

Identifizierung von Assemblierungsdomänen von P2X-Rezeptoren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Wiebke Duckwitz
aus Hamburg

Frankfurt am Main 2007
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. Harald Schwalbe
1. Gutachter:	Prof. Dr. Günter Lambrecht
2. Gutachter:	Prof. Dr. Günther Schmalzing
Datum der Disputation:	20.12.2007

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2003 bis April 2007 unter der Anleitung von Prof. Dr. Günther Schmalzing am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Molekulare Pharmakologie 2, des Universitätsklinikums der RWTH Aachen angefertigt.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die tatkräftige Unterstützung durch viele Menschen in meinem Umfeld nicht zustande gekommen.

Besonderer Dank gilt hier meinem Doktorvater Günther Schmalzing. Er hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, an diesem interessanten Thema zu arbeiten, sondern mich während der Jahre der Zusammenarbeit sowohl wissenschaftlich als auch menschlich sehr gut betreut.

Weiter möchte ich dem gesamten Arbeitskreis von Prof. Schmalzing sowie den weiteren Arbeitsgruppen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der RWTH Aachen für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit danken. Es ist keine Selbstverständlichkeit, in solch einer freundschaftlichen Atmosphäre arbeiten zu dürfen.

Frau Brahm und Sylvia danke ich für die unermüdliche Hilfe bei der täglichen Laborarbeit, das Beantworten aller technischen Fragen und die Versorgung mit Puffern, Zellen, RNA, unzähligen Konstrukten und vielem mehr.

Ralf, Christiane, Cindy und Christian bin ich sehr dankbar für die elektrophysiologischen Untersuchungen meiner sämtlichen Konstrukte, die sie sehr viel Zeit und Nerven gekostet haben.

Cristina, Tom, Niki, Ronja, Heike, Svenja und allen anderen danke ich für die nette Zusammenarbeit, die vielen angeregten fachlichen Diskussionen, die Hilfe bei der Laborarbeit, die kritische Beurteilung meiner Vorträge und Poster und vor allem für die moralische Unterstützung auch in kritischen Zeiten. Die gemeinsamen Freizeitaktivitäten haben sehr zu der gelungenen Zeit in Aachen beigetragen und somit Kraft und Motivation für das Anfertigen dieser Arbeit gegeben. An dieser Stelle sei auch meine Fußballgruppe erwähnt, mit der ich sehr viel Spaß hatte, sowie das Kontakthüpfen zusammen mit Tom, Cristina und Carsten.

Sehr wichtig war auch meine Familie, die mich immer unterstützt, motiviert und moralisch aufgebaut hat. Besonders mein Bruder Sönke und Svenja waren eine große Hilfe und Bereicherung für mich, da sie ebenfalls in Aachen gewohnt haben und so einen großen Anteil an meinem Leben hatten. Ohne die technische Unterstützung meines Bruders wäre außerdem die Formatierung dieser Arbeit schwierig geworden. Auch das Korrekturlesen durch meine Mutter war für mich von unschätzbarem Wert.

Am wichtigsten war und ist für mich aber mein Freund Carsten, den ich erst während meiner Promotion in Aachen kennen gelernt habe, und der somit einen großen Einfluss auf meine Zeit hier hatte. Ihm danke ich von ganzem Herzen für die fachliche und moralische Unterstützung, sein unendliches Verständnis, seine Geduld und Liebe!

Du weißt nicht, zu welchen Höhen Du dich aufschwingen kannst, solange Du Deine Flügel nicht ausbreitest.

Für Thomas.

1.	Einleitung	1
1.1	Ligandengesteuerte Ionenkanäle	1
1.2	Purinerge Rezeptoren	2
1.3	P2X-Rezeptoren	3
1.3.1	Topologie und Struktur.....	5
1.3.2	Lokalisation und physiologische Funktionen.....	7
1.3.3	Pharmakologie.....	8
1.3.4	Assemblierung.....	12
1.4	Biosynthese von Membranproteinen	14
1.4.1	Überblick über den Sekretionsweg.....	14
1.4.2	Integration von Transmembranregionen in die ER-Membran.....	17
1.4.3	Faltung und Assemblierung von Membranproteinen.....	20
2.	Zielsetzung der Arbeit	22
3.	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Chemikalien.....	25
3.1.2	Oligonukleotide.....	25
3.1.3	Enzyme.....	25
3.1.4	Wasser.....	25
3.2	Molekularbiologische Methoden	25
3.2.1	Für die Klonierungen verwendete Vektoren und Plasmide.....	25
3.2.2	Verfahren zur Transformation und Isolierung von Plasmiden.....	26
3.2.3	Gerichtete Mutagenese zur Modifikation der cDNA-Konstrukte.....	26
3.2.4	PCR-Amplifikation und Umklonierung von cDNA.....	27
3.2.5	DNA-Sequenzierung.....	29
3.2.6	Klonierte cDNA-Konstrukte.....	29
3.3	cRNA-Synthese	29
3.4	<i>Xenopus</i>-Oozyten als Expressionssystem	30
3.4.1	Herkunft und Haltung der Frösche.....	30
3.4.2	Gewinnung des Ovars.....	30
3.4.3	Kollagenase-Behandlung der <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	30
3.4.4	cRNA-Injektion in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	31
3.5	Proteinchemische Methoden	31

3.5.1	Metabolische Markierung mittels L-[³⁵ S]-Methionin	31
3.5.2	Aufreinigung der Proteine mit Ni ²⁺ -Chelatchromatographie.....	32
3.5.3	Oberflächenmarkierung durch ¹²⁵ I-Sulfo-SHHP.....	34
3.5.4	Enzymatische Deglykosylierung.....	35
3.5.5	Limitierte Trypsinolyse.....	35
3.5.6	Oxidatives Crosslinking von Cysteinresten	35
3.6	Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE).....	36
3.6.1	Denaturierende SDS-PAGE	36
3.6.2	Denaturierende Tricin-SDS-PAGE	39
3.6.3	Blaue-Native-PAGE.....	40
3.7	Detektion der Proteine	41
3.7.1	PhosphorImaging	41
3.7.2	BioMax MS Filme	41
3.8	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an <i>Xenopus</i>-Oozyten	42
4.	Ergebnisse.....	44
4.1	Assemblierung humaner P2X₅-Untereinheiten	44
4.1.1	Funktionelle rP2X ₅ -Rezeptoren haben eine trimere Architektur	44
4.1.2	hP2X ₅ -Untereinheiten ohne Exon 10 können nicht trimerisieren.....	46
4.1.3	Nicht alle Exon 10-Aminosäuren sind für die Trimerisierung der hP2X ₅ ^{Δ328-349} -Untereinheiten notwendig	47
4.1.4	In Exon 10 ist kein sequenzspezifisches Trimerisierungsmotiv enthalten ..	50
4.1.5	Die Hydrophobizität der Exon 10-Sequenz ist essentiell für die Trimerisierung	51
4.1.6	Die Region N-terminal zur zweiten Transmembranregion enthält wichtige Assemblierungsinformationen	55
4.1.7	Die zweite Transmembranregion enthält kein spezifisches Assemblierungsmotiv	59
4.1.8	Die Positionierung der zweiten Transmembranregion ist wichtig für die Trimerisierung von hP2X ₅ -Untereinheiten	61
4.1.9	Die Hydrophobizität der gesamten zweiten Transmembranregion ist wichtig für die korrekte Membraninsertion.....	65
4.1.10	Aspartat 355 spielt eine wichtige Rolle bei der Assemblierung von hP2X ₅ - Untereinheiten	67

4.1.11	Aspartat 355 ist wahrscheinlich an einer Wasserstoffbrücken-bildung beteiligt.....	74
4.1.12	Suche nach einem Interaktionspartner von ³⁵⁵ D.....	76
4.1.13	Trimerisierende hP2X ₅ -Mutanten sind ebenso kompakt gefaltet wie die Wildtyp-hP2X ₅ -Untereinheit.....	82
4.2	Assemblierung von P2X₁-Untereinheiten der Ratte	89
4.2.1	Die Transmembranregionen der rP2X ₁ -Untereinheit enthalten keine spezifischen Assemblierungsmotive.....	89
4.2.2	Die Ausbildung der zweiten Transmembranregion ist essentiell für die Assemblierung von rP2X ₁ -Untereinheiten	94
4.2.3	Die Transmembranregionen allein besitzen kein Assemblierungs-vermögen.	96
4.2.4	Die Ektodomäne der rP2X ₁ -Untereinheit kann teilweise assemblieren	97
4.2.5	Die Ektodomänen-Konstrukte bilden SDS-resistente, DTT-sensitive Oligomere.....	101
4.2.6	Das Einfügen der zweiten Transmembranregion bringt keine verbesserte Trimerisierung des ^{NCAM-Ecto} rP2X ₁ ⁵²⁻³²⁷ -Konstruktes	103
4.2.7	Koexprimierte, sich überlappende Teilstrukturen der rP2X ₁ -Untereinheit trimerisieren besser als die Teilstrukturen allein.....	104
4.2.8	Die gesamte Ektodomäne der rP2X ₁ -Untereinheit enthält wichtige Assemblierungsinformationen	107
4.3	Assemblierung von Chimären zwischen rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten	114
4.3.1	rP2X ₆ -Untereinheiten können keine funktionellen Homotrimere ausbilden	114
4.3.2	rP2X ₁ -rP2X ₆ - und rP2X ₆ -rP2X ₁ -Chimären haben ein defektes Assemblierungsverhalten	116
4.3.3	Eine rP2X ₆ -rP2X ₁ -rP2X ₆ -Chimäre ist in der Lage zu trimerisieren	117
4.3.4	Das erste Drittel der Ektodomäne enthält mindestens eine wichtige Assemblierungsdomäne	120
5.	Diskussion	123
5.1	Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten.....	123
5.1.1	Die zweite Transmembranregion spielt eine wichtige strukturelle Rolle bei der Trimerisierung von hP2X ₅ -Untereinheiten	124

5.1.2	Die zweite Transmembranregion der hP2X ₅ -Untereinheit enthält keine spezifischen Assemblierungsmotive.....	125
5.1.3	Eine Wasserstoffbrücke zwischen Transmembranregionen könnte die Trimerisierung von hP2X ₅ -Untereinheiten stabilisieren	126
5.1.4	Ionische Wechselwirkungen zwischen Transmembranregionen haben keinen Anteil an der Assemblierung von hP2X ₅ -Untereinheiten.....	128
5.1.5	Wahrscheinlich interagieren die zweiten Transmembranregionen verschiedener Untereinheiten miteinander	129
5.1.6	Ein negativer hydrophober <i>Mismatch</i> führt zu der Aggregation von hP2X ₅ -Untereinheiten	131
5.1.7	Die Trimerisierung von hP2X ₅ -Untereinheiten wird durch Aminosäuren an der Membran-Wasser-Grenze unterstützt	132
5.1.8	Der Einfluss der Aminosäuren-Seitenketten der zweiten Transmembranregion auf die Funktion des Ionenkanals.....	133
5.2	Assemblierung von rP2X₁-Untereinheiten	135
5.2.1	Die Transmembranregionen enthalten keine spezifischen Assemblierungsmotive	135
5.2.2	Ektodomänen-Konstrukte der rP2X ₁ -Untereinheit assemblieren nicht nur über nicht kovalente Wechselwirkungen	138
5.2.3	Ohne die Transmembranregionen findet keine effiziente Trimerisierung von rP2X ₁ -Untereinheiten statt.....	139
5.2.4	Die Ektodomäne enthält multiple Assemblierungsdomänen	140
5.3	Assemblierung von Chimären zwischen rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten	143
6.	Zusammenfassung	147
7.	Literaturverzeichnis	149
8.	Anhang.....	168
8.1	cDNA-Konstrukte	168
8.1.1	Von mir verwendete und hergestellte cDNA-Konstrukte	168
8.1.2	Von mir verwendete, aber nicht hergestellte cDNA-Konstrukte.....	179
8.2	Abkürzungen	182
9.	Lebenslauf	185

1. Einleitung

1.1 Ligandengesteuerte Ionenkanäle

Ligandengesteuerte Ionenkanäle (ionotrope Rezeptoren) sind membranständige Proteine, die ebenso wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Enzym-assoziierte Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der synaptischen Signaltransmission spielen. Auf die Bindung eines extrazellulären Liganden folgt durch Konformationsänderungen des Rezeptorproteins die Öffnung oder Schließung einer Kanalpore, die meist hochselektiv für bestimmte Ionen (Natrium, Kalium, Calcium oder Chlorid) ist und so deren Aus- oder Einstrom ermöglicht beziehungsweise unterbindet. Die durch ligandengesteuerte Ionenkanäle vermittelte Signaltransduktion verläuft sehr schnell, sie tritt innerhalb weniger Millisekunden ein, wodurch sich die Ionenkanäle von den langsameren metabotropen Rezeptoren unterscheiden. Als physiologische Liganden können zum Beispiel die Neurotransmitter Acetylcholin, Serotonin, GABA, Glycin, Glutamat oder ATP dienen. Neben den ligandengesteuerten Ionenkanälen gibt es auch mechanosensitive, wie zum Beispiel MscL aus *E. coli*, oder spannungsabhängige Ionenkanäle, wie zum Beispiel spannungsabhängige Kaliumkanäle, die durch Änderungen des Membranpotentials aktiviert werden. Je nach Art des entstehenden Ionenstroms unterscheidet man excitatorische und inhibitorische Rezeptoren. Ein Anioneneinstrom oder Kationenausstrom führt zu einer Hyperpolarisation und damit durch die Erhöhung des Membranpotentials zu einem inhibitorischen Effekt, während ein Kationeneinstrom eine Depolarisation bewirkt.

Aufgrund ihrer Struktur werden drei verschiedene Klassen von ligandengesteuerten Ionenkanälen unterschieden (Nicke et al., 1999a). Diese Klassen besitzen keine Sequenzähnlichkeiten, haben aber einen gemeinsamen Grundaufbau. Dieser umfasst eine oder mehrere extrazelluläre Domänen, die die Ligandenbindungsstelle beinhalten, intrazelluläre Domänen und mehrere Transmembranregionen, von denen mindestens eine die Ionenpore bildet. Darüber hinaus sind die meisten Ionenkanäle multimere Proteine, die aus mehreren homologen Untereinheiten zusammengesetzt sind.

Die am besten untersuchte Klasse ist die der Cys-Loop-Rezeptoren (Ortells and Lunt, 1995), die die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR), 5HT₃-Rezeptoren (beide excitatorische Kationenkanäle) und die GABA_A- und Glycin-Rezeptoren (GlyR) (beide inhibitorische Anionenkanäle) umfasst. Cys-Loop-Rezeptoruntereinheiten besitzen vier Transmembranregionen mit extrazellulären N- und C-Termini. Charakteristisch für diese

Klasse sind zwei konservierte Cysteinreste im N-Terminus, die über eine Disulfidbindung eine Schleife aus 15 Aminosäuren erzeugen, wodurch diese Unterklasse ihren Namen erhalten hat. Die funktionellen Cys-Loop-Rezeptoren bestehen aus fünf Untereinheiten und sind meistens Heteropentamere.

Die zweite Rezeptorfamilie beinhaltet die ionotropen Glutamatrezeptoren (Hollmann and Heinemann, 1994), zu denen NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren gehören. Glutamatrezeptoren sind excitatorische Kationenkanäle. Diese Rezeptorfamilie bildet ebenfalls zumeist Heterooligomere, die allerdings eine tetramere Stöchiometrie aufweisen. Die Untereinheiten bestehen aus drei Transmembranregionen, einer hydrophoben „reentry loop“, einem extrazellulären N-Terminus sowie einem intrazellulären C-Terminus (Dani and Mayer, 1995)

Die dritte Klasse schließlich bilden die P2X-Rezeptoren, die durch extrazelluläres ATP aktiviert werden (Valera et al., 1994). Diese Rezeptorfamilie bildet homo- und heterotrimere Kationenkanäle (Nicke et al., 1998), die je Untereinheit aus zwei Transmembranregionen, einer extrazellulären Schleife und intrazellulären N- und C-Termini aufgebaut sind.

