

**Inter-molekulare Lokalisation der ATP-Bindungstasche in
P2X-Rezeptoren durch Disulfid-Quervernetzung Cystein-
substituierter Aminosäuren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Benjamin Marquez-Klaka
aus Büdingen (Oberhessen)
Frankfurt am Main 2008

(D30)

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung durchgeführt und vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Theo Dingermann

Prof. Dr. Heinrich Betz

Datum der Disputation: 10. November 2008

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz für die Möglichkeit dieses Thema in seiner Abteilung bearbeiten zu können, für die kontinuierliche Unterstützung meiner Arbeit und für seine große Faszination für die Wissenschaft, die er auf seine Mitarbeiter überträgt.

Herrn Prof. Dr. Theo Dingermann danke ich für die Bereitschaft, meine Dissertation im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt mit zu betreuen und zu begutachten.

Frau Dr. Annette Nicke möchte ich ganz herzlich danken für die hervorragende fachliche Betreuung meiner Arbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen zu jeder Zeit, für ihre große Begeisterung an der Wissenschaft und stets engagierte Beteiligung an allen Experimenten und Ergebnissen, für ihre großartige Unterstützung meiner Weiterbildung und der Möglichkeit an interessanten Kongressen teilnehmen zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit ihren Teil beigetragen haben, indem stets eine freundschaftliche Atmosphäre und große Hilfsbereitschaft bestand, die den Verlauf meiner Doktorarbeit sehr erleichtert hat.

Des Weiteren möchte ich herzlich Herrn Prof. Dr. Herbert Zimmermann und Frau Dr. Gabi Lahner, die im Rahmen des Graduiertenkollegs "Neuronale Plastizität" und darüber hinaus stets sehr bemüht waren, den Blickwinkel der Doktoranden durch umfangreiche Seminaren und Workshops in wissenschaftlichen und außerwissenschaftlichen Belangen zu erweitern, Christian Madry und PD Dr. Bodo Laube für ihre stete Diskussionsbereitschaft zu wissenschaftlichen Fragen und außerordentliches Engagement, die Mitarbeiter über die Arbeit hinaus zu motivieren, Yussuf für die anregenden Gespräche an so manch langen Abenden im Labor sowie allen anderen Mitarbeitern, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Juan und Maria und meinem Bruder Daniel und den zukünftigen Schwiegereltern Gabriele Schinkel und Oliver Lucas bedanken, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Besonderen Dank möchte ich Stefanie Schinkel, aussprechen, denn ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die Superfamilie der Neurotransmitter-gesteuerten Ionenkanäle.....	1
1.1.1 Die Familie der „Cys-Loop“-Rezeptoren.....	2
1.1.1.1 Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor.....	3
1.1.1.2 Lokalisation der Agonisten-Bindungstasche	3
1.1.1.3 Kristallstruktur der Acetylcholin-Bindungsdomäne	5
1.1.2 Glutamat als Neurotransmitter.....	6
1.1.2.1 Ionotrope Glutamat-Rezeptoren (iGluR).....	6
1.1.2.2 Lokalisation der Agonisten-Bindungstasche der iGluR.....	7
1.1.2.3 Kristallstruktur der Liganden-Bindungsdomäne des Glutamat-Rezeptors und des bakteriellen Glutamat-Bindeproteins	8
1.2 P2X-Rezeptoren.....	9
1.2.1 Struktur der P2X-Rezeptoren.....	10
1.2.2 Assemblierung der P2X-Rezeptoren	12
1.2.3 Lokalisation der Agonisten-Bindungstasche	15
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	17
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien.....	19
2.1.1.2 Spezielle Chemikalien.....	19
2.1.1.3 Spezielle Geräte und Software	19
2.1.1.4 Komplettsysteme	20
2.1.2 Standardlösungen	20
2.1.2.1 Lösungen für molekularbiologische Arbeiten.....	20
2.1.2.2 Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen	21
2.1.2.3 Puffer und Lösungen für Oozytenkultur und Elektrophysiologie	21
2.1.2.4 Puffer und Lösungen für SDS-Gelelektrophorese	21
2.1.2.5 Puffer und Lösungen für Blaue native Gelelektrophorese.....	22
2.1.2.6 Allgemeine Puffer und Lösungen für PAGE und Western-Blot	22
2.1.2.7 Lösungen zur Proteinaufreinigung	23
2.1.3 Nukleinsäuren	23
2.1.3.1 Verwendete Plasmide.....	23
2.1.3.2 Oligonukleotide	24
2.1.4 Organismen und Tiere.....	25
2.1.4.1 Bakterienstämme	25
2.1.4.2 <i>Xenopus laevis</i>	25
2.2 Methoden.....	25

2.2.1 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1.1 Herstellung elektrisch kompetenter Bakterienzellen	25
2.2.1.2 Transformation elektrisch kompetenter Bakterienzellen	26
2.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	26
2.2.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen.....	27
2.2.1.5 Plasmidpräparation aus Bakterienzellen (Mini, Midi, Maxi).....	27
2.2.1.6 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	27
2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	28
2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.2.1.9 Dephosphorylierung linearisierter DNA-Fragmente.....	29
2.2.1.10 Ligation von DNA-Doppelsträngen durch T4-Ligase.....	29
2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.2.1.12 Standard PCR zu analytischen Zwecken.....	30
2.2.1.13 PCR zur Subklonierung.....	30
2.2.1.14 PCR-basierte Mutagenese.....	31
2.2.1.15 <i>in vitro</i> Synthese von cRNA.....	32
2.2.1.16 Software zur Sequenzauswertung.....	33
2.2.2 <i>Xenopus laevis</i> Oozyten Expressionssystem	34
2.2.2.1 Haltung und Operation.....	34
2.2.2.2 Vorbereitung der Oozyten.....	35
2.2.2.3 Rezeptorproteinexpression in Oozyten	36
2.2.3 Biochemische Methoden	36
2.2.3.1 Metabolische Markierung von Proteinen	36
2.2.3.2 Anwendung quervernetzender Substanzen	36
2.2.3.3 Oberflächenmarkierung membranständiger Proteinen	37
2.2.3.4 Affinitätschromatographie Hexahistidyl markierter Proteine	37
2.2.3.5 Affinitätschromatographie mit ATP/ADP Protektions-Aufreinigung	38
2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.2.3.7 Blaue-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	40
2.2.3.8 Protein-Transfer und Immunodetektion (Western-Blot)	41
2.2.3.9 Differentielle Deglykosylierung mit Endo H und PNGase F.....	41
2.2.3.10 Aufbereitung und Aufwertung der Daten.....	42
2.2.4 Elektrophysiologische Methoden.....	42
2.2.4.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC).....	42
2.2.4.2 Aufbau des Messplatzes	43
2.2.4.3 Datenanalyse.....	44
3. Ergebnisse	45
3.1 Auswahl des P2X-Rezeptorsubtyps für die Experimente	45
3.2 Experimentelles Vorgehen	46
3.3 Übersicht verwendeter Aminosäuren.....	47
3.3.1 Cysteinsubstitutionen in der P2X _{2/1} -Chimäre.....	49
3.3.2 Optimierung der Expression für die Biochemie	51
3.3.3 Cystein-Substitutionen im unmutierten P2X ₁ -Rezeptor	53
3.3.4 Funktionelle Untersuchungen der Cystein-Mutanten der P2X ₂₋₁ -Chimäre.....	56

3.4 Koexpression der Cystein-substituierten P2X ₁ -Rezeptoren	58
3.4.1 Quervernetzung der P2X ₁ K68C- und P2X ₁ F291C-Cystein-Mutanten.....	58
3.4.2 Übrige Koexpressionen	60
3.4.3 Trimerisierung der P2X ₁ K68C/F291C-Doppelmutante.....	61
3.4.4 ATP/ADP Protektions-Assay	62
3.4.5 Funktionelle Charakterisierung der P2X ₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante.....	65
3.4.6 Weiterführende Untersuchungen zur intermolekularen Lokalisation der ATP-Bindungsstelle	67
3.5 K68C- und F291C-analoge Cystein-Substitutionen in P2X ₂ -, P2X ₃ - und P2X ₄ -Rezeptoren	69
3.5.1 Anwendung quervernetzender Substanzen.....	72
3.5.2 Heteromerisierung der P2X ₁ - und P2X ₂ -Rezeptoren.....	73
3.5.3 Funktionelle Charakterisierung des Cystein-substituierten P2X ₁ -P2X ₂ -Heteromers	74
3.5.4 Weitere Heteromerisierungsversuche	76
4. Diskussion.....	78
4.1 Beteiligung der ausgewählten Aminosäuren an der ATP-Bindung.....	79
4.1.1 Cystein-Mutanten (K68, K70, K309) mit den stärksten Effekten nahe der ersten und zweiten Transmembrandomäne	79
4.1.1.1 Wahrscheinliche Beteiligung der Aminosäure K309 an der Kanalöffnung	81
4.1.2 Bedeutung der konservierten NFR/NFT-Motive	83
4.1.2.1 Beteiligung der Aminosäure F185 an der Agonisten-Bindung	84
4.1.3 Ist die Aminosäure K190 an der Agonisten-Bindung beteiligt?	85
4.1.4 Die Aminosäure R305 scheint wichtig für die Tertiärstruktur des Rezeptors zu sein	86
4.1.5 Zusammenfassung der Aminosäuren der ATP-Bindung	86
4.2 Die Agonisten-Bindungstasche wird von der Grenzfläche zweier benachbarter Untereinheiten gebildet	87
4.2.1 Strukturelle Voraussetzungen einer Untereinheiten-Disulfidbrücke.....	87
4.2.2 Lokalisierung der ATP-Bindungstasche durch Heteromerisierungsstudien.....	88
4.2.2.1 Heteromerisierung Alanin-substituierter P2X ₂ - und P2X ₃ -Untereinheiten	88
4.2.2.2 Assemblierung Cystein-substituierter P2X ₂₋₁ -Untereinheiten	89
4.2.2.3 Anzahl der zur Kanalöffnung notwendigen ATP-Moleküle	91
4.2.3 Bekannte Quervernetzungen von P2X-Rezeptoruntereinheiten	92
4.2.4 Analogien der Agonisten-Bindungstaschen-Lokalisation zu anderen Rezeptorsuperfamilien	93

4.2.5 Zusammenfassung der intermolekularen Agonisten–Bindungsstelle in P2X– Rezeptoren.....	94
4.3 Unterschiede der Quervernetzungs–Effizienz unterschiedlicher P2X–Subtypen ..	95
4.3.1 Die Quervernetzungs–Effizienz korreliert mit der Expressionsstärke der mutierten Untereinheiten.....	96
4.3.1.1 Berechnung des maximal möglichen Dimeranteils in Koexpressions– Experimenten	97
4.3.1.2 Abschätzung der Quervernetzungseffizienz zwischen P2X ₁ K68C– und F291C–Mutanten.....	98
4.3.2 Die Quervernetzungs–Effizienz ist abhängig von der Assemblierung der Untereinheiten	99
4.3.3 Entspricht ein Distanzunterschied konservierter Aminosäuren einem Funktionsunterschied?	100
4.3.3.1 Strukturelle Unterschiede der Glutamat–Rezeptoren durch Agonisten– Bindung.....	101
4.3.3.2 Distanzunterschiede zwischen Aminosäuren gleicher Funktion in homologen Glutamat–Rezeptoren gleichen Zustands	102
4.3.4 Zusammenfassung der möglichen Ursachen für die Unterschiede in der Effizienz der Quervernetzung.....	103
4.4 Fazit.....	103
5. Zusammenfassung	105
6. Literaturverzeichnis	107
7. Anhang.....	116
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	116
7.2 Tabellenverzeichnis	116
7.3 Abkürzungen	117
7.4 Lebenslauf	119
7.5 Originalarbeiten.....	120
7.6 Vorträge und Posterpräsentationen.....	120

1. Einleitung

Die Informationsübertragung zwischen Nervenzellen erfolgt durch elektrische oder chemische Kopplung der Zellen. Die elektrische Kopplung wird durch ionenpermeable Zell-Zell-Kanäle, den „gap junctions“, nahezu ohne Zeitverlust ermöglicht. Die chemische Transmission erfolgt über membranständige, Neurotransmitter-gesteuerte Rezeptoren. Unterteilt werden diese in G-Protein-gekoppelte (metabotrope) und Ionenkanal-bildende (ionotrope) Rezeptoren, die durch Bindung eines extrazellulären Liganden Konformationsänderungen durchlaufen. Im Falle der metabotropen Rezeptoren werden im Zeitraum einiger Millisekunden bis Minuten intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die verschiedene Funktionen der Zelle beeinflussen können. Die Konformationsänderungen der ionotropen Rezeptoren führen zur Öffnung oder Schließung einer Kanalpore, die im offenen Zustand einen Ionenfluß für z. B. Natrium, Kalium, Chlorid oder Kalzium über die Zellmembran ermöglicht. Diese Aktivierung bzw. Inaktivierung der Ionenkanal-pore und damit die eigentliche Signalübertragung verläuft im Bereich weniger Millisekunden. Abhängig von der Membranpotenzialänderung durch den ausgelösten Ionenstrom erfolgt eine weitere Unterteilung in exzitatorische und inhibitorische Ionenkanäle.

1.1 Die Superfamilie der Neurotransmitter-gesteuerten Ionenkanäle

Die Neurotransmitter-gesteuerten Ionenkanäle, oder ionotropen Rezeptoren, stellen eine Gruppe von membranständigen, oligomeren Proteinkomplexen dar, die in Reaktion auf Bindung eines chemischen Botenstoffs einen Ionenkanal in der Zellmembran öffnen bzw. schließen können (Alberts 2002). Weitere Ionenkanäle werden z. B. durch Membranpotenzialänderungen (z. B. Spannungsaktivierte Natriumkanäle Nav1.1 – Nav1.9), das Einwirken von Scherkräften (z. B. MscL aus *E. coli*), Lichteinfall (z. B. Kanalrhodopsin) oder Osmolaritätsveränderungen (z. B. TRPV4) gesteuert (Alberts 2002). Zu den wichtigsten Liganden der ionotropen Rezeptoren gehören unter anderem die Aminosäure Glutamat (Takeuchi 1985), deren Rezeptoren überwiegend erregende Wirkung haben, und Acetylcholin, das u. a. den Hauptbotenstoff des parasymphathischen Systems darstellt (Krnjevic und Phillis 1963). Zusätzlich stellt die Substanz Adenosin-triphosphat (ATP) nicht nur eine universelle Energiespeicherform, sondern ein wichtiges Molekül für die Informationsübertragung und einen eigenständigen Botenstoff dar (Burnstock 1997; Finger *et al.* 2005). Für diesen existieren in verschiedenen Zell- und Gewebetyp-

pen metabotrope und ionotrope ATP-aktivierbare Rezeptorproteine (Valera *et al.* 1994). Von den erwähnten Neurotransmitter-gesteuerten Ionenkanälen sind die Glutamatrezeptoren (iGluRen) und die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChRen) am besten untersucht. Im Vergleich dazu ist über die Purin-Rezeptoren (P2X) weniger bekannt. Im speziellen ist die Lokalisation der Agonisten-Bindungstasche der P2X-Rezeptoren noch nicht eindeutig geklärt. Ziel dieser Arbeit ist die Position der ATP-Bindungstasche innerhalb oder zwischen den Untereinheiten der P2X-Rezeptoren zu klären. Da die molekularen Strukturen und die Agonisten-Bindungstaschen der iGluRen und nAChRen seit vielen Jahren untersucht werden, werden im Folgenden die Glutamatrezeptoren (iGluRen) und die Superfamilie der nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChRen) beschrieben (Abbildung 1.1), wobei besondere Aufmerksamkeit auf die Identifizierung der jeweiligen Agonisten-Bindungstasche gelegt wird. Anschließend werden die P2X-Rezeptoren beschrieben und die bisherigen Hinweise zur Lokalisation der ATP-Bindungstasche dieser Rezeptorklasse angeführt.

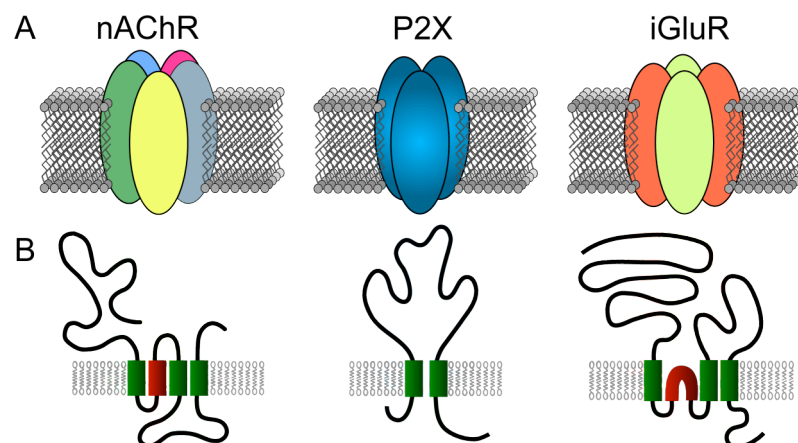


Abbildung 1.1 Übersicht der drei großen Familien der Neurotransmitter-gesteuerten Ionenkanäle. *A*, Darstellung der jeweils funktionellen, oligomeren Rezeptorkomplexe des pentameren nAChR, des trimeren P2XR und tetrameren GluR. *B* Übersicht der Topologie einer Untereinheit der drei Rezeptorklassen. Die jeweils rote Transmembrandomäne ist an der Porenbildung der Rezeptorkomplexe beteiligt. Diese ist bei den P2X-Rezeptoren nicht genau bekannt aber man vermutet, dass beide daran beteiligt sind.

1.1.1 Die Familie der „Cys-Loop“-Rezeptoren

Diese Familie umfasst die durch Acetylcholin (ACh) und Serotonin (5-HT₃) aktivierten, unselektiven Kationenkanäle sowie die durch Glycin und GABA aktivierten, Chlorid-selektiven Rezeptorkanäle (Betz 1990; Karlin und Akabas 1995; Brejc *et al.* 2001; Connolly und Wafford 2004; Abbildung 1.2). Die Untereinheiten der Homo- oder Heteropentamere bestehen aus 450 bis 700 Aminosäuren mit einer Sequenzhomologie

von 25% bis 60% (Betz 1990; Dani und Mayer 1995). Sie besitzen große extrazelluläre N- und kleine C-Termini, getrennt durch vier Transmembrandomänen (M1 bis M4; Dani und Mayer 1995). Der Name der „Cys-Loop“-Rezeptoren leitet sich von den hoch konservierten N-Termini ab, die ein strukturelles Muster mit je zwei quervernetzten Cysteinen, getrennt durch 13 Aminosäuren, beinhalten (Corringer *et al.* 2000; Connolly und Wafford 2004). Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die strukturellen Aspekte der Liganden-Bindungsdomäne und behandelt stellvertretend für die gesamte Klasse der „Cys-Loop“-Rezeptoren den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor.

1.1.1.1 Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor

Die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) sind die am längsten untersuchten Neurotransmitter-gesteuerten Ionenkanäle. Mit der ersten Erwähnung der Reaktion eines Muskels auf Nikotin (Langley 1905) entstand die generelle Idee rezeptiver Substanzen (Langley 1907). Große Mengen des Rezeptorproteins konnten erstmals aus dem elektrischen Organ des Zitterrochen *Torpedo spec.* isoliert werden und führten zu der Identifizierung der pentameren Struktur der Rezeptorkomplexe (Biesecker 1973; Hucho und Changeux 1973). Die Primärstruktur der Untereinheiten wurde durch positionelle Klonierungstechniken aufgeklärt (Noda *et al.* 1982; Noda *et al.* 1983). Seitdem wurden mehrere Rezeptoruntereinheiten identifiziert und basierend auf ihrer Sequenzhomologie klassifiziert (Corringer *et al.* 2000; Millar 2003; Abbildung 1.2).

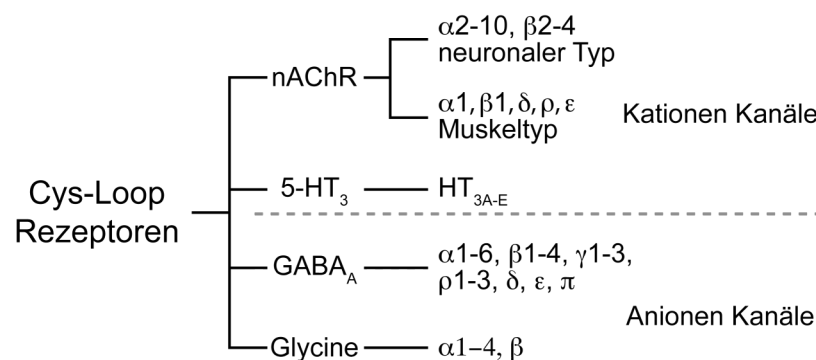


Abbildung 1.2 Übersicht der „Cys-Loop“-Rezeptoren und Untereinheiten. Die Rezeptoren sind nach Kationen- und Anionenleitfähigkeit getrennt aufgelistet. Zusammengetragen aus (Barnard *et al.* 1998; Millar 2003; Cascio 2004; Niesler *et al.* 2007).

1.1.1.2 Lokalisation der Agonisten-Bindungstasche

Bevor die Kristallstruktur der nAChR verfügbar war, wurden verschiedene Methoden zur Lokalisation der Bindungstasche und zur Diskriminierung der an der Agonisten-Bindung beteiligten Aminosäuren verwendet. Dazu wurde oft das Verfahren der Affini-

tätsmarkierung angewandt. Dabei werden z. B. radioaktiv markierte Agonisten oder Antagonisten kovalent an den Rezeptor gebunden (Gronemeyer und Govindan 1986). Die anschließende vergleichende Gel-Elektrophorese oder Massenspektroskopie zwischen markierten und nicht markierten enzymatisch gespaltenen, aufgereinigten Proteinen führt zur Identifizierung des Aminosäurebereichs, an den die Substanz gebunden wurde (Gingras *et al.* 2005; Yang *et al.* 2008).

Die Reduktion des nAChR mit DTT und anschließende Behandlung mit der Cysteinereaktiven Substanz Bromoacetylcholin-Bromid in dem elektrischen Organ des *Electrophorus electricus* führte zur Aktivierung der Zellen (Silman und Karlin 1969). Demnach befinden sich zwei quervernetzte und reduzierbare Cysteine in der Nähe der Agonisten-Bindungstasche (Silman und Karlin 1969). Die Behandlung der reduzierten Rezeptorproteine aus *Torpedo californica* mit dem radioaktiven N-maleimido-benzyltri- $[^3\text{H}]$ -Methylammonium-Iodid ($[^3\text{H}]$ MBTA) resultierte in der Markierung der Aminosäuren C192 und C193 der α -Untereinheiten des Rezeptorkomplexes (Kao *et al.* 1984). Folglich befindet sich die Agonisten-Bindungstasche an oder in der α -Untereinheit (Kao *et al.* 1984). Die Expression von α - und γ - sowie α - und δ - aber nicht α - und β -Untereinheiten in Fibroblasten resultierte in Proteinkomplexen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften für den Agonisten Carbamoylcholin und den Antagonisten d-Tubocurarin (Blount und Merlie 1989). Dies implizierte, dass der nAChR zwei Agonisten-Bindungsstellen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften zwischen den α - γ - und den α - δ -Untereinheiten besitzt (Blount und Merlie 1989). Affinitätsmarkierungsexperimente des nAChR aus *Torpedo californica* mit dem radioaktiv markierten, kompetitiven Antagonisten $[^3\text{H}]$ -Tubocurarin ergaben eine kovalente Bindung des Antagonisten an α -, γ - und δ - Untereinheiten, was in Gegenwart des Agonisten Carbamoylcholin verhindert wurde (Pedersen und Cohen 1990). Wegen der pseudosymmetrischen Anordnung der fünf Untereinheiten in der Reihenfolge α - γ - α - δ - β um eine zentrale Pore herum (Brisson und Unwin 1985) muss sich demnach die Agonisten-Bindungsstelle an der Untereinheitengrenzfläche zwischen den α - γ - und α - δ - Untereinheiten befinden (Pedersen und Cohen 1990). Ähnliche Studien unterstützten diese Lokalisation der Agonisten-Bindungstasche mit fotoaktivierbaren Derivaten des kompetitiven Antagonisten α -Neurotoxin II aus der Kobraart *Naja naja oxiana* (Kreienkamp *et al.* 1992). Eine andere Studie nutzte eine Quervernetzungsmethode. Dabei wurde Glycylamidoethyl-dithio-2-pyridine, eine Substanz mit zwei unterschiedlich reaktiven Gruppen, verbunden über einen 0,9 Å nicht-reaktiven „Linker“ (Loo und

Clarke 2001), angewandt und führte zur Identifizierung von Aminosäuren in den δ - und γ -Untereinheiten in geringer Entfernung zu den Cysteinen an Position 192 und 193 der α -Untereinheit (Czajkowski *et al.* 1993; Czajkowski und Karlin 1995).

Zusammengenommen konnten durch unterschiedliche Methoden Aminosäuren der α -, γ - und δ -Untereinheit identifiziert werden, die an der Agonisten-Bindung beteiligt sind. Demnach befinden sich die Agonisten-Bindungstaschen an den Grenzflächen zwischen den α - γ und α - δ Untereinheiten. Eine Zusammenfassung der entsprechenden Aminosäuren folgt im nächsten Kapitel.

1.1.1.3 Kristallstruktur der Acetylcholin-Bindungsdomäne

Im Jahr 1993 gelang es ein Röntgenstrahlenstreudiagramm des nAChR mit einer Auflösung von 9 Å zu erhalten (Unwin 1993). Ein detailliertes Modell basierte auf Kristallisationsdaten mit einer Auflösung von 4,6 Å, wobei zusätzlich der offene Zustand visualisiert werden konnte (Unwin 1995; Miyazawa *et al.* 1999). Ein Modell mit einer Auflösung von 2,7 Å der Agonisten-Bindungsstelle wurde 2001 verfügbar, als es gelang das Acetylcholin-Bindeprotein (AChBP) aus der Schneckenart *Lymnea stagnalis* heterolog in großen Mengen zu exprimieren und zu kristallisieren (Brejc *et al.* 2001). Dieses lösliche, Pentamere-bildende Protein hat hohe Homologie zu dem N-Terminus einer α -Untereinheit des Acetylcholin-Rezeptor, besitzt aber keine Transmembran- oder intrazellulären Domänen (Smit *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass es Agonisten und Antagonisten des nAChR, wie z. B. Acetylcholin, d-Tubocurarin und α -Bungarotoxin, bindet (Tierney und Unwin 2000). 2005 gelang es den gesamten nAChR aus *Torpedo* mit einer Auflösung von 4 Å darzustellen (Unwin 2005). Vor kurzem konnte erstmals eine vollständige humane, dreifach mutierte $\alpha 1$ -Untereinheit des nAChR als Monomer im Komplex mit α -Bungarotoxin kristallisiert und Röntgenstrukturdaten mit einer Auflösung von 1,94 Å generiert werden (Dellisanti *et al.* 2007).

Die Kristallisationsdaten bestätigen die biochemischen Befunde und zeigen, dass der Agonist an der Grenzfläche zwischen der α -Untereinheit und der gegenüberliegenden γ - bzw. δ -Untereinheit mit je drei Schleifen (benannt A bis F) koordiniert wird (Brejc *et al.* 2001). Dabei sind die wichtigen Aminosäuren der α -Untereinheit ein Tyrosin (Schleife A), ein Tryptophan (Schleife B) und zwei benachbarte und quervernetzte Cysteine an der Spitze der Schleife C (Celie *et al.* 2004). Infolge der Agonisten-Bindung bewegt sich die Schleife C auf die Bindungstasche zu und initiiert damit wahrscheinlich die nachfolgenden Konformationsänderungen, die zur Kanalöffnung führen (Hansen *et*

al. 2005). Auf der gegenüberliegenden Seite der Bindungstasche befindet sich in der Schleife D der γ - bzw. δ -Untereinheiten ein Tryptophan (Brejc *et al.* 2001; Celie *et al.* 2004). Dabei stellen die aromatischen Aminosäuren der Schleifen B und D je ein „hydrophobes“ Anion zur Koordination der Tetramethylammonium-Gruppe des Acetylcholins per Kation- π Interaktion zur Verfügung, ähnlich der Acetylcholinbindung der Acetylcholinesterase (Dougherty 1996). Die Aminosäuren der Agonistenbindung der Schleifen E und F sind weniger stark konserviert bzw. variieren zwischen Aspartat, Methionin und Leucin, Abhängig von den gebundenen Agonisten (Brejc *et al.* 2001; Celie *et al.* 2004; Hansen *et al.* 2005).

Zusammengefasst sind die Aminosäuren der Liganden-Interaktion bekannt, aber die Funktion einzelner Aminosäuren bezüglich der Kanalöffnung des gesamten nAChRs sind nicht vollständig geklärt. Dennoch stellt dieser Rezeptor eines der am besten untersuchten Rezeptorkanalproteine dar und die angewandten Experimentaltechniken sind exemplarisch für das Studium Neurotransmitter-gesteuerter Ionenkanäle.

1.1.2 Glutamat als Neurotransmitter

Dass Glutamat einen Effekt auf Neurone im Säugergehirn hat, wurde erstmals 1949 beschrieben (Krebs und Eggleston 1949). Zuerst wurde ein modulatorischer Einfluss auf die Neurone vermutet. Erst elf Jahre später wurde Glutamat als ein exzitatorischer Neurotransmitter vorgeschlagen und folgerichtig Glutamat-Rezeptoren (GluRen) postuliert (Curtis *et al.* 1960; Roberts 1975). Die Glutamat-Rezeptoren werden unterteilt Signalkaskaden aktivierende Rezeptoren (metabotrope GluRen; Meldrum 2000), die in dieser Arbeit nicht weiter behandelt werden, und in Ionenkanal bildende Rezeptoren (ionotrope GluRen). Die Klonierung der iGluRen ermöglichte weiterführende Untersuchungen heterolog exprimierter Rezeptoren (Boulter *et al.* 1990; Nakanishi 1992; Hollmann und Heinemann 1994) und führte zur Gliederung in drei Subtypen anhand ihrer Spezifität für bestimmte Agonisten: AMPA- (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazole Propionsäure-) Rezeptoren (GluR 1 bis 4), Kainat-Rezeptoren (GluR5-7, KA1 und KA3) und NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat-) Rezeptoren (NR1, NR2a-d, NR3a-b; Wollmuth und Sobolevsky 2004; Collingridge *et al.* 1983; Abbildung 1.3).

1.1.2.1 Ionotrope Glutamat-Rezeptoren (iGluRen)

Die 16 homologen Untereinheiten der iGluRen weisen einen charakteristischen und modularen Aufbau auf (Chen und Wyllie 2006). Eine Untereinheit dieser tetrameren

Rezeptoren besteht aus einer extrazellulären Amino-terminalen Domäne (ATD), drei Transmembrandomänen (TM1, 3, 4), einer Wiedereintrittsschleife (TM2) und einem intrazellulären C-Terminus (Mayer 2005; Abbildung 1.1). Die ATD hat eine Größe von ca. 400 Aminosäuren und wurde als modulatorische Bindungsstelle mehrerer Moleküle und als an der Untereinheiten-Assemblierung beteiligt beschrieben (Ayalon und Stern-Bach 2001; Herin und Aizenman 2004; Madry *et al.* 2007). Die Aminosäurenkette durchspannt die Plasmamembran der Zelle drei mal völlig (M1, M3, M4), während M2 eine intrazelluläre Wiedereintrittsschleife darstellt und an der Porenbildung beteiligt ist (Hollmann *et al.* 1994; Wollmuth und Sobolevsky 2004). Der intrazelluläre C-Terminus interagiert mit verschiedenen Signal- und Strukturproteinen (Kim und Sheng 2004) und ist unerlässlich für den korrekten Transport zur und die Lokalisation an der postsynaptischen Membran (Perez-Otano und Ehlers 2005). Die Liganden-Bindungsdomäne besteht aus zwei Segmenten (S1 und S2). Das erste Segment (S1) befindet sich zwischen TM1 und der ATD, während S2 sich zwischen TM3 und TM4 befindet (Stern-Bach *et al.* 1994). Diese beiden Segmente beinhalten in den meisten Subtypen konservierte Aminosäuren mit ähnlicher Funktion für die Koordination des Agonisten (Gouaux 2004). Rezeptoren dieser Familie stellen nach heutigem Wissen die am weitesten verbreiteten Kanalmoleküle der exzitatorischen synaptischen Transmission dar und sind essentiell an der synaptischen Plastizität sowie Lernvorgängen im Allgemeinen beteiligt (Monaghan *et al.* 1989; Dingledine *et al.* 1999).

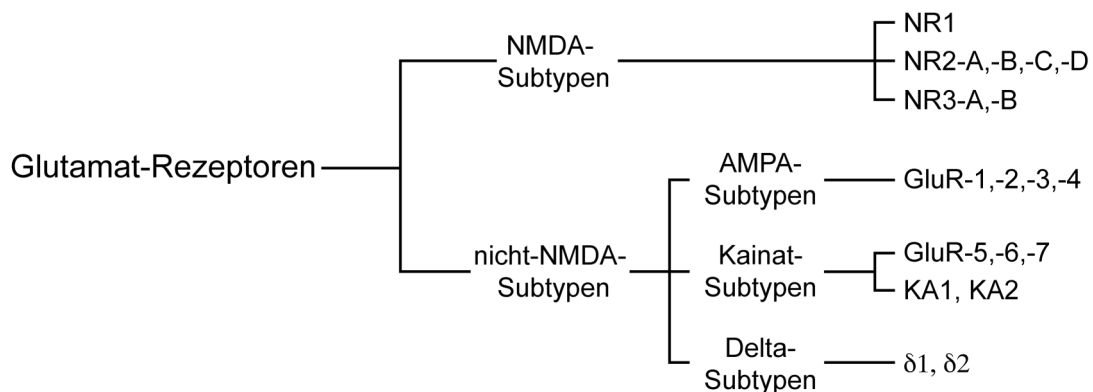


Abbildung 1.3 Übersicht der iGluRn und Untereinheiten. Abbildung modifiziert nach (Wollmuth und Sobolevsky 2004).

1.1.2.2 Lokalisation der Agonisten-Bindungstasche der iGluR

Der erste Hinweis auf die Lokalisation der Liganden-Bindungsdomäne basierte auf Homologiemodellen zu bakteriellen periplasmatischen Bindeproteinen (PBP) (Nakanishi *et al.* 1990; Oh *et al.* 1993; Kuryatov *et al.* 1994). Demnach wurde eine

strukturelle Ähnlichkeit für die Segmente S1 und S2 postuliert, die in PBPen zwei distinkte globuläre Domänen ausbilden, zwischen denen der Agonist gebunden wird (Ames 1986; Nakanishi *et al.* 1990; O'hara *et al.* 1993). Ersetzungen der S2 Domäne in AMPA-insensitiven GluR6 mit dem homologen Bereich aus GluR3 resultierte in einem AMPA-sensitiven Chimärenrezeptor (Stern-Bach *et al.* 1994). Funktionelle Studien einzelpunktmutierter AMPA- Kainat- und NMDA-Rezeptoren ergaben Hinweise auf die Beteiligung der S1 und S2 Domänen an der Ligandenbindung und es wurde vorgeschlagen, dass die Bindungstasche sich innerhalb einer Untereinheit befindet (Kuryatov *et al.* 1994; Hirai *et al.* 1996; Paas *et al.* 1996; Sutcliffe *et al.* 1996; Laube *et al.* 1997). Ein lösliches Fusionsprotein aus den S1 und S2 Domänen des GluR4-Rezeptor zeigte Ligandenbindungs-Eigenschaften eines AMPA-Rezeptors (Kuusinen *et al.* 1995a), S1S1 und S2S2 Fusionsproteine des GluR2- und GluR4-Rezeptors jedoch nicht (Arvola und Keinänen 1996). Folglich wurde die Agonistenbindung zwischen den S1 und S2 Domänen bestätigt (Paas 1998). Die Ligandenbindung innerhalb einer Untereinheit wurde durch die Kristallstruktur eines löslichen GluR4 S1S2 Proteins im Komplex mit dem Agonisten Kainat endgültig bewiesen (Armstrong *et al.* 1998).

1.1.2.3 Kristallstruktur der Liganden-Bindungsdomäne des Glutamat-Rezeptors und des bakteriellen Glutamat-Bindeproteins

Die erste Kristallstruktur der Liganden-Bindungsdomäne (LBD) wurde, ausgehend von einem *E. coli* Überexpressionssystem eines S1S2-LBD-Fusionsproteins erzeugt (Kuusinen *et al.* 1995b; Chen und Gouaux 1997; Armstrong *et al.* 1998). Dieser Studie folgten die Kristallisationen der GluR2-, Kainat- (GluR5- und GluR6-) und NR1-, NR2-S1S1-LBD (Armstrong *et al.* 1998; Armstrong und Gouaux 2000; Ayalon und Stern-Bach 2001; Robert *et al.* 2001; Furukawa und Gouaux 2003; Schorge und Colquhoun 2003; Furukawa *et al.* 2005; Naur *et al.* 2005).

Basierend auf den kristallographischen Daten stellt sich die LBD als eine zweiblättrige Struktur (S1 und S2) dar, die in allen Untereinheiten der iGluR-Familie konserviert ist. Die Bindung des Agonisten erfolgt zwischen den beiden S1 und S2 Segmenten und ist, mit Ausnahme der NMDA-NR1-Untereinheit, für AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren ähnlich (Furukawa und Gouaux 2003). Die α -Carboxylgruppe des Agonisten wird zwischen einem Arginin (S1), Threonin (S1) und Serin (S2) über direkte Wasserstoffbrücken angeordnet, während die α -Aminogruppe durch eine tetrahedrale Struktur eines Prolin (S1), Threonin (S1) und Glutamat (S2) koordiniert wird

(Armstrong *et al.* 1998; Holm *et al.* 2005a; Naur *et al.* 2005). Das Bindungsmuster für das γ -Carboxyl variiert hingegen. Im Falle von Glutamat und Kainat koordinieren ein Serin (S2) und Threonin (S2) sowie zwei Wassermoleküle das γ -Carboxyl. Die AMPA-Isoxazolgruppe wird durch eine Aminosäure und drei Wassermoleküle gebunden (Armstrong und Gouaux 2000; Gouaux 2004; Mayer 2005, 2006). Die Glycin-Spezifität der NR1-Untereinheiten resultiert in einem Tryptophan (S2) im Vergleich zu einem Valin (S2) an entsprechender Position der NR2-Untereinheit, so dass die Koordination des γ -Carboxyl des Glutamats in NR1-Untereinheiten verhindert wird (Banke *et al.* 2001; Furukawa und Gouaux 2003; Pentikainen *et al.* 2003; Frandsen *et al.* 2005). Weiterführende Informationen sind in den folgenden Übersichtsartikeln verfügbar: (Gouaux 2004; Mayer 2005; Chen und Wyllie 2006; Mayer 2006).

Zusammengefasst sind die Strukturdaten für der iGluR_{en} am Umfangreichsten für die LBD verfügbar, und es konnte gezeigt werden, dass die allosterischen Mechanismen der Kanalöffnung in erster Linie über die Grenzfläche der LBD_{en} zwischen den Untereinheiten vermittelt werden (Partin *et al.* 1996; Sun *et al.* 2002; Jin *et al.* 2005; Armstrong *et al.* 2006; Weston *et al.* 2006; Hansen *et al.* 2007; Mitchell und Fleck 2007)

1.2 P2X-Rezeptoren

ATP dient nicht nur als universeller, molekularer Energiespeicher, sondern auch als Modulator der Neurotransmission und darüber hinaus als eigenständiger Neurotransmitter zur Aktivierung von metabotropen P2Y und ionotropen P2X Rezeptoren (Burnstock 1997; Finger *et al.* 2005).

Die erste Beschreibung der Wirkung von Purinen bzw. Adenin-Verbindungen auf das Herz und die Blutgefäße wurde 1929 beschrieben (Drury und Szent-Gyorgyi 1929). Der Vorschlag, dass ATP tatsächlich ein eigenständiger Transmitter mit entsprechenden Rezeptoren sein könnte, erfolgte 1970 (Burnstock *et al.* 1970). In dieser Studie wurde eine nicht-adrenerge und nicht-cholinerge (NANC)-Transmission in den bandartigen Längsstreifen der Dickdarmwand (*Taenia coli*) und im Magen des Meerschweinchens untersucht (Burnstock *et al.* 1970). Es konnte gezeigt werden, dass ATP in diesem Präparat Ströme ähnlich der adrenergen und cholinergen Aktivierung auslösen konnte, und dass ATP nach Stimulation dieser Nerven sezerniert wird. Kurz darauf gab es Hinweise auf ATP als Neurotransmitter in erregenden NANC-Neuronen der Harnblase, und es wurde der Begriff der purinerger Transmission geprägt (Burnstock 1972). Einige Jahre später wurde eine einheitliche Nomenklatur für Purin-aktivierte Rezeptoren (P1-

und P2–Rezeptoren) vorgeschlagen (Burnstock und Kennedy 1985) und weiterentwickelt (Fredholm *et al.* 1994; IUPHAR Nomenklatur: Alexander *et al.* 2007). Als P1–Rezeptoren werden demnach Rezeptoren bezeichnet, die auf extrazelluläre Nucleoside, wie z. B. Adenosin reagieren, während P2–Rezeptoren durch Nucleotide (z. B. ATP, UTP) aktiviert werden. Diese werden weiter unterteilt in metabotrope P2Y– und ionotrope P2X–Rezeptoren (Abbraccio und Burnstock 1994; siehe Abbildung 1.4), die nicht–selektive Ionenkanäle ausbilden.

Die purinergen Rezeptoren sind an verschiedenen physiologischen Vorgängen in Neuronen und nicht–neuronalem Gewebe wie z. B. Reizleitung, Immunantwort, Entzündung, Apoptose und Gefäßregulation beteiligt (North 2002; Burnstock und Knight 2004; Burnstock 2007)

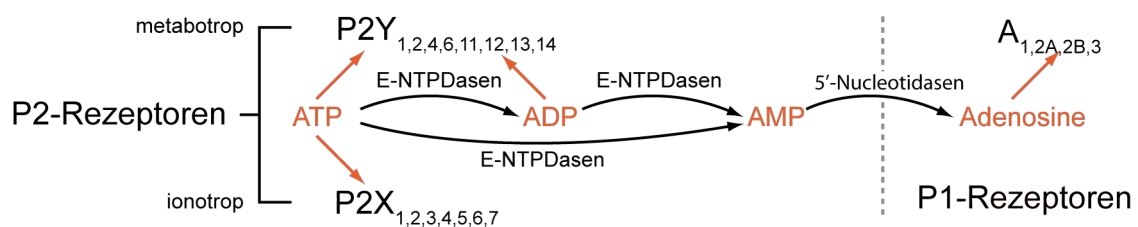


Abbildung 1.4 Übersicht der purinergen Rezeptoren und Untereinheiten. Die P2 Rezeptoren werden in metabotrope P2Y– und ionotrope P2X–Rezeptoren unterteilt. Der Agonist ATP wird durch Ekto–Nucleosid–Triphosphat–Diphosphohydrolasen (E–NTPDasen) zu ADP und AMP hydrolysiert. AMP wird durch 5'–Nucleotidasen zu Adenosin hydrolysiert, was P1–Rezeptoren aktiviert (Robson *et al.* 2006; Burnstock 2007).

1.2.1 Struktur der P2X–Rezeptoren

Eine einzelne Untereinheit der P2X–Rezeptoren besteht aus zwei Transmembrandomänen, einer großen Extrazellulärdomäne mit ca. 300 Aminosäuren und zwei intrazellulären Termini (North 2002). Bisher sind sieben verschiedene Untereinheiten (P2X_{1–7}) kloniert worden (Burnstock 2006). Ein funktioneller Rezeptorkomplex ist aus drei Untereinheiten aufgebaut, was für P2X₁, P2X₂, P2X₃ und P2X₄ gezeigt wurde (Nicke *et al.* 1998; Stoop *et al.* 1999; Aschrafi *et al.* 2004; Barrera *et al.* 2005; Barrera *et al.* 2007). Die trimere Architektur der P2X–Rezeptoren im Vergleich zu den pentameren Acetylcholin–Rezeptoren (nAChRen), oder den tetrameren Glutamatrezeptoren (iGluRen) zusätzlich zu unterschiedlichen Primärstrukturen der Untereinheiten qualifizieren die P2X–Rezeptoren als eigenständige Klasse innerhalb der Superfamilie der Neurotransmitter–gesteuerten Ionenkanäle (Abbraccio und Burnstock 1994; North 2002; Alexander *et al.* 2007; Abbildung 1.1). Vergleichbar mit anderen Ionenkanalfamilien

erweitert sich die funktionelle und pharmakologische Diversität der P2X-Rezeptoren zusätzlich durch Heteromerisierung der Untereinheiten (siehe folgendes Kapitel).

Für nAChRen und iGluRen wurden lösliche Proteine mit hoher Homologie zu den jeweiligen Liganden-Bindungsdomänen identifiziert und kristallisiert, so dass heute zumindest die Struktur der LBD hinreichend bekannt ist (O'hara *et al.* 1993; Brejc *et al.* 2001). Für die P2X-Rezeptoren wurde bisher keine entsprechende Protein-Vorlage identifiziert. Kürzlich konnten jedoch säuresensitive ionotrope Kanäle (ASICs) kristallisiert werden (Jasti *et al.* 2007). Deren Topologie, bestehend aus zwei Transmembrandomänen verbunden über eine große extrazelluläre Domäne und zwei intrazellulären Termini, entspricht dem Aufbau der P2X-Rezeptoren. Die Kristallstruktur der ASICs zeigt ebenfalls eine trimere Architektur, obwohl keine Sequenzhomologie zu P2X-Rezeptoren besteht (Jasti *et al.* 2007). Vor kurzem wurde ein P2X-ähnlicher-Rezeptorkanal in der Amöbe *Dictyostelium discoideum* identifiziert; dieser stellt den ersten P2X-ähnlichen-Rezeptor einzelliger Lebewesen dar, der möglicherweise nach Überexpression für Kristallisationsstudien genutzt werden kann (Fountain *et al.* 2007). Dieser Rezeptorkanal befindet sich in der kontraktile Vakuole der Amöbe und ist an der Osmoregulation beteiligt. Funktionelle Untersuchungen und Punktmutationen dieses Rezeptors zeigten teilweise konservierte Struktur-Funktions-Beziehungen zu bekannten P2X-Rezeptoren (Fountain *et al.* 2007).

Wegen des Mangels an hochauflösenden homologen Strukturen gibt es nur begrenzte Hinweise auf Struktur und Funktion einzelner Bereiche der P2X-Rezeptoren. Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Bestimmung der Struktur sind funktionelle Untersuchungen punktmutierter Rezeptoren. Eine Übersicht der bekannten Strukturinformationen sind in Abbildung 1.5 anhand der Primärsequenz des P2X₁-Rezeptors der Ratte zusammengefasst.

Alle P2X-Rezeptoren besitzen zehn konservierte Cysteine in der Ektodomäne, die in zwei Bereichen untereinander quervernetzt sind (Clyne *et al.* 2002; Ennion und Evans 2002b; Nakazawa *et al.* 2004; Abbildung 1.5). In der Primärsequenz des P2X₁-Rezeptors befinden sich fünf mögliche Konsensussequenzen (Asn-X-Ser/Thr) zur Glykosylierung (Valera *et al.* 1994). Es gibt Hinweise, dass die Positionen N153, N184 und N210 nur mit Mannose-reichen Zuckerseitenketten versehen werden und die Position N284 wegen eines drei Aminosäuren entfernten Prolins nicht glykosyliert wird (Rettinger *et al.* 2000). Die Position N300 ist komplex glykosyliert und für die Funktion des Rezeptors essentiell (Nicke *et al.* 1998; Roberts und Evans 2006). Aminosäuren, die

möglicherweise mit dem Agonisten interagieren, sind in Kapitel 1.2.3 näher beschrieben.

