwendet. Daraufhin wurde das Zielprotein mit angehängtem His₆-Tag mittels eines Elutionspuffers bestehend aus 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0 versetzt mit 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat von der Säule eluiert und in Fraktionen von je 2,5 ml aufgefangen. Die vier Fraktionen mit dem höchsten Wert bei OD₂₈₀ wurden vereinigt. Während des gesamten Aufreinigungsschrittes wurde die Talon-Säule durch eine externe Kühlung auf 4 °C heruntergekühlt. Durch einen Thrombin-Verdau wurde der His₆-Tag vom Protein entfernt. Dafür wurde die Proteinlösung nach Zugabe von 100 U Thrombin (Sigma-Aldrich; T4648) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Im Zuge eines weiteren Aufreinigungsschrittes mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde die Proteinlösung mithilfe einer Chromatographie-Anlage (NGC Chromatography System, Bio-Rad) auf eine Hiload 26/60 Superdex™ 75-Säule (GE Healthcare) mittels eines Laufpuffers bestehend aus

20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit Zugabe von 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat mit einer Flussrate von 2 ml/min geladen. Während des gesamten Aufreinigungsschrittes wurde die Größenausschluss säule durch eine externe Kühlung auf 4 °C heruntergekühlt. Die mit Hilfe eines Fraktionssammlers (BioFrac Fraction Collector, Bio-Rad) aufgefangenen Fraktionen, welche Protein enthielten, wurden dann vereinigt und mit Hilfe eines 10 kDa MWCO Zentrifugalkonzentrators (Sartorius™ Vivaspin™ 20) (VWR International GmbH; 512-4019) aufkonzentriert. Im Falle von Cystein-Mutanten wurde die Größenausschluss säule während des gesamten Aufreinigungsschrittes mit Argon begast, um den Sauerstoff (O₂) zu verdrängen und dadurch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den extrinsischen Cystein-Resten zu verhindern.

Dem Zellysate, welches die isolierten Ligandenbindedomänen der Kainate- und NMDA-Untereinheiten enthielt, wurden zunächst 100 mM NaCl sowie 10 mM Imidazol (Sigma-Aldrich; I202) zugefügt, bevor es ebenfalls durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und anschließend mit einer Flussrate von 5 ml/min auf eine Talon® Superflow™ Co²⁺ Affinitätschromatographiesäule geladen wurde. Zuvor wurde die Säule mit einem Puffer bestehend aus 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 + 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat bzw. Glycin equilibriert. Nachdem das Protein auf der Säule gebunden hatte, wurde diese mit einem Gradienten aus 16 mM und 32 mM Imidazol im Laufpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Protein mittels eines Elutionspuffers (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 400 mM Imidazol, pH 8,0, versetzt mit 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat bzw. Glycin) von der Säule eluiert und mithilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von je 2 ml aufgefangen. Während des gesamten Aufreinigungsschrittes wurde die Talon-Säule durch eine externe Kühlung auf 4 °C heruntergekühlt. Die Fraktionen, welche Protein enthielten, wurden vereinigt und über Nacht in einem Dialyseschlauch (MWCO 3500) (Cellu Sep®) in den Laufpuffer für die Anionenaustauschchromatographie (20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,5 versetzt mit 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat bzw. Glycin) bei 4 °C dialysiert. Zudem wurde im Falle der Ligandenbindedomänen der Untereinheiten GluR5 und GluN1 100 U Thrombin und im Falle der GluN2A LBD die Sumo-Protease Ulp-1 (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ute A. Hellmich, Institute of Organic Chemistry & Macromolecular Chemistry (IOMC), Jena, Deutschland) zu der Dialyse zugegeben, sodass der Verdau des His₆-Tags bzw. des Sumo-Proteins mit His₆-Tag während der Dialyse stattfinden konnte. Die Proteinlösung wurde dann mithilfe einer Chromatographie-Anlage mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine

5 ml HiTrap® Q Fast Flow-Anionenaustauschsäule (Sigma-Aldrich; GE17-5156-01), welche zuvor mit demselben Laufpuffer equilibriert wurde, geladen. Anschließend wurde die Säule mit gebundenem Protein mit 25 ml des Laufpuffers gewaschen, um schwach gebundene Proteine von der Säule zu spülen. Daraufhin wurde das Protein von der Säule eluiert, indem die Konzentration des Elutionspuffers (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,5 versetzt mit 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat bzw. Glycin) und damit einhergehend die Konzentration des NaCl mit einer Rate von 1 %/min graduell erhöht wurde. Dabei wurden Fraktionen von 2 ml aufgefangen und die Fraktionen, welche Protein enthielten, wurden vereinigt und mit Hilfe eines 10 kDa MWCO Zentrifugalkonzentrators (Sartorius™ Vivaspin™ 20) aufkonzentriert.

Die Proteinkonzentration c wurde mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes bestimmt⁷³:

$$\begin{aligned} \text{OD}_{280} &= \varepsilon \cdot c \cdot d \\ c &= \frac{\text{OD}_{280}}{\varepsilon \cdot d} \end{aligned} \quad [8]$$

wobei ε der Extinktionskoeffizient des Proteins und d die optische Weglänge beschreibt. Anschließend wurde die Reinheit des Proteins mittels einer Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) überprüft. Hierfür wurden Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gele verwendet (Invitrogen™; NW04122BOX). Das Protein wurde anschließend aliquotiert, schockgefrostet und bei -20° gelagert.

3.5 Farbstoffmarkierung der Ligandenbindedomäne

Zum Zweck der Durchführung von Spektroskopie-Experimenten wurden die isolierten Ligandenbindedomänen mit dem Thiol-reaktiven Maleimid-Derivat des Fluoreszenzfarbstoffes ATTO Oxa11 (ATTO-TEC GmbH) über eine Maleimid-Thiol-Kopplungsreaktion markiert. Dabei wurde der ATTO Oxa11-Fluoreszenzfarbstoff ortsspezifisch an die Thiol-Gruppe des mittels Mutagenese eingebrachten Cystein-Restes angefügt. Die Reaktion wurde in einem Puffer bestehend aus 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5 versetzt mit 1 mM L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat bzw. Glycin durchgeführt. Dem jeweiligen Proteinkonstrukt wurde ein fünfzehnfach molarer Überschuss des

Fluoreszenzfarbstoffes sowie ein zehnfach molarer Überschuss des Reduktionsmittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) (Sigma-Aldrich; C4706) zugefügt. Das TCEP wurde zuvor in Kaliumphosphat (K_3PO_4) (Alfa Aesar; 41587) und der ATTO Oxal1-Fluoreszenzfarbstoff in 5 μ l Acetonitril (Sigma-Aldrich; 271004) gelöst. Die Zugabe eines Reduktionsmittels wie TCEP war hierbei notwendig, da andernfalls die stellenspezifisch eingebrachten und oberflächenexponierten Cysteine Disulfidbrücken (S-S) ausbilden und die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff an eben diesen Cysteinresten beeinträchtigen würden. Durch das Reduktionsmittel verbleibt die Schwefelgruppe des Cysteins in einem reduzierten Zustand (-SH), wodurch die Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert wird. Anschließend wurde der Labelansatz für 3 h bei 4 °C unter Ausschluss von Licht inkubiert. Zur Abtrennung von überschüssigem freiem Farbstoff von dem farbstoffmarkierten Protein wurde dann eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dafür wurde der Ansatz mit einer Flussrate von 2 ml/min über eine Sephadex™ G-25-Säule (GE Healthcare) laufen gelassen. Im Anschluss daran wurde die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes (8) sowie der Labelgrad (engl.: degree of labeling (DOL)) bestimmt:

$$DOL = \frac{A_{\max} \cdot \epsilon_{\text{Protein}} \cdot d}{[A_{280} - (cF_{280} \cdot A_{\max})] \cdot \epsilon_{\text{Farbstoff}} \cdot d} \quad [9]$$

wobei $\epsilon_{\text{Farbstoff}}$ den Extinktionskoeffizienten des Farbstoffes, $\epsilon_{\text{Protein}}$ den Extinktionskoeffizienten des Proteins, A_{\max} die Absorption des Farbstoffes, A_{280} die Absorption des Proteins und cF_{280} den Korrekturfaktor des Farbstoffes beschreibt.

3.6 Das FCS-Setup

PET-FCS-Messungen wurden an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop mit einem inversen Stativ (Zeiss Axiovert 100 TV) durchgeführt. Als Anregungslichtquelle wurde ein roter Dioden-Laser (Coherent Cube) mit einer zeitlich stabilen Emissionsintensität verwendet (im Bereich von 30 Hz bis 10 MHz fluktuiert der Laser mit weniger als 1 %), was eine notwendige Voraussetzung für FCS darstellt. Das Emissionsmaximum des Lasers lag bei 637 nm. Das Laserlicht wurde über einen dichroitischen Strahlteiler (Omega Optics, 645DLRP) auf ein Immersionsobjektiv (Zeiss, Plan Apochromat) mit einer Vergrößerung von 63x und

einer hohen numerischen Apertur von 1.4 geleitet und auf die Probe fokussiert. Das rot-verschobene emittierte Fluoreszenzlicht der Probe wurde anschließend durch dieselbe Objektivlinse gebündelt und passierte wiederum den dichroitischen Strahlteiler, welcher Fluoreszenzlicht von Anregungslicht trennte. Die emittierten Photonen wurden dann durch einen Bandpassfilter (Omega Optics, 675RDF50) geleitet und auf zwei Glasfaserkabel fokussiert. Durch deren 100 μm große Eingangsblende wurde das detektierte Licht räumlich gefiltert, wodurch das Beobachtungsvolumen auf wenige Femtoliter ($\sim 10^{15}$ Liter) beschränkt und Hintergrundfluoreszenz verringert wurde. Mit Hilfe eines kubischen nicht-polarisierenden 50:50 Strahlteilers (Linos) wurde das Fluoreszenzlicht gleichmäßig zwischen zwei Lawinen-Photodioden (engl. avalanche photodiode, APD) (PerkinElmer, SPCM-AQRH-14-FC) verteilt. Es wurden zwei APDs benötigt, damit zum einen deren Signale kreuzkorreliert werden können und um zum anderen deren Totzeit sowie Nachpulseffekte zu umgehen^{74,83}. Das Signal der Detektoren wurde dann über eine Hardware-Korrelatorkarte (ALV-5000/60X0 Multiple Tau Digital Real Correlator) mit einer hohen zeitlichen Auflösung kreuzkorreliert, wodurch die Entstehung der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ über eine entsprechende Korrelations-Software (ALV-Correlator Software V. 3.0) (ALV GmbH) in Echtzeit beobachtet werden konnte (Abb. 5).

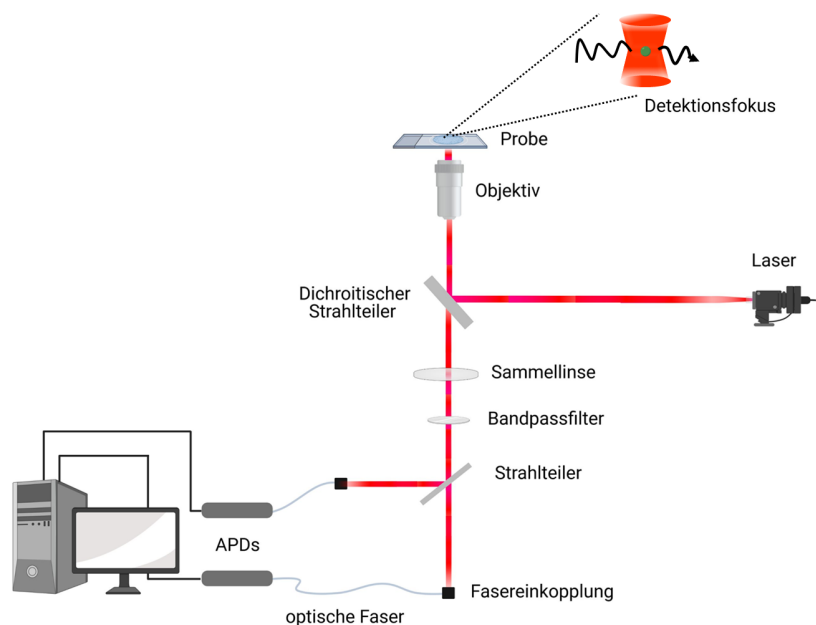


Abbildung 5: Aufbau eines FCS Setups. Die wesentlichen Bestandteile eines Setups, welches zur Durchführung von PET-FCS-Experimenten verwendet werden kann. Als Anregungslichtquelle dient ein roter Dioden-Laser, welches das Laserlicht über einen dichroitischen Strahlteiler auf ein

Immersionsobjektiv leitet. Der Laserstrahl wird auf die Probe fokussiert, woraufhin das rotverschobene Fluoreszenzlicht der Moleküle im Detektionsfokus durch dieselbe Objektivlinse gebündelt und mittels des dichroitischen Strahlteilers vom Anregungslicht getrennt wird. Durch einen Bandpassfilter wird das emittierte Licht auf zwei Glasfaserkabel fokussiert und durch einen Strahlteiler gleichmäßig auf zwei Lawinen-Photodioden verteilt. Durch Kreuzkorrelation der Signale beider APDs kann die Autokorrelationsfunktion mittels einer entsprechenden Korrelations-Software in Echtzeit berechnet werden. (Abbildung erstellt mit BioRender.com)

Durch einen Heizer in Form eines hohlen Kupferrings, welcher sich über der Objektivlinse befindet, wurde die Temperatur der Probe reguliert. Dabei wurde Kühlflüssigkeit durch den Ring geleitet, wodurch die Temperatur über die Objektivlinse und das Immersionsöl auf die Probe übertragen wurde. Die exakte Kontrolle der Temperatur der Probe ist von entscheidender Wichtigkeit, da sowohl Diffusion als auch Relaxationskinetiken von Molekülen temperaturabhängig sind⁷⁴. Die Probe wurde gemessen, nachdem der Anregungs- bzw. Detektionsfokus 50 μm in die Probe hineinbewegt wurde. Die Leistung des Laserstrahls wurde durch einen drehbaren optischen Filter reguliert.

3.7 PET-FCS-Experimente: Probenpräparation, Datenerfassung und Datenauswertung

Alle PET-FCS-Experimente wurden bei 25 °C und einer Anregungsleistung von 400 μW durchgeführt. Die Konzentration des farbstoffmarkierten Proteins, welche typischerweise im niedrigen nM-Bereich lag, wurde bei jeder Messung so gewählt, dass das detektierte Fluoreszenzsignal optimalerweise zwischen 100 und 300 kHz und die Teilchenzahl zwischen 10 und 100 lag. Die Messungen der einzelnen Ligandenbindedomänen sowie der Dimere der AMPA- und Kainate-Rezeptor-Konstrukte wurden in einem Puffer bestehend aus 50 mM Phosphat, pH 7,5 (mit einer Ionenstärke von 200 mM durch Kaliumchlorid eingestellt) jeweils mit und ohne L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat durchgeführt. Die Messungen der Dimerisierung und allosterischen Kommunikation der LBD-Konstrukte der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten wurde in einem Puffer bestehend aus 20 mM HEPES, pH 7,5 (mit einer Ionenstärke von 150 mM durch Natriumchlorid) jeweils mit und ohne L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat und/oder Glycin durchgeführt. Bei allen Messungen mit Agonist-gebundenem Protein wurde 1 mM des jeweiligen Agonisten eingesetzt. Hierfür wurden neben L-Glutamat die Agonisten AMPA (Tocris Bioscience; 0254/1), Kainate (Tocris Bioscience; 0222/1), Quisqualat (Sigma-Aldrich; Q2128), (S)-(-)-5-Iodowillardiine (Tocris

Bioscience; 0307/10), (S)-Willardiine (Hölzel Biotech; HY-12499) verwendet. Für die Durchführung von Messungen ungebundener LBDs in ihrem Apo-Zustand wurde der Agonist mit Hilfe einer Dialyse über Nacht bei 4 °C entfernt. Zu diesem Zweck wurden Slide-A-Lyzer™ Dialysekassetten (10kDa MWCO) (ThermoFisher Scientific; 66380) verwendet.

Für die K_d -Wert-Bestimmung wurde L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat in unterschiedlichen Konzentrationen (0 mM; 0,000001 mM; 0,00001 mM; 0,00002 mM; 0,00004 mM; 0,0002 mM; 0,0004 mM; 0,0005 mM; 0,0008 mM; 0,001 mM; 0,002 mM; 0,004 mM; 0,008 mM; 0,016 mM; 0,032 mM; 0,064 mM; 0,128 mM; 0,256 mM; 0,512 mM; 1,024 mM) zu dem AMPA-Rezeptor Konstrukt GluR2 LBD G447C-T685W gegeben.

Für die Messungen der Dimerisierung wurde im Falle der GluR2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors zu dem farbstoffmarkierten GluR2 LBD G447C-T685W-L483Y-Konstrukt ein Überschuss von 15 μ M des unmarkierten GluR2 LBD L483Y-Konstruktes gegeben. Im Falle der Kainate-Rezeptor GluR5-Untereinheit wurde zu dem farbstoffmarkierten LBD K503C-K734W-D791K-Konstrukt ein Überschuss von 40 μ M des unmarkierten GluR5 LBD D791K-Konstruktes gegeben. Bei den NMDA-Rezeptor LBDs wurde zu den farbstoffmarkierten Konstrukten GluN1 LBD A480C-N521Y und GluN1 LBD A480C-N521Y-Y535S jeweils ein Überschuss von 40 bis 60 μ M des unmarkierten GluN2A LBD E516Y-Konstruktes gegeben.

Die Messungen der Agonist-gebundenen Proteine wurden auf einem Objektträger mit einer Aushöhlung (Marienfeld Superior™), in welche die Probe pipettiert wurde, durchgeführt. Die Probe wurde zusätzlich durch ein Borosilikatglas-Präzisionsdeckgläschen (Marienfeld Superior™) abgedeckt. Um Wechselwirkungen der Protein-Probe mit der negativ geladenen Glasoberfläche zu vermeiden, wurde jeder Probe jeweils 0,05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich; 11332465001) und 0,3 mg/ml Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin; BSA) (Sigma-Aldrich; B4287) zugefügt⁷⁴. Proteine in ihrem ungebundenen Apo-Zustand wurden in Lab-Teks™ (Thermo Scientific™; Nunc,155409) mit einer zusätzlichen Beschichtung der Glasoberfläche mittels 10 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich; P1399), welche ebenfalls Wechselwirkungen der Proteine mit der Glasoberfläche unterbinden sollte, gemessen⁷⁴.

Für jede Probe wurden jeweils drei Autokorrelationsfunktionen mit einer Messzeit von je 10 min aufgenommen, um eine Standardabweichung der Messungen bilden zu können.

Die aufgenommenen ACFs wurden dann mit Hilfe der Software OriginPro2016G (OriginLab Cooperation) durch analytische Modelle angenähert und die Parameter der Kinetiken aus den Fits entnommen⁸³. Dabei wurde das analytische Modell für eine zweidimensionale Diffusion in x und y-Ebene eines globulären, fluoreszierenden Proteins, welches durch den Detektionsfokus diffundiert, verwendet⁸³:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \quad [10]$$

wobei N die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus und τ_D die Zeitkonstante der Diffusion beschreibt. Das Modell für eine zweidimensionale Diffusion kann angewendet werden, wenn die laterale Dimension (z) des Anregungs- bzw. Detektionsfokus wesentlich größer ist als die horizontalen Dimensionen (x,y)⁷⁴.

Da bei PET-FCS Konformationsfluktuationen auftreten, welche schneller sind als τ_D und sich in zusätzlichen Abfällen der ACF im sub-ms-Bereich äußern, wird unter Annahme eines Zwei-Zustand-Gleichgewichts das analytische Modell um die Summe einer Anzahl einfach-exponentieller Abfälle erweitert⁹⁵:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \sum_n a_n \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_n}\right)\right) \quad [11]$$

wobei a_n die Amplitude und τ_n die Zeitkonstante der nten Relaxation beschreibt.

Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung [5] konnte aus den gemessenen Werten für τ_D der jeweilige hydrodynamische Radius (R_h) der Proteine bestimmt werden. Als Referenz wurde der Fluoreszenzfarbstoff ATTO655 gemessen, dessen Diffusionskoeffizient und somit auch hydrodynamischer Radius bekannt sind⁹⁶. Zusätzlich wurde der Gyrationradius (R_g) der LBDs auf Grundlage von Kristallstrukturen mittels der Software Pymol (pymol.org) bestimmt. Die hydrodynamischen Radii wurden dann mit Hilfe der Werte für R_g unter Anwendung des theoretischen Skalierungsgesetzes für eine monodisperse Kugel berechnet⁹⁷:

$$R_h = \frac{1}{\sqrt{3/5}} \cdot R_g \quad [12]$$

3.8 Expression ionotroper Glutamatrezeptoren als intakte Vollängen-Konstrukte in Säugetierzellen und Farbstoffmarkierung mittels Klick-Chemie

Die Transfektion kultivierter HEK293T-Zellen (German Collection of Microorganism and Cell Cultures, ACC635) wurde unter Verwendung des jetPRIME®-Transfektionsreagenz (Polypus, 114-01) und dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll durchgeführt. Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor Durchführung der Transfektion auf mit Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich, P6407) vorbehandelten 4-Kammer Lab-Teks™ ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass zum Zeitpunkt der Transfektion eine Zellkonfluenz von 60-85 % vorlag.

Für eine LabTek™-Kammer (1 ml Zellmedium) wurde der Transfektionsansatz wie folgt hergestellt:

500 ng	Plasmid-DNA, welche für das Zielkonstrukt kodiert
500 ng	Plasmid-DNA, welche für die tRNA/tRNA-Synthetase (Konstrukt: pCMV tRNA-Pyl/NESPyIRSAF) kodiert
2 µl	jetPrime®-Transfektionsreagenz in 50 µl JP-Reaktionspuffer

Für die Farbstoffmarkierung mittels Klick-Chemie wurden den Zellen eine unnatürliche Aminosäure (uAA) direkt in das Zellkulturmedium zugefügt. Dabei wurde die uAA mit 1 M HEPES (pH 8.0) im Verhältnis 1:4 auf eine Endkonzentration von 250 µM verdünnt.

Für die bioorthogonale Klick-Färbung der membranständigen Rezeptoren wurden die transfizierten Zellen mit 1,5 µM des Tetrazin-Farbstoffes H-Tet-Cy5 (Jena Bioscience) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen, um den überschüssigen Tetrazin-Farbstoff zu entfernen. Nach der Färbung wurden die Zellen in HBSS überführt und an einem konfokalen Laserrastermikroskop (engl. laser scanning microscope, LSM) (LSM700 Zeiss) mikroskopiert.

4. Ergebnisse

Teile der Ergebnisse, die in diesem Kapitel aufgeführt sind, sind in einem Manuskript enthalten, welches zur Begutachtung eingereicht wurde. Abbildungen und Tabellen sind teilweise aus diesem Manuskript übernommen.

4.1 Vergleich der Dynamiken der Ligandenbindedomänen von Vertretern der drei iGluR-Subtypen AMPAR, KainateR und NMDAR

Zur Erfassung der Bewegungen der beiden Lobes (D1 und D2) innerhalb isolierter Ligandenbindedomänen (Konformationsdynamiken) von Homologen der drei iGluR-Untergruppen AMPAR, KainateR und NMDAR wurden PET-FCS-Messungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zuvor, basierend auf Kristallstrukturen, PET-Reportersysteme für die AMPAR GluR2(flip)-Untereinheit und die KainateR GluR5-Untereinheit entwickelt (Reportersystem für GluR2(flip)-Untereinheit entwickelt durch Simone Schwarze)⁹⁴. Diese bestehen aus einem stellenspezifisch eingebrachten Cystein (C), an welches der Fluoreszenzfarbstoff ATTO Oxa 11 angefügt wurde, und einem ebenfalls stellenspezifisch eingebrachten Tryptophan (W). Im Falle der NMDAR GluN1- und GluN2A-Untereinheiten besteht das entsprechende Reportersystem ausschließlich aus einem stellenspezifisch eingebrachten Cystein mit gekoppeltem ATTO Oxa 11-Fluoreszenzfarbstoff (Abb. 6 b-e). Der umgebungssensitive Fluoreszenzfarbstoff ATTO Oxa 11 nimmt Veränderungen in seiner Mikroumgebung wahr, was sich wiederum in Änderungen der Intensität der Fluoreszenzemission äußert. Zudem kommt es zu einer Löschung der Fluoreszenz durch PET, sobald der Farbstoff in Van-der-Waals-Kontakt mit dem eingebrachten Tryptophan-Rest tritt. Daher werden schnelle Konformationsänderungen, welche mit der Ausbildung und Trennung eines Fluorophor/Tryptophan-Komplexes

assoziiert sind, in Fluktuationen des Fluoreszenzsignals, welche wiederum durch FCS erfasst werden können, widergespiegelt. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde der Cystein-Rest in den oberen D1-Lobe und der Tryptophan-Rest in den unteren D2-Lobe der Ligandenbindedomänen eingefügt (Abb. 6 a). Da die Konformationsänderungen der LBDs auf sehr geringen Distanzen erfolgen, wurde zur Detektion der photoinduzierte Elektronentransfer gewählt, welcher eine entsprechend hohe räumliche Auflösung von ≤ 1 nm aufweist. Bei der Entwicklung der PET-Reportersysteme wurde darauf geachtet, dass lösungsmittlexponierte Stellen für die Einbringung der Cystein- und Tryptophan-Reste gewählt und die Mutationen von konservierten sowie strukturell und funktionell wichtigen Seitenketten vermieden wurden. Zudem wurde überprüft, dass nativ vorkommende Cystein-Seitenketten entweder im Protein verborgen vorliegen oder strukturelle Disulfidbrücken ausbilden, um eine unspezifische Fluoreszenzmarkierung der LBDs zu vermeiden. Hierfür wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei welchen die WT-Proteine mit derselben Methode zur Fluoreszenzmarkierung behandelt wurden wie die Proteine, die das Reportersystem tragen. Dabei wurden kaum nachweisbare Mengen an farbstoffmarkierten WT-Proteinen erhalten.

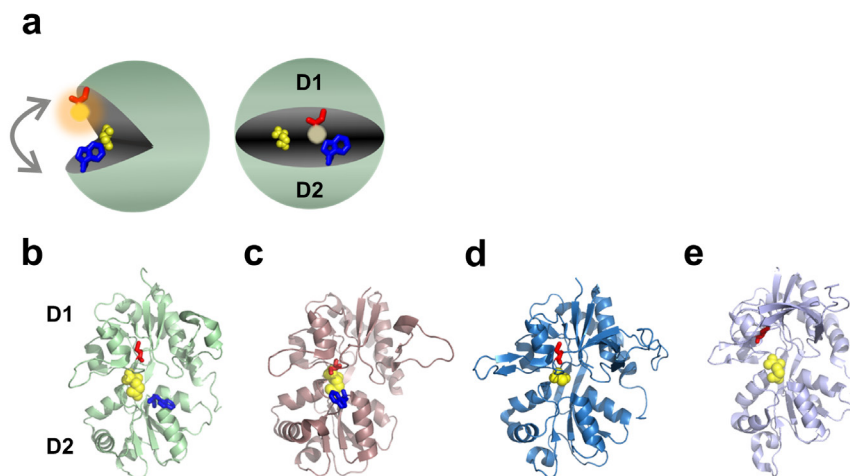


Abbildung 6: Darstellung der entwickelten Reportersysteme zur Erfassung der Kinetiken der Bewegung isolierter Ligandenbindedomänen von Homologen der drei iGluR-Untergruppen AMPAR, KainateR und NMDAR mittels PET-FCS. (a) Darstellung der Struktur einer isolierten Ligandenbindedomäne mit PET-Reportersystem zur Erfassung der Konformationsdynamiken der LBD-Muschelschale (grauer Pfeil) aufgrund von Fluoreszenzlöschung hervorgerufen durch Van-der-Waals-Kontakt zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Tryptophan. Das eingebrachte Cystein (rot) mit angefügtem Fluoreszenzfarbstoff (orange) befindet sich dabei im oberen Lobe (D1) und das eingebrachte Tryptophan (blau) im unteren Lobe (D2) der Muschelschalenstruktur an der Ligandenbindespalte. Der gebundene Agonist ist als gelbe Sphären dargestellt. (b-e) Kristallstrukturen der Agonist-gebundenen AMPAR GluR2(flip) (PDB ID 2UXA) (b), KainateR GluR5 (PDB ID 1TXF) (c), NMDAR GluN1 (PDB ID 1PB7) (d) und NMDAR GluN2A (PDB ID 5I57) (e) LBDs. Das stellenspezifisch eingebrachte Cystein (die Stelle, an der der Fluoreszenzfarbstoff angefügt wird) ist in Rot dargestellt. Der stellenspezifisch eingebrachte Tryptophan-Rest ist mit Blau und der gebundene Agonist mit Gelb gekennzeichnet.