1.2 Purinerge Rezeptoren

1929 wurde erstmals die Wirkung von Purinen auf Herz und Blutgefäße beschrieben (Drury and Szent-Gyorgyi, 1929). Es dauerte aber noch bis 1976, bis der Begriff der „purinergen Rezeptoren“ (P-Rezeptoren) erstmals verwendet wurde (Burnstock, 1976). Zwei Jahre später wurden die P-Rezeptoren in zwei Klassen unterteilt: die P1-Rezeptoren, die durch Adenosin aktiviert werden, und die P2-Rezeptoren, die durch ATP oder ADP aktiviert werden. 1985 wurde aufgrund verschiedener pharmakologischer Eigenschaften wiederum eine Einteilung der P2-Rezeptoren in zwei Klassen vorgeschlagen, nämlich in die P2X-Rezeptoren und die P2Y-Rezeptoren (Burnstock and Kennedy, 1985), (Burnstock, 2006). Erst die Klonierung verschiedener Subtypen führte schließlich zu der heute gebräuchlichen Unterteilung in ionotrope P2X-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren (Abbraccio and Burnstock, 1994), (Brake et al., 1994), (Barnard et al., 1994), (Valera et al., 1994), (Fredholm et al., 1994), (Webb et al., 1993). Purinerge Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei den verschiedensten physiologischen Vorgängen sowohl in neuronalen als auch in nicht neuronalen Zellen. Dazu gehören unter anderem exokrine und endokrine Sekretion, Immunantwort, Entzündung, Zellproliferation, Apoptose, Gefäßregulation und Blutgerinnung.

1.3 P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren sind kationenselektive ligandengesteuerte Ionenkanäle. Bisher wurden sieben P2X-Isoformen kloniert (P2X₁-P2X₇), außerdem sind von allen Isoformen Spleiß-Varianten bekannt. P2X-Untereinheiten haben eine Länge zwischen 379 (rP2X₆-Untereinheit) und 595 (rP2X₇-Untereinheit) Aminosäuren (North, 2002). Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Isoformen unterscheiden sich hauptsächlich in der zytosolisch gelegenen C-terminalen Domäne. Im übrigen Anteil der Proteine besitzen alle paarweise miteinander verglichenen Isoformen eine Identität von jeweils 40-55% (North, 2002). Abb. 1-1 zeigt ein Alignment der sieben Isoformen der Ratte.

```

rP2X1 -MARRLQDELAEFFFEYDTPRMVIVRNKKVGVIFRLIQVIVVIVVIVGWVFEYKGYQTSSD-LISSVSVKLKLGLAVTQLQG-----LGPQVWDVADYVFFPAHG
rP2X2 -MVRRLARGCWSAFWDYETPKVIVWRNRRLGFVHRMVQLLILLYFVWVVFIVQKSYQDSEITGPESIIITKVKGITWS-----EDKVDVVEEYVKKPPEG
rP2X3 -----MNCISDFFTYETFTKSVVWSKWTIGIINRAVQLLIIISYFVGVWFLHEKAYQVRDTAIESSVVTKVKGFGFY-----ANRVMVDSYDVTTPQG
rP2X4 --MAGCCSVLGSFLFEYDTPRIVLIRSRKVGLMNRVQLLILAYVIGWVFEWKEGYQETDS--VVSSTTKAKGVAVTNT-----SQLGFRILWDVADYVIPAQE
rP2X5 -MGQAAWKGFVLSLFDYKTAKFVVAKSKVGLLYRVLQLLILLYLLIIVWFLIKKSYQDITSLQASVVTTKVKGVAVTNTM-----LGERLMDVADFVIPSQG
rP2X6 MASAVAAALVSWGFLDKYKTEKYVMTRNCWVIGISQRLQLQGVVVVIGWALLAKKGYQEWMDPQISVITKLGVSVTQVKE-----LEKRLMDVADFVIPSQG
rP2X7 --MPACCSWN--DVFOYETNKVTRIQSVNYGTIKWILHMTVFSYVS--PALMSDKIYQKKEP--LISSVHTKVKGVAEVTENVTEGGVTIKLVHGIFFDTADYTLPLQG
* * * * *
rP2X1 DSSFVYMTNFIVTPQQTQGHCAENPE--GGICQDDSGCTPGKAERKAQGIRTCNCPVFNQ--TVKTCEIFGWCPVEVDDKIPSPALLREAEENFTLFIKNSISFFR
rP2X2 GSVSIIITRIEVTPSOTLGTCPESMR--VHSSSTCHSDDDDCIAGQLDMQNGIRTCVVPYHGDGSKTCEVSAMCPVEDG--TSDNHFLGKMAPNFTLILKNSIHYPK
rP2X3 TSVFVITKMIVTENMQGHCPENE---EKYRCVSDSQCGP--ERFPGGILITGRCVNYS--VLRTEIQGWCPTEVD--TVEMPIM--MEAEENFTLFIKNSIRFPL
rP2X4 ENSLFIMTNMIVTNQSTQSTCPEIPDK--TSICNSDADCTPESVDTHSSGVATGRCVPFNE--SVKTCVEAAMCPVENDVGVTTPAFILKAAENFTLILKNNIWIWPK
rP2X5 ENVFFVVTNLIIVTPNQOGICAEREG--IPDGECSHEDDDCHAGESVWAGHGLKTCGLRVGNSTRGTCEIFAWCPVETK--SMPDPLLLKDAEFTLISIKNFIRFPK
rP2X6 ENVFFLVTNFLTVAQVQGRCPPEHS--VPLANCWADEDCEPEMGTYSHGKITGCVAFNGTHR--TCEIWSWCPVESH--AVPRKPLLAQAKNFTLFIKNTVTFNK
rP2X7 -NSFFVMTNYLKGSEQEQKLCPEYPSR--GKQCHSDQGCIKGWMDDPQSKGIQTCRCIIPYDQ--KRRKTCEIFAWCPAEEGKEAPRALLRSAENFTLILKNNIDPPG
* * * * *
rP2X1 FKVNRNLVEEVNGTYMKKCLYHKIQHPLCPVFNGLYVVRESQDFRSLAEKGGVGTITIDMKCDLDWVHRHCKPIYQFHGLYG--EKNLSPGFNFRFARHFVQN
rP2X2 FKFSKGNIASQKSD--YLKHCFTFDQSDPYCPIFRUGFIVEKAGENFTELAHKGVGIVGIINWNCDDLSESECNPKYSFRRLDPKYDP--ASSGYNFRFAKYKIN
rP2X3 FNFEKGNLLPNLTDKIKRCRFHPEKAPFCPIILRVGDVVKAGODFAKLARTGVLGIKI GWICDLDKAWDCIPKYSFRRLDGVSEKSSVPGYNEFRFAKYKME
rP2X4 FNFSEKRNILPNITTSYLKSCIIYNAQTDFPFCPIFRUGTIVGAGHSEVWAVEGGIMGIQIKWCDLDRASLCLLPRYSFRRLDTRLEHNVSPGYNFRFAKYRDP
rP2X5 FNFSEKRNILETDNKHFLKTKTCHFSSTN--LYCPIFRUGSIVRWAGADFQDALKGGVGTIYIEMDCDLDAASKCNPHYFNRLDNKHTHS--ISSGYNFRFAKYRDP
rP2X6 FNFSEKRNALDWTNDFYKYCLYDLSLSPYCPVFRIGDLVAMTGGDFEDLALGGVGINIHWCNLDKGSDCSPQYSFQ--LQE-----RGYNFRFANYWMAA
rP2X7 HNYTTRNILLPGMN---ISCTFHKTWNPCPIFRUGDIFQEIENFTFEVAVQGGIMGIEIYWDNLDWSWHRCCQPKYSFRRLDKTYNESLFPGYNFRFAKYKEN
* * * * *
rP2X1 G-TNRRHLKVFGIHFDILVDGKAGKFDIIPMTTITGSGIGIFGVATVLCDDLILLHLIPK-----RHYKQKFKFYAEDMGPGEHDPVATS
rP2X2 GTTTTRTLIKAYGIRIDVIVHGQAGKFSLIPTIINLATALTSIGVGSFLCDWILLTFPMNK-----NKLYSHKFKDKVTRTPKHPSSRWPVTLAL
rP2X3 NGSEYRLLKAFGIRFDVIVYGNAGKFNLIPTIISVAAFTSVGVTVLDCDILINFLKLG-----ADHYKARKFEVETTTIKGTASTNPVFA
rP2X4 AGKEQRTLTKAYGIRFDIIVFGKAGKFDIIPMTMINVGSGLALLGVATVLCDDVIVLYCMKK-----KYYRDKKYKYVVEDEYEQGLSGEMNQ 388
rP2X5 NGVEFRDLMKAYGIRFDVIVNGKAGKFSIIPVTINIGSGLALMGAGAFFDLDLVLIXLIRK-----SEFYRDKKFEKVRGQKEDANVEVEANEM
rP2X6 SGVESRLLKLYGIRFDILVTGQAGKFPALIPTAITVGTGAALGMVTFLCDLILLVVDRE-----AGFYWTKYEEARAKATTNSA 379
rP2X7 G-MEKRTLKAFGVRFDIIVFGTGGKFDIILQVVYLGSTLISYFGLATVDCIDLIINIYASTCCSRVYPSCKCEPCAVNEYIYRKKCEPIVEPKPILKYVSVFVDEP
* * * * *
rP2X1 STGLQENMRTS 399
rP2X2 VLQIIPPPPSHYSDQDPPSPSGEGPTLGEAEPLAVQSPRPCSISALTEQVVDTLQHMGRPPVPEPSPQDSTSTDPKGLAQL 463
rP2X3 SDQAIVTKQSTDSGAYSIGH 397
rP2X5 EOERPEDEPLERVRQDEQSOELAQRKQNSNCOVLEPARFGLRENAIVNVKQSOILHPVKIT 455
rP2X7 HIWMVQQLLKGKSLQDVKGQEVPRQTDLELSRSLSLHSPPIPGQPEEMQLHQIEAVPRSRDSDWCQCNGNCLPQLPENRRALEELCCRKPKGCITTSSEL
rP2X7 FSKIVLSREALQLLILLYQEPILALEGHAINSKLRHCAYRSYATWRVFSQDMADFAILLPSCCRWKRKEFPKTKQGSYGFKYPY 595

```

Abb. 1-1 Alignment der sieben P2X-Isoformen der Ratte. Die beiden Transmembranregionen sind grau hinterlegt, die konservierten Cysteine sind rot dargestellt. Aminosäuren, die in allen Isoformen konserviert sind, sind mit „*“ gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit dem Programm „ClustalW Multiple Sequence Alignment“ erstellt.

1.3.1 Topologie und Struktur

Da bisher keine Röntgenkristallstruktur von P2X-Rezeptoren existiert, beruhen alle Strukturvorstellungen auf indirekten Methoden. Hydropathieanalysen haben ergeben, dass die P2X-Untereinheiten zwei hydrophobe Transmembranregionen haben (Abb. 1-1) (Valera et al., 1994). Diese sind durch einen langen extrazellulären Bereich verbunden (Newbolt et al., 1998), und die N- und C-Termini sind intrazellulär lokalisiert (Torres et al., 1998b) (Abb. 1-2). Diese Topologie wurde dadurch bestätigt, dass N-Glykosylierungssequenzen in der Ektodomäne glykosyliert werden (Newbolt et al., 1998), (Rettinger et al., 2000a), (Torres et al., 1998a) und in der Ektodomäne lokalisierte Cysteine an Disulfidbrücken beteiligt sind (Ennion and Evans, 2002a), (Clyne et al., 2002b). Darüber hinaus zeigten Versuche mit Konkameren, dass die N- und C-Termini auf der gleichen Seite der Membran lokalisiert sein müssen (Nicke et al., 2003), (Newbolt et al., 1998). Außerdem ergaben diverse Mutagenese-Experimente, dass die ATP-Bindungsstelle in der postulierten Ektodomäne liegt (Roberts and Evans, 2004), (Ennion et al., 2000), (Jiang et al., 2000b), wodurch diese Topologieannahme bestätigt wurde.

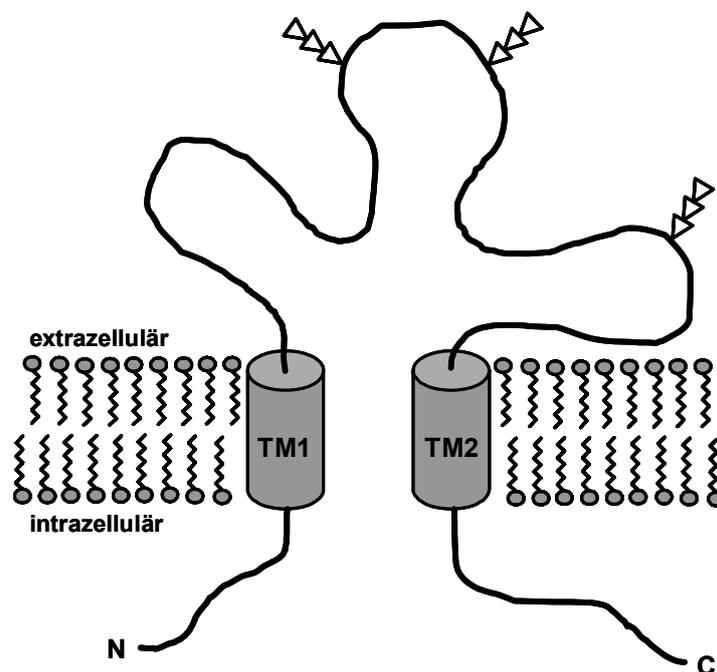


Abb. 1-2 Topologie der P2X-Rezeptoren. TM1 und TM2 sind die beiden Transmembranregionen; die N- und C-Termini sind intrazellulär lokalisiert. Die extrazelluläre Schleife ist glykosyliert (dargestellt durch Dreiecke).

Die zytoplasmatische N-terminale Domäne ist bei allen Isoformen relativ kurz (etwa 30 Aminosäuren). Sie ist bis auf die Sequenz Y-X-T-X-R/K, die eine PKC-

Phosphorylierungssequenz (Y-X-T) beinhaltet, nur schwach konserviert (Abb. 1-1). Mutationen in dieser Region führen zu einer Beschleunigung der Desensibilisierung und zu einer Abnahme der Stromamplitude (Ennion and Evans, 2002b), (Liu et al., 2003), (Boue-Grabot et al., 2000), und auch andere Aminosäuren der N-terminalen Domäne können die funktionellen Eigenschaften beeinflussen (Jiang et al., 2001), (Werner et al., 1996), was für einen direkten Einfluss dieser Region auf die Regulierung der Leitfähigkeit von P2X-Rezeptoren spricht.