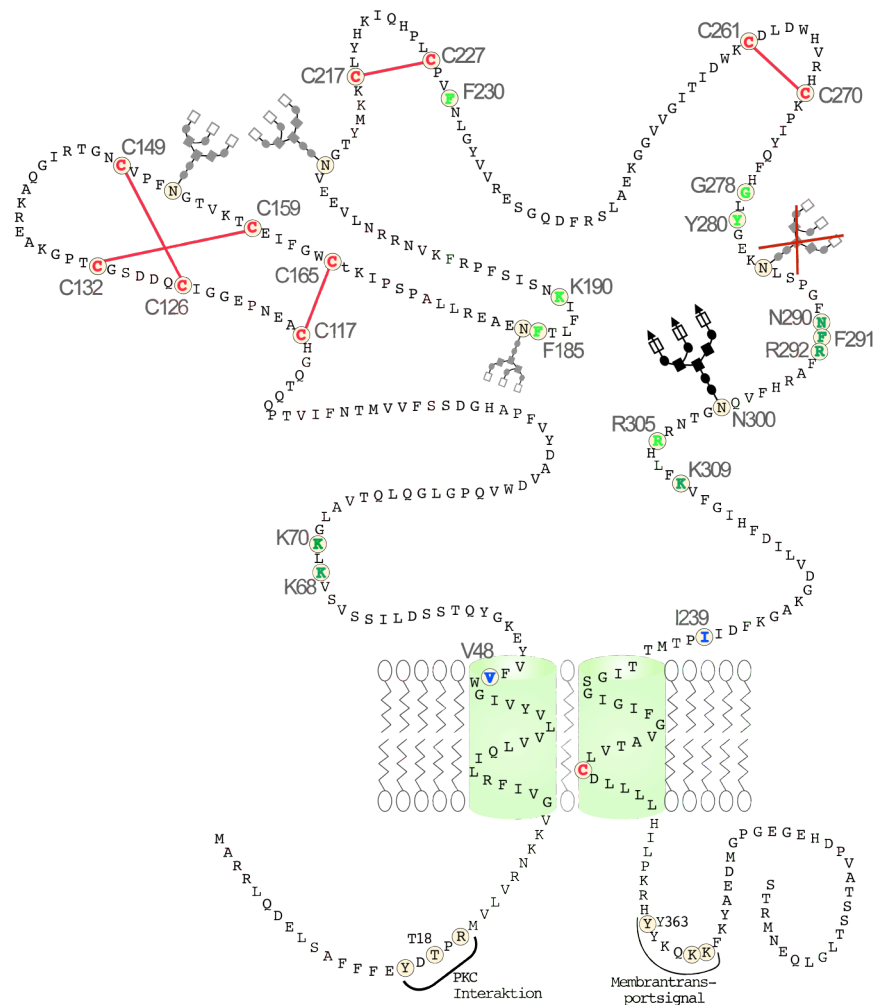


Abbildung 1.5 Primärsequenz des P2X₁-Rezeptors der Ratte. Dargestellt sind die Aminosäuren als Einzelbuchstaben kodiert. In rot sind die konservierten Cysteine mit postulierter Quervernetzung (Clyne *et al.* 2002; Ennion und Evans 2002b; Nakazawa *et al.* 2004), in grün wahrscheinlich an der Agonistenbindung beteiligten Aminosäuren dargestellt (Ennion *et al.* 2000; Roberts und Evans 2004, 2006, 2007). In hellgrün sind homologe Aminosäuren zu putativen ATP-bindenden Resten anderer P2X Untereinheiten dargestellt (Jiang *et al.* 2000; Yan *et al.* 2005; Yan *et al.* 2006; Zemkova *et al.* 2007). Blau unterlegt sind nach Cystein-Mutation quervernetzbar Aminosäuren (Rassendren *et al.* 1997; Jiang *et al.* 2001; Jiang *et al.* 2003). Drei der fünf möglichen Glykosylierungsstellen sind mit Kernglykosylierungsstrukturen versehen und eine mit komplexen Zuckermolekülen. Eine Position wird nicht glykosyliert (Valera *et al.* 1994; Nicke *et al.* 1998; Rettinger *et al.* 2000; Roberts und Evans 2006). Weiterhin sind ein PKC (Proteinkinase C) Interaktions- (Boue-Grabot *et al.* 2000; Ennion und Evans 2002a; Liu *et al.* 2003) und ein Membrantransportsignal identifiziert worden (Chaumont *et al.* 2004; Vial *et al.* 2006).

1.2.2 Assemblierung der P2X-Rezeptoren

Transkripte und/oder Proteine für P2X-Untereinheiten wurden in den meisten Säuger- gewebe gefunden (North 2002; Burnstock und Knight 2004). In vielen Fällen sind zwei oder mehr der sieben bekannten P2X-Subtypen in einem Gewebe bzw. einer Zelle

exprimiert. Demnach ist es wahrscheinlich, dass native P2X-Rezeptoren hinsichtlich ihrer biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften nur selten heterolog exprimierten, homomeren P2X-Rezeptoren entsprechen (Nicke und King 2006). Der erste Hinweis auf heteromere P2X_{2/3}-Rezeptoren resultierte aus den pharmakologischen Unterschieden zwischen dem heterolog exprimierten P2X₃-Rezeptor, aus dorsalen Wurzelganglien kloniert, und Messungen nativer P2X-Rezeptoren dieses Gewebes (Lewis *et al.* 1995). Erst die Kombination von rekombinanten P2X₂- und P2X₃-Rezeptoren erbrachte ATP-aktivierte Ströme mit ähnlichen Charakteristika. Eine Ko-präzipitationsstudie bakuloviral exprimierter P2X₂- und P2X₃-Rezeptoruntereinheiten bestätigte biochemisch die Heteromerisierung dieser beiden Untereinheiten (Radford *et al.* 1997).

Seitdem sind mehrere heteromere P2X-Rezeptoren durch vielfältige Methoden identifiziert worden. Torres und Kollegen führten Koimmunopräzipitationsexperimente mit heterolog exprimierten P2X-Rezeptor-Untereinheiten durch und wiesen biochemisch elf verschiedene heteromere P2X-Rezeptoren nach (P2X_{1/2}, P2X_{1/3}, P2X_{1/5}, P2X_{1/6}, P2X_{2/3}, P2X_{2/5}, P2X_{2/6}, P2X_{3/5}, P2X_{4/5}, P2X_{4/6}, P2X_{5/6}; Torres *et al.* 1999b). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass alle Untereinheiten außer P2X₇-Untereinheiten Heterooligomere bilden. Von diesen Kombinationen konnten bisher P2X_{1/5}- (Le *et al.* 1999), P2X_{2/3}- (Lewis *et al.* 1995; Radford *et al.* 1997), P2X_{2/6}- (King *et al.* 2000), P2X_{4/6}- (Le *et al.* 1998) und P2X_{1/2}-Rezeptoren (Brown *et al.* 2002; Aschrafi *et al.* 2004) funktionell charakterisiert werden (Übersichtsliteratur: North 2002; Nicke und King 2006). Eine weitere, bisher nicht bekannte heteromere P2X_{1/4}-Rezeptorkombination wurde ebenfalls identifiziert und charakterisiert (Nicke *et al.* 2005). Außerdem wurde eine funktionelle und strukturelle Interaktion der P2X₄- und P2X₇-Untereinheiten aufgezeigt, so dass eine Heteromerisierung dieser beiden Untereinheiten angenommen werden kann (Guo *et al.* 2007). Dies steht im Gegensatz zur bisherigen Annahme, dass P2X₇-Untereinheiten nicht heteromerisieren würden (Dubyak 2007).

Funktionelle homo- und heteromere P2X-Rezeptoren sind Trimere. Folglich wird die Verteilung von Untereinheiten innerhalb eines heteromeren Rezeptorkomplexes nicht symmetrisch sein. Bisher deuten wenigstens zwei Studien auf eine feste Stöchiometrie des heteromeren P2X_{2/3}-Rezeptors hin. Jiang und Kollegen führten zwei Cystein-Mutationen (V48C und I329C, Nummerierung nach P2X₁) in je eine der vermuteten Transmembrandomänen ein, was zur Quervernetzung über Disulfidbrücken zwischen je einer P2X₂- und P2X₃-Untereinheiten und damit zu nicht-funktionellen Rezeptoren

führte (Jiang *et al.* 2003). Die Koexpression einer zweifach mutierten P2X₂-Untereinheit mit einer wt-P2X₃-Untereinheit unterschied sich nicht von dem wt-P2X_{2/3}-Rezeptor und änderte seine Eigenschaften nach DTT-Behandlung nicht (Jiang *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu führte die Koexpression einer doppelt mutierten P2X₃- mit einer wt-P2X₂-Untereinheit zu einer Stromzunahme infolge der DTT-Behandlung. Demnach wurde von einer Stöchiometrie von einer P2X₂- mit zwei P2X₃-Untereinheiten für den Rezeptor angenommen (Jiang *et al.* 2003). Ein ähnlicher Ansatz nutzte zwei Lysin-zu-Alanin-Mutationen (K68A und K309A, Nummerierung nach P2X₁), die die Wirkung von ATP an den P2X₂- und P2X₃-Rezeptoren stark erniedrigte (Wilkinson *et al.* 2006). Die Kanaleigenschaften einer derart doppelt mutierten P2X₂-Untereinheit konnten durch Koexpression einer wt-P2X₃-Untereinheit wieder hergestellt werden. In der umgekehrten Anordnung (doppelt mutierte P2X₃-Untereinheit in Koexpression mit wt-P2X₂-Untereinheiten) war keine Wiederherstellung des Stroms möglich, so dass eine P2X₂- in Kombination mit zwei P2X₃-Untereinheiten pro Rezeptorkomplex angenommen wurde (Wilkinson *et al.* 2006). Für die P2X_{1/2}-Kombination konnte durch Kopurifikation aus *Xenopus laevis*-Oozyten und Quantifizierung der Untereinheiten nach Gel-Elektrophorese eine Assemblierung von einer P2X₁- mit zwei P2X₂-Untereinheiten gezeigt werden (Aschrafi *et al.* 2004).

Im Gegensatz dazu gibt es für die Stöchiometrie weiterer heteromerer P2X-Rezeptoren unterschiedliche Evidenzen. So wurde zum Beispiel für die heteromeren P2X_{1/4}- und P2X_{1/5}-Rezeptoren eine variable Stöchiometrie vorgeschlagen (Le *et al.* 1999; Nicke *et al.* 2005). Kürzlich wurde durch den Einsatz eines Rasterkraftmikroskops gezeigt, dass die Stöchiometrie der P2X_{2/6}-Rezeptoren von den relativen Expressionsstärken der jeweiligen Untereinheiten in tsA 201 Zellen abhängt (Barrera *et al.* 2007).

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Stöchiometrien könnte alternatives Spleißen ein weiterer Grund für die beobachtete Diversität der funktionellen P2X-Rezeptoren darstellen und die Untersuchung nativer Rezeptoren erschweren (z. B. Brandle *et al.* 1997; Cheewatrakoolpong *et al.* 2005; Koshimizu *et al.* 2006).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die hohe beobachtete funktionelle Diversität der ATP-aktivierten Rezeptoren durch Heteromerisierung mit unterschiedlichen Stöchiometrien und (möglicherweise) bisher unbekanntem Spleißvarianten verursacht wird. Weiterführende Untersuchungen der Untereinheiten-Kombinationen der verschiedenen P2X-Subtypen werden für die Charakterisierung von P2X-Rezeptoren in nativen Geweben notwendig sein.

1.2.3 Lokalisation der Agonisten-Bindungstasche

Die Strukturaufklärung der P2X-Rezeptoren begann vor etwa zehn Jahren im Anschluss an die Klonierung der Rezeptoren. Wie bereits erwähnt, ist bisher kein lösliches Protein mit Homologie zu Anteilen der P2X-Rezeptoren verfügbar. Insbesondere ist wenig über die Lokalisation der ATP-Bindungsstelle am/im Rezeptor bekannt. Somit stützen sich Informationen über an der Bindung beteiligte Aminosäuren auf funktionelle Untersuchungen punktmutierter Rezeptoren und Vorhersagen der Sekundärstruktur.

Solche Vorhersagen wurden auf die zweite Hälfte der extrazellulären Domäne angewandt und eine Ähnlichkeit zu Aminoacyl-tRNA-Synthetase postuliert. Demnach koordinieren die Aminosäuren 170 bis 330 des P2X-Rezeptors die Bindung eines ATP Moleküls über β -Faltblattstrukturen (Freist *et al.* 1998). Dieses Modell wurde als Grundlage für Punktmutationen des P2X₄-Rezeptors und anschließenden funktionellen Studien verwendet (Yan *et al.* 2005). Die Alanin-Mutanten der Aminosäuren K190, F230, R278 und D280 des P2X₄-Rezeptors zeigten eine mehr als 100fach reduzierte ATP-Wirksamkeit und wurden demnach als an der Agonistenbindung beteiligt postuliert (Yan *et al.* 2005). Da die dimeren tRNA-Synthetasen ATP-Moleküle innerhalb einer Untereinheit binden, könnte dies auf eine Lokalisation der ATP-Bindungsstelle innerhalb einer P2X-Untereinheit hindeuten. Eine Erweiterung dieses Modells erfolgte durch Untersuchung zusätzlicher Punkt-Mutationen (K67A, F185A, K190A, F230A, R278A, D280A, R295A) in P2X₄-Rezeptoren (Zemkova *et al.* 2007). Diese Studien deuten auf eine wichtige Funktion für K67 und R295 entweder für die Bindung des Agonisten oder für die nachfolgende Konformationsänderung, die zur Öffnung des Kanals führen, hin (Zemkova *et al.* 2007). In diesem Modell ist die Region K313 bis I333 vermutlich an der Kanalöffnung beteiligt (Yan *et al.* 2006). Eine kürzlich erschienene Studie lieferte zusätzliche Hinweise auf die Kanalöffnungsfunktion von K308 im P2X₂-Rezeptor (Homolog zu K313 im P2X₄-Rezeptor). Dies wurde durch die Verwendung eines konstitutiv aktiven P2X₂-Rezeptors (T339S) demonstriert (Cao *et al.* 2007). Die T339S-Mutation destabilisiert den geschlossenen Zustand des Rezeptors und hat demnach eine wichtige Rolle im Schaltverhalten des Rezeptors. In dieser Mutante reduzierte eine zusätzliche K308A-Mutation die Frequenz der spontanen Kanalöffnungen, was in der K69A/T339S-Mutante nicht der Fall ist (Cao *et al.* 2007).

Unabhängig von der Vorhersage der Sekundärstruktur und der möglichen intramolekularen Bindungstasche wurden durch systematische Alanin- und Cystein-Substitutionen die positiv geladenen, konservierten Aminosäuren K68, K70, R292,

R305 und K309 (Nummerierung nach P2X₁-Sequenz) der P2X₁-, P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren identifiziert, die ausschlaggebend für die Agonistenwirksamkeit sind und vermutlich mit den negativ geladenen Phosphatresten des ATP interagieren (Ennion *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2000; Roberts und Evans 2004; Wilkinson *et al.* 2006; Roberts und Evans 2007; Roberts *et al.* 2008). Die Lokalisation der Lysine K68, K70 und K309 auf gegenüberliegenden Seiten der extrazellulären Domäne nahe der ersten und der zweiten Transmembrandomäne (Abbildung 1.5) könnte theoretisch auf eine ATP-Bindungsstelle an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten hinweisen (Wilkinson *et al.* 2006). Weitere Substitutionsstudien zeigten eine reduzierte Markierung mit radioaktivem 2-Azido-ATP und eine verringerte ATP-Effektivität nach Inkubation der F185C-, T186C, N290C-, F291C- und R292C-P2X₁-Mutanten mit MTS-Substanzen (Roberts und Evans 2007). Diese Studie liefert den deutlichsten Hinweis auf eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der Agonistenbindung, i. e. eine stark reduzierte Bindung von MTS-Biotin an diese Cystein-Mutanten in Anwesenheit von ATP (Roberts und Evans 2007). Eine Erweiterung dieser Studie unterstützt die Agonisten-Bindungsfunktion der homologen Aminosäuren des P2X₂- und P2X₄-Rezeptors, die möglicherweise an der Koordination des ATP-Adeninrings beteiligt sind (Roberts *et al.* 2008). Demnach sind zueinander homologe Aminosäuren an der ATP-Bindungstasche der P2X₁-, P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren beteiligt (Roberts und Evans 2007; Roberts *et al.* 2008). Funktionelle Studien an substituierten Rezeptoren konnte die Beteiligung konservierter Glycin-, Aspartat-, Prolin-, Glutamin-, Asparagin- (außer N290), Threonin- (außer T186) und Glutamat-Reste an der ATP-Bindung ausschließen (Ennion *et al.* 2001; Digby *et al.* 2005; Roberts und Evans 2005, 2006).

Zusammengenommen sind möglicherweise die Aminosäuren K68, K70, F185, N290, F291 und R292 (P2X₁-Nummerierung) an der Agonistenbindung in mehreren P2X-Subtypen beteiligt. Dem entgegen ist die Aminosäure K309 und der umgebende Bereich wahrscheinlich an den Konformationsänderungen, die zur Kanalöffnung führen, beteiligt. Die ATP-Bindungstasche wurde ausgehend von den möglicherweise an der Agonistenbindung beteiligten Aminosäuren sowohl innerhalb einer (Yan *et al.* 2005) als auch zwischen zwei (Wilkinson *et al.* 2006) Untereinheiten lokalisiert. Die tatsächliche Lokalisation der Bindungstasche ist somit unklar. Ihre Identifizierung und die der beteiligten Aminosäuren wird das Verständnis der Funktion der P2X-Rezeptoren und die Entwicklung subtypenspezifischer Substanzen unterstützen, mit denen die physiologischen

Funktionen von P2X–Rezeptoren in verschiedenen Geweben und Organen untersucht werden können.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Für die P2X–Rezeptoren gibt es kein Gewebe, aus dem Protein in großer Menge aufgereinigt werden kann, wie es für den nAChR aus dem elektrischen Organ des *Torpedo* möglich ist. Ferner gibt es kein lösliches, P2X–homologes Protein, das zur heterologen Überexpression und anschließender Kristallisation verwendet werden kann, wie es für die iGluRen verfügbar ist. Somit sind die strukturellen Informationen der P2X–Rezeptoren begrenzt und insbesondere ist die Lokalisation der Agonisten–Bindungstasche unklar. Aus der Lokalisation der Bindungstasche leiten sich pharmakologische Eigenschaften heteromerer Rezeptoren ab. Die Lokalisation zwischen zwei Untereinheiten, analog zu den nAChRn, würde die *in vivo* Charakterisierung von heteromeren P2X–Rezeptoren erschweren, da abhängig von den P2X–Untereinheiten im Rezeptorkomplex Bindungsstellen mit unterschiedlichen Eigenschaften entstehen. Eine intra–molekulare Bindungstasche, wie in den iGluRn, hingegen, würde die zur Differenzierung heteromerer P2X–Rezeptoren notwendigen Agonisten und Antagonisten einschränken, da keine neuen Bindungstaschen entstehen. Die bisherigen Untersuchungen von P2X–Rezeptoren ergeben Hinweise auf beide Möglichkeiten, so dass die Lokalisation der ATP–Bindungstasche noch nicht eindeutig geklärt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation der ATP–Bindungstasche der P2X–Rezeptoren innerhalb einer oder zwischen zwei Untereinheiten zu bestimmen. Dazu sollten konservierte Aminosäuren, die an der Agonisten–Bindung beteiligt sind, mit Cysteinen substituiert und die Distanz zwischen diesen Cysteinen durch Disulfidbrückenbildung festgestellt werden. Eine inter–molekulare Quervernetzung von zwei koexprimierten Cystein–substituierten Untereinheiten durch Disulfidbrückenbildung bedeutet eine räumliche Annäherung dieser beiden Cysteine benachbarter Untereinheiten. Dies wäre ein Hinweis auf die Bindung des Agonisten an der Grenzfläche zwischen zwei Untereinheiten. Die intra–molekulare Quervernetzung von zweifach Cystein–substituierten Untereinheiten würde dagegen auf eine Agonisten–Bindungsstelle innerhalb einer Rezeptor–Untereinheit hinweisen.

Für die biochemischen Studien wurde der P2X₁–Rezeptor der Ratte mit N–terminalen Hexahistidylmotiven zur affinitätschromatographischen Aufreinigung nach Expression in *Xenopus laevis*–Oozyten verwendet. Zur Identifizierung quervernetzter Untereinhei-

ten sollten Polyacrylamid–Gel–Elektrophorese–(PAGE)–Methoden zum Einsatz kommen. Als Modellrezeptor für elektrophysiologische Charakterisierung der Cystein–Mutanten mittels Zwei–Elektroden–Spannungsklemme (TEVC) wurde eine nicht–desensitisierende P2X₂₋₁–Chimäre verwendet. Diese Chimäre besitzt die gleichen Bindungseigenschaften wie der P2X₁–Rezeptor, desensitisiert jedoch nicht, so dass im Gegensatz zu P2X₁–Rezeptoren unter Gleichgewichtsbedingungen gemessen werden kann. Abschließend soll das Reduktions–Oxidations–(Redox)–Verhalten der quervernetzbaaren Cysteine durch die Anwendung reduzierender und oxidierender Substanzen während kontinuierlicher TEVC–Messung untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Distanz zwischen analogen Cystein–substituierten Aminosäuren in weiteren P2X–Subtypen zu überprüfen. Dazu wurden homologe Aminosäuren in P2X₂–, P2X₃– und P2X₄–Rezeptoren mit Cysteinen substituiert und analog zu den Versuchen an P2X₁–Rezeptoren auf Quervernetzung getestet.

Das dritte Ziel dieser Arbeit war die Koexpression Cystein–substituierter P2X–Untereinheiten verschiedener Subtypen, um heteromerisierte Untereinheiten mittels Quervernetzung über Disulfidbrückenbildung zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades (*pro analysis*) der folgenden Firmen verwendet:

<i>Fluka</i>	<i>Seelze</i>
<i>New England Biolabs NEB</i>	Ipswich, MA, USA
<i>Roche Diagnostics</i>	Basel, Schweiz
<i>Roth</i>	Karlsruhe
<i>Sigma–Aldrich</i>	Taufkirchen
<i>Toronto Research Chemicals TRC</i>	North York, ON, Kanada

2.1.1.2 Spezielle Chemikalien

[³⁵ S]–Methionin	<i>Perkin Elmer</i> , Waltham, MA, USA
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTPs)	<i>Sigma–Aldrich</i> , Taufkirchen
DNA–Längenstandards	<i>Eurogentec</i> , Köln
Native HMW Marker	<i>Amersham</i> , Freiburg
Iodacetamid	<i>Sigma–Aldrich</i> , Taufkirchen
MTS–2–MTS	<i>TRC</i> , North York, ON, Kanada
MTS–4–MTS	<i>TRC</i> , North York, ON, Kanada
<i>Pfu</i> –Ultra Polymerase	<i>Stratagene</i> , La Jolla, CA, USA
PrecisionPlus Protein Standard	<i>BioRad</i> , Hercules, CA, USA
Restriktionsenzyme	<i>Roche</i> , <i>NEB</i>
T4 DNA–Ligase	<i>Roche</i> , Basel, Schweiz
<i>Taq</i> DNA–Polymerase	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
Vent DNA–Polymerase	<i>NEB</i> , Ipswich, MA, USA

2.1.1.3 Spezielle Geräte und Software

Analysenwaage A120S	<i>Sartorius</i> , Göttingen
Dampfautoklav Vaculab S3000	<i>MMM</i> , München
Elektrophorese Netzteil EPS 500/400	<i>Pharmacia</i> , Karlsruhe
Entwicklermaschine Agfa Curix 60	<i>Agfa</i> , Köln
Feinwaage	<i>Sartorius</i> , Göttingen
Gelapparatur PROT–Resolv Mini–LC	<i>Phase</i> , Lübeck
Gelsystem XCell SureLock	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
PCR Maschine “System 9700”	<i>PE Applied Biosystems</i> , Darmstadt
Inkubator Typ BE800	<i>Memmert</i> , Schwabach
Magnetrührer IKAMAG REO	<i>IKA–Labortechnik</i> , Staufen
Mikroschmiede MF–83	<i>Bachofer</i> , Reutlingen
Spektralphotometer ND–1000	<i>Nanodrop</i> , Wilmington, USA
PH–Meter 766	<i>Knick</i> , Berlin
Reaktionsgefäß Mixer 5432	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Schüttler S25	<i>New Brunswick Scientific</i>

Vakuumentrifuge	<i>Fischer Laborbedarf</i>
Thermostat 5320	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
UV-Tisch Gel Doc 2000	<i>BioRad, Hercules, CA, USA</i>
Verstärker TEC-05X	<i>npi, Tamm</i>
Vortexer Reax 2000	<i>Heidolph, Schwabach</i>
Waage	<i>Sartorius, Göttingen</i>
Wasserbad	<i>GFL, Burgwedel</i>
Zentrifugen	
– Biofuge 15	<i>Heraeus, Hanau</i>
– Biofuge pico	<i>Heraeus, Hanau</i>
– Sorvall RC5C	<i>DuPont, Wilmington, USA</i>
Rotoren Sorvall GSA, SS34, HB4	<i>DuPont, Wilmington, USA</i>

2.1.1.4 Komplettsysteme

Message Machine SP6/T7	<i>Ambion, Huntingdon, UK</i>
MinElute Gel Extraction Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
MinElute PCR Purification Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
Plasmid Kits (Mini, Midi, Maxi)	<i>Qiagen, Hilden</i>
Quick Change Mutagenesis Kit	<i>Stratagene, La Jolla, CA, USA</i>

2.1.2 Standardlösungen

So weit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen in Milli-Q (*Millipore, Billerica, MA, USA*) gereinigtem Wasser angesetzt. Wenn angegeben, wurden die Lösungen für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

2.1.2.1 Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

6x DNA-Gel-Probenpuffer	Ficoll 400	15% (w/v)
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol FF	0,25% (w/v)
1x TE-Puffer	Tris/HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	auf pH 8,0 einstellen	
50x TAE-Puffer	Tris	2 M
	EDTA	50 mM
	Eisessig	60 mM
10x TBE-Puffer	Tris	0,9 M
	Borsäure	1,6% (v/v)
	EDTA	10 mM
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	10 mg/ml

2.1.2.2 Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen

Ampizillinlösung	Ampizillin in H ₂ O, Steril filtriert	100 mg/ml
Kanamycinlösung	Kanamzyinsulfat in H ₂ O, Steril filtriert	50 mg/ml
LB-Flüssigmedium	Bacto-Trypton Bacto-Hefeextrakt NaCl auf pH 7,5 einstellen, direkt autoklavieren	10 g/l 5 g/l 10 g/l
LB-Agar	Bacto-Agar in LB-Flüssigmedium, direkt autoklavieren	20 g/l

2.1.2.3 Puffer und Lösungen für Oozytenkultur und Elektrophysiologie

1x ND96 Oozyten-Ringer	NaCl	96 mM
	KCl	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
	CaCl ₂	1 mM
	HEPES	5 mM
	pH 7,4; autoklavieren	
1x Ca ²⁺ -Frei Oozyten-Ringer	NaCl	96 mM
	KCl	2 mM
	MgCl ₂	2 mM
	HEPES	5 mM
	pH 7,4; autoklavieren	
ATP-Stocklösung	ATP•H ₂ O pH 7,4; Lagerung bei -20°C	100 mM

2.1.2.4 Puffer und Lösungen für SDS-Gelelektrophorese

5x SDS-Gelladepuffer	Tris/HCl, pH 6,8	0,3 M
	SDS	5% (w/v)
	Glyzerol	50% (v/v)
	optional Bromphenolblau	0,1% (w/v)
	optional DTT	0,1 M
	Lagerung bei -20°C	
10x Lämmli-Puffer	Tris	0,25 M
	Glyzin	1,92 M
	SDS	1% (w/v)
Sammelgelpuffer	Tris/HCl, pH 6,8	0,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
Trenngelpuffer	Tris/HCl, pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4% (w/v)

2.1.2.5 Puffer und Lösungen für Blaue native Gelelektrophorese

5x Probenpuffer	6–Aminocapronsäure	500 mM
	Serva Blue G	5% (w/v)
	Vor Gebrauch: 1x in Glyzerol 50% (v/v) verdünnen	
1x Kathodenpuffer	Tricin	50 mM
	Bistris	15 mM
	Serva Blue G	0,005% (w/v)
	Steril filtrieren; Lagerung bei 4°C	
1x Anodenpuffer	Bistris	50 mM
	HCl	ad pH 7,0
	Steril filtrieren; Lagerung bei 4°C	
3x Gelpuffer	6–Aminocapronsäure	1,5 M
	Bistris	150 mM
	HCl	ad pH 7,0
	Steril filtrieren; Lagerung bei 4°C	

2.1.2.6 Allgemeine Puffer und Lösungen für PAGE und Western-Blot

Coomassie-Färbe-Lösung	Coomassie (R250)	0,124% (w/v)
	Essigsäure	7% (v/v)
	Ethanol	50% (v/v)
Entfärbe-Lösung	Essigsäure	10% (v/v)
	Methanol	10% (v/v)
Transferpuffer	Tris	250 mM
	Glyzin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
10x TBS-Puffer	NaCl	1,4 M
	Tris-HCl pH 7,5	200 mM
1x TBST-Puffer	TBS	1fach
	Tween 20	0,1% (v/v)
Ponceau S Lösung	Ponceau S	2% (w/v)
	Salicylsulfonsäure	30% (w/v)
	Trichloressigsäure	30% (w/v)
Blockpuffer	TBS	1 fach
	Ziegenserum (<i>GIBCO, Karlsruhe</i>)	5% (v/v)
	Trockenmilch (Saliter)	5% (w/v)
	Tween 20	0,1% (v/v)

2.1.2.7 Lösungen zur Proteinaufreinigung

Natrium-Phosphat Puffer (NaPi)	1 M Na ₂ HPO ₄ -Lösung	5,3 ml/l
	1 M NaH ₂ PO ₄ -Lösung	94,7 ml/l
	pH 8,0 eingestellt mit NaH ₂ PO ₄	
	Steril filtriert; Lagerung bei -20°C	
Solubilisierungspuffer	Natriumphosphat-Puffer	100 mM
	Digitonin (<i>Fluka</i>)	1% (w/v)
	PefaBlock (<i>Fluka</i>)	0,4 mM
	Optional: Iodacetamid	50 mM
Waschpuffer	Solubilisierungspuffer	20% (v/v)
	Imidazol	30 mM
	NaPhosphat-Puffer 100 mM	ad 100% (v/v)
	Optional: Iodacetamid	10 mM
Elutionspuffer	Tris/HCl	20 mM
	Imidazol	100 mM
	EDTA	10 mM
	Digitonin	1% (w/v)
	pH 7,4 eingestellt, Lagerung bei -20°C	

2.1.3 Nukleinsäuren

2.1.3.1 Verwendete Plasmide

Zur *in vitro* cRNA-Synthese C-terminaler polyA-Fusionskonstrukte wurde der pNKS2 Vektor verwendet (Gloor *et al.* 1995). Das Grundgerüst dieses Vektors besteht aus 2,8 kb mit den notwendigen Sequenzen zur Amplifikation in Bakterien und einem offenen Leserahmen für β -Lactamase. Zusätzlich beinhaltet der Vektor einen SP6-Promoter 5' und ein polyA Signal sowie polyA Sequenz 3' der eingeführten Sequenz.

Die pNKS2 Plasmide mit der P2X₁ Sequenz (www.ncbi.nlm.nih.gov Zugriffsnummer: NP_037129; Nicke *et al.* 1998), P2X₂₋₁-Chimäre (Werner *et al.* 1996; Rettinger und Schmalzing 2004) und P2X₂ Sequenz (NP_446108; Aschrafi *et al.* 2004) wurden von Dr. Annette Nicke zur Verfügung gestellt. Die Vektoren mit P2X₃ Sequenz (NP_112337; Nicke *et al.* 1998) und P2X₄ Sequenz (NP_113782; Soto *et al.* 1996) wurden als Vorlage für PCR-Amplifikation mit 5'-*NcoI* und 3'-*Bsu36I* Schnittstellen innerhalb der Primer (Kapitel 2.1.3.2) und anschließender Ligation in die entsprechenden Schnittstellen des pNKS2 verwendet. Dabei wurden analog zu den P2X₁- und P2X₂-Konstrukten ein Hexahystidylmotiv an den N-Terminus der kodierenden Sequenz angefügt. Im Falle der P2X₃-Sequenz wurden zwei Aminosäureabweichungen von der Datenbanksequenz (NP_112337) per PCR-Mutagenese entfernt. Punktmutationen der Vektoren wurden durch primerbasierte Mutations-PCR erzeugt (siehe 2.2.1.14).

2.1.3.2 Oligonukleotide

Mutagenese- und Sequenzierprimer (s. u.) wurden mit Hilfe der Software MacVector Version 8.2 (Accelrys Software, USA) und dem Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) ausgewählt und von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Für die Mutageneseprimer ist jeweils der „sense“-Primer angegeben, dessen von der wt-Sequenz abweichende Basen hervorgehoben sind. Die zugehörigen antisense-Primer entsprechen jeweils genau den komplementären Sequenzen. Für die zur Klonierung verwendeten Primer sind die neu eingefügten Nukleotide hervorgehoben.

Tabelle 2.1 verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Anwendung
<i>P2X₁ und P2X_{2/1}-Chimäre Mutageneseprimer</i>		
ChimC8S	CTTGGCCCGGGC CAGT TGGTCCGCTTCTG	Mutagenese
P2X ₁ -V48C	CTGGTCTACGTCATTGGGTGG TGCT TTGTCTATGAAAAAGGATAC	Mutagenese
P2X ₁ -K68C	CAGCAGTGTGTCCGT TGC CTCAAGGGCTTGGCTG	Mutagenese
P2X ₁ -K70C	TGTGTCCGTGAAGCT TGT TGGCTTGGCTGTGACCC	Mutagenese
P2X ₁ -F185C	CGTGAGGCTGAGAA CTGC ACCCTCTTCATCAAAAAC	Mutagenese
P2X ₁ -K190C	CTTCACCCTCTTCAT CTG CAACAGCATCAGCTTCC	Mutagenese
P2X ₁ -F291C	CTCCAGGCTTCAACT TGC AGATTTGCCAGGCA	Mutagenese
P2X ₁ -R292C	CTCCAGGCTTCAACT TGCT TTTGCCAGGCATTTCTGT	Mutagenese
P2X ₁ -R305C	GAATGGGACAAACCGT TGT CACCTCTTCAAGGTGT	Mutagenese
P2X ₁ -K309C	CAAACCGTGCACCTCTT TGCG TGTTTGGGATTCACCTTTGATA	Mutagenese
P2X ₁ -I329C	GGCTGGGAAGTTTGACAT CTGCC CTACTATGACTACTATC	Mutagenese
P2X ₁ -ThrPos9	CGCACAGGCAAC CTTGTG CCCCGCGG TCC ACTGTGAAGACATG	Mutagenese
P2X ₁ -ThrPos12	CTTTCCACGCTT CTGGT ACCCAGGGG CTCC CTGGTAGAGGAGG	Mutagenese
P2X ₁ -ThrPos19	GAAGAAGTG CCTCGT CCCCGCGG TTC ACACCCCCTGTGCCAG	Mutagenese
P2X ₁ -ThrPos20	GGAAGTGTGAT CTGGT CCCCGCGG TTCG CACTGCAAACCCATC	Mutagenese
<i>P2X₂ Mutageneseprimer</i>		
P2X ₂ -K69C	GCTCCATCATCAC CTGCG TCAAGGGGATCACCATG	Mutagenese
P2X ₂ -F289C	CTCAGGCTACA ACTGC AGGTTTGCCAAGTATTAC	Mutagenese
P2X ₂ -I328C	GCAGGGAAATTCAGTCT CTGCC CCACCATCATCAATCTGG	Mutagenese
<i>P2X₃ Mutageneseprimer</i>		
P2X ₃ -K63C	GAGTCCTCAGTAGTTACAT TGCG TGAAAGGCTTCGGGC	Mutagenese
P2X ₃ -G201R	CGACAAGGACATAAAG AGGT GCCGCTTCCAC	Mutagenese
P2X ₃ -F280C	CCCTGGCTACA ACTGC AGGTTTGCCAATAC	Mutagenese
P2X ₃ -G305D	CTTTTGGCATCCGCTTT GAT GTGCTGGTATATG	Mutagenese
<i>P2X₄ Mutageneseprimer</i>		
P2X ₄ -K67C	CTCGGTGACAAC CTGCG CCAAAGGTGTGGCTG	Mutagenese
P2X ₄ -F294C	CTCCTGGCTACA ATTGC AGGTTTGCCAAGTAC	Mutagenese
<i>P2X₃ und P2X₄ Klonierungsprimer</i>		
P2X ₃ -5'NcoI	tc CATGGCCCATCATCATCATC ATAACTGTATATCAGACTTCTTC	Klonierung
P2X ₃ -3'Bsu36I	AGAC CTAAGGCT AGTGACCAATAGAATAGG	Klonierung
P2X ₄ -5'NcoI	tc CATGGCCCATCATCATCATC ATGCGGGCTGCTGCTCC	Klonierung
P2X ₄ -3'Bsu36I	AAC CTAAGG TCACTGGTTTCATCTCC	Klonierung

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Anwendung
<i>Sequenzierungsprimer</i>		
SP6	CATTTAGGTGACACTATAG	Sequenzierung
pNKS2rev	GTGGTAATTGTTTTGTAATGC	Sequenzierung

2.1.4 Organismen und Tiere

2.1.4.1 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1–Blue mit dem Genotyp: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'* [*proAB⁺ lacI^f lacZΔM15 Tn10(tet^r)*]

2.1.4.2 *Xenopus laevis*

Die verwendeten *Xenopus laevis* Krallenfrösche wurden vornehmlich von *Nasco* (Fort Atkinson, WI, USA) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Für den Umgang mit Mikroorganismen oder DNA wurden ausschließlich sterile Lösungen, Medien, Gefäße, Pipetten und Pipettenspitzen verwendet. Zur Sterilisation wurden die Flüssigkeiten entweder steril filtriert oder in einem Dampfautoklaven für 45 min bei 1 bar Überdruck auf 120°C erhitzt. Die Identität der vervielfältigten, klonierten oder mutierten DNA–Plasmide wurde durch wenigstens einfache, bei unklaren Ergebnissen beidseitige Sequenzierung (*MWG Biotech AG*) überprüft.

2.2.1.1 Herstellung elektrisch kompetenter Bakterienzellen

Eine bei –70°C gelagerte Dauerkultur von *E. coli* XL1–Blue wurde auf Eis aufgetaut. Davon wurden ca. 50 µl auf einer tetracyclin–haltigen (12 µg/ml) LB–Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Kolonie in 10 ml LB–Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 300 UpM geschüttelt. Am nächsten Tag wurde diese Übernachtkultur in 1 l LB–Medium überführt und unter Schütteln (300 UpM) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (bei 600 nm) von 0,5 bis 0,8 inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur auf Eis innerhalb einer Stunde auf 4°C abgekühlt und durch eine Zentrifugation (4°C / 6000 UpM) pelletiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Alle folgenden Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C und mit

vorgekühlten, sterilen Lösungen durchgeführt. Das Pellet wurde einmal mit 1 l, dann mit 500 ml eiskaltem Aqua dest. und schließlich mit 20 ml 10% (v/v) Glycerol gewaschen. Dabei wurde nach jedem Waschschrift wie zuvor zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Bakterienpellet in 2 ml 10% (v/v) Glycerol resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 50 μ l Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Transformation elektrisch kompetenter Bakterienzellen

Aliquots kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und mit ca. 1–2 μ l Plasmid-DNA (ca. 50 ng) durch Pipettieren vermischt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser (*BioRad*, Hercules, CA, USA) bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ohm. Zum Transformationsansatz wurden anschließend 500 μ l Antibiotika-freies LB-Medium pipettiert, das Ganze in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C im Roller inkubiert. Danach wurden 75–100 μ l auf Antibiotika-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

2 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und für mindestens 8 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit $\sim 200 \mu$ l dieser Kultur wurde eine 200 ml Kultur angeimpft und bis zu einer Bakteriendichte (Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge) von ca. 0,5 im Warmluftschüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde auf Eis gestellt und durch anschließende Zentrifugation bei $\sim 3000g$ für 10' bei 4°C pelletiert. Dieses Pellet wurde unter Vermeidung von Luftblasen in 60 ml eiskalter 50 mM CaCl_2 Lösung resuspendiert. Es wurde erneut nach obigen Vorgaben zentrifugiert und das Pellet diesmal in 3,2 ml eiskalten 50 mM CaCl_2 resuspendiert. Die Suspension wurde für 1 h auf Eis inkubiert um die Membranpermeabilität zu erhöhen. Anschließend wurde sie Suspension mit einem Volumen 40% (v/v) Glycerin in 50 mM CaCl_2 gemischt und in Aliquots zu je 100 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung fand bei -80°C statt. Die Transformationsrate dieser Bakterien wurde durch Transformation eines Aliquots mit 100 ng, 10 ng, 1 ng und 0,1 ng des pUC-Plasmides (*Stratagene*, La Jolla, CA, USA) und anschließender Auszählung der erhaltenen Kolonien bestimmt.

2.2.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen

100 µl zuvor hergestellter, chemischer kompetenter *E. coli* XL1–Blue Zellen wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut, in vorgekühlte 1,5 ml Gefäßen (*Falcon*, Nr.: 35–2059) überführt, mit 1–10 µl der Plasmid–DNA durch Pipettieren vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock für 45 s bei 42°C und eine erneute Kühlung der Zellen für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl auf 37°C vorgewärmten LB–Mediums folgte die Inkubation bei 37°C für eine Stunde. 75–100 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf Antibiotika–haltige LB–Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5 Plasmidpräparation aus Bakterienzellen (Mini, Midi, Maxi)

Für die Plasmidpräparation wurden sowohl das QIAprep Spin Miniprep–Kit als auch das „*Qiagen* Plasmid Midi/Maxi–Kit“ der Firma *Qiagen* (Hilden) nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. In beiden Fällen wurden Übernachtskulturen (5 ml oder 200 ml oder 500 ml) in Antibiotika–haltigem LB–Medium durch Zentrifugation pelletiert, und anschließend wurden die Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen. Nach Neutralisation wurden alle ausgefallenen Komponenten abzentrifugiert, der Überstand auf eine DEAE–Anionenaustauschersäule aufgetragen und störende Komponenten wie RNA und Proteine mit einem Puffer mittleren Salzgehalts von der Säule gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit einem Puffer hohen Salzgehaltes und die Präzipitation wurde mit Isopropanol durchgeführt. Die Gesamtausbeute an DNA betrug bei der Minipräparation ca. 10 µg und bei der Maxipräparation ca. 500 µg.

2.2.1.6 Photometrische DNA–Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der aufgearbeiteten DNA oder RNA und zur Bestimmung der Optischen Dichte von Bakteriensuspensionen wurde der Nanodrop ND–1000 (*Nanodrop*, Wilmington, USA) nach Anleitung des Herstellers verwendet, wobei die jeweilige Lösung nicht verdünnt wurde. Die Konzentration wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) und 600 nm (OD_{600}) abzüglich der optischen Dichte des verwendeten Lösungsmittels bestimmt. Wobei:

$$OD_{260}=1 \cong 50 \mu\text{g doppelsträngiger DNA/ml}$$

$$OD_{260}=1 \cong 40 \mu\text{g einzelsträngiger DNA oder RNA/ml}$$

$$OD_{600}=1 \cong 8 \cdot 10^8 \text{ Zellen/ml}$$

entspricht. Eine Qualitätsabschätzung der RNA– oder DNA–Lösungen erfolgte anhand des Absorptionsverhältnisses der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm (relative DNA/RNA

Menge im Verhältnis zu Proteinmenge) und 240 nm zu 260 nm (relative DNA/RNA Menge im Verhältnis zur Salzdichte der Lösung). Dabei wurde ein Quotient von 1,8 bis 2,0 als optimal erachtet. Sofern nicht anders angegeben, wurden DNA-Lösungen auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und RNA-Lösungen auf 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten wurden in dieser Arbeit 0,7 und 2% (w/v) Gele verwendet, die lineare doppelsträngige DNA-Fragmente im Größenbereich von 0,8–10 kb bzw. 0,5–10 kb zu trennen vermögen. Zur Gel-Herstellung wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE- (Tris-Acetat-EDTA; 2.1.2.1) oder TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA; 2.1.2.1) in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde das Gel auf einer Glasplatte, über der ein Kamm befestigt war, gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel in der Gel-Kammer platziert, mit dem entsprechenden Puffer überschichtet und mit den Proben bzw. mit 5 μl des Markers (Smartladder von *Eurogentec*, Köln) beladen. Nach Anlegen der Spannung (ca. 10 V/cm) wurden die Proben ca. 1–2 h bei RT aufgetrennt. Zum Anfärben der Banden wurde das Gel ca. 15 min in einer wässrigen Lösung inkubiert, die 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid enthielt. Die Detektion und das Fotografieren erfolgten unter UV-Licht (254 oder 302 nm) (Geldokumentationssystem „Gel Doc 2000“, *BioRad*, Hercules, CA, USA).

2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Restriktion von ca. 2–5 μg DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurden die Fragmente elektrophoretisch getrennt und nach Anfärben mit Ethidiumbromid unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) visualisiert. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kits (*Qiagen*, Hilden) mit folgendem veränderten Protokoll isoliert. Zu den Gel-Stücken wurde das dreifache Volumen (w/v) des Puffers QC gegeben und diese ca. 10 min bei 37°C (nicht 50°C!) inkubiert, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Die Inkubation bei der geringeren Temperatur verhindert, dass die DNA-Fragmente z.T. aufgeschmolzen werden und unerwünschte Sekundärstrukturen einnehmen. Anschließend wurde die Mischung auf die im Kit vorhandenen DEAE Anionenaustauschersäulen gegeben und 1 min zentrifugiert. Nach Waschen mit dem Puffer PE (*Qiagen*, Hilden)

und erneuter Zentrifugation wurde der überschüssige Puffer PE entfernt und die DNA mit 10 µl Tris•HCL (pH 8,0) und Zentrifugation eluiert.

2.2.1.9 Dephosphorylierung linearisierter DNA–Fragmente

Bei Ligationen ist es von Vorteil, eines der zu ligierenden Fragmente einer Phosphatasebehandlung zu unterziehen, insbesondere, wenn es sich um stumpfe („blunt“) und nicht passende bzw. überhängende („sticky“) Enden handelt. Die Dephosphorylierung des mit Restriktionsenzymen behandelten Vektors verhindert eine Religation ohne entsprechendes Insert. Dafür wurde die alkalische Phosphatase aus Rindern (*NEB*) verwendet. Dieses Glykoprotein spaltet am 5' Ende des linearen DNA Fragmentes das Phosphat ab. Da Ligasen freie 3'–Hydroxylgruppen mit 5'–Phosphatresten verbinden, ist nunmehr eine Zirkularisierung nur durch den Einbau eines Fragmentes mit phosphorylierten Enden möglich. Die Phosphatasebehandlung des Vektors wurde mit 1 U Phosphatase in einem Volumen von 11,1 µl für 1 h auf 37°C durchgeführt. Anschließend wurde das Enzym durch 15 min Inkubation bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.2.1.10 Ligation von DNA–Doppelsträngen durch T4–Ligase

Die Ligation von DNA–Fragmenten wurde mit Hilfe des „DNA T4 Ligation Kits“ (*NEB*) durchgeführt. Von den aufgereinigten DNA–Fragmenten wurde zunächst die Konzentration mittels Nanodrop ND–1000 (*Nanodrop*, Wilmington, USA) oder durch Vergleich der Intensitäten der entsprechenden Banden und Marker abgeschätzt. Für die Ligationsreaktion von kohäsiven DNA–Enden wurden Vektor und Insert im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, wobei die Vektorkonzentration bei ca. 50–100 ng lag. Im Gesamtvolumen von 10 µl wurden das entsprechende Volumen der DNA–Fragmente mit jeweils 1 µl 10x Ligationspuffer und Ligase (5 U/µl) vermischt und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach 15 minütiger Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C wurde die Lösung zur Transformation in Bakterien verwendet.

2.2.1.11 Polymerase–Kettenreaktion (PCR)

Die PCR–Methode ("Polymerase chain reaction") ermöglicht die Vervielfältigung eines bestimmten DNA–Bereiches, basierend auf einem Vorlagenstrang. Die grundlegende Methode wurde 1985 beschrieben (Saiki *et al.* 1985; Mullis *et al.* 1986). Das Grundprinzip besteht aus der (1) Denaturierung der Vorlage, (2) Anlagerung von Oligonukleotiden („Primern“) und der anschließenden (3) Elongation der Zielsequenz durch


die verwendete Polymerase, ausgehend von den 3' Enden der Primer. Diese drei Schritte werden mehrfach in Folge ausgeführt, wobei theoretisch bei jeder Zyklusabfolge die Anzahl der vorhandenen synthetisierten DNA-Stränge verdoppelt wird. Um eine langfristige Leistungsfähigkeit bei wiederholter Denaturierung bei 95°C zu gewährleisten, werden thermostabile Polymerasen verwendet, wie zum Beispiel die *Taq*-Polymerase aus dem Organismus *Thermophilus aquaticus* oder die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*.