In einer Reihe von Experimenten sollten die Konformationsdynamiken der LBDs der unterschiedlichen Homologe jeweils in ihrem ungebundenen Apo-Zustand sowie nach Bindung eines Agonisten bestimmt werden.

Dafür wurde zunächst eine Kontrollmessung der Ligandenbindedomäne der GluR2(flip)-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors, in welche nur ein Cystein mit angehängtem Fluoreszenzfarbstoff eingebracht wurde, durchgeführt. Durch die Negativkontrolle sollte nachgewiesen werden, ob Kinetiken, hervorgerufen durch unspezifische Löschung des Fluoreszenzfarbstoffes aufgrund nativer Tryptophane (W) oder Tyrosine (Y) im Protein oder aufgrund von Umgebungsänderungen des umgebungssensitiven Farbstoffes, auch ohne die stellenspezifische Einbringung des Tryptophans auftreten.

Die Autokorrelationsfunktion der Kontrollmutante GluR2 LBD G446C in ihrem Glutamat-gebundenen Zustand zeigt einen exponentiellen Abfall im ms-Bereich welcher durch die Diffusion des Proteins durch den Detektionsfokus hervorgerufen wird. Das analytische Modell, welches hier zur mathematischen Annäherung verwendet wurde, zeigt zudem einen weiteren exponentiellen Abfall auf sub-ms-Zeitskalen (Abb. 7 a). Dem mathematischen Fit kann dabei eine Diffusionszeit τ_D mit dazugehöriger Standardabweichung von $1,73 \pm 0,04$ ms entnommen werden. Die zusätzliche Relaxation kann aufgrund einer nicht signifikanten Amplitude (< 10 %) von nur 3 ± 1 % mit einer Zeitkonstante von 3 ± 4 μ s vernachlässigt werden (Abb. 7 c). Nach einer Dialyse, welche dem Zweck diente, den Agonisten von der isolierten LBD zu entfernen, wurde die Kontrollmutante GluR2 LBD G446C in ihrem ungebundenen Apo-Zustand gemessen. Auch hier wurde für die Annäherung der ACF ein mathematisches Modell der zweidimensionalen Diffusion mit einem zusätzlichen exponentiellen Abfall verwendet (Abb. 7 a). Bei dieser Messung liegt die Diffusionszeit des Proteins bei $1,70 \pm 0,01$ ms und es zeigt sich eine Relaxation mit einer Amplitude von 9 ± 2 % und einer Zeitkonstante von 260 ± 150 ns, wobei der zusätzliche Exponent auch hier aufgrund seiner geringen Amplitude als nicht signifikant betrachtet werden kann (Abb. 7 c). Zuletzt wurde dem ungebundenen Protein nach der Dialyse erneut der Agonist Glutamat zugefügt. Der gemessenen ACF kann eine Diffusionszeit von $1,71 \pm 0,01$ ms sowie eine zusätzliche Relaxation mit einer vernachlässigbar geringen Amplitude von 5 ± 1 % mit dazugehöriger Zeitkonstante von 306 ± 155 ns entnommen werden (Abb. 7 a,c).

Alles in allem weisen die ACFs der Kontrollmutante GluR2 LBD G446C unter allen Bedingungen nur einen einzelnen signifikanten exponentiellen Abfall im ms-Bereich auf, welcher durch Fluoreszenzfluktuationen, hervorgerufen durch die

Diffusion des Proteins durch den Detektionsfokus aufgrund der Brownschen Molekularbewegung, entsteht. Da keinerlei signifikante Relaxationen im sub-ms-Bereich nachgewiesen werden konnten, kann eine unspezifische Löschung des Fluoreszenzfarbstoffes durch Teile des Proteins oder des umgebenden Mediums ausgeschlossen werden.

Anschließend wurde die isolierte LBD der GluR2-Untereinheit, in welche sowohl ein Cystein mit angehängtem Fluoreszenzfarbstoff als auch ein Tryptophan-Rest eingebracht wurden, gemessen. Die Autokorrelationsfunktion des GluR2 LBD G446C-T685W-Konstruktes im Agonist-gebundenen Zustand zeigt neben dem exponentiellen Abfall der Diffusion zusätzliche Fluoreszenzfluktuationen auf schnelleren sub-ms-Zeitskalen (Abb. 7 b). Durch die mathematische Annäherung der ACF kann dabei ein Wert für τ_D mit dazugehöriger Standardabweichung von $1,78 \pm 0,04$ ms festgestellt werden. Für die zusätzliche Relaxation können eine signifikante Amplitude (> 10 %) von 20 ± 3 % und eine Zeitkonstante von 311 ± 82 ns entnommen werden (Abb. 7 d). Die ACF, welche für das Protein in seinem ungebundenen Apo-Zustand aufgezeichnet wurde, konnte mit einem analytischen Modell der zweidimensionalen Diffusion mit drei zusätzlichen Exponenten im sub-ms-Bereich angenähert werden (Abb. 7 b). Dabei können eine Diffusionszeit von $2,06 \pm 0,03$ ms und für die drei zusätzlichen Relaxationen signifikante Amplituden und dazugehörige Zeitkonstanten von $a_1 = 17 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 113 \pm 14$ μ s, $a_2 = 25 \pm 3$ % mit $\tau_2 = 6 \pm 2$ μ s und $a_3 = 48 \pm 7$ % mit $\tau_3 = 321 \pm 139$ ns festgestellt werden (Abb. 7 d). Für das Protein in seinem gebundenen Zustand nach erneuter Zugabe von Glutamat nach Dialyse können eine Diffusionszeit von $1,75 \pm 0,01$ ms und eine Relaxation mit einer signifikanten Amplitude von 20 ± 3 % und einer Zeitkonstante von 302 ± 50 ns ermittelt werden (Abb. 7 b,d).

Alles in allem können bei den PET-FCS-Messungen der Doppelmutante neben den Fluoreszenzfluktuationen, welche durch die molekulare Diffusion des Proteins durch das Beobachtungsvolumen hervorgerufen werden, zusätzliche Fluktuationen des Fluoreszenzsignals auf schnelleren Zeitskalen im sub-ms-Bereich festgestellt werden. Diese zusätzlichen Relaxationen werden durch Bewegungen der D1 und D2-Lobes der LBD verursacht, indem es zu einer wiederholten Ausbildung und Trennung des Van-der-Waals-Kontaktes zwischen dem ATTO Oxa 11-Fluoreszenzfarbstoff und dem stellenspezifisch eingebrachten W685-Restes und somit zu einer wiederholten PET-Löschung des Fluorophors kommt. Dabei wurden insgesamt drei zusätzliche exponentielle Abfälle festgestellt, wobei die einzelnen Relaxationen Kinetiken der Konformationsdynamiken der LBD auf Zeitskalen von

4 Ergebnisse

$\sim 100 \mu\text{s}$, $\sim 10 \mu\text{s}$ und $\sim 0,5 \mu\text{s}$ darstellen. Zudem wird deutlich, dass ein beträchtlicher Anteil der Konformationsdynamiken, welche die LBD im ungebundenen Apo-Zustand aufweist, in Anwesenheit des Agonisten Glutamat verloren geht. Ein erneutes Einfrieren der Kinetiken war dabei auch nach Dialyse durch Zugabe von Glutamat möglich, was durch die nahezu identischen Werte, welche für die Parameter beider Messungen ermittelt wurden, widerspiegelt wird.

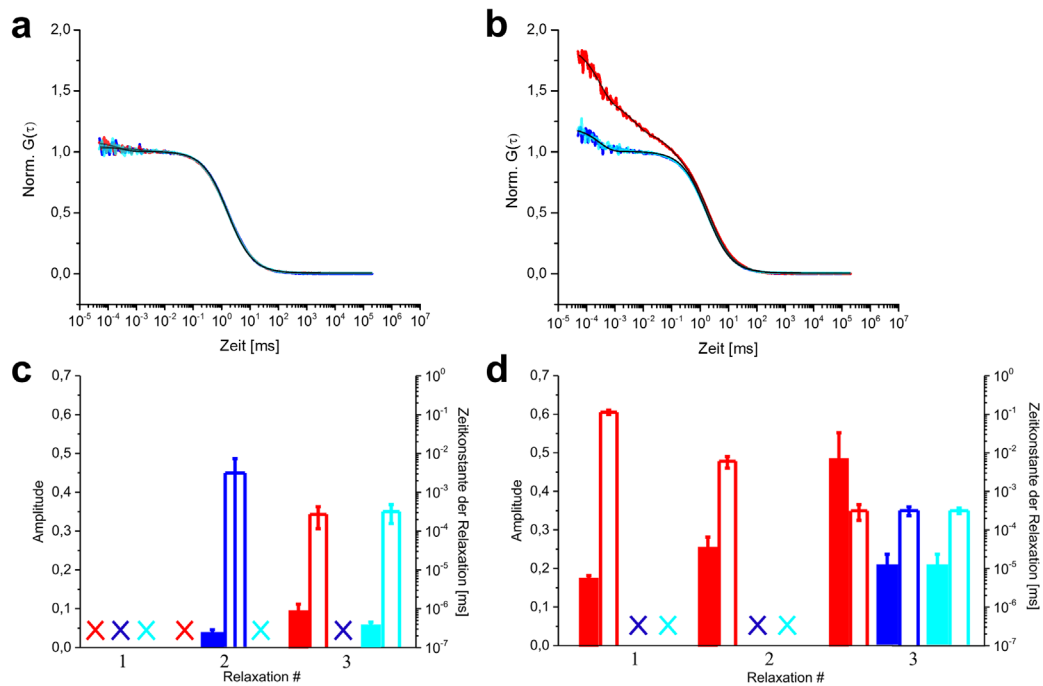


Abbildung 7: Messungen der Dynamiken der isolierten Ligandenbindedomäne der GluR2(flip)-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors im Agonist-gebundenen sowie im ungebundenen Apo-Zustand mittels PET-FCS. (a,b) Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus der Kontrollmutante GluR2 LBD G446C (a) und der Doppelmutante mit PET-Reportersystem GluR2 LBD G446C-T685W (b). Die ACFs der Messungen mit Agonist-gebundenem Protein vor der Dialyse sind jeweils in Dunkelblau dargestellt. Die Messungen des Proteins im ungebundenen Apo-Zustand sind jeweils in Rot dargestellt. Die Messungen des Proteins im Glutamat-gebundenen Zustand nach erneuter Zugabe des Agonisten nach Dialyse sind in Cyan dargestellt. Die schwarzen Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die zweidimensionale molekulare Diffusion von Molekülen mit einer oder drei zusätzlichen exponentiellen Relaxationen dar. (c,d) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen der Konstrukte GluR2 LBD G446C (c) und GluR2 LBD G446C-T685W (d). Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unausgefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a,b). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

Auch für die isolierte LBD der GluR5-Untereinheit eines Kainate-Rezeptors wurde zunächst eine Kontrollmessung mit dem Konstrukt GluR5 LBD K503C, in welches ein Cystein-Rest mit angehängtem Fluoreszenzfarbstoff – allerdings kein

Tryptophan-Rest – eingebracht wurde, durchgeführt. Auch hier diente die Negativkontrolle dem Zweck, unspezifische Löschereignisse, welche aufgrund von Wechselwirkungen des Fluoreszenzfarbstoffes mit nativen Tryptophan- oder Tyrosin-Resten im Protein oder durch Änderungen der Mikroumgebung des Farbstoffes auftreten, auszuschließen. Hierfür wurde die LBD zunächst in ihrem Glutamat-gebundenen Zustand gemessen, wobei eine Diffusionszeit von $1,54 \pm 0,04$ ms und eine zusätzliche Relaxation mit einer Amplitude von 14 ± 1 % und dazugehörigen Zeitkonstante von 879 ± 71 ns festgestellt werden kann (Abb. 8 a,c). Des Weiteren wurde die Kontrollmutante in ihrem ungebundenen Apo-Zustand gemessen, wobei ein Wert für τ_D mit dazugehöriger Standardabweichung von $1,74 \pm 0,06$ ms ermittelt wird. Zwei zusätzliche exponentielle Abfälle der Autokorrelationskurve stellen Kinetiken mit signifikanten Amplituden und dazugehörigen Zeitkonstanten von $a_1 = 10 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 112 \pm 34$ μ s und $a_2 = 15 \pm 3$ % mit $\tau_2 = 707 \pm 206$ ns dar (Abb. 8 a,c). Zuletzt wurde das dialysierte Protein nach erneuter Zugabe des Agonisten Glutamat gemessen, wobei der mathematischen Annäherung der ACF eine Diffusionszeit von $1,73 \pm 0,04$ ms und eine zusätzliche Kinetik mit einer nicht signifikanten Amplitude von 7 ± 1 % und einer dazugehörigen Zeitkonstante von 674 ± 280 ns entnommen werden kann (Abb. 8 a,c).

Im Vergleich zu der Kontrollmutante der LBD der AMPAR GluR2-Untereinheit, welche einen einzigen signifikanten exponentiellen Abfall der ACF aufgrund von Diffusion des Proteins durch das Detektionsvolumen zeigt, können bei der Kontrollmutante der LBD der KainateR GluR5-Untereinheit zusätzliche exponentielle Abfälle mit signifikanten Amplituden auf schnelleren Zeitskalen festgestellt werden. Diese Relaxationen im sub-ms-Bereich werden durch die Bewegung der beiden Lobes der LBD hervorgerufen. Da hier allerdings kein Tryptophan-Rest vorhanden ist, welcher mit dem ATTO Oxa 11-Fluoreszenzfarbstoff in Van-der-Waals-Kontakt treten und eine Löschung der Fluoreszenz durch PET hervorrufen könnte, kommen die Fluktuationen des Fluoreszenzsignals in diesem Fall durch die Änderung der Polarität der Mikroumgebung des umgebungssensitiven Farbstoffes zustande. Auch hier wird ersichtlich, dass die LBD in ihrem ungebundenen Apo-Zustand verstärkte Konformationsdynamiken aufweist, verglichen mit ihrem Agonist-gebundenen Zustand. Da die Anteile der Kinetiken des ungebundenen Proteins mit 10 ± 1 % und 15 ± 3 % allerdings im unteren Signifikanzbereich liegen, wurde für weitere Messungen dennoch ein Tryptophan an Position 734 ortsspezifisch in das Protein eingebracht.

Demnach wurde weiterhin das Konstrukt GluR5 LBD K503C-K734W, welches das PET-Reportersystem enthält, gemessen. Die ACF des Glutamat-gebundenen Proteins wurde mit einem mathematischen Modell der zweidimensionalen Diffusion mit drei zusätzlichen Exponenten angenähert (Abb. 8 b). Für die Diffusionszeit kann dabei ein Wert von $1,77 \pm 0,01$ ms ermittelt werden. Die Amplituden und dazugehörigen Zeitkonstanten der drei Exponenten können mit $a_1 = 5 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 91 \pm 29$ μ s, $a_2 = 10 \pm 2$ % mit $\tau_2 = 3 \pm 2$ μ s und $a_3 = 111 \pm 3$ % mit $\tau_3 = 212 \pm 13$ ns ermittelt werden (Abb. 8 d). Die ACF des Proteins im ungebundenen Apo-Zustand zeigt zusätzlich zu dem Abfall, welcher die molekulare Diffusion beschreibt, vier weitere exponentielle Abfälle (Abb. 8 b). Die aus der mathematischen Annäherung entnommene Diffusionszeit mit dazugehöriger Standardabweichung beträgt hierbei $1,73 \pm 0,09$ ms. Die vier zusätzlichen Relaxationen weisen signifikante Amplituden und dazugehörige Zeitkonstanten von $a_1 = 24 \pm 2$ % mit $\tau_1 = 208 \pm 77$ μ s, $a_2 = 29 \pm 4$ % mit $\tau_2 = 21 \pm 10$ μ s, $a_3 = 32 \pm 2$ % mit $\tau_3 = 3 \pm 1$ μ s und $a_4 = 56 \pm 10$ % mit $\tau_4 = 241 \pm 140$ ns auf (Abb. 8 d). Nach erneuter Zugabe des Agonisten Glutamat nach Dialyse zeigt das Protein eine Diffusionszeit von $1,81 \pm 0,03$ ms und drei zusätzliche Kinetiken mit Amplituden und Zeitkonstanten von $a_1 = 7 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 32 \pm 19$ μ s, $a_2 = 44 \pm 10$ % mit $\tau_2 = 0,7 \pm 0,1$ μ s und $a_3 = 130 \pm 32$ % mit $\tau_3 = 98 \pm 51$ ns (Abb. 8 d).

Alles in allem können bei der Doppelmutante der isolierten KainateR LBD zusätzlich zur molekularen Diffusion des Proteins im ms-Bereich weitere Relaxationen auf schnelleren sub-ms-Zeitskalen beobachtet werden, welche sich auf Konformationsdynamiken der Muschelschalenstruktur der LBD zurückführen lassen. Aufgrund von Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes durch den stellenspezifisch eingebrachten Tryptophan-Rest an Position 734 werden die Konformationsdynamiken in Fluktuationen des Fluoreszenzsignals übersetzt, wodurch der unspezifische Löscheffekt, welcher bei der ungebundenen Einzelmutante zu beobachten ist, deutlich verstärkt wird. Dabei lassen sich bei der Doppelmutante im Apo-Zustand vier Kinetiken mit signifikanten Amplituden und Zeitkonstanten im Bereich von ~ 200 μ s, ~ 20 μ s, ~ 1 μ s und $\sim 0,5$ μ s feststellen. Die Doppelmutante im Glutamat-gebundenen Zustand vor und nach der Dialyse zeigt jeweils nur drei Relaxationen, wobei je eine davon aufgrund einer nicht signifikant geringen Amplitude vernachlässigt werden kann. Die dominante Kinetik befindet sich dabei auf Zeitskalen von wenigen ns. Somit ist auch hier zu erkennen, dass bei Zugabe des Agonisten ein signifikanter Anteil der Konformationsdynamiken im μ s-Bereich des Proteins im ungebundenen Apo-Zustand verloren geht.

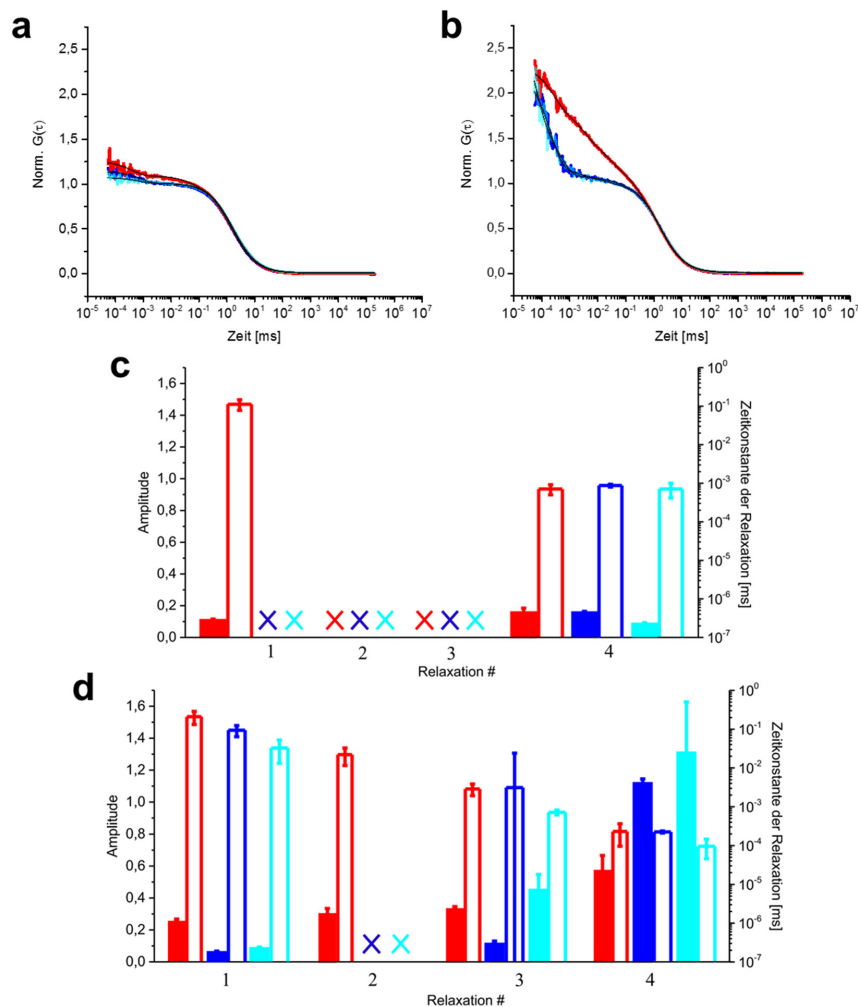


Abbildung 8: Messungen der Dynamiken der isolierten Ligandenbindedomäne der GluR5-Untereinheit eines Kainate-Rezeptors im Agonist-gebundenen sowie im ungebundenen Apo-Zustand mittels PET-FCS. (a,b) Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus der Kontrollmutante GluR5 LBD K503C (a) und der Doppelmutter mit PET-Reportersystem GluR5 LBD K503C-K734W (b). Die ACFs der Messungen mit Agonist-gebundenem Protein vor der Dialyse sind jeweils in Dunkelblau dargestellt. Die Messungen des Proteins im ungebundenen Apo-Zustand sind jeweils in Rot dargestellt. Die Messungen des Proteins im Glutamat-gebundenen Zustand nach erneuter Zugabe des Agonisten nach Dialyse sind in Cyan dargestellt. Die schwarzen Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die zweidimensionale molekulare Diffusion von Molekülen mit ein bis vier zusätzlichen exponentiellen Relaxationen dar. (c,d) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen der Konstrukte GluR5 LBD K503C (c) und GluR5 LBD K503C-K734W (d). Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unausgefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a,b). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

PET-FCS-Messungen der isolierten Ligandenbindedomäne der GluN1-Untereinheit eines NMDA-Rezeptors zeigen, dass bereits die Kontrollmutante GluN1 LBD A480C ohne ein stellenspezifisch eingebrachtes Tryptophan in den

unteren Lobe signifikante exponentielle Abfälle der ACF im sub-ms-Bereich hervorruft. Um auszuschließen, dass einer der Tryptophan- oder Tyrosin-Reste, welche natürlich im Protein vorkommen, für die Löschung des Farbstoffes verantwortlich ist, wurden alle nativen Tryptophane und Tyrosine in unmittelbarer Nachbarschaft zum Fluorophor (W498, W731, Y703, Y711) zu der Aminosäure Phenylalanin (F), welche keine Löschung des ATTO Oxa 11-Farbstoffes verursacht, mutiert^{90,98} (Abb. 9 a). Die ACFs der FCS-Messungen der Phenylalanin-Mutanten zeigen Relaxationen im sub-ms-Bereich, ähnlich zu denen der Einzelmutante GluN1 LBD A480C ohne Phenylalanin-Mutation, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Fluktuationen des Fluoreszenzsignals hier vielmehr durch Änderungen der Mikroumgebung (Polarität) des umgebungssensitiven ATTO Oxa 11-Fluoreszenzfarbstoffes aufgrund von Konformationsdynamiken der LBD zustande kommen als durch unspezifische Löscheffekte durch native Teile des Proteins (Abb. 9 b; Tab. 5).

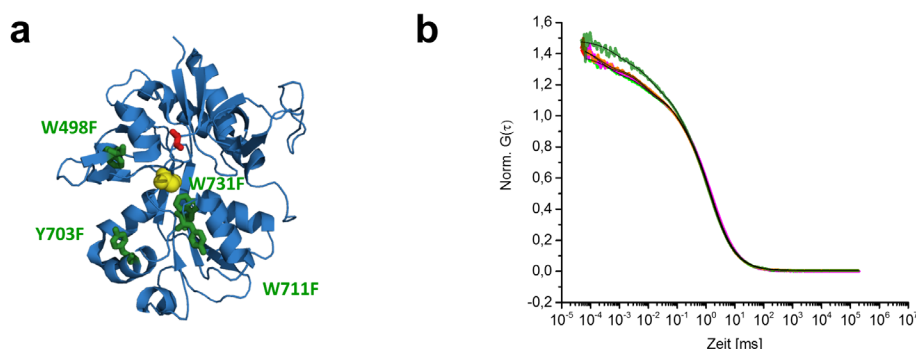


Abbildung 9: Native Tryptophan- und Tyrosin-Reste in der Ligandenbindedomäne der GluN1-Untereinheit eines NMDA-Rezeptors sind nicht für die Löschung des Fluoreszenzfarbstoffes ATTO Oxa 11 verantwortlich. (a) Struktur der Ligandenbindedomäne der GluN1-Untereinheit eines NMDA-Rezeptors (PDB ID: 1PB7). Mutationen von nativen Tryptophan (W)- und Tyrosin (Y)-Resten in der unmittelbaren Nachbarschaft des ATTO Oxa 11-Fluoreszenzfarbstoffes an dem eingebrachten Cystein-Rest (Position 480, rot) zu Phenylalanin (F) (W498F, Y703F, Y711F, W731F) sind in Grün dargestellt. (b) Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus von FCS-Messungen der fluoreszenzmarkierten LBD-Mutanten W498F (hellgrün), Y703F (magenta), Y711F (orange), W731F (dunkelgrün) in einem ungebundenen Apo-Zustand. Die schwarzen Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die zweidimensionale molekulare Diffusion von Molekülen mit drei zusätzlichen exponentiellen Relaxationen dar.

Tabelle 5: Parameter der Kinetiken ermittelt durch die mathematische Annäherung der ACFs, welche aufgrund der Punktmutanten W498F, Y703F, Y711F und W731F innerhalb des fluoreszenzmarkierten NMDAR-Konstruktes GluN1 LBD A480C gemessen wurden. Werte sind

4 Ergebnisse

Mittelwerte aus drei Messungen bzw. zwei Messungen (im Falle der W731F-Mutante) \pm Standardabweichung.

	τ_D [ms]	a_1	τ_1 [μ s]	a_2	τ_2 [μ s]	a_3	τ_3 [μ s]
W498F	$1,47 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	117 ± 12	$0,14 \pm 0,01$	7 ± 2	$0,11 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,18$
Y703F	$1,55 \pm 0,08$	$0,16 \pm 0,01$	108 ± 23	$0,15 \pm 0,01$	7 ± 2	$0,18 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,15$
Y711F	$1,43 \pm 0,05$	$0,16 \pm 0,01$	101 ± 12	$0,15 \pm 0,03$	$7 \pm 0,5$	$0,13 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,02$
W731F	$1,41 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,02$	137 ± 25	$0,17 \pm 0,01$	10 ± 2	$0,11 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,13$

Die ACF des Proteins in seinem Glycin-gebundenen Zustand wurde mit einem mathematischen Modell der zweidimensionalen Diffusion mit einem zusätzlichen Exponenten angenähert (Abb. 10 a). Dabei können eine Diffusionszeit von $1,67 \pm 0,01$ ms und eine Kinetik mit einer Amplitude von 8 ± 1 % mit dazugehöriger Zeitkonstante von 5 ± 3 μ s festgestellt werden, wobei der Exponent aufgrund der geringen, nicht signifikanten Amplitude vernachlässigt werden kann (Abb. 10 b). Die ACF, welche aufgrund des Proteins, welches sich in seinem ungebundenen Apo-Zustand befand, gemessen wurde, zeigt neben einer Diffusionszeit von $1,71 \pm 0,04$ ms drei zusätzliche Kinetiken mit signifikanten Amplituden und dazugehörigen Zeitkonstanten von $a_1 = 14 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 145 \pm 55$ μ s, $a_2 = 15 \pm 6$ % mit $\tau_2 = 8 \pm 4$ μ s und $a_3 = 13 \pm 1$ % mit $\tau_3 = 487 \pm 396$ ns (Abb. 10 a,b). Nach erneuter Zugabe des Agonisten Glycin zu der LBD wurde die gemessene Autokorrelationsfunktion mit einem mathematischen Modell angenähert, welches neben der molekularen Diffusion noch zwei weitere Exponenten enthält (Abb. 10 a). Dabei werden dem Fit eine Diffusionszeit von $1,63 \pm 0,03$ ms und Relaxationen mit Amplituden und Zeitkonstanten von $a_1 = 10 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 19 \pm 5$ μ s, $a_2 = 10 \pm 1$ % mit $\tau_2 = 485 \pm 292$ ns entnommen (Abb. 10 b).

Auch bei der isolierten LBD der GluN1-Untereinheit zeigen sich im ungebundenen Zustand des Proteins signifikante Relaxationen im Bereich von ~ 100 μ s, ~ 10 μ s und $0,5$ μ s aufgrund von Konformationsdynamiken, die bei Zugabe des Agonisten größtenteils verloren gehen.