Die zytoplasmatische C-terminale Domäne ist der am wenigsten konservierte Proteinbereich (Abb. 1-1). Ihre Länge variiert stark zwischen den verschiedenen Isoformen und umfasst beispielsweise bei den Ratten-Isoformen zwischen 24 (rP2X₆) und 236 (rP2X₇) Aminosäuren. Dies weist darauf hin, dass die C-terminale Domäne eine wichtige Rolle bei den isoformspezifischen funktionellen Eigenschaften spielt. Es gibt nur eine C-terminale konservierte Sequenz, das Y-X-X-X-K-Motiv, das nahe der zweiten Transmembranregion lokalisiert ist (Abb. 1-1) und als wichtig für die Oberflächenexpression diskutiert wird (Chaumont et al., 2004). Die C-Termini der verschiedenen P2X-Isoformen scheinen eine Rolle bei den Desensibilisierungseigenschaften (Werner et al., 1996), beim Gating und den Eigenschaften der Kanalpore (Eickhorst et al., 2002), (Smart et al., 2003) sowie bei der Interaktion mit anderen Proteinen zu spielen (Kim et al., 2001a), (Gendreau et al., 2003), (Boue-Grabot et al., 2003). Außerdem könnten sie für die Internalisierung einiger P2X-Rezeptoren von Bedeutung sein und damit die Anzahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche regulieren (Royle et al., 2002).

Die Ektodomäne, die bei der rP2X₁-Untereinheit die Aminosäuren 52-334 umfasst, macht bei den meisten P2X-Rezeptoren den größten Anteil am Gesamtprotein aus. Die einzige Ausnahme ist der P2X₇-Rezeptor, der eine sehr lange C-terminale Domäne besitzt. Die Ektodomäne ist der am stärksten konservierte Bereich (Abb. 1-1), wobei insbesondere 10 vollständig konservierte Cysteine auffallen. Diese Cysteine spielen durch die Ausbildung von fünf Disulfidbrücken eine wichtige Rolle bei der Faltung der Ektodomäne (Ennion and Evans, 2002a), (Clyne et al., 2002b). Außerdem sind alle P2X-Isoformen N-glykosyliert (North 2002), wobei die Anzahl der N-Glykosylierungen zwischen zwei (rP2X₅) und sechs (rP2X₄) liegen kann. Diese N-Glykosylierungen sind von Bedeutung für die Expression, Stabilität und Funktion von P2X-Rezeptoren (Rettinger et al., 2000a), (Torres et al., 1998a). Als weiteres wichtiges Strukturelement enthält die Ektodomäne die ATP-Bindungsstelle (Roberts and Evans, 2004), (Ennion et al., 2000), (Jiang et al., 2000b) und in einigen Isoformen Aminosäuren, die eine Regulation der Funktion durch Metallionen (Clyne et al., 2002a),

(Coddou et al., 2003) oder den pH-Wert (Clarke et al., 2000), (Clyne et al., 2002a) ermöglichen.

Die Transmembranregionen tragen wahrscheinlich beide zu der Bildung der Kanalpore bei (Egan et al., 1998), (Haines et al., 2001b), (Jiang et al., 2001), (Rassendren et al., 1997), wobei aber die Ergebnisse für die erste Transmembranregion nicht eindeutig sind, so dass es auch möglich ist, dass sie eventuell eher am Gating als direkt an der Pore beteiligt ist (Egan et al., 2004). Auch der Selektivitätsfilter scheint eher durch die zweite Transmembranregion gebildet zu werden, wenn er auch noch nicht definierten Aminosäuren zugeordnet werden kann (Egan et al., 2004). Darüber hinaus haben Experimente ergeben, dass die zweite Transmembranregion eine Rolle bei der Assemblierung von P2X-Untereinheiten spielen könnte (Torres et al., 1999b). Während alle bisherigen Studien übereinstimmend zu dem Ergebnis gekommen sind, dass die erste Transmembranregion eine α -helikale Struktur besitzt (Jiang et al., 2001), (Silberberg et al., 2005), (Li et al., 2004), ist die Sekundärstruktur der zweiten Transmembranregion unklar, zumindest ist wahrscheinlich, dass sie nicht vollständig α -helikal ist (Rassendren et al., 1997), (Egan et al., 1998), (Li et al., 2004), (Silberberg et al., 2005).

1.3.2 Lokalisation und physiologische Funktionen

P2X-Rezeptoren sind in den verschiedensten Geweben im ganzen Körper verbreitet und dort an den unterschiedlichsten Vorgängen beteiligt. Zudem können sie physiologisch als Homo- und als Heterotrimere sowie als Spleiß-Varianten vorkommen, wodurch ihre Funktion äußerst vielfältig ist (Burnstock, 2004). Ausführliche Zusammenfassungen der unten aufgeführten Gewebeverteilungen sind bei (North, 2002), (Burnstock, 2004), (Gever et al., 2006) zu finden.

P2X₁-Rezeptoren sind weit verbreitet und befinden sich überwiegend in der glatten Muskulatur (zum Beispiel im Vas deferens, in Gefäßen und in der Harnblase) und in Blutplättchen, wo sie die Kontraktilität beziehungsweise die Blutgerinnung beeinflussen.

P2X₂-Rezeptoren sind im peripheren und zentralen Nervensystem sowie in vielen nicht neuronalen Zellen zu finden. Sie spielen eine Rolle bei der Signaltransmission in Nervenendigungen sowie in interneuronalen Synapsen, wodurch sich eine Funktion bei vielen physiologischen Vorgängen wie z. B. Lernen und Koordination ergibt. In nicht neuronalen Zellen könnten sie unter anderem bei der Regulierung von Hormonausschüttung oder bei der Kontraktion glatter Muskelzellen wichtig sein.

P2X₃-Rezeptoren sind ebenso wie heteromere P2X_{2/3}-Rezeptoren überwiegend in afferenten peripheren und zentralen sensorischen Neuronen lokalisiert. Sie sind an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt, unter anderem an der Transmission von chronisch entzündlichen und neuropathischen Schmerzen.

P2X₄-Rezeptoren sind wahrscheinlich die am weitesten verbreiteten P2X-Rezeptoren. Sie befinden sich in neuronalen sowie in nicht neuronalen Geweben, wobei ihre Funktion bisher überwiegend ungeklärt ist. Wahrscheinlich spielen sie aber eine Rolle bei der Modulation von chronisch entzündlichen und neuropathischen Schmerzen durch Mikroglia des Rückenmarks.

P2X₅-Rezeptoren kommen ebenfalls in einer großen Zahl von Geweben vor, wobei die Expression in differenzierenden Geweben wie Epithelzellen erhöht ist. Hier wird durch die Aktivierung durch ATP die Proliferation gehemmt und die Differenzierung gefördert. In humanen Geweben scheinen P2X₅-Rezeptoren überwiegend in Zellen des Immunsystems (zum Beispiel Thymus, Milz, Lymphknoten, Leukozyten) und in epidermalen Keratinozyten lokalisiert zu sein, wobei die Funktionen noch unklar sind.

P2X₆-Rezeptoren befinden sich im gesamten zentralen Nervensystem und sind oft mit P2X₂- und P2X₄-Rezeptoren kolokalisiert. Außerdem sind sie in der Skelettmuskulatur, im Thymus sowie in anderen Geweben vorhanden. Homomere P2X₆-Rezeptoren scheinen keine funktionellen Ionenkanäle ausbilden zu können, so dass sie wahrscheinlich hauptsächlich als heteromere Rezeptoren physiologische Funktion besitzen.

P2X₇-Rezeptoren werden hauptsächlich in Zellen des Immunsystems exprimiert (Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten) sowie in den Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems. Sie spielen eine Rolle bei der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, bei der Zellproliferation und bei Apoptose.

1.3.3 Pharmakologie

Leitfähigkeit: P2X-Rezeptoren reagieren auf die Bindung von ATP mit der Öffnung eines Kationenkanals, der eine hohe Leitfähigkeit für Natrium und Kalium sowie eine je nach Isoform variierende Calcium-Leitfähigkeit besitzt (Bean et al., 1990), (Evans et al., 1996). Dabei besitzen die einzelnen Isoformen eine unterschiedliche Potenz gegenüber ATP mit EC₅₀-Werten in der folgenden Reihenfolge: P2X₁ = P2X₃ < P2X₂ = P2X₄ = P2X₅ < P2X₆ << P2X₇ (Khakh et al., 2001). Darüber hinaus wurde für P2X₂-, P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren nach längerer ATP-Stimulation eine zusätzliche Leitfähigkeit für größere Kationen (NMDG, YO-PRO-1) beschrieben (Virginio et al., 1999), (Khakh et al., 1999a). Bei P2X₅-Rezeptoren

wurde darüber hinaus auch ohne längere ATP-Stimulation eine signifikante Leitfähigkeit für Chlorid und größere Kationen beobachtet (Bo et al., 2003). Es ist allerdings noch unklar, ob diese zusätzlichen Leitfähigkeiten tatsächlich direkt durch eine Porendilatation der P2X-Rezeptoren zustande kommen, ob mehrere P2X-Rezeptoren an der Porenbildung beteiligt sind oder ob die Aktivierung der P2X-Rezeptoren zu einer Öffnung sekundärer Kanäle führt. Dies ist wahrscheinlich bei den bei P2X₅-Rezeptoren beobachteten Chlorid-Strömen der Fall, da sie durch Flufenaminsäure, einen Inhibitor von Ca²⁺-aktivierten Chloridkanälen (White and Aylwin, 1990), reduziert werden können, ohne den Verlauf der ATP-aktivierten P2X₅-Rezeptorstromkurve zu beeinflussen. Für den P2X₇-Rezeptor wurde kürzlich durch Einzelkanal-Ableitungen gezeigt, dass die Porendilatation keine intrinsische Eigenschaft des P2X₇-Rezeptors darstellt (Riedel et al., 2007).

Kinetische Eigenschaften: Die verschiedenen P2X-Isoformen unterscheiden sich erheblich in ihren kinetischen Eigenschaften. Einige (P2X₂, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇) desensibilisieren nicht oder nur langsam, während andere (P2X₁, P2X₃) rasch desensibilisieren und nach einer Aktivierung nicht sofort wieder aktiviert werden können (Gever et al., 2006). Im desensibilisierten Zustand ist der Rezeptor bei gebundenem Liganden geschlossen und inaktiv.

Agonisten: Auch in ihrer Sensitivität gegenüber ATP und anderen Agonisten sind die P2X-Isoformen sehr verschieden. So hat der P2X₇-Rezeptor einen EC₅₀-Wert für ATP von 100 µM, während alle anderen Isoformen durch ATP-Konzentrationen zwischen 1 und 10 µM halbmaximal aktiviert werden (North and Surprenant, 2000). Ein weiterer entscheidender Agonist ist αβ-meATP ((Welford et al., 1986)1986), ein gegenüber ATPasen sehr stabiles ATP-Derivat. Da es an einigen Isoformen (P2X₁, P2X₃, P2X₆) als potenter Agonist, an anderen dagegen nur schwach (P2X₂, P2X₄, P2X₅) beziehungsweise gar nicht (P2X₇) agonistisch wirkt (Gever et al., 2006), eignet es sich gut dazu, Heteromere oder verschiedene Isoformen nebeneinander abzugrenzen. Weitere Agonisten, die sich ebenfalls in ihrer Potenz an den unterschiedlichen Isoformen unterscheiden, sind βγ-meATP, 2-meSATP, ATPγS, BzATP und ADP (Lambrecht, 2000).

Antagonisten: Mittlerweile existiert eine Reihe von Antagonisten an P2X-Rezeptoren. Hierzu gehören einige Farbstoffe (Brilliant blue G, Phenolrot, Reactive red 2, Reactive blue, Evans blue, Trypan blue), das Antiflagellatenmittel Suramin sowie Suraminderivate, das Pyridoxalanalogon PPADS und PPADS-Derivate, der Crosslinker DIDS, oxidiertes ATP, TNP-ATP und ANAPP₃ (Lambrecht, 2000). Meist werden PPADS, Suraminderivate und

TNP-ATP eingesetzt. Allerdings sind die meisten dieser Substanzen chemisch hochreaktiv, wodurch unspezifische Nebenreaktionen auftreten können, außerdem sind sie meist nicht selektiv für P2X-Rezeptoren, sondern können auch P2Y-Rezeptoren oder auch andere Proteine aktivieren. Das Suraminderivat NF023 war das erste, das als selektiv für P2X-Rezeptoren erkannt worden war (Ziyal et al., 1997) und darüber hinaus eine höhere Selektivität gegenüber P2X₁-Rezeptoren als gegenüber anderen P2X-Rezeptoren zeigte. Ein noch potenterer Agonist ist das Suraminderivat NF279 (Damer et al., 1998), (Rettinger et al., 2000b). NF449 (Braun et al., 2001) schließlich ist ein im nanomolaren Bereich wirksamer Antagonist mit einer äußerst hohen Selektivität für P2X₁-Rezeptoren (Rettinger et al., 2005). Weitere P2X₁-selektive Antagonisten sind das PPADS-Derivat MRS2159 (Kim et al., 2001b), das Suraminderivat NF864 (Horner et al., 2005) und die Substanz RO-1 (Jaime-Figueroa et al., 2005). Ein neuer selektiver P2X₃-Antagonist ist NF110 (Hausmann et al., 2006), bei dessen Untersuchung entdeckt wurde, dass die Isoform-Selektivität der Suraminderivate von der Stellung der Sulfonsäuregruppen abhängt. Eine weitere selektive Substanz ist die Abbott-Substanz A-317491, eine kleine organische Säure (Jarvis et al., 2002), die selektiv für P2X_{2/3}- und P2X₃-Rezeptoren ist, ebenso wie das P2X₃/P2X_{2/3}-selektive RO-3 (Ford et al., 2006). Auch für den P2X₇-Rezeptor gibt es selektive Antagonisten. Dazu gehören Brilliant blue G (Jiang et al., 2000a), A-740003 (Honore et al., 2006), KN-62 (Gargett and Wiley, 1997), AZD9056 (Baxter et al., 2003) und AZ11645373 (Stokes et al., 2006). Für alle anderen Isoformen sind bisher noch keine selektiven Antagonisten entwickelt worden, so dass hier noch ein großer Forschungsbedarf besteht.

Regulation: P2X-Rezeptoren können durch eine Reihe von äußeren Einflüssen in ihrer Funktion reguliert werden. Dabei weisen die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Empfänglichkeiten für solche Einflüsse auf.

Bivalente Kationen und Metalle können die Funktion von P2X-Rezeptoren modulieren, indem sie an den Rezeptor binden und so die Affinität von ATP verändern (Evans et al., 1996) (Vial et al., 2004a) oder den Kanal direkt blockieren (Nakazawa et al., 1990), (Nakazawa and Hess, 1993). Dabei haben Calcium- und Magnesium-Ionen in der Regel einen inhibierenden Einfluss auf die ATP-induzierten Ionenströme, während Zink-Ionen die ATP-Wirkung potenzieren (Laube, 2002), (Wildman et al., 1998), mit Ausnahme des P2X₇-Rezeptors, der durch Zink- und Kupfer-Ionen inhibiert wird (Virginio et al., 1997).

Der extrazelluläre pH-Wert hat ebenfalls einen Einfluss auf die Funktion und die Kinetik von P2X-Rezeptoren. So werden P2X₁-, P2X₃-, P2X₄- und P2X₅-Rezeptoren durch niedrige

pH-Werte inhibiert, während P2X₂- und P2X_{2/3}-Rezeptoren durch niedrige pH-Werte potenziert werden (Gever et al., 2006). Ebenso wie Zink-Ionen binden Protonen wahrscheinlich an Histidin-Reste in der Ektodomäne von P2X-Rezeptoren (Clarke et al., 2000), (Clyne et al., 2002a), (Vial et al., 2004a).

Ivermectin, ein Nematodenmittel, ist dazu in der Lage, die ATP-Wirkung an P2X₄-Rezeptoren zu potenzieren und die Amplitude der Ionenströme zu erhöhen (Khakh et al., 1999b). Diese Wirkung kommt wahrscheinlich durch eine gesteigerte Anzahl an Rezeptoren an der Zelloberfläche zustande (Toulme et al., 2006).