2.2.1.12 Standard PCR zu analytischen Zwecken

Zur Überprüfung des Vorhandenseins bestimmter Sequenzen innerhalb eines neu erstellten Plasmides wurde eine *Taq*-basierte PCR nach Angaben des Herstellers (*Invitrogen*) verwendet. Zur Amplifikation der gewünschten Fragmente aus Plasmiden wurde folgende Vorschrift verwendet:

H ₂ O	19,2 μ l
10x Puffer (Invitrogen)	2,5 μ l
dNTP-Mischung (10 mM, Invitrogen)	1,0 μ l
Plasmid-DNA (ca. 50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Primer (10 mM/ μ l)	je 0,5 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase (Invitrogen)	0,3 μ l
Entsprechendes Gesamtvolumen	25 μ l

Das Mischen der Lösung geschah auf Eis. Direkt im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße in die bereits 95°C heiße PCR Maschine gestellt und folgendes Programm wurde gestartet:

Initiale Denaturierung	95°C	5'	
Denaturierung	95°C	30''	 30 Wiederholungen
Anlagerung	50°C	30''	
Elongation	72°C	1'	
Finale Elongation	72°C	5'	
Reaktionsende	4°C		

Anschließend wurden 5 μ l zur Analyse auf einem Agarose-Gel verwendet.

2.2.1.13 PCR zur Subklonierung

Um bei inkompatiblen Schnittstellen spezifische DNA-Sequenzen in einen anderen Vektor zu übertragen, wurde die PCR Methode zur positionsspezifischen Amplifikation verwendet. Vorteil dieser Methode ist es, die Enden der amplifizierten DNA-Sequenz durch entsprechende Planung der Primer vorher zu bestimmen und ggf. gewünschte Restriktionsschnittstellen zu implementieren.

So wurden unter anderem die kodierenden P2X₃ und P2X₄ Sequenzen mit einem zusätzlichen Hexahistidylmotiv (His-Anhang) am 5'-Ende versehen. Ferner wurde ein *NcoI* Motiv im 5'-Bereich des His-Anhangs und eine *Bsu36I* Schnittstelle im 3'-Bereich der kodierenden Sequenz generiert. Basierend auf diesen Restriktionsschnittstellen wurde das Fragment sowie der pNKS2 Zielvektor mit genannten Enzymen geschnitten und die gewünschte Sequenz mit dem Vektor ligiert. Um ungewünschte Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz zu minimieren wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet. Vorteil dieser so genannten „Proof-reading“ Polymerase aus dem Organismus *Pyrococcus furiosus* besteht in der 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die ein „Korrekturlesen“ des synthetisierten Stranges erlaubt. Somit reduzieren sich die zufällig eingebrachten Einzel-nukleotid-Mutationen auf ein Minimum. Dennoch wurde im Anschluss an die PCR-basierte Klonierung und Vervielfältigung in Bakterien der neu erhaltene Vektor sequenziert, um die korrekte Nukleotidabfolge zu gewährleisten. Das verwendete Protokoll wird in 2.2.1.14 beschrieben.

2.2.1.14 PCR-basierte Mutagenese

Zur Einführung von Mutationen in proteinogene Sequenzen verschiedener Plasmide wurde das „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (*Stratagene*, La Jolla, CA, USA) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide waren 23–48 bp (Tabelle 2.1) lang und wurden von der Firma *MWG Biotech* synthetisiert. Folgende Abbildung veranschaulicht das Prinzip:

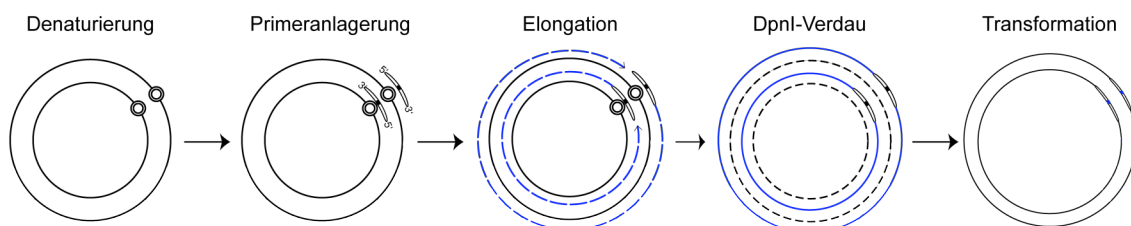


Abbildung 2.1 Amplifikationsprinzip der Mutagenese-PCR. Skizziert sind die essentiellen Schritte der Amplifikation: Denaturierung; Anlagerung der Primer mit enthaltener Punktmutation; Elongation über eine *Pfu*-Polymerase; *DpnI*-Verdau des Vorlagenstranges; Transformation in Bakterien.


Analog zu der Taq-PCR finden auch hier die drei maßgeblichen Schritte, (1) Denaturierung der DNA, (2) Anlagerung der Primer und (3) Elongation der Primer durch die *PfuTurbo*, statt. In dem speziellen Fall der Mutagenese PCR enthalten der sense und antisense Primer Nukleotide, die für eine, nicht in der Vorlagensequenz vorhandene, Aminosäure kodieren. Durch den Einbau dieser Oligonukleotide in die neu synthetisier-

ten DNA–Stränge resultieren Plasmide mit veränderter Nukleotidsequenz innerhalb der Primer und Einzelstrangbrüchen an den jeweiligen 5'–Enden der Primer. Anschließend an die PCR wird der methylierte Vorlagenstrang durch das Enzym *DpnI* (*Diplococcus pneumoniae*) selektiv geschnitten und die gesamte Mischung in *E. coli* XL1–Blue Bakterien transformiert. Das *DpnI* verdaute Plasmid wird von den Zellen nicht als Plasmid erkannt und folglich nicht vervielfältigt, wohingegen jedoch die Einzelstrangbrüche des mutierten Plasmide per bakterieller Ligasen geschlossen und das Plasmid vervielfältigt wird.

Für die PCR–Reaktionen wurden folgende Mengen eingesetzt:

H ₂ O	19 μ l
10x Puffer (Stratagene, La Jolla, CA, USA)	2,5 μ l
dNTP–Mischung (10 mM, Invitrogen)	1,0 μ l
Plasmid–DNA (ca. 50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Primer (10 mM/ μ l)	je 0,5 μ l
<u>PfuTurbo–Polymerase (Stratagene) (2,5 U/μl)</u>	<u>0,5 μl</u>
Entsprechendes Gesamtvolumen	25 μ l

Das Mischen der Lösung geschah auf Eis. Direkt im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße in die bereits 95°C heiße PCR Maschine gestellt und folgendes Programm wurde gestartet:

Initiale Denaturierung	95°C	30'	
Denaturierung	95°C	30''	
Anlagerung	xx°C*	30'	
Elongation	72°C	15'	
Finale Elongation	72°C	7'	
Reaktionsende	4°C		

*Je nach Primerpaar wurde die Anlagerungstemperatur zwischen 55°C und 60°C variiert.

Anschließend wurden 5 μ l zur Analyse auf einem Agarose–Gel verwendet. Für die Restriktion der methylierten DNA wurde zum PCR–Mix 1 μ l *Dpn* I (10 U/ μ l) (*NEB*) zugegeben, gut gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. 1–5 μ l des Ansatzes wurden dann entweder per Hitzeschocktransformation oder Elektrotransformation in *E. coli* XL1–Blue eingeführt.

2.2.1.15 *in vitro* Synthese von cRNA

Zur Expression der Rezeptorenmutanten in *Xenopus laevis*–Oozyten wurde cRNA zur Injektion hergestellt. Die *in vitro*–Transkription wurde mit dem SP6 oder T7 „Message Machine Kit“ (*Ambion*, Huntingdon, UK) durchgeführt. Vorteil dieses Komplettsystems

ist, dass die synthetisierte cRNA mit einer 5'-„Capstruktur“ (5'-7MeGxxxG-3') versehen wird. Zusätzlich befindet sich auf dem Vorlagenplasmid (pNKS2) eine polyA-Sequenz, wodurch die Stabilität bzw. die Translationseffizienz *in vivo* erheblich erhöht wird. Während der Durchführung wurden stets alle gängigen Empfehlungen zur Vermeidung der RNAsen Kontamination eingehalten. Um eine gleichmäßige Länge aller cRNA-Moleküle zu erhalten, wurden 10 μg des DNA-Plasmid mit dem zu transkribierenden Insert mit 10 U des Restriktionsenzym *EcoRI* (für pNKS2) oder *PacI* (für pSGEM) innerhalb von 16 h linearisiert. Eine anschließende Hitzeinaktivierung (65°C für 10 Minuten) denaturierte das Enzym, so dass es nicht mehr mit der linearisierten DNA interagiert. Um das Enzym und weitere Verunreinigungen (z. B. RNAsen) zu entfernen, wurde die Lösung mit dem „MinElute“ System (*Qiagen*, Hilden) nach der „Enzymatic reaction cleanup“ Vorschrift des Herstellers aufgereinigt und in 10 μl RNAsen freiem Wasser aufgenommen. Die DNA-Konzentration der erhaltenen Lösung wurde mit dem Spektralphotometer „Nanodrop ND-1000“ (*Nanodrop*, Wilmington, USA) bestimmt. Folgender Ansatz wurde für die cRNA-Synthese nach der Vorschrift des „Message Machine Kits“ zusammen pipettiert:

10x Transkriptionspuffer	1 μl
linearisiertes Plasmid	1 μg
NTP capping Solution	5 μl
SP6 oder T7 Enzymmix	1 μl
Primer (10 mM/ μl)	je 0,5 μl
DEPC-H ₂ O	ad 10 μl

Die cRNA-Synthesereaktion wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 μl DNase I und eine 15 minütige Inkubation bei 37°C, um den linearisierten DNA-Strang zu beseitigen. Die Aufreinigung der cRNA erfolgte durch eine Lithiumchlorid Präzipitation nach Angaben des Herstellers (*Ambion*, Huntingdon, UK) und das erhaltene Pellet wurde in 15 μl RNase freiem H₂O aufgenommen. Die Quantifizierung der cRNA erfolgte durch photometrische Absorptionsbestimmung und eine Qualitätskontrolle per TBE-Agarosegel (siehe 2.2.1.7).

2.2.1.16 Software zur Sequenzauswertung

Primer wurden geplant und erstellt mit dem Internet-basierten Primer3-Programm (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Zur Auswertung von Sequenzdaten wurden die Programme Sequencher (*Gene Codes*, Ann Arbor, MI, USA) in der Version 4.5, sowie 4Peaks Ver-

sion 1.7 (<http://mekentosj.com>) genutzt. Plasmide wurden mit dem Programm MacVector in der Version 8.2 (Accelrys Software, USA) erstellt und verwaltet.

2.2.2 *Xenopus laevis* Oozyten Expressionssystem

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist ca. 5–13 cm groß und gehört zur Familie der *Pipidae* (Zungenlose).



Abbildung 2.2 *Xenopus laevis* Weibchen in der Dorsalansicht.

Die für diese Arbeit verwendeten Krallenfrösche produzieren verhältnismäßig große Eizellen mit einem Durchmesser von bis zu 1,5 mm im ausgereiften Zustand. Die Reifung der Oozyten wird in sechs Stadien unterteilt (I–VI), welche anhand der Größe und charakteristischen Pigmentierung zu unterscheiden sind. Verwendet wurden lediglich Eizellen der Entwicklungsstadien V und VI, die eine starke, dunkle Pigmentierung des animalen und eine einheitliche, weiße Färbung des vegetativen Pols zusätzlich zu einem scharf abgegrenzten Übergang zwischen beiden Polen aufwiesen. Die Oozyten stellen ein ideales Expressionssystem für die elektrophysiologische Untersuchung von Ionenkanälen und Liganden-gesteuerten Neurotransmitter-Rezeptoren dar. Für biochemische Zwecke eignet sich dieses System besonders, da durch die Injektion jede Zelle die vorgegebene Fremd-cRNA, auch als Mischung mehrerer RNAs effektiv exprimiert. Dennoch ist nicht unbedingt sicher gestellt, dass alle gewünschten zu exprimierenden Proteine die Membran der Oozyte erreichen, weshalb eine Überprüfung der Oberflächenverfügbarkeit für jede verwendete cRNA statt gefunden hat. Die einzelnen Schritte der Nutzung von Oozyten als Expressionssystem werden im Folgenden beschrieben.

2.2.2.1 Haltung und Operation

Ausgewachsene *Xenopus laevis*-Weibchen wurden in lichtdichten Becken (1 m x 50 cm, ca. 15 cm hoch mit Wasser gefüllt) in Gruppen zu je 20 Tieren, unter elektronisch geregeltem Hell/Dunkel Rhythmus (16 h bis 8 h) gehalten. Das ca. 18–20°C

warme Wasser wurde per Umwälzpumpe gereinigt mit Ausnahme der zweimal wöchentlich erfolgten Fütterungen (Altromin 0830, *Altromin*, Lage); wobei im Anschluss die Futterreste entfernt wurden, bevor der Wasserfilter wieder in Betrieb genommen wurde.

Die Oozytenentnahme wurde an narkotisierten Tieren auf Eis, unter Einhaltung Allgemeingültiger Hygienevorschriften (desinfizierte Handschuhe und Operationsbesteck, Einmalskalpelle und Nahtmaterial) und Tierschutzbestimmungen durchgeführt. Der jeweils zu operierende Frosch wurde zunächst für ca. 20 Minuten in 1 g/l Tricaine (MS222 [3-Aminobenzoessäureethylester], *Sigma*) pH 7,4 in Leitungswasser anästhesiert und auf Eis platziert. Die Öffnung der Bauchdecke erfolgte durch einen ca. 1 cm langen Scherenschnitt in eine angehobene Hautfalte, wobei die darunter liegende Muskelschicht separat eröffnet wurde. Durch diesen ventralen Zugang zum Bauchraum wurden je ca. 3 ml des Ovars entnommen und in Gentamycin-haltiges ND96 überführt. Die Bauchdecke wurde mit jeweils zwei bis vier Stichen (Muskelschicht samt Faszie und Haut separat) eines resorbierbaren Nahtmaterials (VicrylPlus, *Ethicon*, Norderstedt) vernäht und der Frosch in Anschluss in frischem Wasser, mit den Nasenöffnungen oberhalb des Wassers, zum Aufwachen aufbewahrt. Zur weiteren Identifizierung wurde der Frosch fotografiert (Abbildung 2.2) und katalogisiert. Eine allgemeine Aktivitätskontrolle des Tieres fand statt, bevor es in ein separates Becken für operierte Tiere verbracht wurde.

2.2.2.2 Vorbereitung der Oozyten

Das entnommene Ovar wurde vorsichtig mit zwei Pinzetten in ca. 5 mm große Teile zerkleinert und in steril filtriertem ND96 (Gentamycin-haltig) mit 0,3 mg/ml Kollagenase Typ IIA (*Sigma*) für 16 h bei 19°C inkubiert. Dies diente dem enzymatischen Abbau des Bindegewebes. Zur Entfernung der, die Oozyten umgebenden, Follikelzellschicht wurden die nun größtenteils vereinzelt Oozyten mehrfach mit Ca^{2+} -Freier Lösung gewaschen, bis keine Trübung des Überstandes zu erkennen war, und direkt für ca. 20' bei 19°C inkubiert. Die Oozyten wurden anschließend in sterilem ND96, supplementiert mit Gentamycin, bei 4°C aufbewahrt. Unter Sichtkontrolle (Binokular mit ca. 10facher Vergrößerung) wurden Oozyten des Stadiums V und VI (gleichmäßige Färbung und scharfer Übergang am Äquator) ausgewählt und gesondert bis zur später erfolgenden Injektion bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Rezeptorproteinexpression in Oozyten

Die Expression der P2X-Proteine in *Xenopus laevis*-Oozyten erfolgte durch Injektion von cRNA, wobei strengstens auf RNase freies Arbeiten geachtet wurde. Zur Injektion wurden Borosilikat-Glaskapillaren (*Drummond Scientific*, Broomall, PA, USA; Innendurchmesser: 0,53 mm, Aussendurchmesser: 1,14 mm) mit einem Vertikalelektroden-Puller (Modell PC10, *Narishige*, London, UK) in einem Zug auseinander geschmolzen. Der Spitzendurchmesser wurde mit einer Pinzette unter Sichtkontrolle (Binokular SMZ654, *Nikon*, Düsseldorf) auf ca. 5 bis 10 μm aufgebrochen. Die Kapillaren wurden per Metallkanüle mit RNase freiem Mineralöl (*Sigma*) gefüllt und in die Injektionsapparat Nanoject II (*Drummond Scientific*, Broomall, PA, USA) eingespannt. Nun wurde unter binokularer Sichtkontrolle die cRNA-Lösung aus dem Deckel eines RNase freiem 1,5 ml Reaktionsgefäßes (*Eppendorf*, Hamburg) in die Kapillare aufgesaugt und jeweils bis zu 50 nl in die, in einer Rinne aufgereihten, Oozyten injiziert. Dabei wurde darauf geachtet im Äquatorbereich der Oozyte einzustechen und einige Sekunden gewartet, bevor die Injektionskapillare zurückgezogen wurde, um sicher zu stellen, dass möglichst viel cRNA in der Zelle verblieb. Die Oozyten wurden anschließend 12–72 h bei 19 °C in ND96 mit Gentamycin inkubiert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Metabolische Markierung von Proteinen

Die metabolische Markierung neu synthetisierter Proteine in *Xenopus laevis* Oozyten erfolgte wie bereits beschrieben (Nicke *et al.* 1998). Nach Injektion von 50 nl einer cRNA oder eines cRNA Gemischs, wurden jeweils ca. 10 Oozyten pro Gruppe für wenigstens 16 h in [³⁵S]-Methionin-haltigem ND96 mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin bei 19°C inkubiert. Dabei wurde $\sim 0,1$ MBq/Oozyte eingesetzt. Am folgenden Tag wurden die Oozyten 3–4 mal mit frischem ND96 gewaschen und anschließend in ND96 (Gentamycin) mit 10 mM nicht radioaktivem Methionin für weitere 2 Tage bei 19°C inkubiert.

2.2.3.2 Anwendung quervernetzender Substanzen

Die quervernetzenden Substanzen 1,2-Ethandiy-l-bismethanethiosulfonat (MTS-2-MTS), 1,4-Butandiy-l-Bismethanthiosulfonat (MTS-4-MTS), 1,4-Bis-maleimido-Butan (BMB), 1,4-Bis-maleimido-Dihydroxybutan (BMHB) und Dibromobiman (DBBN) wurde kurz vor Anwendung 2 mM in Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) gelöst. Die Quervernetzungs-Reaktion erfolgte an intakten Oozyten mit einer Konzentration von

0,2 mM der quervernetzenden Substanz in ND96-Medium, das zuvor auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt wurde, für ca. 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Oberflächenmarkierung (Kapitel 2.2.3.3) durchgeführt.

2.2.3.3 Oberflächenmarkierung membranständiger Proteinen

Um die membranständigen Proteinkomplexe selektiv sichtbar zu machen, wurde die Methode der Oberflächenmarkierung verwendet. Dazu wurden die Oozyten ca. drei Tage nach der Injektion mit ND96, welches vorher auf pH 8,5 eingestellt wurde, gewaschen. Im Anschluss wurden sie für 30 Minuten unter leichter Agitation in ND96 (pH 8,5) mit 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Sulfo-NHS-Cy5 oder -Cy3 bei 4°C inkubiert. Dabei werden die verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe (Cy3, Cy5 oder Rhodamine) durch die Sulfo-NHS Estergruppe an primäre Amine aller extrazellulär vorhandenen Proteine kovalent gebunden. Die einzig verfügbaren primären Amine in einer Proteinkette sind die Seitenketten-Stickstoffatome von Lysinen. Demnach ist die Markierungsintensität direkt abhängig von der Anzahl an extrazellulär vorhandenen Lysinen des aufzureinigenden Proteins. Im Idealfall gab es keine Markierung intrazellulärer Proteine, da die Farbstoffe aufgrund der polaren Sulfo-NHS Gruppe nicht die Zellmembran durchdringen können bzw. bei intrazellulärem PH-Wert keine Reaktion mit den primären Aminen stattfinden kann.

2.2.3.4 Affinitätschromatographie Hexahistidyl markierter Proteine

Die verwendete Aufreinigungsmethode wurde in (Nicke *et al.* 1998) beschrieben und wird hier zusammengefasst. Die metabolisch- oder Oberflächen-markierten Oozyten wurden 2–3-mal mit ND96 gewaschen und der Überstand wurde vollständig entfernt. Anschließend wurden pro Oozyte 20 μl Solubilisierungspuffer hinzugegeben (Optional: 50 mM Iodacetamid) und die gesamte Gruppe Oozyten durch 20–30 faches Auf- und Abpipetieren homogenisiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Eine Vorreinigung des Homogenats wurde durch eine Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C für 10 Minuten erreicht. 100 μl des geklärten Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 400 μl Solubilisierungspuffer (Optional: 50 mM Iodacetamid), 30 μl Ni^{2+} -NTA Agarosekügelchen und zusätzlich 5 μl Imidazol (1 M; pH 8,0) versetzt. Dieser Bindungsansatz wurde 30 Minuten unter mittelschnellem Drehen in einem Überkopfmischer bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die Agarosekügelchen bei 10.000 g und 4°C 2 Minuten zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und mit 1 ml Waschpuffer (Kapitel 2.1.2.7; optional: 10 mM Iodacetamid) gewaschen. Dieses Waschen wurde 4 mal wiederholt, jeweils nach vorangegangener Zentrifugation. Die Elution erfolgte in 2 x 50 µl Elutionspuffer bei 30°C und starkem Schütteln in einem Thermomixer (*Eppendorf*, Hamburg) für jeweils 10 Minuten. Die Eluierten Proteinlösungen wurden standardgemäß sofort für verschiedene Gel-Methoden verwendet, oder auf Eis gelagert.

2.2.3.5 Affinitätschromatographie mit ATP/ADP Protektions-Aufreinigung

Eine besondere Form der Affinitätschromatographie stellt die ATP/ADP Protektionsaufreinigung dar. Ziel dieser Methode ist es, alle Disulfidbrücken der an die Agarosebeads gebundenen Proteine zu reduzieren und die Aufreinigung in Anwesenheit von ATP oder ADP fortzusetzen. Somit soll die Abhängigkeit der Disulfidquervernetzung von ATP oder ADP festgestellt werden.

Nach zweimaligen Waschen der, an Ni²⁺-NTA Agarosekügelchen gebundenen, Proteine wurde der Waschpuffer mit 20 mM β-Mercaptoethanol versetzt und die Proben für ca. 5 Minuten auf 4°C unter kontinuierlicher Bewegung gehalten. Anschließend wurden die Lösung auf zwei Aliquots aufgeteilt, weitere zwei male ohne Reduktionsmittel jedoch in Anwesenheit von entweder 10 mM ATP oder ADP gewaschen. Die Elution erfolgte entsprechend Kapitel 2.2.3.4, wobei auch hier 10 mM ATP oder ADP zugesetzt wurde. Zur Überprüfung der ATP/ADP Abhängigkeit der Quervernetzung wurden die Proben mit und ohne 2 mM H₂O₂ auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen.

2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der aufgereinigten Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte mittels diskontinuierlicher Tris-Glyzin SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Standardprotokoll basierend auf (Laemmli 1970). Bei dieser Methode wird die Bindungseigenschaft von ca. 1,4 g Natriumdodecylsulfat (SDS) an 1 g Protein genutzt. Dadurch wird die Eigenladung des Proteins maskiert und es resultiert ein nahezu identisches Ladungs-Masse Verhältnis aller Proteine in einem SDS-PAGE-Gel. In dem kontinuierlichen elektrischen Feld über die Gelmatrix werden diese Proteine im Folgenden ihrer molekularen Größe nach aufgetrennt, da die Migrationgeschwindigkeit nur noch von der Vernetzungsdichte des Polyacrylamides abhängt. Diskontinuierlich bedeutet in diesem Zusammenhang, dass zwei Gel-Systeme mit Puffern unter-

schiedlicher pH–Werte verwendet werden. Die eigentliche Trennung der Proteine erfolgt in dem Trenngel (pH 8,8), dem ein Sammelgel (pH6,8) aufliegt. In dem Sammelgel verursacht der pH–Wert, dass Glycin als Zwitterion vorliegt. Demnach bildet sich zwischen dem langsameren Glycin und dem schneller beweglichen Chlorid ein zusätzliches Dipolfeld, das die dazwischen befindlichen Proteine aufstapelt. Dadurch wird ein nahezu gleichzeitiger Eintritt aller aufgetragenen Proteine in das Sammelgel und dadurch eine erhöhte Bandenschärfe erreicht.

Tabelle 2.2 Pipettieranleitung für SDS–PAGE–Trenngele

Trenngeldichte	5%		6%		7%		8%		10%		12%		14%	
	1	½	1	½	1	½	1	½	1	½	1	½	1	½
Volles oder ½ Gel	1	½	1	½	1	½	1	½	1	½	1	½	1	½
Trenngelpuffer in [ml]	2,0	1,0	2,00	1,0	2,00	1,0	2,00	1,0	2,00	1,0	2,00	1,0	2,00	1,0
40% Acrylamid/Bis [ml]	1,0	0,5	1,20	0,6	1,40	0,7	1,60	0,8	2,00	1,0	2,40	1,2	2,80	1,4
H ₂ O [ml]	4,95	2,48	4,75	2,35	4,55	2,25	4,35	2,15	3,95	1,98	3,55	1,78	3,15	1,58
TEMED [μ l]	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4
10% APS [μ l]	40	20	40	20	40	20	40	20	40	20	40	20	40	20

Bei der SDS–PAGE handelt es sich um ein denaturierendes Verfahren, da durch Bindung des SDS die Tertiärstruktur des Proteins zerstört wird, aber die Disulfidbrücken erhalten bleiben. Für die Identifizierung von Cystin–quervernetzten Untereinheiten wurde dabei auf die Zugabe des Reduktionsmittels (DTT oder β –Mercaptoethanol) verzichtet. Die Spaltung der Disulfidbrücken geschah lediglich zu Kontrollzwecken. Um in dem Gelen mit einer monomeren, dimeren und ggf. trimeren Anordnung der Untereinheit, also Proteine mit einer Größe von ca. 50 bis 180 kDa gut auflösen zu können wurden Gradientengele gegossen. Die Gele wurden nach Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3 für 1 mm dicke Gradientengele in einer PROT–Resolv Mini–LC (*Phase*, Lübeck) Apparatur gegossen, wobei anstelle von Wasser bei dem dichteren Anteil 40%ige Succroselösung verwendet wurde, um eine Durchmischung des Gradienten zu vermeiden.

Tabelle 2.3 Pipettieranleitung SDS–PAGE–Sammelgel

Sammelgedichte	4%	5%
Trenngelpuffer in [ml]	1,25	1,25
40% Acrylamid/Bis [ml]	0,50	0,63
H ₂ O [ml]	3,22	3,10
TEMED [μ l]	5	5
10% APS [μ l]	25	25

Zum Nachweis vollständiger Trimerkomplexe neben monomeren P2X–Rezeptor–Untereinheiten wurden i.d.R. 10%–5% Trenngele (Tabelle 2.2) mit einem 4% Sammel-

gel (Tabelle 2.3) benutzt. Die maximale Auftragsmenge entsprach 20 μl gereinigter Proteinprobe mit entsprechender Menge 5x SDS Probenpuffer versetzt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 90 V bis zum Einlaufen in das Trenngel und anschließend bei 150 V bis die gefärbte Lauffront das Gelende erreichte.

2.2.3.7 Blaue–Native Polyacrylamid–Gelelektrophorese (BN–PAGE)

Die BN–PAGE stellt eine elektrophoretische Trennmethode für Proteine in ihrem nativen Zustand dar. Im Gegensatz zur SDS–PAGE wird das Protein mit dem nicht dissoziierenden Farbstoff Coomassie G–250 negativ geladen. Dies hat den Vorteil, dass die Tertiär– und Quartärstruktur des Proteins erhalten bleibt und somit Proteinkomplexe sichtbar gemacht werden können. Ein Nachteil besteht allerdings in dem variablen Verhältnis, mit dem der Farbstoff gebunden wird, so dass eine Zuordnung der Molekulargrößen der Komplexe im Gel nur bedingt bzw. am Endpunkt der Elektrophorese möglich ist. Vielmehr ist die Migration der Proteine in der Gelmatrix von dem eingenommenen Raum, der Globularität, des Proteinkomplexes abhängig. Die Komplexe werden durch einen Siebeffekt in einem Acrylamid–Gradientengel aufgetrennt. Grundlage für diese Methode sind die Publikationen von Schägger (Schagger und Von Jagow 1991; Schagger *et al.* 1994).

Tabelle 2.4 Pipettieranleitung für BN–PAGE–Gele

Acrylamidgedichte	4%	10%	13%
3x Gelpuffer in [ml]	1,33	1,33	1,33
30% Acrylamid/Bis [ml]	0,6	1,4	1,7
H ₂ O [ml]	2,1	0,3	–
Glyzerin [ml]	–	1,0	1,0
TEMED [μl]	4	4	4
10% APS [μl]	20	20	20

10 μl Probe wurden mit 2,5 μl 5x nativen Probenpuffer gemischt. Es wurden 1 mm dicke Gele bestehend aus einem linearen Acrylamidgradienten (4–10% oder 4–13%) mittels eines Zweikammer–Gradientenmischers gegossen. Um eine bessere Auflösung der Banden zu erreichen, wurden die Trenngele mit einem 4% Sammelgel (mit demselben Puffer) überschichtet und das Gel mit den Proben und dem nativen Proteinmarker beladen. Die Gele wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 2.4 gegossen. Der Kathodenpuffer enthielt 0,005% Serva Blue G. Der Einlauf der Proben in das Gel er-

folgte bei 90 V. Nach Eintreten der Lauffront in das Trenngel wurde das Gel bei einer konstanten Spannung von 150 V ungefähr 2 Stunden laufen gelassen,.

2.2.3.8 Protein-Transfer und Immunodetektion (Western-Blot)

Der Nachweis von Proteinen die nicht radioaktiv- oder Oberflächenmarkiert waren, geschah durch Immunodetektion nach Transfer mittels Western-Blot „Semidry“-Methode auf PVDF- oder Nitrozellulose-Membranen. Dazu wurden die SDS- oder BN-PAGE Gele nach entsprechender Laufzeit für 10' in Transferpuffer (siehe 2.1.2.6) inkubiert. Anschließend wurden drei Lagen im Transferpuffer äquilibrierten Whatmann-Filterpapiere in der Semidry-Apparatur platziert („Transblot-SD“ Blotting Apparatur, *BioRad*, Hercules, CA, USA). Auf das dritte Filterpapier folgte die Membran (wobei die PVDF-Membranen durch kurze Inkubation in Methanol hydrophiliert wurde), darüber das Gel und zuletzt wieder drei Lagen Whatmann-Filterpapier. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 2,5 mA / cm² für 30 min. Optional wurden die transferierten Banden durch 30' Inkubation in Ponceau S-Lösung und anschließendem Waschen mit H₂O visualisiert und ggf. durch optische Digitalisierung archiviert.

Die Immunodetektion erfolgte nach mindestens 20' Inkubation in Blockingpuffer, um unspezifische Protein-Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Dem schloss sich eine einstündige Lagerung der eingeschweißten Membran mit entsprechend verdünntem Erstantikörper in Blockingpuffer unter geringer Drehbewegung bei Raumtemperatur an. Es folgte viermaliges Waschen für jeweils 5' in TBST, gefolgt von der Inkubation des Peroxidase-gekoppelten, entsprechend verdünnten Zweitantikörpers in Blockingpuffer für 1 h. Nach erneutem viermaligem Waschen in TBST und abschliessendem einmaligem Waschen in TBS wurde die Peroxidaseaktivität durch Zugabe von ECL-Reagenz (*Amersham*, Freiburg) und Detektion der entstehenden Chemilumineszenz auf Bio-Max MR Röntgenfilm (*Kodak*, Stuttgart) visualisiert.

2.2.3.9 Differentielle Deglykosylierung mit Endo H und PNGase F

Für die Analyse des Glykosylierungszustandes der P2X-Rezeptoren wurden jeweils 10 µl des gereinigten Proteins mit 2 µl 5x SDS-Probenpuffer und zusätzlich 3,3% Octylglucosid versetzt. Das Enzym Endo H wurde vor dem Gebrauch 1:10 in ddH₂O verdünnt und es wurde 1 µl pro Ansatz verwendet, so dass pro 10 µl Probe 50 Units Endo H und 50 Units an PNGase F (unverdünnt 0,1 µl pro Ansatz) eingesetzt wurden.

Die Mischung wurde dann 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend der SDS-PAGE unterzogen.

2.2.3.10 Aufbereitung und Aufwertung der Daten

Die Biomax MR Filme (*Kodak*, Stuttgart) wurden unter Durchlicht an einem Epson Perfection 4480 digitalisiert. Phosphorspeicherplatten (*Kodak*, Stuttgart) und Gele Fluoreszenzfarbstoff markierter Proteine wurden auf einem Typhoon Trio (*GE Healthcare*, Uppsala, Schweden) mit der Software ImageQuant (*GE Healthcare*) digitalisiert. Die Auswertung (Größenbestimmung und densitometrische Bestimmung der Banden) erfolgte mit ImageQuant 4.7 Software (*GE Healthcare*, Uppsala, Schweden).

2.2.4 Elektrophysiologische Methoden

Zur funktionellen Untersuchung der Rezeptoren und deren Mutanten wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus laevis* Oozyten angewandt.

2.2.4.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Katz und Schwartz 1974; engl. Two-Electrode Voltage-Clamp „TEVC“) ist ein sehr vielseitiges Werkzeug der Elektrophysiologie, um Membranpotenzial-Änderungen infolge der Aktivierung elektrisch oder chemisch erregbarer Kanäle in der Plasmamembran großer Zellen zu studieren. Spannungsklemm-Experimente führen zu Messungen des Ionenstroms über die Membranen mit einer, im Vergleich zu anderen Methoden eher geringen zeitlichen Auflösung. Durch diese Messungen ist es möglich näherungsweise Beschreibungen kinetischer Merkmale der in der Membran vorhanden Rezeptoren nach Aktivierung zu erhalten bzw. durch den Vergleich der Kinetiken einzelpunktmutierter Rezeptoren untereinander, Hinweise über die mögliche Funktion der mutierten Aminosäure in dem Rezeptorprotein zu erhalten. Teile der Theorie der Spannungsklemme mit zwei Mikroelektroden wurden von Katz und Schwartz (Katz und Schwartz 1974) und von Smith und Kollegen (Smith *et al.* 1980) beschrieben (Sucher *et al.* 2000; Buckingham *et al.* 2006).

Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsmessung besteht eine Anordnung aus zwei Elektroden in der Oozyte und einer bzw. zwei außerhalb im, die Oozyte umgebenden, Bad, von denen eine über einen Rückkopplungsverstärker miteinander verschaltet sind. Eine intrazelluläre Elektrode (Glaskapillare mit einem Silber/Silberchlorid-Draht mit 3 M KCl gefüllt) misst das aktuelle Membranpotential (V_{mem}) (Potential zwischen intra- und

extrazellulärer Elektrode), während die zweite Elektrode einen entsprechenden Strom „injiziert“, so dass ein vorher eingestelltes Kommandopotential (V_{com}) als Membranpotential der Oozyte erreicht wird. Der Strom, der zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials notwendig ist, wird aufgezeichnet. Somit wird die Leitfähigkeit bzw. Aktivierung aller in der Membran befindlichen Kanäle aufgezeichnet und gibt Einsicht in das Verhalten der Rezeptorproteine (siehe Abbildung 2.3).

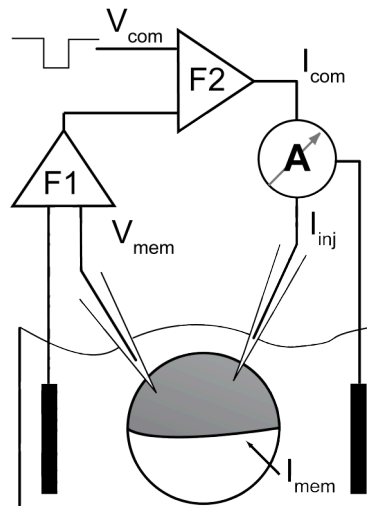


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der Spannungsklemme. Ein gemessenes Membranpotential (V_{mem}), abhängig von einem Membranstrom (I_{mem}) wird im Vorverstärker (F1) amplifiziert und gegen ein Kommandopotential (V_{com}) im Differentialverstärker abgeglichen. Die resultierende Differenz wird über weitere Schaltkreise (nicht gezeigt) in einen zu injizierenden Strom umgerechnet (I_{com}), der zum einen protokolliert (A) und zum anderen in die Oozyte injiziert wird (I_{inj}).

2.2.4.2 Aufbau des Messplatzes

Der Messplatz wurde auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut, wobei auf eine Abschirmung im Sinne eines Faraday-Käfigs verzichtet wurde. Zum Messplatz gehörte ein Binokular (SMZ645, Nikon, Düsseldorf) auf dessen Objektisch die Oozytenmesskammer (Eigenbau der Werkstatt des MPI) mit einem Volumen von ca. 50 μl eingebaut war. Die Messkammer bestand aus einer trichterförmigen Vertiefung, in welche die Oozyte positioniert wurde. Der Zulauf bestand aus einem acht zu eins Verteilerstutzen (Manifold), der oberhalb der eingespannten Oozyte arretiert wurde. Der Zulauf verschiedener Agonisten- oder Spüllösungen wurde über vorgeschaltete Magnetventile, kontrolliert von dem Applikationsprogramm, gesteuert. Der Ablauf bestand aus einer Glaskapillare, die an der Oberfläche der Kammer kontinuierlich die Flüssigkeit in eine, an eine Vakuumpumpe angeschlossene Flasche absaugte. Der Durchfluss durch die Kammer wurde mit Rollklemmen aus Schwerkraft-Infusionsschlauchsystemen auf ca. 10 ml/min eingestellt. Zu beiden Seiten der Oozyten-

messkammer waren Mikromanipulatoren (MM33, *Marzhäuser*, Wetzlar) auf dem schwingungsgedämpften Tisch angebracht, in welche die Messelektroden in Elektrodenhaltern eingespannt wurden. Der elektrische Kontakt zur Elektrodenfülllösung (3 M KCl) wurde durch Silberchlorid-Elektroden hergestellt. Als Messelektroden wurden Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (GB150F-10, 0,86 x 1,5 x 100 mm, *Science Products*, Hofheim) verwendet, die zuvor am VertikalElektroden-Puller (Modell PC10, *Narishige*) in einem Zwei-Stufen Protokoll gezogen wurden, so dass sie nicht manuell aufgebrochen werden mussten. Diese hatten i.d.R. einen Widerstand von ca. 0,5–1,5 M Ω bei einer Öffnung von ca. 1–2 μm .

2.2.4.3 Datenanalyse

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm CellWorks (*npi*, Tamm) auf einem Intel Pentium PC mit Microsoft WindowsXP Betriebssystem aufgenommen und gespeichert. Die Auswertung erfolgte mit dem CellWorks Reader Programm (*npi*, Tamm) und Prism 4-Software (*GraphPad*, San Diego, CA, USA), welche auch für das Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurven verwendet wurde. Die Textverarbeitung und zusätzliche Tabellenkalkulationen erfolgten mit den Programmen des Microsoft Office 2004 Paketes. Für die Erstellung von Abbildung wurden die Programme Illustrator CS und Photoshop CS (*Adobe*, San Jose, Ca, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl des P2X–Rezeptorsubtyps für die Experimente

Zu Beginn der Arbeit wurden verschiedene Kriterien zur Wahl des P2X–Rezeptorsubtyps für die biochemischen und elektrophysiologischen Experimente in Betracht gezogen. Um hinreichende Messbarkeit der Bindungsstellenmutanten zu gewährleisten sollte die ATP–Sensitivität des entsprechenden Wildtyps sehr hoch sein. Demnach standen von allen P2X–Rezeptoren P2X₁–, P2X₃– oder P2X₅–Rezeptoren mit einem EC₅₀–Wert für ATP im Bereich von 1 μ M zur Auswahl (Tabelle 3.1). P2X₆–Rezeptoren bilden keine funktionellen homomeren Rezeptoren aus, so dass diese nicht in Betracht gezogen wurden (North 2002).

Tabelle 3.1 Affinitäten der homomeren P2X–Rezeptoren der Ratte

P2X Subtyp	ATP EC ₅₀
P2X ₁	~0,1 μ M
P2X ₂	~5,0 μ M
P2X ₃	~1,3 μ M
P2X ₄	~4,0 μ M
P2X ₅	~0,4 μ M
P2X ₆	n.f.
P2X ₇	~400 μ M

Die angegebenen Konzentrationen der halbmaximalen Aktivierung beziehen sich auf die Rezeptorsubtypen der Ratte, gemessen in verschiedenen heterologen Expressionssystemen. n.f. bedeutet nicht funktionell (North und Surprenant 2000; Khakh 2001; Khakh *et al.* 2001; North 2002; King Bf 2003)

Allerdings besitzen die sensitiveren Subtypen eine schnell desensitisierende Kinetik mit Zeitkonstanten im Bereich von Millisekunden (North 2002). Dem entgegen verfügt eine P2X₂₋₁–Chimäre (Rettinger und Schmalzing 2004) über eine nicht–desensitisierende Aktivierungskinetik, so dass unter Gleichgewichtsbedingungen in kurzen Intervallen gemessen werden kann. Darüber hinaus besitzt diese P2X₂₋₁–Chimäre einen EC₅₀–Wert für ATP von ca. 3 nM ATP, wie er für den P2X₁–Rezeptor unter Berücksichtigung der schnellen Desensitisierung berechnet wurde (Rettinger und Schmalzing 2003), und ist damit weitaus effektiver aktivierbar als andere P2X–Rezeptoren (Rettinger und Schmalzing 2004). Da bei einer Konzentration von 3 mM ATP auch bei nicht–injizierten Oozyten unspezifische Effekte sichtbar wurden, wurden keine höheren Konzentrationen verwendet. Durch die hohe Sensitivität der P2X₂₋₁–Chimäre konnten demnach Rezeptoren mit Mutationen vermessen werden, deren EC₅₀–Wert für ATP um bis zu einem Faktor von 1.000.000 erhöht war. Zwar besitzt der P2X₁–Rezeptor vermutlich eine ähnlich hohe Sensitivität, ist aber wegen der starken Desensitisierung nur mit schnellem

Lösungswechsel und präzise abgestimmten Applikationen akkurat und reproduzierbar messbar, da andernfalls bei jeder Agonisten–Applikation eine ungleiche Menge von aktivierbaren Rezeptorkomplexen zur Verfügung steht und dadurch die Messwerte unter Umständen niedriger erscheinen. Darüber hinaus ist die Desensibilisierung lang anhaltend, so dass die Zeitintervalle zwischen den Applikation größer als fünf Minuten sein müssen, um ca. 10% der in der Plasmamembran vorhandenen Rezeptoren aktivieren zu können (Rettinger und Schmalzing 2003, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der kompetitive Antagonist NF279 eine virtuell identische Effektivität an der P2X₂₋₁–Chimäre und dem P2X₁–Rezeptor besitzt (Rettinger und Schmalzing 2004).

Wegen der übereinstimmenden Primärstruktur der extrazellulären Domäne, der gleichen Sensitivität der P2X₂₋₁–Chimäre (Rettinger und Schmalzing 2004) im Vergleich zu dem P2X₁–Rezeptor (Rettinger und Schmalzing 2003) und der identischen Effektivität von NF279 (Rettinger und Schmalzing 2004) wurde die P2X₂₋₁–Chimäre bzw. ihre Mutanten in elektrophysiologischen und biochemischen Experimenten verwendet.

3.2 Experimentelles Vorgehen

Die entsprechenden Cystein–Mutanten wurden, nach Überprüfung der Expression und korrekten Faltung durch SDS–PAGE, BN–PAGE und Zwei–Elektroden–Spannungsklemme (TEVC) koexprimiert, um auf spontane Quervernetzung per Disulfidbrückenbildung zwischen den beiden Schwefelatomen der eingebrachten Cysteine zu testen. Die Quervernetzung wurde durch nicht–reduzierende SDS–PAGE der Rezeptorproteine nach Ni²⁺–NTA affinitätschromatographischer Aufreinigung über das N–terminal angefügte Hexahistidyl–Motiv überprüft. Dabei sollte im Falle einer Quervernetzung von zwei Untereinheiten ein Dimer sichtbar werden. Als positive Kontrolle für die Dimerisierung diente die Koexpression von zwei Mutanten (V48C und I328C, Nummerierung nach P2X₂), deren Quervernetzung bereits zwischen zwei Untereinheiten beschrieben wurde (Jiang *et al.* 2003; Spelta *et al.* 2003). Als Negativkontrolle dienten der unmutierte P2X₁–Rezeptor sowie die einzeln exprimierten Cystein–Mutanten, die nicht in der Lage sein sollte Dimere in nicht–reduzierenden SDS–PAGE–Gelen auszubilden. Eine Auftrennung mit BN–PAGE–Gelen sollte Aufschluss über die Oligomerisierung der Untereinheiten in den Komplexen geben und es ermöglichen falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Banden mit Molekulargewichten größer als das eines Trimers weisen auf Aggregation der Rezeptorproteine hin. Weshalb Mutanten die höhere Aggregate bildeten nicht ausgewertet und nicht weiter verwendet wurden.

Die Quervernetzung innerhalb einer Untereinheit sollte ebenso untersucht werden. Um eine intramolekulare Quervernetzung sichtbar zu machen, wurde zunächst in der extrazellulären Domäne der P2X₂₋₁-Chimäre ein Erkennungsmotiv (LeuValProArgGlySer) für das proteolytische Enzym Thrombin durch positionsspezifische Mutagenese eingeführt. Es wurden die folgenden Aminosäurebereiche der P2X₂₋₁-Chimäre zu LVPRGS mutiert:

C149–V150–P151–F152–N153–G154
K199–V200–N201–R202–R203–N204
L218–Y219–H220–K221–I222–Q223
L263–D264–W265–H266–V267–R268

Eine Spaltung der aufgereinigten Proteine durch enzymatischen Verdau unter nicht-reduzierenden Bedingungen zur Erhaltung der Disulfidbrücken, würde in nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gelen in zwei Banden unterschiedlicher Größe resultieren, wenn keine intramolekulare Quervernetzung erfolgte. Im Falle einer ausgebildeten intramolekularen Disulfidbrücke zwischen den substituierten Cysteinen würde das Protein als Bande in Höhe einer kompletten Untereinheit nach enzymatischen Verdau erhalten bleiben. Die anschließende Expression dieser Thrombin-Mutanten in *Xenopus laevis*-Oozyten ergab keine messbaren Ströme nach ATP-Aktivierung in Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Untersuchungen (nicht gezeigt), weshalb diese nicht-funktionellen Mutanten nicht weiter verwendet und auf die Spaltung der Proteine verzichtet wurde. Darüber hinaus wird im Falle einer intramolekularen Disulfidbrücke angenommen, dass in den angewandten nicht-reduzierenden SDS-PAGE- und BN-PAGE-Gelen ein scheinbar geringeres Molekulargewicht der Proteinbande resultieren würde. Die Annahme beruht auf dem verringerten Umfang der Untereinheiten durch die zusätzliche Disulfidbrücke.

3.3 Übersicht verwendeter Aminosäuren

Zu Beginn der Arbeit standen nur begrenzte, elektrophysiologische Daten anderer Arbeitsgruppen über Einzelpunktmutationen zur Verfügung, weshalb zuerst drei (K68, K70, K309) und später insgesamt acht (zusätzlich F185, K190, F291, R292, R305) Aminosäuren aus der extrazellulären Domäne ausgewählt wurden. Mittels zielgerichteter, PCR-basierter Mutagenese wurden diese in Cysteine überführt und im Folgenden zur besseren Übersicht in vier Gruppen (Region A bis D) zusammengefasst. Demnach befinden sich K68 und K70 in Region A nahe der ersten Transmembrandomäne, F185 und K190 in Region B, F291 und R292 in Region C und R305 sowie K309 in Region D

nahe der zweiten Transmembrandomäne (Nummerierung basierend auf P2X₁-Sequenz der Ratte).