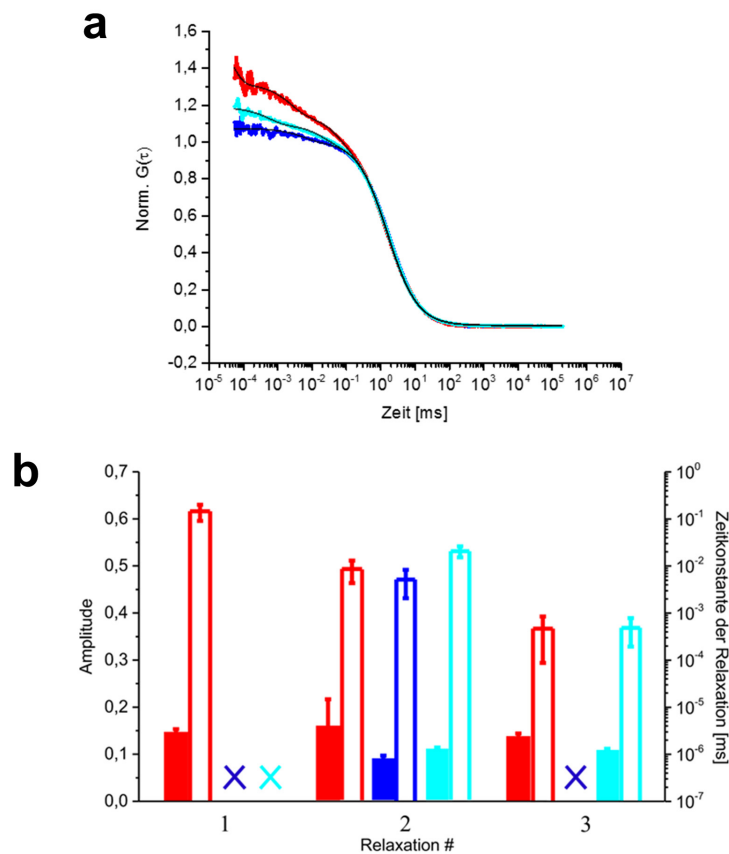


Abbildung 10: Messungen der Dynamiken der isolierten Ligandenbindedomäne der GluN1-Untereinheit eines NMDA-Rezeptors im Agonist-gebundenen sowie im ungebundenen Apo-Zustand mittels PET-FCS. (a) Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus des Konstruktes GluN1 LBD A480C (a). Die ACF der Messung mit Agonist-gebundenem Protein vor der Dialyse ist in Dunkelblau dargestellt. Die Messung des Proteins im ungebundenen Apo-Zustand ist in Rot dargestellt. Die Messung des Proteins im Glycin-gebundenen Zustand nach erneuter Zugabe des Agonisten nach Dialyse ist in Cyan dargestellt. Die schwarzen Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die zweidimensionale molekulare Diffusion von Molekülen mit einer oder drei zusätzlichen exponentiellen Relaxationen dar. (b) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen. Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unangefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

Mit Hilfe von Kristallstrukturen wurde analog zu der A480C-Mutante der GluN1-Untereinheit die Kontrollmutante T481C für die GluN2A-Untereinheit eines NMDA-Rezeptors entwickelt und FCS-Messungen durchgeführt (Abb. 11).

Die ACF, welche aufgrund von PET-FCS-Messungen der GluN2A LBD in einem Glutamat-gebundenen Zustand, gemessen wurde, konnte mit einem mathematischen Modell, welches zwei weitere Exponenten zusätzlich zu der zweidimensionalen molekularen Diffusion beschreibt, angenähert werden (Abb. 11

a). Dabei ergibt sich eine Diffusionszeit mit dazugehöriger Standardabweichung von $1,54 \pm 0,05$ ms und zwei Kinetiken mit Amplituden und Zeitkonstanten von $a_1 = 6 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 17 \pm 8$ μ s, $a_2 = 22 \pm 2$ % mit $\tau_2 = 433 \pm 136$ ns, wobei die erste Kinetik aufgrund ihres geringen, nicht signifikanten Anteils vernachlässigt werden kann (Abb. 11 b). Die ACF, welche sich aus FCS-Messungen der LBD in einem ungebundenen Apo-Zustand ergibt, wird mit einem mathematischen Modell, welches zusätzlich zur molekularen Diffusion drei weitere exponentielle Relaxationen beschreibt, angenähert (Abb. 11 a). Dem Fit können eine Diffusionszeit von $1,71 \pm 0,04$ ms sowie signifikante Amplituden mit dazugehörigen Zeitkonstanten der drei Relaxationen von $a_1 = 12 \pm 2$ % mit $\tau_1 = 170 \pm 22$ μ s, $a_2 = 12 \pm 2$ % mit $\tau_2 = 8 \pm 1$ μ s und $a_3 = 17 \pm 6$ % mit $\tau_3 = 482 \pm 190$ ns entnommen werden (Abb. 11 b). Nach erneuter Zugabe des Agonisten Glutamat zu der isolierten LBD nach Dialyse wurde eine ACF gemessen, die zusätzlich zum exponentiellen Abfall der Diffusion zwei weitere exponentielle Abfälle, welche Kinetiken im sub-ms-Bereich darstellen, aufweist (Abb. 11 a). Dabei kann eine Diffusionszeit von $1,56 \pm 0,02$ ms und Amplituden und Zeitkonstanten der Kinetiken von $a_1 = 4 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 31 \pm 19$ μ s und $a_2 = 14 \pm 3$ % mit $\tau_2 = 322 \pm 248$ ns bestimmt werden, wobei die erste Kinetik aufgrund der geringen, nicht-signifikanten Amplitude wiederum vernachlässigt werden kann (Abb. 11 b).

Demnach ergeben sich auch für die LBD der GluN2A-Untereinheit im ungebundenen Apo-Zustand drei signifikante Kinetiken im Bereich von ~ 100 μ s, ~ 10 μ s und $\sim 0,5$ μ s, welche nach Zugabe des Agonisten Glutamat größtenteils zum Stillstand kommen. Da auch hier nur ein Cystein-Rest und kein Tryptophan-Rest eingebracht wurde, ergeben sich die Fluoreszenzfluktuationen nicht aufgrund eines PET-Löschmechanismus, sondern vielmehr durch Veränderungen der Polarität der Mikroumgebung des umgebungssensitiven ATTO Oxa 11-Fluoreszenzfarbstoffes.

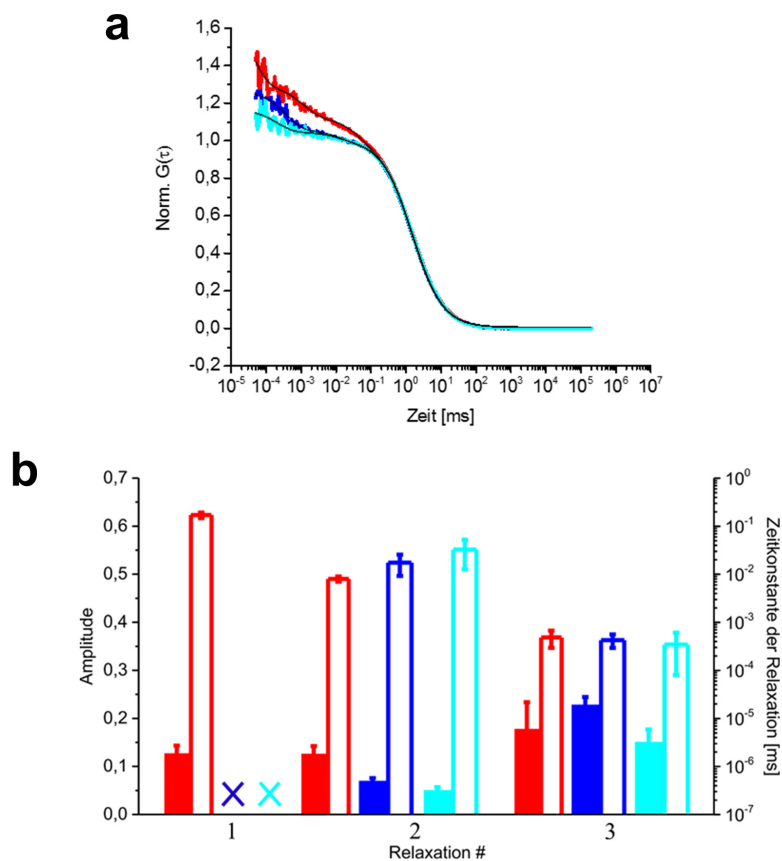


Abbildung 11: Messungen der Dynamiken der isolierten Ligandenbindedomäne der GluN2A-Untereinheit eines NMDA-Rezeptors im Agonist-gebundenen sowie im ungebundenen Apo-Zustand mittels PET-FCS. (a) Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus des Konstruktes GluN2A LBD T481C (a). Die ACF der Messung mit Agonist-gebundenem Protein vor der Dialyse ist in Dunkelblau dargestellt. Die Messung des Proteins im ungebundenen Apo-Zustand ist in Rot dargestellt. Die Messung des Proteins im Glutamat-gebundenen Zustand nach erneuter Zugabe des Agonisten nach Dialyse ist in Cyan dargestellt. Die schwarzen Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die zweidimensionale molekulare Diffusion von Molekülen mit zwei oder drei zusätzlichen exponentiellen Relaxationen dar. (b) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen. Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unangefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

Alles in allem können die Relaxationen der ACFs im sub-ms-Bereich der GluR2 LBD, GluN1 LBD und GluN2A LBD in ihrem ungebundenen Apo-Zustand durch drei zusätzliche Exponenten beschrieben werden (Abb. 7 b,d; Abb. 10 a,b; Abb. 11 a,b). Zur Beschreibung der Relaxationen auf sub-ms-Zeitskalen der ungebundenen GluR5 LBD werden hingegen vier zusätzliche Exponenten benötigt (Abb. 8 b,d). In allen gemessenen Konstrukten befinden sich die vorherrschenden Kinetiken, welche die Bewegung der LBD beschreiben, auf Zeitskalen von $\sim 100\text{-}200\ \mu\text{s}$, $\sim 10\text{-}$

20 μ s, \sim 1 μ s und \sim 0,5 μ s. Durch die Anwesenheit des Agonisten kommen die Konformationsdynamiken im μ s-Bereich bei allen Konstrukten sowohl vor als auch nach der Dialyse des Proteins jeweils in einem ähnlichen Maße zum Stillstand.

4.2 Untersuchung der Dimerisierung der homologen Ligandenbindedomänen

Da bekannt ist, dass die Ligandenbindedomänen der iGluRs innerhalb der intakten, funktionsfähigen Vollängenrezeptoren Dimere ausbilden, wurden im Rahmen einer Versuchsreihe die Dynamiken einer isolierten LBD innerhalb eines Dimers im Vergleich zu denen der LBD als Monomer von Homologen der drei Untergruppen AMPAR, KainateR und NMDAR untersucht. Hierfür wurden die LBDs als Monomere sowie innerhalb eines Dimers sowohl im Agonist-gebundenen Zustand als auch in einem ungebundenen Apo-Zustand untersucht. Da isolierte LBDs in Lösung bei Proteinkonzentrationen geringer als mg/ml für gewöhnlich keine Dimere ausbilden, wurden jeweils Mutationen in die Dimer-Verbindungsflächen der LBDs eingefügt, welche den K_d -Wert für die Dimerisierung herabsetzen und dadurch die Ausbildung von Dimeren bereits bei geringeren Proteinkonzentrationen begünstigen^{45,56,59}. In die LBD der GluR2(flip)-Untereinheit wurde hierfür das Leucin (L) an Position 483 zu Tyrosin (Y) mutiert, sodass die isolierten LBDs Homodimere ausbilden⁴⁵. Innerhalb der LBD der KainateR GluR5-Untereinheit wurde analog zu dem Asparaginsäure-Rest (D) an Position 776 der GluR6-Untereinheit die Asparaginsäure an Position 791 zu einem Lysin-Rest (K) mutiert, um eine Ausbildung von Homodimeren der LBDs zu erreichen⁵⁸. In der isolierten LBD der NMDAR GluN1-Untereinheit wurde das Asparagin (N) an Stelle 521 zu Tyrosin und in der GluN2A-Untereinheit die Glutaminsäure (E) an Stelle 516 ebenfalls zu Tyrosin mutiert, sodass die LBDs dieser beiden Untereinheiten Heterodimere in Lösung ausbilden⁵⁹.

Das Homodimer, bestehend aus zwei Ligandenbindedomänen der GluR2(flip)-Untereinheit, wurde gebildet, indem zu dem Konstrukt, welches zusätzlich zum PET-Reportersystem die L483Y-Mutation trägt (GluR2 LBD G446C-T685W-L483Y), ein Überschuss der LBD, welche ausschließlich die L483Y-Mutation zur Dimerisierung trägt (GluR2 LBD L483Y), gegeben wurde. Anschließend wurden nach Zugabe von Glutamat FCS-Messungen der dimerisierten LBDs in ihrem Agonist-gebundenen Zustand durchgeführt. Die ACF, welche hierbei gemessen

wurde, kann durch ein mathematisches Modell, welches zusätzlich zur zweidimensionalen molekularen Diffusion einen weiteren Exponenten beschreibt, angenähert werden (Abb. 12 a). Dabei kann für die Diffusionszeit τ_D ein Wert mit Standardabweichung von $2,22 \pm 0,03$ ms ermittelt werden. Die zusätzliche Relaxation zeigt eine Amplitude von 33 ± 9 % und eine Zeitkonstante von 168 ± 42 ns (Abb. 12 c). Die ACF des farbstoffmarkierten Konstruktes GluR2 LBD G446C-T685W-L483Y, welches aufgrund der zu geringen Proteinkonzentration kein Dimer ausbildet, wurde ebenfalls mittels eines mathematischen Modells mit einer weiteren exponentiellen Relaxation zusätzlich zu der molekularen Diffusion angenähert (Abb. 12 a). Dadurch wurden für die Diffusionszeit ein Wert von $1,87 \pm 0,01$ ms und für die zusätzliche Relaxation eine Amplitude von 12 ± 5 % und eine Zeitkonstante von 416 ± 134 ns ermittelt (Abb. 12 c). Unter Einbeziehung der jeweiligen Standardabweichung kann festgestellt werden, dass sowohl die Amplitude als auch die dazugehörige Zeitkonstante bei der Messung der LBD als Monomer und als Dimer in der gleichen Größenordnung liegen, wodurch kein signifikanter Unterschied in den Dynamiken besteht. Allerdings kann eine deutliche Erhöhung der Diffusionszeit des Dimers im Vergleich zum monomeren Protein um ca. 19 % festgestellt werden.

Daraufhin wurden die Dynamiken des farbstoffmarkierten Konstruktes GluR2 LBD G446C-T685W-L483Y innerhalb eines Dimers im ungebundenen Apo-Zustand nach Zugabe eines Überschusses des unmarkierten Konstruktes GluR2 LBD L483Y ebenfalls im ungebundenen Apo-Zustand gemessen. Aufgrund der gemessenen ACF, welche mittels eines mathematischen Modells mit drei weiteren exponentiellen Abfällen zusätzlich zu dem exponentiellen Abfall der molekularen Diffusion beschrieben werden kann, wird eine Diffusionszeit mit Standardabweichung des Dimers von $2,61 \pm 0,05$ ms festgestellt (Abb. 12 b). Für die drei zusätzlichen Relaxationen werden Amplituden mit dazugehörigen Zeitkonstanten von $a_1= 10 \pm 1$ % mit $\tau_1= 438 \pm 65$ μ s, $a_2= 7 \pm 1$ % mit $\tau_2= 7 \pm 3$ μ s und $a_3= 35 \pm 10$ % mit $\tau_3= 193 \pm 79$ ns ermittelt (Abb. 12 d). Die ACF der FCS-Messung des Konstruktes GluR2 LBD G446C-T685W-L483Y, welches aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen kein Dimer ausbilden sollte, wurde ebenfalls mit einem mathematischen Modell, welches die zweidimensionale Diffusion und drei zusätzliche Exponenten beschreibt, angenähert (Abb. 12 b). Für das Monomer im ungebundenen Apo-Zustand kann hierbei eine Diffusionszeit von $1,99 \pm 0,03$ ms festgestellt werden. Die drei zusätzlichen Relaxationen weisen Amplituden und Zeitkonstanten von $a_1= 19 \pm 3$ % mit $\tau_1= 68 \pm 20$ μ s, $a_2= 25 \pm 3$ % mit $\tau_2= 3 \pm 1$ μ s und $a_3= 55 \pm 10$ % mit $\tau_3= 101 \pm 5$ ns auf (Abb. 12 d).

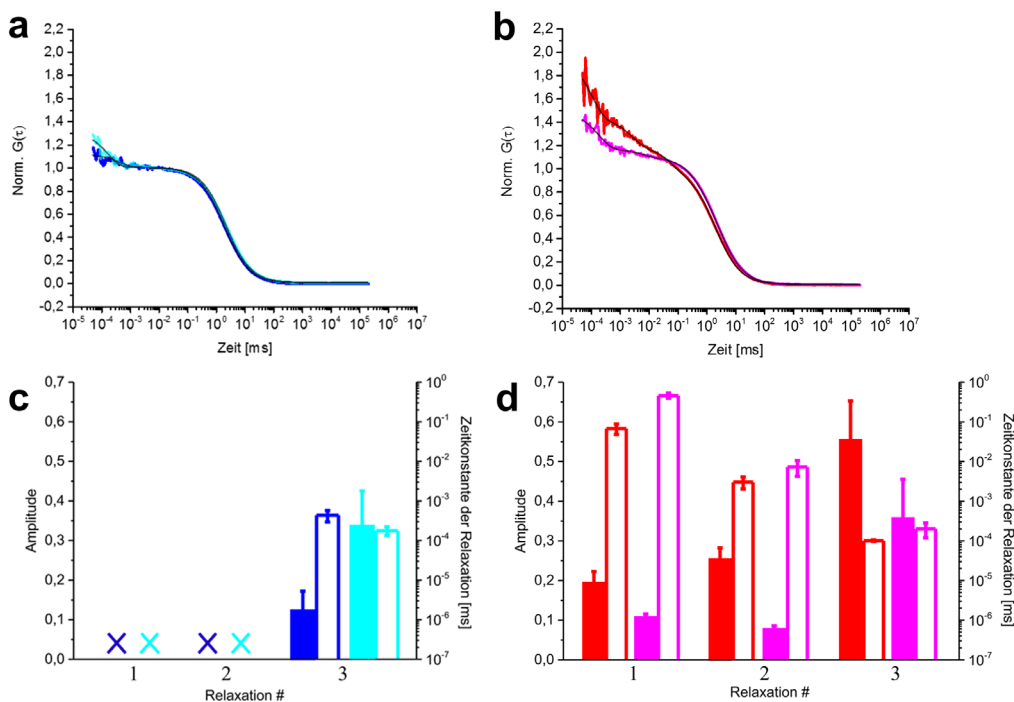


Abbildung 12: Dynamiken der LBD der AMPAR GluR2-Untereinheit innerhalb eines Homodimers. Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus des Konstruktes GluR2 LBD G446C-T685W-L483Y + L-Glu (Monomer; dunkelblau) und nach Zugabe eines Überschusses des Konstruktes GluR2 LBD L483Y+L-Glu (Dimer; cyan) (a) und des Konstruktes GluR2 LBD G446C-T685W-L483Y im ungebundenen Apo-Zustand (Monomer; rot) und nach Zugabe eines Überschusses des Konstruktes GluR2 LBD L483Y im ungebundenen Apo-Zustand (Dimer; magenta) (b). Die schwarzen Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die zweidimensionale Diffusion von Molekülen mit einer oder drei zusätzlichen exponentiellen Relaxationen dar. (c,d) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen des Konstruktes GluR2 LBD G446C-T685W-L483Y im Agonist-gebundenen Zustand mit (Dimer) und ohne (Monomer) Zugabe eines Überschusses des Agonist-gebundenen GluR2 LBD L483Y-Konstruktes (c) und des Konstruktes GluR2 LBD G446C-T685W-L483Y im ungebundenen Apo-Zustand mit (Dimer) und ohne (Monomer) Zugabe eines Überschusses des ungebundenen GluR2 LBD L483Y-Konstruktes (d). Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unausgefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a,b). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

Vergleicht man die Dynamiken der LBD als Monomer in ihrem ungebundenen Apo-Zustand mit denen der LBD innerhalb eines Dimers ebenfalls in einem ungebundenen Apo-Zustand, fällt auf, dass die drei Relaxationen im sub-ms-Bereich, welche im Monomer beobachtet werden, im Dimer erhalten bleiben. Allerdings sind die Amplituden der drei Kinetiken der LBD innerhalb des Dimers wesentlich geringer als die, die beim Monomer festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die Konformationsdynamiken der LBD innerhalb des Dimers zumindest teilweise eingefroren werden. Zudem lassen sich vergleichen mit dem

Monomer signifikant erhöhte Zeitkonstanten der drei Relaxationen im sub-ms-Bereich innerhalb des Dimer-Konstruktes ermitteln, was auf eine signifikante Verlangsamung der Bewegungen der LBD innerhalb des Dimers hindeutet. Auch hinsichtlich der Diffusionszeit lässt sich bei der Messung des Dimers eine signifikante Erhöhung um ca. 31 % verglichen mit dem Monomer feststellen.

Wie beim Monomer lässt sich auch im Dimer bei Zugabe des Agonisten Glutamat feststellen, dass die Konformationsdynamiken der LBD teilweise zum Stillstand kommen, was sich durch ein Verschwinden der Relaxationen im μ s-Bereich äußert.

Da die Diffusionszeit τ_D eines globulären Proteins direkt proportional zu dessen hydrodynamischem Radius ist⁹⁹, wurden des Weiteren auf Grundlage der mittels FCS gemessenen Diffusionszeiten die hydrodynamischen Radii der LBDs bestimmt und mit dem Wert, der mittels Kristallstrukturdaten berechnet wurde, verglichen. Es kann beobachtet werden, dass die GluR2 LBD in Lösung unter allen Bedingungen (Monomer/Dimer; Apo/+ Glu) einen größeren hydrodynamischen Radius aufweist als den, der durch Kristallstrukturen ermittelt wurde. Zudem kann eine leichte Tendenz dahingehend festgestellt werden, dass der hydrodynamische Radius des Proteins im Apo-Zustand – ob Monomer oder Dimer – größer zu sein scheint als im jeweiligen Agonist-gebundenen Zustand. Bei Dimerisierung zeigen die hydrodynamischen Radii, welche basierend auf den gemessenen FCS-Daten berechnet wurden, eine Erhöhung um ca. 22 % im Agonist-gebundenen Zustand und 31 % im ungebundenen Apo-Zustand bei Dimerisierung (Tab. 6).

Tabelle 6: Hydrodynamische Radii der LBD der AMPAR GluR2-Untereinheit im Agonist-gebundenen sowie im ungebundenen Zustand jeweils als Monomer und Dimer ermittelt durch FCS-Messungen im Vergleich zu den auf Grundlage von Kristallstrukturen berechneten Werten. Werte für R_h , ermittelt durch FCS-Messungen, stellen Mittelwerte von mindestens drei Messungen bzw. im Falle des Apo-Dimers einer Messung \pm Standardabweichung dar (PDB IDs: 1FTO (Monomer/Dimer Apo); 1FTJ (Monomer/Dimer Glutamat-gebunden)).

	GluR2 Monomer Apo	GluR2 Monomer + Glu	GluR2 Dimer Apo	GluR2 Dimer + Glu
R_h (Kristall) (nm)	2,5	2,4	3,1	3,0
R_h (FCS) (nm)	$2,9 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$

Auch die LBD der KainateR GluR5-Untereinheit wurde als Monomer in ihrem Agonist-gebundenen und als Dimer in ihrem Agonist-gebundenen sowie ungebundenen Zustand gemessen (Abb. 13). Die ACF des Konstruktes GluR5 LBD K503C-K734W-D791K, welches sowohl das PET-Reportersystem als auch die

Mutante zur Dimerisierung enthält, zeigt in einem Agonist-gebundenen Zustand zusätzlich zu einer zweidimensionalen molekularen Diffusion zwei weitere exponentielle Relaxationen (Abb. 13 a). Aufgrund einer mathematischen Annäherung können dabei eine Diffusionszeit von $1,96 \pm 0,02$ ms und Relaxationen mit Amplituden und Zeitkonstanten von $a_1 = 19 \pm 2$ % mit $\tau_1 = 3 \pm 0,5$ μ s, $a_2 = 116 \pm 21$ % mit $\tau_2 = 227 \pm 23$ ns festgestellt werden (Abb. 13 c).

Des Weiteren wurde zu dem fluoreszenzmarkierten Konstrukt GluR5 LBD K503C-K734W-D791K das unmarkierte Konstrukt GluR5 LBD D791K im Überschuss zugegeben, um die Ausbildung eines Homodimers der beiden LBD-Konstrukte zu erreichen. Hierbei zeigte die ACF der FCS-Messungen zusätzlich zu einer Diffusionszeit von $2,31 \pm 0,01$ ms drei exponentielle Abfälle, welche Kinetiken mit Amplituden und dazugehörigen Zeitkonstanten von $a_1 = 12 \pm 0,5$ % mit $\tau_1 = 133 \pm 27$ μ s, $a_2 = 33 \pm 8$ % mit $\tau_2 = 4 \pm 2$ μ s und $a_3 = 140 \pm 34$ % mit $\tau_3 = 228 \pm 51$ ns beschreiben (Abb. 13 b,d). Durch eine Annäherung der ACF, welche mittels FCS-Messungen des Monomers des GluR5 LBD K503C-K734W-D791K-Konstruktes aufgenommen wurde, kann eine Diffusionszeit von $1,78 \pm 0,07$ ms mit ebenfalls drei zusätzlichen Relaxationen mit Amplituden und Zeitkonstanten von $a_1 = 41 \pm 3$ % mit $\tau_1 = 55 \pm 2$ μ s, $a_2 = 59 \pm 3$ % mit $\tau_2 = 3 \pm 1$ μ s und $a_3 = 65 \pm 4$ % mit $\tau_3 = 123 \pm 63$ ns festgestellt werden (Abb. 13 b,d). Alles in allem wird deutlich, dass die drei Relaxationen, welche das Monomer der LBD im ungebundenen Apo-Zustand aufweist, im ungebundenen Dimer erhalten bleiben. Allerdings kann auch hier eine Verringerung der Amplituden der Relaxationen im μ s-Bereich im Dimer im Vergleich zum Monomer beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass es – zumindest teilweise – zu einem Verlust der Konformationsdynamiken der LBD im μ s-Bereich kommt. Eine Ausnahme stellt a_3 dar, bei welcher eine deutliche Zunahme der Amplitude und somit der Konformationsdynamiken im ns-Bereich verzeichnet werden kann. Zudem kann auch, ähnlich wie bei der AMPAR LBD, innerhalb des Dimers eine Erhöhung der Zeitkonstanten – zumindest bei der Relaxation auf langsameren μ s-Zeitskalen – beobachtet werden, was auf eine Verlangsamung der Konformationsdynamiken der LBD auf diesen Zeitskalen hindeutet. Die Bindung eines Agonisten durch die LBD führt ähnlich wie die Dimerisierung der LBDs zu einer Verringerung der Amplitude der einen Relaxation im μ s-Bereich und zum vollständigen Verschwinden der zweiten μ s-Kinetiken, was auch hier darauf hindeutet, dass die Konformationsdynamiken im μ s-Bereich verringert bzw. vollständig zum Stillstand kommen. Zudem zeigt die Agonist-gebundene LBD, wie auch die LBD innerhalb des Dimers, eine starke Zunahme der Amplitude der Relaxation und

somit der Konformationsdynamiken im ns-Bereich. Darüber hinaus kann eine Erhöhung der Diffusionszeit um ca. 30 % des Dimers im Vergleich zum Monomer festgestellt werden.