Auch durch die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten kann die Funktion von P2X-Rezeptoren beeinflusst werden. Die zytoplasmatische N-terminale Domäne aller P2X-Isoformen enthält eine konservierte PKC-Phosphorylierungssequenz, die wichtig für die Funktion zu sein scheint (Boue-Grabot et al., 2000), (Liu et al., 2003). Es wurde vermutet, dass diese Phosphorylierung durch andere Proteine reguliert wird (Paukert et al., 2001). Da aber die Potenzierung von P2X-Rezeptoren durch G_q-gekoppelte metabotrope Glutamat-Rezeptoren auch nach der Entfernung der PKC-Phosphorylierungssequenz erhalten blieb, liegt der Schluss nahe, dass die Potenzierung wahrscheinlich durch die Phosphorylierung anderer Proteine vermittelt wird (Vial et al., 2004b). Auch neuere Untersuchungen des P2X₃-Rezeptors sprechen gegen eine direkte Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (Brown and Yule, 2007). P2X-Rezeptoren enthalten darüber hinaus noch andere potentielle Phosphorylierungssequenzen, die die Funktion beeinflussen könnten. So wird beispielsweise der P2X₇-Rezeptor in der Position ³⁴³Y phosphoryliert (Kim et al., 2001a).

Die Interaktion mit anderen Proteinen spielt ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der P2X-Rezeptor-Funktion. So spielen vor allem verschiedene C-terminal gelegene Domänen eine Rolle bei der Interaktion mit intrazellulären Proteinen sowie mit Membranproteinen (Boue-Grabot et al., 2003), (Kim et al., 2001a), (Wilson et al., 2002), (Gendreau et al., 2003), (Masin et al., 2006). Eine besonders interessante Interaktion ist die zwischen P2X-Rezeptoren und anderen Rezeptoren. So wurde eine gegenseitige Beeinflussung von P2X-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelten GABA_B-Rezeptoren (Gomez-Villafuertes et al., 2003) sowie weiteren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Vial et al., 2004b), nAChR (Khakh et al., 2005) und 5HT₃-Rezeptoren (Boue-Grabot et al., 2003) beschrieben.

1.3.4 Assemblierung

Ebenso wie andere Ionenkanäle müssen P2X-Untereinheiten multimerisieren, um funktionelle Rezeptoren ausbilden zu können. Zwar gibt es noch keine Kristallstruktur, die Auskunft über den oligomeren Zustand der P2X-Rezeptoren geben könnte, aber verschiedene biochemische, elektrophysiologische und mikroskopische Versuche haben übereinstimmend eine trimere Struktur der Rezeptorkomplexe ergeben.

Erste Versuche, den Assemblierungszustand der P2X-Rezeptoren zu bestimmen, wurden von Bo et al. (1992) durchgeführt, bevor der erste P2X-Rezeptor kloniert worden war. Eine Saccharose-Dichtegradient-Zentrifugation von aus dem Vas deferens der Ratte isolierten, in Digitonin solubilisierten Proteinen, die [^3H]- $\alpha\beta$ -meATP gebunden hatten, ergab einen Sedimentationskoeffizienten von 12.1. Dies wurde als das Vorhandensein pentamerer P2X-Rezeptoren interpretiert. In einem weiteren Ansatz wurde die Ektodomäne des P2X₂-Rezeptors (^{53}K - ^{308}K) in *E. coli* exprimiert, solubilisiert und aufgereinigt und die *in vitro* gefalteten, mit [^{32}P]-ATP markierten Proteine einem Dichtegradienten unterzogen (Kim et al., 1997). Diese Experimente ergaben eine tetramere Struktur, wobei bedacht werden muss, dass dem exprimierten Konstrukt mit den Transmembranregionen eventuell strukturell wichtige Domänen fehlten.

Die ersten Methoden, die eindeutig einen trimeren Assemblierungszustand von in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierten P2X-Rezeptoren zeigten, waren Crosslinking-Versuche und die Blaue-Native-PAGE-Technik (Nicke et al., 1998). Das Crosslinking von aufgereinigten solubilisierten P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren durch CLII, einem bifunktionellen Analogon des P2X-Antagonisten PPADS, führte zu einer fast quantitativen Bildung von SDS-resistenten Trimeren. Ebenso ergab die Analyse nativer Proben durch Blaue-Native-PAGE eindeutig einen trimeren Assemblierungszustand sowohl für P2X₁- als auch für P2X₃-Rezeptoren. Spätere Experimente mit Konkatameren aus P2X₁-Untereinheiten bestätigten die trimere Struktur (Nicke et al., 2003), und zusätzliche Versuche, in denen die Blaue-Native-PAGE-Technik eingesetzt wurde, konnten neben der trimeren Struktur von P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren auch für P2X₂-, P2X₄- und P2X₅-Rezeptoren einen trimeren Assemblierungszustand zeigen (Aschrafi et al., 2004). Lediglich P2X₆-Untereinheiten wichen von diesem Verhalten ab ((Aschrafi et al., 2004), C. Niculescu, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse). Weitere Untersuchungen durch Raster-Kraft-Mikroskopie mit chemisch quervernetzten P2X₂-Untereinheiten ergaben ebenfalls eine trimere Struktur, die bei chemisch quervernetzten P2X₆-Rezeptoren nicht zu beobachten war (Barrera et al., 2005).

Neben biochemischen Methoden kamen auch elektrophysiologische Methoden zum Einsatz, um die Multimerisierung von P2X-Rezeptoren zu untersuchen. So konnte durch die Bestimmung des Hill-Koeffizienten gezeigt werden, dass mehr als ein ATP-Molekül notwendig ist, um P2X-Rezeptoren zu aktivieren (Bean, 1990), (Ding and Sachs, 1999), was für einen multimeren Zustand sprach. Zusätzlich ergaben Experimente, die die Blockade der Funktion von Konkatameren aus Wildtyp-P2X₂-Untereinheiten und T³³⁶C-P2X₂-Mutanten durch MTSET untersuchten, ebenfalls eine trimere Architektur (Stoop et al., 1999). Allerdings wurde aufgrund von elektrophysiologischen Kinetikuntersuchungen auch eine tetramere Struktur postuliert (Ding and Sachs, 2000).

Auch die Ergebnisse mikroskopischer Methoden sprachen für einen trimeren Assemblierungszustand von P2X-Rezeptoren. Die Untersuchung von P2X₂-Rezeptoren durch Raster-Kraft-Mikroskopie ergab sowohl in Volumenmessungen als auch bei der Bestimmung des Winkels zwischen an N-terminale Hexahistidyltags gebundene Antikörper eine trimere Struktur (Barrera et al., 2005). Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen von P2X₂-Rezeptoren zeigten einen trimeren Assemblierungszustand (Mio et al., 2005).

Die verschiedenen P2X-Isoformen sind nicht nur in der Lage, Homotrimere zu formen, sondern können auch in verschiedene Heterotrimere assemblieren. So gibt es funktionelle und biochemische Hinweise auf das Vorkommen von P2X_{2/3}- (Lewis et al., 1995), (Radford et al., 1997), P2X_{1/5}- (Torres et al., 1998c), (Lê et al., 1999), P2X_{2/6}- (King et al., 2000) und P2X_{4/6}- Rezeptoren (Le et al., 1998). Die funktionellen Eigenschaften der Heteromere liegen meist zwischen denen der beiden Monomere. Torres et al. haben durch Koimmunopräzipitationsexperimente die theoretisch mögliche Koassemblierung der Isoformen untersucht (Torres et al., 1999a) und herausgefunden, dass sich die Isoformen in ihrer Fähigkeit, mit anderen Isoformen zu koassemblieren, sehr unterscheiden. Die Ergebnisse sind in Tab. 1-1 zusammengefasst.

Tab. 1-1 Übersicht über die durch Koimmunopräzipitation untersuchte theoretische Koassemblierung der P2X-Isoformen (nach (Torres et al., 1999a)).

	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
P2X ₁	+	+	+	-	+	+	-
P2X ₂	+	+	+	-	+	+	-
P2X ₃	+	+	+	-	+	-	-
P2X ₄	-	-	-	+	+	+	-
P2X ₅	+	+	+	+	+	+	-
P2X ₆	+	+	-	+	+	(+)	-
P2X ₇	-	-	-	-	-	-	+

Wie diese Assemblierung der P2X-Untereinheiten aber zustande kommt und welche Proteinregionen dabei miteinander in Kontakt treten, ist noch nicht bekannt. Bisher wurde erst die zweite Transmembranregion beziehungsweise die distale Ektodomäne als potentielle Assemblierungsdomäne beschrieben (Torres et al., 1999b), ohne diese Funktion bestimmten Aminosäuren und Interaktionsarten zuzuschreiben.

1.4 Biosynthese von Membranproteinen

1.4.1 Überblick über den Sekretionsweg

Integrale Membranproteine bilden mit 20-30% einen großen Anteil an den Genen aller pro- und eukaryontischen Organismen (Krogh et al., 2001). Membranproteine besitzen hydrophobe Transmembranregionen, die den 0,3 nm breiten apolaren Kern der Membran sowie die 0,15 nm breiten polareren Übergangsbereiche durchspannen. Diese Transmembranregionen bestehen meist aus Bündeln von α -Helices („ α -helix bundle“) (Von Heijne, 1999), ein geringerer Teil, wie zum Beispiel Porine, besitzt β -Faltblattstrukturen („ β -barrel“) (Wimley, 2003), (Bigelow et al., 2004). Membranproteine sind an zahlreichen essentiellen Vorgängen beteiligt, wie zum Beispiel Signaltransduktion, Transport von Ionen und Molekülen durch die Plasmamembran und Zell-Kommunikation. Ebenso wie Proteine, die sezerniert werden, im Sekretionsweg oder in diesem nachfolgenden Kompartimenten gebraucht werden, werden Membranproteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER)

synthetisiert. Die einzige Ausnahme bilden Membranproteine, die sich in der Membran von Mitochondrien oder Chloroplasten befinden.

Die Biosynthese von Membranproteinen beginnt ebenso wie die aller anderen Proteine an freien Ribosomen im Zytosol. Durch eine N-terminale hydrophobe Signalsequenz werden die entstehenden Peptidketten kotranslational zum ER dirigiert, wo die Synthese fortgesetzt wird (Walter and Johnson, 1994), (Walter and Blobel, 1981b). Dies geschieht, indem die Signalsequenz an das Signalerkennungspartikel SRP (signal recognition particle) bindet, woraufhin die Proteinsynthese unterbrochen wird (Walter and Johnson, 1994) (Walter and Blobel, 1981a). Nun bindet der Ribosomen-Peptid-SRP-Komplex über Interaktionen mit dem SRP-Rezeptor und dem Sec61-Komplex (Translokon) an die ER-Membran (Rapoport et al., 1996), (Matlack et al., 1998). Durch den Translokon-Komplex wird die entstehende Peptidkette in das ER geschleust (Rapoport et al., 1996), (Matlack et al., 1998), und bei Membranproteinen werden die Transmembranregionen kotranslational in die ER-Membran integriert (Do et al., 1996), so dass später extrazelluläre Proteinregionen im Inneren des ER liegen, während zytosolische Bereiche schon während der Synthese im Zytosol lokalisiert sind. Von besonderer Wichtigkeit ist hier bei Membranproteinen die Orientierung, da bei einigen Membranproteinen der N-terminale Bereich im Zytosol, bei anderen im Extrazellulärraum lokalisiert ist. Dies muss von dem Translokon-Komplex erkannt werden. Das Signalpeptid wird bei einigen Proteinen im ER abgespalten, während es bei anderen, wie zum Beispiel den P2X-Rezeptoren, später eine Transmembranregion bilden kann (Rapoport et al., 2004).

Im Inneren des ER befinden sich zahlreiche Chaperone, d.h. Helferproteine, die an die entstehende Peptidkette binden und die korrekte Faltung unterstützen. Zu diesen Chaperonen gehören unter anderem das Hitzeschockprotein BiP (Gething, 1999), die Lectine Calnexin und Calreticulin (Helenius and Aebi, 2004) sowie Protein-Disulfid-Isomerasen (Freedman, 1994). Diese Chaperone unterstützen die Faltung der Proteine, verhindern die Aggregation und ermöglichen das Ausbilden von Disulfidbrücken, die die Tertiärstruktur der Proteine stabilisieren. Außerdem sind sie Teil des ER-Qualitätskontrollsystems, das fehlgefaltete Proteine erkennt, aus dem ER ausschleust und dem Abbau durch das Proteasom zuführt (Lord et al., 2000).

Neben der Faltung erfahren viele Proteine im ER eine Glykosylierung. Die häufigste Form der Glykosylierung ist die N-Glykosylierung, die im ER durch das Verknüpfen eines aktivierten Oligosaccharids ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) mit dem Asparagin einer N-X-T/S-Sequenz

der wachsenden Peptidkette eingeleitet wird (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Zwei Glukosereste und ein Mannoserest werden durch die Glukosidasen I und II wieder abgespalten, während sich das Protein noch im ER befindet (Helenius and Aebi, 2004). Das entstehende (GlcMan₈GlcNAc₂)-Oligosaccharid spielt eine wichtige Rolle bei der Faltung von N-glykosylierten Proteinen, da so glykosylierte Peptidketten die Chaperone Calnexin oder Calreticulin binden können, die den Faltungsprozess unterstützen (Hammond and Helenius, 1995). Das Abspalten des letzten Glukoserestes durch die Glukosidase II bewirkt das Abdissoziieren dieser Chaperone. Ist die Faltung des Proteins nicht korrekt, wird es wieder glukosyliert und von den Chaperonen gebunden (Parodi, 2000). Ist das Polypeptid richtig gefaltet, verlässt es das ER als (Man₈GlcNAc₂)-glykosyliertes Protein (core-Glykosylierung), das im Golgi-Apparat weiter modifiziert wird (Komplex-Glykosylierung). Die seltenere O-Glykosylierung beginnt ebenfalls im ER oder auch im *cis*-Golgi, wo ein GlcNAc-Rest an ein Serin oder Threonin gebunden wird (Marth, 1996). Die O-Glykosylierung kann im Golgi weiter modifiziert werden, besteht aber meistens nur aus 1-4 Zuckerresten.

Der Transport der gefalteten Proteine aus dem ER erfolgt aus bestimmten Ribosomen-freien Regionen des ER, sogenannten Transitionselementen des ER (Palade, 1975). Er erfolgt in Transfervesikeln, die vom ER abgeschnürt werden. Diese Vesikel besitzen eine spezielle Hülle, die COPII-Hülle („COPII-coat“), die aus den Proteinen Sec23/24 und Sec13/31 besteht (Barlowe, 2003). Die Entstehung dieser Vesikel wird meistens durch die Interaktion von ER-Export-Erkennungssequenzen der Proteine mit ER-Export-Rezeptoren oder durch eine direkte Interaktion der Erkennungssequenzen mit Proteinen des COPII-Komplexes initiiert (Belden and Barlowe, 2001), (Barlowe, 2003) und erfordert zusätzlich das Zusammenspiel von Sec12 und der GTPase Sar1 (Barlowe, 2003). Die COPII-Vesikel, die sich von der ER-Membran abschnüren, verschmelzen mit dem ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) (Hauri and Schweizer, 1992), um schließlich mit dem *cis*-Golgi zu fusionieren (Presley et al., 1997).

Im Golgi-Apparat finden durch die hier zahlreich vorhandenen Enzyme weitere posttranslationale Modifizierungen statt. So werden die N-Glykosylierungen verändert und vollendet, während O-Glykosylierungen auch neu hinzugefügt und modifiziert werden können. Auch proteolytische Spaltungen können im Golgi-Apparat stattfinden (Molloy et al., 1994). Außerdem findet im Golgi-Apparat die Sortierung der Proteine je nach Zielort statt, wie etwa der Plasmamembran, den Lysosomen, dem ER oder den Sekretgranula (Keller and Simons, 1997), (Traub and Kornfeld, 1997). Vom *trans*-Golgi schließlich gelangen die Proteine an die Plasmamembran beziehungsweise an ihren jeweiligen Bestimmungsort.