Tabelle 3.2 Übersicht verwendeter Aminosäuren

P2X ₁		P2X ₂		P2X ₄		Postulierte Interaktion	Region
WT	~ 1,0 ^{1,2}	WT	~ 10 ³	WT	~ 3,8 ⁴		
V48C		V48C	3,4 ¹¹				
K68A	~ 1400 ¹	K69A	n.f. ³	K67A	n.f. ⁵	Phosphat ¹	A
K68R	n.f. ¹	K69R	~ 2800 ³	K68R			A
K68C		K69C	n.f. ¹³	K67C	n.f. ¹³		
K70A	~ 4,0 ¹	K71A	> 1000 ³	K69A			A
K70C		K71C	n.f. ¹³	K69C	> 3000 ¹³		
F185A	~ 9,0 ²	F183A		F185A	n.f. ⁹	Adenin ²	B
F185C		F183C	40,0 ¹³	F185C	265,0 ¹³		
F185W		F185W		F185W	7,0 ⁹		B
K190A	~ 4,3 ¹	K188A	> 1000 ³	K190A	> 5000 ⁴	Phosphat ^{1,3}	B
K190R	~ 1,6 ¹	K188R	~ 5 ³	K190R	~ 7 ⁴		B
F230A	~ 1,3 ²	F227A	n.f. ⁶	F230A	> 5000 ⁴		
F230W		F227W		F230W	~ 4 ⁴		
G278A		R275A		R278A	> 5000 ⁴	Phosphat ⁴	
Y280A		D277A		D280A	> 5000 ⁴	Magensium ⁴	
N290A	~ 71,0 ⁷	N288A	~ 1000 ³	N293A			C
N290C		N288C	> 3000 ¹³	N293C	> 3000 ¹³		
F291A	~ 140 ²	F289A		F294A	31,4 ⁹	Adenin ²	C
F291W		F289W		F294W	13,6 ⁹		C
F291C	39,8 ¹⁰	F289C	64,0 ¹³	F294C	60,0 ¹³		C
R292A	~ 71 ¹	R290A	> 1000 ³	R295A	n.f. ⁹	Adenin ^{1,3}	C
R292K	~ 98 ¹	R290K	~ 60 ³	R295K	n.f. ⁹		C
R292C	15,8 ¹⁰	R290C	> 3000 ¹³	R295C	> 3000 ¹³		
R305A	~ 3,7 ¹	R304A	> 1000 ³	R309A			D
R305C	n.f. ¹⁰						D
K309A	~ 1100 ¹	K308A	n.f. ³	K313A	> 3000 ⁸	Phosphat ^{1,3}	D
K309R	~ 20 ¹	K308R	~ 240 ³	K313R	> 3000 ⁸		D
K309C	159 ¹⁰	K307C	> 3000 ¹³	K313C	> 3000 ¹³		D
I329C	0,6 ¹⁰	I328C	13,0 ¹²				

Dargestellt sind die EC₅₀-Werte in μM für ATP an den entsprechenden Rezeptoren (soweit vorhanden). Spalte 4 beinhaltet die vermuteten Interaktionen mit Anteilen des ATP; in der letzten Spalte ist die jeweilige Region (A–D) benannt. Grau hinterlegte Informationen waren zu Beginn der Arbeit verfügbar. In dieser Arbeit in erstellte Cystein-Mutanten sind fett/kursiv hervorgehoben. ¹(Ennion *et al.* 2000); ²(Roberts und Evans 2004); ³(Jiang *et al.* 2000); ⁴(Yan *et al.* 2005); ⁵(Wilkinson *et al.* 2006); ⁶(Nakazawa *et al.* 2004); ⁷(Roberts und Evans 2006); ⁸(Yan *et al.* 2006); ⁹(Zemkova *et al.* 2007); ¹⁰(Roberts und Evans 2007); ¹¹(Jiang *et al.* 2001); ¹²(Rassendren *et al.* 1997); ¹³(Roberts *et al.* 2008) n.f.: nicht funktionell.

Die Auswahl beschränkte sich zunächst auf die Aminosäuren Lysin und Arginin, von denen angenommen wird, dass sie mit ihrem positiv geladenen Stickstoffatom die negativ geladene Phosphatkette des ATP koordinieren (Ennion *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2000). Ferner wurden Phenylalanine ausgewählt, von denen angenommen wird, dass sie

mit ihren Benzolring per delokalisierten π -Elektronen die heterobizyklischen Adenin-Gruppe des ATP stabilisieren (Roberts und Evans 2004). Die Tabelle 3.2 bietet einen aktuellen Überblick über Einzelpunktmutationen in der extrazellulären Domäne von P2X₁, P2X₂ und P2X₄ sowie die mittleren effektiven ATP-Konzentrationen (EC₅₀), die zur halbmaximalen Aktivierung nötig sind. Werte, die zu Beginn dieser Arbeit vorlagen sind hellgrau unterlegt und bildeten die Entscheidungsgrundlage für die Auswahl der entsprechenden Aminosäuren, die in Cysteine mutiert wurden.

3.3.1 Cysteinsubstitutionen in der P2X_{2/1}-Chimäre

Die Substitutionen wurden zunächst an einer P2X₂₋₁-Chimäre durchgeführt, deren N-Terminus inklusive der ersten Transmembrandomäne aus der P2X₂-Sequenz und deren extrazelluläre Domäne und der C-Terminus aus der P2X₁-Sequenz der Ratte besteht (Abbildung 3.1; Rettinger und Schmalzing 2004). Funktionelle Studien haben nahezu identische Wirksamkeit des kompetitiven Antagonisten NF279 am P2X₁-Rezeptor und der P2X₂₋₁-Chimäre gezeigt (Rettinger und Schmalzing 2004). Die Eignung dieser Chimäre als Modellrezeptor für den P2X₁-Rezeptor wurde zunächst überprüft.

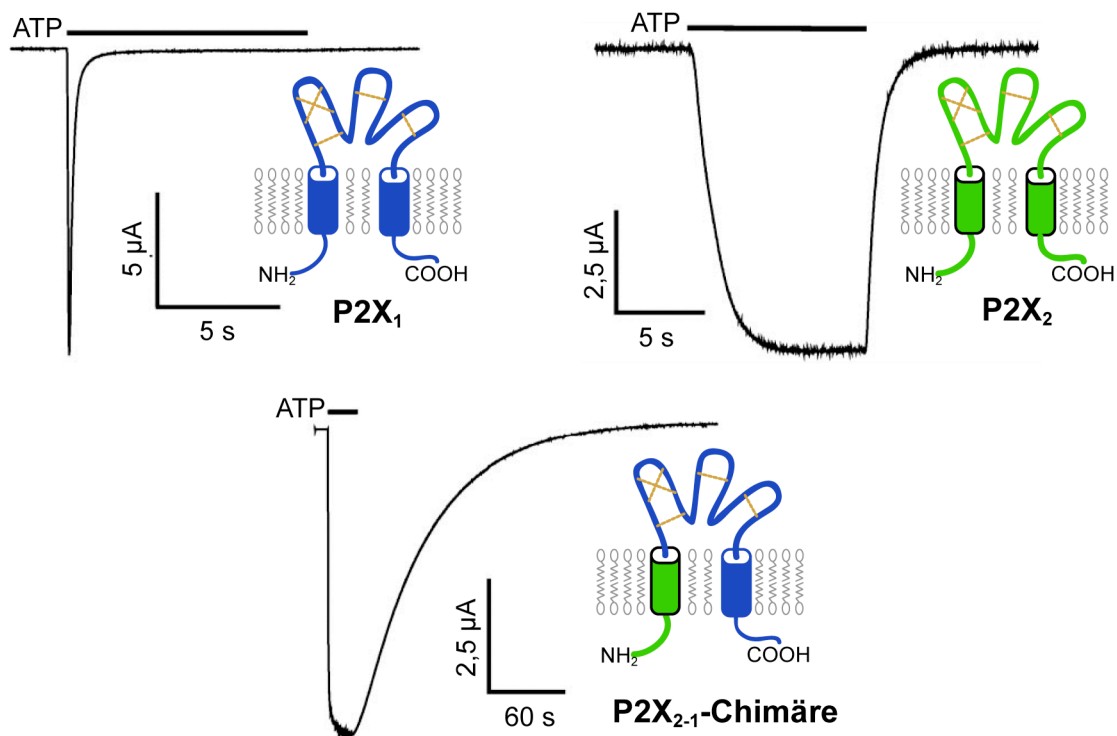


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der P2X₂₋₁-Chimäre. Die Rezeptoren sind als vereinfachte Skizze dargestellt mit den endogenen Disulfidbrücken als gelb-braune Linien angedeutet. Eine typische Stromkurve der Rezeptoren in unterschiedlichen zeitlichen Maßstäben befindet sich jeweils links der Modelle. Abbildung modifiziert aus Rettinger und Schmalzing (2004).

Die $P2X_{2-1}$ -Chimäre bildet ebenso wie der $P2X_1$ -Rezeptor trimere Komplexe aus und das Glykosylierungsmuster entsprach dem des unmutierten $P2X_1$ -Rezeptors (Abbildung 3.2 A, B). Die differentielle Deglykosylierung mit Endo H zeigte ausschließlich eine Bande, die größer war als die Bande des mit PNGase F komplett deglykosylierten Proteins. Endo H spaltet N-glykosidisch verknüpfte Zuckermoleküle mit hohem Mannose-Anteil, aber nicht komplexe Zuckermoleküle, zwischen den ersten beiden Glukosaminen. PNGase F hingegen hydrolysiert alle N-Glykane direkt an dem Asparagin-Rest, unabhängig von der Form des Zuckermoleküls. Eine Endo H-resistente Bande bedeutet demnach das Vorhandensein von komplex glykosylierten Proteinen. Somit zeigten alle drei Rezeptoren bzw. Mutanten einen nahezu identischen Größenunterschied entsprechend eines Glykosylierungsmuster in dem eine der vier bekannten Glykosylierungsstellen komplex glykosyliert war, was einen Hinweis auf den Einbau in die Plasmamembran bedeutet (Abbildung 3.2 B; Nicke *et al.* 1998).

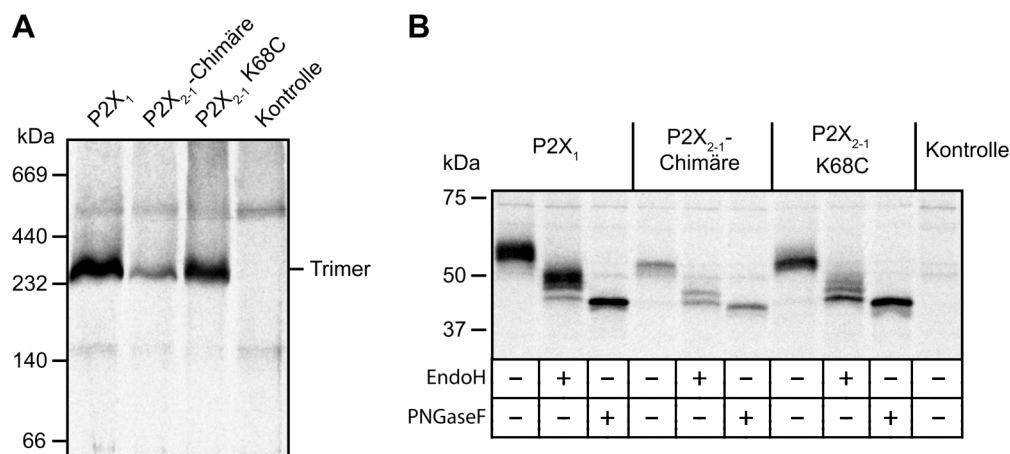


Abbildung 3.2 Biochemischer Vergleich der Assemblierung und der Glykosylierung der $P2X_{2-1}$ -Chimäre und des unmutierten $P2X_1$ -Rezeptor. Nach metabolischer Markierung und dreitägiger Expression der angegebenen $P2X$ -Konstrukte mit N-terminalen Hexahistidylmotiv in *Xenopus laevis* Oozyten wurden die $P2X$ -Komplexe per Affinitätschromatographie über Ni^{2+} -NTA Agarose aufgereinigt. **A**, Die Auftrennung der Rezeptorkomplexe in einem BN-PAGE Gel zeigt, dass $P2X_1$ -Rezeptor und $P2X_{2-1}$ -Chimärenrezeptor effektiv trimere Komplexe bilden. **B**, die Deglykosylierung zeigt ein ähnliches Muster für die Endo H-sensitiven und Endo H-resistenten Proteinanteile und einen identischen Größenunterschied für alle drei Untereinheiten in einem reduzierenden SDS-PAGE-Gel. Die nicht mutierte $P2X_{2-1}$ -Chimäre wurde in diesem Fall lediglich einen Tag exprimiert, da aufgrund der hohen ATP-Sensitivität und nicht-desensitisierenden Eigenschaften die Oozyten nach längerer Expression versterben. Daher ergab die Aufreinigung weniger Protein, was sich in den schwächeren Banden zeigt.

Da vermutet wurde, dass die ausgewählten Aminosäuren an der Agonisten-Bindung beteiligt sind und daher eine Verringerung der Affinität des Rezeptors erwartet wurde, erschien die $P2X_{2-1}$ -Chimäre als Rezeptormodell für die geplanten funktionellen Studien ideal (Kapitel 3.1). Demnach bestand die ursprüngliche Idee darin, alle Cystein-

Mutationen in diese Chimäre einzubringen, um die Vorteile der elektrophysiologischen Charakterisierung mit den Ergebnissen der biochemischen Aufreinigungsmethode zu kombinieren.

3.3.2 Optimierung der Expression für die Biochemie

Bei der Methode der nicht-reduzierenden SDS-PAGE bleiben Cystine im quervernetzten Zustand erhalten. So sollte es möglich sein die Quervernetzung von zwei Untereinheiten über Disulfidbrückenbildung als Dimerisierung der Untereinheiten oder die intramolekulare Quervernetzung als Banden geringerer Molekulargröße aufgrund eines verringerten Stokes-Radius der Untereinheiten sichtbar zu machen. Die P2X₂₋₁-Chimäre zeigte jedoch nach der Aufreinigung nach metabolischer Markierung sehr unterschiedlich starke Dimer- und Trimerbanden, mit großer Varianz zwischen den einzelnen Experimenten. Verstärkt wurde das Problem dieser unspezifischen Hintergrundbanden durch das Einbringen weiterer Cystein-Mutationen, so dass eine eindeutige Identifizierung zweier quervernetzter Untereinheiten (sichtbar als Bande auf Größe eines Dimers) vor diesem Hintergrund nicht möglich war. (Abbildung 3.3).

Es wurden verschiedene Versuche unternommen die Intensität der Multimer-Banden zu reduzieren, ohne Disulfidbrücken-reduzierende Stoffe, wie etwa DTT oder β -Mercaptoethanol, zu verwenden. Zuerst wurde die „Chase“-Zeit (Kompetition mit 10 mM nicht-radioaktivem Methionin) auf drei Tage erhöht, was eine deutliche Reduktion der Multimere zur Folge hatte (nicht gezeigt), so dass für alle folgenden Experimente das Protokoll auf 16 h Pulse (Oozyten für 16 h in radioaktivem Methionin) und 48 h Chase (nicht-radioaktives Methionin) gewählt wurde.

Als eine weitere Möglichkeit wurde ein zusätzliches Cystein (an Position 8) im intrazellulären N-Terminus der P2X₂-Sequenz entfernt. Es wurde vermutet, dass dieses, in der Zelle oder während der Aufreinigung frei zugängliche Cystein, spontan mit den freien Cysteinen anderer Untereinheiten reagierte. Eine Mutation dieser Position zu Serin (C8S) ergab eine deutliche Verringerung der Intensität der Hintergrundbanden für die unmutierte P2X₂₋₁-Chimäre, nicht jedoch für die, als Positivkontrolle verwendete Doppelmutante (P2X₂₋₁-V48C/I329C) bzw. Dreifachmutante (P2X₂₋₁-C8S/V48C/I329C; Abbildung 3.4 A). Für diese Kombination von Mutationen innerhalb einer Untereinheit wurde zwar eine deutlich erhöhte Dimer- oder Trimerbildung erwartet, jedoch wies die bereits vorhandene, deutliche Dimerbande in der unmutierten P2X₂₋₁-Chimäre auf eine unspezifische Dimerisierung bzw. Trimerisierung der Positivkontrolle hin. Es wurde

angenommen, dass die Reduktion der Multimerisierungsneigung der unmutierten P2X₂₋₁-Chimäre durch die C8S-Mutation auch eine Abnahme der Dimer- bzw. Trimerbande, oder wenigstens eine Stabilisierung des Dimer-zu-Monomer-Verhältnisses der C8S/V48C/I329C-Dreifachmutante bedeuten würde. Dies war jedoch nicht der Fall (Abbildung 3.4 A), so dass die C8S-Mutation als ineffektiv zur Reduktion der Hintergrundbanden bewertet wurde.

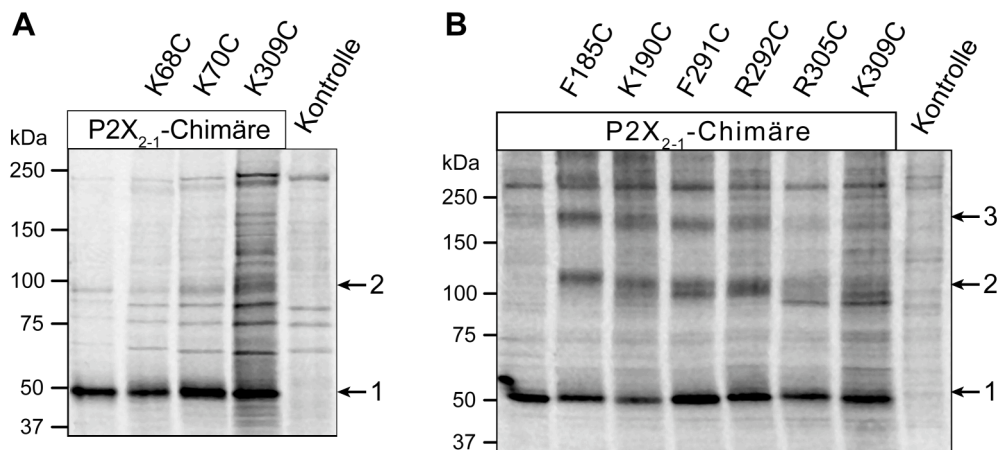


Abbildung 3.3 Übersicht der Auftrennung der verschiedenen P2X₂₋₁-Cystein-Mutanten in einem nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gel. Beispielhaft sind zwei Experimente mit je zwei Tagen „Chase“-Periode gezeigt, wobei angemerkt werden muss, dass die Intensität der Dimer- und Trimerbanden der Chimäre und aller Mutationen stark zwischen den Experimenten variierte. Die Höhen, auf der die monomeren, dimeren oder trimeren Banden verlaufen, sind mit Pfeilen und entsprechenden Zahlen bezeichnet. In der ersten Spur in **B** ist ein Artefakt der monomeren P2X₂₋₁-Chimärenbande sichtbar. Dies resultierte, da diese Spur am äußersten Rand des Geles verlief.

Eine weitere Möglichkeit stellte die Verwendung von Iodacetamid dar, was eine Alkylierung frei zugänglicher Cysteine bewirkt. Dieses Reagenz wurde während der gesamten Aufarbeitung der Proteine aus Oozyten in unterschiedlichen Konzentrationen genutzt (Kapitel 2.2.3.4, Seite 37), konnte jedoch nicht zu einer Minderung der ungewünschten Dimer- bzw. Trimerbanden beitragen (Abbildung 3.4 B).

Aus der Summe dieser Versuche ergab sich die Entscheidung, die biochemischen Studien vornehmlich an dem P2X₁-Rezeptor durchzuführen, da sich die P2X₂₋₁-Chimäre als unzureichend für die deutliche Identifizierung einer Zunahme dimerisierter Untereinheiten darstellte. Dem entgegen zeigten sich die P2X₂₋₁-Chimäre und ihre Cystein-Mutanten als sehr geeignetes System für die elektrophysiologischen Studien, worauf in dem Abschnitt 3.3.4 näher eingegangen wird.

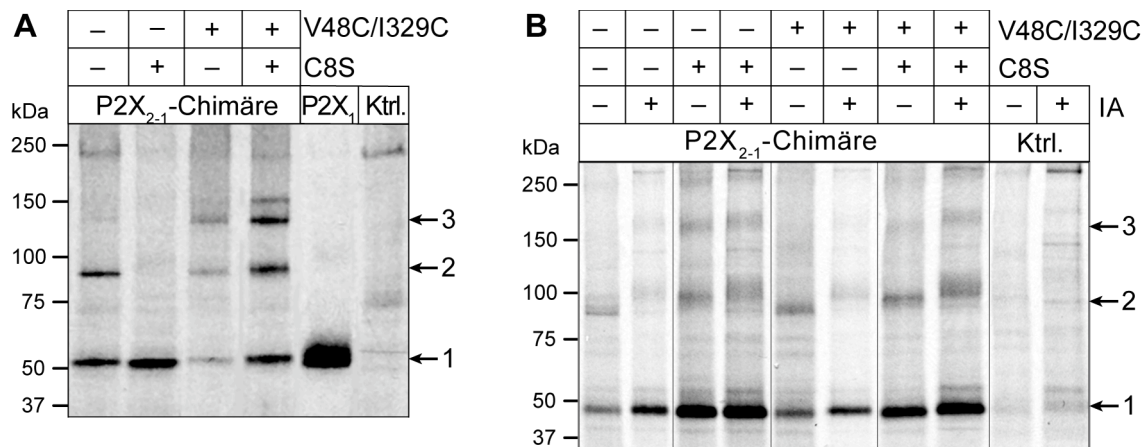


Abbildung 3.4 Vergleichende nicht-reduzierende SDS-PAGE der Chimäre mit und ohne C8S Mutation, mit und ohne Iodacetamid während der Aufarbeitung. Die metabolische Markierung erfolgte für 16 h in [³⁵S]-Methionin-haltigem Medium. Anschließend wurden die Oozyten zwei Tage in nicht-radioaktivem ND96-Medium inkubiert. Die Inkubation der wt-P2X₂₋₁-Chimärenkonstrukte wurde wegen der Toxizität des Rezeptors für die Oozyten auf einen Tag begrenzt. **A**, Auftrennung der aufgereinigten P2X₂₋₁-Chimäre mit und ohne C8S Mutation und der P2X₂₋₁-Chimäre-V48C/I329C Doppel- bzw. P2X₂₋₁-Chimäre-C8S/V48C/I329C Dreifachmutation in einem nicht-reduzierendem SDS-PAGE-Gel. Die Intensität der Dimer- und Trimerbanden variierte stark zwischen den Experimenten. **B**, Anwendung von Iodacetamid (IA) in der Aufreinigung der P2X₂₋₁-Chimäre und der P2X₂₋₁-Chimäre-C8S, V48C/I329C Mutanten und anschließender Auftrennung in einem nicht-reduzierendem SDS-PAGE-Gel. Die Abkürzung „Ktrl.“ bezeichnet die nicht injizierte Kontrollgruppe. Die Laufhöhen der monomeren, dimeren und trimeren Banden sind mit Pfeilen und entsprechenden Zahlen beschriftet.

3.3.3 Cystein-Substitutionen im unmutierten P2X₁-Rezeptor

In den ersten Versuchen stellte sich die P2X₂₋₁-Chimäre als unzureichend für die biochemischen Untersuchungen dar, so dass die analogen Mutationen in dem unmutierten P2X₁-Rezeptor (mit Hexahistidyl-Motiv am N-Terminus) eingebracht wurden. Bereits initiale Experimente metabolisch markierter Cystein-Mutanten dieses Rezeptors zeigten deutliche Monomerbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa und verringerte Dimer- und Trimerbanden im Vergleich zu den P2X₂₋₁-Mutanten (vgl. Abbildung 3.4 A und Abbildung 3.5 A). Die Doppelbande des Monomers erklärt sich als komplex glykosylierte Form (obere, diffuse Bande) im Vergleich zu der minimal glykosylierten, Mannose-reichen, wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum verbliebenen Form (untere, scharfe Bande). In Oberflächenprotein-Markierungsexperimenten war, wie erwartet, nur die komplex glykosylierte Bande sichtbar (Abbildung 3.7). Zusätzlich zeigten BN-PAGE Experimente, dass alle P2X₁-Rezeptormutanten einen Komplex derselben Größe bildeten (Abbildung 3.5 B). Die teilweise Zersetzung des Rezeptorkomplexes nach Zugabe von 0,1% SDS in BN-PAGE Gelen zeigte drei distinkte Banden, entsprechend eines Monomers, Dimers und als größtes Multimer ein Trimer

(Abbildung 3.5 A; Nicke *et al.* 1998). Demnach bildeten alle P2X₁-Rezeptormutanten einen trimeren Komplex.

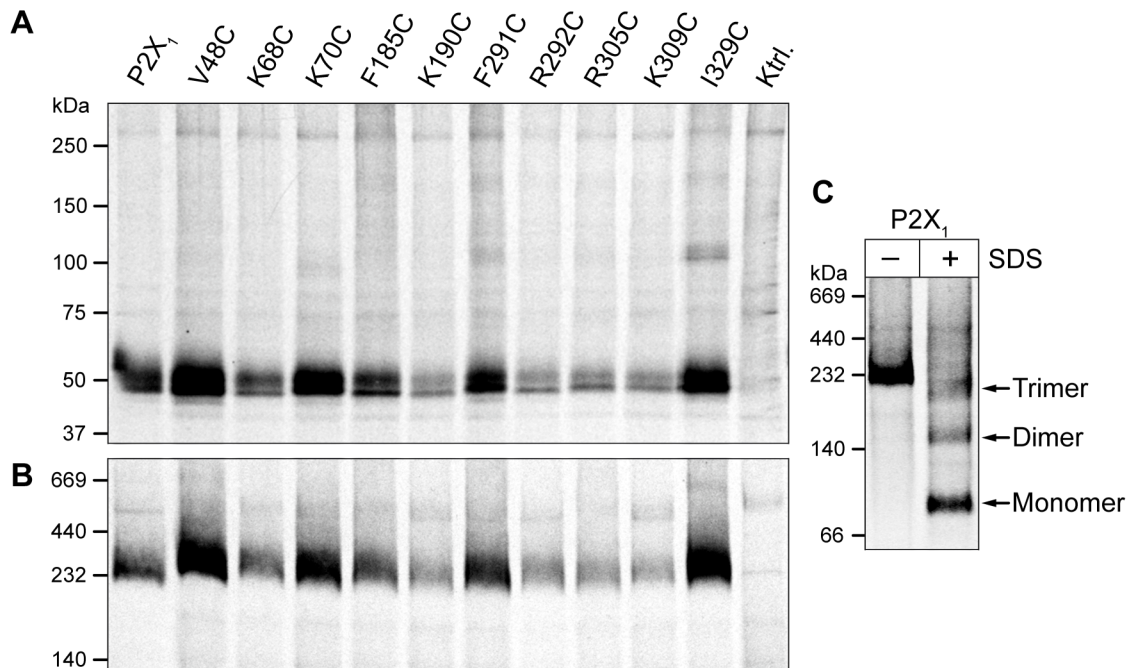


Abbildung 3.5 Autoradiogramm der Cystein-substituierten P2X₁-Mutanen nach Einzalexpression. **A** Nicht-reduzierendes SDS-PAGE-Gel der affinitätschromatographisch gereinigten Cystein-Mutationen des P2X₁-Rezeptors nach 16 h metabolischer Markierung in [³⁵S]-Methionin-haltigem Medium und zwei Tagen Inkubation in nicht-radioaktivem Medium. **B** Autoradiogramm eines BN-PAGE Gel mit denselben Proben wie in **A**. Wie bereits in Abschnitt 2.2.3.7 angeführt, ist eine genaue Größenordnung der aufgetrennten Komplexe anhand des Größenmarkers unter den durchgeführten Bedingungen nicht möglich, sondern dient dem Vergleich der Experimente untereinander. **C** Autoradiogramm eines BN-PAGE-Gel des P2X₁-Rezeptorproteins vor und nach teilweiser Dissoziation durch Zugabe von 0,1% SDS. Die Abkürzung „Ktrl.“ bezeichnet die nicht injizierte Kontrollgruppe.

Die Oberflächenexpression der erstellten P2X₁-Rezeptormutanten wurde mit enzymatischer Deglykosylierung überprüft (Abbildung 3.6). Die Deglykosylierung zeigt ein ähnliches Muster für die Endo H-sensitive und Endo H-resistente Proteinanteile mit einem identischen Größenunterschied für alle Rezeptormutanten und den wt-P2X₁-Rezeptor in einem reduzierendem SDS-PAGE-Gel. Demnach war eine der vier möglichen Konsensussequenzen zur N-glykosidischen Glykosylierung (Abbildung 1.5) mit einem komplexen Polysaccharidmolekül versehen (Abbildung 3.6; Abbildung 3.2 B). Diese komplexe Glykosylierung sprach für einen Einbau der Rezeptorkomplexe in die Plasmamembran der Zellen.

Zur Visualisierung vollständig ausgereifter Rezeptorproteine in der Zellmembran wurden diese per Sulfo-NHS-gekoppelter, fluoreszierender Farbstoffe vor der spezifischen Aufreinigung der P2X₁-Rezeptoren per Hexahistidyl-Affinitäts-Chromatographie markiert. Dabei wurde ein Farbstoff (Cy5, Cy3 oder Rhodamin) über eine Sulfo-NHS Gruppe kovalent an ein primäres Amin gekoppelt (vgl. Kapitel 2.2.3.3). Anschließend

wurden die Proteine wie in Kapitel 2.2.3.4 beschrieben affinitäts–chromatographisch aufgereinigt und auf SDS–PAGE–Gelen aufgetrennt. Das Auslesen der Fluoreszenz in den Gelen (vgl. Kapitel 2.2.3.10) zeigte ein geringfügig besseres „Signal–zu–Hintergrund–Verhältnis“ bei der Anwendung des Farbstoffes Cy5 im Vergleich zu Cy3, was wahrscheinlich durch die Absorptionseigenschaften des Acrylamid–Geles begründet ist.

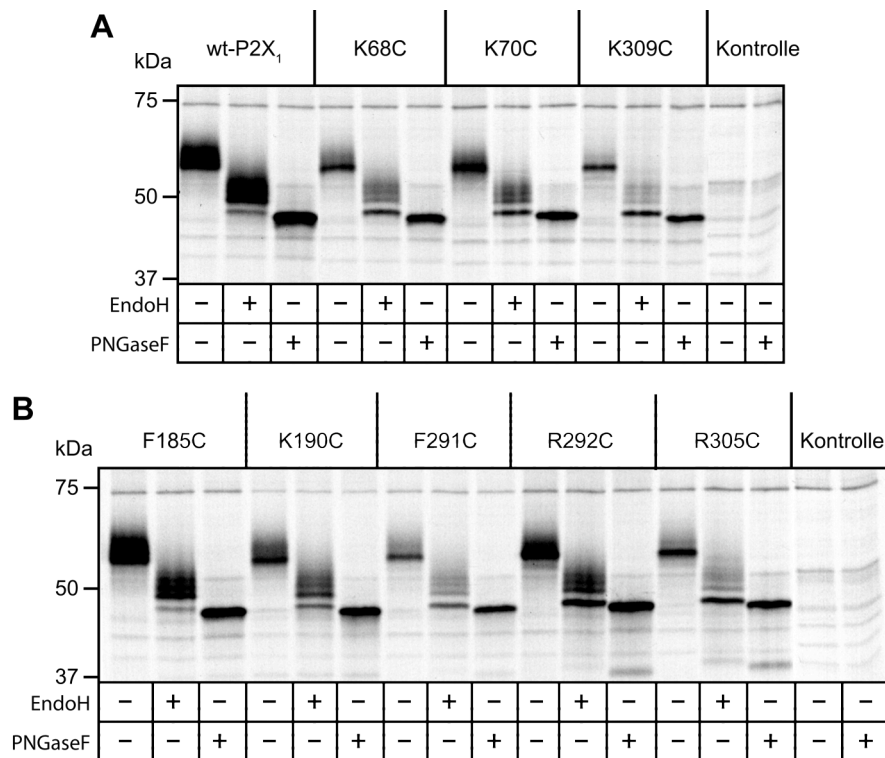


Abbildung 3.6 Deglykosylierung der Cystein–Mutationen in P2X₁–Rezeptoren. Autoradiogramm eines reduzierenden SDS–PAGE–Geles mit den aufgetrennten P2X₁–Rezeptormutanten nach 1 h enzymatischer Behandlung mit den angegebenen Enzymen. Die Oozyten wurden 16 h in [³⁵S]–Methionin–haltigem Medium metabolisch markiert und zwei Tage in nicht–radioaktivem Medium inkubiert. **A**, Vergleich des wt–P2X₁–Rezeptors und der P2X₁–Mutanten K68C, F291C, K309C. **B**, Auftrennung der P2X₁–Mutanten F185C, K190C, F291C, R292C und R305C. Als Kontrolle wurden nicht injizierte Oozyten unter denselben Bedingungen aufgearbeitet.

Die Cy5–Markierung der Cystein–substituierten P2X₁–Rezeptoren resultierte in distinkten Banden in SDS–PAGE–Experimenten mit einem Molekulargewicht der P2X–Monomere von ca. 55 kDa (Abbildung 3.7 A). Alle Mutanten zeigten einen geringen Dimerhintergrund, der nach densitometrischer Auswertung unter 4% der Summe der Proteinmengen des Monomers und Dimers lag (Abbildung 3.7 A). Der Größenunterschied zu den metabolisch markierten Rezeptorproteinen von 50 kDa (vgl. Abbildung 3.5 A) beruht auf der ausschließlichen Sulfo–NHS–Anfärbung der komplex glykosylierten Membranproteine, im Gegensatz zu den anteilig überwiegenden, intrazellulären Proteinen (mit minimaler, mannosereicher Zuckerseitenkette) bei der metabolischen

Markierung (vgl. Kapitel 3.3.1 auf Seite 49). Dies ist ein Hinweis auf die spezifische Oberflächenmarkierung mit diesen Farbstoffe (Abbildung 3.7 B).

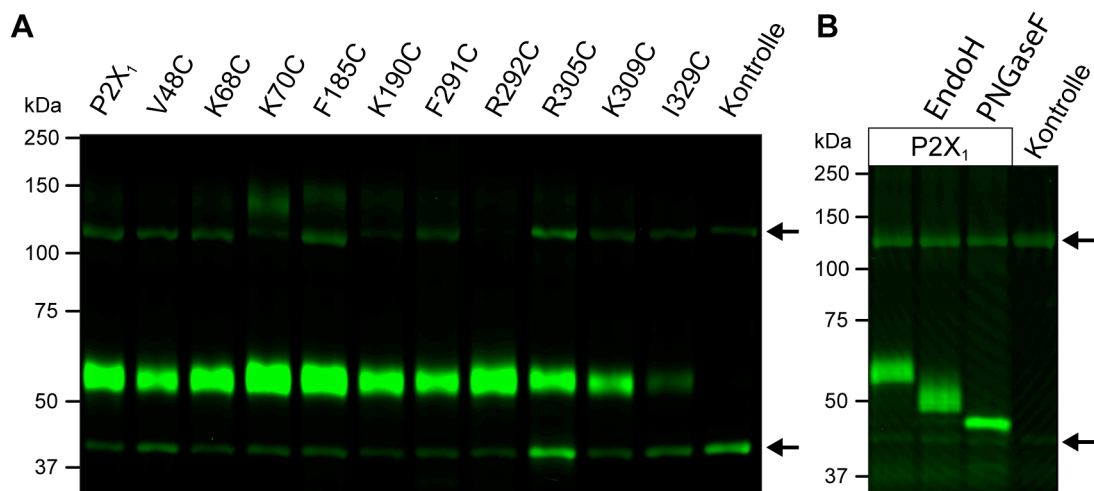


Abbildung 3.7 Oberflächenmarkierte P2X₁-Einzelmutationen. *A*, Nicht-reduzierendes SDS-PAGE-Gel der affinitätschromatographisch gereinigten P2X₁-Einzelmutanten ohne Anwendung von Iodacetamid. *B*, Deglykosylierung des wt-P2X₁-Rezeptorproteins mit Endo H und PNGase F. Die Pfeile neben den Gelen bezeichnen die unspezifischen Banden der Oozyten-Aufreinigung.

Die biochemischen Untersuchungen des P2X₁-Rezeptors zeigten einen sehr geringen Dimer- und Trimerhintergrund der eingebrachten Einzelaminosäuremutationen im Vergleich zu der P2X₂₋₁-Chimäre. Demnach wurden in den folgenden biochemischen Experimenten die Cystein-Mutanten des P2X₁-Rezeptors verwendet.

3.3.4 Funktionelle Untersuchungen der Cystein-Mutanten der P2X₂₋₁-Chimäre

Alle P2X₁-Mutanten wurden mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme auf Funktionalität getestet und ergaben Ströme im Bereich einiger Mikroampere nach Aktivierung mit 3 mM ATP. Die ATP-Dosis-Wirkungs-Kurven dieser Mutationen waren nach rechts verschoben mit EC₅₀-Werten von 7 μ M bis 700 μ M im Vergleich zu 1 μ M für den unmutierten P2X₁-Rezeptor (Abbildung 3.8 B). Dies war zu erwarten, da die mutierten Aminosäuren wahrscheinlich an der ATP-Bindung oder der Öffnung des Rezeptors beteiligt sind. Wegen der schnell desensitisierenden Ströme des P2X₁-Rezeptors war eine funktionelle Charakterisierung erschwert. Um den Einfluss der Mutationen auf die Aktivierung des Rezeptors genauer untersuchen zu können, wurde die erwähnte P2X₂₋₁-Chimäre für die elektrophysiologische Charakterisierung der Cystein-Mutanten verwendet (Kapitel 3.1 auf Seite 45 und Abbildung 3.1).

Durch den Einsatz dieser P2X₂₋₁-Chimäre war es möglich für alle Cystein-Mutanten außer der R305C-Mutante vollständige Dosis-Wirkungs-Kurven zu erstellen (durchge-

führt von Dr. Jürgen Rettinger; MPI für Biophysik, Frankfurt; Abbildung 3.8). Die R305C-Mutante zeigte einen stetig anwachsenden Einwärtsstrom, so dass keine zuverlässige Aussage über die ATP-Effektivität des Rezeptors getroffen bzw. kein EC_{50} -Wert ermittelt werden konnte. In Übereinstimmung mit entsprechenden Alanin-Mutanten des $P2X_1$ -Rezeptors (Tabelle 3.2) wurden die größten Änderungen des EC_{50} -Wertes von ATP für K68C (~60.000), K70C (~8.500) und K309C-Mutanten (~7.000) gemessen. Zusätzlich zeigte die R292C-Mutante einen um den Faktor ~1.200 erhöhten EC_{50} -Wert. Alle weiteren Mutationen in der Chimäre verursachten geringe Veränderungen des EC_{50} -Wertes die ähnlich oder bis zu 50fach erhöht gegenüber den entsprechenden Alanin-Mutanten des $P2X_1$ -Rezeptors waren (Abbildung 3.8; Tabelle 3.2). Diese Abweichungen könnten einerseits in den unterschiedlichen substituierten Aminosäure (Cystein oder Alanin), oder in dem schnellen Desensitisierungsverhalten des $P2X_1$ -Rezeptors begründet sein (Kapitel 3.1 auf Seite 45).

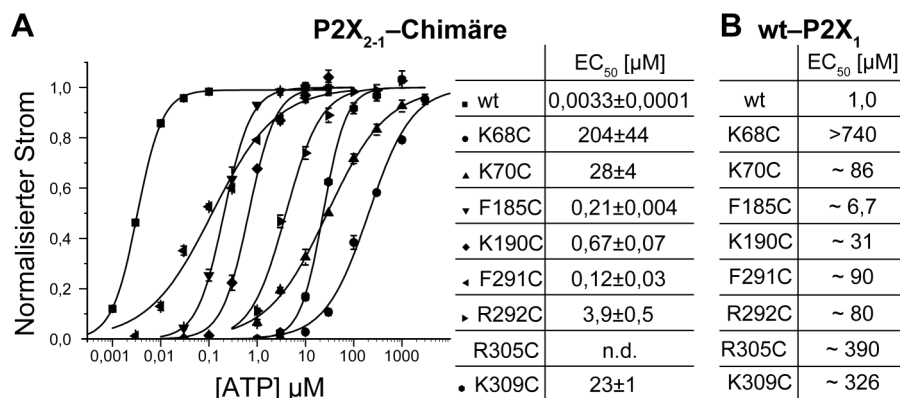


Abbildung 3.8 ATP-Dosis-Wirkungs-Relationen der P2X₂₋₁-Cystein-Mutanten. **A**, ATP-Dosis-Wirkungs-Relation und entsprechende EC_{50} -Werte für ATP an den Cystein-Mutanten der P2X₂₋₁-Chimäre. Die Messungen an Oozyten erfolgten mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme bei einem Haltepotential von -60 mV. **B**, ATP EC_{50} -Werte der Mutationen im P2X₁-Rezeptor. Die Werte der P2X₁-Cysteinmutanten basieren auf je fünf Oozyten eines Frosches und sind nur als Annäherung zu verstehen. Diese Daten und die Abbildung wurden von Dr. Jürgen Rettinger (MPI für Biophysik) generiert und zur Verfügung gestellt.

Insgesamt betrachtet konnten zwar alle Cystein-Mutanten der P2X₂₋₁-Chimäre erfolgreich exprimiert und funktionell in der Oozyten-Membran mit Strömen im Mikroamperebereich nachgewiesen werden (Abbildung 3.8), aber für die R305C-Mutante konnte keine Dosis-Wirkungs-Relation erstellt werden. Dies weist darauf hin, dass die Cystein-Mutationen mit Ausnahme der R305C-Mutation die Faltung und die Funktion des Rezeptors nicht wesentlich beeinträchtigen bzw. aufheben. Zusätzlich ermöglichte die nicht-desensitisierende Eigenschaft der P2X₂₋₁-Chimäre die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Disulfidbrücken-Quervernetzung (Kapitel 3.4.5 auf Seite 65).

3.4 Koexpression der Cystein-substituierten P2X₁-Rezeptoren

Nachdem die Oberflächenexpression, Trimerisierung und Funktionalität der Cystein-Mutanten des P2X₁-Rezeptors festgestellt worden war, folgte die Koexpression der P2X₁-Cysteinmutanten in *Xenopus laevis*-Oozyten mit dem Ziel eine spontane Quervernetzung der Cysteine über Disulfidbrückenbildung zwischen zwei Untereinheiten zu identifizieren. Bei acht Mutationen in der extrazellulären Domäne beläuft sich die Menge auf 28 Kombinationen. In den jeweiligen Experimenten wurde jede einzelne Mutation mit den jeweils sieben anderen kombiniert, um mehrfache Wiederholungen einzelner Koexpressionsexperimente zu erreichen. Jedes Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt, so dass jede Kombination wenigstens viermal getestet wurde. Darüber hinaus wurde bei jeder Aufreinigung die Positivkontrolle (P2X₁-V48C in Koexpression mit P2X₁-I329C) mitgeführt.

3.4.1 Quervernetzung der P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Cystein-Mutanten

Außer der Koexpression der P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Mutanten zeigte keine der 28 Kombinationen der acht Mutanten eine spontane und spezifische Quervernetzung von zwei Untereinheiten, die vergleichbar mit der Positivkontrolle P2X₁-V48C + P2X₁-I329C war (Abbildung 3.9). Die Quervernetzung wurde als distinkte Dimerbande mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa bei metabolischen markierten (Abbildung 3.9 A) und ca. 110 kDa bei oberflächemarkierten (Abbildung 3.9 B) Proteinen identifiziert. Die P2X₁ F291C-Mutante zeigte bereits bei Einzelexpression eine erhöhte Neigung zur Dimerbildung (Abbildung 3.9 A, rechte Seite). Es erschien jedoch eine deutlich intensivere Dimerbande in Kombination mit der K68C-Mutante, die sogar stärker als die Dimerbande der Positivkontrolle war. In reduzierenden (20 mM DTT) SDS-PAGE-Gelen wurden alle Rezeptorkomplexe, insbesondere die der koexprimierten P2X₁ K68C- + F291C-Mutanten und P2X₁ V48- + I329C-Mutanten, vollständig in Monomere dissoziiert (Abbildung 3.12 C). Dies deutet darauf hin, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Schwefelatomen der P2X₁ K68C- + F291C-Mutanten und der P2X₁ V48- + I329C-Mutanten benachbarter Untereinheiten des P2X₁-Rezeptors ausgebildet wird. Die Trimerbanden aller koexprimierten Mutanten in BN-PAGE-Gelen erschienen in diesen Experimenten wie in den Einzelexpressionsexperimenten (Abbildung 3.5) als einzelne Banden ohne zusätzliche Banden höheren molekularen Gewichtes, womit Aggregation ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 3.9 C).

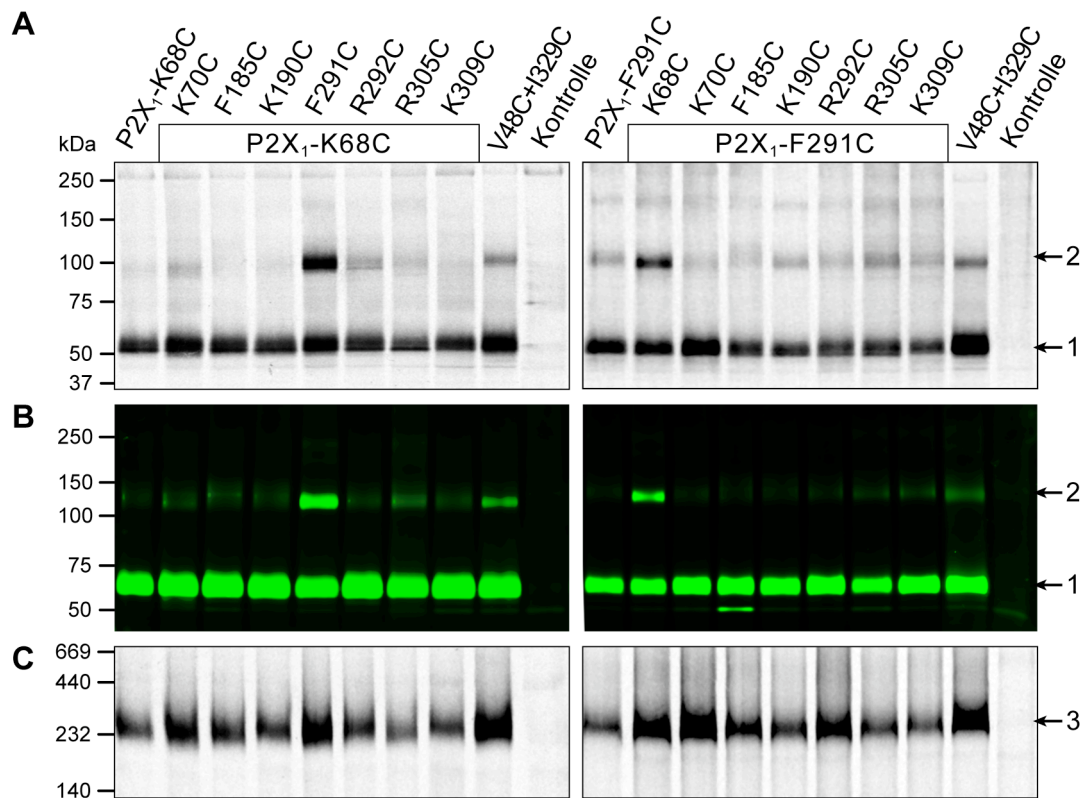


Abbildung 3.9 Übersicht der P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Koexpressionsexperimente. **A** Autoradiogramm nicht-reduzierender SDS-PAGE-Gele der affinitätschromatographisch gereinigten koexprimierten Rezeptorproteine nach 16 h metabolischer Markierung und zwei Tagen Inkubation in nicht radioaktivem Medium. Dargestellt sind jeweils die K68C- (links) und F291C-Mutanten (rechts) in entsprechender Koexpression mit den anderen sieben Cystein-substituierten Mutanten. **B** Nicht-reduzierende SDS-PAGE-Gele der Oberflächen-markierten Rezeptorproteine. **C** Autoradiogramm von BN-PAGE-Gelen mit den Proben aus **A**. Die monomeren, dimeren oder trimeren Banden sind mit Pfeilen und entsprechenden Zahlen auf der rechten Seite markiert.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Quervernetzung dieser beiden Cystein-Mutanten wurden die entsprechenden Banden densitometrisch quantifiziert und als Anteil am P2X-Gesamtprotein (Anteil der Summe aus Monomer und Dimer) dargestellt (Abbildung 3.10). Ein ungepaarter, beidseitiger t-Test des Dimeranteils der Koexpressionsexperimente im Vergleich zu den Einzelexpressionen ergab ein Signifikanzniveau (p) unter 0,0001.

Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse auf eine spezifische Disulfidbrückenbildung zwischen den substituierten Cysteinen (K68C und F291C) benachbarter Unter-einheiten hin. Somit kann eine Annäherung dieser beiden Aminosäuren in dem P2X₁-Rezeptor angenommen werden.