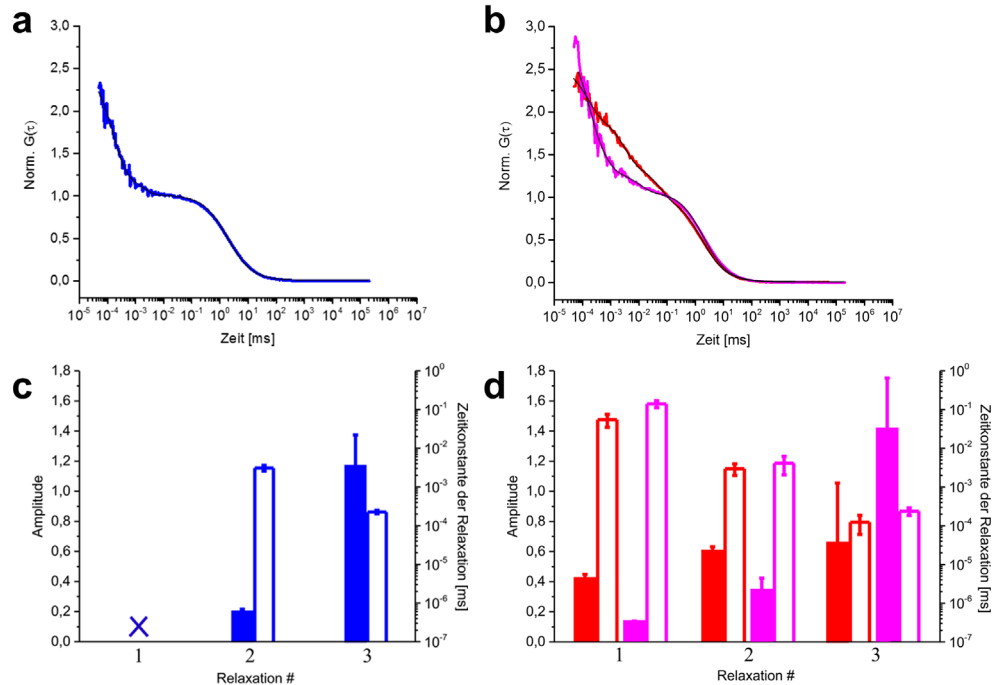


Abbildung 13: Dynamiken der LBD der KainateR GluR5-Untereinheit innerhalb eines Homodimers. Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus des Konstruktes GluR5 LBD K503C-K734W-D791K + L-Glu (Monomer; dunkelblau) (a) und des Konstruktes GluR5 LBD K503C-K783W-D791K im ungebundenen Apo-Zustand (Monomer; rot) und nach Zugabe eines Überschusses des Konstruktes GluR5 LBD D791K im ungebundenen Apo-Zustand (Dimer; magenta) (b). Die schwarzen Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die zweidimensionale Diffusion von Molekülen mit zwei oder drei zusätzlichen exponentiellen Relaxationen dar. (c,d) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen des Konstruktes GluR5 LBD K503C-K734W-D791K im Agonist-gebundenen Zustand (c) und des Konstruktes GluR5 LBD K503C-K734W-D791K im ungebundenen Apo-Zustand mit (Dimer) und ohne (Monomer) Zugabe eines Überschusses des ungebundenen GluR5 LBD D791K-Konstruktes (d). Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unausgefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a,b). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

Auch für die KainateR LBD wurden die hydrodynamischen Radii für Monomer und Dimer jeweils im Agonist-gebundenen Zustand und im ungebundenen Apo-Zustand zum einen mittels FCS-Messungen und zum anderen auf der Grundlage von Kristallstrukturen bestimmt (Tab. 7). Da für die GluR5 LBD nach derzeitigem Stand sowohl als Monomer als auch als Dimer im ungebundenen Apo-Zustand keine Kristallstrukturen verfügbar sind, konnten in diesen Fällen die hydrodynamischen Radii nicht bestimmt werden. Weiterhin wurde auch keine FCS-

Messung des GluR5 LBD Dimers im Glutamat-gebundenen Zustand durchgeführt, weshalb auch hier kein Wert für R_h bestimmt werden konnte. Vergleicht man den Wert des hydrodynamischen Radius, welcher aufgrund der Kristallstruktur für das Monomer der LBD im Glutamat-gebundenen Zustand ermittelt wurde, mit dem Wert für R_h , welcher mittels FCS-Messungen berechnet wurde, wird auch hier klar, dass mittels des löslichen Proteins ein größerer hydrodynamischer Radius bestimmt werden kann als auf der Grundlage von Kristallstrukturen. Anders als bei der AMPAR GluR2 LBD können allerdings keinerlei Unterschiede der hydrodynamischen Radii der GluR5 LBD im ungebundenen Apo-Zustand und im Glutamat-gebundenen Zustand festgestellt werden. Die Erhöhung der Diffusionszeit des Dimers im Vergleich zum Monomer wird auch durch eine Erhöhung des hydrodynamischen Radius um ca. 31 % des Dimers verglichen mit dem Monomer widergespiegelt (Tab. 7).

Tabelle 7: Hydrodynamische Radii der LBD der KainateR GluR5-Untereinheit im Agonist-gebundenen sowie im ungebundenen Zustand jeweils als Monomer und Dimer ermittelt durch FCS-Messungen im Vergleich zu den auf der Grundlage von Kristallstrukturen berechneten Werte. Werte für R_h , ermittelt durch FCS-Messungen, stellen Mittelwerte von jeweils drei Messungen \pm Standardabweichung (Monomer Glutamat-gebunden), zwei Messungen \pm Standardabweichung (Monomer Apo), einer Messung \pm Standardabweichung (Dimer Apo) dar (PDB IDs: 1TXF (Monomer Glutamat-gebunden); 2F36 (Dimer Glutamat-gebunden)). --- zeigt an, dass hier keine Strukturdaten verfügbar sind bzw. keine FCS-Daten aufgenommen wurden.

	GluR5 Monomer Apo	GluR5 Monomer + Glu	GluR5 Dimer Apo	GluR5 Dimer + Glu
R_h (Kristall) (nm)	----	2,3	---	3,1
R_h (FCS) (nm)	$2,6 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,1$	---

Zuletzt wurden die Dynamiken der LBD der NMDAR GluN1-Untereinheit innerhalb eines Heterodimers gemessen. Dafür wurde zu dem fluoreszenzmarkierten Konstrukt GluN1 LBD A480C-N521Y ein Überschuss des unmarkierten GluN2A LBD E516Y-Konstruktes zugegeben. Die ACF, welche aufgrund des Heterodimers im Glycin- und Glutamat-gebundenen Zustand gemessen wurde, kann mit einem mathematischen Modell, welches neben der molekularen Diffusion eine weitere exponentielle Relaxation beschreibt, angenähert werden (Abb. 14 a). Dabei können eine Diffusionszeit von $2,33 \pm 0,04$ ms und eine Amplitude und dazugehörige Zeitkonstante der zusätzlichen Relaxation von 15 ± 3 % mit $0,2 \pm 0,04$ μ s ermittelt werden (Abb. 14 c). Die ACF des Monomers des GluN1 LBD A480C-N521Y-Konstruktes kann

ebenfalls mit einem weiteren Exponenten zusätzlich zur Diffusion der Moleküle durch den Detektionsfokus beschrieben werden (Abb. 14 a). Dabei können eine Diffusionszeit von $1,73 \pm 0,01$ ms und eine Relaxation mit einer Amplitude und dazugehörigen Zeitkonstante von 5 ± 1 % mit $1,2 \pm 0,6$ μ s festgestellt werden, wobei die Relaxation in diesem Fall aufgrund der geringen, nicht-signifikanten Amplitude vernachlässigt werden kann (Abb. 14 c). Vergleicht man die Messungen der Dynamiken der LBD als Monomer mit denen der LBD innerhalb eines Heterodimers, fällt auf, dass es zu einer deutlichen Erhöhung der Diffusionszeit innerhalb des Dimers kommt. Die Amplituden sowie Zeitkonstanten der Relaxation befinden sich bei beiden Messungen in ähnlichen Größenordnungen, wobei die Relaxation im Falle der Messung des Monomers aufgrund des nicht signifikanten Anteils vernachlässigbar ist. Im Falle der Messung des Dimers befindet sich die Amplitude des Exponenten im unteren Signifikanzbereich. Zudem kann eine Erhöhung der Diffusionszeit um ca. 35 % bei Dimerisierung festgestellt werden.

Des Weiteren wurde das Heterodimer aus dem fluoreszenzmarkierten GluN1 LBD A480C-N521Y-Konstruktes mit einem Überschuss des unmarkierten GluN2A LBD E516Y-Konstruktes gebildet, wobei sich beide LBDs in ihrem ungebundenen Apo-Zustand befanden. Die ACF, die hierbei gemessen wurde, kann mit einem mathematischen Modell der zweidimensionalen molekularen Diffusion mit drei zusätzlichen Relaxationen beschrieben werden (Abb. 14 b). Dabei lassen sich aus der mathematischen Annäherung ein τ_D -Wert von $2,30 \pm 0,03$ ms und Amplituden sowie dazugehörige Zeitkonstanten der drei zusätzlichen exponentiellen Abfälle von $a_1 = 14 \pm 0,5$ % mit $\tau_1 = 450 \pm 75$ μ s, $a_2 = 10 \pm 0,5$ % mit $\tau_2 = 23 \pm 5$ μ s und $a_3 = 13 \pm 4$ % mit $\tau_3 = 1,6 \pm 0,3$ μ s ermitteln (Abb. 14 d). Zum Vergleich wurden auch Messungen des Monomers des GluN1 LBD A480C-N521Y-Konstruktes im ungebundenen Apo-Zustand durchgeführt. Auch hier wurde die ACF mit drei weiteren Exponenten zusätzlich zur Diffusion angenähert (Abb. 14 b). Dabei ergeben sich eine Diffusionszeit von $1,71 \pm 0,03$ ms und Amplituden und Zeitkonstanten für die zusätzlichen Relaxationen von $a_1 = 12 \pm 0,5$ % mit $\tau_1 = 114 \pm 19$ μ s, $a_2 = 15 \pm 1$ % mit $\tau_2 = 6 \pm 1$ μ s und $a_3 = 16 \pm 2$ % mit $\tau_3 = 0,3 \pm 0,1$ μ s (Abb. 14 d).

4 Ergebnisse

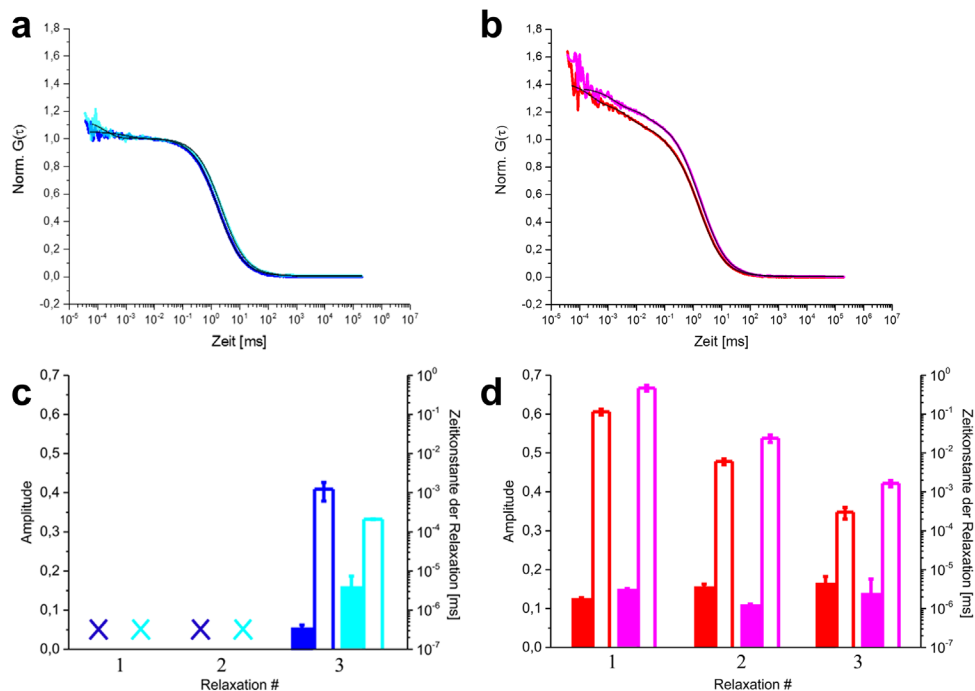


Abbildung 14: Dynamiken der LBD der NMDAR GluN1-Untereinheit innerhalb eines Heterodimers. Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus des Konstruktes GluN1 LBD A480C-N521Y + L-Glu (Monomer; dunkelblau) und nach Zugabe eines Überschusses des Konstruktes GluN2A LBD E516Y+ L-Glu (Dimer; cyan) (a) und des Konstruktes GluN1 LBD A480C-N521Y im ungebundenen Apo-Zustand (Monomer; rot) und nach Zugabe eines Überschusses des Konstruktes GluN2A LBD E516Y im ungebundenen Apo-Zustand (Dimer; magenta) (b). Die schwarzen Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die zweidimensionale Diffusion von Molekülen mit ein oder drei zusätzlichen exponentiellen Relaxationen dar. (c,d) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen des Konstruktes GluN1 LBD A480C-N521Y im Agonist-gebundenen Zustand mit (Dimer) und ohne (Monomer) Zugabe eines Überschusses des Agonist-gebundenen GluN2A LBD E516Y-Konstruktes (c) und des Konstruktes GluN1 LBD A480C-N521Y im ungebundenen Apo-Zustand mit (Dimer) und ohne (Monomer) Zugabe eines Überschusses des ungebundenen GluN2A LBD E516Y-Konstruktes (d). Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unausgefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a,b). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

Vergleicht man beide Messungen miteinander, fällt ähnlich zu den Messungen der LBDs im Agonist-gebundenen Zustand auch hier auf, dass sich die gemessene Diffusionszeit beim Dimer im Vergleich zum Monomer um ca. 35 % erhöht. Anders als bei den Messungen der AMPAR LBD und KainateR LBD kann hier innerhalb des Dimers keine signifikante Verringerung der Amplituden der Relaxationen der LBD verglichen mit dem Monomer festgestellt werden, was bedeutet, dass es zu keiner signifikanten Verringerung der Konformationsdynamiken der LBD innerhalb des Dimers kommt. Allerdings kann auch hier, analog zu den Messungen der AMPAR LBDs und KainateR LBDs, eine

signifikante Erhöhung der Zeitkonstanten der drei Relaxationen innerhalb des Dimers im Vergleich zum Monomer ermittelt werden, womit die Bewegungen der LBD bei Dimerisierung auch hier stark verlangsamt werden. Auch innerhalb des Dimers führt die Bindung von Agonisten dazu, dass die Konformationsdynamiken auf langsameren μs -Zeitskalen zum Stillstand kommen, was sich durch das Verschwinden der Relaxationen auf diesen Zeitskalen äußert.

Mit Hilfe der Diffusionszeiten, welche mittels FCS-Messungen bestimmt wurden, wurde der hydrodynamische Radius des Monomers der GluN1 LBD sowie des GluN1/GluN2A LBD Dimers sowohl im ungebundenen Apo-Zustand als auch im Agonist-gebundenen Zustand bestimmt und mit dem R_h -Wert, welcher aufgrund von Kristallstrukturdaten berechnet wurde, verglichen (Tab. 8). Anders als bei den AMPAR LBDs und den KainateR LBDs kann hier keinerlei Unterschied zwischen den hydrodynamischen Radii, welche aufgrund der LBDs in Lösung bestimmt wurden, im Vergleich zu denen, welche auf Grundlage der Kristallstrukturen berechnet wurden, festgestellt werden. Allerdings kann eine leichte Tendenz dahingehend beobachtet werden, dass die LBDs – ob als Monomer oder als Dimer – im Apo-Zustand einen größeren hydrodynamischen Radius aufweisen als in ihrem jeweiligen Agonist-gebundenen Zustand. Zudem wird die Erhöhung der Diffusionszeit des Dimers im Vergleich zum Monomer ebenfalls durch eine Zunahme des hydrodynamischen Radius des Dimers um ca. 33 % im Agonist-gebundenen Zustand und um 35 % im ungebundenen Zustand widerspiegelt.

Tabelle 8: Hydrodynamische Radii der LBD der NMDAR GluN1-Untereinheit im Agonist-gebundenen sowie im ungebundenen Zustand jeweils als Monomer und Dimer ermittelt durch FCS-Messungen im Vergleich zu den auf der Grundlage von Kristallstrukturen berechneten Werte. Werte für R_h , ermittelt durch FCS-Messungen, stellen Mittelwerte von jeweils drei Messungen \pm Standardabweichung dar (PDB IDs: 1PB7 (GluN1 LBD Monomer); 2A5T (GluN1/GluN2A LBD Dimer)). --- zeigt an, dass hier keine Strukturdaten verfügbar sind.

	GluN1 Monomer Apo	GluN1 Monomer + Gly	GluN1/ GluN2A Dimer Apo	GluN1/ GluN2A Dimer + Gly/Glu
R_h (Kristall) (nm)	2,6	2,5	---	3,2
R_h (FCS) (nm)	$2,6 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,4$

4.3 Untersuchung der allosterischen Kommunikation zwischen isolierten Ligandenbindedomänen von NMDA-Rezeptoren

In den vergangenen Jahrzehnten wurde auf Grundlage entsprechender Untersuchungen wiederholt die Auffassung vertreten, dass innerhalb eines intakten, funktionsfähigen iGluR-Vollängenrezeptors eine allosterische Kopplung zwischen den beiden LBDs eines Dimers besteht^{44,100}. Vor dem Hintergrund dieser Annahme wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, welche dem Zweck diente, allosterische Kommunikation innerhalb eines LBD-Dimers zu untersuchen. Hierfür eignen sich die LBDs der NMDA-Rezeptoren besonders gut, da diese anders als die LBDs von AMPA- und Kainate-Rezeptoren obligatorisch Heterodimere ausbilden, wobei die LBD der GluN1-Untereinheit ausschließlich Glycin (Gly) bindet, wohingegen die LBD der GluN2A-Untereinheit ausschließlich Glutamat (Glu) bindet. Allosterische Kommunikation von NMDAR LBDs wurde mit Hilfe eines Versuchsaufbaus untersucht, mittels welchem die Auswirkungen der Bindung von Glutamat an die LBD der GluN2A-Untereinheit auf die Dynamiken der GluN1 LBD innerhalb eines Heterodimers bestehend aus den Konstrukten GluN1 LBD A480C-N521Y und GluN2A LBD E516Y beobachtet werden konnten (Abb. 15 a).

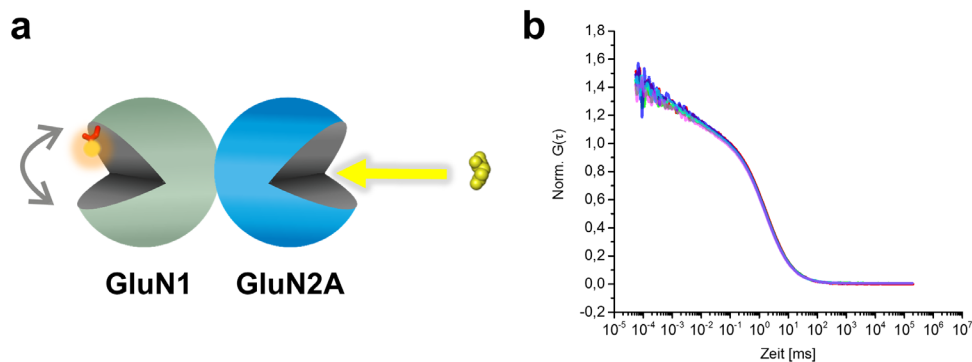


Abbildung 15: Allosterische Kommunikation der Dynamiken von LBDs innerhalb eines NMDAR LBD Dimers. (a) Entwicklung des Reportersystems zur Untersuchung der Auswirkungen der Bindung des Agonisten Glutamat an die GluN2A LBD auf die Konformationsdynamiken der GluN1 LBD (grauer Pfeil) aufgrund von allosterischer Kommunikation. Das eingebrachte Cystein mit angehängtem Fluoreszenzfarbstoff ist in Rot und der Agonist Glutamat als gelbe Sphären dargestellt. (b) Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) der Kontrollmessungen des Monomers des GluN1 LBD A480C-N521Y-Konstruktes im ungebundenen Apo-Zustand (rot) sowie in Anwesenheit von 40 μM (hellgrün), 200 μM (dunkelblau), 500 μM (cyan) und 1 mM (magenta) L-Glutamat.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Kontrollmessungen des GluN1 LBD A480C-N521Y-Monomers im ungebundenen Apo-Zustand sowie in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Agonisten Glutamat (40 μ M, 200 μ M, 500 μ M, 1 mM) durchgeführt (Abb 15 b). Die ACFs der Messungen und somit auch die daraus abgeleiteten Dynamiken der LBD in Anwesenheit von bis zu 1 mM Glutamat unterscheiden sich nicht von denen der GluN1 LBD im ungebundenen Apo-Zustand. Diese Beobachtung unterstützt die Tatsache, dass gegebenenfalls auftretende Änderungen in der Dynamik der GluN1 LBD innerhalb des Dimers in Anwesenheit des Agonisten Glutamat tatsächlich auf allosterische Kommunikation zurückzuführen sind und nicht aus direkten Wechselwirkungen des Glutamats mit der GluN1 LBD resultieren.

Zunächst wurde das Heterodimer, bestehend aus dem fluoreszenzmarkierten GluN1 LBD A480C-N521Y-Konstrukt und dem unmarkierten GluN2A LBD E516Y-Konstrukt, in Anwesenheit des Agonisten Glycin gemessen. Die FCS-Messungen ergaben hierbei eine ACF, welche mit einem weiteren Exponenten zusätzlich zur molekularen Diffusion angenähert wurde, woraus eine Diffusionszeit von $2,08 \pm 0,03$ ms und eine Amplitude mit dazugehöriger Zeitkonstante der zusätzlichen Relaxation von 15 ± 7 % mit $0,2 \pm 0,09$ μ s resultiert (Abb. 16 a,b). Daraus geht hervor, dass die Anwesenheit von Glycin, welches ein voller Agonist für die LBD der GluN1-Untereinheit darstellt, ein Einfrieren der Konformationsdynamiken im μ s-Bereich eben dieser LBD innerhalb des Heterodimers bewirkt, eine Schlussfolgerung, die aufgrund des Verschwindens der Relaxationen auf diesen Zeitskalen gezogen werden kann.

Anschließend wurde das Heterodimer der beiden NMDAR LBDs in Anwesenheit des Agonisten Glutamat untersucht. Die ACF wurde mit einem mathematischen Modell, welches zusätzlich zur molekularen Diffusion zwei weitere Relaxationen auf schnelleren Zeitskalen beschreibt, angenähert (Abb. 16 a). Hierbei können eine Diffusionszeit von $2,23 \pm 0,03$ ms und Amplituden und dazugehörige Zeitkonstanten der Relaxationen von $a_1 = 4 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 70 \pm 17$ μ s, $a_2 = 8 \pm 1$ % mit $\tau_2 = 0,9 \pm 0,5$ μ s festgestellt werden (Abb. 16 b). Beide Kinetiken sind hierbei aufgrund ihrer geringen, nicht-signifikanten Amplituden vernachlässigbar. Anhand dieser Messung wird deutlich, dass die Anwesenheit von Glutamat, welches ausschließlich an die GluN2A LBD bindet, ebenfalls – ähnlich wie Glycin – bewirkt, dass die Konformationsdynamiken der GluN1 LBD, welche im ungebundenen Apo-Zustand auftreten, durch allosterische Kommunikation zwischen den beiden LBDs zum Stillstand kommen. Diese Schlussfolgerung kann aufgrund des Verschwindens der Kinetiken im 450 μ s-Bereich und im 20 μ s-

Bereich, welche das Dimer im Apo-Zustand aufweist, gezogen werden. Von der Tatsache, dass die LBDs bei der entsprechenden Messung als Dimer vorliegen, kann aufgrund der erhöhten Diffusionszeit ausgegangen werden.

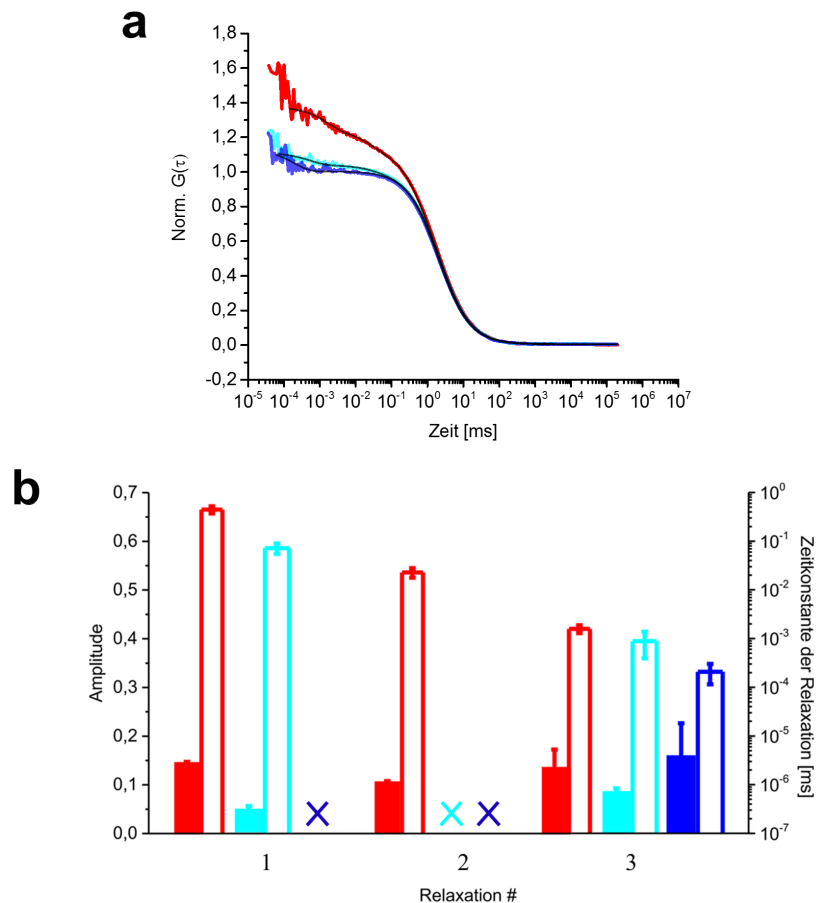


Abbildung 16: Allosterische Kommunikation der Konformationsdynamiken der NMDAR LBDs innerhalb eines Heterodimers. (a) Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus der Dynamiken der GluN1 LBD innerhalb eines Heterodimers, bestehend aus den Konstrukten GluN1 LBD A480C-N521Y und GluN2A LBD E516Y im ungebundenen Apo-Zustand (rot). Die ACFs dieses Konstruktes in Anwesenheit der Agonisten Glycin oder L-Glutamat sind jeweils in Dunkelblau und Cyan dargestellt. (b) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen der Dynamiken der GluN1 LBD innerhalb des Heterodimers in Abwesenheit von Agonisten sowie in Anwesenheit des Agonisten Glycin oder Glutamat. Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unausgefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

Für weitere Untersuchungen der allosterischen Kommunikation der NMDAR LBDs wurde ein Tyrosin-Rest (Y) an Position 535 in der Dimer-Verbindungsfläche der GluN1 LBD zu Serin (S) mutiert, wodurch die aromatische Seitenkette an dieser Stelle entfernt wurde⁵⁹. Es ist literaturbekannt, dass der Rest Y535 als allosterischer

Modulator wirkt und eine wichtige Rolle bei der Deaktivierung des Rezeptors spielt⁵⁹.

Zu diesem Zweck wurde zunächst das Konstrukt GluN1 LBD A480C-N521Y-Y535S als Monomer in seinem ungebundenen Apo-Zustand gemessen. Hierbei können neben einer Diffusionszeit von $1,90 \pm 0,02$ ms drei zusätzliche Relaxationen mit signifikanten Amplituden und dazugehörigen Zeitkonstanten von $a_1 = 15 \pm 1$ % mit $\tau_1 = 146 \pm 15$ μ s, $a_2 = 17 \pm 2$ % mit $\tau_2 = 9 \pm 1$ μ s und $a_3 = 27 \pm 9$ % mit $\tau_3 = 0,3 \pm 0,2$ μ s aus der mathematischen Annäherung der ACF ermittelt werden (Abb. 17 a,b). Vergleicht man die Kinetiken dieses Konstruktes mit den gemessenen Kinetiken des Konstruktes GluN1 LBD A480C-N521Y, fällt auf, dass die Y535S-Mutation keinen signifikanten Einfluss auf die Dynamiken der GluN1 LBD hat (Abb. 14 b,d; 17 a,b). In Anwesenheit von Glycin können für das Konstrukt GluN1 LBD A480C-N521Y-Y535S eine Diffusionszeit von $1,63 \pm 0,005$ ms und nur eine zusätzliche Relaxation mit einer Amplitude und Zeitkonstante von 6 ± 1 % mit 3 ± 1 μ s beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Konformationsdynamiken der LBD durch den Agonisten Glycin zum Stillstand kommen, was ebenfalls dafür spricht, dass die Mutation des Tyrosins an Position 535 keinen signifikanten Einfluss auf die Dynamiken der GluN1 LBD hat (Abb. 17 a,b).