1.4.2 Integration von Transmembranregionen in die ER-Membran

Der Translokon-Komplex ist ein Membranprotein, das einen Kanal durch die ER-Membran bildet, durch den Proteine ein- und ausgeschleust werden können. Die Struktur dieses Komplexes ist für das Archaeobakterium *Methanococcus jannashii* mit einer Auflösung von 0,32 nm bestimmt worden (Van den Berg et al., 2004). Er besteht bei Eukaryonten aus Sec61-Heterotrimeren und bei Prokaryonten aus SecY-Heterotrimeren, die sich aus α -, β -, und γ -Untereinheiten zusammensetzen. Wahrscheinlich lagern sich jeweils vier dieser Heterotrimere zu einem Tetramer zusammen, das den vollständigen Translokon-Komplex bildet (Van den Berg et al., 2004). Jedes der Trimere bildet einen Kanal, der einen Durchmesser von 0,4-0,6 nm hat (Hamman et al., 1997) und durch den die wachsende Peptidkette in das ER gelangt. Der Kanal ist ungefähr wie eine Sanduhr geformt und besitzt in der Mitte einen hydrophoben Ring, der wahrscheinlich dazu beiträgt, den Kanal zu verschließen. Öffnet sich der Kanal für eine eintretende Peptidkette, entfernt sich ein „Stöpsel“ aus dem Kanal, der Teil der α -Untereinheit ist und den Kanal im inaktiven Zustand verschlossen hält (Bowie, 2005). In Abb. 1-3 ist die Darstellung eines geschlossenen Translokon-Kanals zu sehen, in die der hydrophobe Ring und der „Stöpsel“ eingezeichnet sind.

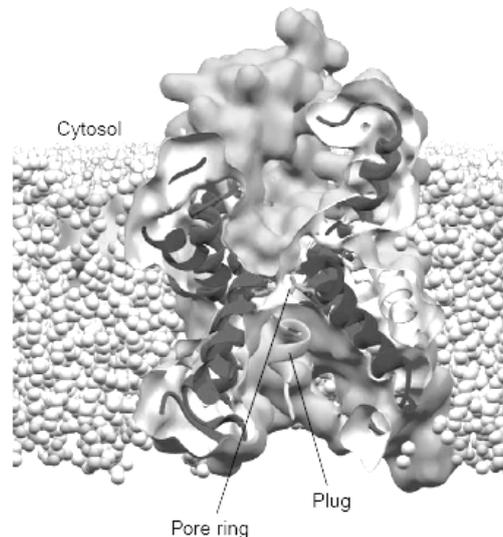


Abb. 1-3 Modell des Translokon-Komplexes. Pore ring: hydrophober Ring, Plug: Stöpsel (nach (Rapoport et al., 2004)).

Wenn ein Ribosomen-Peptid-SRP-Komplex an den Translokon-Komplex bindet, wird die aus dem Ribosom austretende Peptidkette in den Translokon-Kanal eingebracht. Lösliche Proteine, die zur Sezernierung bestimmt sind, gelangen vollständig in das ER-Innere. Bei

Membranproteinen hingegen muss die Entscheidung gefällt werden, ob ein Bereich eine Transmembranregion werden und somit in die ER-Membran eingebracht werden soll oder nicht. Diese Membraninsertion erfolgt meist kotranslational im Translokon, kann aber auch nach der Translation des gesamten Proteins stattfinden.

Die gängige Vorstellung von der kotranslationalen Membraninsertion sieht folgendermaßen aus: In der α -Untereinheit des Translokon-Komplexes sind zehn Transmembranregionen so angeordnet, dass zwei Domänen unterschieden werden, die in die Transmembranregionen 1-5 und 6-10 unterteilt sind. Transmembranregion 5 und 6 sind durch eine flexible Schleife verbunden, so dass eine muschelartige Struktur entsteht (Van den Berg et al., 2004), (Rapoport et al., 2004). Die β - und γ -Untereinheiten sind auf drei Seiten der α -Untereinheit so lokalisiert, dass die Öffnung der „Muschel“ frei bleibt. So besteht die Möglichkeit, den Translokon-Kanal seitlich zur Membran hin zu öffnen. Tritt nun eine Peptidkette aus dem Ribosom in den Translokon-Kanal ein, wird permanent diese seitliche Öffnung geöffnet und geschlossen, so dass das eintretende Peptid in ständigen Kontakt mit der Membran tritt. Die Hydrophobizität des Peptids entscheidet nun darüber, ob es in die Membran eintritt oder in der wässrigen Umgebung der Kanalpore und später des ER-Inneren oder des Zytosols verbleibt (Martoglio et al., 1995), (Heinrich et al., 2000). Somit wird eine Transmembranregion vom Translokon-Komplex aufgrund ihrer Hydrophobizität erkannt. Abb. 1-4 zeigt den Mechanismus der Membraninsertion von Transmembranregionen.

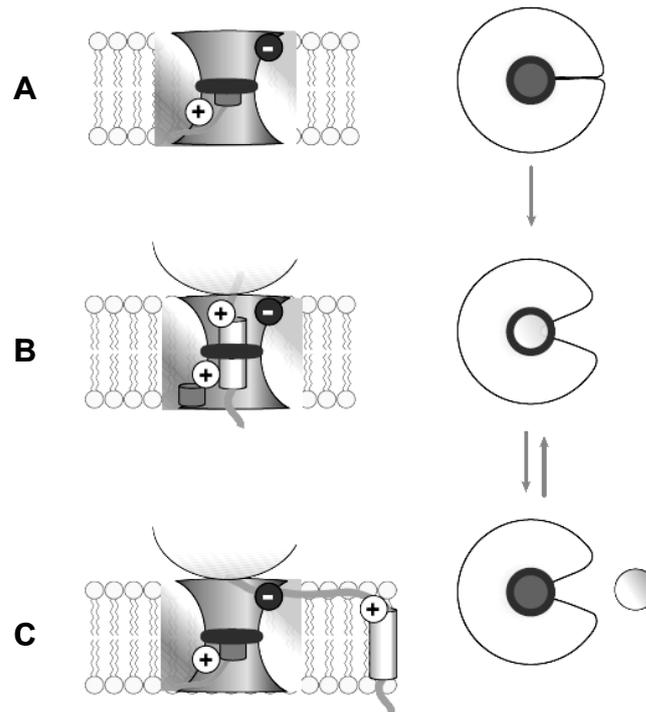


Abb. 1-4 Modell des Translokations-Komplexes und der Insertion von Transmembranregionen. Links: Seitenansicht, rechts: Aufsicht. A, Der Kanal ist verschlossen. (+) und (-) zeigen die Lokalisation der geladenen Aminosäuren des Translokons an, die in *Saccharomyces cerevisiae* zur Topologieentscheidung beitragen. **B,** Der Kanal ist seitlich geöffnet. Eine eintretende Peptidkette erhält Kontakt zur Membran. **C,** Die Transmembranregion tritt aus dem Translokation in die Membran ein (nach (Bowie, 2005)).

Es gibt inzwischen weitreichende Erkenntnisse darüber, welche Voraussetzungen Transmembranregionen erfüllen müssen, um als solche erkannt zu werden. Entscheidend sind vor allem die Gesamthydrophobizität und die Länge der Peptidsegmente. Eine α -Helix muss aus ungefähr 20 Aminosäuren bestehen, um den hydrophoben Kern einer Lipiddoppelschicht durchspannen zu können (Popot and Engelman, 1990). Ist also ein ausreichend langes Segment ausreichend hydrophob, wird es als Transmembranregion identifiziert und in die Membran eingebracht. Als Richtlinie, ob die Hydrophobizität eines Segmentes ausreicht, kann der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient der enthaltenen Aminosäuren dienen (White and Wimley, 1999). Dieser gibt einen Hinweis darauf, ob das Einbringen einer Aminosäure in die Membran energetisch günstig oder ungünstig ist. Aufgrund dieser Vorhersagen kann man beispielsweise berechnen, dass ein Peptid, das aus 20 Alaninen besteht, gerade unterhalb der kritischen Grenze liegt und nicht in die Membran integriert wird, während 15 Alanine und 5

Leucine gerade ausreichen würden. Dieses theoretische Ergebnis konnte experimentell bestätigt werden (Hessa et al., 2005).

Neben der Entscheidung, ob ein Protein in die Membran integriert wird oder nicht, muss im Translokon-Komplex auch die Topologieentscheidung getroffen werden. Die Transmembransegmente werden mit dem N-Terminus voran in den Translokon-Kanal eingebracht, so dass eine $N_{\text{exo}}/C_{\text{cyt}}$ -Orientierung vorliegt (White and Von Heijne, 2004). Nun entscheidet sich, ob diese Orientierung beibehalten oder umgekehrt wird. Hierbei spielt die sogenannte „positive-inside rule“ eine Rolle, nach der positiv geladene Aminosäuren eher intra- als extrazellulär lokalisiert sind (Von Heijne, 1986). So kann teilweise durch das Umkehren der Nettoladungen von extra- und intrazellulären Proteinbereichen sogar die Topologie geändert werden (Goder and Spiess, 2001). Versuche in *Saccharomyces cerevisiae* haben ergeben, dass geladene Aminosäuren im Sec61-Komplex über die Interaktion mit geladenen Aminosäuren der wachsenden Peptidkette die Topologie beeinflussen (Abb. 1-4). Aber auch andere Faktoren scheinen hier eine Rolle zu spielen, wie etwa das Membranpotential (Cao et al., 1995) oder die Interaktion mit negativ geladenen Phospholipid-Kopfgruppen (van Klompenburg et al., 1997). Neben der Ladung sind auch andere Faktoren wichtig für die Topologie, wie etwa die Struktur, die Länge oder die Hydrophobizität der Signalsequenz (Rapoport et al., 2004), (Denzer et al., 1995), (Wahlberg and Spiess, 1997), (Goder and Spiess, 2003). Bei Proteinen mit mehreren Transmembranregionen richtet sich die Orientierung der nachfolgenden Transmembranregionen meistens nach der Orientierung der vorangehenden Transmembranregionen (Wessels and Spiess, 1988).

1.4.3 Faltung und Assemblierung von Membranproteinen

Die Faltung von Membranproteinen verläuft nach der gängigen Lehrmeinung in mehreren Schritten. Dabei gibt es drei Modelle: das von Popot und Engelman (Popot and Engelman, 1990) postulierte „two stage model“, das „three stage model“ (Jacobs and White, 1989) und das „four stage model“ (White and Wimley, 1999). Alle Modelle gehen davon aus, dass die Transmembranregionen erst in die Membran inseriert werden, bevor sie assoziieren und so die Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine ausbilden. Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob die Membraninsertion der einzelnen Transmembranregionen immer nacheinander stattfindet oder ob, wie zum Beispiel für spannungsabhängige Kaliumkanäle vermutet (Sato et al., 2002), auch mehrere Transmembranregionen erst im Translokon assoziieren und anschließend in die Membran integriert werden. Motive und Wechselwirkungen, die die Assoziation von Helices unterstützen, wie elektrostatische Wechselwirkungen und Packungseffekte, werden im

Diskussionskapitel ausführlich behandelt. Die Ausbildung der Sekundärstruktur der α -Helices der Transmembranregionen findet wahrscheinlich schon vor der Membranintegration statt, während sich die wachsende Peptidkette noch im Ribosomen-Kanal befindet (Deutsch, 2003), (Woolhead et al., 2004), was auch zur Erkennung der Transmembranregionen im Translokationstranslokation beitragen könnte. Bei sezernierten Proteinen wurde dies nicht beobachtet (Woolhead et al., 2004), so dass die Faltung von Membranproteinen eventuell früher beginnt als die Faltung von löslichen Proteinen. Dies zeigt, wie wichtig die Transmembranregionen für die Struktur des Gesamtproteins sind. Generell findet die Faltung von Proteinen während aller Stadien der Biosynthese statt, den größten Anteil hat allerdings die Faltung im ER. Hier wird bei den meisten Proteinen wahrscheinlich auch die Assemblierung der gefalteten Untereinheiten maßgeblich bestimmt (Deutsch, 2002). Eine wichtige Rolle spielen dabei Assemblierungsdomänen, die die spezifische Interaktion zwischen Untereinheiten gewährleisten (Deutsch, 2003). Dabei können Transmembranregionen einen erheblichen Einfluss haben, da sie selbst Assemblierungsdomänen beinhalten können oder durch ihre Insertion und Assoziation die Lokalisation anderer Regionen beeinflussen und so der Kontakt zwischen Assemblierungsdomänen ermöglicht wird. Auch Interaktionen zwischen N-terminalen Domänen, die vor den anderen Proteinbereichen synthetisiert werden, können die weitere Assemblierung steuern, wie zum Beispiel die T1-Domäne bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen, aber auch in allen anderen Proteinbereichen können Assemblierungsdomänen lokalisiert sein. Darüber hinaus können zytosolische Hilfsproteine (zum Beispiel Calmodulin oder KCHIP) und Chaperone im ER (zum Beispiel BiP oder Calnexin) an die entstehenden Proteine binden und ihre weitere Faltung und Assemblierung beeinflussen. Die Faltung und Assemblierung von Membranproteinen ist demnach ein komplexer Vorgang, der sich von Protein zu Protein unterscheiden kann, multiple Interaktions- und Stabilisierungsdomänen beinhaltet und noch lange nicht vollständig geklärt ist.

2. Zielsetzung der Arbeit

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war das Identifizieren von Assemblierungsdomänen von P2X-Rezeptoren. Für die Untersuchung der Assemblierung sollte die Blaue-Native-PAGE-Technik eingesetzt werden, da frühere Studien mit anderen Membranproteinen gezeigt hatten, dass mit dieser Technik zuverlässig die Quartärstruktur bestimmt werden kann. So konnten beispielsweise die korrekten Quartärstrukturen von Cys-Loop-Rezeptoren (Büttner et al., 2001), (Griffon et al., 1999), (Nicke et al., 1999b), Glutamattransportern (Gendreau et al., 2004) und P2X-Rezeptoren (Nicke et al., 1998) durch Blaue-Native-PAGE dargestellt werden.

hP2X₅-Untereinheiten unterscheiden sich von anderen P2X-Isoformen darin, dass bei ihnen aufgrund andersartigen Spleißens das Exon 10 fehlt, wodurch sie nicht in der Lage sind, funktionelle Ionenkanäle auszubilden (Le et al., 1997), (Bo et al., 2003). Da die Region, die durch Exon 10 kodiert wird, mit der Region überlappt, die in der Literatur als bisher einzige bekannte eventuelle Assemblierungsdomäne diskutiert wird (Torres et al., 1999b), war mein Ziel herauszufinden, inwieweit Exon 10 und die zweite Transmembranregion zu der Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten beitragen. Hierzu sollten die Aminosäuren, die durch Exon 10 kodiert werden, schrittweise in die hP2X₅-Untereinheit eingefügt und das Assemblierungsverhalten untersucht werden. Weitere Mutanten und Deletionskonstrukte der hP2X₅-Untereinheit sollten darüber hinaus einen tieferen Einblick in die Rolle der von Exon 10 kodierten Aminosäuren und insbesondere der zweiten Transmembranregion bei der Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten ermöglichen. Dabei war auch die Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern von Interesse. Neben der proteinbiochemischen Untersuchung der Assemblierungseffizienz und der Oberflächenexpression interessierte auch die elektrophysiologische Charakterisierung der einzelnen Konstrukte, um so ein Gesamtbild von der Funktion der von Exon 10 kodierten Aminosäuren und der zweiten Transmembranregion zu erhalten.