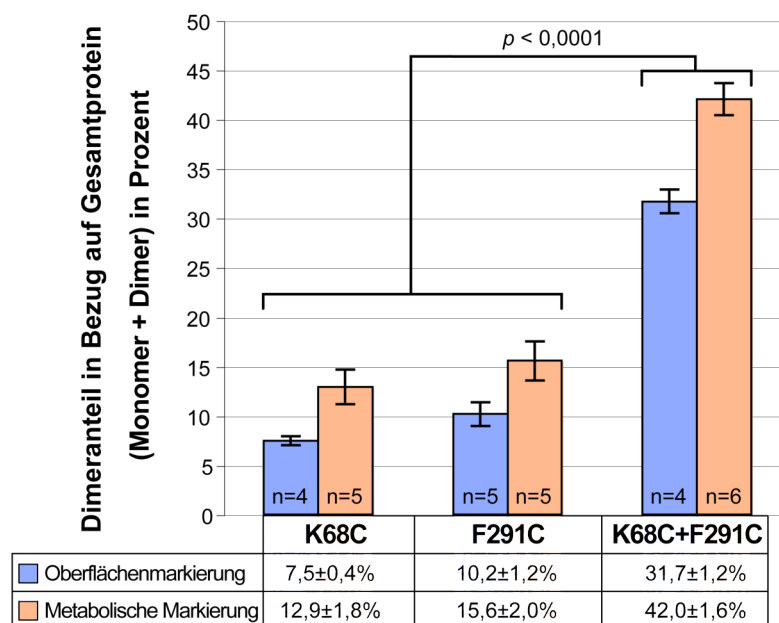


Abbildung 3.10 Relative Intensität des Dimers zu Gesamtprotein der einzeln- und koexprimierten P2X₁ K68C- und F291C-Untereinheiten. Dargestellt sind die Anteile der Dimerbande als Prozent (\pm Standardfehler) des Gesamtproteins (Monomer + Dimer) nach densitometrischer Auswertung (n = Anzahl der Experimente) mit der ImageQuant Software. Ein ungepaarter, beidseitiger t-Test ergab ein Signifikanzniveau (p) unter 0,0001 für den Dimeranteil bei Koexpression im Vergleich zu den einzeln exprimierten Untereinheiten.

3.4.2 Übrige Koexpressionen

Eine ebenfalls beobachtete Dimerisierung der P2X₁ K70C- und R292C-Mutanten konnte nicht bestätigt werden bzw. war nicht signifikant von der Dimerisierung der Einzelmutanten zu unterscheiden (nicht gezeigt). Da außer der Kombination der P2X₁ K68C- mit P2X₁ F291C-Mutanten und der Positivkontrolle (Kombination der P2X₁ V48- mit P2X₁ I329C-Mutanten) keine Dimerisierung eintrat, wird im Folgenden nur die Koexpression der P2X₁ F185C-Mutante mit den sieben anderen Cystein-Mutationen exemplarisch dargestellt (Abbildung 3.11).

Die nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gele zeigten keine Dimerisierung außer bei den oben erwähnten Kombinationen (Abbildung 3.11 A). Die Trimerbande der koexprimierten P2X₁ V48C- und I329C-Mutanten in nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gelen wurde sporadisch beobachtet und ist möglicherweise auf die bereits erhöhte Dimerisierungsneigung der P2X₁ I329C-Mutante in nicht-reduzierenden SDS-PAGE zurückzuführen (vgl. Abbildung 3.11 A; Abbildung 3.5). Die BN-PAGE-Gele zeigten für alle einzeln- und koexprimierten Mutanten in singulären Banden mit der Größe eines Trimers, so dass Aggregation der Untereinheiten ausgeschlossen wurde (Abbildung 3.11 B). Reduzierende SDS-PAGE-Gele (20 mM DTT) zeigten vollständig dissoziierte

monomere Banden für alle Mutanten und Kombinationen von Mutanten (Abbildung 3.11 C).

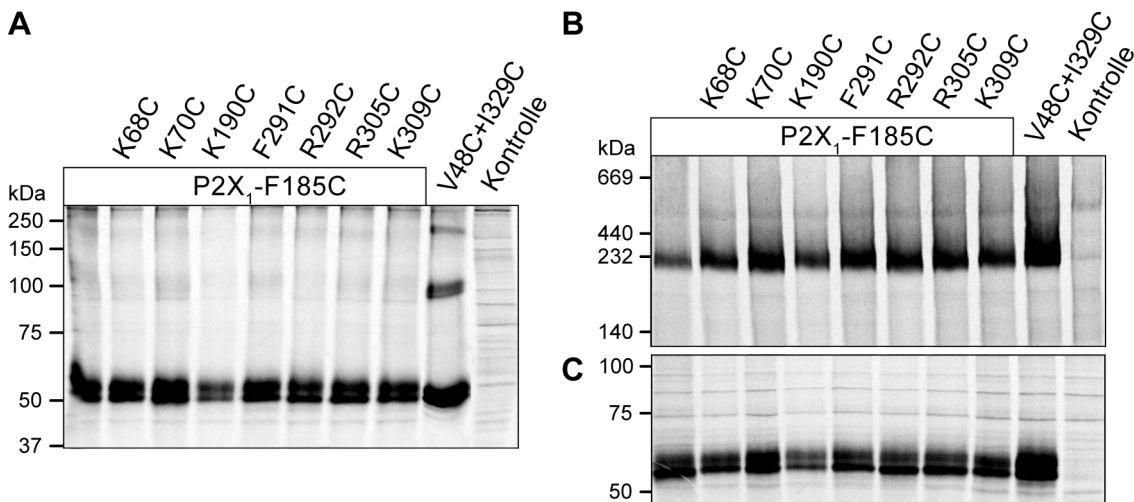


Abbildung 3.11 Koexpression der P2X₁ F185C-Mutante mit sieben anderen Cysteinmutanten der Ektodomäne. *A* Autoradiogramm eines nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gel der P2X₁ F185C-Einzelmutante in Kombination mit den sieben anderen Cystein-Mutanten nach metabolischer Markierung und affinitätschromatographischer Aufreinigung. Als Positivkontrolle wurde die P2X₁ V48C + P2X₁ I329C-Kombination verwendet. *B* Autoradiogramm eines BN-PAGE-Geles mit denselben Proben. *C*, Autoradiogramm eines reduzierenden (20 mM DTT) SDS-PAGE-Geles der Proben aus *A*.

3.4.3 Trimerisierung der P2X₁ K68C/F291C-Doppelmutante

Um zu untersuchen, ob eine Quervernetzung der drei Untereinheiten eines P2X-Komplexes möglich ist, wurden beide Mutationen in eine P2X₁-Untereinheit eingebracht. Nicht-reduzierende SDS-PAGE-Analyse metabolisch markierter Proteine zeigte vier distinkte Banden unterschiedlicher Größe: das Monomer mit ca. 50 kDa, ein Dimer mit ca. 100 kDa, ein Trimer mit ca. 150 kDa und eine zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa, was einem Tetramer entsprechen könnte (Abbildung 3.12 A). Diese zusätzliche Bande bei 200 kDa könnte auf aggregiertes Protein, einen Rezeptor mit vier Untereinheiten oder einen Trimerkomplex mit verändertem Trennverhalten in nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gelen hinweisen. Reduzierende SDS-PAGE-Analyse (20 mM DTT) zeigte ausschließlich Monomerbanden, so dass Disulfidbrücken als Ursache für die Multimerisierung insbesondere für die Bande bei 200 kDa angenommen wurden (Abbildung 3.12 C). Interessanterweise stellte sich diese Probe in nicht dissoziierenden BN-PAGE Gelen als distinktes Trimer ohne ersichtliche Banden höheren molekularen Gewichts dar (Abbildung 3.12 D). Das weist darauf hin, dass es sich bei der zusätzliche Bande ebenfalls um ein Trimer handelt, das jedoch nicht komplett quervernetzt wurde. In dem doppelt mutierten Rezeptor sind drei

Disulfidbrücken möglich, die bei vollständiger Quervernetzung eine ringförmige Konformation des Komplexes erzeugen würden (Abbildung 3.12 B). Wurden nur zwei von drei möglichen Disulfidbrücken gebildet, würde eine lineare Konformation des Komplexes vorliegen. Diese würde voraussichtlich eine geringere Mobilität in der Polyacrylamid-Matrix aufweisen (Abbildung 3.12 A, die entsprechende Bande ist mit einem Stern markiert). Eine ähnliche Beobachtung wurde von Nagaya und Kollegen (2005) veröffentlicht. In dieser Studie wurden zwei aneinandergrenzende, vermutlich Zink-komplexierende Aminosäuren unterschiedlicher Untereinheiten des $P2X_2$ -Rezeptors durch Cysteine ersetzt und zusätzlich zum Trimer eine Bande in der Größe eines Tetrameres beobachtet. Die Autoren vermuteten als Ursache entweder unterschiedliche Glykosylierungszustände des Proteins oder jeweils zwei und drei Disulfidbrücken innerhalb des trimeren Rezeptors (Nagaya *et al.* 2005).

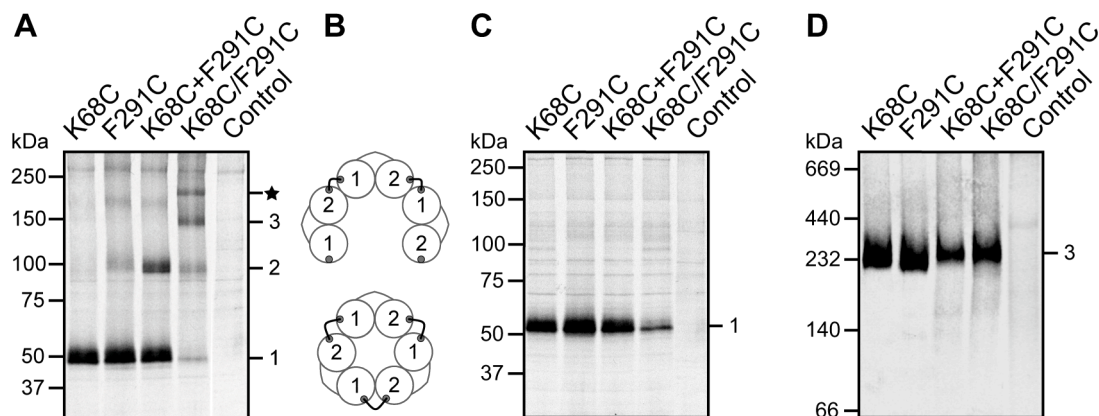


Abbildung 3.12 A, B, C Autoradiogramm metabolisch markierter $P2X_1$ -Doppelmutanten aufgetrennt in nicht-reduzierendem (A) und reduzierendem (20 mM DTT) (C) SDS-PAGE-Gel sowie in nicht-dissoziierendem BN-PAGE-Gel (D). B Theoretische Konformationen der in (A) beobachteten Trimerbanden, wobei der geschlossene Komplex die niedrigere und der offene, zweifach quervernetzte Rezeptor die obere Bande (markiert mit einem Stern in A) darstellen könnten.

Der doppelt mutierte $P2X_1$ K68C/F291C-Rezeptor sollte theoretisch vollständig als Trimer vorliegen. Dennoch ist eine geringe Dimer- und Monomerbande sichtbar (Abbildung 3.12-A). Wahrscheinlich schränkte bereits die Ausbildung der ersten Disulfidbrücke die Flexibilität des Komplexes so ein, dass die zusätzlichen Quervernetzungen erschwert wurden. Zusammengenommen wird der $P2X_1$ K68C/F291C-Rezeptor effektiv über Disulfidbrücken zu Trimeren quervernetzt.

3.4.4 ATP/ADP Protektions-Assay

Die biochemischen Daten zeigten eine spezifische Quervernetzung über Disulfidbrücken zwischen den substituierten Aminosäuren K68C und F291C benachbarter Unterein-

heiten des P2X₁-Rezeptors. Unter der Annahme, dass die Aminosäuren K68 und F291 an der ATP-Bindung beteiligt sind, weist dies auf eine Lokalisation der ATP-Bindungsstelle an der Grenzfläche zweier benachbarter Untereinheiten hin. Sollte dies zutreffen, so müsste die Anwesenheit von ATP in der Bindungstasche die Ausbildung der Disulfidbrücke beeinträchtigen. Um dies zu überprüfen, wurden die koexprimierten P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Einzelmutanten und die entsprechende Doppelmutante während der Bindung an die Ni²⁺-NTA Agarose mit 20 mM des Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol behandelt. Darauf folgend wurde in der Anwesenheit von entweder 10 mM ATP oder ADP nach dem Standardprotokoll gewaschen und eluiert. Vor dem Auftrag auf ein nicht-reduzierendes SDS-PAGE-Gel wurde ein Teil des Eluates durch Zugabe von 2 mM H₂O₂ oxidiert und mit der nicht reoxidierten Probe verglichen (Abbildung 3.13; vgl. Kapitel 2.2.3.5).

Ursprünglich wurde 20 mM des Reduktionsmittel DTT während der Bindung des Proteins an die Ni²⁺-NTA Agarose verwendet. Dies resultierte aber in stark reduzierten Proteinmengen, da das DTT anscheinend einen starken Einfluss auf das Ni²⁺-Ion in der NTA-Matrix oder auf das Hexahistidylmotiv des Proteins besaß, so dass die Bindung des Proteins an das Ni²⁺-Ion verhindert wurde. In den ersten Experimenten wurde 100 mM ATP verwendet und ergab dieselben Ergebnisse wie 10 mM ATP. Da aber Bedenken bestanden, dass 100 mM des stark negativ geladenen ATPs einen sehr Einfluss auf die Konformation des Proteins und die Ausbildung der Disulfidbrücke haben könnte, wurde die ATP-Konzentration auf 10 mM verringert.

Die Zugabe von H₂O₂ zu den koexprimierten P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Mutanten oder der P2X₁ K68C/F291C-Doppelmutante resultierte in einer effektiven Wiederausbildung der Quervernetzung, was in der Anwesenheit von ATP verhindert wurde (Abbildung 3.13 A, B). Im Vergleich dazu beeinflusste ADP, das kein Agonist an P2X-Rezeptoren darstellt (Mahaut-Smith *et al.* 2000), die Wiederausbildung der Disulfid-Quervernetzung nicht. Unter denselben Bedingungen zeigten die koexprimierten P2X₁ V48C- und P2X₁ I329C-Mutanten bzw. die P2X₁ V48C/I329C-Doppelmutante keine Verminderung der Quervernetzung nach Reoxidation durch 2 mM H₂O₂ in Anwesenheit von ADP oder ATP (Abbildung 3.13 C, D). Dies war zu erwarten, da diese Aminosäuren vermutlich nicht an der ATP-Bindung beteiligt sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass ATP in der Lage ist die Quervernetzung zwischen den Aminosäurenmutanten P2X₁-K68C und P2X₁-F291C spezifisch zu verhindern.

Zusätzlich zu diesen Experimenten wurde die unspezifische Aggregation der Untereinheiten durch BN-PAGE-Gele kontrolliert. Diese Gele zeigten keinen Verlust der trimeren Struktur der Rezeptorkomplexe unter diesen reduzierenden bzw. oxidierenden Bedingungen (Abbildung 3.13 unten). Dies zeigt, dass die nativen (intrinsischen) Disulfidbrücken innerhalb der extrazellulären Domäne der jeweiligen P2X₁-Rezeptoruntereinheiten während der Aufreinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen durch die Behandlung mit β -Mercaptoethanol vermutlich nicht zugänglich bzw. reduzierbar sind und die Konformation der Untereinheiten erhalten bleibt.

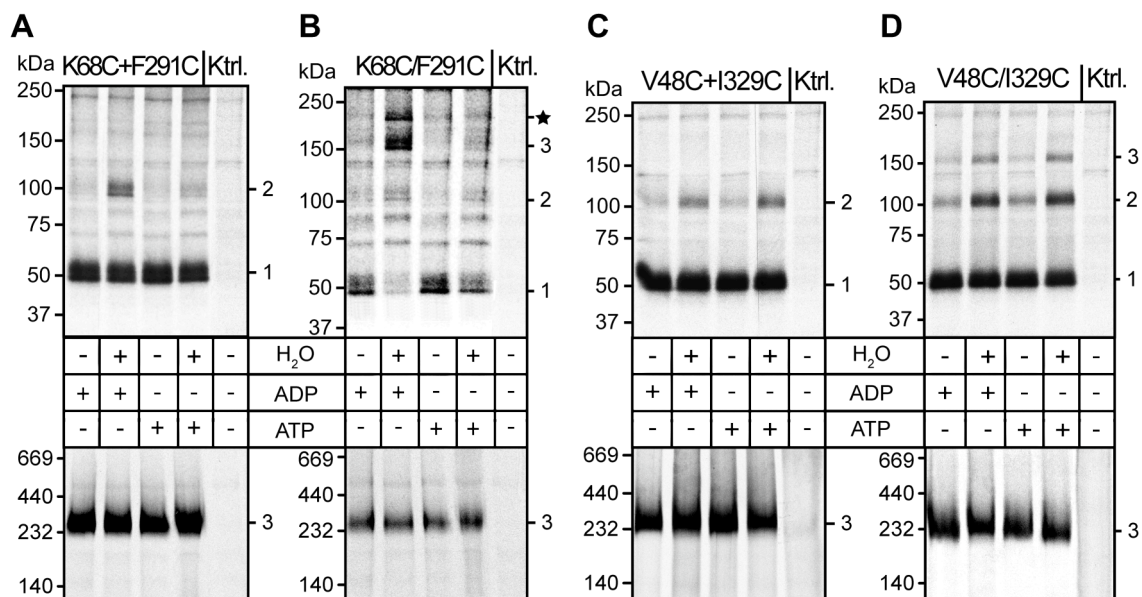


Abbildung 3.13 Spezifische Unterbindung der Disulfidbrückenbildung zwischen P2X₁ K68C- und F291C-Mutanten durch ATP. Die Mutanten werden während der Bindung der Proteine an die Ni²⁺-NTA Agarose mit 10 mM β -Mercaptoethanol reduziert und anschließend in Gegenwart von je 10 mM ATP oder ADP aufgereinigt. Aufgetrennt wurden die Rezeptorkomplexe in nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gele (oben) und BN-PAGE-Gele (unten) mit und ohne vorherige Behandlung mit 2 mM H₂O₂. Auftrennung der koexprimierten P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Mutanten (**A**) und der entsprechenden Doppelmutanten in (**B**). Auftrennung der koexprimierten P2X₁ V48C- und P2X₁ I329C-Mutanten (**C**) bzw. der entsprechenden Doppelmutante (**D**). Die Monomer-, Dimer bzw. Trimerbanden sind mit den Zahlen 1, 2 oder 3 an der rechten Seite der Gele markiert. Der Stern markiert die zweite Trimerbande (vgl. Abbildung 3.12). Die Abkürzung „Ktrl.“ bezeichnet die nicht injizierte Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse deuten entweder darauf hin, dass sich die beiden Cysteinsubstitutionen K68C und F291C in der ATP-Bindungstasche befinden und eine Quervernetzung durch ein gebundenes ATP-Molekül verhindert wird, oder dass die Bindung von ATP den Rezeptorkomplex in eine Konformation überführt, in der eine Annäherung dieser beiden Cysteine nicht mehr möglich ist.

3.4.5 Funktionelle Charakterisierung der P2X₂₋₁ K68C/F291C–Doppelmutante

Um den Einfluss der Disulfid–Quervernetzung der Aminosäuremutationen K68C und F291C auf die Rezeptorfunktion zu untersuchen, wurde die K68C/F291C–Doppelmutation in der P2X₂₋₁–Chimäre funktionell charakterisiert. Diese Arbeit wurde von Dr. Jürgen Rettinger, MPI für Biophysik, Frankfurt durchgeführt. Die Applikation von 300 μ M ATP ergab lediglich geringe Ströme in der Größenordnung von 10–20 nA. Es wurde vermutet, dass eine entsprechende Disulfidbrücke zwischen den Cystein–Mutationen die ATP–Bindungstasche verdeckt oder die zum Öffnen erforderliche Konformationsänderung verhindert. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Oozyten während der Messung mit 10 mM DTT superfundiert. Die P2X₂₋₁ K68C/F291C–Doppelmutante zeigte nach Zugabe von DTT eine Zunahme des ATP induzierten Stromes um den Faktor 63 ± 11 (Abbildung 3.14 A, B). Daraus wurde geschlossen, dass weniger als 2% (1/60) der Rezeptoren vor der DTT–Behandlung keine Disulfidbrücke aufwiesen und aktivierbar waren, was auf eine hohe Effizienz der spontanen Quervernetzung zwischen den Aminosäuremutationen K68C und F291C hinweist. Die DTT–induzierte Stromzunahme erreichte nach ca. 15 min ein Plateau und blieb stabil oder zeigte eine geringfügigen ($\sim 10\%$) Abnahme nach wiederholten Applikationen von 300 μ M ATP. Wie erwartet, führte die Reoxidation durch Applikation von 2 mM H₂O₂ zu einer Abnahme des Maximalstroms.

Als Kontrollexperimente wurden die entsprechenden Einzelmutationen (P2X₂₋₁–K68C und –F291C) bezüglich ihrer Empfindlichkeit auf DTT untersucht (Abbildung 3.14 B, C). Die P2X₂₋₁ F291C–Mutante zeigte einen Einwärtsstrom im Bereich einiger μ A nach Aktivierung durch 300 μ M ATP, der durch die Applikation von 10 mM DTT nicht wesentlich beeinflusst wurde. Die P2X₂₋₁ K68C–Mutante zeigte direkt nach Zugabe von DTT innerhalb einer Minute eine ca. dreifache Zunahme der Stromantwort. In einigen Oozyten erniedrigte sich dieser Strom nach ~ 20 min wieder auf das Anfangsniveau. Dieses Verhalten war nicht erklärbar aber die spontane Reversibilität und die geringe Strompotenzierung im Vergleich zu der Doppelmutante sowie die Unempfindlichkeit der F291C–Mutante führten zu der Interpretation, dass es sich hierbei nicht um eine Reduktion von eventuell endogenen Disulfidbrücken handelt. Um die Vergleichbarkeit mit den biochemischen Experimenten zu erreichen wurden die entsprechenden P2X₁–Rezeptormutanten untersucht. Ein qualitativ ähnlicher Effekt der Potenzierung des Maximalstroms konnte für die P2X₁ K68C/F291C–Doppelmutante (ca. 140fach) im

Vergleich zu P2X₁-Einzelmutanten (ca. zwei- bis dreifach) gezeigt werden (Abbildung 3.14 B).

Die Untersuchung der ATP-Dosis-Wirkungs-Relation der durch Inkubation in 10 mM DTT reduzierten P2X₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante ergaben einen EC₅₀-Wert für ATP von 153±8 μM. Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant von dem der P2X₂₋₁ K68C-Einzelmutante (Abbildung 3.14 C; Abbildung 3.8). Es wurde angenommen, dass beide Aminosäuren K68 und F291 an der ATP-Bindung beteiligt sind, so dass eine Substitution beider Aminosäuren einen stärkeren Einfluss auf die ATP-Effektivität haben sollte, als die jeweilige Einzelmutation. Das Ergebnis widersprach demnach der Erwartung, dass der EC₅₀-Wert für ATP der Doppelmutante über dem der P2X₂₋₁ K68C-Mutante liegen sollte.

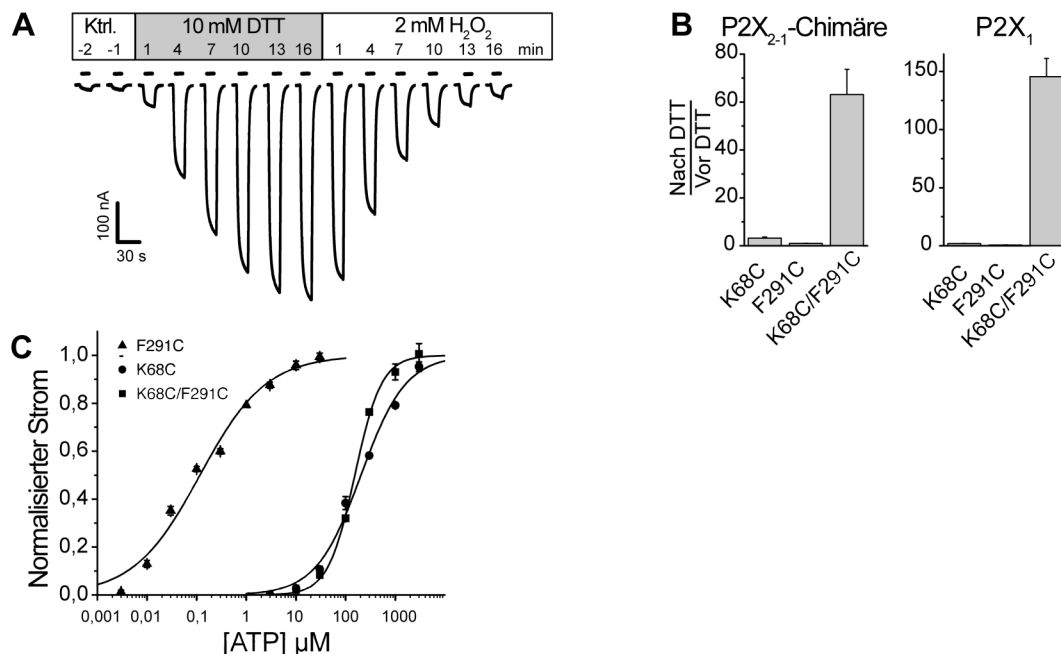


Abbildung 3.14 Funktionelle Untersuchung der P2X₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante. *A*, Darstellung des Originalstromes einer Oozyte nach Injektion und einem Tag Expression der P2X₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante. Nach Erreichen einer stabilen Antwort auf 300 μM ATP wurde die Oozyte mit 10 mM DTT superfundiert. Nach Erreichen eines Plateaus der Stromzunahme wurde mit 2 mM H₂O₂ zur Reoxidation superfundiert. Das Haltepotential betrug -40 mV. *B*, Balkendiagramm des DTT-Effektes auf den Maximalstrom der Cystein-Mutationen der P2X₂₋₁-Chimäre und des P2X₁-Rezeptor. Das Verhältnis ergibt sich aus dem Stromwerten nach Applikation von 300 μM ATP an Oozyten, die vor der Strommessung in 10 mM DTT inkubiert, zu Oozyten ohne DTT-Behandlung. *C*, Darstellung der ATP-Dosis-Wirkungs-Kurve für die P2X₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante nach Vorinkubation in 10 mM DTT für wenigstens 15 Minuten. Als Vergleich wurden die Kurven der entsprechenden einzelmultierten Rezeptoren dargestellt (vgl. Abbildung 3.8). Diese Daten und Abbildungen wurden von Dr. Jürgen Rettinger, MPI für Biophysik generiert.

Um die direkte Interaktion der ATP-Bindung und der Disulfid-Quervernetzung an der funktionellen, doppelt mutierten P2X₂₋₁-Chimäre zu untersuchen, wurde der zeitliche Verlauf der Reoxidation in An- und Abwesenheit von ATP verglichen. Zu diesem

Zweck wurde die Effizienz der Reoxidation nach kurzen (20 s) und langen (100 s) Applikationen von 300 μ M ATP untersucht. In Anlehnung an die biochemischen Ergebnisse der mutierten P2X₁-Rezeptoren wurde die Reoxidation der P2X₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante in der Anwesenheit von ATP deutlich verhindert (Abbildung 3.15 A, B). Die Untersuchungen zeigten, dass die lange (100 s) ATP-Applikation die Reoxidation effektiver verhinderte als die kurze (20 s) Applikation (Abbildung 3.15 A, B).

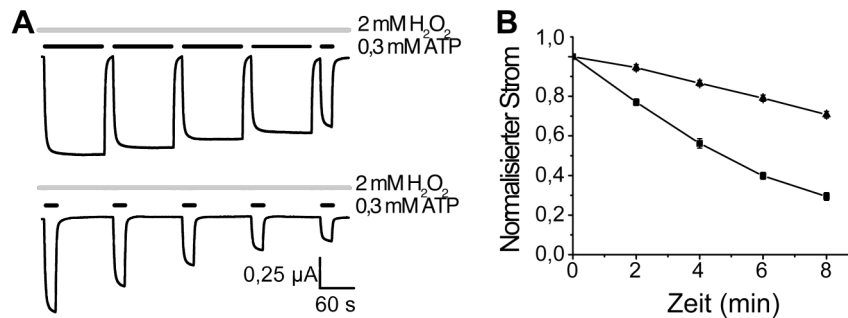


Abbildung 3.15 ATP-Einfluss auf die Reoxidation der P2X₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante
A, Original-Stromkurve der P2X₂₋₁ K68C/F291C nach Reduktion durch Inkubation in 10 mM DTT-haltigem ND96-Medium für 15 Minuten. Die Stromantworten auf 300 μ M ATP sind in kontinuierlicher Gegenwart von 2 mM H₂O₂ dargestellt. Das Intervall zwischen den ATP-Applikationen betrug 120 s, wobei entweder 20 s (oben) oder 100 s (unten) appliziert wurde. Die Messung mittels TEVC erfolgte bei einem Haltepotential von -60 mV. **B**, Zeitabhängige Darstellung der relativen Stromantwort aus **A**. ATP-Applikationen für 20 s sind als Quadrate und für 100 s als Dreiecke dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar; Anzahl der Experimente: n=5 für jedes Protokoll. Diese Daten und Abbildungen wurden von Dr. Jürgen Rettinger, MPI für Biophysik zur Verfügung gestellt.

Zusammengenommen konnte funktionell die Quervernetzung durch Disulfidbrückenbildung der Cystein-substituierten P2X₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante gezeigt werden. Zusätzlich wurde die Inhibition der Reoxidation in Gegenwart von ATP gezeigt. Dies unterstützt die Vermutung, dass sich die Cystein-Mutationen an/in der Bindungstasche befinden, so dass ATP direkt die Interaktion dieser Mutationen verhindert, Alternativ könnte ATP den Rezeptorkomplex in eine Konformation überführen, in der die Annäherung dieser beiden Mutationen nicht möglich ist.

3.4.6 Weiterführende Untersuchungen zur intermolekularen Lokalisation der ATP-Bindungsstelle

Der größte Einfluss auf die ATP-Effektivität wurde in Übereinstimmung mit entsprechenden Alanin-Substitutionen durch die K68C- und K309C-Mutationen der P2X₂₋₁-Chimäre erreicht (Abbildung 3.8; Tabelle 3.2). Weil sich diese beiden Aminosäuren auf gegenüberliegenden Seiten der extrazellulären Domäne in der Nähe der Transmembrandomänen befinden, wurde untersucht, ob beide Aminosäuren von unterschiedlichen Untereinheiten an der Ausbildung einer Agonisten-Bindungsstelle

Untereinheiten an der Ausbildung einer Agonisten-Bindungsstelle beteiligt sind. Die Koexpression der P2X₁ K68C- und P2X₁ K309C-Mutanten resultierte jedoch nicht in quervernetzten Untereinheiten, so dass vermutlich keine räumliche Annäherung besteht.

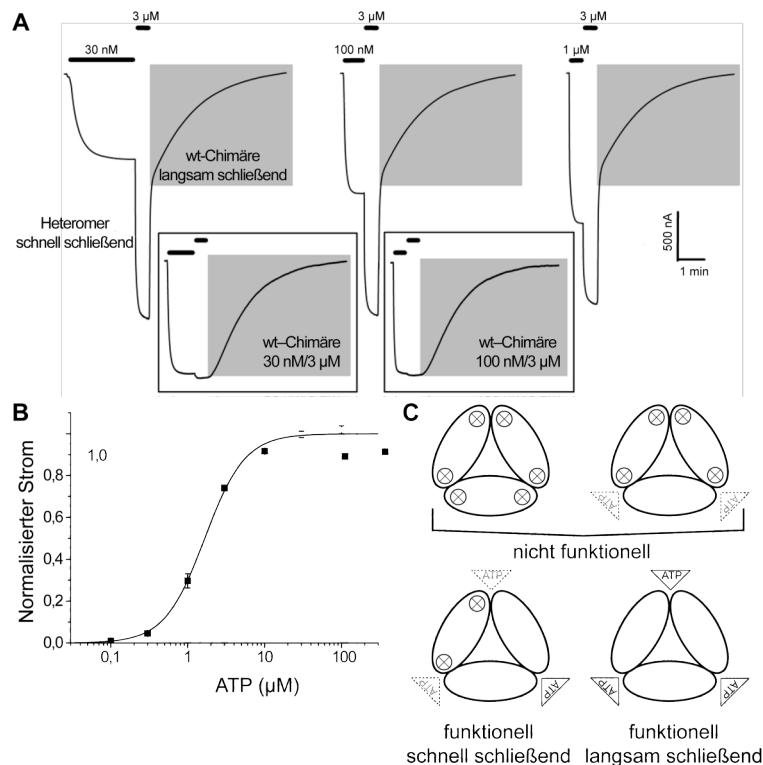


Abbildung 3.16 TEVC-Untersuchung der koexprimierten unmutierten und K68C/K309C-doppelt mutierten P2X₂₋₁-Chimäre. cRNA für die unmutierte P2X₂₋₁-Chimäre und die entsprechende K68C/K309C-Doppelmutante wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und in *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert. Die TEVC-Untersuchung wurde 1 bis 2 Tage nach der Injektion bei einem Haltepotential von -60 mV durchgeführt. **A**, Die angezeigte Testkonzentration wurde appliziert bis der Strom ein Plateau ausbildete und anschließend wurde für 30 s die Referenzkonzentration (3 mM) appliziert. Das grau hinterlegte Areal zeigt den Stromanteil der homomeren unmutierten P2X₂₋₁-Chimäre, die durch das langsame Schließverhalten identifiziert wurde. Zum Vergleich zeigen die unten eingefügten Abbildungen analoge Experimente mit Oozyten, die nur mit cRNA der unmutierten P2X₂₋₁-Chimäre injiziert worden sind. Die homomeren Rezeptoren sind mit 100 nM ATP maximal aktiviert. Bei dieser Konzentration ist der heteromere Rezeptor nahezu inaktiv. **B**, Dosis-Wirkungs-Kurve des schnell-deaktivierenden Stromanteils des Heteromers. Der heteromere Stromanteil wurde durch Subtraktion des langsam schließenden Stromanteils der homomeren Chimäre vom Gesamtstrom berechnet. **C**, Erwartete homomere und heteromere Kombination der Untereinheiten. Dreiecke deuten die voll funktionellen Grenzflächen-ATP-Bindungsstellen an. Gestrichelte Dreiecke deuten funktionelle aber gering affine Bindungsstellen an. Die Kreuze in einem Kreis bezeichnen die K68C und K309C Mutationen. Bindungsstellen zwischen zwei Mutationen wurden als nicht-funktionell erachtet und drei funktionelle Bindungsstellen wurden als notwendig für die Kanalöffnung angenommen.

Um die Beteiligung dieser zwei Aminosäuren unterschiedlicher Untereinheiten an der gleichen ATP-Bindungsstelle zu untersuchen wurden von Dr. Annette Nicke (MPI für Hirnforschung in Frankfurt am Main) funktionelle Untersuchungen mit der entsprechenden P2X₂₋₁-Doppelmutante durchgeführt. Sofern diese P2X₂₋₁ K68C/K309C-Doppelmutante einzeln in Oozyten exprimiert wurde, konnte kein Strom durch die Applikation von 1 mM ATP vor oder nach Reduktion durch DTT hervorgerufen wer-

den. Dies ist ein Hinweis, dass die kombinierte Substitution dieser beiden Aminosäuren möglicherweise die ATP-Bindung oder die nachfolgende Öffnung des Kanals vollständig verhindert.

Die Koexpression der P2X₂₋₁ K68C/K309C-Doppelmutante mit der unmutierten P2X₂₋₁-Untereinheit in einem 1:1 Verhältnis der cRNA resultierte in einem ATP-aktivierten Strom mit zwei distinkten Komponenten der Inaktivierung nach Auswaschen von ATP (Abbildung 3.16). Diese zwei Komponenten sind ein Hinweis auf das Vorhandensein von mindestens zwei Rezeptor-Populationen: einem funktionellen Heteromer aus Doppelmutante und unmutiertem Rezeptor einerseits und dem unmutierten P2X₂₋₁-Rezeptor andererseits. Der Strom des Heteromers konnte außerdem deutlich von dem Strom des unmutierten P2X₂₋₁-Rezeptoren unterschieden werden, da der unmutierte Rezeptor bereits mit 100 nM ATP maximal aktiviert ist und einen sehr langsamen Verlauf der Kanalschließung nach Entfernung von ATP aufweist (Zeitkonstante der Kanalschließung von $\tau = 60$ s; Abbildung 3.16; Rettinger und Schmalzing 2004). Der heteromere Rezeptor war mit 30 μ M ATP maximal aktiviert (EC_{50} -Wert = $1,7 \pm 0,1 \mu$ M ATP; Hill-Koeffizient $n_h = 1,5 \pm 0,1$) und die Kanalschließung erfolgte sehr schnell nach Auswaschen des ATPs (Abbildung 3.16 B).

Weil der beobachtete Strom zwei Komponenten besaß, wurde neben der Population der homomeren P2X₂₋₁-Rezeptoren nur eine weitere heteromere Rezeptorpopulation mit maximal einer doppelt mutierten Untereinheit angenommen. Wie in Abbildung 3.16 C dargestellt, besitzt ein Heteromer aus zwei unmutierten und einer doppelt-mutierten Untereinheit drei funktionelle ATP-Bindungsstellen, wobei nur zwei funktionelle Bindungsstellen in Heteromeren mit zwei doppelt-mutierten Untereinheiten zu erwarten sind. Unter der Annahme, dass drei ATP-Moleküle zur Kanalöffnung notwendig sind, bedeuten diese Ergebnisse, dass eine Interaktion der Aminosäuren K68 und K309 unterschiedlicher Untereinheiten zur ATP-Bindung besteht und nur eine Mutation pro Bindungsstelle toleriert wird.

3.5 K68C- und F291C-analoge Cystein-Substitutionen in P2X₂-, P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren

Wenn die ATP-Bindungsstelle in P2X₁-Rezeptoren sich an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten befindet, dann müsste sich diese, aufgrund der Sequenzhomologie, in anderen P2X-Rezeptoruntereinheiten an ähnlicher Stelle befinden. Um zu testen, ob P2X₁ K68- und P2X₁ F291-homologe Aminosäuren sich ähnlich

annähern, wurden die entsprechenden Positionen in den P2X₂-K69, -F289, P2X₃-K63, -F280 und P2X₄-K67, -F294 Rezeptoren mit N-terminalen Hexahistidylmotiv gegen Cysteine ausgetauscht. Hierbei wurden die in diesen Subtypen vorhandenen, nicht konservierten Cysteine belassen und nicht ersetzt. In der extrazellulären Domäne der P2X-Rezeptoren befinden sich 10 konservierte Cysteine. In den intrazellulären Bereichen der P2X₂-, P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren befinden sich zusätzlich drei, zwei und vier nicht konservierte Cysteine (North 2002). Für die folgenden Experimente wurden, analog zu den Versuchen mit dem P2X₁-Rezeptor, nicht-denaturierende Bedingungen für die affinitätschromatographische Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose aus *Xenopus laevis* Oozyten gewählt. Aufgrund der höheren Anzahl an Cysteinen wurde jedoch zusätzlich Iodacetamid während des Versuchs verwendet, um unspezifische Quervernetzung zu vermeiden (Kapitel 2.2.3.4 auf Seite 37). Ferner wurden v. a. die Cy5-NHS-Oberflächen-markierten Proteine untersucht, um korrekt gefaltete, völlig gereifte Rezeptorkomplexe selektiv zu untersuchen. Außerdem wurde die Proteinexpressionsmenge der verschiedenen Untereinheiten in Koexpressions-Experimenten durch Anpassung der cRNA-Injektionsmenge optimiert (vgl. Kapitel 4.3.1.1). Eine Abschätzung der Proteinexpressionsmenge erfolgte durch densitometrische Auswertung der Proteinbanden in SDS-PAGE-Gelen der einzeln exprimierten Mutanten.

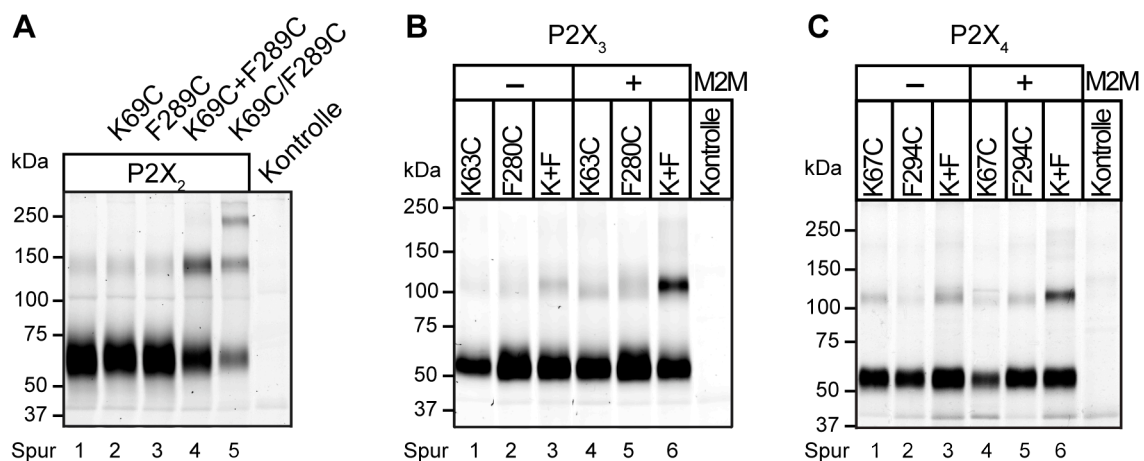


Abbildung 3.17 Oberflächenmarkierte P2X₂-, P2X₃- und P2X₄-Cysteinmutanten. Nicht-reduzierende SDS-PAGE-Gele Cy5-NHS-markierter Proteine der (A) P2X₂-, (B) P2X₃- und (C) P2X₄-Cysteinmutanten nach Einzel- und Koexpressionen. Die Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie wurde drei Tage nach Injektion in Anwesenheit von 50 mM Iodacetamid zur Solubilisierung der Oozyten und 10 mM Iodacetamid während der gesamten Aufreinigung durchgeführt. M2M kennzeichnet die Anwendung von MTS-2-MTS.

Nicht-reduzierende SDS-PAGE-Untersuchung der koexprimierten und in Anwesenheit von Iodacetamid unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgereinigten P2X₂ K69C- und P2X₂ F289C-Rezeptormutanten, zeigte eine Bande auf der Größe eines Dimers.

Die anschließende densitometrische Auswertung mit der ImageQuant Software ergab eine Dimerfraktion von $28,5 \pm 3,7\%$ des oberflächen-markierten Gesamtproteins (Abbildung 3.17 A, Spur 4). Deutlich weniger ($< 5\%$) war für den wt-P2X₂-Rezeptor und die entsprechenden Einzelmutanten sichtbar (Abbildung 3.17 A, Spur 1–3). Die entsprechende P2X₂ K69C/F289C-Doppelmutante wurde effektiv bis zur Größe eines Trimers quervernetzt. Im Gegensatz zur P2X₁ K68C/F291C-Doppelmutante blieb eine starke Bande auf Größe eines P2X₂-Monomers ($59,6 \pm 0,2\%$) sichtbar (Abbildung 3.17 A, Spur 5). Demnach ist die Quervernetzung weniger effektiv als die der P2X₁-Rezeptormutanten. Zusätzlich war eine schwache Bande auf der Höhe eines Tetramers sichtbar, welche wahrscheinlich der offenen, unvollständig quervernetzten Konformation des Trimers, analog zu den P2X₁-Rezeptormutanten, entspricht (vgl. Abbildung 3.12 A, B; (Nagaya *et al.* 2005)). Da diese Experimente mit oberflächen-markierten Proteinen durchgeführt wurden und die Funktionalität der P2X₂-Rezeptormutanten überprüft wurde (Kapitel 3.5.3), konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Dimerbande um ein Artefakt während der Aufarbeitung zufällig aggregierten Proteins handelt.

Die Koexpression der P2X₃ K63C- und P2X₃ F280C-Rezeptormutanten zeigte im Gegensatz dazu keine deutliche Dimerisierung. Sie belief sich auf $5,6 \pm 0,7\%$ (Abbildung 3.17 B, Spur 3) im Vergleich zu den einzeln exprimierten Cystein-Mutanten von $4,6 \pm 0,6\%$ bzw. $4,0 \pm 0,9\%$ (Abbildung 3.17 B, Spur 1,2). Die Doppelmutante war in Oberflächenmarkierungs-Experimenten nicht nachweisbar, bzw. erschien nach metabolischer Markierung auf BN-PAGE-Gelen als Aggregat und wurde daher nicht weiter untersucht.

Entsprechend zeigten die einzeln exprimierten P2X₄ K67C- und P2X₄ F294C-Rezeptormutanten jeweils eine Dimerfraktion von $7,8 \pm 2,8\%$ und $7,9 \pm 3,0\%$ (Abbildung 3.17 C, Spur 1 ,2) bzw. in Koexpressions-Experimenten $11,9 \pm 1,7\%$ (Abbildung 3.17 C, Spur 3). Die P2X₄-Doppelmutante wurde ähnlich der P2X₃-Doppelmutante nicht an der Oberfläche markiert und war nach metabolischer Markierung in BN-PAGE-Gelen als unspezifisches Aggregat sichtbar, so dass sie ebenfalls nicht weiter untersucht wurde. Der leicht erhöhte Hintergrund der P2X₄-Rezeptormutanten begründet sich wahrscheinlich in der größeren Anzahl an endogen vorhandenen Cysteinen.

Zusammengefasst zeigten die koexprimierten homologen P2X₁ K68- und P2X₁ F291C-Mutanten der P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren keine spontane Dimerisierung im Gegensatz zu den koexprimierten homologen P2X₂-Rezeptormutanten. Dies ist ein Hinweis auf

unterschiedliche Distanz und/oder Orientierung dieser konservierten Aminosäuren (Lysin und Phenylalanin) in den P2X₃-Subtypen. Eine direkte Annäherung der Cystein-substituierten Aminosäuren scheint für P2X₁- und P2X₂- aber nicht für P2X₃- und P2X₄-Rezeptormutanten möglich zu sein.

3.5.1 Anwendung quervernetzender Substanzen

Um die Distanz zwischen den zu P2X₁ K68 und F291 homologen Positionen abschätzen zu können, wurde die homobifunktionelle, quervernetzende Substanz 1,2-Ethanedithiol-bismethanethiosulfonat (MTS₂-MTS) verwendet (Loo und Clarke 2001; vgl. Kapitel 2.2.3.2). Diese Chemikalie besteht aus zwei Cystein-reaktiven Methylthiosulfonat-Gruppen, die durch zwei Kohlenstoffatome verbunden sind und Schwefelatome über eine Distanz von 5,2 Å quervernetzen können. Die Anwendung von 0,2 mM MTS₂-MTS erhöhte die Dimerfraktion für die koexprimierten P2X₃ K63C- und P2X₃ F280C-Rezeptormutanten auf 22,3±2,1%. Ein beidseitiger, ungepaarter t-Test ergab einen Erwartungswert (*p*-Wert) unter 0,01 (Abbildung 3.18 A). Die Dimerfraktionen der einzeln exprimierten Cystein-Mutanten veränderten sich nur geringfügig (4,3±0,5% ohne MTS₂-MTS zu 5,0±0,3% mit MTS₂-MTS; siehe Abbildung 3.17 B, Spur 4–6 und Abbildung 3.18 A).

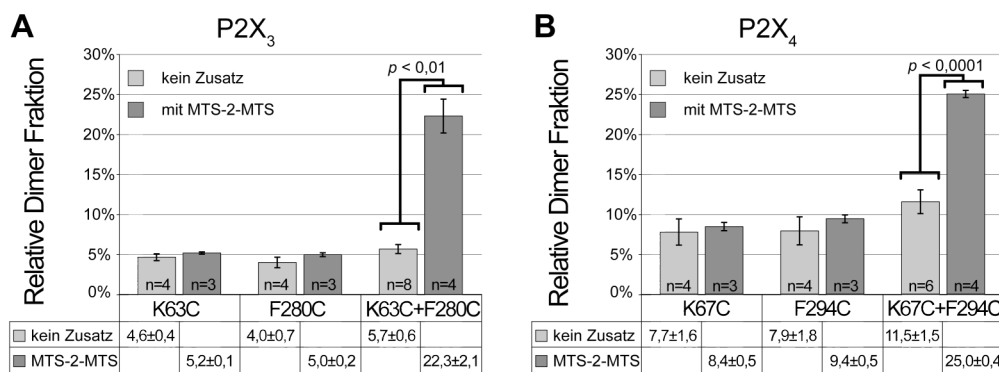


Abbildung 3.18 Quantitative Auswertung der Dimerisierung der P2X₃- und P2X₄-Cysteinmutanten. Durchschnittliche Dimerfraktion der (A) P2X₃- und (B) P2X₄-Cysteinmutanten mit und ohne vorheriger Anwendung von MTS₂-MTS, angegeben als Anteil des Gesamtproteins. Der Wert *n* gibt die Anzahl der Experimente an. Der Wert *p* beschreibt den Erwartungswert eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests.