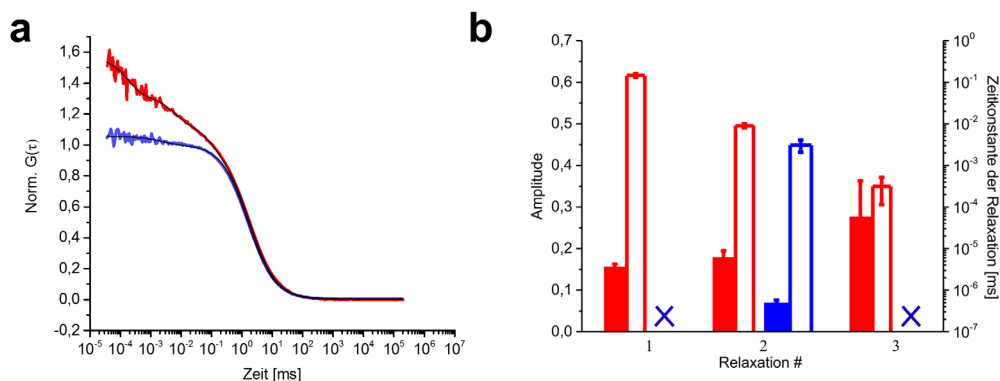


Abbildung 17: Messungen der Dynamiken der GluN1 LBD mit der Mutation Y535S im Agonist-gebundenen sowie im ungebundenen Apo-Zustand mittels PET-FCS. (a) Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus der Dynamiken des Konstruktes GluN1 LBD A480C-N521Y-Y535S im Agonist-gebundenen Zustand (dunkelblau) sowie im ungebundenen Apo-Zustand (rot). (b) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen der Dynamiken der GluN1 LBD im Apo-Zustand sowie in Anwesenheit des Agonisten Glycin. Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unausgefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der Y535S-Mutation auf die allosterische Kommunikation zwischen den LBDs innerhalb des GluN1/GluN2A-Dimers untersucht. Hierfür wurde zunächst das Heterodimer, bestehend aus den Konstrukten GluN1 LBD A480C-N521Y-Y535S und GluN2A LBD E516Y, im Apo-Zustand gemessen. Die hieraus resultierende ACF wurde mit einem mathematischen Modell für die zweidimensionale molekulare Diffusion mit drei zusätzlichen Exponenten angenähert, wobei eine Diffusionszeit von $2,47 \pm 0,15$ ms und Amplituden sowie Zeitkonstanten für die Relaxationen von $a_1 = 20 \pm 3$ % mit $\tau_1 = 390 \pm 108$ μ s, $a_2 = 19 \pm 1$ % mit $\tau_2 = 7 \pm 2$ μ s und $a_3 = 34 \pm 13$ % mit $\tau_3 = 0,15 \pm 0,08$ μ s ermittelt werden konnten (Abb. 18 a,b). Somit wird offensichtlich, dass die Kinetiken der Bewegungen der GluN1 LBD innerhalb des Heterodimers auch mit der Mutation Y535S erhalten bleiben und die Parameter der Kinetiken in derselben Größenordnung liegen wie die Parameter der Kinetiken der GluN1 LBD ohne Y535S-Mutation innerhalb des Dimers, wodurch ersichtlich wird, dass die Ausbildung eines LBD Dimers durch die Mutation nicht negativ beeinflusst wird. Dass hierbei ein Dimer der LBDs vorliegt, ist wiederum durch die erhöhte Diffusionszeit ersichtlich.

In Anwesenheit der Agonisten Glycin und Glutamat wurde eine ACF gemessen, durch welche eine Diffusionszeit von $2,06 \pm 0,02$ ms und Amplituden und Zeitkonstanten zweier zusätzlicher Kinetiken von $a_1 = 8 \pm 0,5$ % mit $\tau_1 = 74 \pm 3$ μ s, $a_2 = 18 \pm 5$ % mit $\tau_2 = 0,3 \pm 0,1$ μ s festgestellt werden, wobei die erste Kinetik aufgrund der geringen, nicht-signifikanten Amplitude vernachlässigt werden kann (Abb. 18 a,b). Aufgrund dieser FCS-Messung wird deutlich, dass die Kinetiken der GluN1 LBD im Bereich von ~ 400 μ s und ~ 10 μ s auch mit Y535S-Mutation innerhalb des GluN1/GluN2A-Dimers in Anwesenheit von Glycin zum Stillstand kommen. Des Weiteren wurde dem Dimer, bestehend aus GluN1 LBD A480C-N521Y-Y535S und GluN2A LBD E516Y, ausschließlich der Agonist Glutamat zugefügt. Die ACF, welche hierbei gemessen wurde, zeigt zusätzlich zu einer Diffusionszeit von $2,61 \pm 0,19$ ms drei zusätzliche Kinetiken mit $a_1 = 22 \pm 4$ % mit $\tau_1 = 293 \pm 89$ μ s, $a_2 = 18 \pm 1$ % mit $\tau_2 = 7 \pm 2$ μ s und $a_3 = 52 \pm 11$ % mit $\tau_3 = 0,2 \pm 0,04$ μ s, wobei die Amplituden und Zeitkonstanten hierbei in denselben Größenordnungen liegen wie die Parameter, welche für die Kinetiken des Dimers mit Y535-Mutation im Apo-Zustand gemessen wurden (Abb. 18 a,b). Demzufolge ist deutlich zu erkennen, dass die Anwesenheit des Agonisten Glutamat hier so gut wie keine Auswirkungen auf die Kinetiken der Konformationsdynamiken der GluN1 LBD hat, was im Widerspruch zu den Ergebnissen steht, welche mittels des GluN1/GluN2A-Dimers ohne Y535S-Mutation erzielt wurden (Abb. 16 a,b; 18

a,b). Auf Grundlage dieser Beobachtung können Rückschlüsse darauf gezogen werden, dass die Mutation des Y535-Restes zu Serin die allosterische Übertragung der Bewegungen der GluN2A LBD auf die GluN1 LBD unterbindet, was wiederum darauf hindeutet, dass der Tyrosin-Rest an Stelle 535 eine wichtige Rolle bezüglich der allosterischen Kopplung der NMDAR LBDs spielt. Von einer Ausbildung eines Dimers der LBDs kann auch hier aufgrund der erhöhten Diffusionszeit ausgegangen werden.

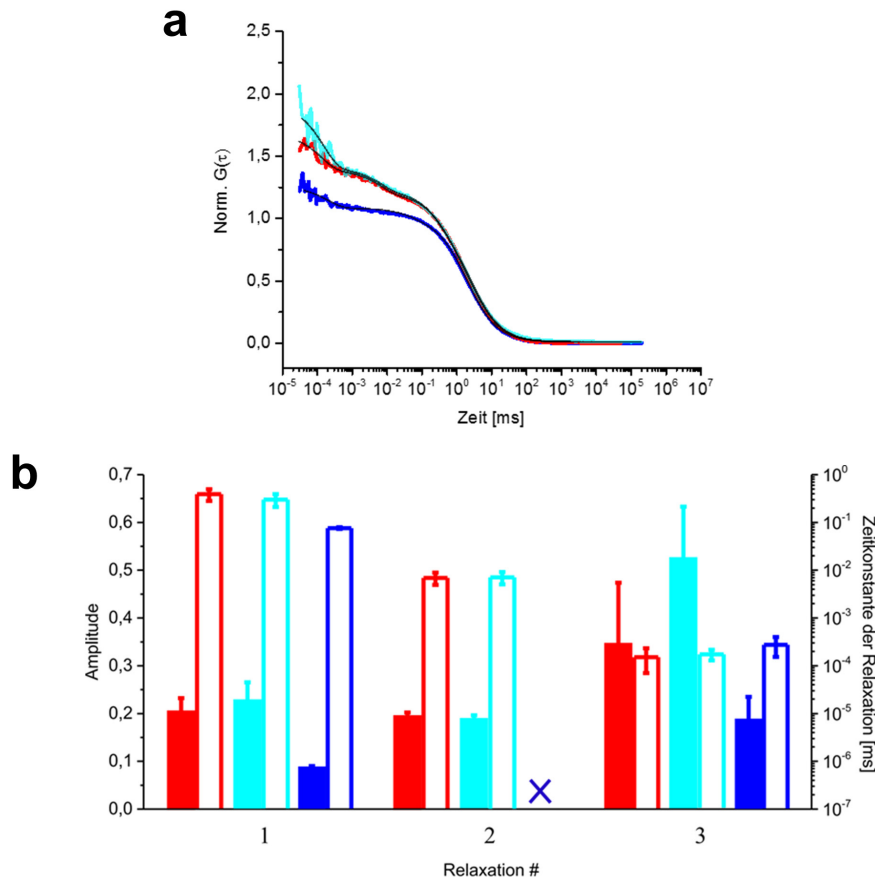


Abbildung 18: Allosterische Kommunikation der Konformationsdynamiken der NMDAR LBDs innerhalb eines Heterodimers mit der Mutation Y535S in der GluN1 LBD. (a) Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus der Dynamiken der GluN1 LBD innerhalb eines Heterodimers, bestehend aus den Konstrukten GluN1 LBD A480C-N521Y-Y535S und GluN2A LBD E516Y im ungebundenen Apo-Zustand (rot) und in Anwesenheit der Agonisten Glycin und L-Glutamat (dunkelblau) sowie nur L-Glutamat (cyan). (b) Säulendiagramme der aus den mathematischen Fits extrahierten Parameter der Relaxationen der Dynamiken der GluN1 LBD innerhalb des Heterodimers in Abwesenheit von Agonisten sowie in Anwesenheit der Agonisten Glycin und/oder L-Glutamat. Die Amplituden der Relaxationen (ausgefüllte Säulen) und die dazugehörigen Zeitkonstanten (unausgefüllte Säulen) stimmen farblich mit den ACFs überein (a). Die Kreuze (X) kennzeichnen fehlende bzw. nicht nachgewiesene Kinetiken.

4.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante von Glutamat für die Bindung an die Ligandenbindedomäne der GluR2-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors

Mit Hilfe der PET-FCS-Methode wurde außerdem die Dissoziationskonstante (K_d) für die Bindung von L-Glutamat an die LBD der GluR2(flip)-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors bestimmt. Hierfür wurde sich der Sachverhalt zu Nutze gemacht, dass die Konformationsdynamiken der LBD durch die Bindung des Agonisten Glutamat zum Stillstand kommen. Dies wird wiederum durch eine Verringerung der Amplituden der entsprechenden Kinetiken, welche sich in exponentiellen Abfällen der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ äußern, widergespiegelt. Unter dieser Voraussetzung wurden der GluR2(flip) LBD der Agonist Glutamat in steigender Konzentration bis zu einer Sättigungskonzentration von 1,024 mM zugefügt und die Amplituden der Kinetiken durch eine mathematische Annäherung der ACFs bestimmt. Die Summe der Amplituden der einzelnen Kinetiken fungiert hierbei als Maß für die Bindung des Glutamats an die LBD. Nachdem für jede Messung die Summe der Amplituden der Kinetik/en mit dazugehöriger Standardabweichung in Abhängigkeit der Glutamat-Konzentration aufgetragen wurde, ergab sich bei linearer Auftragung der Glutamat-Konzentration ein Kurvenverlauf, welcher einen exponentiellen Zerfallsprozess beschreibt und bei logarithmischer Auftragung der Glutamat-Konzentration eine Kurve mit sigmoidem Verlauf (Abb. 19 a,b). Für das hier vorliegende System wird die Annahme getroffen, dass die Bindung und Dissoziation eines Liganden an jede einzelne Ligandenbindedomäne einen stochastischen Prozess darstellt. Zudem wird von einem stationären Vorgang ausgegangen, bei welchem die Rate der Bindung des Liganden (Assoziationsratenkonstante k_{on}) gleich der Rate der Freisetzung des Liganden (Dissoziationsratenkonstante k_{off}) ist. Weiterhin ändert sich die Gesamtkonzentration der LBDs über die Zeit nicht, wobei die LBDs außerdem gleichartig und gleichermaßen zugänglich für den Liganden Glutamat sind. Unter diesen Voraussetzungen kann hier ein mathematisches Modell zur Annäherung der Kurven verwendet werden, welches die Bindung einer einzigen Art von Ligand an einen homogenen Bestand von LBDs beschreibt¹⁰¹:

$$[RL] = \frac{[L][R_T]}{[L] + K_d}$$

$$\frac{[RL]}{[R_T]} = \frac{[L]}{[L]+K_d} \quad [13]$$

wobei $[RL]$ die Stoffmengenkonzentration der ligandengebundenen LBD, $[L]$ die Stoffmengenkonzentration des freien Liganden und $[R_T]$ die Gesamtkonzentration der Ligandenbindedomäne darstellt. Durch die mathematische Annäherung der Kurven kann ein K_d -Wert von $2,38 \pm 0,69 \mu\text{M}$ für die Bindung von L-Glutamat an die GluR2(flip) LBD ermittelt werden.

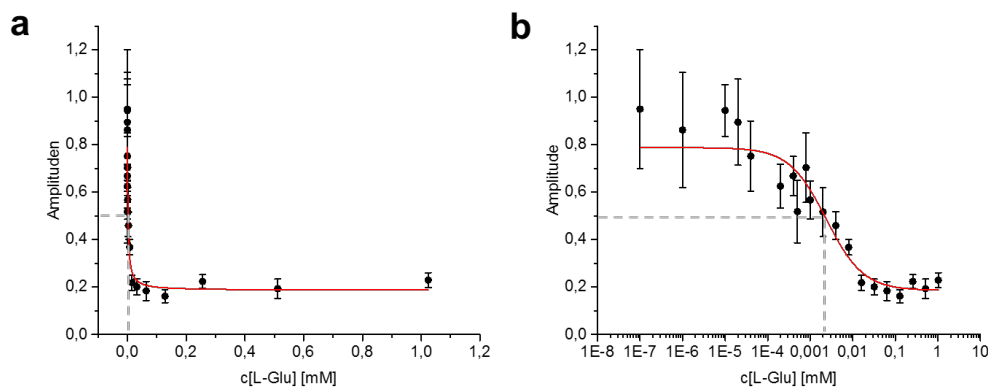


Abbildung 19: Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) der Bindung des Liganden Glutamat an die GluR2(flip) LBD. Die Summe der Amplituden der einzelnen Kinetik/en \pm Standardabweichung der Konformationsdynamiken der LBD in Anwesenheit steigender Konzentrationen des Glutamat-Liganden in Abhängigkeit der linear aufgetragenen Glutamat-Konzentration (a) bzw. der logarithmisch aufgetragenen Glutamat-Konzentration (b). Die roten Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die Bindung einer einzigen Art von Ligand an ein homogenes Repertoire von Ligandenbindedomänen dar. Die gestrichelten grauen Linien zeigen den Wendepunkt der Kurve und demnach den mittels mathematischer Annäherung ermittelten Wert für K_d an.

4.5 Untersuchung der Dynamiken einer Ligandenbindedomäne bei Bindung von vollen und partiellen Agonisten

In einer letzten Versuchsreihe wurde der Einfluss einer Reihe voller sowie partieller Agonisten auf die Konformationsdynamiken der GluR2(flip) LBD eines AMPA-Rezeptors untersucht. Hierfür wurden dem Konstrukt GluR2 LBD G446C-T685W in seinem ungebundenen Apo-Zustand die vollen Agonisten L-Glutamat (L-Glu), Quisqualat (Quis) und AMPA sowie die partiellen Agonisten Kainate, Willardiin (HW) und Iodowillardiin (IW) jeweils in einer Sättigungskonzentration von 1 mM zugefügt. Aufgrund der ACFs, welche mittels FCS aufgenommen wurden, kann

festgestellt werden, dass die Bewegungen der LBD im μs -Bereich in Anwesenheit aller sechs voller und partieller Agonisten im selben Maße zum Stillstand kommen (Abb. 20 a,b; Tab. 9). In Anwesenheit jedes der Agonisten kann eine Kinetik auf einer Zeitskala von ns beobachtet werden, welche in allen Fällen in derselben Größenordnung liegt. Anhand der ACFs in Anwesenheit der Liganden Quisqualat und Iodowillardiin kann neben der Kinetik im ns-Bereich eine weitere Kinetik im μs -Bereich erfasst werden (Tab. 9). Da die Amplituden dieser Kinetiken allerdings in beiden Fällen unter 10 % liegen, sind die zugrundeliegenden Bewegungen der LBD nicht signifikant und damit vernachlässigbar.

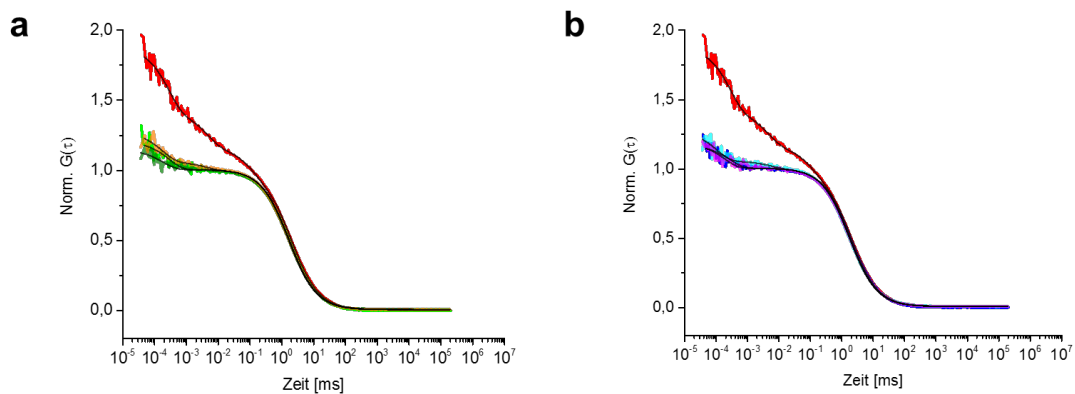


Abbildung 20: Untersuchung des Einflusses von vollen und partiellen Agonisten auf die Dynamiken der GluR2(flip) LBD mittels PET-FCS. Autokorrelationsfunktionen ($G(\tau)$) normiert auf die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsfokus (a) der GluR2(flip) LBD in einem ungebundenen Apo-Zustand (rot) sowie in Anwesenheit des vollen Agonisten L-Glutamat (hellgrün), des partiellen Agonisten Kainate (dunkelgrün) und des vollen Agonisten Quisqualat (orange) und (b) der GluR2(flip) LBD in einem ungebundenen Apo-Zustand (rot) sowie in Anwesenheit des partiellen Agonisten Willardiin (dunkelblau), des partiellen Agonisten Iodowillardiin (cyan) und des vollen Agonisten AMPA (magenta). Die schwarzen Linien stellen mathematische Annäherungen der jeweiligen Kurven unter Verwendung eines mathematischen Modells für die zweidimensionale Diffusion von Molekülen mit ein oder zwei zusätzlichen exponentiellen Relaxationen dar.

4 Ergebnisse

Tabelle 9: Kinetiken der Bewegungen der GluR2(flip) LBD G446C-T685W im sub-ms-Bereich in Anwesenheit voller und partieller Agonisten. Amplituden (a_n) und dazugehörige Zeitkonstanten (τ_n) stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils drei Messungen dar.

	a_1	τ_1 [μ s]	a_2	τ_2 [μ s]	a_3	τ_3 [ns]
APO	0,17 \pm 0,01	113 \pm 14	0,25 \pm 0,03	6 \pm 2	0,48 \pm 0,07	320 \pm 140
L-Glu					0,20 \pm 0,03	300 \pm 50
Kainate					0,15 \pm 0,03	190 \pm 40
Quis			0,06 \pm 0,01	4 \pm 1	0,22 \pm 0,02	180 \pm 50
HW					0,17 \pm 0,01	290 \pm 100
IW			0,05 \pm 0,01	7 \pm 1	0,22 \pm 0,01	116 \pm 35
AMPA					0,16 \pm 0,04	340 \pm 180

Alles in allem können demnach keine nennenswerten Unterschiede zwischen vollen und partiellen Agonisten hinsichtlich des Einflusses auf die Modulation der Dynamiken der GluR2 LBD festgestellt werden.

5. Diskussion

In den vergangenen Jahrzehnten wurden mithilfe von Kristallstrukturanalysen eine Vielzahl von Strukturen der isolierten ATDs^{102–105} und LBDs^{20,30,33,61,62,106,107}, aber auch der gesamten Vollängenrezeptoren^{15,23} aller drei Untergruppen ionotroper Glutamatrezeptoren (AMPA, KainateR und NMDAR) aufgelöst. Kristallstrukturen liefern dabei zwar detaillierte, jedoch lediglich starre Momentaufnahmen der hochdynamischen Rezeptoren in einer der vielen verschiedenen Konformationen, welche sie während ihres Funktionszyklus einnehmen. Obwohl der grundlegende Mechanismus, nach welchem die Schließung der Ligandenbindedomäne mit der Aktivierung des Ionenkanals verbunden ist, im Wesentlichen auch auf Grundlage von Kristallstrukturen deutlich wird, werden zur näheren Untersuchung von Kinetiken und thermodynamischen Einzelheiten der Funktionsweise der Rezeptoren Methoden benötigt, welche dynamische Prozesse erfassen können. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zeitaufgelöste Spektroskopie-Techniken wie NMR-Spektroskopie¹⁰⁸, Infrarotspektroskopie¹⁰⁹ oder FRET^{17,110}, aber auch Molekulardynamik-(MD)-Simulationen^{29,111} und elektrophysiologische Methoden^{20,45,52} eingesetzt, um weitreichendere Einblicke in die dynamischen Strukturen der iGluRs zu erhalten. Zur Erweiterung des Repertoires derartiger Spektroskopie-Techniken ist die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, welche in Kombination mit dem photoinduzierten Elektronentransfer (PET-FCS) angewendet werden kann, hervorragend geeignet. Durch PET-FCS können Proteine auf Einzelmolekülniveau untersucht werden, wobei sich die Methode zudem durch eine bemerkenswert hohe zeitliche Auflösung in der Größenordnung von einer Nanosekunde in Kombination mit einer außergewöhnlich hohen räumlichen Auflösung im Bereich von einem Nanometer auszeichnet und daher eine vielversprechende Ergänzung zu allen bisherigen Spektroskopie-Methoden zur Untersuchung von Glutamatrezeptoren darstellt. Bisherige Untersuchungen, welche gezeigt haben, dass die Aktivierung, Desensibilisierung und Deaktivierung intakter, funktionsfähiger ionotroper Glutamatrezeptoren im Bereich von Millisekunden erfolgen¹⁵, deuten darauf hin, dass die Konformationsdynamiken der isolierten LBDs, welche diesen Prozessen zugrunde liegen, auf ähnlichen oder schnelleren Zeitskalen ablaufen. Zudem kann

auf Grundlage von strukturellen Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass die Bewegung der LBD (Klammerschluss) im Bereich von wenigen Nanometern stattfindet⁹, was die isolierte LBD von iGluRs zu einem interessanten Zielprotein für Untersuchungen mittels PET-FCS macht.

5.1 Konformationsdynamiken der isolierten Ligandenbindedomänen

Mit Hilfe von PET-FCS-Messungen sollten die Konformationsdynamiken homologer isolierter Ligandenbindedomänen von AMPA-, Kainate-, und NMDA-Rezeptoren untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mutanten hergestellt, welche ein fluoreszenzbasiertes Reportersystem zur Erfassung derartiger Konformationsänderungen enthielten (vergleiche Abschnitt 3.2 Tab. 4).

In Bezug auf die Kontrollmutante der GluR2(flip) LBD konnten weder im Glutamat-gebundenen Zustand noch im ungebundenen Apo-Zustand Fluktuationen des Fluoreszenzsignals auf sub-ms-Zeitskalen beobachtet werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass im Falle der Kontrollmutante kein Tryptophan in den unteren Lobe der LBD eingebracht wurde, wodurch eine Löschung der Fluoreszenz des Farbstoffes aufgrund von PET nicht stattfinden konnte und sich der Farbstoff demnach permanent in einem fluoreszierenden Zustand befand.

Die sub-ms-Relaxationen, welche bei der Kontrollmutante der KainateR GluR5 LBD im ungebundenen Apo-Zustand beobachtet wurden, lassen sich vermutlich auf Änderungen der Mikroumgebung des stark umgebungssensitiven ATTO Oxa11-Fluoreszenzfarbstoffes – hervorgerufen durch die Bewegung der beiden Lobes zueinander – zurückführen. Die Fluoreszenz des ATTO Oxa 11-Farbstoffes wird durch die Polarität der Umgebung beeinflusst, wodurch die Fluoreszenzemission in unpolarer Umgebung zunimmt, während sie in polarer Umgebung verringert wird. Zum einen können aufgrund der Aminosäurezusammensetzung innerhalb des Proteins polarere und unpolare Mikroumgebungen entstehen, zwischen denen der Farbstoff hin- und herwechselt, wodurch er zwischen einem fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zustand alterniert. Zum anderen deuten die beobachteten Fluoreszenzfluktuationen möglicherweise auf eine größere Flexibilität der KainateR GluR5 LBD verglichen mit der AMPAR GluR2 LBD hin, wodurch der Fluorophor einem umfangreicheren

Umgebungswechsel unterzogen wird und dadurch ebenfalls zwischen einer polareren und unpolaren Umgebung hin- und herwechselt.

Im Falle der NMDAR GluN1 und GluN2A LBDs konnten bereits anhand der Einzelmantanten sub-ms-Relaxationen mit signifikanten Amplituden beobachtet werden. Da infolge einer Änderungen der Mikroumgebung des Fluorophors Fluktuationen des Fluoreszenzsignals hervorgerufen werden, welche Kinetiken mit einer ausreichend großen Amplitude für eine quantitative und qualitative Analyse der Daten widerspiegeln, wurde bei den NMDAR LBD-Homologen die Einzelmantante als Reportersystem zur Erfassung der Bewegungen der LBDs verwendet. Die Änderungen der Mikroumgebung des Fluorophors treten hierbei aus denselben Gründen auf wie zuvor im Zusammenhang mit der Kainate GluR5 LBD diskutiert.

Durch die Messung der Kontrollmutanten der AMPAR und KainateR LBDs wird sichergestellt, dass Fluktuationen des Fluoreszenzsignals, welche nach Einbringen eines Tryptophan-Restes in den unteren Lobe der LBD auftreten, auf dieses Tryptophan zurückzuführen sind. Auf diese Weise lässt sich die Analyse undefinierter Bewegungen des Proteins aufgrund von unspezifischen Lösereignissen ausschließen, wodurch eine gezielte Untersuchung der Auf- und Zu-Bewegungen der LBD-Muschelschale ermöglicht wird. Im Falle der NMDAR LBDs wurde durch den Austausch der nativen Tyrosin- und Tryptophan-Reste in unmittelbarer Umgebung des Fluorophors dahingehend ebenfalls Gewissheit verschafft.

Mittels PET-FCS-Messungen konnte für die isolierten LBDs aller vier Homologe der AMPA-, Kainate- und NMDA-Rezeptoren in ihrem ungebundenen Apo-Zustand eine multiexponentielle Kinetik mit signifikanter Amplitude für die Konformationsdynamiken der Bewegung beider Lobes zueinander festgestellt werden. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen wird angenommen, dass sich die LBD in ihrem ungebundenen Apo-Zustand in einem dynamischen Gleichgewicht befindet, in welchem sie eine Reihe von Zuständen einnimmt^{5,110,112} und einen permanenten Wechsel zwischen der offenen und geschlossenen Konformation der Muschelschale vollzieht^{5,6}. Durch den wiederholten Wechsel zwischen offener und geschlossener Konformation der LBD kommt es zu einer wiederholten Ausbildung und Trennung eines Komplexes zwischen Fluoreszenzfarbstoff im oberen Lobe und dem Tryptophan-Rest im unteren Lobe, was durch Fluktuationen des Fluoreszenzsignals widergespiegelt wird. Da jeder monoexponentielle Abfall innerhalb der ACFs eine bestimmte, thermisch aktivierte Konformationsänderung

der LBD entlang einer bestimmten Reaktionskoordinate zwischen zwei divergierenden Zuständen beschreibt¹³⁴, können die Exponenten im sub-ms-Bereich, welche mittels FCS gemessen wurden, als die Anzahl unterschiedlicher Arten von Bewegungen der LBDs interpretiert werden. Auf Grundlage der gemessenen ACFs konnte im Falle der AMPAR GluR2 LBD und der NMDAR GluN1 und GluN2A LBDs jeweils drei exponentielle Teilkinetiken der Konformationsdynamiken im ns- μ s-Bereich im ungebundenen Apo-Zustand der Proteine ermittelt werden, während im Falle der KainateR GluR5 LBD vier exponentielle Teilkinetiken festgestellt wurden. Diese Beobachtung stimmt mit Erkenntnissen aus Molekulardynamik-Computersimulationen überein, welche auf rein theoretischer Ebene innerhalb der AMPAR GluR2 LBD sowie innerhalb der NMDAR GluN1 und GluN2A LBDs ebenfalls drei unterschiedliche Arten von Bewegungen identifizierten¹¹². In Bezug auf die GluR2 und GluN1 LBDs werden die Bewegungen zwischen den beiden Lobes als „Hinge-bending“, „Twisting“ und „Sweeping“ bezeichnet, wobei im Falle der GluN2A LBD die „Sweeping“-Bewegung durch die so genannte „Rocking“-Bewegung ersetzt ist¹¹². Folglich unterscheiden sich die charakteristischen Bewegungen der LBDs weder zwischen AMPA- und NMDA-Rezeptoren noch zwischen Glycin- und Glutamat-bindenden LBDs¹¹². Die drei Kinetiken, welche mittels PET-FCS für die AMPAR und NMDAR LBDs beobachtet wurden, könnten demnach die „Hinge-bending“- , „Twisting“- , „Sweeping“- bzw. „Rocking“-Bewegungen widerspiegeln. Im Falle der KainateR LBD könnten alle vier Arten von Bewegungen vertreten sein, was die Beobachtung von vier exponentiellen Relaxationen mittels PET-FCS erklären würde. Eine exakte Zuordnung der unterschiedlichen Bewegungen und der mittels FCS gemessenen Kinetiken ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht möglich.