Ein weiterer Ansatz, Informationen über Assemblierungsdomänen von P2X-Rezeptoren zu erhalten, war ein systematisches Mutagenese-Scanning der Ektodomäne der rP2X₁-Rezeptoren. Da frühere Experimente in unserem Labor bereits Hinweise auf eine wichtige Rolle der Ektodomäne bei der Assemblierung von P2X-Rezeptoren geliefert hatten (P. Minko, C. Niculescu, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse) und auch andere Ionenkanäle extrazelluläre Assemblierungsdomänen besitzen (zum Beispiel Kaliumkanäle (Li et al., 1992)

oder Glycin-Rezeptoren (Griffon et al., 1999)), sollte ein Alanin-Scanning der gesamten Ektodomäne durchgeführt werden. Das Alanin-Scanning ist eine bewährte Methode, um die Funktion einzelner Aminosäuren in einem Protein zu untersuchen. Durch die Substitution durch Alanin werden funktionelle Gruppen eliminiert, wodurch ein sogenannter „Rasureffekt“ (Jin and Wells, 1994) zustande kommt. Um einen Überblick über die Funktion der Ektodomäne zu erhalten, sollten Mutanten, in denen drei bis sechs zusammenhängende Aminosäuren durch Alanin ersetzt waren, proteinbiochemisch und elektrophysiologisch analysiert werden.

Darüber hinaus sollten auch Konstrukte untersucht werden, die verschiedene Bereiche der Ektodomäne von P2X₁-Rezeptoren umfassten. Das Ziel dieser Versuche war die Konstruktion einer löslichen, nativ gefalteten Teilstruktur des P2X₁-Rezeptors. Dahinter steht, dass Membranproteine wegen ihrer hydrophoben, in die Membran integrierten Transmembranregionen sehr schwierig aufzureinigen und zu kristallisieren sind. Da eine Kristallisierung zum Erhalt einer hoch aufgelösten Struktur aber unabdingbar ist, wäre es sehr hilfreich, eine lösliche Teilstruktur zu finden, die assemblierungsfähig ist. Da eine Trimerisierung nur möglich ist, wenn die Untereinheiten die native Struktur der intakten Wildtyp-Rezeptoren besitzen, würde eine effiziente Trimerisierung einer Teilstruktur für eine native Faltung derselben sprechen. Die Ergebnisse einer hoch aufgelösten Strukturanalyse einer solchen Teileinheit könnten dann auf den gesamten Wildtyp-Rezeptor übertragen werden. Diese Methode hat schon bei anderen Membranproteinen zum Erfolg geführt. So wurde zum Beispiel bei ionotropen Glutamatrezeptoren die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne als Monomer isoliert exprimiert, kristallisiert und die Ligandenbindung untersucht (Armstrong and Gouaux, 2000), (Furukawa and Gouaux, 2003), und bei *Shaker*-Kalium-Kanälen wurde die intrazelluläre T1-Domäne, die für die Tetramerisierung der Untereinheiten wichtig ist, als Tetramer kristallisiert und anhand der erhaltenen Röntgenkristallstruktur Aminosäuren identifiziert, die die Tetramerisierung vermitteln (Kreusch et al., 1998). Somit war es das Ziel, lösliche Teilstrukturen der rP2X₁-Untereinheit zu identifizieren, die zur Trimerisierung fähig sind, und auf diese Weise gleichzeitig zusätzliche Informationen über das Assemblierungsvermögen der Ektodomäne zu erhalten.

Als weitere Strategie zur Identifizierung von Assemblierungsdomänen sollten chimäre Konstrukte aus rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten hergestellt werden. Die rP2X₆-Untereinheiten sind von besonderem Interesse, da sie im Gegensatz zu allen anderen P2X-Isoformen ein defektes Trimerisierungsverhalten aufweisen ((Aschrafi et al., 2004), C.

Niculescu, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse). Somit könnte das Assemblierungsvermögen verschiedener Chimären Aufschluss darüber geben, welche Regionen für diesen Trimerisierungsdefekt verantwortlich beziehungsweise welche Proteindomänen für eine korrekte Assemblierung der Untereinheiten notwendig sind.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit keine anderen Angaben gemacht werden, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

3.1.2 Oligonukleotide

PCR-Primer wurden von Qiagen (Hilden), Biomers.net GmbH (Ulm), Sigma-Aldrich (Steinheim), Operon (Köln) und zuletzt von Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

3.1.3 Enzyme

Die für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Enzyme und dazugehörigen Puffer stammten, wenn nicht anders angegeben, von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main).

3.1.4 Wasser

Bei den verschiedenen Methoden dieser Arbeit wurde Wasser unterschiedlicher Reinheitsgrade verwendet: Lichrosolv®-Wasser in HPLC-Qualität (Merck, Darmstadt), demineralisiertes Wasser und Reinstwasser. Demineralisiertes Wasser wurde durch Ionenaustausch aus Trinkwasser, Reinstwasser durch Ultrafiltration von demineralisiertem Wasser gewonnen. Das Reinstwasser wies eine Leitfähigkeit von $<0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ auf und war nominal DNase- und RNase-frei (Ultra Clear-Reinstwassersystem). Zur Herstellung der benötigten Lösungen und Puffer wurde, soweit im Text keine zusätzlichen Angaben gemacht werden, immer Reinstwasser verwendet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Für die Klonierungen verwendete Vektoren und Plasmide

Für die cRNA-Synthese und die Expression in *Xenopus*-Oozyten verwendete Vektoren:

- pNKS2: (Gloor et al., 1995)
- pNKS3: Der Vektor pNKS3 entstand durch Modifikation des Vektors pNKS2.
- pNKS4: Der Vektor pNKS4 entstand durch Modifikation des Vektors pNKS3.

Für die cRNA-Synthese, die Expression in *Xenopus*-Oozyten und Klonierungen verwendete Plasmide:

His-rP2X₁, His-rP2X₂, His-rP2X₅, His-rP2X₆ waren aus vorherigen Studien verfügbar (Nicke et al., 1998; Aschrafi et al., 2004). Die hP2X₅-Untereinheit (GenBank™ accession number AAC51931) wurde von Sven Sadtler durch PCR aus einer humanen cDNA-Bibliothek (Invitrogen) isoliert, indem ein sequenzspezifisches Primerpaar (vorwärts aaagaattcCATGGGGCAGGCGGGCTGCAA, rückwärts aaagaattcGAGGCAATTCACGTGCTCCTGTGGGGCT) verwendet, mit EcoRI geschnitten und in den pNKS2-Vektor subkloniert wurde.

3.2.2 Verfahren zur Transformation und Isolierung von Plasmiden

DNA-Konstrukte wurden unter Verwendung standardisierter molekularbiologischer Techniken (Sambrook et al., 1989) erzeugt. Bei Bedarf wurden Proben zwischen zwei enzymatischen Reaktionen mit Hilfe von AutoSeq™ G-50 Säulen (GE Healthcare, Freiburg) entsalzt.

Ligierte oder zu vervielfältigende Plasmide wurden in kompetente *E. coli* DH5α™-Zellen, die nach der CaCl₂-Methode gewonnen wurden, transformiert (Inoue et al., 1990). Die Retransformation von reiner Plasmid-DNA wurde nach dem Kurzprotokoll von (Pope and Kent, 1996) durchgeführt. Die Zellen wurden auf Ampicillin-haltigen (75 µg/ml Ampicillin, Calbiochem, Darmstadt) LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die LB-Agarplatten wurden hergestellt, indem 1.5% Agar (Sigma-Aldrich, Steinheim) in LB-Medium (20 g LB-Broth, Sigma-Aldrich, Steinheim, in 1 l demineralisiertem Wasser, pH 7,4) gelöst wurde. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Lösung auf 55°C wurde sie mit Ampicillin versetzt und in Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) gegossen. Am Tag nach der Kultivierung wurden sechs Klone angeimpft. Nach Anzucht dieser Klone in einer Schüttelkultur über Nacht bei 37°C (Schüttelinkubator Minitron (Infors, Bottmingen, Schweiz) in jeweils 5 bzw. später 2 ml Ampicillin-haltigem (75 µg/ml) LB-Medium wurde die Plasmid-DNA anfänglich unter Verwendung des GeneElute™ Plasmid-Miniprep-Kits (Sigma-Aldrich, Steinheim) und später unter Verwendung des FastPlasmid™ Miniprep-Kits (Eppendorf, Hamburg) aufgereinigt. Zur Gewinnung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde der Qiagen Plasmid-Midi-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3 Gerichtete Mutagenese zur Modifikation der cDNA-Konstrukte

Die gerichtete Mutagenese der cDNA-Konstrukte hatte entweder den Austausch, die Insertion oder die Deletion einzelner oder mehrerer Aminosäuren beziehungsweise Enzymschnittstellen

zum Ziel. Diese Mutationen wurden nach dem Prinzip des QuikChange™ Site-Directed-Mutagenesis-Kits (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Hierbei wurde doppelsträngige Plasmid-DNA, die die zu mutierende Sequenz enthielt, als Matrize in einer PCR eingesetzt (MasterCycler, Eppendorf, Hamburg). Zwei zueinander komplementäre PCR-Primer, die die gewünschte Mutation enthielten, wurden während der PCR durch die *Pfu Turbo* DNA-Polymerase in Anwesenheit von dNTPs so verlängert, dass genickte zirkuläre DNA-Stränge mit den inkorporierten Primern entstanden. Nach der PCR-Reaktion wurde die methylierte DNA-Matrize durch *Dpn* I-Behandlung (New England Biolabs, Frankfurt am Main) abgebaut und die entstandenen DNA-Plasmide in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen, die nach der CaCl₂-Methode (Inoue et al., 1990) gewonnen wurden, transformiert. Anschließend wurde zur Plasmidisolierung wie oben beschrieben verfahren.

3.2.4 PCR-Amplifikation und Umklonierung von cDNA

Bei diesem Verfahren diente die Plasmid-DNA, die die Zielsequenz enthielt, als Matrize für eine PCR-Amplifikation mit zwei Primern, die jeweils im 5'-Bereich der beiden komplementären DNA-Stränge annealten und den gewünschten cDNA-Bereich der Ausgangs-DNA flankierten. Die Primer verfügten des Weiteren im 5'-Bereich über Enzymschnittstellen, die ebenfalls im Zielvektor vorhanden oder mit diesem kompatibel waren, um die amplifizierte Doppelstrang-DNA in den gewünschten Vektor hineinzuligieren. Zur Erleichterung der Restriktion nahe der Enden des PCR-Produktes wurde eine Verlängerung von fünf Adenosinen am 5'-Ende der Primer angefügt.

Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 50 µl, in dem 10-100 ng der Plasmid-DNA als Matrize, 5 U *Pfu Turbo* DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg), je 150 µM dNTPs und je 250 nM PCR-Primer enthalten waren, unter den in Tab. 3.1 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tab. 3-1 PCR-Parameter

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	45 s
Denaturierung	25	95°C	45 s
Annealing		60°C	45 s
Elongation		72°C	1,5 min/kb Insert
Elongation	1	72°C	10 min

Das amplifizierte Insert besaß nun im 5'- und im 3'-Bereich zusätzlich die Restriktionsstellen der Oligonukleotide.

Das PCR-Produkt und der Zielvektor wurden jeweils sukzessive mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und bei Bedarf zum Pufferaustausch zwischen den enzymatischen Reaktionen mit Hilfe von AutoSeqTM entsalzt. Anschließend wurden beide auf jeweils einem Agarosegel (1 % Agarose (peqGOLD Universal Agarose; peqLab, Erlangen)) in TAE-Puffer (40 mM Tris, 1,14 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,5)) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Fluka, Seelze, Deutschland) bei 100 V aufgetrennt. Die Banden wurden mit UV-Licht detektiert und mit einem Videoprintersystem (Phase, Lübeck; UP-895CE Printer, Sony, Köln, Deutschland) dokumentiert. *EcoR I/Hind III*-restringierte λ -DNA (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) diente als Standard zur Fragmentgrößenbestimmung. Die erwünschten DNA-Banden wurden mit Skalpellen aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des Jetsorb-Gel-Extraction-Kits (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zur Erfolgskontrolle wurde die isolierte DNA auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt.

Vektor und PCR-Amplifikationsprodukt wurden bei Raumtemperatur 1-2 h oder bei 16°C über Nacht nach Herstellerangaben in Gegenwart von T4-DNA-Ligase und T4-DNA-Ligase-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main) miteinander ligiert. Am nächsten Tag wurde das Ligationsprodukt in kompetente DH5 α TM-Zellen transformiert und zur Plasmidisolierung wie oben beschrieben verfahren.

3.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenz modifizierter cDNA-Konstrukte wurde durch Didesoxynukleotid-Sequenzierung verifiziert. Die PCR wurde mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs (BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Ethanol-Fällung und anschließendem Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde das Pellet in LiChrosolv[®]-Wasser aufgenommen. Die elektrophoretische Auftrennung und Detektion der fluoreszierenden Nukleotide wurden mit einem ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Alignments zwischen DNA-Sequenzen wurden mit den Computerprogrammen ClustalW (Eddy, 1995) und VectorNTI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt.

3.2.6 Klonierte cDNA-Konstrukte

Die von mir klonierten cDNA-Konstrukte sind im Anhang in Tab. 8-1 nach Konstruktnummer sortiert aufgeführt. Die Verfahren zur Herstellung der Konstrukte und die dafür benötigten Primer sind jeweils angegeben. In der Tabelle nicht aufgeführte cDNA-Konstrukte wurden in unserem Labor von Frau U. Braam und Herrn P. Minko unter Verwendung der oben beschriebenen Methoden hergestellt und sind unter 8.2 aufgelistet.

3.3 cRNA-Synthese

Für die *in vitro* cRNA-Synthese wurden die jeweiligen DNA-Plasmide mit Restriktionsendonukleasen hinter dem Poly(A)-Schwanz des Vektors linearisiert. Dies erfolgte je nach Plasmid durch die Restriktionsenzyme *EcoRI* oder *Xho I*. Nach der Aufreinigung mit Hilfe des Qiaquick-Nucleotide-Removal-Kits (Qiagen, Hilden) und Ethanolfällung bei -20°C wurde das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur ca. 30 min lang getrocknet und anschließend in 5 mM Tris / 0,5 mM EDTA pH 8,0 aufgenommen. Davon wurden je 0,5-1 µg zur cRNA-Synthese eingesetzt. Die Synthese erfolgte mit der SP6-Polymerase (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA) in Gegenwart von dNTPs (NTP Set, GE Healthcare, Freiburg) und Cap-Nukleotid (RNA Cap Analogs, Epicentre Biotechnologies, Madison, USA). Das Transkript wurde anschließend durch Sepharose-Gelchromatographie (AutoSeq[™] G-50 Säulen, GE Healthcare Freiburg) und Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleotiden und Proteinen gereinigt und nach einer Ethanolfällung in 5 mM Tris/HCl pH 7,4 aufgenommen. Die Quantifizierung der cRNA erfolgte durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg). Nach der Synthese wurde die cRNA bei -70°C gelagert.

3.4 Xenopus-Oozyten als Expressionssystem

3.4.1 Herkunft und Haltung der Frösche

Die Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) wurden aus Südafrika, später aus Frankreich importiert (African *Xenopus* Facility, Südafrika oder *Xenopus express*, Vernassal, Frankreich). Bis zu zehn Tiere wurden in Becken mit 200 l Leitungswasser gehalten, die kontinuierlich mit Pressluft begast wurden. Die Wassertemperatur betrug 16-20°C. Der Raum wurde in einem 12-Stunden-Rhythmus beleuchtet. Die Krallenfrösche wurden zweimal wöchentlich mit gewürfeltem Rinderherz, dem kleine Mengen Multisanostol[®] zuckerfrei (Roland, Hamburg) zugefügt wurden, gefüttert.