Für die Koexpression der P2X₄ K67C- und P2X₄ F294C-Rezeptormutanten erhöhte sich die Dimerfraktion auf 25±0,5%, und ein beidseitiger ungepaarter t-Test ergab hierfür einen Erwartungswert (*p*-Wert) unter 0,0001 (Abbildung 3.18 B). Im Vergleich dazu veränderten sich die Dimerfraktionen der einzeln exprimierten Cystein-Mutanten von 7,8±1,7% (ohne MTS₂-MTS) auf 9,4±0,5% (mit MTS₂-MTS; Abbildung 3.17 C, Spur 4–6 und Abbildung 3.18 B). Zusätzlich wurden die quervernetzenden

Reagenzien MTS–4–MTS, Dibromobiman (DBBN), 1,4–Dimaleimidobutan (BMB) getestet. Diese zeigten jedoch bereits bei den unmutierten Rezeptoren eine Zunahme der Dimerfraktionen (nicht gezeigt) und wurden daher nicht weiter verwendet.

Es konnte somit eine hoch signifikante, Cystein–spezifische Quervernetzung der mutierten P2X₃– und P2X₄–Untereinheiten durch Anwendung des kurzen Cystein–reaktiven Reagenz MTS–2–MTS erreicht werden. Die Effizienz blieb jedoch unter dem Niveau der spontan quervernetzenden P2X₁– und P2X₂–Cysteinmutanten.

3.5.2 Heteromerisierung der P2X₁– und P2X₂–Rezeptoren

Weil P2X₂ K69C– und P2X₂ F289C–Rezeptormutanten mit vergleichbarer Effizienz wie P2X₁ K68C– und P2X₁ F291C–Rezeptormutanten dimerisieren, lag es nahe diese Cystein–Mutanten auf Heteromerisierung durch Koexpression in den vier möglichen Kombinationen zu untersuchen (Abbildung 3.19).

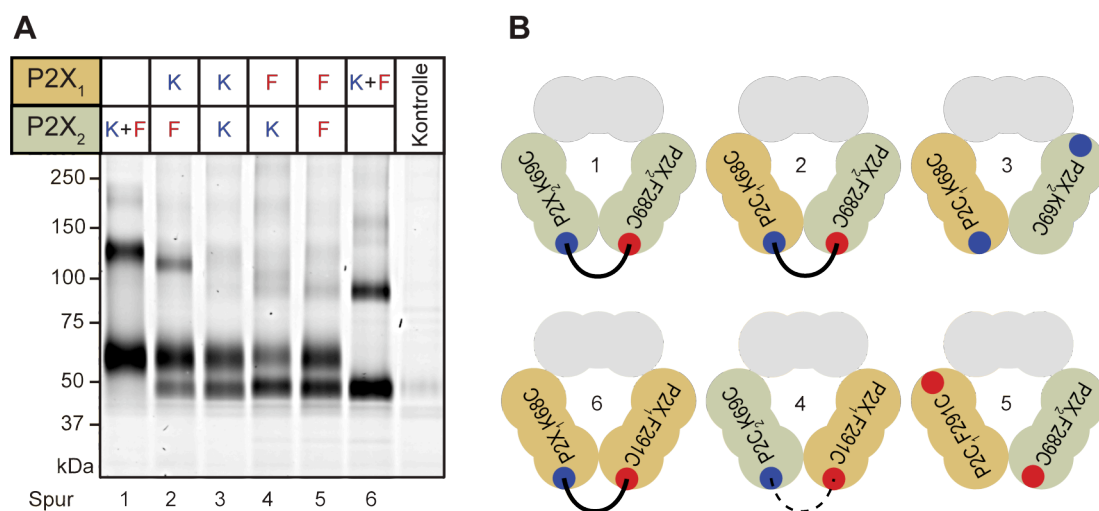


Abbildung 3.19 Heteromerisierung der P2X₁– und P2X₂–Cystein–Mutanten. *A*, nicht-reduzierendes SDS–PAGE–Gel der Oberflächen-markierten P2X₁ K68C–, P2X₁ F291C–, P2X₂ K69C– und P2X₂ F289C–Rezeptormutanten nach paarweiser Koexpression. Zur besseren Übersicht wurden die Cystein–substituierten Lysine und Phenylalanine mit K und F abgekürzt. *B*, schematische Darstellung der theoretisch möglichen heteromeren Rezeptorkomplexe bei den Koexpressions–Experimenten. Grau hinterlegte Untereinheiten entsprechen einer der beiden koexpressierten Cystein–Mutanten, Rot und Blau deutet die ersetzten Phenylalanine und Lysine an, wobei eine gepunktete Linie die nicht quervernetzte Untereinheitenkombination bezeichnet; die Nummern entsprechen den Spuren in *A*.

Die Koexpression der P2X₁ K68C– und P2X₂ F289C–Rezeptormutanten ergab eine Bande entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 120 kDa (Abbildung 3.19 A, Spur 2) und befand sich somit zwischen dem Dimer der Koexpression der P2X₁ K68C– mit P2X₁ F291C–Rezeptormutanten (ca. 100 kDa; Spur 6) und P2X₂ K69C– mit P2X₂ F289C–Mutanten (ca. 135 kDa; Spur 1). Die relative Menge des Dimers der koexpressierten P2X₁ K68C– und P2X₂ F289C–Mutanten entsprach 12,5±0,2% des

Gesamtproteins im Vergleich zu den Dimermengen der Kontrollexperimente von $2,9\pm 0,2\%$ für die Koexpression der P2X₁ K68C– und P2X₂ K69C–Mutanten (Abbildung 3.19 A, Spur 3) bzw. $2,9\pm 0,3\%$ für P2X₁ F291C– und P2X₂ F289C–Mutanten (Spur 5). Interessanterweise zeigte die Koexpression der P2X₁ F291C– und P2X₂ K69C–Mutanten keine Bande, die einem Dimer entsprechen würde (Dimerfraktion $4,1\pm 1,1\%$) (Abbildung 3.19 A, Spur 4).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass P2X₁– und P2X₂–Rezeptormutanten heteromereisieren. Unerwartet dabei war, dass in dem heteromeren Rezeptor nicht beide Grenzflächen quervernetzbar sind bzw. dass es einen Distanz– und/oder Orientierungsunterschied der Cystein–Substitutionen konservierter Aminosäuren an den Grenzflächen innerhalb eines Rezeptors gibt (vgl. Abbildung 3.19 B, Schema 2 und 4).

3.5.3 Funktionelle Charakterisierung des Cystein–substituierten P2X₁–P2X₂–Heteromers

Messungen mittels der Zwei–Elektroden–Spannungsklemme zeigten bereits, dass die Disulfidbrücke der P2X₁ K68C/F291C–Doppelmutante die Aktivierung des Rezeptors sehr stark einschränkt, aber die Funktion nach Reduktion durch DTT wieder hergestellt werden kann (Abbildung 3.14). Demnach ist die ATP–Bindung und Aktivierung des Rezeptors möglich, sofern die Schwefelatome der eingebrachten Cysteine in reduziertem Zustand vorliegen. Auf dieser Grundlage war es möglich die Aktivierung der heteromeren P2X_{1/2}–Rezeptoren durch Koexpression der P2X₁ K68C– und P2X₂ F289C–Mutanten spezifisch zu untersuchen.

Tabelle 3.3 Funktionelle Kenndaten der einzeln und koexprimierten P2X₁– und P2X₂–Mutanten

	RNA [ng/Zelle]	Kontrolle			Nach DTT Behandlung		
		I [μA]	τ1 [s]	τ2 [s]	I [μA]	τ1 [s]	τ2 [s]
P2X₁–K68C	21	8±3	3,8±0,3	13,5±0,6	19,4±2,4	4,2±0,5	11,2±1,5
P2X₂–F289C	3,5	5,6±0,5	n. d.	n. d.	8,2±0,6	n. d.	n. d.
P2X₁–K68C/ P2X₂–F289C	21 / 3,5	2,85±0,11	n. d.	n. d.	6,5±0,5	2,6±0,1	8,0±0,2

Die funktionellen Untersuchungen wurden von Dr. Jürgen Rettinger am Max–Planck–Institut für Biophysik in Frankfurt an einzeln und koexprimierten P2X₁ K68C– und

P2X₂ F289C–Rezeptormutanten in *Xenopus laevis*–Oozyten durchgeführt. Die einzeln exprimierten Mutanten ergaben die, für die Subtypen charakteristischen desensitisierenden (P2X₁–Rezeptor) bzw. nicht–desensitisierenden (P2X₂–Rezeptor) Ströme (Abbildung 3.20 A, C). Der Verlauf der Desensitierung für die P2X₁ K68C–Mutante war biphasisch, zeigte keine Änderung nach DTT–Behandlung und konnte anhand der Summe von zwei Exponentialfunktionen mit gleicher Amplitude beschrieben werden (Zusammengefasst in Tabelle 3.3).

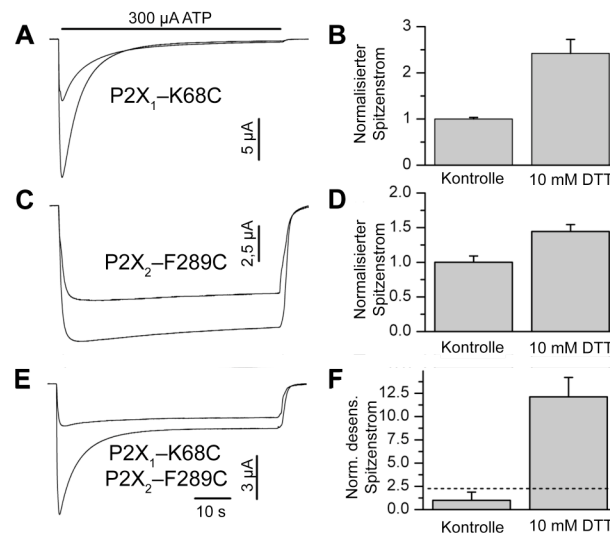


Abbildung 3.20 Funktionelle Charakterisierung des heteromeren P2X₁ K68C– / P2X₂ F289C–Rezeptors. A, C, E, Dargestellt sind die Originalströme aus TEVC–Untersuchungen einzelner Oozyten. Die jeweils kleinere Stromkurve wurde vor, und die größere nach einer 15–minütigen Inkubation in 10 mM DTT–haltigem Medium aufgenommen. Auf der rechten Seite (B, C, D) sind die zugehörigen Maximalströme normalisiert auf den Wert vor DTT–Behandlung dargestellt. Die Streubalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Für B und D wurden die Maximalströme verwendet, während in F nur der desensibilisierende Anteil des Stroms analysiert wurde. Die gestrichelte Linie in F zeigt das erwartete Stromniveau des monomeren P2X₁ K68C–Rezeptors nach DTT–Behandlung an (vgl. B).

Die Koinjektion gleicher cRNA–Mengen der P2X₁ K68C– und P2X₂ F289C–Cysteinmutanten resultierte in ausschließlich nicht desensitisierenden Strömen ähnlich dem homomeren P2X₂ F289C–Rezeptor. Eine zusätzliche desensitisierende Komponente erschien erst ab einem Injektionsverhältnis von 6:1 (P2X₁ K68C–Mutante : P2X₂ F289C–Mutante). Dies legt den Schluss nahe, dass bei Injektionsverhältnissen unter 6:1 die P2X₁ K68C–Untereinheiten annähernd vollständig mit den P2X₂ F289C–Untereinheiten zu einem heteromeren Rezeptor assemblieren, so dass kein desensitisierender Stromanteil der homomeren P2X₁ K68C–Rezeptoren sichtbar ist. Dieses Heteromer könnte entweder wegen der Quervernetzung nicht funktionell sein oder es ist funktionell und der Strom dieses Heteromers entspricht dem nicht–desensitisierenden homomeren P2X₂ F289C–Rezeptor. Um den heteromeren P2X_{1/2}–Rezeptors funktionell auflösen zu können, wurden die cRNAs in einem Verhältnis von 6:1 (P2X₁ K68C–

Mutante : P2X₂ F289C–Mutante) injiziert, da bei diesem Injektionsverhältnis die desensitisierende Stromkomponente des homomeren P2X₁ K68C–Rezeptors praktisch nicht vorhanden ist. Es wurden die Stromantworten auf eine Konzentration von 300 μ M ATP vor und nach einer 15–minütigen Inkubation in 10 mM DTT–haltigem Medium verglichen.

Ohne vorherige Behandlung der koexprimierten P2X₁ K68C– und P2X₂ F289C–Mutanten durch DTT betrug der desensitisierende Strom lediglich $0,33 \pm 0,29 \mu$ A. Nach DTT–Behandlung wurden der Strom mehr als zehnfach auf $4,0 \pm 0,69 \mu$ A erhöht (Abbildung 3.20 E, F). Auch in diesem Fall zeigte die Desensitierung einen biphasischen Verlauf, jedoch mit geringfügig kleineren Zeitkonstanten im Vergleich zum homomeren P2X₁ K68C–Rezeptor (Tabelle 3.3). Zum Vergleich erhöhte sich der Strom des homomeren P2X₁ K68C–Rezeptors um den Faktor 2,4 nach DTT–Behandlung (Abbildung 3.20 A, B), wobei der Strom des homomeren P2X₂ F289C–Rezeptors sich nur geringfügig erhöhte (Abbildung 3.20 C, D). Demzufolge entsprach die zusätzlich erscheinende desensitisierende Komponente dem heteromeren Rezeptor, der erst nach Reduktion der Disulfidbrücke zwischen den Untereinheiten voll funktionsfähig wurde.

Zusammengefasst konnte ein Maximalstrom des heteromeren P2X₁ K68C– und P2X₂ F289C–Rezeptors nach Reduktion der Disulfidbrücke durch DTT–Behandlung spezifisch gemessen werden. Dieser Strom zeigte einen desensitisierenden, biphasischen Verlauf mit geringfügig geringeren Zeitkonstanten als bei homomeren P2X₁ K68C–Rezeptoren. Obwohl dieser heteromere Rezeptor aus Cystein–substituierten Untereinheiten besteht, die nicht den Wildtypstrom wiedergeben, konnte ein Strom des Heteromers mit denselben desensitisierenden Eigenschaften wie der homomere P2X₁–Rezeptor charakterisiert werden. Demnach könnten ähnliche Ansätze zur spezifischen Charakterisierung weiterer heteromerer P2X–Rezeptoren verwendet werden, bei denen die Unterscheidung von den Homomeren pharmakologisch schwierig ist.

3.5.4 Weitere Heteromerisierungsversuche

Es wurden die übrigen sieben Kombinationen koexprimierter Cystein–Mutationen getestet und die Ergebnisse in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Bei keiner weiteren Kombination war es möglich eine Dimerbildung, die sich von den Negativkontrollen (Kombination von zwei Lysin–zu–Cystein Mutanten bzw. Phenylalanin–zu–Cystein Mutanten) signifikant unterschied, festzustellen. Selbst die Anwendung der Cystein–reaktiven,

quervernetzenden Substanz MTS–2–MTS erwies sich als unzureichend, um eine Dimerisierung herbeizuführen. Da keine Dimerbande sichtbar war, wurde auf eine statistische Auswertung der relativen Dimerfraktionen der Gele verzichtet.

Da es nicht möglich war, bereits beschriebene Untereinheiten–Kombinationen durch Koexpression der Cystein–Mutanten zu Vernetzen, liegt der den Schluss nahe, dass die Grenzfläche bzw. die Distanz und/oder Orientierung zwischen zwei benachbarten Untereinheiten sich bei den Subtypen der P2X–Rezeptoren unterscheidet.

Tabelle 3.4 Erwartete Dimerisierung der koexprimierten P2X–Cystein–Mutanten

		P2X ₁		P2X ₂		P2X ₃		P2X ₄	
		K	F	K	F	K	F	K	F
P2X ₁	K	–	+	–	+ ^{2,3}	–	– ²	–	– ⁴
	F		–	– ^{2,3}	–	– ²	–	– ⁴	–
P2X ₂	K			–	+	–	– ^{1,2}	–	–
	F				–	– ^{1,2}	–	–	–
P2X ₃	K					–	–/+	–	–
	F						–	–	–
P2X ₄	K							–	–/+
	F								–

Übersicht der bisher beschrieben und der in dieser Arbeit bestätigten heteromeren P2X–Rezeptorkombinationen. Aufgeführt sind alle getesteten Kombinationen der Cystein–Mutanten (Phenylalanin mit F und Lysin mit K abgekürzt), wobei beobachtete Dimerisierung infolge der Heteromerisierung mit einem Plus, nicht beobachtete mit einem Minus gekennzeichnet sind. Kombinationen für die keine Dimerisierung erwartet wurde sind grau hinterlegt. Grün hinterlegt sind die in dieser Arbeit gezeigten quervernetzten Rezeptoren. Orange hinterlegt sind erwartete, aber in dieser Arbeit nicht bestätigte Heteromere. Publikationen zu den jeweiligen Kombinationen sind entsprechend: ¹(Lewis *et al.* 1995; Radford *et al.* 1997; Spelta *et al.* 2002; Jiang *et al.* 2003; Wilkinson *et al.* 2006), ²(Torres *et al.* 1999a), ³(Brown *et al.* 2002; Aschrafi *et al.* 2004; Calvert und Evans 2004), ⁴(Le *et al.* 1999; Nicke *et al.* 2005).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden acht Einzel-Substitutionen von potenziell an der ATP-Bindung beteiligten Aminosäuren durch Cystein am P2X₁-Rezeptor erstellt. Durch Koexpression dieser Rezeptormutanten konnte eine spezifische und spontane Quervernetzung benachbarter K68C- und F291C- mutierter P2X₁-Untereinheiten zum Dimer in nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gelen gezeigt werden. Selektive Oberflächenmarkierung und BN-PAGE-Gele zeigten außerdem, dass die Rezeptormutanten trimere Komplexe ausbilden und in die Plasmamembran eingebaut werden. Demnach kann artifizielle Aggregation oder Missfaltung als Ursache für die Dimerisierung ausgeschlossen werden. Entsprechend einer geringen Distanz zwischen den beiden Cystein-substitutionen benachbarter Untereinheiten, bildet der P2X₁ K68C/F291C-doppelt mutierte Rezeptor Trimere in nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gelen aus. Elektrophysiologisch konnte die effiziente und reversible Disulfidbrückenbildung zwischen den Untereinheiten durch entsprechende Mutationen in einer nicht-desensibilisierenden P2X_{2,1}-Chimäre bestätigt werden. Die Gegenwart von ATP verhinderte die Ausbildung der Disulfidbrücke in biochemischen und elektrophysiologischen Experimenten.

Koexpression der homologen Mutationen (K69C und F289C) des P2X₂-Rezeptors zeigte eine spontane Quervernetzung von zwei benachbarten Untereinheiten. Quervernetzungen entsprechender Mutationen der P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren wurden durch Anwendung einer quervernetzenden Substanz verstärkt, die ca. 5 Å überbrückt. Die paarweise Kombination der P2X₁-, P2X₂-, P2X₃- und P2X₄-Rezeptormutanten zeigte selbst nach Anwendung quervernetzender Substanzen nur in der Kombination von P2X₁-K68C und P2X₂-F289C eine Quervernetzung von zwei unterschiedlichen Untereinheiten in einem heteromeren Rezeptor. Dieses quervernetzte Heteromer konnte in elektrophysiologischen Messungen durch Reduktion der Disulfidbrücke spezifisch funktionell aktiviert werden.

Da die Aminosäuren K68 und F291 des P2X₁-Rezeptors potenziell an der Agonisten-Bindung beteiligt sind, wird gefolgert, dass sich die ATP-Bindungsregion der P2X-Rezeptoren wahrscheinlich an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten befindet. Die Distanz zwischen den beiden Cystein-Mutationen ist in P2X₃- und P2X₄- wahrscheinlich größer als in P2X₁- und P2X₂-Rezeptoren.

4.1 Beteiligung der ausgewählten Aminosäuren an der ATP-Bindung

Die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit basiert auf der Annahme, dass die ausgewählten Aminosäuren an der ATP-Bindung beteiligt sind. Bisherige Untersuchungen führten zur Identifizierung von Aminosäuren der P2X-Rezeptoren, die an der Agonisten-Bindung beteiligt sein könnten, basierend auf Veränderungen der ATP-Effektivität durch Alanin-Substitution (Kapitel 1.2.3). Diese Verschiebung kann jedoch eine veränderte Affinität der Bindungsstelle für den Agonisten oder einen veränderten Öffnungsmechanismus (Gating) bzw. eine verringerte Effizienz des Übergangs zwischen geschlossenem und offenem Kanal bedeuten (Colquhoun 1998). Eine eindeutige Unterscheidung zwischen Bindungseigenschaften und Öffnungsverhalten kann durch statistische Untersuchung der zeitlichen Verteilung zwischen offenem und geschlossenem Zustand in Einzelkanalmessungen erreicht werden (Colquhoun 1998). Bisher wurde jedoch nur eine Einzelkanaluntersuchung an zwei der möglichen Agonisten-Bindungsmutanten publiziert (Cao *et al.* 2007), so dass im Folgenden die Beteiligung der verwendeten Aminosäuren an der Agonisten-Bindung auf Grundlage der funktionellen Ergebnisse dieser Arbeit und aktueller Literatur diskutiert wird.

4.1.1 Cystein-Mutanten (K68, K70, K309) mit den stärksten Effekten nahe der ersten und zweiten Transmembrandomäne

Die K68C-, K70- und K309C-Mutanten der P2X_{2,1}-Chimäre zeigten mit einem EC₅₀-Wert für ATP von 204±0,44 μM, 28±4 μM und 23,1±1 μM ca. 70.000fach, 8.000fach und 7.000fach erniedrigte scheinbare Affinitäten für ATP (Kapitel 3.3.4). Somit hatten diese Cystein-Mutanten im Vergleich zu den übrigen Mutanten den höchsten Einfluss auf die ATP-Effektivität, was auf eine wesentliche Beteiligung an der Agonisten-Bindung hindeuten könnte.

Die Beteiligung von K68 wird unterstützt durch die Beeinträchtigung der Rezeptorfunktion von Alanin-substituierten P2X₁-, P2X₂-, P2X₃-, P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren, in denen K68-homologe Aminosäuren substituiert wurden, was zu nicht-aktivierbaren Rezeptoren führte (Wilkinson *et al.* 2006). Ähnliche Ergebnisse ergaben Alanin-substituierte P2X₄-Rezeptoren, und es wurde postuliert, dass die homologen Aminosäuren K67 und K313 (analog zu P2X₁-K68, K309) im P2X₄-Rezeptor für die Agonisten-Bindung oder die Kanalöffnung wichtig sind (Zemkova *et al.* 2007). Diese Annahme wird durch Studien unterstützt, die zeigten, dass die Alanin- und Cystein-Mutationen der Aminosäuren K68, K70 und K309 des P2X₁- und P2X₂-Rezeptors einen großen

Einfluss auf den EC_{50} -Wert für ATP haben bzw. den zeitlichen Verlauf der Stromantwort stark beeinflussen (Ennion *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2000; Roberts und Evans 2004; Kapitel 1.2.3 auf Seite 15). Ein deutlicher Hinweis auf die Lokalisation der Aminosäuren K68 und K70 in der Nähe der ATP-Bindungsstelle ergab sich weiterhin aus der verringerten Bindung von MTS-Substanzen an K68 benachbarte Aminosäuren in der Gegenwart von ATP (Jiang *et al.* 2000). Darüber hinaus zeigt der größere Einfluss der K70C-Mutante auf den EC_{50} -Wert für ATP (ca. 8.000fach erhöht, siehe Kapitel 3.3.4) im Vergleich zu der K70A-Mutante (ca. fünffach erhöht; Ennion *et al.* 2000), dass an dieser Position des Rezeptors die geringfügig negative Partialladung des Schwefelatoms, aufgrund der Differenz der Elektronegativität von Schwefel (2,5) und Wasserstoff (2,0), der Cystein-Seitenkette weniger toleriert wird als die kurze ungeladene Seitenkette eines Alanin. Demnach könnte die Aminosäure K70 an der Koordination der ATP-Phosphatgruppe beteiligt sein und die Komplexierung der negativ geladenen Pyrophosphatkette des ATP durch die Cystein-Mutation erschwert werden.

Weitere Hinweise auf Beteiligung an der ATP-Bindung ergeben sich aus Zugänglichkeitsstudien Cystein-substituierter $P2X_1$ -, $P2X_2$ - und $P2X_4$ -Rezeptoren mit 2-Azido-ATP oder MTS-Substanzen (Roberts und Evans 2007; Roberts *et al.* 2008). Die Cystein-Mutationen der Aminosäuren K68, -K70 und -K309 in $P2X_1$ resultierten in einer reduzierten Markierung mit radioaktivem 2-Azido-ATP (Roberts und Evans 2007) und eine stark reduzierte Bindung von MTS-Biotin an diese Cystein-Mutanten in Anwesenheit von ATP (Roberts und Evans 2007). Ferner wurde gezeigt, dass die ATP-Stromantworten nach Anwendung geladener MTS-Substanzen an Mutanten entsprechender Aminosäuren des $P2X_2$ - und $P2X_4$ -Rezeptors stark beeinträchtigt sind (Roberts *et al.* 2008). Demnach sind die entsprechenden Aminosäuren an der ATP-Bindungstasche der $P2X_1$ -, $P2X_2$ - und $P2X_4$ -Rezeptoren beteiligt (Roberts und Evans 2007; Roberts *et al.* 2008).

Die Wirkung der MTS-Substanzen an Cystein-substituierten Rezeptoren lässt Rückschlüsse auf die Funktion einer positiven, negativen oder apolaren Ladung an der Position der ersetzten Aminosäuren zu. In diesen Studien konnten übereinstimmende funktionelle Veränderungen nach Anwendung der MTS-Substanzen für die Cystein-Substitutionen der $P2X_1$ -, $P2X_2$ - und $P2X_4$ -Rezeptoren gezeigt werden (Roberts und Evans 2007; Roberts *et al.* 2008). Dennoch bedeutet die Zugänglichkeit eines substituierten Cysteins oder eine veränderte Aktivierbarkeit durch ATP nach Änderung der Ladung an dieser Position nicht zwangsläufig eine Beteiligung an der Agonisten-

Bindung, denn die Ersetzung einer Aminosäure könnte z. B. einen Einfluss auf elektrostatische Interaktionen innerhalb des Moleküls haben oder strukturelle Veränderungen bewirken.

Wie bereits erwähnt, kann eine Differenzierung zwischen Bindungs- oder Öffnungs-Funktion einer Aminosäure nur durch Einzelkanalstudien von Einzelpunkt-mutierten Rezeptoren erfolgen (Colquhoun 1998). Eine derartige Studie über Einzelkanalmessungen einer konstitutiv aktiven P2X₂-Rezeptormutante konnte eine ATP-Bindungsfunktion der Aminosäure K69 in P2X₂-Rezeptoren bestätigen und einen Einfluss der Aminosäure K308 des P2X₂-Rezeptors auf das Öffnungsverhalten zeigen (Cao *et al.* 2007; siehe folgendes Kapitel).

Bisher deuten alle Hinweise auf eine Beteiligung der Aminosäure K68 des P2X₁-Rezeptors und homologer Aminosäuren weiterer P2X-Subtypen an der ATP-Bindung hin. Die Aminosäure K70 hat in P2X₁-, P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren einen ähnlich starken Einfluss auf die ATP-Effektivität. Da zusätzlich zu der verfügbaren Literatur die hier untersuchten Cystein-Mutanten dieser Aminosäuren einen großen Einfluss auf die ATP-Effektivität zeigten, wird die Annahme einer direkten Beteiligung der Aminosäuren K68 und K70 an der Agonisten-Bindung in P2X-Rezeptoren unterstützt.

4.1.1.1 Wahrscheinliche Beteiligung der Aminosäure K309 an der Kanalöffnung

Wie bereits im vorausgegangenem Kapitel angeführt, zeigt die K309C-Mutation der P2X₂₋₁-Chimäre mit einem EC₅₀-Wert für ATP von 23,1±1 μM eine ca. 7.000fach erniedrigte ATP-Effektivität (siehe Kapitel 3.3.4). Mehrere Veröffentlichungen postulieren eine ATP-Bindungsfunktion dieser Aminosäure (Ennion *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2000; Worthington *et al.* 2002; Roberts und Evans 2004, 2007; Roberts *et al.* 2008). Dem entgegen zeigte eine funktionelle Studie von P2X₄-Reptormutanten des Bereichs K313 bis I333 eine Funktion dieses Bereiches als Signalübertragungsmodul zwischen der Liganden-Bindungsdomäne und der Kanalöffnung (Yan *et al.* 2006). Es wurden die Kinetiken der Aktivierung, Deaktivierung und der Desensibilisierung von ladungsneutralen oder elektrogenen Substitutionen des Rezeptors untersucht (Yan *et al.* 2006). Analog zu den Alanin- oder Cystein-Substitutionsstudien und der Anwendung von MTS-Substanzen können hierbei Hinweise auf die Bedeutung der Aminosäuren für die Funktion des Rezeptors erhalten werden, wobei nur bedingt zwischen einer Beteiligung an der Agonisten-Bindung oder dem Öffnungsverhalten unterschieden werden kann.

Deutliche Hinweise auf die Beteiligung der Aminosäure K308 (Homolog zu K313 im P2X₄-Rezeptor) an dem Kanalöffnungsverhalten des P2X₂-Rezeptor leiten sich aus einer Einzelkanalstudie ab (Cao *et al.* 2007). In dieser Studie wurde die spontane Öffnung des P2X₂-Rezeptors durch eine T339S-Mutation genutzt. Dadurch wird der geschlossene Zustand des Rezeptors destabilisiert, so dass es zu spontaner Kanalöffnung auch ohne gebundenen Agonisten kommt. Zusätzlich wurden zwei Mutationen von wahrscheinlich an der Agonisten-Bindung beteiligten Aminosäuren (K69A und K308A) in diesen Rezeptor eingebracht und Einzelkanalmessungen sowie Ganz-Zell-Ableitungen mit der „Patch-Clamp“-Technik durchgeführt (Cao *et al.* 2007). Die P2X₂ K69A/T339S-Mutante zeigte keine Veränderung der Frequenz der spontanen Öffnungen im Vergleich zu der P2X₂ T339S-Mutante. Demnach hat die Aminosäure K69 einen Einfluss auf die Agonisten-Bindung, die in der konstitutiv aktiven Rezeptormutante zur Öffnung nicht notwendig ist (Cao *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu zeigte die P2X₂ K308A/T339S-Mutante keine spontane Öffnung mehr. Daraus wurde gefolgert, dass die Aminosäure K308 die spontane Öffnung durch Beeinträchtigung der zur Öffnung nötigen Konformationsänderung unterbindet, dass also die Aminosäure K308 an dem Öffnungsvorgang selbst und nicht an der Agonisten-Bindung beteiligt ist (Cao *et al.* 2007). Diese Hinweise wurden durch die Aktivierung der P2X₂ K69A/T339S- und P2X₂ T339S-, nicht aber der P2X₂ K308A/T339S-, Rezeptormutanten durch den Antagonisten Suramin unterstützt (Cao *et al.* 2007).

Es gibt zwar Indizien, die eine Beteiligung der Aminosäure P2X₁-K309 (P2X₂-K308 bzw. P2X₄-K313) an der Agonisten-Bindung unterstützen (Ennion *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2000; Worthington *et al.* 2002; Roberts und Evans 2004, 2007; Roberts *et al.* 2008), aber die eindeutigsten Hinweise resultieren aus den Einzelkanalmessungen der konstitutiv aktiven P2X₂-Rezeptormutanten und weisen auf eine Beteiligung an dem Öffnungsverhalten des Rezeptors hin (Cao *et al.* 2007). Wegen der hohen Homologie dieses Bereiches in allen P2X-Subtypen (Ennion *et al.* 2000) und einer ähnlichen Einschränkung der Funktionsweise von Mutationen homologer Aminosäuren in P2X₂-, P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren (Wilkinson *et al.* 2006; Zemkova *et al.* 2007) muss angenommen werden, dass diese Aminosäure auch in anderen Subtypen hauptsächlich - aber nicht unbedingt ausschließlich - an dem Öffnungsverhalten des P2X-Kanals beteiligt ist.

4.1.2 Bedeutung der konservierten NFR/NFT-Motive

Aromatische Aminosäuren sind beteiligt an der Bindung von Adenin-Nukleotiden in vielen ATP-bindenden Proteinen (Tanner *et al.* 2003). In einer 5'-Nukleotidase z. B. wird der Adeninring zwischen zwei Phenylalaninen komplexiert (Knofel und Strater 2001). Insbesondere wurde für Synapsin I, einem Protein in der Membran von kleinen synaptischen Vesikeln, das an der Neurotransmitter-Ausschüttung beteiligt ist, die Koordination des Adeninrings von einem NWK-Motiv gezeigt (Brautigam *et al.* 2004). Alanin-Substitutionen der Aminosäuren der konservierten NFT- und NFR-Motive in P2X₁-Rezeptoren beeinträchtigten die ATP-Effektivität, so dass eine ähnliche Bindung der Adenin-Ringstruktur zwischen diesen Motiven vorgeschlagen wurde (Roberts und Evans 2004; Vial *et al.* 2004). In dieser Arbeit wurden deshalb drei Aminosäuren dieser Motive (P2X₁-F185, F291 und R292) mit Cysteinen substituiert.

Die F185C-, F291C und R292C-Mutation der P2X₂₋₁-Chimäre zeigten mit einer ~63fachen, ~40fachen und ~1200fachen Erhöhung des EC₅₀-Wertes für ATP unterschiedlichen Einfluss auf die ATP-Effektivität. Ein vergleichbar geringer Einfluss auf den EC₅₀-Wert wurde bei der F291-Cysteinmutation des P2X₁-Rezeptors beobachtet (Roberts und Evans 2007). Die F291-Alaninmutante des P2X₁-Rezeptors ergab im Gegensatz dazu einen 140fach erhöhten EC₅₀-Wert für ATP (Roberts und Evans 2004). Ähnliche Ergebnisse wurden für Mutationen der Aminosäure F185 des P2X₁-Rezeptors erhalten (Roberts und Evans 2004). Demnach erscheint die geringe negative Partialladung des Schwefelatoms der Cystein-Seitenkette an diesen Positionen geringfügig vorteilhafter für die Funktion des P2X-Rezeptors zu sein als die kurze Seitenkette des Alanins. Möglicherweise unterstützt die Interaktion der negativen Partialladung mit dem Kation- π -System des Adeninrings die Agonistenbindung.

Weitere Hinweise auf die Agonisten-Bindung ergaben sich aus der reduzierten Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung mit radioaktivem 2-Azido-ATP an N290C-, F291C-, und R292C-Mutanten des P2X₁-Rezeptors (Roberts und Evans 2007). Die MTS-Biotin-Bindung an diese Mutanten konnte in Gegenwart von ATP verringert und in Gegenwart von Apyrase erhöht werden (Roberts und Evans 2007). Darüber hinaus wurde an den homologen P2X₁ N290C- und R292C-Mutanten der P2X₁-, P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren die ATP-Effektivität durch Anwendung positiv und negativ geladener MTS-Substanzen zusätzlich reduziert; aber an der F291C-Mutante erhöhte die Anwendung positiv oder negativ geladener MTS-Substanzen die ATP-Effektivität wieder bis auf das Niveau des Wildtyps (Roberts und Evans 2007; Roberts *et al.* 2008).

Roberts und Kollegen (2007) interpretieren dieses Ergebnis so, dass die Aminosäuren N290–F291–R292 an der Agonisten–Bindung beteiligt sind und bei Agonisten–Bindung konformellen Änderungen unterliegen (Roberts und Evans 2007; Roberts *et al.* 2008).

Ein Hinweis gegen die direkte Beteiligung der Aminosäure F291 an der Agonisten–Bindung ergibt sich aus der geringen Veränderung des EC_{50} –Wertes einer P2X₄ F294A– bzw. P2X₄ F294W–Mutante (Zemkova *et al.* 2007). Demnach hat diese Position nur einen geringen Einfluss auf die Agonisten–Bindung im P2X₄–Rezeptor (Zemkova *et al.* 2007). Diese Hinweise gegen eine Beteiligung der Aminosäure F294 an der Agonisten–Bindung werden durch die zusätzlichen Ergebnisse von Roberts und Kollegen (2008) und der vorliegenden Arbeit relativiert. Eine Cystein–Mutation der Aminosäure F291 in der P2X₂₋₁–Chimäre (Kapitel 3.3.4) und in den P2X₂– und P2X₄–Rezeptoren (Zemkova *et al.* 2007; Roberts *et al.* 2008) beeinträchtigt den EC_{50} –Wert für ATP nur gering, aber die Anwendung der MTS–Substanzen auf die einzelnen Cystein–Mutanten des NFR–Motivs unterstützen die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Agonisten–Bindung (Roberts *et al.* 2008).

Die Hinweise gegen eine Beteiligung an der Agonisten–Bindung der Aminosäure F291 werden durch mehrere Ergebnisse relativiert. Darüber hinaus kann die Aminosäure F291 mit K68 nach Cystein–Substitution in P2X₁– und P2X₂–Rezeptoren quervernetzt werden (Kapitel 3.4.1 und 3.5), so dass sich die Aminosäure F291 in unmittelbarer Nähe zur Aminosäure K68, die an der Agonisten–Bindung beteiligt ist, befinden muss. Alle Hinweise zusammengenommen kann davon ausgegangen werden, dass das Aminosäurenmotiv N290–F291–R292 wahrscheinlich direkt an der Agonisten–Bindung beteiligt ist.

4.1.2.1 Beteiligung der Aminosäure F185 an der Agonisten–Bindung

Der erhaltene EC_{50} –Wert für ATP der P2X₂₋₁ F185C–Chimäre von $0,21 \pm 0,004 \mu\text{M}$ ist ca. 63fach erniedrigt im Vergleich zum Wildtyp. Es ist somit eine der Mutanten mit dem geringsten Einfluss auf die ATP–Effektivität, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Eine Substitutionsstudie der homologen Aminosäure in P2X₄–Rezeptoren zeigte einen ähnlich geringen Einfluss auf die ATP–Effektivität (Zemkova *et al.* 2007), der durch eine P2X₄ F185W–Mutante vollständig aufgehoben wurde (Zemkova *et al.* 2007). Obwohl der Einfluss auf die ATP–Effektivität gering war, konnte eine hydrophobe

Aminosäure an dieser Position die Funktionalität des Rezeptors wiederherstellen, so dass die Bindung des ATP-Adeninrings in P2X₄-Rezeptoren angenommen wurde (Zemkova *et al.* 2007). Dies entspricht der bereits zitierten Aussage von Roberts und Evans (2004), die davon ausgehen, dass der ATP-Adeninring zwischen F185 und F291 des P2X₁-Rezeptors komplexiert wird (Roberts und Evans 2004). Eine neuere Studie über Cysteinsubstitutionen in P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren vor und nach Anwendung von MTS-Substanzen konnte nicht zwischen einem Einfluss auf die Agonisten-Bindung oder die Kanalöffnung dieser und der benachbarten Aminosäure T186 unterscheiden (Roberts *et al.* 2008). Somit kann keine abschließende Aussage über die Beteiligung dieser Aminosäure an der Agonisten-Bindung getroffen werden.

4.1.3 Ist die Aminosäure K190 an der Agonisten-Bindung beteiligt?

Der EC₅₀-Wert von ATP an der P2X₂₋₁ K190C-Chimärenmutante ist mit 0,67 μ M ca. 60fach erhöht im Vergleich zu der unmutierten P2X₂₋₁-Chimäre. Die entsprechende Mutation des P2X₁-Rezeptors zeigt mit einem ATP-EC₅₀-Wert von \sim 31 μ M eine nur ca. 30fache Erhöhung. Das entspricht in etwa auch den Ergebnissen von Ennion und Kollegen (2000) mit einem fünffach erniedrigten ATP-EC₅₀-Wert von \sim 4,3 μ M für eine P2X₁ K190A-Mutante. Interessanterweise wies die homologe P2X₂ K188A-Mutante einen EC₅₀-Wert für ATP über 1 mM (Jiang *et al.* 2000), und die P2X₄ K190A-Mutante einen EC₅₀-Wert über 5 mM auf (Yan *et al.* 2005). In beiden Studien war eine Arginin-Mutation dieser Aminosäure in der Lage, die ATP-Effektivität wiederherzustellen (ATP-EC₅₀-Wert: P2X₂ K188R-Mutante \sim 5 μ M und P2X₄ K190R-Mutante \sim 7 μ M; Tabelle 3.2; Jiang *et al.* 2000; Yan *et al.* 2005). Daraus resultierte der Vorschlag, dass die Aminosäure K188 (bzw. K190 in P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren) möglicherweise an der Bindung der ATP-Phosphatkette beteiligt sein könnte (Jiang *et al.* 2000; Yan *et al.* 2005). Der geringe Einfluss auf die ATP-Effektivität der P2X₂₋₁ K190C-Mutante, die in dieser Arbeit aufgezeigt wurde (Kapitel 3.3.4), schließt dies eher aus, da die geringe negative Partialladung des Schwefelatoms der Cystein-Seitenkette eher eine Abstoßung der Phosphatgruppe bewirken und demnach den ATP-EC₅₀-Wert erniedrigen sollte. Eine Alanin-Substitution an dieser Position des P2X₁-Rezeptors zeigte ebenso nahezu keinen Einfluss auf die ATP-Effektivität (Ennion *et al.* 2000), so dass keine bedeutende Beteiligung an der Agonisten-Bindung, zumindest in P2X₁-Rezeptoren, angenommen wird.

4.1.4 Die Aminosäure R305 scheint wichtig für die Tertiärstruktur des Rezeptors zu sein

Die R305–Cysteinersetzung in der P2X₂₋₁–Chimäre besaß einen stetig anwachsenden Einwärtsstrom, so dass keine zuverlässige Aussage über die ATP–Effektivität des Rezeptors getroffen bzw. kein EC₅₀–Wert ermittelt werden konnte (Kapitel 3.3.4). Eine kürzlich erschienenen Studie zeigte eine stark reduzierte Oberflächenexpression und minimale Stromantworten für eine R305C–Cysteinmutation in P2X₁–Rezeptoren (Roberts und Evans 2007). Eine entsprechende R305A–Mutante des P2X₁–Rezeptors hatte kaum Einfluss auf die ATP–Effektivität im Vergleich zum wt–P2X₁–Rezeptor, so dass keine besondere Funktion dieser Aminosäure vorgeschlagen wurde (Ennion *et al.* 2000). Im Gegensatz dazu hatte die analoge P2X₂R304A–Mutante einen ATP–EC₅₀–Wert größer als 1 mM, und eine P2X₂R304K–Mutante stellte sich mit einer ATP–Effektivität im Bereich des wt–P2X₂–Rezeptors dar (Jiang *et al.* 2000). Demnach wurde eine Beteiligung an der ATP–Phosphatbindung vorgeschlagen (Jiang *et al.* 2000).

Die P2X₁R305C–Mutante war in der vorliegenden Arbeit mittels TEVC mit einem ca. 400fach erhöhten EC₅₀–Wert messbar. Aber die geringe Funktionalität der P2X₂₋₁R305C–Mutante und die geringe Oberflächenexpression der P2X₁R305C–Mutante in HEK–Zellen (Roberts und Evans 2007) lässt den Schluss zu, dass es sich bei R305 im P2X₁–Rezeptor wahrscheinlich um eine für die korrekte Faltung notwendige Aminosäure handelt deren Mutation die Prozessierung und Oberflächenverfügbarkeit des Rezeptors einschränkt.

4.1.5 Zusammenfassung der Aminosäuren der ATP–Bindung

Zusammengenommen entsprachen die elektrophysiologischen Daten den Hinweisen verschiedener Studien, so dass eine Beteiligung an der Agonisten–Bindung der verwendeten Aminosäuren K68, K70, F185, F291 und R292 des P2X₁–Rezeptors bzw. der P2X₂₋₁–Chimäre angenommen werden kann. Dem entgegen unterstützen die Daten der Aminosäuremutationen K309C des P2X₂₋₁–Rezeptors zwar eine Beteiligung an der ATP–Bindung, aber kürzlich erschienenen Studien des P2X₂– und P2X₄–Rezeptors zufolge ist diese Aminosäure an dem Öffnungsverhalten des Rezeptors beteiligt (Yan *et al.* 2006; Cao *et al.* 2007; Zemkova *et al.* 2007). Die Aminosäure R305 hingegen ist wahrscheinlich für die Faltung des Rezeptors essentiell, so dass die Mutation dieser Aminosäure keine Aussage über die Agonisten–Bindungsbeteiligung zulässt. Die Mutationen der Aminosäuren K190 der P2X₂₋₁–Chimäre zeigten kaum einen Einfluss auf die

ATP-Effektivität. Obwohl Hinweise auf die Beteiligung an der Agonisten-Bindung homologer Aminosäuren in P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren existieren (Ennion *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2000; Yan *et al.* 2005), wird eine bedeutende Beteiligung von K190 an der Agonisten-Bindung in P2X₁-Rezeptoren nicht angenommen (Zemkova *et al.* 2007).

4.2 Die Agonisten-Bindungstasche wird von der Grenzfläche zweier benachbarter Untereinheiten gebildet

Aufgrund der Literatur und der Ergebnisse dieser Arbeit wird angenommen, dass die Aminosäuren K68 und F291 des P2X₁- und P2X₂-Rezeptors an der Agonisten-Bindung beteiligt sind bzw. dass die Aminosäure F291 sich zumindest nahe der Bindungstasche befindet (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.2). Cystein-Mutation dieser beiden Aminosäuren in P2X₁ und P2X₂-Rezeptoren führten in Koexpressions-Experimenten zu spontan quervernetzten Untereinheiten durch Disulfidbrückenbildung (Kapitel 3.4.1 und 3.5). Die Dimerisierung der koexprimierten Mutanten und die Trimerisierung der Doppelmutanten wurde in der Gegenwart von ATP, jedoch nicht ADP, verhindert (Kapitel 3.4.4). Funktionell wurde das Vorhandensein dieser Quervernetzung durch sehr geringe ATP-induzierte Ströme im oxidierten, sowie die Messung robuster Ströme im reduzierten, Zustand einer P2X₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante bestätigt (Kapitel 3.4.5). Eine nahe liegende Interpretation dieser Befunde ist, dass die ATP-Bindungsstelle sich zwischen zwei benachbarten Untereinheiten befindet, ähnlich wie in den nAChRen (Abbildung 4.3). Eine intramolekulare ATP-Bindungsstelle kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, so dass im Folgenden die inter- oder intramolekulare Lokalisation diskutiert wird.

4.2.1 Strukturelle Voraussetzungen einer Untereinheiten-Disulfidbrücke

Ob eine Agonisten-Bindungsstelle sich an der Grenzfläche zweier oder innerhalb einer Untereinheit befindet, wurde in nAChRen mit Quervernetzungsstudien zwischen Cystein-substituierten Aminosäuren der Agonisten-Bindungsstelle untersucht (Czajkowski *et al.* 1993; Czajkowski und Karlin 1995). Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen setzt voraus, dass sich die zwei Schwefelatome bis auf ca. 1,8 – 2,2 Å annähern können (Creighton 1988; Thangudu *et al.* 2007). Darüber hinaus muss der Winkel zwischen der Disulfidbindung und dem jeweiligen β -Kohlenstoff des Cysteins näherungsweise 103° betragen und der Torsionswinkel zwi-

schen den β -Kohlenstoffatomen beider Cysteine in etwa 90° (rechtsdrehend) oder -90° (linksdrehend) betragen (Creighton 1988; Thangudu *et al.* 2007). Für keine andere Aminosäureninteraktion bestehen solche stringenten Bedingungen (<http://bioinformatics.univ-reunion.fr/analycys/index.htm>; Creighton 1988; Thangudu *et al.* 2007).

Jiang und Kollegen (2003) zeigten, dass die drei P2X-Rezeptoruntereinheiten symmetrisch um eine zentrale Pore in einer „Head-to-Tail“-Orientierung angeordnet sind, so dass sich jeweils die zweite Transmembrandomäne (TMD) einer Untereinheit an die erste TMD der benachbarten Untereinheiten annähert. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den K68C- (18 Aminosäuren von der ersten TMD entfernt) und F291C-Mutanten (42 Aminosäuren von der zweiten TMD entfernt) des P2X₁-Rezeptors wurde in Kapitel 3.4.1 gezeigt. Dies bedeutet eine geringe Distanz und präzise Orientierung dieser Aminosäuren zueinander, so dass K68 und F291, unter der Annahme der zirkulären Anordnung der Untereinheiten, sich auf unterschiedlichen Seiten einer Untereinheit befinden. Im Umkehrschluss bedeutet dies auch, dass die Entfernung zwischen K68 und F291 innerhalb einer Untereinheit zu groß für eine intramolekulare Disulfidbrückenbildung ist und eine direkte Interaktion dieser Aminosäuren bei der intramolekularen Agonisten-Bindung wahrscheinlich nicht besteht. Folglich ist die Koordination eines ATP-Moleküls an der Grenzfläche zwischen zwei Untereinheiten anzunehmen.