Die Tatsache, dass die LBD des Kainate-Rezeptors vier Relaxationen und eine wesentlich höhere Amplitude der multiexponentiellen Kinetik aufweist, könnte ebenfalls auf eine größere Flexibilität der KainateR LBD verglichen mit den AMPAR und NMDAR LBDs hindeuten, wobei ein qualitativer Vergleich zu den NMDAR LBDs mit Vorsicht gezogen werden muss, da in die GluN1 und GluN2A LBDs kein Tryptophan eingebracht wurde. Demnach könnte die geringere Amplitude hier auch auf eine geringere Effizienz der Fluoreszenz-Löschung des Farbstoffes zurückzuführen sein.

Mit Hilfe von smFRET-Messungen wurde die Anzahl von Konformationszuständen der LBD der AMPAR GluR2-Untereinheit quantitativ bestimmt, wobei insgesamt fünf verschiedene Konformationen der LBD in ihrem ungebundenen APO-Zustand festgestellt wurden¹¹⁰. Wird von der Annahme

ausgegangen, dass die drei bzw. vier exponentiellen Relaxationen, welche innerhalb dieser Arbeit für die LBD der iGluR-Homologe gemessen wurden, jeweils Bewegungsübergänge zwischen zwei Konformationen darstellen, kann auch mithilfe der PET-FCS-Messungen eine Heterogenität von Konformationen innerhalb der LBDs festgestellt werden. Ein quantitativer Vergleich zwischen den smFRET-Messungen und den PET-FCS-Messungen ist hierbei allerdings kaum möglich, da die Messungen mittels smFRET auf anderen räumlichen sowie zeitlichen Skalen ablaufen.

Bei allen vier LBD-Homologen wurden Kinetiken festgestellt, welche hauptsächlich in Bereichen von 100-200 μ s, 10-20 μ s, 1 μ s und 0,5 μ s liegen. Untersuchungen mittels smFRET in Kombination mit Korrelationsspektroskopie der intermolekularen Konformationsdynamiken zwischen den oberen Lobes zweier LBDs metabotroper Glutamatrezeptoren innerhalb eines Dimers zeigten, dass die entsprechenden Bewegungen auf Zeitskalen von 50-100 μ s ablaufen¹¹³, was im Einklang mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Zeitkonstanten für die intramolekularen Bewegungen zwischen den oberen D1-Lobes und den unteren D2-Lobes ist. Im Gegensatz dazu wurde mithilfe von ¹⁹F-NMR-Untersuchungen die Vermutung aufgestellt, dass ein Wechsel der GluR2 LBD im Apo-Zustand zwischen einer Reihe unterschiedlicher Konformationen, welche durch unterschiedliche Grade des Klammerschlusses charakterisiert sind und somit möglicherweise das Öffnen und Schließen der LBD darstellen, auf Zeitskalen von Millisekunden ablaufen, was mehr als eine Größenordnung langsamer ist im Vergleich zu den Zeiten, welche hier mittels PET-FCS ermittelt wurden⁶⁹. Zudem wurde mittels smFRET ebenfalls eine heterogene Population von Konformationen der GluR2 LBD ermittelt, welche auf einer Zeitskala von ca. 100 ms ineinander übergehen, was um mehr als drei Größenordnungen von den Zeiten abweicht, die im Rahmen dieser Arbeit mittels FCS ermittelt wurden¹¹⁰. Da die PET-FCS-Methode die Möglichkeit bietet, eine Bandbreite von Konformationsdynamiken auf schnelleren zeitlichen und kleineren räumlichen Skalen zu betrachten und demzufolge ein ganz anderes Spektrum an Bewegungen abdeckt, stellt sie eine vielversprechende Ergänzung zu allen bisher bestehenden Messmethoden zur Untersuchung ionotroper Glutamatrezeptoren dar. Demnach stellen die innerhalb dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auch keinen Widerspruch, sondern vielmehr eine Ergänzung zu den bisher durch andere Methoden erzielten Ergebnisse dar.

Die Kinetiken, welche für die isolierten LBDs der vier Homologe aufgrund von FCS-Messungen beobachtet wurden, befinden sich im Bereich von ns- μ s. Hingegen ist literaturbekannt, dass die Kinetiken der Aktivierung, Deaktivierung und

Desensitisierung von intakten, funktionsfähigen Glutamatrezeptoren auf Zeitskalen von ms erfolgen¹¹⁴. Da die Konformationsänderung der LBDs die treibende Kraft für diese Prozesse darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass die Bewegungen der LBDs innerhalb des Volllängenrezeptors ebenfalls im ms-Bereich ablaufen. Demzufolge unterscheidet sich der zeitliche Rahmen, in welchem die Konformationsänderungen der LBD innerhalb des Volllängenrezeptors stattfinden, von denen der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Konformationsdynamiken für die isolierten LBDs um mehrere Größenordnungen. Dies ist insofern vorstellbar und sinnvoll, als dass die Bewegungen der LBD im intakten Rezeptor durch die Anbindung an die aminoterminalen Domänen und Transmembrandomänen eingeschränkt sind, wodurch die Konformationsdynamiken deutlich langsamer als im Falle der frei beweglichen, isolierten LBD ablaufen. Die mittlere Zeitkonstante der Konformationsdynamiken der unterschiedlichen LBD-Homologe kann durch die Berechnung der Summe der Zeitkonstanten der einzelnen Kinetiken gewichtet nach ihrer relativen Amplitude ermittelt werden. Hierbei kann für die AMPAR GluR2 LBD eine mittlere Zeitkonstante von $\sim 23 \mu\text{s}$, für die KainateR GluR5 LBD von $\sim 40 \mu\text{s}$ und für die NMDAR GluN1 und GluN2A LBDs von $51 \mu\text{s}$ bzw. $52 \mu\text{s}$ berechnet werden. Auf dieser Grundlage kann festgestellt werden, dass die Konformationsdynamiken der AMPAR LBD durchschnittlich am schnellsten und die der NMDAR LBDs durchschnittlich am langsamsten ablaufen. Die mittlere Zeitkonstante, welche für die Konformationsdynamiken der KainateR LBD berechnet wurde, liegt zwischen denen der AMPAR und NMDAR LBDs. Aus der Literatur geht ebenfalls hervor, dass die Gating-Kinetiken von AMPA-Rezeptoren mit ca. 1 ms für die Aktivierung¹¹⁵ und ca. 1 bis 10 ms für die Desensitisierung^{43,116,117} am schnellsten ablaufen, während die NMDA-Rezeptoren mit ca. 20-30 ms für die Aktivierung¹¹⁸ und 10 bis tausenden von Millisekunden für die Desensitisierung²² hinsichtlich ihrer Gating-Kinetiken die langsamste Untergruppe der ionotropen Glutamatrezeptoren darstellen. Die Kainate-Rezeptoren liegen hinsichtlich der Geschwindigkeit ihres Gating-Verhaltens zwischen den beiden anderen Untergruppen der iGluRs^{43,119}. Unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Zeiten, die die unterschiedlichen Homologe der isolierten LBDs für die Konformationsdynamiken der Auf- und Zu-Bewegung – die Bewegung, die dem Öffnen und Schließen des Ionenkanals zugrunde liegt – benötigen, kann eine Tendenz dahingehend festgestellt werden, dass die zeitliche Reihenfolge der Konformationsdynamiken zwischen den isolierten LBD-Homologen die zeitliche Reihenfolge der Gating-Kinetiken der jeweiligen Volllängenrezeptoren widerspiegelt.

Die PET-FCS-Messungen, welche innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen zudem, dass die Kinetiken im μ s-Bereich aller vier gemessenen LBD-Homologe in Anwesenheit des jeweiligen Agonisten überwiegend zum Stillstand kommen. Auf Grundlage zahlreicher struktureller sowie auch spektroskopischer Untersuchungen wird ein Modell unterstützt, nach welchem die Bindung eines Agonisten eine Konformationsänderung der LBD hervorruft, welcher dem Prozess der Aktivierung und damit einhergehend der Öffnung des Ionenkanals zugrunde liegt. Bei dieser Bewegung schließt sich die LBD um den gebundenen Agonisten herum, wodurch eine geschlossene Konformation der Klammer stabilisiert wird^{6,17,22,31,33,110}. Der Agonist-gebundene Zustand der LBD ist daher rigider und somit wesentlich weniger flexibel im Vergleich zum ungebundenen Apo-Zustand¹⁰⁰, was durch die hier durchgeführten PET-FCS-Messungen in Anwesenheit der jeweiligen Agonisten deutlich gezeigt werden konnte.

Innerhalb der AMPAR und KainateR LBDs kommen der ortsspezifisch eingebrachte Fluorophor und der ebenfalls ortsspezifisch eingebrachte Tryptophan-Rest durch eine Stabilisierung des geschlossenen Zustandes der Klammer in permanenten Kontakt, wodurch der Fluorophor dauerhaft in einem „gedimmten“ Zustand vorliegt und keine Schwankungen des Fluoreszenzsignals auftreten. Im Falle der NMDAR Homologe wird der Fluoreszenzfarbstoff durch die Stabilisierung der LBD im geschlossenen Zustand keiner Umgebungsänderung unterzogen, wodurch auch hier keine Fluktuationen der Fluoreszenzemission auftreten. Auf Grundlage einer Reihe von MD-Simulationen wurde vorhergesagt, dass AMPAR und NMDAR LBDs auch in deren Agonist-gebundenen Zuständen einen Teil ihrer Flexibilität beibehalten^{38,39,112}. Weiterhin wurde auch aufgrund von smFRET-Messungen festgestellt, dass die Ligandenbindedomäne der GluR2-Untereinheit in ihrer Glutamat-gebunden Form vier unterschiedliche Konformationen annimmt, wodurch sich die Annahme ergibt, dass die LBD auch in ihrem gebundenen Zustand nicht gänzlich starr in nur einem aktiven Zustand vorliegt, sondern vielmehr ein sequentielles Gleichgewicht zwischen mehreren Zuständen des Proteins besteht¹¹⁰. Darüber hinaus wurde mittels NMR-Messungen ebenfalls eine Flexibilität der isolierten LBD nicht nur im Apo-Zustand, sondern auch im Agonist-gebundenen Zustand festgestellt⁶⁹. Dies stimmt gleichermaßen mit den Beobachtungen im Rahmen der FCS-Messungen innerhalb dieser Arbeit überein, durch die ebenfalls gezeigt wurde, dass ein Teil der Flexibilität der LBDs auch im Agonist-gebundenen Zustand beibehalten wird. Im Falle der AMPAR und NMDAR LBDs wurde im Agonist-gebundenen Zustand jeweils eine Kinetik mit signifikantem Anteil im ns-Bereich festgestellt. Dieselbe Kinetik ist im Falle der

Kainate GluR5 LBD wesentlich stärker ausgeprägt und besitzt im Glutamat-gebundenen Zustand obendrein einen größeren Anteil als im ungebundenen Apo-Zustand. Im Bereich der Proteindynamik korrelieren die Größenordnungen der Zeitskalen, in denen unterschiedliche Bewegungen stattfinden, mit der Größenordnung der räumlichen Skalen, auf denen diese Bewegungen auftreten. Während daher Bewegungen der gesamten Domäne auf Zeitskalen von μs bis ms ablaufen, erfolgen Bewegungen von Sekundärstrukturen oder Loops auf wesentlich schnelleren Zeitskalen von Nanosekunden bis Mikrosekunden¹²⁰. Demnach könnte eine mögliche Erklärung für den übermäßig hohen Anteil der ns-Kinetik, welche im Falle der Agonist-gebundenen KainateR GluR5 LBD beobachtet wurde, darin bestehen, dass das Loop-Segment zwischen der Stelle, an der der Fluorophor eingebracht wurde, und dem β -Faltblatt der D1-Domäne um zwei Reste länger ist als das homologe Loop-Segment in der AMPAR GluR2 LBD und den NMDAR GluN1 und GluN2A LBDs. Diese Verlängerung des Loop-Segments könnte möglicherweise die Ursache für dessen größere Flexibilität im Vergleich zu den homologen Strukturen innerhalb der AMPAR und NMDAR-Konstrukte sein, wodurch es eine verstärkte unspezifische Beweglichkeit aufweist, was die überproportional starken Kinetiken auf solchen schnellen Zeitskalen erklären würde. Zudem zeigt die KainateR LBD zusätzlich auch eine signifikante Kinetik im niedrigen μs -Bereich, welche bei den AMPAR- und NMDAR LBDs nicht festzustellen ist, was möglicherweise auf eine größere Beweglichkeit der KainateR LBD auch im Glutamat-gebundenen Zustand im Vergleich zu den Agonist-gebundenen AMPAR und NMDAR LBDs hindeutet.

Die schnellen, thermisch aktivierten, konformativen Gleichgewichtsschwankungen, welche im Apo-Zustand aller iGluR-Homologe beobachtet wurden, und die anschließende Verschiebung zur geschlossenen Agonist-gebundenen Konformation hin, legen einen Konformationsauswahlmechanismus der Bindung von Liganden an die LBDs nahe. Hierbei bindet der Ligand selektiv an eine bestimmte Form des Moleküls, welche nur in geringen Mengen vorhanden ist, und überführt das Molekül schließlich in die Liganden-gebundene Konformation¹²¹. Ein solcher Mechanismus wurde bereits aufgrund von smFRET-Messungen im sub-ms-Bereich der LBDs von NMDA-Rezeptoren vermutet¹²².

Des Weiteren wurde für die LBDs der vier iGluR-Homologe die durchschnittliche Diffusionszeit aller PET-FCS-Messungen im Agonist-gebundenen Zustand berechnet. Hierbei kann für die AMPAR GluR2(flip) LBD eine durchschnittliche Diffusionszeit von $1,74 \pm 0,03$ ms, für die KainateR LBD von $1,71 \pm 0,12$ ms und

für die NMDAR GluN1 und GluN2A LBDs von jeweils $1,65 \pm 0,03$ ms und $1,55 \pm 0,01$ ms ermittelt werden. Wird davon ausgegangen, dass der freie ATTO655-Farbstoff eine Diffusionszeit von 0,4 ms bei einer Größe von 0,57 nm aufweist⁹⁶, können für die iGluR-Homologe in ihren Agonist-gebundenen Zuständen die theoretischen Diffusionszeiten bestimmt werden. Hierbei wird für die AMPAR GluR2(flip) LBD aufgrund ihrer Größe von ca. 2,4 nm eine theoretische Diffusionszeit von 1,68 ms berechnet, wodurch die mittels FCS bestimmte Diffusionszeit in dem Bereich liegt, welcher für ein Protein dieser Größe durchaus zu erwarten ist. Wird bei der KainateR GluR5 LBD im Agonist-gebundenen Zustand von einer Größe von 2,3 nm ausgegangen, kann eine theoretische Diffusionszeit von 1,61 ms berechnet werden. Vergleicht man hierbei den Mittelwert der Diffusionszeiten, welche mittels FCS ermittelt wurden, und bezieht die ermittelte Standardabweichung mit ein, kann auch hier festgestellt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Diffusionszeiten der KainateR LBD durchaus plausibel für ein Protein dieser Größe ist. Für die LBDs der NMDAR GluN1 und GluN2A-Untereinheiten kann eine theoretische Diffusionszeit von jeweils 1,75 ms und 1,83 ms bestimmt werden, welche etwas höher ausfallen als die mittels FCS gemessenen Diffusionszeiten, jedoch weitestgehend innerhalb derselben Größenordnung liegen. Darüber hinaus kann im Falle der AMPAR GluR2 LBD und der NMDAR GluN1 und GluN2A LBDs im Agonist-gebundenen Zustand eine geringere Diffusionszeit verglichen zum Apo-Zustand festgestellt werden, was insofern Sinn macht, als dass die offene Konformation der LBD im ungebundenen Zustand einen größeren hydrodynamischen Radius besitzt als die geschlossene Agonist-gebundene Form, was wiederum in der Diffusionszeit widerspiegelt wird. Im Falle der Kainate GluR5 LBD kann kein deutlicher Unterschied in der Diffusionszeit zwischen Apo- und gebundenem Zustand festgestellt werden, was möglicherweise auf die Sensitivität des Fits für die hochkomplexe multiexponentielle Kinetik zurückzuführen ist, wodurch der subtile Unterschied in der Diffusionszeit untergegangen sein könnte. Zudem könnte eine weitere Möglichkeit sein, dass die KainateR LBD auch im Glutamat-gebundenen Zustand flexibler ist als die AMPAR und NMDAR LBDs, wodurch der Unterschied hinsichtlich des hydrodynamischen Radius nicht so ausgeprägt ist, was sich in einer ähnlichen Diffusionszeit beider Zustände äußert.

5.2 Konformationsdynamiken der LBDs innerhalb eines Dimers

Nach Ausbildung von Homodimeren der AMPAR GluR2(flip) LBD und der KainateR GluR5 LBD wurden ebenfalls PET-FCS-Messungen durchgeführt, welche zeigten, dass die Konformationsdynamiken im μ s-Bereich der jeweiligen LBD nach Dimerisierung zum einen abgeschwächt werden, was durch die verringerten Anteile der einzelnen Kinetiken widerspiegelt wird, und zum anderen stark verlangsamt werden, was sich in einer deutlichen Erhöhung der Zeitkonstanten der Kinetiken äußert. Dieses Ergebnis ist insofern nachvollziehbar, als dass die Anbindung der LBDs an eine zweite LBD innerhalb eines Dimers eine Einschränkung der Beweglichkeit zur Folge hat. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Konformationsdynamiken der LBDs im Volllängenrezeptor durch die Anbindung an drei weitere Ligandenbindedomänen sowie die aminoterminalen Domänen und die Transmembrandomänen auf wesentlich langsameren Zeitskalen von Millisekunden – anstelle der Nanosekunden bis Mikrosekunden-Zeitskalen, welche für die isolierten LBDs ermittelt wurden – stattfinden, ist eine Einschränkung und Verlangsamung der Beweglichkeit einer LBD durch die Anbindung an eine zweite LBD demnach ebenfalls nicht überraschend. Im Falle der NMDAR LBD konnte innerhalb des Heterodimers zwar keine signifikante Verringerung der Anteile und somit keine Reduzierung der einzelnen Kinetiken beobachtet werden, allerdings kann auch hier eine Verlangsamung der Konformationsdynamiken festgestellt werden, welche auf die Anbindung der LBD an eine ähnlich große Domäne zurückzuführen ist. Zudem befindet sich die Gelenkregion, welche aufgrund einer Konformationsänderung für den Wechsel von der offenen hin zur geschlossenen Konformation und somit für die Konformationsdynamiken der LBDs verantwortlich ist, innerhalb der Dimerverbindungsfläche der beiden „back-to-back“ angeordneten LBDs³⁵, was vermutlich zu einer Einschränkung der Mobilität der beiden Lobes zueinander beiträgt.

Setzt man die erhaltenen Ergebnisse in den Kontext eines intakten Volllängenrezeptors, könnte eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte sein, dass der Verlust eines wesentlichen Teils der Flexibilität und die damit einhergehende Rigidität der LBDs dazu beitragen, die Bindung von Agonisten an die Bindestelle zu begünstigen.

Ob sich die LBDs in den FCS-Messungen tatsächlich zu Dimeren zusammenschließen, lässt sich aufgrund der jeweiligen Diffusionszeit feststellen. Da eine Zunahme der Masse eines sphärischen Partikels um den Faktor 8 lediglich eine Verdoppelung der Diffusionszeit bedingt⁸⁰, ist bei einer Verdoppelung des Molekulargewichtes infolge einer Dimerisierung der LBDs eine Erhöhung der Diffusionszeit um 25-30% zu erwarten. Vergleicht man die Diffusionszeiten der AMPAR GluR2(flip) LBD als Monomer im Agonist-gebundenen Zustand sowie im Apo-Zustand mit den jeweiligen gemessenen Diffusionszeiten des Homodimers der GluR2 LBDs in beiden Zuständen, ergibt sich eine Erhöhung der Diffusionszeiten um 19 % im Agonist-gebundenen Zustand und um 31 % im Apo-Zustand. Auch für die KainateR GluR5 LBD kann zwischen Monomer und Dimer im Apo-Zustand eine Erhöhung der Diffusionszeit um 30 % infolge einer Dimerisierung festgestellt werden. Für die NMDAR GluN1 LBD konnte aufgrund einer Heterodimerisierung mit der GluN2A LBD sowohl im Agonist-gebundenen Zustand als auch im Apo-Zustand eine Erhöhung der Diffusionszeit um 35 % festgestellt werden. Folglich zeigt sich für alle gemessenen Konstrukte eine Erhöhung der Diffusionszeit in dem Rahmen, in dem es bei einer Homo-/Heterodimerisierung zu erwarten war, was durchaus Gewissheit dahingehend verschafft, dass die beobachteten Effekte tatsächlich infolge einer Dimerisierung der LBDs auftreten. Dies wird ebenfalls durch die hydrodynamischen Radii, welche auf Grundlage der FCS-Messungen berechnet wurden, widerspiegelt-

Des Weiteren wurde auf Grundlage der mittels FCS bestimmten Diffusionszeiten die hydrodynamischen Radii der LBD-Homologe als Monomere sowie als Dimere bestimmt und mit den hydrodynamischen Radii verglichen, welche aufgrund von Kristallstrukturen der jeweiligen Konstrukte ermittelt werden können. Hierbei kann eine deutliche Tendenz dahingehend beobachtet werden, dass für die hydrodynamischen Radii, welche auf Grundlage der LBDs in Lösung mittels FCS bestimmt wurden, deutlich höhere Werte ermittelt wurden als für die hydrodynamischen Radii, welche aufgrund von Kristallstrukturen berechnet wurden. Diese Beobachtung stimmt mit bisherigen Annahmen auf Grundlage von Simulationen überein, welche zeigten, dass LBDs in Lösung weit ausgedehntere Konformationen annehmen können als auf Grundlage von Kristallstrukturen beobachtet^{5,39,112}.

5.3 Allosterische Kommunikation zwischen iGluR LBDs

Der Begriff „Allosterie“ beschreibt einen Prozess, bei welchem Vorgänge, die sich in einem bestimmten Teil eines Moleküls ereignen, Auswirkungen auf einen anderen, überwiegend entfernter gelegenen, funktionellen Teil desselben Moleküls haben^{123,124}. Allosterische Prozesse sind häufig mit Liganden-induzierten strukturellen Konformationsänderungen verbunden, welche einen regulatorischen Effekt aufweisen und zwischen den allosterisch gekoppelten Bindestellen übertragen werden^{100,123,124}. Dies dient insbesondere bei Proteinen, welche aus mehreren Domänen bestehen, zur Feinabstimmung regulatorischer Mechanismen, welche durch Ereignisse wie z.B. die Bindung von Liganden an regulatorische Stellen hervorgerufen werden¹⁰⁰. Die Konformationsänderungen von Biomolekülen, welche im Zusammenhang mit allosterischen Prozessen auftreten, stellen dynamische Prozesse dar, welche – wie aus vorhergehenden Arbeiten ersichtlich ist – entscheidend für allosterische Abläufe sind^{123,124}. Demzufolge basiert der Mechanismus, welcher Allosterie zugrunde liegt, auf Änderungen der freien Energielandschaft, die durch eine Kombination aus Veränderungen der Konformationsauswahl sowie Dynamiken des Proteins herbeigeführt werden¹⁰⁰.

Auf Grundlage von Kristallstrukturen wurde bei der Untergruppe der NMDA-Rezeptoren ionotroper Glutamatrezeptoren neben den Wechselwirkungen zwischen den D1-Domänen der GluN1 und GluN2 LBDs zusätzliche Kontakte auch zwischen Domäne 1 und Domäne 2 der beiden LBD-Untereinheiten festgestellt, welche einen Mechanismus bereitstellen, durch den die Bindung eines Agonisten an die Verbindungsfläche zwischen den Untereinheiten gekoppelt wird, was eine allosterische Kopplung zwischen der Glutamat- und Glycin-Bindestelle vermuten lässt⁵⁹.

Durch die Ausbildung eines Heterodimers, bestehend aus der GluN1 LBD und der GluN2A LBD, konnte auch innerhalb dieser Arbeit allosterische Kommunikation zwischen den NMDAR LBDs gemessen werden. In der Tat konnte ein allosterischer Effekt dahingehend beobachtet werden, dass die Bindung von Glutamat an die GluN2A LBD ein Einfrieren der Konformationsdynamiken der GluN1 LBD in ähnlichem Maße bewirkt wie es zuvor bei direkter Bindung von Glycin an die GluN1 LBD beobachtet wurde. Aufgrund von Homologie-Modellierung eines chick-Kainate-Bindeproteins (cKBP) wurde bereits früher schon angenommen, dass die Bindung eines Agonisten nicht nur eine geschlossene

Klammer innerhalb der ligandengebundenen Untereinheit stabilisiert, sondern zusätzlich auch die einer benachbarten Untereinheit, auch wenn diese nicht durch einen Liganden gebunden ist^{7,125}. Dies sagt exakt das vorher, was im Rahmen dieser Arbeit mithilfe von PET-FCS nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte ein ähnlicher Effekt auch bei NMR-Untersuchungen der Dynamiken von Calbindin D_{9K}, einem Calcium-bindenden Protein, festgestellt werden. Das Protein, welches aus zwei Domänen besteht, zeigt in seiner ungebundenen Apo-Form dynamische Flexibilität in beiden Domänen, wohingegen beide Domänen in ihrer vollständig gebundenen Form rigider werden, was ein ähnliches – wenn nicht sogar identisches – Verhalten wie das der LBD von iGluRs widerspiegelt. Interessanterweise konnte bei Bindung des Liganden an eine der beiden Domänen des Proteins aufgrund allosterischer Effekte beobachtet werden, dass nicht nur die Domäne, mit welcher der Ligand interagiert, sondern auch die benachbarte ungebundene Domäne starrer wird^{123,126}. Dies beschreibt denselben allosterischen Effekt, der innerhalb dieser Arbeit auch für die LBDs der NMDA-Rezeptoren beobachtet werden konnte

Auf Grundlage von elektrophysiologischen Untersuchungen wird ebenfalls eine allosterische Kopplung zwischen der Glycin- und Glutamat-Bindestelle von NMDA-Rezeptoren vermutet^{44,100,127}. Diese Annahme basiert vorwiegend auf der wiederholten Beobachtung einer deutlich verringerten Affinität von Glycin für die LBD der GluN1-Untereinheit in Anwesenheit eines Liganden in der GluN2-Untereinheit, woraufhin Glycin mit einer vierfach höheren Rate von der Bindestelle dissoziiert^{100,127}. Zudem konnte auch der umgekehrte Effekt beobachtet werden, da auch eine allosterische Modulation der Glutamat-Affinität durch die Bindung von HA-966 (1-hydroxy-3-aminopyrrolidin-2-on) an die Glycin-Bindestelle gezeigt werden konnte, was wiederum eine Erhöhung der Dissoziationsrate von Glutamat zur Folge hat¹²⁷. Alles in allem deuten die bisher erlangten Erkenntnisse auf eine negative Kooperativität zwischen den beiden Bindestellen hin¹⁰⁰. Durch smFRET-Messungen wurde als Grund für die negative Kooperativität zwischen den beiden Agonisten Glycin und Glutamat ermittelt, dass die Bindung des einen Agonisten eine destabilisierende Wirkung auf die zweite Ligandenbindedomäne hat, wodurch der zweite Agonist mit geringerer Wahrscheinlichkeit bindet¹⁰⁰. Dies äußerte sich durch stärkere Konformationsschwankungen und einen vermehrten Wechsel zwischen den einzelnen Konformationszuständen der Glycin-bindenden GluN1-Untereinheit bei alleiniger Bindung von Glutamat an die Bindestelle der GluN2-Untereinheit. Die daraus folgende Hypothese besagt, dass der Rezeptor öfter in Zustände wechselt, in denen die LBD in einer offenen Konformation vorliegt, wodurch die geschlossene Konformation der LBD destabilisiert ist. Dies begünstigt

zum einen die Dissoziation des Agonisten von der LBD und wirkt sich zugleich nachteilig auf die Bindung eines Agonisten an die LBD aus, wodurch die geringere Affinität des Agonisten in Anwesenheit des zweiten Agonisten zustande kommt¹⁰⁰. Das Einfrieren der Dynamiken und die damit einhergehende Verringerung der Flexibilität der Glycin-bindenden GluN1 LBD, welche bei Bindung von Glutamat an die GluN2A LBD mit Hilfe von PET-FCS-Messungen im Rahmen dieser Arbeit festgestellt wurden, ist vollkommen gegenteilig und demnach widersprüchlich zu dem, was die smFRET-Messungen zeigten. Ein Grund hierfür könnte sein, dass das Cystein mit angehängtem Fluoreszenzfarbstoff bei den PET-FCS-Messungen an eine andere Stelle eingebracht wurde als die Cysteine einschließlich Fluoreszenzfarbstoffen im Zusammenhang mit den smFRET-Messungen. Die Konformationsänderung, welche durch die smFRET-Messungen untersucht wird, ist demnach nicht dieselbe wie die, welche mittels PET-FCS analysiert wird. Die Bewegung, welche durch smFRET untersucht wurde, wird demnach flexibler, während die Auf- und Zu-Bewegung der Muschelschale, die durch PET-FCS gemessen wurde, rigider wird. Darüber hinaus zeigten entsprechende MD-Simulationen, die im Rahmen der zuvor erwähnten smFRET-Untersuchungen durchgeführt wurden, eine etwas weiter geschlossene Konformation der LBD der GluN1-Untereinheit bei Bindung von Glutamat an die LBD der GluN2-Untereinheit, was wiederum im Einklang mit den im Zuge dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ist¹⁰⁰. In Anlehnung an die Hypothese, dass die LBD der GluN1-Untereinheit durch allosterische Kommunikation in einer geschlossenen Konformation stabilisiert wird, kann eine negative Kooperativität zwischen den Bindestellen und die damit einhergehende Verringerung der Affinität für Glycin dadurch erklärt werden, dass der Ligand aufgrund der geschlossenen und dadurch schlechter zugänglichen Bindetasche der GluN1 LBD mit geringerer Wahrscheinlichkeit bindet. Allerdings würde unter der Voraussetzung, dass die LBD in ihrem geschlossenen Zustand stabilisiert wird, ein bereits gebundener Agonist langsamer aus der Bindetasche dissoziieren, was mehr mit positiver als mit negativer Kooperativität übereinstimmen und den durch Elektrophysiologie erzielten Ergebnissen widersprechen würde^{44,100,127}. An diesem Punkt kann demnach auch in Betracht gezogen werden, dass die LBD nicht in ihrem geschlossenen, sondern in ihrem offenen Zustand erstarrt. Diese Hypothese würde allerdings im Widerspruch zu dem Homologie-Modell des Kainate-Bindeproteins stehen^{7,125}.