3.4.2 Gewinnung des Ovars

Xenopus laevis-Weibchen wurden durch Inkubation in einer 0,2%igen Lösung von 3-Aminobenzoesäureethylester (Tricain, MS 222, Sigma Chemicals, St. Louis, USA) und 10 mM Hepes pH 7,4 anästhesiert. Durch einen ca. 1-1,5 cm langen Schnitt auf der Bauchseite wurden Haut und Muskelschicht durchtrennt, um Zugang zum Ovar zu bekommen. Dieses wurde mit einer Pinzette vorsichtig, jedoch nicht komplett herausgezogen. Die gewünschte Ovarmenge wurde mit einer Schere abgetrennt und bis zur Weiterbehandlung in steriler Oozyten-Ringer-Lösung (ORi, 90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes in demineralisiertem Wasser, pH 7,4 mit NaOH eingestellt) bei 19°C gelagert. Muskelschicht und Haut wurden separat wieder zusammengenäht. Der Frosch wurde über Nacht in einem separaten Behälter mit Leitungswasser gehalten. Am nächsten Tag wurde er in ein Becken mit zuvor operierten Fröschen zurückgesetzt, um die vollständige Heilung der Wunde und die Regeneration des Ovars bis zur nächsten Operation zu ermöglichen.

3.4.3 Kollagenase-Behandlung der Xenopus-Oozyten

Zur Entfernung des Bindegewebes und der Follikelzellen, die die Oozyten umgeben (Dumont, 1972), wurde das Ovar mit Pinzetten in kleine Stücke zerlegt und über Nacht (ca. 15 h) bei 19°C in sterilfiltrierter Kollagenase (1,3-1,5 mg/ml) in Gentamycin-haltigem ORi (50 µg/ml, Gentamycin-Sulfat, Alexis Biochemicals, Grünberg) inkubiert. Verwendet wurde die Kollagenase von der Firma Serva, Heidelberg (Kollagenase NB4G Proved Grade), der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim (Kollagenase Typ IA) oder der Firma Biochrom AG, Berlin (Kollagenase CLS Typ II). Am nächsten Morgen wurden die Oozyten mehrfach mit ORi vorgewaschen, um die Kollagenase und Zelldebris zu entfernen. Zur Ablösung der Follikelzellen wurden die Oozyten 10 min lang in Ca²⁺-freiem ORi inkubiert und

anschließend nochmals wiederholt mit ORi gewaschen. Anschließend wurden die Oozyten in ORi in eine Petrischale überführt. Um eine homogene Gruppe zu erhalten, wurden kurz darauf Oozyten der Entwicklungsstadien V oder VI (Colman, 1984) mit einer Glas-Pasteurpipette mit feuerpolierter Öffnung von $> 1,2$ mm ausgelesen und bis zur cRNA-Injektion bei 19°C in ORi aufbewahrt. Für längere Inkubationen der Oozyten wurde Gentamycin-haltiges ORi verwendet.

3.4.4 cRNA-Injektion in *Xenopus*-Oozyten

Die Injektion der Oozyten wurde an einem Injektionsplatz, bestehend aus einem Stereomikroskop (Stemi DV4, Zeiss, Jena), einer Mikroinjektionpumpe (Nanoliter Injector, World Precision Instruments, Sarasota, USA) und einem Mikromanipulator (World Precision Instruments, Sarasota, USA), durchgeführt. Die Glaskapillaren wurden mit Hilfe eines Mikropipettenpullers (Modell PP-830, Narishige, Japan) gezogen. Die cRNA wurde, wenn nicht anders angegeben, in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($50 \text{ nl}/\text{Oozyte}$) injiziert. hP2X₅- und rP2X₅-Untereinheiten wurden teilweise in einer Konzentration von $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ injiziert und für die elektrophysiologische Messung von hP2X₅-Konstrukten wurde die cRNA teilweise in einer Konzentration von $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ injiziert, da sonst die Zellen undicht waren. Dies ist in den Legenden der Abbildungen vermerkt. Für die Koexpression von Proteinen wurden die jeweiligen cRNAs zuvor im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt. Injizierte Zellen und nicht injizierte Kontrollgruppen wurden bei 19°C in ORi gelagert.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Metabolische Markierung mittels L-[³⁵S]-Methionin

Wenn in den Legenden der Abbildungen nicht anders angegeben, wurden alle Proteine während der Expression mit L-[³⁵S]-Methionin metabolisch markiert. Zwischen der Injektion und der radioaktiven Markierung wurden die Oozyten 1-2 h bei 19°C in ORi gelagert. Danach wurden sie mit Hilfe einer Glaspipette dreimal in ORi gewaschen und anschließend in spezielle Gefäße (Probengefäße, Sarstedt, Nümbrecht), deren Innenwand zuvor mit Oozyten-Homogenat beschichtet worden war, um ein Anhaften der Zellen zu verhindern, überführt. Darin erfolgte die metabolische Markierung der neu synthetisierten Proteine durch Zugabe von L-[³⁵S]-Methionin (Perkin Elmer, Boston, USA) auf die Oozyten (ca. $0,1 \text{ MBq}/\text{Oozyte}$). Diese als *pulse* bezeichnete metabolische Markierung des Gesamtproteins wurde nach 4 oder 15 h (über Nacht) durch dreimaliges Waschen der Oozyten in ORi beendet. Die Aufarbeitung mit Detergenz erfolgte entweder direkt nach dem *pulse* oder nach einer zusätzlichen *chase*-

Phase, in der die Oozyten für 24 h in Gentamycin-haltigem ORi nachinkubiert wurden. Die Inkubation während der *chase*-Phase erfolgte in Cell⁺ Gewebekulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht), deren Beschichtung ein Anhaften der Oozyten am Gefäßboden verhinderte. Wenn in den Legenden der Abbildungen nicht anders angegeben, wurden die Proteine nach einem *Übernacht-pulse* und einer *chase*-Phase aufgereinigt.

3.5.2 Aufreinigung der Proteine mit Ni²⁺-Chelatchromatographie

Eine Gruppe umfasste in der Regel 10 Oozyten, die jeweils mit der gleichen cRNA injiziert und zusammen radiomarkiert worden waren. Nach der radioaktiven Markierung (vgl. 3.5.1) wurden die Oozyten mit Ca²⁺-freiem ORi gewaschen, um bei der nachfolgenden Lyse die Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Proteasen zu reduzieren.

Als Detergenz zur Solubilisierung der Membranproteine wurde Digitonin (bis 2004 Serva, Heidelberg, danach Calbiochem, Darmstadt) verwendet. Vor dem Gebrauch wurde das Digitonin umkristallisiert, um unlösliche Verunreinigungen zu entfernen. Durch Aufkochen in Reinstwasser wurde eine 1%ige (Serva) oder 5%ige (Calbiochem) Lösung hergestellt und zur Ausfällung der unlöslichen Bestandteile 2-4 Tage bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde der Überstand filtriert und unter Vakuum lyophilisiert. Ab 2004 wurde für die gesamte Proteinaufreinigung Digitonin von der Firma Calbiochem (Darmstadt) verwendet. Dieses Digitonin wurde für die Proteinextraktion und sämtliche Waschschrte in der gelieferten Qualität, d.h. ohne weitere Aufreinigung, eingesetzt. Lediglich für die Elution der Proteine von der Ni²⁺-NTA-Agarose wurde weiterhin aufgereinigtes und lyophilisiertes Digitonin eingesetzt.

Zur Solubilisierung der Proteine wurden die Oozyten jeweils einer Gruppe in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Safe-Lock, Eppendorf, Hamburg) durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Als Puffer (20 µl pro Oozyte) diente eiskalter 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0 (Sambrook et al., 1989), in dem Digitonin (1%), 2-Iodacetamid (50 mM) und die Proteaseinhibitoren Pefabloc[®]-SC (100 µM), Pepstatin (5 µM), Leupeptin (50 µM) und Antipain (10 µM) (alle Biomol, Hamburg) gelöst waren. Anschließend wurde das Homogenat 15 min lang auf Eis inkubiert, dabei wurde das Homogenat gelegentlich jeweils 45 s lang gevortext (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich).

Um den löslichen Anteil von den unlöslichen Zellbestandteilen abzutrennen, wurde der Detergenzextrakt zentrifugiert (16 000 rpm, 4°C, 10 min, Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand wurde

zur vollständigen Abtrennung überführter unlöslicher Bestandteile ein zweites Mal unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert.

100 µl des Überstandes wurden zur Inkubation mit Ni²⁺-NTA-Agarose (30 µl einer aufgeschüttelten 1:1 (V/V) Suspension von Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0) versetzt. Die Inkubation erfolgte in 400 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0 in Anwesenheit von 10 mM Imidazol zur Reduktion unspezifischer Bindung, 1% Digitonin und der Proteaseinhibitoren. Die Ansätze wurden 45 min bei Raumtemperatur in einem Über-Kopf-Schüttler (REAX 2, Heidolph, Kelheim) inkubiert, um die Ni²⁺-NTA-Agarose in Suspension zu halten, so dass die Proteine über die freien Elektronenpaare der sechs Histidine, die am N- oder C-Terminus eingefügt worden waren, als Chelatkomplexe an die immobilisierten Ni²⁺-Ionen koordiniert werden konnten.

Anschließend wurde die Ni²⁺-NTA-Agarose fünfmal mit je 1 ml eiskaltem Waschpuffer (0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0, mit 0,2% Digitonin, 1 mM 2-Iodacetamid, 0,1 mM Pefabloc[®]-SC, 25 mM Imidazol) gewaschen. Bei jedem der Waschschrte wurde die Ni²⁺-NTA-Agarose durch Zentrifugation (10 000 rpm, 20°C, 1-2 min) sedimentiert, der Überstand abgesaugt und verworfen, die Ni²⁺-NTA-Agarose mit neuem Puffer versetzt und durch Schütteln wieder vollständig suspendiert. Durch den Waschvorgang mit einer im Vergleich zur Inkubation erhöhten Imidazolkonzentration (Inkubation mit 10 mM, Waschen mit 25 mM Imidazol) wurden diejenigen Komponenten des Oozytenextraktes entfernt, die weniger stark an die Ni²⁺-Ionen gebunden waren als die Proteine mit Hexahistidylsequenz, so dass der Hintergrund durch unspezifische Bindung reduziert wurde.

Bei der anschließenden nativen Elution wurde eine hohe Imidazolkonzentration eingesetzt, um die Proteine aus der Bindung mit den Ni²⁺-Ionen zu verdrängen. Dazu wurde die Ni²⁺-NTA-Agarose nach möglichst vollständiger Entfernung des Waschpuffers mit 50 µl Elutionspuffer (1% Digitonin, 250 mM Imidazol, 50 mM HCl, pH 7,4) versetzt, 15 min bei Raumtemperatur (21°C) in einem Horizontalschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) in Suspension gehalten, durch Zentrifugation (10 000 rpm, 21°C, 2 min) sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde mit weiteren 50 µl Elutionspuffer wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und auf Eis aufbewahrt.

Um die Vollständigkeit der nativen Elution zu überprüfen, wurde zusätzlich für 15 min bei 56°C (Thermomixer compact; Eppendorf, Hamburg) unter denaturierenden Bedingungen mit jeweils 50 µl 1 x SDS Probenpuffer (5 x SDS-Probenpuffer: 310 mM Tris/HCl, 10% SDS,

50% Glycerol, 0,5% Bromphenolblau, pH 6,8) oder 1 x Tricin/SDS Probenpuffer (5 x Tricin/SDS-Probenpuffer: 250 mM Tris/HCl, 20% SDS, 60% Glycerol, 0,05% Serva Blue G, pH 6,8), versetzt mit 100 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), für 15 min bei 56°C nacheluiert.

3.5.3 Oberflächenmarkierung durch ^{125}I -Sulfo-SHHP

Zur selektiven radioaktiven Markierung der an der Oberfläche der Oozyten exprimierten Proteine diente ^{125}I -sulfo-SHPP, ein membranimpermeables Derivat des Bolton-HunterReagenzes. ^{125}I -sulfo-SHPP wurde vor jedem Versuch in einer Vorreaktion aus Sulfo-SHPP (Pierce, Rockford, USA) frisch hergestellt ((Thompson et al., 1987), (Aschrafi et al., 2004)). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Oberflächenmarkierung von 10-12 Oozyten wird aus Tabelle 3-2 ersichtlich. Die Oozyten wurden zweieinhalb Tage vor der Jodierung mit cRNA injiziert und unmittelbar vor der Reaktion mehrfach mit Oozyten-PBS (20 mM NaH_2PO_4 , 110 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , pH 8,5 mit NaOH eingestellt) gewaschen. Die radioaktive Markierung der Oberflächenproteine erfolgte durch Zugabe des Reaktionsansatzes (Tab. 3-2) zu 10-12 Oozyten und anschließender einstündiger Inkubation auf Eis in mit Oozytenhomogenat beschichteten Gefäßen. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Ca^{2+} -freiem ORI mit 100 mM Lysinmonohydrochlorid, um nicht abreagiertes ^{125}I -Sulfo-SHP zu inaktivieren, und anschließend mit Ca^{2+} -freiem ORI, um das Lysin zu entfernen, gewaschen. Die so markierten Proteine wurden wie unter 3.5.2 beschrieben aufgereinigt.

Tab. 3-2 Reagenzien zur Oberflächenmarkierung durch ^{125}I -Sulfo-SHPP

Reagenz	Herkunft	Konzentration der Stammlösung	Volumen pro Ansatz
Sulfo-SHPP	Pierce, Rockford, USA	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in wasserfreiem DMSO	0,12 μl
Na^{125}I	Amersham Buchler, Braunschweig	0.6444 TBq/ mg	0,64 μl
Chloramin T	Merck, Darmstadt	5 mg/ml in 0.5 M Na-Phosphat pH 7.4	1 μl
D,L- α -Hydroxyphenyl-essigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim	1 mg/ml in 0.1 M NaCl	12,63 μl
Natriummetabisulfit	Sigma-Aldrich, Steinheim	12 mg/ml in 0.05 M Na-Phosphat pH 7.4	1 μl

3.5.4 Enzymatische Deglykosylierung

Zur Abspaltung N-glykosidisch gebundener Zuckerketten dienten die Enzyme Endoglycosidase H (EndoH, zur Abspaltung core-glykosylierter Zucker) und Peptid:N-Glycosidase F (PNGase F, zur Abspaltung aller glykosidisch gebundener Zuckerketten). Vor der Zugabe eines der beiden Enzyme wurden die nativ eluierten Membranproteine mit 1 x SDS-oder Tricin/SDS-Probenpuffer 15 min bei 56°C denaturiert. Vor der Verwendung der Enzyme wurde, sofern in den Abbildungen nicht anders angegeben, EndoH 1:10 mit EndoH-Puffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL, 5 mM Na₂EDTA, pH 7,5) und PNGase F 1:10 mit 10%iger NP40-Lösung verdünnt. Zur vollständigen Deglykosylierung der Proteine wurden 10 µl der denaturierten Probe mit 2 µl der jeweiligen Enzymverdünnung versetzt. Der Ansatz wurde 2-3 h bei 37°C inkubiert. Die Anwesenheit des nichtionischen Detergenzes NP40 im PNGase F-Reaktionsansatz verzögert die Inaktivierung des Enzyms durch das im SDS-Probenpuffer enthaltene SDS, bewirkte allerdings ein verändertes Laufverhalten der mit PNGase F behandelten Proteine bei der Gelelektrophorese. Daher wurden auch den unbehandelten und den mit EndoH behandelten Proben vor der elektrophoretischen Auftrennung 1,8 µl der 10%igen NP40-Lösung zugesetzt.