4.2.2 Lokalisierung der ATP-Bindungstasche durch Heteromerisierungsstudien

4.2.2.1 Heteromerisierung Alanin-substituierter P2X₂- und P2X₃-Untereinheiten

Einer Lokalisation der ATP-Bindungsstelle an der Untereinheitengrenzfläche würde mit den Beobachtungen einer funktionellen Studie an heteromeren P2X_{2/3}-Rezeptoren übereinstimmen (Wilkinson *et al.* 2006). Die Autoren konnten zeigen, dass nicht funktionelle einzelmutierte (K69A oder K308A), aber nicht entsprechend doppelt mutierte P2X₂-Untereinheiten bei Koexpression mit wt-P2X₃-Untereinheiten funktionelle heteromere Rezeptoren bilden. Der resultierende heteromere Rezeptor besitzt eine ATP-Effektivität, die vergleichbar mit dem wt-P2X_{2/3}-Rezeptor ist. In entgegengesetzten Experimenten konnten die entsprechenden einzeln mutierten P2X₃-Rezeptoren jedoch nicht durch Koexpression mit einer wt-P2X₂-Untereinheit funktionelle Rezeptoren bilden (Wilkinson *et al.* 2006).

Ausgehend von der Annahme, dass beide Aminosäuren an der Agonisten-Bindung beteiligt sind (Ennion *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2000; Roberts und Evans 2004, 2007) und dass die heteromeren Rezeptoren aus zwei $P2X_3$ - und einer $P2X_2$ -Untereinheit aufgebaut sind (Jiang *et al.* 2003), schlussfolgerten die Autoren, dass der heteromere Rezeptor funktionell ist, wenn zwei nicht-mutierte intermolekulare Agonisten-Bindungsstellen im Rezeptor vorhanden sind (Abbildung 4.1 A; Wilkinson *et al.* 2006). In dem heterotrimeren Rezeptor bestehen diese nicht-mutierte Bindungsstellen zwischen den zwei wt- $P2X_3$ - und zwischen der wt- $P2X_3$ - und der nicht betroffenen Seite der einzelmutierten $P2X_2$ -Untereinheit (Abbildung 4.1 A; Wilkinson *et al.* 2006). In der umgekehrten Kombination, unter der Annahme der $(P2X_2)_1 : (P2X_3)_2$ Stöchiometrie, sollte nur eine intermolekulare nicht-mutierte Bindungsstelle zwischen der wt- $P2X_2$ - und der nicht-mutierte Seite der einzelmutierten $P2X_3$ -Untereinheit vorhanden sein (Abbildung 4.1 B; Wilkinson *et al.* 2006).

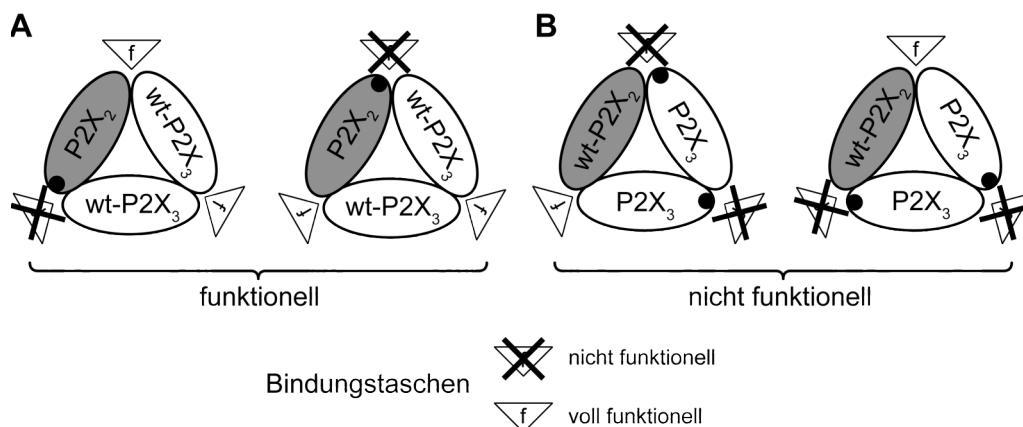


Abbildung 4.1 Theoretische heteromere Rezeptoren bei Koexpression von $P2X_2$ - und $P2X_3$ -Mutanten. Darstellung der heteromeren Rezeptoren mit angedeuteten funktionellen und nicht-funktionellen, einzeln mutierten ATP-Bindungsstellen an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten. **A**, Kombination der $P2X_2$ K69A- und K308A-Mutanten mit wt- $P2X_3$ -Rezeptoren. Wahrscheinlich funktionell, weil zwei nicht-mutierte Bindungsstellen je heteromeren Rezeptor vorhanden sind. **B**, Kombination der wt- $P2X_2$ -Rezeptoren mit je $P2X_3$ K63A- und K299A-Mutanten. Wahrscheinlich nicht funktionell, weil nur eine nicht-mutierte Bindungsstelle pro heteromeren Rezeptor resultiert. Abbildung nach Wilkinson *et al.* (2006).

4.2.2.2 Assemblierung Cystein-substituierter $P2X_{2-1}$ -Untereinheiten

In dieser Studie wurden analoge funktionelle Studien mit Cysteinsubstitutionen homologer Aminosäuren (K68C/K309C) in der $P2X_{2-1}$ -Chimäre durchgeführt (Kapitel 3.4.6, Seite 67). Im Gegensatz zu den einzeln mutierten Rezeptoren ergab die doppelt mutierte Chimäre nicht funktionelle Rezeptoren. Dies deutet darauf hin, dass nur eine Mutation der Aminosäuren K68 und K309 je funktioneller Bindungsstelle toleriert wird.

Die Koexpression der P2X₂₋₁ K68C/K309C–Doppelmutante mit der unmutierten P2X₂₋₁–Chimäre zeigte nach ATP–Applikation einen Strom des homomeren unmutierten P2X₂₋₁–Rezeptors und eine zusätzliche Komponente, die wahrscheinlich von einem Rezeptor, gebildet aus einer doppelt mutierten und zwei unmutierten P2X₂₋₁–Untereinheiten, verursacht wurde (Abbildung 3.16). Der Unterschied zu der Studie von Wilkinson und Kollegen (2006) besteht in der Messbarkeit des Stromanteils des heteromeren Rezeptors. Diese zusätzliche, schnell inaktivierende Komponente konnte isoliert von dem langsam inaktivierenden Stromanteil der unmutierten P2X₂₋₁–Chimäre, die bei einer ATP–Konzentration von 100 nM bereits gesättigt ist, gemessen und ein EC₅₀–Wert für ATP dieses heteromeren Rezeptors mit 1,7±0,1 μM bestimmt werden (Kapitel 3.4.6). Unter der Annahme, dass wenigstens eines dieser beiden Lysine an der Untereinheiten–Grenzfläche notwendig ist, um die Kanalöffnung zu induzieren (Kapitel 3.4.6 und Abbildung 4.2), können heteromere Rezeptoren mit zwei unmutierten Untereinheiten und einer doppelt mutierten Untereinheit drei funktionelle Grenzflächen ausbilden (Abbildung 4.2 C). Dagegen würden zwei funktionelle Grenzflächen in heteromeren Rezeptoren mit zwei doppelt–mutierten Untereinheiten gebildet werden (Abbildung 4.2 B).

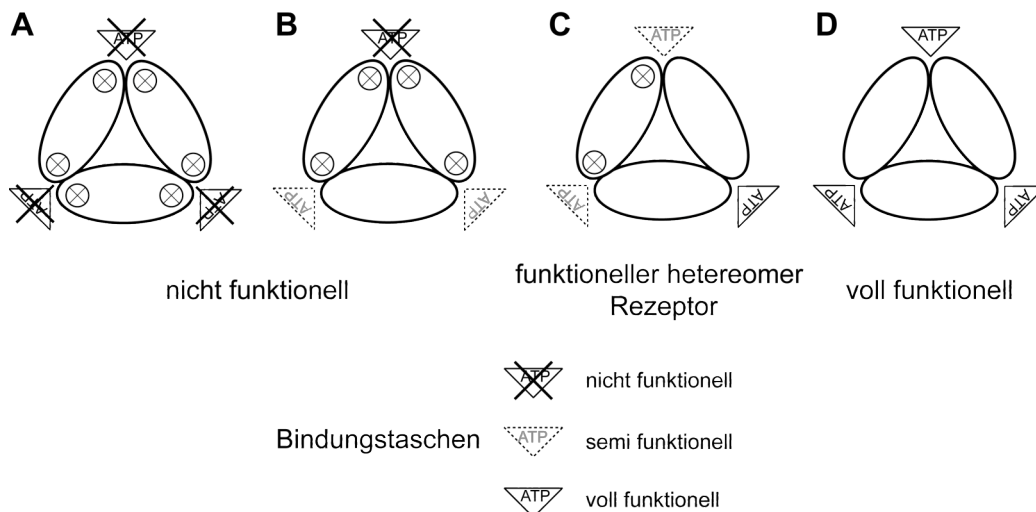


Abbildung 4.2 Theoretische Rezeptorpopulationen bei Koexpression von doppelt- und nicht-mutierten Untereinheiten. Darstellung der heteromeren Rezeptoren mit angedeuteten ATP–Bindungsstellen an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten. **A** und **B**, wahrscheinlich nicht funktionell, weil in Koexpressionsstudien nur eine heteromere Rezeptorpopulation beobachtet wurde. **C**, Rezeptor mit einer voll funktionellen und zwei „halbfunktionellen“ Bindungsstellen. **D**, voll funktioneller homomere Rezeptor.

Die Annahme, dass K68 und K309 verschiedener Untereinheiten an der Untereinheiten–Grenzfläche an der Agonisten–Bindung und/oder Kanalöffnung beteiligt sind, trifft zu, wenn drei ATP–Moleküle zur Kanalöffnung notwendig sind bzw. drei funktionelle Bindungsstellen im Rezeptor vorhanden sein müssen (Bean *et al.* 1990; Ding und

Sachs 1999b). Dies kann aber nicht unbedingt angenommen werden. Deshalb ist die Information über die Anzahl der zur Öffnung der P2X-Kanäle notwendigen ATP-Moleküle kritisch für die Interpretation dieser Daten.

4.2.2.3 Anzahl der zur Kanalöffnung notwendigen ATP-Moleküle

Es gibt zwei allgemeine Modellvorstellungen zur Beschreibung der Interaktion zwischen Ligandenbindung und Kanalöffnung. Dem „sequentiellen“ oder Koshland-Nemethy-Filmer- (KNF-) Modell zufolge (Koshland *et al.* 1959; Koshland *et al.* 1966), erfolgt die Kanalöffnung erst nach der Besetzung aller Bindungsstellen. Dabei erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für die Agonistenbindung an unligandierte Untereinheiten abhängig von der Anzahl bereits ligandierter Untereinheiten (Koshland *et al.* 1966). Unter dieser Annahme würde die oben beschriebene Interpretation der Ergebnisse (Kapitel 4.2.2.2) bezüglich der inter-molekulare Bindungstasche zutreffen.

Das zweite Modell von Monod, Wyman und Changeux (MWC-Modell; Monod *et al.* 1965; Changeux *et al.* 1967) beschreibt die allosterischen Übergänge von Proteinen mehrerer regelmäßig angeordneter Untereinheiten bei Liganden-Bindung unter Einhaltung der Symmetrie des Komplexes (Edelstein *et al.* 1996). In diesem Modell erhöht die Bindung eines Liganden die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen offenem und geschlossenem Zustand, so dass die Öffnung des Kanals in jedem ligandiertem Zustand möglich ist (Monod *et al.* 1965; Changeux *et al.* 1967). Die Aussenseite-Aussen Konfiguration der „Patch-Clamp“ Methode kombiniert mit einer sehr schnellen Agonisten-Applikation von ca. 200 μ s (Moffatt und Hume 2007) ermöglichte es, ratenkinetische Modelle für den P2X₂-Rezeptor zu erstellen und vorherige Modelle (Ding und Sachs 1999a, b) zu erweitern (Moffatt und Hume 2007). Die erhaltenen Daten entsprachen einer Beschreibung der Rezeptorkinetik anhand des MWC-Modells mit drei Liganden-Bindungsstellen (Moffatt und Hume 2007), so dass die Kanalöffnung im nicht vollständig ligandierten Zustand angenommen werden muss.

Wenn die Bindung von zwei Molekülen ausreichend für die Kanalöffnung ist, wäre in heteromeren Komplexen mit einer doppelt- und zwei nicht-mutierten Untereinheiten die Lokalisation der Bindungstasche innerhalb der zwei nicht-mutierten Untereinheiten theoretisch möglich. Dieser heteromere Rezeptor würde sich in funktionellen Untersuchungen ähnlich einem homomeren unmutierten Rezeptor verhalten, da die ATP-Bindung an die doppelt mutierte Untereinheit zur Kanalaktivierung nicht notwendig ist. Ein heteromerer Rezeptor mit zwei doppelt- und einer unmutierten Untereinheit wäre

unter der Annahme von zwei notwendigen ATP-Molekülen zur Kanalaktivierung bei inter- oder intra-molekularer Bindungstasche nicht funktionell, da die doppelt-mutierten Untereinheiten nicht funktionell sind (Kapitel 4.2.2.2; Abbildung 3.16 B).

Die Hypothese der intermolekularen ATP-Bindungstasche wird durch das Auftreten neuer Kanaleigenschaften und demnach neuer Bindungsstellen des heteromeren P2X₂₋₁-Rezeptors (P2X₂₋₁-K68C/K309C koexprimiert mit unmutierter P2X₂₋₁-Chimäre) gestützt. Der ATP-EC₅₀-Wert (1,7 μM) ist zwar höher als der der unmutierten P2X₂₋₁-Chimäre (ATP-EC₅₀-Wert = 3 nM), jedoch geringer als die der jeweiligen homomeren einzelmutierten Rezeptoren (P2X₂₋₁-K68C ATP-EC₅₀-Wert = 204 μM und K309C EC₅₀-Wert = 23 μM), die lediglich „halbfunktionelle“ Bindungstaschen besitzen sollten (Abbildung 3.16). Es erscheint naheliegend, dass wenigstens eine unmutierte Bindungstasche in dem heteromeren Rezeptorkomplex vorhanden ist, die die höhere ATP-Effektivität im Vergleich zu den einzelmutierten Rezeptoren bewirkt. Dies ist der Fall, wenn zwei unmutierte Untereinheiten mit einer doppelt-mutierten Untereinheit assemblieren und die ATP-Bindungstasche an der Untereinheiten-Grenzfläche lokalisiert ist (Kapitel 3.4.6; Abbildung 4.2 C). Allerdings werden bei diesem Modell allosterische Interaktionen bzw. die Kooperativität zwischen den Untereinheiten nicht berücksichtigt. Die Möglichkeit, dass bereits ein gebundenes ATP für die Kanalöffnung ausreichend ist, wurde aus folgenden Gründen ausgeschlossen. (1) Der Hill-Koeffizient des Heteromers der K68C/K309C-Doppelmutante und der unmutierter P2X₂₋₁-Chimäre ist größer als eins (n_H-Wert = 1,5), und (2) Einzelkanalstudien ergaben ein kinetisches Modell, in dem wenigstens zwei Moleküle zur Öffnung notwendig sind (Ding und Sachs 1999b).

Zusammengefasst unterstützen diese Assemblierungsstudien punktmutierter Rezeptoren die Lokalisation der Agonisten-Bindungstasche an der Untereinheitengrenzfläche.

4.2.3 Bekannte Quervernetzungen von P2X-Rezeptoruntereinheiten

Bisher wurden zwei Quervernetzungen benachbarter Untereinheiten in P2X-Rezeptoren beschrieben. In P2X₂-, P2X₃- und heteromeren P2X_{2/3}-Rezeptoren wurden jeweils ein Valin (homolog zu P2X₂-V48) in der ersten und ein Isoleucin (homolog zu P2X₂-I328C) in der zweiten Transmembrandomäne ersetzt. Koexpression dieser Mutanten resultierte in nicht funktionellen Rezeptoren, die nach Reduktion durch DTT-Behandlung aktivierbar wurden (Jiang *et al.* 2003; Spelta *et al.* 2003). Nicht reduzierende SDS-PAGE-Gele zeigten Dimer- bzw. Trimerbanden der koexprimierten Unterein-

heiten bzw. der doppelt mutierten P2X₂-Rezeptoren (Jiang *et al.* 2003). Die Quervernetzung dieser beiden nicht an der Agonisten-Bindung beteiligten Aminosäuren ergab den Vorschlag einer „Head to tail“-Orientierung der P2X-Untereinheiten in einem trimeren Rezeptorkomplex. Darüber hinaus wurde aus diesen Experimenten eine Stöchiometrie von einer P2X₂- und zwei P2X₃-Untereinheiten für den heteromeren P2X_{2/3}-Rezeptor gefolgert (Jiang *et al.* 2003; Spelta *et al.* 2003).

Eine ähnliche Dimerisierung wurde für quervernetzte Cystein-Mutationen von Aminosäuren, die an der Zinkbindung beteiligt sind (H120C und H213C), in P2X₂-Rezeptoren beschrieben (Nagaya *et al.* 2005). Die doppelt mutierten Rezeptoren waren entsprechend nicht funktionell, konnten aber nach Reduktion der Disulfidbrücke aktiviert werden. Da eine Quervernetzung in einer Dimerisierung resultiert, ist davon auszugehen, dass sich diese Bindungsstelle ebenfalls an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten befindet (Nagaya *et al.* 2005). Interessanterweise wurde für zwei Mitglieder der nAChR Familie (den Glycin-Rezeptor und den GABA-Rezeptor Typ A) eine modulatorische Zink-Bindungsstelle analog zu der Agonisten-Bindungsstelle an der Grenzfläche zwischen zwei Untereinheiten aufgezeigt. Im Falle der Glutamat-Rezeptoren wurde die Zink-Bindungsstelle wie auch die Agonisten-Bindungsstelle innerhalb einer Untereinheit beschrieben (Nagaya *et al.* 2005).

4.2.4 Analogien der Agonisten-Bindungstaschen-Lokalisation zu anderen Rezeptorsuperfamilien

Eine Bindungsstelle des Agonisten zwischen zwei Untereinheiten wäre analog zu den nAChRen. Eine eventuelle Ähnlichkeit zwischen den P2X-Rezeptoren und nAChRen wurde in einer Studie von Adriouch und Kollegen (2008) gefunden. In dieser wurde gezeigt, dass in P2X₇-Rezeptoren an das Arginin in Position 125 ein ADP-Ribosylrest übertragen werden kann, was zur dauerhaften Aktivierung des Kanals führt. Diese Aminosäure befindet sich in einem konservierten, sechs quervernetzte Cysteine beinhaltenden Bereich der P2X-Rezeptoren, dessen Struktur von den Autoren als „Finger-ähnlich“ vorgeschlagen wurde und die Bindungstasche ähnlich der C-Schleife der nAChR abdecken könnte (Adriouch *et al.* 2008).

Eine Cystein-reiche „Daumen“-Region wurde auch in trimeren ASIC-Kanälen identifiziert; sie ist vermutlich an der Kopplung zwischen der Protonenbindung und Kanalöffnung beteiligt (Jasti *et al.* 2007). Es besteht zwar keine Homologie zwischen den ASIC- und den P2X-Rezeptoren, aber die trimere Architektur und die Topologie der

Untereinheiten dieser Rezeptoren entspricht dem Aufbau der P2X-Rezeptoren. Sie besteht bei beiden Rezeptor-Klassen aus zwei Transmembrandomänen verbunden über eine große extrazelluläre Domäne mit zehn konservierten, quervernetzten Cysteinen und zwei intrazellulären Termini (Jasti *et al.* 2007). Die eigentliche Agonisten-Bindungsstelle bzw. Protonen-Bindungsstelle der ASIC-Rezeptoren befindet sich vermutlich in einer stark negativen Tasche, die von Aspartat- und Glutamat-Seitenketten benachbarter Untereinheiten gebildet wird (Jasti *et al.* 2007). Möglicherweise ist die Agonisten-Bindungsstelle in P2X-Rezeptoren vergleichbar zu den ASIC-Kanälen zwischen benachbarten Untereinheiten lokalisiert.

4.2.5 Zusammenfassung der intermolekularen Agonisten-Bindungsstelle in P2X-Rezeptoren

Zusammengefasst sind die Aminosäuren K68 und F291 wahrscheinlich an der Agonisten-Bindung beteiligt (Kapitel 4.1.1 und 4.1.2) und befinden sich in P2X₁- und P2X₂-Rezeptoren in hinreichender Nähe und Orientierung zueinander (Kapitel 4.2.1), so dass eine Disulfidbrücke zwischen Cystein-Mutanten dieser Aminosäuren in benachbarten Untereinheiten gebildet werden kann (Kapitel 3.4.1, 3.4.5 und 3.5). In Gegenwart von ATP nicht aber ADP wird die Ausbildung dieser Disulfidbrücke verhindert (Kapitel 3.4.4 und 3.4.5). Diese Ergebnisse deuten auf eine Agonisten-Bindungsstelle an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten, ähnlich der bereits mit Kristallstruktur verfügbaren ASIC-Rezeptoren (Kapitel 4.2.4), hin (Abbildung 4.3).

Die Heteromerisierung der K68C- und K309C-mutierten P2X₂₋₁-Chimäre dieser Arbeit (Kapitel 4.2.2.2) und Heteromerisierungsdaten analoger Alanin-substituierter P2X₂- und P2X₃-Rezeptoren (Kapitel 4.2.2.1; Wilkinson *et al.* 2006) unterstützen die Annahme, dass der Agonist zwischen zwei Untereinheiten gebunden wird (Abbildung 4.3). Ursprünglich wurde angenommen, dass die Aminosäure K309 an der Agonisten-Bindung beteiligt ist (Kapitel 4.1.1.1). Eine kürzlich erschienene Studie zeigt jedoch, dass die homologe Aminosäure K308 des P2X₂-Rezeptors wahrscheinlich, aber nicht unbedingt ausschließlich, an der Kanalöffnung beteiligt ist (Kapitel 4.1.1.1; Cao *et al.* 2007). Weitere Studien über die Funktion dieser Aminosäure sind abzuwarten, bevor eine endgültige Aussage getroffen werden kann.

Solange keine hochauflösenden Strukturen oder Homologiemodelle der P2X-Rezeptoren zur Verfügung stehen, stellen diese Ergebnisse die ersten direkten bioche-

mischen Hinweise auf die Lokalisation der ATP-Bindungstasche an der Grenzfläche von zwei benachbarten Untereinheiten dar (Abbildung 4.3).

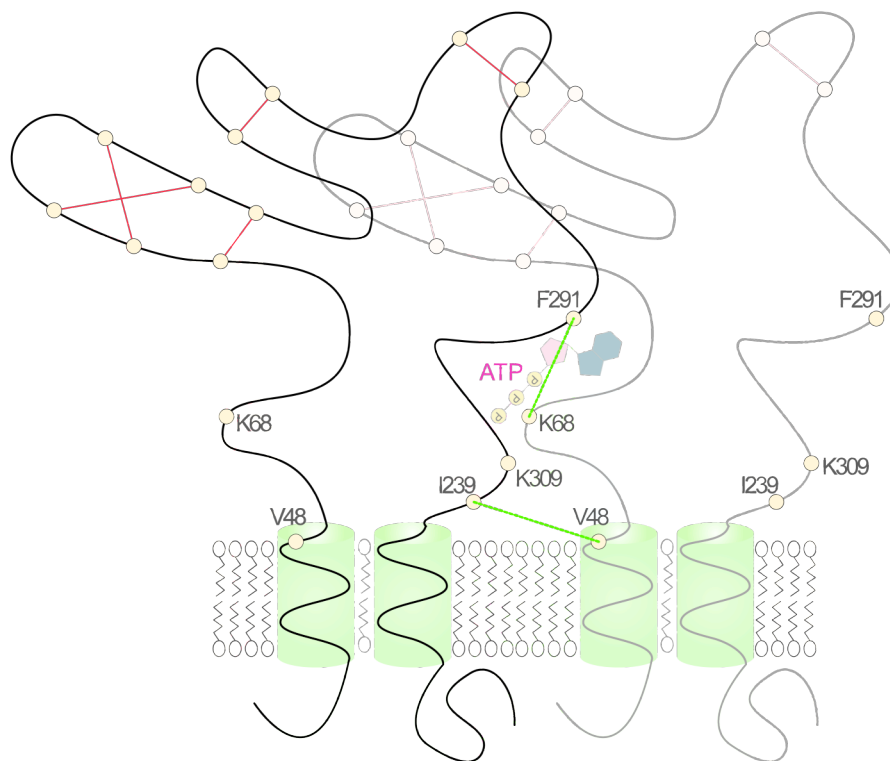


Abbildung 4.3 Mögliche Lokalisation der ATP-Bindungstasche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten. Schematische Darstellung von zwei P2X-Rezeptoruntereinheiten mit den konservierten Disulfidbrücken der extrazellulären Domäne als rote Linien dargestellt. Die Disulfidbrückenbildung zwischen den substituierten Aminosäuren P2X₁-V48 und I239 ist als grüne Linie dargestellt, ebenso wie die Disulfidbrückenbildung zwischen den substituierten, möglicherweise an der ATP-Bindung beteiligten Aminosäuren K68 und F291. Ein ATP-Molekül ist zwischen diesen beiden Aminosäuren an der Grenzfläche von zwei Untereinheiten schematisch angedeutet.

4.3 Unterschiede der Quervernetzungs-Effizienz unterschiedlicher P2X-Subtypen

Die P2X₃-, P2X₄- und die Kombination der P2X₁- mit den P2X₂-Rezeptormutanten zeigten im Gegensatz zu den P2X₁- und P2X₂-Subtypen selbst nach Anwendung der quervernetzenden Substanz MTS-2-MTS nur einen vergleichsweise geringen Dimeranteil.

In den folgenden Kapiteln werden mögliche Ursachen für die reduzierte Quervernetzungseffizienz erörtert, die z. B. durch ungünstige Bedingungen zur Ausbildung einer Disulfidbrücke in unterschiedlichen P2X-Subtypen begründet sein kann (Kapitel 4.2.1). Eine unterschiedliche Expressionsstärke oder Assemblierung der koinjizierten Untereinheiten können weitere Ursachen der reduzierten Dimerisierung sein. Möglicherweise bedeutet dieser Distanzunterschied konservierter Aminosäuren eine unterschiedliche

Funktion dieser Aminosäuren, so dass nur eine der K68- oder F291-homologen konservierten Aminosäuren an der Ausbildung der Agonisten-Bindungstasche beteiligt ist oder der Agonist an verschiedenen Subtypen in unterschiedlicher Orientierung bindet.

4.3.1 Die Quervernetzungs-Effizienz korreliert mit der Expressionsstärke der mutierten Untereinheiten

In den Koexpressions-Experimenten der P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Mutanten variierte die Dimerbildung. Insbesondere war fast 10% weniger Dimer in Oberflächenmarkierungs-Experimenten im Vergleich zu der metabolischen Markierung sichtbar (Abbildung 3.10). Als Ursache für diese Unterschiede wurden verschiedene Gründe in Betracht gezogen: (1) unterschiedlich effektive Translation oder unterschiedlicher Zeitverlauf der Translation der koexprimierten Untereinheiten; (2) unterschiedlich ausgeprägter Membrantransport bzw. Aggregation der Untereinheiten in intrazellulären Kompartimenten, wie z. B. dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat; (3) unterschiedliche Assemblierungsneigung bzw. unterschiedliche Assemblierungs-Stöchiometrie der Cystein-Mutanten; (4) unterschiedliche Effizienz des Membrantransportes der heteromeren und homomeren Rezeptoren.

Es ist möglich, die Gesamtmenge metabolisch markierten Proteins mit der Menge an Oberflächen-markierten Protein bei paralleler Anwendung beider Techniken zu vergleichen (siehe Abbildung 3.10), um eine Aussage über die Translations- und Membrantransporteffizienzen der einzeln exprimierten Untereinheiten zu erhalten und damit die Möglichkeiten (1) und (2) zu untersuchen. Es ist aber nicht möglich, die unterschiedlich ausgeprägte Expression von Untereinheiten gleicher molekularer Größe in Koexpressions-Experimenten zu unterscheiden, so dass die Möglichkeiten (3) und (4) mit den verwendeten Methoden nicht untersucht werden kann. Der Vergleich von Oberflächen- und metabolisch markiertem Protein ergab jedoch immer eine um ca. 10% erhöhte Dimerfraktion des gesamten Proteins. Möglicherweise ist der Transport weiterer Dimerer zur Plasmamembran evtl. durch die F291C-Mutation beeinträchtigt. Diese Mutante zeigte bereits bei Einzelexpression einen eingeschränkten Transport in die Oberfläche. Um weitere Aussagen über die Effizienz der Quervernetzung zu treffen, wurde die theoretische, maximal mögliche Dimerfraktion berechnet.

4.3.1.1 Berechnung des maximal möglichen Dimeranteils in Koexpressions-Experimenten

Unter der Annahme, dass während der Reifung des Rezeptors der Einbau einer Untereinheit ein rein zufälliges (stochastisches) Ereignis darstellt, kann die Binomialverteilung als diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung verwendet werden. Demnach kann die Wahrscheinlichkeit für jede Kombination von Untereinheiten in dem trimeren Rezeptor berechnet werden (Gleichung 4.1 und Abbildung 4.4 A).

$$P(k) = \binom{n}{k} \cdot p^k \cdot (1-p)^{n-k} \quad \text{mit } n=3 \text{ und } k=0,1,2,3$$

Gleichung 4.1 Formel der Binomialverteilung. Wahrscheinlichkeit P für k Erfolge aus n gleichartigen Versuchen mit zwei möglichen Ergebnissen. Angewandt auf die Heteromerisierung entspricht P dem relativen Anteil an Rezeptoren, die k gleiche Untereinheiten in einem Trimer ($n=3$) besitzen, wobei p die scheinbare Wahrscheinlichkeit (relative Verfügbarkeit) der erwarteten und $(1-p)$ die Wahrscheinlichkeit für die jeweils andere Untereinheit darstellt. Somit könnte für $k=3$ bzw. $k=0$ der Anteil an homomeren und mit $k=1,2$ der Anteil der heteromeren Rezeptoren berechnet werden

Für eine gleiche Wahrscheinlichkeit des Einbaus einer von zwei Untereinheiten ($p=50\%$) in einen trimeren Rezeptor, ergibt sich demnach eine relative Menge (bezogen auf das Gesamtprotein) von 75% für heteromere Rezeptoren mit wenigstens einer anderen Untereinheit (Abbildung 4.4 A). Für den Fall der Koexpression von P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Mutanten wurde ein Dimer als Ergebnis der Quervernetzung zweier Untereinheiten beobachtet. Unter der Annahme, dass diese Quervernetzung chemisch zu 100% effizient ist, werden je zwei Untereinheiten des trimeren Komplexes als Dimer sichtbar. Dies ergibt einen Anteil von 50% Dimer am Gesamtprotein (zwei Drittel von 75%; Abbildung 4.4, Schwarzer Kasten). Dies trifft aber nur zu, sofern die initiale Annahme erfüllt ist, dass es sich bei der Assemblierung um ein rein stochastisches Ereignis handelt und beide Untereinheiten ungefähr zu 50% vorliegen, d. h. effektiv synthetisiert und gefaltet werden.

Von den oben angeführten Faktoren können die Möglichkeiten (1) und (2) (unterschiedliche Translations- bzw. Expressionseffizienz oder Aggregation einer oder beider Untereinheiten) in diese Berechnung als Verschiebung der relativen Verfügbarkeit der Untereinheiten einberechnet werden. Dies würde als eine Veränderung der Wahrscheinlichkeit p für den Einbau einer Untereinheit A in die Berechnung eingehen. Da in diesem Modell die Wahrscheinlichkeit für den Einbau der zweiten Untereinheit B (Gegenwahrscheinlichkeit) als $(1-p)$ beschrieben wird, kann für jede unterschiedliche Verfügbarkeit der Untereinheiten A:B eine maximal mögliche Dimerfraktion berechnet werden (Abbildung 4.4 B).

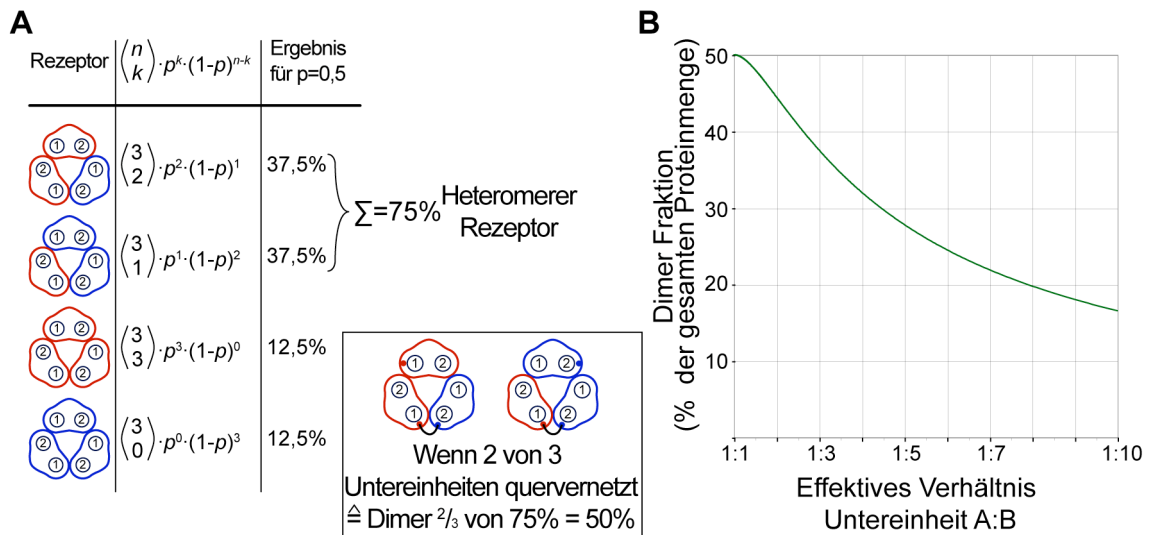


Abbildung 4.4 Berechnung der Dimerfraktion für quervernetzte Untereinheiten. **A**, Für einen trimeren Rezeptor (am Beispiel der P2X-Rezeptoren mit den zwei Transmembrandomänen 1 und 2 dargestellt) gibt es 4 Kombinationsmöglichkeiten von 2 verschiedenen Untereinheiten (rote und blaue Untereinheiten in den Rezeptorkomplexen in der linken Spalte). Unter der Annahme einer ausschließlich stochastischen Kombination der Untereinheiten, kann die Wahrscheinlichkeit für jede Untereinheitenkombination per Binomialverteilung berechnet werden (mittlere Spalte). Das Ergebnis in Prozent steht in der rechten Spalte. Bei einem Expressionsverhältnis von 1:1 beider Untereinheiten ergibt sich ein Anteil von 75% für heteromere Rezeptoren (Kasten in der Mitte), wobei eine Disulfidbrücke jeweils 2 von 3 Untereinheiten quervernetzen würde. **B**, Bei einem unterschiedlich starkem Expressionsverhältnis beider Untereinheiten variiert der Anteil an heteromere Rezeptorpopulation und demnach der Anteil an dimerisiertem Rezeptorprotein. Das Diagramm zeigt die maximale Dimerfraktion in Abhängigkeit der relativen Verfügbarkeit der Untereinheiten A zu B, unter der Annahme der stochastischen Kombination.

4.3.1.2 Abschätzung der Quervernetzungseffizienz zwischen P2X₁ K68C- und F291C-Mutanten

Eine nachträgliche Betrachtung der Proteinmenge der einzeln exprimierten P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Mutanten ergab in etwa die gleiche Menge exprimierten Proteins in metabolischen Markierungsexperimenten, jedoch zeigte die P2X₁ F291C-Mutante nach drei Tagen im Vergleich zu der P2X₁ K68C-Mutante eine ca. fünffach geringere Proteinmenge in Oberflächenmarkierungs-Experimenten (Abbildung 3.10). Dies beruht wahrscheinlich auf zeitlich unterschiedlicher Expression der beiden Mutanten. Auf das obige Modell bezogen beträgt die relative Verfügbarkeit der Untereinheiten A $p=0,18$ (A:B von 1:5), was eine maximale Dimerfraktion von 27,8% bedeuten würde. Die beobachtete Dimermenge nach Oberflächenmarkierung entspricht mit 31,7% in etwa diesem mathematisch berechneten Maximum. Demnach kann von einer sehr effizienten Quervernetzung ausgegangen werden. Eine Angleichung der Menge der injizierten cRNA auf 1 : 5 (P2X₁ K68C- : F291C-Mutante) erhöhte die Dimerfraktion in Oberflächenmarkierungsexperimenten auf ca. 40% (nicht gezeigt). Eine relative Menge von 40% Dimer in metabolischen Markierungsexperimenten entspräche einem Verhältnis

von ca. 1:2,5 der beiden Untereinheiten. Da bei der metabolischen Markierung jedoch auch nicht vollständig prozessierte, teilweise aggregierte Rezeptorproteine sichtbar sind, ist diese Berechnung nur bedingt zuverlässig.

Weitere Hinweise für die hohe Effizienz der spontanen Quervernetzung zwischen den P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Mutanten ergaben sich aus Experimenten, in denen die Menge an Dimer durch Anwendung oxidierender Substanzen wie z. B. Kupfer-Phenantrolin, Jod oder H₂O₂ vor der Aufreinigung nicht erhöht werden konnte. Zusätzlich lieferte die Reduktion der an die Ni²⁺-NTA-Agarose gebundenen, metabolisch markierten Rezeptorproteine (Kapitel 3.4.4) und die anschließende Oxidation durch H₂O₂ eine Dimerfraktion in der Größe der spontanen Quervernetzung von ca. 40%.

Wegen dieser Abhängigkeit der maximal möglichen Dimerfraktion von der relativen Verfügbarkeit der Untereinheiten wurde für die Koexpression- und Heteromerisierungs-Experimente mit den P2X₂-, P2X₃-, P2X₄-Cystein-Mutanten die Menge an injizierter cRNA mit der aufgereinigten Proteinmenge in vorausgegangen Einzelexpressionsexperimenten korreliert und für Koexpressionsexperimente auf eine erwartete Expression von 1:1 eingestellt. Da der Zusammenhang zwischen Injektions- und Proteinmenge nicht linear ist, wurde diese Korrelation aus mehreren Einzelexpressionsexperimenten berechnet.

4.3.2 Die Quervernetzungs-Effizienz ist abhängig von der Assemblierung der Untereinheiten

Ein weiterer möglicher Grund für die reduzierte Quervernetzungseffizienz einiger Subtypen ist eine ungleiche Assemblierung bzw. Stöchiometrie der koinjizierten Untereinheiten. Die Koexpression der P2X₁- und P2X₂-Mutanten resultierte in einer mäßigen, grenzflächenabhängigen Quervernetzung von zwei Untereinheiten unterschiedlicher Subtypen des heteromeren P2X_{1/2}-Rezeptors. Funktionelle Untersuchungen koexprimierter P2X₁- und P2X₂-Untereinheiten ergaben ein entsprechendes Heteromer mit P2X₁-ähnlicher Kinetik, die jedoch nur in jeder sechsten Oozyte gemessen werden konnte (Brown *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu wurde die effektive und vollständige Heteromerisierung der zwei Subtypen als Bande intermediärer Größe in BN-PAGE-Gelen gezeigt (Aschrafi *et al.* 2004).

Der in dieser Arbeit verwendete biochemische Ansatz ermöglichte die Dimerisierung der P2X₁ K68C- und P2X₂ F289C-Mutanten mit 12,5±0,2% des gesamten P2X-Proteins zu quantifizieren (Kapitel 3.5.2). Interessanterweise zeigte die densitometrische

Auswertung der Gele ca. zweifach mehr monomeres P2X₂- im Vergleich zu P2X₁- Protein, obwohl in vorausgegangenen Experimenten die cRNA-Injektionsmenge beider Mutanten mehrfach angeglichen wurde mit dem Ziel, dass von beiden Untereinheiten gleiche Mengen an Protein exprimiert werden (Abbildung 3.19, Spur 2). Möglicherweise bedeutet dieses 1:2 Proteinverhältnis der P2X₁- : P2X₂-Mutanten eine bevorzugte Assemblierung von zwei P2X₂- mit einer P2X₁-Untereinheit. Die beobachtete Dimerfraktion von 12,5% entspricht weniger als einem Drittel der maximal möglichen Menge von 50%, was bei effektiver Ausbildung der Disulfidbrücke bedeuten würde, dass nur einer von drei assemblierten Rezeptoren ein heteromeres P2X_{1/2}-Rezeptor ist. Nach Anpassung der cRNA-Injektionsmenge konnte dieses Heteromer in jeder untersuchten Oozyte beobachtet werden (siehe Abbildung 3.20).

Diese eingeschränkte Heteromerisierung resultiert wahrscheinlich aus der reduzierten Verfügbarkeit quervernetzbarer Untereinheiten. Für das P2X_{1/2}-Heteromer konnte dies aufgrund der unterschiedlichen Größen der Untereinheiten in nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gelen gezeigt werden; aber wie oben erwähnt, kann dies nicht für die übrigen Kombinationen gleich großer Untereinheiten überprüft werden.

4.3.3 Entspricht ein Distanzunterschied konservierter Aminosäuren einem Funktionsunterschied?

Da es nicht möglich war, die P2X₃- und P2X₄-Untereinheiten oder bereits beschriebene heteromere Untereinheiten-Kombinationen (vgl. Kapitel 1.2.2) durch Koexpression der Cystein-Mutanten zu vernetzen (Kapitel 3.5 und 3.5.4), bedeutet dies, dass die Distanz und/oder Orientierung zwischen zwei benachbarten Untereinheiten sich bei den Subtypen der P2X-Rezeptoren unterscheiden. Folglich wäre es möglich, dass nur eine der K68- oder F291-homologen konservierten Aminosäuren an der Ausbildung der Agonisten-Bindungstasche beteiligt ist.

Bisher gibt es die meisten Hinweise auf eine direkte Beteiligung an der ATP-Bindung für die Aminosäure K68 (Ausführliche Übersicht in Kapitel 4.2). Dagegen ist die Funktion der F291-Position weniger klar (siehe Kapitel 4.1.2). Eine nahe liegende Erklärung für die unterschiedlichen Distanzen der K68- und F291-analogen Aminosäuren wäre, dass lediglich K68 einen direkten Kontakt mit einem ATP Molekül ausbildet, während F291 sich auf einer flexibleren Domäne befindet, die sich in Folge der Agonisten-Bindung auf die Bindungsstelle zubewegt, oder dass K68 und F291 sich relativ zueinander annähern (Roberts und Evans 2007). Danach würde die Distanz zwischen diesen

Aminosäuren von dem jeweiligen Rezeptorsubtyp bzw. Heteromer und von dem entsprechenden Zustand des Rezeptors abhängig sein (Roberts *et al.* 2008).

Die stark reduzierte Quervernetzungseffizienz der homomeren P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren, selbst nach Anwendung bifunktioneller quervernetzender Substanzen, bedeutet, dass die Distanz der mutierten Aminosäuren an den Grenzflächen der Untereinheiten größer und/oder deren Orientierung zueinander verschieden ist. Diese Variation könnte für die pharmakologischen Unterschiede der verschiedenen P2X-Subtypen verantwortlich sein. Dem entgegen stehen die gleichartigen, pharmakologischen Eigenschaften von P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren (hohe ATP- und TNP-ATP-Effektivität, starke Desensibilisierung) bzw. P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren (geringere Agonisten- und Antagonisten-Sensitivität; North 2002; Nicke und King 2006; Guo *et al.* 2007).

Ein Vergleich mehrerer Kristall-Struktur-Modelle der GluR_n zeigt, dass beide Aminosäuren an der Agonisten-Bindung beteiligt sein könnten, auch wenn ein Distanz- oder Orientierungsunterschied besteht.

4.3.3.1 Strukturelle Unterschiede der Glutamat-Rezeptoren durch Agonisten-Bindung

Es gibt Beispiele für Distanzunterschiede in der Größenordnung einiger Ångström zwischen Aminosäuren der Agonisten-Bindung in den Glutamat-Rezeptoren. So zeigt ein Vergleich der Kristallstrukturen der AMPA-GluR2 Untereinheit im unligandiertem und Glutamat gebundenen Zustand (www.rcsb.org Zugriffsnummern 1FTO und 1FTJ) einen Distanzunterschied der Aminosäuren, die die α -Carboxyl- und γ -Carboxylgruppe des Glutamats koordinieren (R96 und T143). Unligandiert beträgt die Distanz der endständigen Kohlenstoffatome 13 Å und sofern Glutamat gebunden ist, beträgt die Distanz 5,5 Å. Es besteht also ein Distanzunterschied von 7,4 Å, was fast der vierfachen Länge einer Disulfidbrücke entspricht (siehe Kapitel 4.2.1).

In den NR2A-Untereinheiten (Zugriffsnummern 25AT und 25AS) beträgt die entsprechende Distanz der homologen Aminosäuren (R121 und T174) im unligandiertem Zustand 9,3 Å und Glutamat-gebundenem 9,6 Å. Demnach beträgt der Distanzunterschied nur 0,3 Å zwischen den verschiedenen Zuständen. Es bestehen zwar Unterschiede in der Auflösung und Herstellung der Kristalle, die diesen Modellen zu Grunde liegen, aber der Distanzunterschied von 7,4 Å ist mehr als sechsfach größer als die geringste Auflösung der verwendeten Modelle (2 Å für 1FTO), so dass diese Distanz wahrscheinlich wirklich vorliegt und kein Modellartefakt ist. Interessant ist dabei, dass

infolge der Zustandsänderung der Distanzunterschied $7,4 \text{ \AA}$ beträgt, bei einer maximalen Agonistenlänge des Glutamats von ca. 6 \AA (www.rcsb.org). Im Vergleich dazu beträgt die maximale Länge des ATP-Moleküls ca. 20 \AA in „gestreckter“ und ca. 10 \AA in der energieärmeren „geklappten“ Konformation. Demnach könnten für die P2X-Rezeptoren größere Bewegungen einiger Anteile der ATP-Bindungstasche infolge der Agonisten-Bindung vermutet werden.

4.3.3.2 Distanzunterschiede zwischen Aminosäuren gleicher Funktion in homologen Glutamat-Rezeptoren gleichen Zustands

Ein weiterer Vergleich der Distanzen zwischen konservierten Aminosäure-Seitenketten ligandierter GluR-Subtypen zeigt eine unterschiedliche Orientierung der Seitenketten auf. Der Abstand zwischen dem jeweiligen endständigen Kohlenstoffatom der die α -Carboxyl- und γ -Carboxylgruppen des Glutamats koordinierenden Aminosäuren beträgt in GluR2-Untereinheiten $5,5 \text{ \AA}$ (R96 und T143; vgl. Kapitel 4.3.3.1) und in NR2A-Untereinheiten $9,6 \text{ \AA}$ (R121 und T174; vgl. Kapitel 4.3.3.1). Dieser Distanzunterschied von $4,1 \text{ \AA}$ zwischen den endständigen Kohlenstoffatomen konservierter Seitenketten mit gleicher Funktion ist auf eine unterschiedliche Orientierung der Seitenketten aufgrund unterschiedlicher Drehwinkel des Peptidrückgrates zurückzuführen. Demnach beträgt der Distanzunterschied der α -Kohlenstoffatome dieser Aminosäuren nur $0,3 \text{ \AA}$ ($13,6 \text{ \AA}$ in GluR2- und $13,3 \text{ \AA}$ in NR2A-Untereinheiten).

Die Orientierung der Seitenkette ist jedoch essentiell für die Ausbildung einer Disulfidbrücke (siehe Kapitel 4.2.1). Wie bereits oben beschrieben (Kapitel 4.2.1) muss der Winkel zwischen der Disulfidbindung und dem jeweiligen β -Kohlenstoff des Cysteins näherungsweise 103° und der Torsionswinkel zwischen den β -Kohlenstoffatomen beider Cysteine in etwa 90° oder -90° betragen (Creighton 1988; Thangudu *et al.* 2007). Eine reduzierte Quervernetzungs-Effizienz der P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren kann demnach durch eine zu große Distanz oder falsche Orientierung der substituierten Cysteine zueinander begründet werden.

Darüber hinaus sind weitere Gründe für die reduzierte Dimerisierungseffizienz der P2X₃- und P2X₄-Rezeptormutanten denkbar. Möglicherweise wird die Ausbildung der Disulfidbrücke durch ein reduzierendes Milieu der umgebenden Aminosäuren verhindert, oder der Freiheitsgrad der Torsionswinkel ist durch die benachbarten Aminosäuren eingeschränkt, so dass ein günstiger Winkel für die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen nicht zustande kommt.