Nach dem Einbringen der Mutante Y535S, welche sich innerhalb der Gelenkregion der GluN1 LBD inmitten der Dimerverbindungsfläche zwischen den beiden LBD-

Homologen befindet, wurde der zuvor beobachtete allosterische Effekt aufgehoben. Die Bindung von Glutamat an die GluN2A LBD innerhalb des GluN1/GluN2A-Dimers zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Dynamiken der GluN1 LBD, bei welcher die aromatische Seitenkette des Y535-Restes entfernt wurde, wodurch demnach keine allosterische Kommunikation zwischen den beiden LBDs beobachtet werden konnte. Die aromatische Seitenkette des Tyrosin-Restes bindet in eine hydrophobe Tasche, welche innerhalb der homologen AMPAR GluR2-Untereinheit von allosterischen Modulatoren gebunden wird, wodurch der Y535-Rest als endogener allosterischer Modulator identifiziert wurde⁵⁹. Mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Tyrosin-Rest an Position 535 für die Modulierung der Deaktivierungsrate von NMDA-Rezeptoren verantwortlich ist und somit die Vermutung nahelegt, dass dieser als eine Art Kupplung zwischen den beiden LBDs fungiert⁵⁹. Da durch PET-FCS-Experimente gezeigt werden konnte, dass ein Einfrieren der Konformationsdynamiken der GluN1 LBD durch allosterische Kommunikation in Anwesenheit der Y535S-Mutante nicht mehr stattfindet, konnte der Y535-Rest im Rahmen der Experimente innerhalb dieser Arbeit in der Tat als Vermittler der allosterischen Effekte zwischen beiden LBDs identifiziert werden.

Alles in allem lassen die Ergebnisse, welche innerhalb dieser Arbeit erhalten wurden, Rückschlüsse auf allosterische Kommunikation zwischen der GluN1 und GluN2A-Untereinheit innerhalb eines NMDA-Rezeptors zu, durch welche die Dynamiken der GluN1-Untereinheit aufgrund der Bindung eines Agonisten an die GluN2A-Untereinheit zum Stillstand kommen. Dies geschieht über einen allosterischen Reaktionsweg, in welchem der Y535-Rest eine Schlüsselfunktion einnimmt. Ob die GluN1 LBD in ihrer offenen oder geschlossenen Konformation stabilisiert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht endgültig festgestellt werden, allerdings ist die verringerte Flexibilität ein möglicher Grund für die verringerte Affinität für Glycin, was wiederum das Modell eines Konformationsauswahlmechanismus für die Bindung von Liganden an die LBD unterstützt.

Im Kontext des Vollängenrezeptors könnte der Grund für eine derartige enge allosterische Kopplung zwischen den Bindestellen entweder eine Absicherung dahingehend sein, dass der Ionenkanal erst dann öffnet, wenn alle vier Bindestellen besetzt sind oder aber, dass ganz im Gegenteil eine Besetzung aller Bindestellen nicht notwendig ist, da die Bindung von Liganden an zwei der vier Bindestellen ausreichend ist, um ein Schließen aller LBDs auszulösen. Aus bisherigen

Untersuchungen geht hervor, dass auf die Untergruppe der NMDA-Rezeptoren eher Letzteres zutrifft¹⁶.

5.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante von Glutamat

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Amplitude der multiexponentiellen Kinetik, welche die LBD der GluR2(flip)-Untereinheit in ihrem Apo-Zustand aufweist, infolge der Zugabe und Bindung des Agonisten Glutamat erheblich verringert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, in welchem sich dieser Effekt zu Nutze gemacht wurde und wodurch eine Bestimmung der Dissoziationskonstante der Bindung eines Agonisten an die LBD von Glutamatrezeptoren mittels PET-FCS ermöglicht wird. Zu diesem Zweck wurde der Agonist Glutamat in aufsteigender Konzentration zu der isolierten LBD titriert, wodurch ein zunehmend größerer Anteil der LBDs in einem Glutamatgebundenen Zustand vorliegt und die Amplitude der multiexponentiellen Kinetik zunehmend verringert wird. Durch Auftragen der ermittelten Amplituden in Abhängigkeit der jeweiligen Glutamat-Konzentrationen ergeben sich eine Reihe an Datenpunkten, aus denen die Dissoziationskonstante mithilfe eines mathematischen Modells entnommen werden kann. Obwohl innerhalb dieser Arbeit die GluR2(flip) LBD in Kombination mit dem Agonisten Glutamat für die experimentelle Durchführung ausgewählt wurde, sollte eine Bestimmung des K_d -Wertes mithilfe dieser Methode auch im Zusammenhang mit anderen LBD-Homologen sowie anderen Agonisten, die eine vergleichbare Wirkung wie Glutamat auf die Amplitude der PET-Kinetik haben, realisierbar sein.

Bei Betrachtung der literaturbekannten K_d -Werte für dieselbe Interaktion zwischen dem Agonisten Glutamat und der LBD der GluR2-Untereinheit fällt auf, dass die Dissoziationskonstanten mit Werten zwischen $0,089-1,67 \mu\text{M}$ ^{14,62,66,128-130} deutlich schwanken. Dies lässt sich unter Umständen dadurch erklären, dass die hier aufgeführten K_d -Werte zum Teil unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. unterschiedliche Messmethoden, Temperaturen und/oder Pufferbedingungen, ermittelt wurden, was einen signifikanten Einfluss auf die Bestimmung der jeweiligen Dissoziationskonstante hat.

Der im Rahmen dieser Arbeit durch das auf PET-FCS-basierende Verfahren ermittelte Wert von $2,38 \pm 0,69 \mu\text{M}$ für die Dissoziationskonstante der Bindung des Agonisten Glutamat an die isolierte LBD der GluR2-Untereinheit, ist im Vergleich

zu aus der Literatur entnommenen Werten etwas höher, befindet sich allerdings von der Größenordnung her in einem durchaus ähnlichen Bereich. Dies kann ebenfalls auf unterschiedliche Pufferbedingungen sowie zum Teil unterschiedliche Temperaturen zurückzuführen sein. Zudem liegt die gemessene Dissoziationskonstante unter Einbeziehung des Standardfehlers im Bereich des Wertes von $1,67 \pm 0,01 \mu\text{M}$, welche von Kiyonaka et al. gemessen wurde.

Alles in allem stellt das mittels PET-FCS entwickelte Verfahren demnach eine geeignete Alternative zu den bisher bestehenden Methoden zur Ermittlung von Dissoziationskonstanten für Liganden, welche einen Einfluss auf die PET-Kinetik des jeweiligen Rezeptors aufweisen, dar.

5.5 Auswirkungen von vollen und partiellen Agonisten auf die Dynamiken der LBD

Innerhalb der Liganden, welche eine Affinität für ionotrope Glutamatrezeptoren aufweisen, wird zwischen vollen und partiellen Agonisten unterschieden. Der Definition nach erzielen volle Agonisten eine maximale Aktivierung des Ionenkanals, während als partielle Agonisten Stoffe bezeichnet werden, welche auch in Sättigungskonzentration vorliegend lediglich eine submaximale Reaktion des Rezeptors hervorrufen^{6,9}. Demnach weisen partielle Agonisten eine geringere Effizienz bei der Aktivierung des Ionenkanals im Vergleich zu vollen Agonisten auf. Der Mechanismus, welcher hierbei zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig verstanden, allerdings wurden auf Grundlage zahlreicher struktureller sowie elektrophysiologischer Untersuchungen bislang mehrere Theorien aufgestellt, durch welche die Unterschiede in der Wirkungsweise voller und partieller Agonisten erklärt werden können. Eine der Theorien unterstützt die Auffassung, dass die Bindung von partiellen Agonisten einen unvollständigen Klammerschluss hervorruft, wodurch eine weiter geöffnete Konformation der LBDs eingenommen wird verglichen mit der, die bei der Bindung von vollen Agonisten hervorgerufen wird, wodurch die Öffnung des Ionenkanals mit geringerer Wahrscheinlichkeit erfolgt^{17,20,33}. In einer weiteren Theorie wird die Ansicht vertreten, dass volle und partielle Agonisten dieselben Konformationszustände der LBD hervorrufen können, partielle Agonisten das Gleichgewicht allerdings wesentlich weniger effizient hin zur vollständig geschlossenen Klammer verschieben als es volle Agonisten tun, was in einer geringeren Stabilität des Komplexes aus LBD und partiellem Agonist resultiert^{47,64,122}.

Mithilfe von PET-FCS-Messungen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine dritte Theorie untersucht, nach welcher die Bindung von vollen und partiellen Agonisten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Konformationsdynamiken der LBDs haben. Hierbei kann in Betracht gezogen werden, dass bei Bindung von partiellen Agonisten ein Teil der Dynamik der LBD erhalten bleibt, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Öffnung des Ionenkanals verringert wird. Auf dieser Annahme basierend wurde mit Hilfe von MD-Simulationen vorhergesagt, dass die Beweglichkeit der D2-Domäne relativ zur D1-Domäne der GluR2 LBD bei Bindung eines partiellen Agonisten wie Kainate größer ist als bei Bindung eines vollen Agonisten wie Glutamat, was darauf hindeutet, dass volle Agonisten die D2-Domäne in stärkerem Maße immobilisieren als es partielle Agonisten tun²⁹. Diese Hypothese wird zudem durch Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie gestützt, welche ebenfalls darauf hindeutet, dass LBDs bei Bindung von partiellen Agonisten verstärkte Dynamiken im μs -ms-Bereich aufweisen, welche nicht nur mit Bewegungen innerhalb der Agonist-Bindestelle verbunden sind, sondern ebenfalls Bewegungen der beiden Lobes zueinander umfassen^{10,70,71}.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die Dynamiken der AMPAR GluR2(flip) LBD in Anwesenheit einer Reihe voller sowie partieller Agonisten analysiert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Konformationsdynamiken im μs -Bereich, welche bei der AMPAR GluR2(flip) LBD im ungebundenen Apo-Zustand beobachtet wurden, bei Bindung der vollen Agonisten Quisqualat, AMPA und L-Glutamat sowie der partiellen Agonisten Willardiin, Iodowillardiin und Kainate (aufgeführt in der Reihenfolge abnehmender Wirksamkeit^{20,42,62}) im selben Maße zum Stillstand kommen, wobei in allen Fällen lediglich eine signifikante Kinetik im sub- μs -Bereich bestehen bleibt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die vollen Agonisten Glutamat, AMPA und Quisqualat bei Bindung an die LBDs der GluR2-Untereinheit eine nahezu identische, maximale Reaktion des Rezeptors hervorrufen^{33,62}, ist das Ergebnis der PET-FCS-Messungen, dass hierbei keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Dynamiken der LBDs auftreten, nicht überraschend. Obwohl eine starke Ähnlichkeit zwischen den Kristallstrukturen der GluR2 LBDs im Komplex mit den drei vollen Agonisten besteht und diese zudem ein identisches Ausmaß des Klammerschlusses von ca. 20 ° im Vergleich zum Apo-Zustand aufweisen^{33,62}, was ebenfalls auf eine ähnliche Wirkungsweise hindeutet, konnten dennoch subtile Unterschiede hinsichtlich der Wechselwirkungen der Agonisten mit dem aktiven Zentrum der LBD festgestellt werden^{62,131}. Derartige Unterschiede in den Wechselwirkungen verschiedener Agonisten innerhalb der Ligandenbindespalte

könnten dabei ein entscheidender Faktor für die Stabilität der geschlossenen Konformation der LBDs und damit einhergehend für die Stabilität des Komplexes aus LBD und partiellem Agonist sein, was ausschlaggebend für die Wirksamkeit des jeweiligen Liganden trotz Besetzung der vollständig geschlossenen Konformation sein kann.

Ein erheblicher Unterschied zwischen vollen und partiellen Agonisten ist darüber hinaus eine lokale Konformationsänderung innerhalb der Agonist-Bindestelle, die durch die Drehung einer trans-Peptidbindung um 180° hervorgerufen wird und in der Ausbildung zweier zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Lobes quer über die Ligandenbindespalte resultiert, welche die LBD in ihrer geschlossenen Konformation stabilisieren^{30,33,62}. Diese Drehung der Peptidbindung und die damit einhergehende Ausbildung der stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt vorwiegend bei Bindung von vollen Agonisten an die LBD, weshalb eine größere Flexibilität der LBD im Komplex mit partiellen Agonisten im Vergleich zu der LBD gebunden an volle Agonisten nachvollziehbar gewesen wäre. Zusätzlich wird eine Korrelation zwischen der Drehung der Peptidbindung und dem Ausmaß des Klammerschlusses vermutet³¹.

Da die PET-FCS-Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, keinerlei Unterschiede in den Konformationsdynamiken zwischen der LBD bei Bindung an volle oder partielle Agonisten gezeigt haben, wird aufgrund dieser Erkenntnisse ein Mechanismus, welcher die Wirksamkeit der Liganden mit Unterschieden in den Dynamiken der LBD verknüpft, als eher unwahrscheinlich erachtet.

Viel mehr wird ein Mechanismus favorisiert, bei welchem die unterschiedlichen Wirkungsgrade von vollen und partiellen Agonisten entweder auf unterschiedlich ausgeprägte Grade des Klammerschlusses oder Unterschiede in der Stabilisierung verschiedener Konformationszustände der LBD zurückzuführen sind.

6. Fazit und Ausblick

Die PET-FCS-Methode, die die Löschung der Fluoreszenz eines extrinsischen Fluorophors durch die natürlich vorkommende Aminosäure Tryptophan mit Korrelationsspektroskopie kombiniert, wurde von Neuweiler et al. ursprünglich als Verfahren zum Nachweis der Faltungsdynamiken sowie Konformationsdynamiken von Proteinen entwickelt^{89,90}. Dabei vereint sie eine räumliche Auflösung von einem Nanometer mit einer zeitlichen Auflösung im Bereich von Nanosekunden bis Millisekunden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Übertragung und Anwendung dieser Methode auf ein weiteres Modellsystem realisiert werden, wodurch das Repertoire an Proteinen, welche sich nachgewiesenermaßen als Zielobjekte für Untersuchungen mittels PET-FCS eignen, erweitert wurde. Im Zuge dessen wurde gezeigt, dass PET-FCS eine geeignete Methode zur Detektion der lokalen Konformationsänderungen innerhalb der isolierten Ligandenbindedomänen ionotroper Glutamatrezeptoren darstellt. Zu diesem Zweck wurden PET-basierte Fluoreszenzsonden als Reportersysteme für lokale Konformationsänderungen innerhalb der LBDs entwickelt.

Darauf basierend konnte nachgewiesen werden, dass die Ligandenbindedomänen von Homologen der AMPA-, Kainate-, und NMDA-Rezeptoren, welche in einem ungebundenen Apo-Zustand vorliegen, eine erhebliche Flexibilität aufweisen, was sich in einem wiederholten Öffnen und Schließen der Muschelschale äußert. Für die LBDs der AMPAR- und NMDAR-Homologe wurden innerhalb dieser Konformationsänderung drei unterschiedliche Bewegungsarten identifiziert, welche alle auf Zeitskalen von Nanosekunden bis Mikrosekunden ablaufen. Im Falle der LBD des KainateR-Homologs konnten sogar vier unterschiedliche Bewegungsarten, welche sich ebenfalls in einem Bereich von Nanosekunden bis Mikrosekunden ereignen, nachgewiesen werden. Bei Bindung eines Agonisten an die LBDs zeigte sich ein deutlicher Verlust dieser Flexibilität, wobei sich die LBD um den gebundenen Agonisten herumschließt und in einer rigiden, geschlossenen Konformation verweilt. Darüber hinaus wurden bei einer Dimerisierung der LBDs

ebenfalls – nicht im selben Ausmaß wie bei der Bindung eines Agonisten, aber dennoch deutlich – eine Verringerung der Konformationsdynamiken sowie eine Verschiebung der Bewegungen zu langsameren Zeiten hin festgestellt.

Hinsichtlich dieser Erkenntnisse, welche durch PET-FCS-Messungen auf Grundlage der isolierten Ligandenbindedomänen ionotroper Glutamatrezeptoren gewonnen wurden, wäre im Rahmen zukünftiger Arbeiten die Untersuchung derselben Konformationsdynamiken der LBDs innerhalb eines Tetramers im Kontext eines intakten, funktionsfähigen Volllängenrezeptors von großem Interesse. Um dies zu erreichen, wäre ein Versuchsaufbau denkbar, welcher die Expression von Homologen der ionotropen Glutamatrezeptoren als funktionsfähige Volllängenrezeptoren in lebende Säugetierzellen überträgt. Zusätzlich müsste das jeweilige innerhalb dieser Arbeit entwickelte PET-Reportersystem in die LBD des Volllängenrezeptors eingebracht und mit einem Fluorophor markiert werden. In Bezug auf die Farbstoffmarkierung muss hierbei eine spezifischere Methode als die der Maleimid-Kopplung gewählt werden, da die Volllängenrezeptoren – sowie auch andere Strukturen innerhalb der Zelle – im Vergleich zu den isolierten LBDs eine deutlich höhere Anzahl intrinsischer Cysteine besitzen, was folglich vermutlich zu einer unspezifischen Farbstoffmarkierung im gesamten Rezeptor führen würde. Darüber hinaus wäre eine Entfernung aller Cystein-Reste eine kaum zu bewältigende Aufgabe, welche zudem das Protein aller Voraussicht nach in seiner Funktionalität beeinträchtigen würde. Zur Etablierung eines solchen Systems muss gewährleistet sein, dass die Fluoreszenzmarkierung selektiv und ortsspezifisch durchgeführt werden kann. Eine Möglichkeit stellt dabei der Einbau unnatürlicher Aminosäuren mit einzigartigen chemischen Seitengruppen dar, welche nach Einbau in die Polypeptidkette mittels bioorthogonaler Klick-Chemie mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden können. Zudem konnte eine Markierung von intakten, funktionsfähigen Glutamatrezeptoren in der Membran von Säugetierzellen mithilfe von Klick-Chemie bereits im Kontext der NMDA-Rezeptoren erfolgreich gezeigt werden¹³².

Auf Grundlage dieser Überlegungen wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Dr. Gerti Beliu (Universität Würzburg) eine Funktionsmutante des KainateR GluR6-Volllängenrezeptors hergestellt, in welche durch die Erweiterung des genetischen Codes über die TAG-Stop-Suppression eine ortsspezifische, nicht-kanonische Aminosäure eingebaut wurde. Das PET-Reportersystem, welches für die LBD der GluR6-Untereinheit eines Kainate-Rezeptors entwickelt wurde (Ergebnisse innerhalb dieser Arbeit nicht gezeigt), wurde hierbei auf den Volllängenrezeptor derselben Untereinheit übertragen (GluR6 K487TAG-K719W-

eGFP) und dieser schließlich in lebenden HEK293T-Zellen exprimiert. Mithilfe eines an das Protein angefügten eGFPs wurde ein genereller Expressionsnachweis erbracht (Abb. 21). Dies diente zum einen als Nachweis der Effizienz der Amber-Suppression bei Kontrollexperimenten ohne Zugabe der nicht-kanonischen Aminosäure (Trans-Cyclooctene-Lysin, TCO*) und zum anderen zur Detektion der Protein- bzw. Rezeptorlokalisierung. Hierbei zeigte sich deutlich, dass der Volllängenrezeptor effizient exprimiert wird, allerdings eine große Population des Proteins im Zytosol der Zelle lokalisiert ist, wodurch nur ein geringer Anteil in die Zellmembran der Zellen eingebaut wird (Abb. 21). Dennoch konnte auch gezeigt werden, dass es möglich ist, die ausgewählte Aminosäure-Position (K487) innerhalb des PET-Reportersystems mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetrazin-Cy5 zu markieren (Abb. 21). Dies bestätigte, dass die identifizierte Position für den Einbau der klickbaren nicht-kanonischen Aminosäure (TCO*) im Volllängenrezeptor grundsätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden kann und demnach lösungsmittelzugänglich ist. Die Verwendung des membranimpermeablen Fluoreszenzfarbstoffs Tetrazin-Cy5 färbt dabei nur die extrazellulär-zugängliche Population der Rezeptoren an.

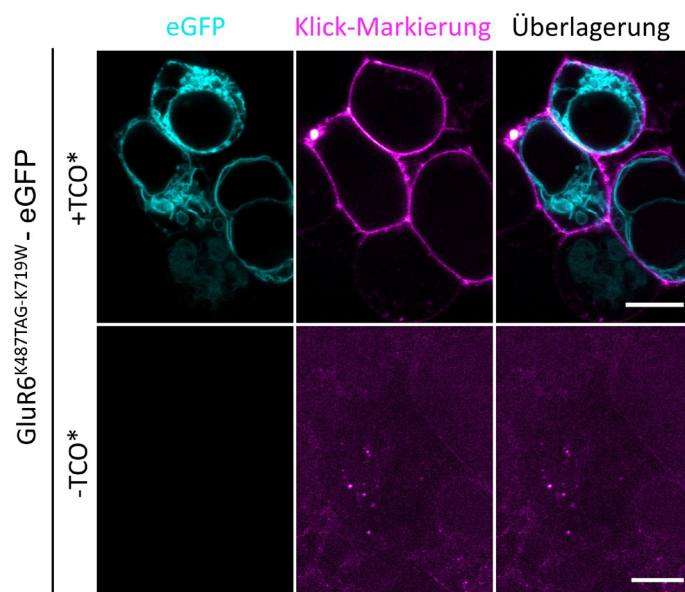


Abbildung 21: Bioorthogonale Fluoreszenzmarkierung des ionotropen Glutamatrezeptors GluR6 nach transienter Expression in HEK293T-Zellen. Repräsentative konfokale Bilder lebender HEK293T-Zellen, welche PylRS/4xtRNA^{Pyl} und den KainateR GluR6 K487TA-K719W-eGFP-Rezeptor mit (+ TCO*) und ohne (- TCO*) Zugabe der unnatürlichen und mittels Klick-Chemie markierbaren Aminosäure TCO*-Lysin (TCO*) koexprimieren¹³³. Die Farbstoffmarkierung erfolgte mit H-Tetrazin-Cy5. Maßstabsleiste: 10 µm.

In zukünftigen Experimenten sollte hierbei notwendigerweise das Ziel verfolgt werden, den Cyanin-Farbstoff Tetrazin-Cy5 durch einen anderen Tetrazin-funktionalisierten Farbstoff (z.B. ATTO655) zu ersetzen, welcher eine starke kontaktinduzierte Fluoreszenzlöschung durch Tryptophan aufweist und dadurch kompatibel mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten PET-FCS-Reportersystemen ist. Des Weiteren könnte im Rahmen von Funktionsanalysen dieser Reportersysteme durch Patch-Clamp-Elektrophysiologie-Messungen die Funktionalität der Vollängenrezeptoren überprüft und somit die spezifische Markierung voll funktionsfähiger Vollängenrezeptoren für die Einzelmolekül-Spektroskopie und Mikroskopie ermöglicht werden.

Zusätzlich wurde ein allosterischer Effekt zwischen den LBDs zweier NMDA-Homologe innerhalb eines Dimers dahingehend beobachtet, dass die Konformationsdynamiken der ungebundenen LBD bei Bindung eines Agonisten an die benachbarte LBD im selben Maße zum Stillstand kommen wie es bei einer direkten Bindung eines Agonisten beobachtet wurde. Darüber hinaus wurde dem intrinsischen aromatischen Aminosäurerest Y535, welcher sich innerhalb der Dimer-Verbindungsfläche der beiden LBDs befindet, nach genaueren Untersuchungen eine Schlüsselfunktion innerhalb des allosterischen Reaktionsweges zugewiesen. In diesem Zusammenhang wurde der allosterische Effekt aufgrund von Veränderungen der Konformationsdynamiken der LBD der GluN1-Untereinheit nach Zugabe eines Agonisten zu der GluN2A-Untereinheit bestimmt.

Demnach wäre ein interessantes Experiment im Rahmen zukünftiger Untersuchungen, das zuvor beschriebene Reportersystem umzukehren und allosterische Kommunikation anhand der Konformationsdynamiken der GluN2A LBD bei Bindung eines Agonisten an die GluN1 LBD zu messen. Auch dahingehend wurden bereits Vorarbeiten getätigt, welche allerdings deutlich zeigten, dass die isolierte GluN2A LBD, welche die erforderlichen Mutationen zur Durchführung eines derartigen Experimentes enthielt, nicht in ausreichender Mengen in *E.coli*-Bakterien exprimiert werden konnte. Möglicherweise wäre es in diesem Fall zum Zweck der Herstellung der GluN2A LBD demnach zielführend, auf ein anderes Expressionssystem wie das von Säugetierzellen oder Insektenzellen auszuweichen. Gegebenenfalls könnte ein solches System zur Untersuchung von allosterischer Kommunikation zwischen isolierten LBDs zukünftig auch für homologe LBDs der AMPA- und Kainate-Untergruppe entwickelt werden.

Darüber hinaus wurde für die Ligandenbindedomänen ionotroper Glutamatrezeptoren mit Hilfe von PET-FCS ein neues Verfahren entwickelt, um die Dissoziationskonstante für die Bindung eines Agonisten an die LBD zu messen. Da hierbei für die Bindung von Glutamat an die LBD der GluR2(flip)-Untereinheit eines AMPA-Rezeptors ein K_d -Wert, welcher im Rahmen der in der Literatur zu findenden Werte liegt, ermittelt werden konnte, wäre es zukünftig durchaus vielversprechend, dieses Verfahren auch auf weitere Ligandenbindedomänen anderer Homologe in Kombination mit einer großen Bandbreite an Agonisten anzuwenden.

Zuletzt konnte außerdem gezeigt werden, dass sich der Einfluss von vollen und partiellen Agonisten auf die Konformationsdynamiken der LBD nicht voneinander unterscheiden. Dadurch kann mit Bestimmtheit davon ausgegangen werden, dass der Mechanismus, welcher der unterschiedlichen Effizienz hinsichtlich der Rezeptoraktivierung bei Bindung von vollen im Vergleich zu partiellen Agonisten zugrunde liegt, nicht Dynamik-basiert ist.

Alles in allem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich mithilfe der PET-FCS-Methode neue Möglichkeiten ergeben, um das weite Feld der Glutamatrezeptor-Forschung unter Berücksichtigung verschiedener Aspekte zukünftig weitergehend zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

1. Pereda, A. E. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci* **15**, 250–263 (2014).
2. Twomey, E. C. & Sobolevsky, A. I. Structural Mechanisms of Gating in Ionotropic Glutamate Receptors. *Biochemistry* **57**, 267–276 (2018).
3. Karakas, E., Regan, M. C. & Furukawa, H. Emerging structural insights into the function of ionotropic glutamate receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **40**, 328–337 (2015).
4. Robert, A. AMPA Receptor Binding Cleft Mutations That Alter Affinity, Efficacy, and Recovery from Desensitization. *Journal of Neuroscience* **25**, 3752–3762 (2005).
5. Lau, A. Y. Enhanced sampling of glutamate receptor ligand-binding domains. *Neuroscience Letters* **700**, 17–21 (2019).
6. Kubo, M. & Ito, E. Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. *Proteins* **56**, 411–419 (2004).
7. Paas, Y. The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends in Neurosciences* **21**, 117–125 (1998).
8. Speranskiy, K. & Kurnikova, M. On the Binding Determinants of the Glutamate Agonist with the Glutamate Receptor Ligand Binding Domain. *Biochemistry* **44**, 11508–11517 (2005).
9. Kumar, J. & Mayer, M. L. Functional Insights from Glutamate Receptor Ion Channel Structures. *Annual Review of Physiology* **75**, 313–337 (2013).

10. Maltsev, A. S. & Oswald, R. E. Hydrophobic Side Chain Dynamics of a Glutamate Receptor Ligand Binding Domain. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 10154–10162 (2010).
11. Wollmuth, L. P. Ion permeation in ionotropic glutamate receptors: still dynamic after all these years. *Current Opinion in Physiology* **2**, 36–41 (2018).
12. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. (Oxford University Press, 2012).
13. Zhu, S. & Gouaux, E. Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **112**, 11–15 (2017).
14. Abele, R., Keinänen, K. & Madden, D. R. Agonist-induced Isomerization in a Glutamate Receptor Ligand-binding Domain. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 21355–21363 (2000).
15. Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P. & Gouaux, E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**, 745–756 (2009).
16. Mayer, M. L. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **440**, 456–462 (2006).
17. Du, M., Reid, S. A. & Jayaraman, V. Conformational Changes in the Ligand-binding Domain of a Functional Ionotropic Glutamate Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 8633–8636 (2005).
18. Sobolevsky, A. I. Structure and gating of tetrameric glutamate receptors: Structure and gating of iGluRs. *The Journal of Physiology* **593**, 29–38 (2015).
19. Greger, I. H. & Mayer, M. L. Structural biology of glutamate receptor ion channels: towards an understanding of mechanism. *Current Opinion in Structural Biology* **57**, 185–195 (2019).

20. Jin, R., Banke, T. G., Mayer, M. L., Traynelis, S. F. & Gouaux, E. Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nature Neuroscience* **6**, 803–810 (2003).
21. Howe, J. R. REVIEW ■: How Glutamate Receptors Are Built. *The Neuroscientist* **5**, 311–323 (1999).
22. Traynelis, S. F. *et al.* Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews* **62**, 405–496 (2010).
23. Karakas, E. & Furukawa, H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* **344**, 992–997 (2014).
24. Tobi, D. Dynamics and allostery of the ionotropic glutamate receptors and the ligand binding domain: Dynamics and Allostery of iGluRs and LBD. *Proteins* **84**, 267–277 (2016).
25. Mamonova, T., Yonkunas, M. J. & Kurnikova, M. G. Energetics of the Cleft Closing Transition and the Role of Electrostatic Interactions in Conformational Rearrangements of the Glutamate Receptor Ligand Binding Domain †. *Biochemistry* **47**, 11077–11085 (2008).
26. Krieger, J., Lee, J. Y., Greger, I. H. & Bahar, I. Activation and Desensitization of Ionotropic Glutamate Receptors by Selectively Triggering Pre-existing Motions. *Neuroscience Letters* **700**, 22–29 (2018)
27. Mayer, M. L. & Armstrong, N. Structure and Function of Glutamate Receptor Ion Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 161–181 (2004).
28. Zhu, S. *et al.* Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation. *Cell* **165**, 704–714 (2016).

29. Arinaminpathy, Y., Sansom, M. S. P. & Biggin, P. C. Molecular Dynamics Simulations of the Ligand-Binding Domain of the Ionotropic Glutamate Receptor GluR2. *Biophysical Journal* **82**, 676–683 (2002).
30. Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G.-Q. & Gouaux, E. Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* **395**, 913–917 (1998).
31. Naur, P. *et al.* Crystal structure of the kainate receptor GluR5 ligand-binding core in complex with (*S*)-glutamate. *FEBS Letters* **579**, 1154–1160 (2005).
32. Mano, I., Lamed, Y. & Teichberg, V. I. A Venus Flytrap Mechanism for Activation and Desensitization of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole Propionic Acid Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 15299–15302 (1996).
33. Armstrong, N. & Gouaux, E. Mechanisms for Activation and Antagonism of an AMPA-Sensitive Glutamate Receptor: Crystal Structures of the GluR2 Ligand Binding Core. *Neuron* **28**, 165-181 (2000)
34. Furukawa, H. & Gouaux, E. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *The EMBO journal* **22**, 2873–2885 (2003).
35. Pøhlsgaard, J., Frydenvang, K., Madsen, U. & Kastrup, J. S. Lessons from more than 80 structures of the GluA2 ligand-binding domain in complex with agonists, antagonists and allosteric modulators. *Neuropharmacology* **60**, 135–150 (2011).
36. Lau, A. Y. & Roux, B. The hidden energetics of ligand binding and activation in a glutamate receptor. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**, 283–287 (2011).

37. Hansen, K. B. *et al.* Structural Determinants of Agonist Efficacy at the Glutamate Binding Site of *N*-Methyl-d-Aspartate Receptors. *Mol Pharmacol* **84**, 114–127 (2013).
38. Oswald, R. E. Flexibility of a Glutamate-Binding Domain. *Structure* **15**, 1157–1158 (2007).
39. Lau, A. Y. & Roux, B. The Free Energy Landscapes Governing Conformational Changes in a Glutamate Receptor Ligand-Binding Domain. *Structure* **15**, 1203–1214 (2007).
40. Plested, A. J. R. & Mayer, M. L. AMPA Receptor Ligand Binding Domain Mobility Revealed by Functional Cross Linking. *Journal of Neuroscience* **29**, 11912–11923 (2009).
41. Yu, A. & Lau, A. Y. Energetics of Glutamate Binding to an Ionotropic Glutamate Receptor. *J. Phys. Chem. B* **121**, 10436–10442 (2017).
42. Ahmed, A. H. Dynamics of Cleft Closure of the GluA2 Ligand-binding Domain in the Presence of Full and Partial Agonists Revealed by Hydrogen-Deuterium Exchange*. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 27658-27666 (2013).
43. Erreger, K., Chen, P. E., Wyllie, D. J. A. & Traynelis, PhD, S. F. Glutamate Receptor Gating. *Crit Rev Neurobiol* **16**, 187–224 (2004).
44. Benveniste, M., Clements, J., Vyklický, L. & Mayer, M. L. A kinetic analysis of the modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptors by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* **428**, 333–357 (1990).
45. Sun, Y. *et al.* Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* **417**, 245–253 (2002).

46. Meyerson, J. R. *et al.* Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization. *Nature* **514**, 328–334 (2014).
47. Zhang, W., Cho, Y., Lolis, E. & Howe, J. R. Structural and Single-Channel Results Indicate That the Rates of Ligand Binding Domain Closing and Opening Directly Impact AMPA Receptor Gating. *Journal of Neuroscience* **28**, 932–943 (2008).
48. Dürr, K. L. *et al.* Structure and Dynamics of AMPA Receptor GluA2 in Resting, Pre-Open, and Desensitized States. *Cell* **158**, 778–792 (2014).
49. Hansen, K. B., Yuan, H. & Traynelis, S. F. Structural aspects of AMPA receptor activation, desensitization and deactivation. *Current Opinion in Neurobiology* **17**, 281-288 (2007).
50. Armstrong, N., Jasti, J., Beich-Frandsen, M. & Gouaux, E. Measurement of Conformational Changes accompanying Desensitization in an Ionotropic Glutamate Receptor. *Cell* **127**, 85–97 (2006).
51. Stern-Bach, Y., Russo, S., Neuman, M. & Rosenmund, C. A Point Mutation in the Glutamate Binding Site Blocks Desensitization of AMPA Receptors. *Neuron* **21**, 907–918 (1998).
52. Partin, K. M., Fleck, M. W. & Mayer, M. L. AMPA Receptor Flip/Flop Mutants Affecting Deactivation, Desensitization, and Modulation by Cyclothiazide, Aniracetam, and Thiocyanate. *Journal of Neuroscience* **16**, 6634-6647 (1996)
53. Horning, M. S. & Mayer, M. L. Regulation of AMPA Receptor Gating by Ligand Binding Core Dimers. *Neuron* **41**, 379–388 (2004).
54. Cheriyan, J., Mezes, C., Zhou, N., Balsara, R. D. & Castellino, F. J. Heteromerization of Ligand Binding Domains of N-Methyl-D-Aspartate Receptor

- Requires Both Coagonists, L-Glutamate and Glycine. *Biochemistry* **54**, 787-794 (2015).
55. Yonkunas, M., Buddhadev, M., Flores Canales, J. C. & Kurnikova, M. G. Configurational Preference of the Glutamate Receptor Ligand Binding Domain Dimers. *Biophysical Journal* **112**, 2291–2300 (2017).
56. Nayeem, N., Zhang, Y., Schweppe, D. K., Madden, D. R. & Green, T. A. Nondesensitizing Kainate Receptor Point Mutant. *Mol Pharmacol* **76**, 534–542 (2009).
57. Chaudhry, C., Plested, A. J. R., Schuck, P. & Mayer, M. L. Energetics of glutamate receptor ligand binding domain dimer assembly are modulated by allosteric ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 12329–12334 (2009).
58. Nayeem, N., Mayans, O. & Green, T. Conformational Flexibility of the Ligand-Binding Domain Dimer in Kainate Receptor Gating and Desensitization. *Journal of Neuroscience* **31**, 2916–2924 (2011).
59. Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. & Gouaux, E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**, 185–192 (2005).
60. Koshland, D. E., Némethy, G. & Filmer, D. Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits *. *Biochemistry* **5**, 365–385 (1966).
61. Hogner, A. *et al.* Structural Basis for AMPA Receptor Activation and Ligand Selectivity: Crystal Structures of Five Agonist Complexes with the GluR2 Ligand-binding Core. *Journal of Molecular Biology* **322**, 93–109 (2002).

62. Jin, R., Horning, M., Mayer, M. L. & Gouaux, E. Mechanism of Activation and Selectivity in a Ligand-Gated Ion Channel: Structural and Functional Studies of GluR2 and Quisqualate [†], [‡]. *Biochemistry* **41**, 15635–15643 (2002).
63. Birdsey-Benson, A., Gill, A., Henderson, L. P. & Madden, D. R. Enhanced Efficacy without Further Cleft Closure: Reevaluating Twist as a Source of Agonist Efficacy in AMPA Receptors. *Journal of Neuroscience* **30**, 1463–1470 (2010).
64. Ahmed, A. H., Wang, S., Chuang, H.-H. & Oswald, R. E. Mechanism of AMPA Receptor Activation by Partial Agonists. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 35257–35266 (2011).
65. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.-P. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology* **12**, 88-118 (1965)
66. Zhang, W., Robert, A., Vogensen, S. B. & Howe, J. R. The Relationship between Agonist Potency and AMPA Receptor Kinetics. *Biophysical Journal* **91**, 1336–1346 (2006).
67. Weston, M. C., Gertler, C., Mayer, M. L. & Rosenmund, C. Interdomain Interactions in AMPA and Kainate Receptors Regulate Affinity for Glutamate. *Journal of Neuroscience* **26**, 7650–7658 (2006).
68. Ramaswamy, S. *et al.* Role of Conformational Dynamics in α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic Acid (AMPA) Receptor Partial Agonism. **287**, 8 (2012).
69. Ahmed, A. H., Loh, A. P., Jane, D. E. & Oswald, R. E. Dynamics of the S1S2 Glutamate Binding Domain of GluR2 Measured Using ¹⁹F NMR Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 12773–12784 (2007).

70. Maltsev, A. S., Ahmed, A. H., Fenwick, M. K., Jane, D. E. & Oswald, E. Mechanism of Partial Agonism at the GluR2 AMPA Receptor: Measurements of Lobe Orientation in Solution. *Biochemistry* **47**, 10600-10610 (2009).
71. Fenwick, M. K. & Oswald, R. E. NMR spectroscopy of the ligand binding core of ionotropic glutamate receptor 2 bound to 5-substituted willardiine partial agonists. *Journal of Molecular Biology* **378**, 673-685 (2008).
72. Doose, S., Neuweiler, H. & Sauer, M. A Close Look at Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan. *ChemPhysChem* **6**, 2277–2285 (2005).
73. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Springer, 2006).
74. Sauer, M. & Neuweiler, H. PET-FCS: Probing Rapid Structural Fluctuations of Proteins and Nucleic Acids by Single-Molecule Fluorescence Quenching. in *Fluorescence Spectroscopy and Microscopy* (eds. Engelborghs, Y. & Visser, A. J. W. G.) vol. 1076 597–615 (Humana Press, 2014).
75. Medina, M. Angel & Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology. *Bioessays* **24**, 758–764 (2002).
76. Hess, S. T., Huang, S., Heikal, A. A. & Webb, W. W. Biological and Chemical Applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Review †. *Biochemistry* **41**, 697–705 (2002).
77. Magde, D., Elson, E. & Webb, W. W. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**, 705–708 (1972).
78. Elson, E. L. & Magde, D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13**, 1–27 (1974).

79. Ries, J. & Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy. *Bioessays* **34**, 361–368 (2012).
80. Haustein, E. & Schwille, P. Fluorescence Correlation Spectroscopy: Novel Variations of an Established Technique. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 151–169 (2007).
81. Schwille, P. & Haustein, E. Fluorescence Correlation Spectroscopy. 33.
82. Rigler, R., Mets, Ü., Widengren, J. & Kask, P. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur Biophys J* **22**, (1993).
83. Krichevsky, O. & Bonnet, G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.* **65**, 251–297 (2002).
84. Berland, K. M., So, P. T. C. & Gratton, E. Two-Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy: Method and Application to the Intracellular Environment. *Biophysical Journal* **68**, 8 (1995).
85. Eigen, M. & Rigler, R. Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 5740–5747 (1994).
86. Dertinger, T. *et al.* Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements. *ChemPhysChem* **8**, 433–443 (2007).
87. Kastrup, L., Blom, H., Eggeling, C. & Hell, S. W. Fluorescence Fluctuation Spectroscopy in Subdiffraction Focal Volumes. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 178104 (2005).

88. Thompson, N. L., Burghardt, T. P. & Axelrod, D. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. *Biophysical Journal* **33**, 435–454 (1981).
89. Neuweiler, H. *et al.* Detection of Individual p53-Autoantibodies by Using Quenched Peptide-Based Molecular Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 4769–4773 (2002).
90. Neuweiler, H., Schulz, A., Böhmer, M., Enderlein, J. & Sauer, M. Measurement of Submicrosecond Intramolecular Contact Formation in Peptides at the Single-Molecule Level. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 5324–5330 (2003).
91. Schwille, P., Kummer, S., Heikal, A. A., Moerner, W. E. & Webb, W. W. Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 151–156 (2000).
92. Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P. & Webb, W. W. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 13573–13578 (1998).
93. Widengren, J., Mets, U. & Rigler, R. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.* **99**, 13368–13379 (1995).
94. Schwarze, S. Untersuchung von Faltungs- und Funktionsdynamik isolierter Proteindomänen mittels Fluoreszenzlöschung. (Dissertation, Würzburg, Universität Würzburg, 2014, 2014).

95. Ries, J., Schwarze, S., Johnson, C. M. & Neuweiler, H. Microsecond Folding and Domain Motions of a Spider Silk Protein Structural Switch. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 17136–17144 (2014).
96. Müller, C. B. *et al.* Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Europhys. Lett.* **83**, 46001 (2008).
97. Burchard, W., Schmidt, M. & Stockmayer, W. H. Information on Polydispersity and Branching from Combined Quasi-Elastic and Intergrated Scattering. *Macromolecules* **13**, 1265–1272 (1980).
98. Lum, J. K., Neuweiler, H. & Fersht, A. R. Long-Range Modulation of Chain Motions within the Intrinsically Disordered Transactivation Domain of Tumor Suppressor p53. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 1617–1622 (2012).
99. Teufel, D. P., Johnson, C. M., Lum, J. K. & Neuweiler, H. Backbone-Driven Collapse in Unfolded Protein Chains. *Journal of Molecular Biology* **409**, 250–262 (2011).
100. Durham, R. J. *et al.* Conformational spread and dynamics in allostery of NMDA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 3839–3847 (2020).
101. Hulme, E. C. & Trevethick, M. A. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation: Equilibrium binding assays. *British Journal of Pharmacology* **161**, 1219–1237 (2010).
102. Clayton, A. *et al.* Crystal Structure of the GluR2 Amino-Terminal Domain Provides Insights into the Architecture and Assembly of Ionotropic Glutamate Receptors. *Journal of Molecular Biology* **392**, 1125–1132 (2009).
103. Jin, R. *et al.* Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain. *EMBO J* **28**, 1812–1823 (2009).

104. Karakas, E., Simorowski, N. & Furukawa, H. Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *EMBO J* **28**, 3910–3920 (2009).
105. Kumar, J., Schuck, P., Jin, R. & Mayer, M. L. The N-terminal domain of GluR6-subtype glutamate receptor ion channels. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 631–638 (2009).
106. Armstrong, N., Mayer, M. & Gouaux, E. Tuning activation of the AMPA-sensitive GluR2 ion channel by genetic adjustment of agonist-induced conformational changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 5736–5741 (2003).
107. Hogner, A. *et al.* Competitive Antagonism of AMPA Receptors by Ligands of Different Classes: Crystal Structure of ATPO Bound to the GluR2 Ligand-Binding Core, in Comparison with DNQX. *J. Med. Chem.* **46**, 214–221 (2003).
108. McFeeters, R. L. & Oswald, R. E. Structural Mobility of the Extracellular Ligand-Binding Core of an Ionotropic Glutamate Receptor. Analysis of NMR Relaxation Dynamics †. *Biochemistry* **41**, 10472–10481 (2002).
109. Madden, D. R., Thiran, S., Zimmermann, H., Romm, J. & Jayaraman, V. Stereochemistry of Quinoxaline Antagonist Binding to a Glutamate Receptor Investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 37821–37826 (2001).
110. Landes, C. F., Rambhadran, A., Taylor, J. N., Salatan, F. & Jayaraman, V. Structural landscape of isolated agonist-binding domains from single AMPA receptors. *Nature Chemical Biology* **7**, 168–173 (2011).
111. Mendieta, J., Ramírez, G. & Gago, F. Molecular dynamics simulations of the conformational changes of the glutamate receptor ligand-binding core in the presence

- of glutamate and kainate: Molecular Dynamics of Glutamate Receptors. *Proteins* **44**, 460–469 (2001).
112. Yao, Y., Belcher, J., Berger, A. J., Mayer, M. L. & Lau, A. Y. Conformational Analysis of NMDA Receptor GluN1, GluN2, and GluN3 Ligand-Binding Domains Reveals Subtype-Specific Characteristics. *Structure* **21**, 1788–1799 (2013).
113. Olofsson, L. *et al.* Fine tuning of sub-millisecond conformational dynamics controls metabotropic glutamate receptors agonist efficacy. *Nature Communications* **5**, (2014).
114. Traynelis, S. F. *et al.* Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews* **62**, 405–496 (2010).
115. Clements, J. D., Feltz, A., Sahara, Y. & Westbrook, G. L. Activation Kinetics of AMPA Receptor Channels Reveal the Number of Functional Agonist Binding Sites. *J. Neurosci.* **18**, 119–127 (1998).
116. Mosbacher, J. *et al.* A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* **266**, 1059–1062 (1994).
117. Krampfl, K., Schlesinger, F., Wolfes, H., Dengler, R. & Bufler, J. Functional diversity of recombinant human AMPA type glutamate receptors: possible implications for selective vulnerability of motor neurons. *Journal of the Neurological Sciences* **191**, 19–23 (2001).
118. Kleppe, I. C. & Robinson, H. P. C. Determining the Activation Time Course of Synaptic AMPA Receptors from Openings of Colocalized NMDA Receptors. *Biophysical Journal* **77**, 10 (1999).
119. Wilding, T. J. & Huettner, J. E. Activation and Desensitization of Hippocampal Kainate Receptors. *J. Neurosci.* **17**, 2713–2721 (1997).

120. Henzler-Wildman, K. & Kern, D. Dynamic personalities of proteins. *Nature* **450**, 964–972 (2007).
121. Hammes, G. G., Chang, Y.-C. & Oas, T. G. Conformational selection or induced fit: A flux description of reaction mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 13737–13741 (2009).
122. Dolino, D. M., Rezaei Adariani, S., Shaikh, S. A., Jayaraman, V. & Sanabria, H. Conformational Selection and Submillisecond Dynamics of the Ligand-binding Domain of the *N*-Methyl-d-aspartate Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 16175–16185 (2016).
123. Kern, D. & Zuiderweg, E. R. The role of dynamics in allosteric regulation. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 748–757 (2003).
124. Hilser, V. J. An Ensemble View of Allostery. *Science* **327**, 653–654 (2010).
125. Paas, Y., Eisenstein, M., Medevielle, F., Teichberg, V. I. & Devillers-Thiéry, A. Identification of the Amino Acid Subsets Accounting for the Ligand Binding Specificity of a Glutamate Receptor. *Neuron* **17**, 979–990 (1996).
126. Mäler, L., Blankenship, J., Rance, M. & Chazin, W. J. Site–site communication in the EF-hand Ca²⁺-binding protein calbindin D9k. *nature structural biology* **7**, 6 (2000).
127. Lester, R., Tong, G. & Jahr, C. Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor. *The Journal of Neuroscience* **13**, 1088–1096 (1993).
128. Sakakura, M. *et al.* Structural Mechanisms Underlying Activity Changes in an AMPA-type Glutamate Receptor Induced by Substitutions in Its Ligand-Binding Domain. *Structure* **27**, 1698-1709.e5 (2019).

129. Kiyonaka, S. *et al.* Ligand-Directed Chemistry of AMPA Receptors Confers Live-Cell Fluorescent Biosensors. *ACS Chemical Biology* **13**, 1880-1889 (2018)
130. Deming, D., Cheng, Q. & Jayaraman, V. Is the Isolated Ligand Binding Domain a Good Model of the Domain in the Native Receptor? *Journal of Biological Chemistry* **278**, 17589–17592 (2003).
131. Valentine, E. R. & Palmer, A. G. Microsecond-to-Millisecond Conformational Dynamics Demarcate the GluR2 Glutamate Receptor Bound to Agonists Glutamate, Quisqualate, and AMPA †. *Biochemistry* **44**, 3410–3417 (2005).
132. Neubert, F. *et al.* Bioorthogonal Click Chemistry Enables Site-specific Fluorescence Labeling of Functional NMDA Receptors for Super-Resolution Imaging. *Angew. Chem.* **130**, 16602–16607 (2018).
133. Serfling, R. *et al.* Designer tRNAs for efficient incorporation of non-canonical amino acids by the pyrrolysine system in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **46**, 1–10 (2018).
134. Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science.* (Freeman 1999).

Publikationsliste

Diese Dissertation basiert auf folgender Publikation:

Manuskript 1- **Suhaila Rajab**, Leah Bismin, Simone Schwarze, Alexandra Pinggera, Ingo H. Greger & Hannes Neuweiler. “Allosteric coupling of sub-millisecond clamshell motions in ionotropic glutamate receptor ligand-binding domains.”

Unter Begutachtung (engl. under review, invited revision)

Folgende Publikation ist nicht in direktem Zusammenhang mit der Dissertation entstanden:

Manuskript 2- Julia C. Heiby, **Suhaila Rajab**, Charlotte Rat, Christopher M. Johnson & Hannes Neuweiler. „ Conservation of folding and association within a family of spidroin N-terminal domains.” *Scientific Reports* 7 (2017)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich die letzten Jahre unterstützt haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Hannes Neuweiler, der es mir ermöglicht hat an einem so interessanten Projekt zu arbeiten und diese Arbeit anzufertigen. Vielen Dank für lange Diskussionen, ganz viel Unterstützung und Deinen ansteckenden Enthusiasmus, den Du auch in mühsamen Phasen beibehalten hast. Es war wirklich eine sehr schöne und prägende Zeit!

Zudem möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Markus Sauer als meinem Drittbetreuer bedanken. Vielen Dank für die tolle Atmosphäre, die Du an deinem Lehrstuhl geschaffen hast und die zu einer unvergesslichen Zeit beiträgt.

Auch möchte ich meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Georg Nagel für seine Unterstützung und hilfreichen Ratschläge danken.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Ingo Greger und Alexandra Pinggera (Laboratory of Molecular Biology Cambridge) für eine gute Zusammenarbeit und wertvolle Ratschläge.

Danke auch an Ute A. Hellmich (Institute of Organic Chemistry & Macromolecular Chemistry Jena) für die Bereitstellung des Plasmids für die Sumo-Protease Ulp-1.

Auch möchte ich Prof. Hiro Furukawa (Cold Spring Harbor Laboratory New York) für wertvolle Ratschläge und Hilfestellung bei der Etablierung des Protokolls für die Proteinexpression und Aufreinigung der isolierten NMDAR LBDs danken.

Danksagung

Ein großer Dank geht auch an Dr. Gerti Beliu (Universität Würzburg) für eine erfolgreiche und freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Durchführung der Vollängenrezeptor-Experimente.

Charlotte Rat, Jonathan Schubert, Andrea Schulze, Julia Heiby und Leah Bismis – danke für eine freundschaftliche Zusammenarbeit teilweise über viele Jahre hinweg im selben Labor. Danke, dass ihr Euer Wissen und Eure Erfahrung mit mir geteilt habt und immer für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt habt.

An diesem Punkt möchte ich auch meinen Kollegen danken, aus denen mit der Zeit Freunde geworden sind. Vielen Dank Teresa Klein, Gerti Beliu, Dominic Helmerich, Patrick Eiring, Alexander Kuhleemann, Fabian Zwettler, Andreas Kurz, Nora Trinks, Jan Schlegel und Mara Meub dafür, dass Ihr die schöne Zeit hier noch schöner gemacht habt und Arbeit mit viel Spaß verbunden habt. Alle Skiseminare, Weihnachtsfeiern und Grillfeiern werden für mich eine unvergessliche Zeit bleiben.

Vielen Dank auch an meine Freunde Romina, Katrin, Thi, Laura, Julia, Janina, Judith.

Großen Dank auch an meine Familie für die großartige Unterstützung über all die Jahre hinweg.

Zuletzt noch einen ganz besonderen Dank an Jonathan für die viele Unterstützung, Geduld und den Optimismus, den Du oftmals für uns beide aufbringst und, dass du es schaffst mich zum Weitermachen zu bewegen und das Beste aus mir rauszuholen.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Untersuchung von Sub-Millisekunden Dynamiken und allosterischer Kommunikation in Ligandenbindedomänen ionotroper Glutamatrezeptoren**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „**Investigation of sub-millisecond dynamics and allosteric communication in ionotropic glutamate receptor ligand binding domains**” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den _____

Signature PhD-student

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Suhaila Rajab
Geburtstag: 10.02.1994
Geburtsort: Marburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

2000-2004 Südstadtschule (Grundschule)
Pforzheim
2004-2012 Hebel-Gymnasium Pforzheim
Juni 2012 Abitur

Hochschulausbildung

2012 - 2015 Studium Biologie B.Sc.
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
(Bachelor-Thesis: Untersuchung zur
Faltung und Funktion der N-
terminalen Domäne eines
Spinnenseidenproteins der Braunen
Witwe) Betreuer: Hannes Neuweiler
2015 - 2017 Studium Biologie M.Sc.
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
(Master-Thesis: Untersuchung zur
Aktivität des Hitzeschockproteins
Hsp90 unter Einfluss des Co-
Chaperons Cdc37) Betreuer: Hannes
Neuweiler
Seit 2017 Doktorarbeit bei Priv.-Doz. Dr.
Hannes Neuweiler; Lehrstuhl für
Biotechnologie und Biophysik
Universität Würzburg

Würzburg, den _____

Suhaila Rajab