4.3.4 Zusammenfassung der möglichen Ursachen für die Unterschiede in der Effizienz der Quervernetzung

- Die Bedingungen für die Ausbildung der Disulfidbrücke sind so stringent, dass eine unterschiedliche Distanz oder Orientierung der Cysteine zueinander oder das Milieu der umgebenden Aminosäuren die Ausbildung der Disulfidbrücke verhindern können (Kapitel 4.2.1 auf Seite 87ff).
- Die maximal mögliche Dimermenge ist direkt von der relativen Verfügbarkeit der koexprimierten Untereinheiten abhängig und, die Verfügbarkeit von zwei Mutanten gleicher molekularer Größe kann nicht unterschieden werden (Kapitel 4.3.1 auf Seite 96ff).
- Die Assemblierung der Mutanten und Subtypen erfolgt unter Umständen nicht stochastisch, so dass eine reduzierte Menge an heteromeren Rezeptoren resultiert (Kapitel 4.3.2 auf Seite 99ff.).
- Es sind Distanzunterschiede zwischen homologen Aminosäure-Seitenketten mit gleicher Funktion in den Kristallstrukturmodellen der iGluRn messbar, so dass ein Distanzunterschied nicht unbedingt auf unterschiedliche Funktionen der Aminosäuren hindeuten muss (Kapitel 4.3.3.1 auf Seite 101ff)

Zusammengefasst ist eine unterschiedliche Funktion der Aminosäure F291 in verschiedenen P2X-Rezeptoren möglich (Zemkova *et al.* 2007; Kapitel 4.1.2). Die reduzierte Dimerisierung der homologen K68C- und F291C-Mutanten unterschiedlicher Subtypen ist wahrscheinlich von mehreren Bedingungen abhängig, die nicht unbedingt die Funktion der Aminosäuren betreffen. Demnach kann aus der unterschiedlichen Distanz zwischen, bzw. Orientierung oder Umgebung von homologen Cystein-Mutationen nicht unbedingt ein Funktionsunterschied abgeleitet werden kann.

4.4 Fazit

In dieser Arbeit konnte nach Koexpression Cystein-substituierter P2X-Rezeptoren mit biochemischen und elektrophysiologischen Methoden eine Quervernetzung zwischen den P2X₁ K68C- und P2X₁ F291C-Mutanten benachbarter Untereinheiten desselben Rezeptorkomplexes identifiziert werden, wobei die Quervernetzung in Gegenwart des Agonisten ATP verhindert werden konnte. Da mehrere Publikationen in Übereinstimmung mit den funktionellen Daten dieser Arbeit eine Beteiligung dieser Aminosäuren

an der Agonisten-Bindung postulieren, deutet dies auf eine ATP-Bindungstasche an der Grenzfläche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten hin.

Die geringe Distanz zwischen diesen Cystein-Mutationen konnte für P2X₂-Rezeptoren und heteromere P2X_{1/2}-Rezeptoren bestätigt werden und scheint damit als strukturelles Motiv für diese beiden P2X-Subtypen konserviert zu sein. In P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren ist die Distanz oder Orientierung analoger Cystein-Mutationen zueinander nicht konserviert. Eine Aussage über unterschiedliche Funktionen dieser Aminosäure-Positionen in diesen P2X-Subtypen kann daraus nicht unbedingt abgeleitet werden.

Diese Ergebnisse bedeuten einen ersten und direkten Hinweis einer relativen Annäherung von Domänen benachbarter Untereinheiten in P2X-Rezeptoren, die möglicherweise an der Koordination des Agonisten beteiligt sind. Diese Ergebnisse liefern wichtige Hinweise auf die generelle Struktur der P2X-Rezeptoren und tragen werden maßgeblich zur Interpretation einer zukünftigen Kristallstruktur beitragen.

Zusätzlich konnte die Cystein-spezifische Quervernetzung zur Identifizierung von Aminosäurenpaaren geringer Distanz zwischen zwei Untereinheiten der P2X-Rezeptoren angewandt werden. Demnach ist diese Methode geeignet, die Aminosäuren der Grenzflächen in Proteinkomplexen zu identifizieren. Diese Methode bietet die Möglichkeit der spezifischen Aktivierung von z. B. heteromeren Rezeptoren mit entsprechend quervernetzten Cysteinen nach Reduktion der Disulfidbrücke. Ferner können damit auch unterschiedliche Zustände von Rezeptorkomplexen durch Quervernetzung unter verschiedenen Bedingungen (z. B. An- und Abwesenheit des Agonisten) erfasst werden.

5. Zusammenfassung

Die trimeren P2X-Rezeptoren sind nicht-selektive Kationenkanäle, die durch Adenosintri-phosphat (ATP) aktiviert werden. Es gibt sieben Untereinheiten (P2X₁₋₇). P2X-Rezeptoren sind in nahezu jedem Gewebe exprimiert und dort an den verschiedensten physiologischen Vorgängen beteiligt. Neben den „Cys-Loop“-Rezeptoren und den ionotropen Glutamat-Rezeptoren stellen die P2X-Rezeptoren eine eigenständige Familie von Neurotransmitter-gesteuerten Rezeptoren dar. Eine Untereinheit der trimeren P2X-Rezeptoren besteht aus den intrazellulären N- und C-Termini und zwei Transmembrandomänen, die über eine große extrazelluläre Domäne verbunden sind. Da weder ein P2X-homologes lösliches Protein für Kristallisationsstudien noch ein Gewebe zur Aufreinigung großer Mengen von P2X-Rezeptorprotein zur Verfügung steht, stützen sich Struktur-Funktions-Studien auf einzelpunktmutierte Rezeptoren in heterologen Expressionssystemen. Einige Aminosäuren, die bei Austausch gegen Alanin eine deutliche Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von ATP bewirken und von denen daher vermutet wird, dass sie an der Agonisten-Bindung beteiligt sind, wurden bereits identifiziert. Ob sich die Agonisten-Bindungstasche der P2X-Rezeptoren zwischen zwei Untereinheiten, wie bei den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren, oder innerhalb einer Untereinheit, vergleichbar mit den ionotropen Glutamat-Rezeptoren, befindet, ist weitgehend ungeklärt.

Um die Lokalisation der ATP-Bindungstasche zu bestimmen, wurden, basierend auf vorhandener Literatur, potenziell an der ATP-Bindung beteiligte Aminosäuren des P2X₁-Rezeptors durch zielgerichtete Mutagenese gegen Cysteine ausgetauscht und die P2X-Rezeptormutanten in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert. Das Ziel dabei war, quervernetzte Cystein-Mutanten durch Disulfidbrückenbildung zwischen den substituierten Cysteinen zu identifizieren und so die Distanz von Aminosäure-Seitenketten, die an der Agonisten-Bindung beteiligt sind, zu bestimmen. Für die biochemischen Untersuchungen wurden entweder alle neu gebildeten Proteine der Oozyten metabolisch durch Inkubation mit radioaktivem [³⁵S]-Methionin oder selektiv die Plasmamembranständigen Proteine mit Sulfo-NHS-Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Die Rezeptormutanten wurden affinitätschromatographisch über ein N-terminales Hexahistidyl-Motiv unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und mit nicht-reduzierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) auf Expression sowie mit Blauer-Nativer-PAGE auf korrekte Trimerisierung überprüft. Darüber hinaus wurden homologe Cystein-Substitutionen einer P2X₂₋₁-Chimäre, welche dieselben Bindungseigenschaften des P2X₁-Rezeptors besitzt, mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme charakterisiert (TEVC).

Die Koexpression der verschiedenen P2X-Mutanten ergab eine spontane Quervernetzung über Disulfidbrücken zwischen den P2X₁ K68C- und F291C-Mutanten, die in nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gelen über eine Dimerbildung nachgewiesen werden konnte. Dies deutet auf eine geringe Distanz zwischen diesen Cystein-substituierten Aminosäuren hin. Die Ausbildung der Disulfidbrücke konnte nach Reduktion der Quervernetzung während der Aufreinigung und durch Zugabe von ATP verhindert werden. In funktionellen Studien der P2X₂₋₁ K68C/F291C-Doppelmutante war es entsprechend möglich die Disulfidbrücke reversibel zu reduzieren. In den Mutantenkanäle exprimierenden *Xenopus*-Oozyten wurde der geringe Rezeptorstrom durch Reduktion mit DTT ca. 60fach potenziert und dadurch überhaupt messbar gemacht. Die Reoxidation durch H₂O₂ wurde wie in den biochemischen Experimenten in Anwesenheit von ATP ebenfalls verhindert. Da die Aminosäuren K68 und F291 des P2X₁-Rezeptors möglicherweise an der Agonisten-Bindung beteiligt sind, sind diese Ergebnisse die ersten direkten experimentellen Hinweise auf die Aposition von Domänen benachbarter Untereinheiten, die an der Agonisten-Bindung beteiligt sind. Demnach befindet sich die ATP-Bindungstasche an der Grenzfläche zwischen zwei Untereinheiten der P2X-Rezeptoren.

Die Koexpression homologer Cystein-substituierter P2X₂-, P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren zeigte analog zu den P2X₁-Experimenten eine spontane Dimerisierung der P2X₂ K69C- und F289C-Mutanten. Eine mäßige Quervernetzung von zwei Untereinheiten der P2X₃ K63C- und F280C- sowie der P2X₄ K67C- und F294C-Mutanten konnte nach Anwendung einer ca. 0,5 nm langen Cystein-spezifischen quervernetzenden Substanz erreicht werden. Die paarweise Kombination der P2X₁-, P2X₂-, P2X₃- und P2X₄-Cystein-Mutanten zeigte selbst nach Anwendung quervernetzender Substanzen nur in der Kombination von P2X₁-K68C und P2X₂-F289C eine Quervernetzung von zwei unterschiedlichen Untereinheiten eines heteromeren P2X_{1/2}-Rezeptors. Diese Kombination konnte in elektrophysiologischen Messungen durch Reduktion der Disulfidbrücke spezifisch messbar gemacht und somit die Heteromerisierung dieser Untereinheiten eindeutig aufgezeigt werden.

Zusammenfassend deutet die geringe Distanz der an der Quervernetzung beteiligten Cystein-Mutationen der P2X₁-, P2X₂- und homomeren P2X_{1/2}-Rezeptoren auf ein konserviertes strukturelles Motiv dieser P2X-Subtypen hin, welches in P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren nicht konserviert zu sein scheint. Diese Ergebnisse liefern wichtige Hinweise auf die generelle Struktur der P2X-Rezeptoren und werden maßgeblich zur Interpretation einer zukünftigen Kristallstruktur beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Abbracchio Mp und Burnstock G (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64, 445-75
- Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse Ah, Seman M, Haag F und Koch-Nolte F (2008) ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *Faseb J* 22, 861-9
- Alberts B Molecular biology of the cell. (2002) Garland Science New York
- Alexander Sp, Mathie A und Peters Ja (2007) Transmitter-gated channels. *Br J Pharmacol* 150 Suppl 1, S82-95
- Ames Gf (1986) Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annual review of biochemistry* 55, 397-425
- Armstrong N, Sun Y, Chen Gq und Gouaux E (1998) Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395, 913-7
- Armstrong N und Gouaux E (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 28, 165-81
- Armstrong N, Jasti J, Beich-Frandsen M und Gouaux E (2006) Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell* 127, 85-97
- Arvola M und Keinanen K (1996) Characterization of the ligand-binding domains of glutamate receptor (GluR)-B and GluR-D subunits expressed in Escherichia coli as periplasmic proteins. *J Biol Chem* 271, 15527-32
- Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J und Schmalzing G (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol* 342, 333-43
- Ayalon G und Stern-Bach Y (2001) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31, 103-13
- Banke Tg, Greenwood Jr, Christensen Jk, Liljefors T, Traynelis Sf, Schousboe A und Pickering Ds (2001) Identification of amino acid residues in GluR1 responsible for ligand binding and desensitization. *J Neurosci* 21, 3052-62
- Barnard Ea, Skolnick P, Olsen Rw, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson An und Langer Sz (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50, 291-313
- Barrera Np, Ormond Sj, Henderson Rm, Murrell-Lagnado Rd und Edwardson Jm (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 280, 10759-65
- Barrera Np, Henderson Rm, Murrell-Lagnado Rd und Edwardson Jm (2007) The stoichiometry of P2X2/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. *Biophys J* 93, 505-12
- Bean Bp, Williams Ca und Ceelen Pw (1990) ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: current-voltage relation and single-channel behavior. *J Neurosci* 10, 11-9
- Betz H (1990) Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5, 383-92
- Biesecker G (1973) Molecular properties of the cholinergic receptor purified from Electrophorus electricus. *Biochemistry* 12, 4403-9
- Blount P und Merlie Jp (1989) Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 3, 349-57
- Boue-Grabot E, Archambault V und Seguela P (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275, 10190-5
- Boulter J, Hollmann M, O'shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C und Heinemann S (1990) Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science* 249, 1033-7
- Brandle U, Spielmanns P, Osteroth R, Sim J, Surprenant A, Buell G, Ruppertsberg Jp, Plinkert Pk, Zenner Hp und Glowatzki E (1997) Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett* 404, 294-8

- Brautigam Ca, Chelliah Y und Deisenhofer J (2004) Tetramerization and ATP binding by a protein comprising the A, B, and C domains of rat synapsin I. *J Biol Chem* 279, 11948-56
- Brejč K, Van Dijk Wj, Klaassen Rv, Schuurmans M, Van Der Oost J, Smit Ab und Sixma Tk (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411, 269-76
- Brisson A und Unwin Pn (1985) Quaternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature* 315, 474-7
- Brown Sg, Townsend-Nicholson A, Jacobson Ka, Burnstock G und King Bf (2002) Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300, 673-80
- Buckingham Sd, Pym L und Sattelle Db (2006) Oocytes as an expression system for studying receptor/channel targets of drugs and pesticides. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 322, 331-45
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D und Smythe A (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40, 668-88
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24, 509-81
- Burnstock G und Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16, 433-40
- Burnstock G (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 36, 1127-39
- Burnstock G und Knight Ge (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240, 31-304
- Burnstock G (2006) Purinergic signalling--an overview. *Novartis Foundation symposium* 276, 26-48; discussion -57, 275-81
- Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87, 659-797
- Calvert Ja und Evans Rj (2004) Heterogeneity of P2X receptors in sympathetic neurons: contribution of neuronal P2X1 receptors revealed using knockout mice. *Mol Pharmacol* 65, 139-48
- Cao L, Young Mt, Broomhead He, Fountain Sj und North Ra (2007) Thr339-to-serine substitution in rat P2X2 receptor second transmembrane domain causes constitutive opening and indicates a gating role for Lys308. *J Neurosci* 27, 12916-23
- Cascio M (2004) Structure and function of the glycine receptor and related nicotinic receptors. *J Biol Chem* 279, 19383-6
- Celie Ph, Van Rossum-Fikkert Se, Van Dijk Wj, Brejč K, Smit Ab und Sixma Tk (2004) Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 41, 907-14
- Changeux J und Edelstein Sj (2001) Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol* 11, 369-77
- Changeux Jp, Podleski Tr und Wofsy L (1967) Affinity labeling of the acetylcholine-receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 2063-70
- Changeux Jp und Edelstein Sj (2005) Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* 308, 1424-8
- Chaumont S, Jiang Lh, Penna A, North Ra und Rassendren F (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* 279, 29628-38
- Cheewatrakoolpong B, Gilchrest H, Anthes Jc und Greenfeder S (2005) Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 17-27
- Chen Gq und Gouaux E (1997) Overexpression of a glutamate receptor (GluR2) ligand binding domain in Escherichia coli: application of a novel protein folding screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13431-6
- Chen Pe und Wyllie Dj (2006) Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *Br J Pharmacol* 147, 839-53
- Cheng Q, Du M, Ramanoudjame G und Jayaraman V (2005) Evolution of glutamate interactions during binding to a glutamate receptor. *Nat Chem Biol* 1, 329-32
- Clyne Jd, Wang Lf und Hume Ri (2002) Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J Neurosci* 22, 3873-80

- Collingridge Gl, Kehl Sj und McLennan H (1983) The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro. *J Physiol* 334, 19-31
- Colquhoun D (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol* 125, 924-47
- Connolly Cn und Wafford Ka (2004) The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* 32, 529-34
- Corringer Pj, Le Novere N und Changeux Jp (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 431-58
- Creighton Te (1988) Disulphide bonds and protein stability. *Bioessays* 8, 57-63
- Curtis Dr, Phillis Jw und Watkins Jc (1960) The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J Physiol* 150, 656-82
- Czajkowski C, Kaufmann C und Karlin A (1993) Negatively charged amino acid residues in the nicotinic receptor delta subunit that contribute to the binding of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6285-9
- Czajkowski C und Karlin A (1995) Structure of the nicotinic receptor acetylcholine-binding site. Identification of acidic residues in the delta subunit within 0.9 nm of the 5 alpha subunit-binding. *J Biol Chem* 270, 3160-4
- Dani Ja und Mayer Ml (1995) Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol* 5, 310-7
- Dellisanti Cd, Yao Y, Stroud Jc, Wang Zz und Chen L (2007) Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 A resolution. *Nat Neurosci* 10, 953-62
- Digby Hr, Roberts Ja, Sutcliffe Mj und Evans Rj (2005) Contribution of conserved glycine residues to ATP action at human P2X1 receptors: mutagenesis indicates that the glycine at position 250 is important for channel function. *J Neurochem* 95, 1746-54
- Ding S und Sachs F (1999a) Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: single channel recordings. *J Membr Biol* 172, 215-23
- Ding S und Sachs F (1999b) Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J Gen Physiol* 113, 695-720
- Ding S und Sachs F (2000) Inactivation of P2X2 purinoceptors by divalent cations. *J Physiol* 522 Pt 2, 199-214
- Ding S und Sachs F (2002) Evidence for non-independent gating of P2X2 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *BMC Neurosci* 3, 17
- Dingledine R, Borges K, Bowie D und Traynelis Sf (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7-61
- Dougherty Da (1996) Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* 271, 163-8
- Drury An und Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68, 213-37
- Dubyak Gr (2007) Go it alone no more--P2X7 joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels. *Mol Pharmacol* 72, 1402-5
- Edelstein Sj, Schaad O, Henry E, Bertrand D und Changeux Jp (1996) A kinetic mechanism for nicotinic acetylcholine receptors based on multiple allosteric transitions. *Biol Cybern* 75, 361-79
- Ennion S, Hagan S und Evans Rj (2000) The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. *J Biol Chem* 275, 29361-7
- Ennion Sj, Ritson J und Evans Rj (2001) Conserved negatively charged residues are not required for ATP action at P2X(1) receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 700-4
- Ennion Sj und Evans Rj (2002a) P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 611-6
- Ennion Sj und Evans Rj (2002b) Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol* 61, 303-11
- Erreger K, Chen Pe, Wyllie Dj und Traynelis Sf (2004) Glutamate receptor gating. *Critical reviews in neurobiology* 16, 187-224

- Evans Rj (1996) Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells. *Neurosci Lett* 212, 212-4
- Finger Te, Danilova V, Barrows J, Bartel Dl, Vigers Aj, Stone L, Hellekant G und Kinnamon Sc (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310, 1495-9
- Fountain Sj, Parkinson K, Young Mt, Cao L, Thompson Cr und North Ra (2007) An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 448, 200-3
- Frandsen A, Pickering Ds, Vestergaard B, Kasper C, Nielsen Bb, Greenwood Jr, Campiani G, Fattorusso C, Gajhede M, Schousboe A und Kastrup Js (2005) Tyr702 is an important determinant of agonist binding and domain closure of the ligand-binding core of GluR2. *Mol Pharmacol* 67, 703-13
- Fredholm Bb, Abbracchio Mp, Burnstock G, Daly Jw, Harden Tk, Jacobson Ka, Leff P und Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46, 143-56
- Freist W, Verhey Jf, Stuhmer W und Gauss Dh (1998) ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett* 434, 61-5
- Furukawa H und Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo J* 22, 2873-85
- Furukawa H, Singh Sk, Mancusso R und Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438, 185-92
- Gingras Ac, Aebersold R und Raught B (2005) Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *J Physiol* 563, 11-21
- Gloor S, Pongs O und Schmalzing G (1995) A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Gene* 160, 213-7
- Gouaux E (2004) Structure and function of AMPA receptors. *J Physiol* 554, 249-53
- Gronemeyer H und Govindan Mv (1986) Affinity labelling of steroid hormone receptors. *Molecular and cellular endocrinology* 46, 1-19
- Guo C, Masin M, Qureshi Os und Murrell-Lagnado Rd (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 72, 1447-56
- Hansen Kb, Yuan H und Traynelis Sf (2007) Structural aspects of AMPA receptor activation, desensitization and deactivation. *Curr Opin Neurobiol* 17, 281-8
- Hansen Sb, Sulzenbacher G, Huxford T, Marchot P, Taylor P und Bourne Y (2005) Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *Embo J* 24, 3635-46
- Herin Ga und Aizenman E (2004) Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol* 500, 101-11
- Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H und Kuhse J (1996) The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6031-6
- Hogner A, Kastrup Js, Jin R, Liljefors T, Mayer Ml, Egebjerg J, Larsen Ik und Gouaux E (2002) Structural basis for AMPA receptor activation and ligand selectivity: crystal structures of five agonist complexes with the GluR2 ligand-binding core. *J Mol Biol* 322, 93-109
- Hollmann M und Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience* 17, 31-108
- Hollmann M, Maron C und Heinemann S (1994) N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13, 1331-43
- Holm Mm, Lunn Ml, Traynelis Sf, Kastrup Js und Egebjerg J (2005a) Structural determinants of agonist-specific kinetics at the ionotropic glutamate receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12053-8
- Holm Mm, Naur P, Vestergaard B, Geballe Mt, Gajhede M, Kastrup Js, Traynelis Sf und Egebjerg J (2005b) A binding site tyrosine shapes desensitization kinetics and agonist potency at GluR2. A mutagenic, kinetic, and crystallographic study. *J Biol Chem* 280, 35469-76
- Hucho F und Changeux Jp (1973) Molecular weight and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from *Electrophorus electricus* electric tissue. *FEBS Lett* 38, 11-5
- Jasti J, Furukawa H, Gonzales Eb und Gouaux E (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449, 316-23
- Jiang Lh, Rassendren F, Surprenant A und North Ra (2000) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* 275, 34190-6

- Jiang Lh, Rassendren F, Spelta V, Surprenant A und North Ra (2001) Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. *J Biol Chem* 276, 14902-8
- Jiang Lh, Kim M, Spelta V, Bo X, Surprenant A und North Ra (2003) Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 23, 8903-10
- Jin R, Banke Tg, Mayer MI, Traynelis Sf und Gouaux E (2003) Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 6, 803-10
- Jin R, Clark S, Weeks Am, Dudman Jt, Gouaux E und Partin Km (2005) Mechanism of positive allosteric modulators acting on AMPA receptors. *J Neurosci* 25, 9027-36
- Kao Pn, Dwork Aj, Kaldany Rr, Silver MI, Wideman J, Stein S und Karlin A (1984) Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J Biol Chem* 259, 11662-5
- Karlin A und Akabas Mh (1995) Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15, 1231-44
- Karlin A (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3, 102-14
- Katz Gm und Schwartz TI (1974) Temporal control of voltage-clamped membranes: an examination of principles. *J Membr Biol* 17, 275-91
- Khakh Bs (2001) Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* 2, 165-74
- Khakh Bs, Burnstock G, Kennedy C, King Bf, North Ra, Seguela P, Voigt M und Humphrey Pp (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53, 107-18
- Kim E und Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771-81
- King Bf, Townsend-Nicholson A, Wildman Ss, Thomas T, Spyer Km und Burnstock G (2000) Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 20, 4871-7
- King Bf T-Na Nucleotide and Nucleoside Receptors, Tocris Reviews No. 23,. In Tocris Reviews. (2003) Manley S Bn Tocris Cookson Bristol
- Knofel T und Strater N (2001) Mechanism of hydrolysis of phosphate esters by the dimetal center of 5'-nucleotidase based on crystal structures. *J Mol Biol* 309, 239-54
- Koshimizu Ta, Kretschmannova K, He MI, Ueno S, Tanoue A, Yanagihara N, Stojilkovic Ss und Tsujimoto G (2006) Carboxyl-terminal splicing enhances physical interactions between the cytoplasmic tails of purinergic P2X receptors. *Mol Pharmacol* 69, 1588-98
- Koshland De, Jr., Nemethy G und Filmer D (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5, 365-85
- Koshland Me, Englberger F und Koshland De (1959) A General Method For The Labeling Of The Active Site Of Antibodies And Enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45, 1470-5
- Krebs Ha und Eggleston Lv (1949) The effect of L-glutamate on the loss of potassium ions by brain slices suspended in a saline medium. *Biochem J* 44, vii
- Kreienkamp Hj, Utkin Yn, Weise C, Machold J, Tsetlin Vi und Hucho F (1992) Investigation of ligand-binding sites of the acetylcholine receptor using photoactivatable derivatives of neurotoxin II from *Naja naja oxiana*. *Biochemistry* 31, 8239-44
- Krnjevic K und Phillis Jw (1963) Pharmacological properties of acetylcholine-sensitive cells in the cerebral cortex. *J Physiol* 166, 328-50
- Kuryatov A, Laube B, Betz H und Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12, 1291-300
- Kuusinen A, Arvola M und Keinanen K (1995a) Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *Embo J* 14, 6327-32
- Kuusinen A, Arvola M, Oker-Blom C und Keinanen K (1995b) Purification of recombinant GluR-D glutamate receptor produced in Sf21 insect cells. *Eur J Biochem* 233, 720-6
- Laemmli Uk (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5
- Langley Jn (1905) On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol* 33, 374-413

- Langley Jn (1907) On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I. *J Physiol* 36, 347-84
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H und Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18, 493-503
- Laurie Dj und Seeburg Ph (1994) Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. *Eur J Pharmacol* 268, 335-45
- Le Kt, Babinski K und Seguela P (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 18, 7152-9
- Le Kt, Boue-Grabot E, Archambault V und Seguela P (1999) Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J Biol Chem* 274, 15415-9
- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North Ra, Buell G und Surprenant A (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432-5
- Liu Gj, Brockhausen J und Bennett Mr (2003) P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci* 108, 12-6
- Loo Tw und Clarke Dm (2001) Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J Biol Chem* 276, 36877-80
- Madden Dr, Armstrong N, Svergun D, Perez J und Vachette P (2005) Solution X-ray scattering evidence for agonist- and antagonist-induced modulation of cleft closure in a glutamate receptor ligand-binding domain. *J Biol Chem* 280, 23637-42
- Madry C, Mesic I, Betz H und Laube B (2007) The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn²⁺ inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 72, 1535-44
- Mahaut-Smith Mp, Ennion Sj, Rolf Mg und Evans Rj (2000) ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. *Br J Pharmacol* 131, 108-14
- Mayer MI (2005) Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 15, 282-8
- Mayer MI (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440, 456-62
- Meldrum Bs (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition* 130, 1007S-15S
- Millar Ns (2003) Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* 31, 869-74
- Mitchell Na und Fleck Mw (2007) Targeting AMPA receptor gating processes with allosteric modulators and mutations. *Biophys J* 92, 2392-402
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M und Unwin N (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 288, 765-86
- Moffatt L und Hume Ri (2007) Responses of rat P2X2 receptors to ultrashort pulses of ATP provide insights into ATP binding and channel gating. *J Gen Physiol* 130, 183-201
- Monaghan Dt, Bridges Rj und Cotman Cw (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29, 365-402
- Monod J, Wyman J und Changeux Jp (1965) On The Nature Of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12, 88-118
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73
- Nagaya N, Tittle Rk, Saar N, Dellal Ss und Hume Ri (2005) An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *J Biol Chem* 280, 25982-93
- Nakanishi N, Shneider Na und Axel R (1990) A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* 5, 569-81
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603

- Nakazawa K, Ojima H, Ishii-Nozawa R, Takeuchi K und Ohno Y (2004) Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation. *Eur J Pharmacol* 483, 29-35
- Naur P, Vestergaard B, Skov Lk, Egebjerg J, Gajhede M und Kastrup Js (2005) Crystal structure of the kainate receptor GluR5 ligand-binding core in complex with (S)-glutamate. *FEBS Lett* 579, 1154-60
- Nicke A, Baumert Hg, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E und Schmalzing G (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J* 17, 3016-28
- Nicke A, Kerschensteiner D und Soto F (2005) Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *J Neurochem* 92, 925-33
- Nicke A und King B Heteromerization of P2X receptors. In Biological and biophysical aspects of ligand-gated ion channel receptor superfamilies. (2006) Arias Hr Research Signpost Kerala
- Niesler B, Walstab J, Combrink S, Moller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bonisch H, Gothert M, Rappold G und Bruss M (2007) Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT3C, 5-HT3D, and 5-HT3E. *Mol Pharmacol* 72, 8-17
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Miyata T und Numa S (1982) Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299, 793-7
- Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Tanabe T, Shimizu S, Kikuyotani S, Kayano T, Hirose T, Inayama S und Et Al. (1983) Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha-subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 305, 818-23
- North Ra und Surprenant A (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 563-80
- North Ra (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013-67
- O'hara Pj, Sheppard Po, Thogersen H, Venezia D, Haldeman Ba, Mcgrane V, Houamed Km, Thomsen C, Gilbert Tl und Mulvihill Er (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11, 41-52
- Oh Bh, Pandit J, Kang Ch, Nikaido K, Gokcen S, Ames Gf und Kim Sh (1993) Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J Biol Chem* 268, 11348-55
- Paas Y, Eisenstein M, Medevielle F, Teichberg Vi und Devillers-Thiery A (1996) Identification of the amino acid subsets accounting for the ligand binding specificity of a glutamate receptor. *Neuron* 17, 979-90
- Paas Y (1998) The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends Neurosci* 21, 117-25
- Partin Km, Fleck Mw und Mayer MI (1996) AMPA receptor flip/flop mutants affecting deactivation, desensitization, and modulation by cyclothiazide, aniracetam, and thiocyanate. *J Neurosci* 16, 6634-47
- Pedersen Se und Cohen Jb (1990) d-Tubocurarine binding sites are located at alpha-gamma and alpha-delta subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2785-9
- Pentikainen Ot, Settimo L, Keinanen K und Johnson Ms (2003) Selective agonist binding of (S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionic acid (AMPA) and 2S-(2alpha,3beta,4beta)-2-carboxy-4-(1-methylethenyl)-3-pyrrolidineacetic acid (kainate) receptors: a molecular modeling study. *Biochem Pharmacol* 66, 2413-25
- Perez-Otano I und Ehlers Md (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28, 229-38
- Radford Km, Virginio C, Surprenant A, North Ra und Kawashima E (1997) Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *J Neurosci* 17, 6529-33
- Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North Ra und Surprenant A (1997) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *Embo J* 16, 3446-54
- Rettinger J, Aschrafi A und Schmalzing G (2000) Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J Biol Chem* 275, 33542-7
- Rettinger J und Schmalzing G (2003) Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol* 121, 451-61

- Rettinger J und Schmalzing G (2004) Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P2X1 receptor. *J Biol Chem* 279, 6426-33
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G und Markwardt F (2007) Kinetics of P2X7 Receptor-Operated Single Channels Currents. *Biophys J* 92, 2377-91
- Robert A, Irizarry Sn, Hughes Te und Howe Jr (2001) Subunit interactions and AMPA receptor desensitization. *J Neurosci* 21, 5574-86
- Roberts Ja und Evans Rj (2004) ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *J Biol Chem* 279, 9043-55
- Roberts Ja und Evans Rj (2005) Mutagenesis studies of conserved proline residues of human P2X receptors for ATP indicate that proline 272 contributes to channel function. *J Neurochem* 92, 1256-64
- Roberts Ja und Evans Rj (2006) Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP. *J Neurochem* 96, 843-52
- Roberts Ja und Evans Rj (2007) Cysteine substitution mutants give structural insight and identify ATP binding and activation sites at P2X receptors. *J Neurosci* 27, 4072-82
- Roberts Ja, Digby Hr, Kara M, El Ajouz S, Sutcliffe Mj und Evans Rj (2008) Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X2 and P2X4 receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors. *J Biol Chem*
- Roberts Pj (1975) Glutamate binding to synaptic membranes - detection of post-synaptic receptor sites? *J Physiol* 247, 44P-5P
- Robson Sc, Sevigny J und Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* 2, 409-30
- Saiki Rk, Scharf S, Faloona F, Mullis Kb, Horn Gt, Erlich Ha und Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4
- Schagger H und Von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-31
- Schagger H, Cramer Wa und Von Jagow G (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217, 220-30
- Schorge S und Colquhoun D (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23, 1151-8
- Silman I und Karlin A (1969) Acetylcholine receptor: covalent attachment of depolarizing groups at the active site. *Science* 164, 1420-1
- Smit Ab, Syed Ni, Schaap D, Van Minnen J, Klumperman J, Kits Ks, Lodder H, Van Der Schors Rc, Van Elk R, Sorgedraeger B, Brejc K, Sixma Tk und Geraerts Wp (2001) A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411, 261-8
- Smith Tg, Jr., Barker Jl, Smith Bm und Colburn Tr (1980) Voltage clamping with microelectrodes. *J Neurosci Methods* 3, 105-28
- Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez Jm, Hollmann M, Karschin C und Stuhmer W (1996) P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3684-8
- Spelta V, Jiang Lh, Surprenant A und North Ra (2002) Kinetics of antagonist actions at rat P2X2/3 heteromeric receptors. *Br J Pharmacol* 135, 1524-30
- Spelta V, Jiang Lh, Bailey Rj, Surprenant A und North Ra (2003) Interaction between cysteines introduced into each transmembrane domain of the rat P2X2 receptor. *Br J Pharmacol* 138, 131-6
- Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard Po, O'hara Pj und Heinemann Sf (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 13, 1345-57
- Stoop R, Thomas S, Rassendren F, Kawashima E, Buell G, Surprenant A und North Ra (1999) Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol Pharmacol* 56, 973-81
- Sucher Nj, Deitcher Dl, Baro Dj, Warrick Rm und Guenther E (2000) Genes and channels: patch/voltage-clamp analysis and single-cell RT-PCR. *Cell and tissue research* 302, 295-307

- Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M und Gouaux E (2002) Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* 417, 245-53
- Sutcliffe Mj, Wo Zg und Oswald Re (1996) Three-dimensional models of non-NMDA glutamate receptors. *Biophys J* 70, 1575-89
- Takeuchi Glutamic Acid as an Excitatory Transmitter. In Perspectives on neuroscience : from molecule to mind. (1985) Tsukada Ye University of Tokyo Press
- Tanner Nk, Cordin O, Banroques J, Doere M und Linder P (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell* 11, 127-38
- Thangudu Rr, Sharma P, Srinivasan N und Offmann B (2007) Analcys: a database for conservation and conformation of disulphide bonds in homologous protein domains. *Proteins* 67, 255-61
- Tierney Ml und Unwin N (2000) Electron microscopic evidence for the assembly of soluble pentameric extracellular domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Mol Biol* 303, 185-96
- Torres Ge, Egan Tm und Voigt Mm (1999a) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274, 6653-9
- Torres Ge, Egan Tm und Voigt Mm (1999b) Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly. *J Biol Chem* 274, 22359-65
- Unwin N (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol* 229, 1101-24
- Unwin N (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373, 37-43
- Unwin N (2003) Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett* 555, 91-5
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* 346, 967-89
- Valera S, Hussy N, Evans Rj, Adami N, North Ra, Surprenant A und Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516-9
- Vial C, Roberts Ja und Evans Rj (2004) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 25, 487-93
- Vial C, Rigby R und Evans Rj (2006) Contribution of P2X1 receptor intracellular basic residues to channel properties. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 244-8
- Werner P, Seward Ep, Buell Gn und North Ra (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15485-90
- Weston Mc, Schuck P, Ghosal A, Rosenmund C und Mayer Ml (2006) Conformational restriction blocks glutamate receptor desensitization. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1120-7
- Whitlock A, Burnstock G und Gibb Aj (2001) The single-channel properties of purinergic P2X ATP receptors in outside-out patches from rat hypothalamic paraventricular parvocells. *Pflugers Arch* 443, 115-22
- Wilkinson Wj, Jiang Lh, Surprenant A und North Ra (2006) Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol Pharmacol* 70, 1159-63
- Wollmuth Lp und Sobolevsky Ai (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 27, 321-8
- Wong Ay, Burnstock G und Gibb Aj (2000) Single channel properties of P2X ATP receptors in outside-out patches from rat hippocampal granule cells. *J Physiol* 527 Pt 3, 529-47
- Worthington Ra, Smart Ml, Gu Bj, Williams Da, Petrou S, Wiley Js und Barden Ja (2002) Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function. *FEBS Lett* 512, 43-6
- Yan Z, Liang Z, Tomic M, Obsil T und Stojilkovic Ss (2005) Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel. *Mol Pharmacol* 67, 1078-88
- Yan Z, Liang Z, Obsil T und Stojilkovic Ss (2006) Participation of the Lys313-Ile333 sequence of the purinergic P2X4 receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. *J Biol Chem* 281, 32649-59
- Yang W, Steen H und Freeman Mr (2008) Proteomic approaches to the analysis of multiprotein signaling complexes. *Proteomics* 8, 832-51
- Zemkova H, Yan Z, Liang Z, Jelinkova I, Tomic M und Stojilkovic Ss (2007) Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions. *J Neurochem* 102, 1139-50

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Übersicht der drei großen Familien der Neurotransmitter-gesteuerten Ionenkanäle	2
Abbildung 1.2 Übersicht der „Cys-Loop“-Rezeptoren und Untereinheiten	3
Abbildung 1.3 Übersicht der iGluRn und Untereinheiten	7
Abbildung 1.4 Übersicht der purinergen Rezeptoren und Untereinheiten	10
Abbildung 1.5 Primärsequenz des P2X ₁ -Rezeptors der Ratte	12
Abbildung 2.1 Amplifikationsprinzip der Mutagenese-PCR	31
Abbildung 2.2 <i>Xenopus laevis</i> Weibchen in der Dorsalansicht.....	34
Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der Spannungsklemme.	43
Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der P2X ₂ -1-Chimäre	49
Abbildung 3.2 Biochemischer Vergleich der Assemblierung und der Glykosylierung der P2X ₂ -1-Chimäre und des wt-P2X ₁ -Rezeptor	50
Abbildung 3.3 Übersicht der Auftrennung der verschiedenen P2X ₂ -1-Chimäre Cystein-Mutationen in einem nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gel	52
Abbildung 3.4 Vergleichende nicht-reduzierende SDS-PAGE der Chimäre mit und ohne C8S Mutation, mit und ohne Iodacetamid während der Aufarbeitung.....	53
Abbildung 3.5 Autoradiogramm der Cystein-substituierten P2X ₁ -Mutanen nach Einzeldexpression.....	54
Abbildung 3.6 Deglykosylierung der Cystein-Mutationen in P2X ₁ -Rezeptoren. Autoradiogramm eines reduzierenden SDS-PAGE-Geles mit den aufgetrennte	55
Abbildung 3.7 Oberflächenmarkierte P2X ₁ -Einzelmutationen	56
Abbildung 3.8 ATP-Dosis-Wirkungs-Relationen der P2X ₂ -1-Cystein-Mutanten	57
Abbildung 3.9 Übersicht der P2X ₁ -K68C- und P2X ₁ -F291C- Koexpressionsexperimente.....	59
Abbildung 3.10 Relative Intensität des Dimers zu Gesamtprotein der einzeln- und koexprimierten P2X ₁ -K68C- und F291C-Untereinheiten.....	60
Abbildung 3.11 Koexpression der P2X ₁ -F185C-Mutante mit sieben anderen Cystein-mutanten der Ektodomäne	61
Abbildung 3.12 A, B, C Autoradiogramm metabolisch markierter P2X ₁ -Doppelmutanten	62
Abbildung 3.13 Spezifische Unterbindung der Disulfidbrückenbildung zwischen P2X ₁ -K68C- und F291-Mutanten durch ATP.....	64
Abbildung 3.14 Funktionelle Untersuchung der P2X ₂ -1-K68C/F291C-Doppelmutante.....	66
Abbildung 3.15 ATP-Einfluss auf die Reoxidation der P2X ₂ -1-K68C/F291C-Doppelmutante	67
Abbildung 3.16 TEVC-Untersuchung der koexprimierten unmutierten und K68C/K309C-doppelt mutierten P2X ₂ -1-Chimär.....	68
Abbildung 3.17 Oberflächenmarkierte P2X ₂ -, P2X ₃ - und P2X ₄ -Cysteinmutanten	70
Abbildung 3.18 Quantitative Auswertung der Dimerisierung der P2X ₃ - und P2X ₄ -Cysteinmutanten	72
Abbildung 3.19 Heteromerisierung der P2X ₁ - und P2X ₂ -Cysteinmutanten	73
Abbildung 3.20 Funktionelle Charakterisierung des heteromeren P2X ₁ -K68C- / P2X ₂ -F289C-Rezeptors.....	75
Abbildung 4.1 Theoretische heteromere Rezeptoren bei Koexpression von P2X ₂ - und P2X ₃ -Mutanten	89
Abbildung 4.2 Theoretische Rezeptorpopulationen bei Koexpression von doppelt- und nicht-mutierten Untereinheiten	90
Abbildung 4.3 Mögliche Lokalisation der ATP-Bindungstasche zwischen zwei benachbarten Untereinheiten	95
Gleichung 4.1 Formel der Binomialverteilung.....	97
Abbildung 4.4 Berechnung der Dimerfraktion für quervernetzte Untereinheiten.	98

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 verwendete Oligonukleotide	24
Tabelle 2.2 Pipettieranleitung für SDS-PAGE Trenngele	39
Tabelle 2.3 Pipettieranleitung Sammelgel.....	39
Tabelle 2.4 Pipettieranleitung für BN-PAGE Gele	40
Tabelle 3.1 Affinitäten der homomeren P2X-Rezeptoren der Ratte	45
Tabelle 3.2 Übersicht verwendeter Aminosäuren	48

Tabelle 3.3 Funktionelle Kenndaten der einzeln und koexprimierten P2X₁- und P2X₂-Rezeptormutanten 74

Tabelle 3.4 Erwartete Dimerisierung der koexprimierten P2X-Cysteinmutanten 77

7.3 Abkürzungen

2-meSATP	2-Methylthio-ATP
5-HT ₃ R	Serotonin-Rezeptor Typ3
αβ-meATP	α,β-Methylen-ATP
AChBP	Acetylcholin-Bindeprotein
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASIC	Acid sensing ion channel
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPγS	Adenosin 5'-O-(3-thiotriphosphat)
BN	Blaue-Native
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BzATP	3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl-ATP
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	halbmaximale Sättigungskonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo H	Endoglycosidase H
<i>et al.</i>	et altera (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
GABA	γ-Aminobuttersäure
GluR	Glutamat-Rezeptor
GlyR	Glycin-Rezeptor
HCl	Salzsäure
HEK	human embryonic kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
His-	Hexahistidyl-
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	Konzentration, die zur halbmaximalen Hemmung führt
iGluR	ionotroper Glutamat-Rezeptor
iGluRen	ionotrope Glutamat-Rezeptoren
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani
M	Molar
mol	Mol
mRNA	messenger RNA

MTSET	Ethyltrimethylammonium–methanthiosulfonat
nAChR	nikotinischer Acetylcholin–Rezeptor
nAChRen	nikotinische Acetylcholin–Rezeptoren
NF	Abkürzung für Suraminderivate
NMDA	N–Methyl–D–Aspartat
NMDG	N–Methyl–D–glucamin
NTP	Nukleotidtriphosphate
OD	optische Dichte
ORi	Oozyten–Ringerlösung
PAGE	Polyacrylamid–Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffer saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	potentium Hydrogenii
PKC	Proteinkinase C
PNGase F	Peptid:N–Glycosidase F
PPADS	Pyridoxalphosphat–6–azophenyl–2',4'–disulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleïnase
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris–Borat–EDTA
TE	Tris–EDTA–Puffer
Temed	N,N,N',N'–Tetramethylethylendiamin
TEVC	two–electrode voltage clamp
TM	Transmembranregion
TMD	Transmembrandomäne
TNP–ATP	2',3'–O–(2,4,6–Trinitrophenyl)–adenosin–5'–triphosphat
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Die Gewichts– bzw. Mengeneinheiten entsprechen den SI–Einheiten. Die Bezeichnung der Aminosäuren erfolgte nach der internationalen UPAC–Nomenklatur.

7.4 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Benjamin Marquez-Klaka
Geburtsdatum: 20.12.1976
Geburtsort: Büdingen (Oberhessen), Deutschland
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch, spanisch
Anschrift: Ingelheimer Strasse 24
60529 Frankfurt am Main

SCHULISCHE BILDUNG

1987 – 1996 Wolfgang-Ernst Gymnasium Büdingen
Juni 1996 Abschluss Abitur

ZIVILDIENTST

07.1996 – 08.1997 Zivildienst als Rettungshelfer beim DRK in Büdingen
07.1997 – 05.1998 Rettungssanitäter bei dem DRK in Büdingen.
06.1998 – 08.1998 Rettungssanitäter bei der Rettungswache Bergen-Enkheim e.V.
in Frankfurt am Main.

STUDIUM UND PROMOTION

10.1998 – 10.2003 Studium der Humanbiologie an der Universität Marburg
07.2000 Vordiplomsprüfung
12.2002 Diplomprüfung
01.2003 – 10.2003 Diplomarbeit in der Humangenetik Arbeitsgruppe HD Dr. J. Kunz mit dem Thema: „Etablierung eines Bakteriellen-2-Hybrid Assays zu Identifizierung von potenziellen Protein-Interaktionspartner für WFS1“
11.2003 – 5.2004 Wissenschaftlicher Angestellter der Ruprechts-Karls-Universität Heidelberg am Institut für Neurobiologie (Prof. Dr. K. Unsicker) in der Arbeitsgruppe Dr. K. Tucker.
6.2004 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Abteilung Neurochemie (Prof. Dr. H. Betz) in der Arbeitsgruppe Dr. A. Nicke.

7.5 Originalarbeiten

Kunz J, **Marquez–Klaka B**, Uebe S, Volz–Peters A, Berger R und Rausch P (2003) Identification of a novel mutation in WFS1 in a family affected by low–frequency hearing impairment. *Mutat Res.* 525:121–4

Marquez–Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T und Nicke A (2007) Identification of an intersubunit cross–link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *J Neurosci.* 27:1456–66

Marquez–Klaka B, Rettinger J und Nicke A (2008) Inter–subunit disulfide cross–linking in homomeric and heteromeric P2X receptors. *Eur Biophys J.* Apr 22. In Druck

7.6 Vorträge und Posterpräsentationen

Sep. 2005 First joint Italian–German purine club meeting in Chieti, Italien. **Postertitel:** Approaches to investigate P2X receptor complexes in native tissues using subtype–specific antibodies and BN–PAGE. A. Nicke, F. Soto, **B. Marquez–Klaka**

Mai 2006 8th International Symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides in Ferrara, Italien. **Vortragstitel:** Identification of an inter–subunit cross–link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2XR. **B. Marquez–Klaka**, Y. Bhargava, J. Rettinger und A. Nicke

Okt. 2006 Society for Neuroscience 36th Annual Meeting in Atlanta, GA, USA. **Postertitel:** Functional and biochemical identification of a cross–link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X₁ receptor. **B. Marquez–Klaka**, Y. Bhargava, J. Rettinger und A. Nicke

Mär. 2007 48. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz. **Postertitel:** Functional and biochemical evidence for an inter–subunit localization of the ATP binding site in P2X receptors. **B. Marquez–Klaka**, J. Rettinger und

A. Nicke. *Naunyn–Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology, Volume 375, Supplement 1 / März 2007*

- Jul. 2007 European Biophysical Society Satellite Symposium on Ion Channels in Leeds, England. **Postertitel:** Analysis of P2X receptor heteromerisation by inter-subunit disulfide cross-linking. **B. Marquez–Klaka, J. Rettinger und A. Nicke**
- Okt. 2007 Symposium der Russischen Akademie der Wissenschaften und der Alexander–von–Humboldt Stiftung: „Neuroreceptors: structure, mechanism of action and role in pathologies“, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moskau, Russland. **Vortragstitel:** Functional and biochemical evidence for an inter-subunit crosslink in the putative ATP binding site in P2X receptors. **B. Marquez–Klaka, J. Rettinger, A. Nicke**
- Nov. 2007 Second joint Italian–German purine club meeting in Leipzig. **Postertitel:** Analysis of P2X receptor heteromerisation by inter-subunit disulfide cross-linking. **B. Marquez–Klaka, J. Rettinger und A. Nicke**

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt a.M., den

Benjamin Marquez-Klaka