3.5.5 Limitierte Trypsinolyse

Um die nativ eluierten Proteine partiell zu fragmentieren, wurde eine limitierte Trypsinolyse durchgeführt. Hierfür wurde das Eluat mit 10-1000 µg/ml bovinen Trypsins (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe eines fünffachen Überschusses an Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) und 15-minütiger Inkubation auf Eis beendet. Die eingesetzten Konzentrationen sind aus den Legenden der jeweiligen Abbildungen ersichtlich. Die mit Trypsin behandelten Proben wurden auf Tricin-SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt.

3.5.6 Oxidatives Crosslinking von Cysteinresten

Um Cysteinreste benachbarter Untereinheiten zu crosslinken, wurden drei verschiedene Methoden angewendet: Oxidation durch Luftsauerstoff, durch Wasserstoffperoxid oder durch Kupferphenanthrolin. Bei allen drei Methoden wurden die Puffer für die Proteinaufreinigung ohne 2-Iodacetamid angesetzt, da dieses die Ausbildung der Disulfidbrücken verhindern würde. Zur Analyse der Proteine wurden diskontinuierliche SDS-PAGE-Gradientengele (4-10% Acrylamid) verwendet, um auch die höhermolekularen Banden, die nach dem Crosslinking zu erwarten waren, aufzutrennen.

Für das Crosslinking durch Luftsauerstoff wurden keine weiteren Zusätze verwendet, das Protokoll zur Proteinaufreinigung wurde lediglich mit der oben beschriebenen Abweichung durchgeführt.

Das Crosslinking durch H_2O_2 wurde nach der Inkubation mit Ni^{2+} -NTA-Agarose auf den Ni^{2+} -beads durchgeführt. Hierfür wurde die Ni^{2+} -NTA-Agarose zweimal mit Waschlösung (0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0, mit 0,2% Digitonin, 1 mM 2-Iodacetamid; 0,1 mM Pefabloc[®]-SC; 25 mM Imidazol) und anschließend einmal mit Imidazol-freiem Waschlösung gewaschen, um eine Reaktion des Imidazols mit dem H_2O_2 zu verhindern, bevor sie 30 min bei RT in Imidazol-freier, mit 1 mM bis 30 mM H_2O_2 (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzter Waschlösung inkubiert wurde. Die verwendeten Konzentrationen an H_2O_2 sind den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. Nach dieser Inkubation wurde noch zweimal mit Waschlösung gewaschen, bevor die Proteine nativ eluiert wurden.

Das Crosslinking durch Kupferphenanthrolin wurde vor der Lyse durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 10 Oozyten in 3 ml ORi mit 100 μM CuSO_4 (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 200 μM 1,10-Phenanthrolinmonohydrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, in DMSO gelöst) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten mit Ca^{2+} -freier ORi gewaschen und homogenisiert.

3.6 Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

3.6.1 Denaturierende SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde nach dem System von Laemmli (Laemmli, 1970) in einer vertikalen Gelapparatur der Firma Phas (Lübeck) mit einer Gelgröße von 8 x 16 cm und einer Geldicke von 1 mm durchgeführt. Es wurden diskontinuierliche Acrylamidgradienten von 4-10% (m/v), die mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen wurden, oder kontinuierliche Gelsysteme (4%/10% oder 4%/8% Acrylamid) verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele ist in Tab. 3-3 und Tab. 3-4 aufgeführt. Die einzelnen Gelschichten wurden nacheinander gegossen, wobei jeweils eine Zeitspanne von 1-2 h zur vollständigen Polymerisation jeder Schicht eingehalten wurde. Um ein Abreagieren der für die Polymerisation notwendigen Radikale durch den Luftsauerstoff und ein Antrocknen der Oberfläche der einzelnen Gelschichten zu verhindern, wurden diese unmittelbar nach dem Gießen mit Wasser überschichtet. Die Ausbildung von Probenaschen wurde durch das Einstecken eines Kammes in das Sammelgel vor dessen Aushärtung erreicht.

Die nativ eluierten Proteine wurden mit 5 x SDS-Probenpuffer, welcher meist 100 mM DTT zur Reduktion von Disulfidbrücken enthielt, versetzt, so dass der SDS-Probenpuffer auf eine einfache Konzentration verdünnt wurde und die Endkonzentration von DTT 20 mM betrug, und für 15 min bei 56°C denaturiert. War eine Reduktion von Disulfidbrücken nicht erwünscht, wie zum Beispiel bei Cystein-Crosslinking-Experimenten, so wurde der Probenpuffer nicht mit DTT versetzt, und vor dem Beladen der Gele wurden die Proben mit 100 mM 2-Iodacetamid versetzt und 15 min inkubiert, um eine Reduktion der Proben im Gel durch aus benachbarten Banden diffundierendes DTT zu verhindern. Die Anlagerung von SDS (1,4 g pro 1 g Protein) an die eluierten Proteine führte zu der Dissoziation in ihre Untereinheiten und einer vollständigen Denaturierung. Da die negative Ladung, die die Untereinheiten durch die Anlagerung von SDS erhalten, proportional zur Masse der solubilisierten Polypeptide ist, kann man die Molekulargewichte der Proteine durch Vergleich ihrer relativen Mobilität mit der von Standardproteinen bekannter Masse bestimmen. Das pro Spur aufgetragene Probenvolumen betrug 10 µl. Als Massenstandard dienten [¹⁴C]-markierte Rainbow™-Marker (14,3-220 kDa oder 2,5-45 kDa, GE Healthcare, Freiburg), die vor dem Auftragen mit 1 x SDS-Probenpuffer und 20 mM DTT versetzt und 2 min bei 95°C erhitzt wurden.

Die Elektrophorese erfolgte in einem für das Laemmli-System charakteristischen Laufpuffer, bestehend aus 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin und 0,1% SDS (m/v), pH 8,3. Zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Nachdem die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die gesamte Elektrophorese dauerte 1,5-2 h und wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Front aus dem Gelende auslief. Zur Immobilisierung der Proteine in der Polyacrylamid-Matrix wurden die Gele 20 min in einem Gemisch aus 25% Isopropanol und 10% Essigsäure fixiert. Anschließend wurden die Gele auf Whatman-Papier aufgezogen und 1,5-2 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet (Geldryer Model 583, Bio-Rad, München).

Tab. 3-3 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE

Acrylamidkonz. % (m/v)	Acrylamidgradient 4-10%		Sammelgel
	4%	10%	4%
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,125 ml	1,125 ml	--
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	--	--	1,26 ml
40% Acrylamid-Bis, 29:1 (Bio-Rad, München)	0,45 ml	1,125 ml	0,50 ml
Reinstwasser	2,923 ml	1,563 ml	3,18 ml
Glycerol	--	0,72 g	--
Temed	3 µl	3 µl	5 µl
APS 10%	15 µl	15 µl	25 µl

Tab. 3-4 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel bei der kontinuierlichen SDS-PAGE

Acrylamidkonz. % (m/v)	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,25 ml	2,25 ml	--
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	--	--	1,26 ml
40% Acrylamid-Bis, 29:1 (Bio-Rad, München)	1,80 ml	2,25 ml	0,50 ml
Reinstwasser	4,96 ml	4,45 ml	3,18 ml
SDS 5%	180 µl	180 µl	100 µl
Temed	4,5 µl	4,5 µl	5 µl
APS 10%	45 µl	45 µl	25 µl

3.6.2 Denaturierende Tricin-SDS-PAGE

Die Tricin-SDS-PAGE wurde nach (Schägger and von Jagow, 1987), (Schägger, 2006) durchgeführt. Verwendet wurde ein kontinuierliches Gelsystem (4%/8% oder 4%/10%/16,5% Acrylamid) mit einem Tris/Tricin-Puffersystem zur verbesserten Auftrennung kleiner Proteine ($M_R < 15$ kDa). Die genaue Zusammensetzung des Sammel-, Trenn- und Stoppgels ist in Tab. 3-5 aufgeführt. Das zusätzliche Stoppgel wurde zur Auftrennung sehr kleiner Proteine ($M_R > 3$ kDa) gegossen.

Die nativ eluierten Proteine wurden mit DTT-haltigem 5 x Tricin-Probenpuffer versetzt, so dass der Tricin/SDS-Probenpuffer einfach und das DTT 20 mM konzentriert war, und 15 min bei 56°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte wie unter 3.6.1 beschrieben. Der Kathodenpuffer, bestehend aus 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1% SDS, pH 8,25, enthielt im Gegensatz zur SDS-PAGE Tricin anstatt Glycin als Folgeion. Im Anodenpuffer (0,1 M Tris/HCl; pH 8,9) war kein Tricin notwendig. Da sich die Tricin-SDS-Polyacrylamidgele aufgrund ihres erhöhten elektrischen Widerstandes schnell erwärmten, wurde hier die Spannung niedriger gewählt (70 V beim Einlauf, 110 V beim Durchlauf).

Tab. 3-5 Zusammensetzung von Sammel-, Trenn- und Stoppgel bei der Tricin-SDS-PAGE

Acrylamidkonz. % (m/v)	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Stoppgel 16,5%	Sammelgel 4%
3 M Tris/HCl pH 8,45 0,3% (w/v) SDS	3,33 ml	2,00 ml	2,00 ml	1,67 ml
40% Acrylamid-Bis, 29:1 (Bio-Rad, München)	2,00 ml	1,50 ml	2,48 ml	0,50 ml
Reinstwasser	4,67 ml	2,50 ml	1,03 ml	2,83 ml
Glycerol	-	-	0,6 g = 0,49 ml	-
Temed	5 µl	3 µl	3 µl	4 µl
APS 10%	50 µl	30 µl	30 µl	40 µl

3.6.3 Blaue-Native-PAGE

Die Blaue-Native-PAGE wurde zur Isolierung von Membranproteinen in enzymatisch aktiver Form entwickelt (Schägger and von Jagow, 1991) (Wittig et al., 2006). Anstatt des denaturierend wirkenden SDS dient der Proteinfarbstoff Serva blue G (Serva, Heidelberg) zur Maskierung der Proteinladung. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird hier nicht nur von der Masse, sondern auch von der Form und Eigenladung des Proteins bestimmt. Da bei der Blauen-Nativen-PAGE der native Zustand des Proteins bewahrt wird, eignet sich die Methode auch zur Analyse von oligomeren Proteinkomplexen (Schägger et al., 1994) und erlaubt die korrekte Bestimmung der Quartärstruktur von Membranproteinen, wie zum Beispiel *Cys-loop*-Rezeptoren (Nicke et al., 1999b), (Büttner et al., 2001), (Nicke et al., 2004) oder Glutamat-Transportern (Gendreau et al., 2004).

Es wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgradientengele von 5-20%, bezogen auf die Gesamt-Acrylamidmenge, verwendet, um einen großen Molekulargewichtsbereich erfassen zu können. Um die Auflösung der Proteinbanden zu optimieren, wurde das Trenngel mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet. Die genaue Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels ist in Tabelle 3-6 aufgeführt.

Die nativ eluierten und auf Eis gelagerten Proteinproben wurden unmittelbar vor dem Auftragen mit nativem 5 x Probenpuffer (100 mM 6-Aminocapronat; 50% Glycerol, 1% Serva Blue G) versetzt. Um eine partielle Dissoziation oligomerer Proteine in ihre Untereinheiten zu bewirken, wurde einzelnen Proben zusätzlich 0,1% SDS, 0,1 M DTT, 0,1% SDS und 0,1 M DTT oder 4 M bzw. 8 M Harnstoff zugesetzt und das entsprechende Gemisch für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Art des jeweiligen Denaturierungsreagenzes ist den Legenden der Abbildungen zu entnehmen. Als Massenstandards dienten die Proteine Ferritin, Aldolase, Katalase und BSA (je 10 µg pro Spur, Combithek II[®], Boehringer, Mannheim), im letzten Drittel der Dissertation wurde ein käuflich erhältliches Gemisch aus Markerproteinen (HMW Calibration Kit for native electrophoresis, GE-Healthcare, Freiburg) verwendet.

Dem Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 15 mM BisTris, pH 7,0) wurden 0,002% (m/v) Serva Blue G zugesetzt, der Anodenpuffer (50 mM BisTris/HCl, pH 7,0) wurde ohne weitere Zusätze verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für 12-14 h bei einer Spannung von 30 V. Zur Anfärbung der nicht-radioaktiven Markerproteine wurden die Gele nach der Elektrophorese in einer Färbelösung (1,0 g Coomassie[®] Brilliant Blue R 250; 450 ml Methanol; 450 ml H₂O; 100 ml Eisessig) 15 min bei RT inkubiert und anschließend 20 min in einer Lösung aus 10%

Methanol und 10% Essigsäure entfärbt. Die Trocknung der Gele erfolgte wie unter 3.6.1 beschrieben.

Tab. 3-6 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel bei der Blauen-Nativen-PAGE

Acrylamidkonz. % (m/v)	Acrylamidgradient 5-20%		Sammelgel
	5%	20%	4%
1,5 M 6-Aminocapronat 150 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0	1,43 ml	1,43 ml	1.41 ml
29,2% Acrylamid-Bis, 37,5:1 (Bio-Rad, München)	0,716 ml	-	0,564 ml
50% Acrylamid-Bis, 37,5:1 (Bio-Rad, München)	-	1,72 ml	-
Reinstwasser	2,15 ml	0,58 ml	2,256 ml
Glycerol	--	0,72 g	--
Temed	2,9 µl	2,9 µl	6 µl
APS 10%	14,4 µl	14,4 µl	30 µl

3.7 Detektion der Proteine

3.7.1 PhosphorImaging

Die Detektion der radioaktiv markierten Proteine erfolgte mit Hilfe des Storm[®] 820 PhosphorImager (GE Healthcare, Freiburg), der eine digitale Abbildung der auf dem Gel vorhandenen Radioaktivität liefert. Das PhosphorImaging-System ermöglichte sowohl die qualitative als auch die quantitative Auswertung der getrockneten Gele mit Hilfe der Software ImageQuant[®] (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld).

3.7.2 BioMax MS Filme

Zur Detektion der radioaktiv markierten Proteine wurden teilweise zusätzlich Röntgenfilme (BioMax MS, Kodak, Rochester, NY, USA) verwendet, welche auf die getrockneten Gele aufgelegt und bei -80°C gelagert wurden. Zur Verstärkung der Strahlung wurden

Verstärkerfolien (BioMax TranScreen LE, Kodak, Rochester, NY, USA), die zwischen Gel und Film gelegt wurden, eingesetzt. Die Röntgenfilme wurden von Hand entsprechend den Herstellerangaben entwickelt (Entwickler, Fixierer: Kodak, Rochester, New York, USA).

3.8 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus*-Oozyten

Die funktionellen Analysen der Rezeptorproteine wurden von Dr. Ralf Hausmann, Dipl. Biol. Christiane Rosefort, Christian Wolf und Cindy Franklin aus unserer Arbeitsgruppe unter Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme („Two Elektrode Voltage Clamp“), durchgeführt. Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ermöglicht Ganzzelleableitungen an großen Zellen. Prinzip der Methode ist es, das Membranpotential (V_M) der Oozyte mit der Spannungselektrode zu messen und dabei durch die Stromelektrode so viele Ladungen in die Zelle zu injizieren, dass V_M den Wert eines bestimmten vorgegebenen Potentials (Klemmpotential oder Haltepotential: V_C) erreicht. Dies geschieht über einen konventionellen Messverstärker (Rückkopplungsverstärker) (Turbo TEC-05; NPI Elektronik, Tamm, Deutschland). Dessen Ausgang generiert in Abhängigkeit von der am Eingang gemessenen anliegenden Potentialdifferenz ein Potential (V_0) mit einem Strom (I_0), der über die Stromelektrode der Zelle appliziert wird. Die injizierten Ladungen verschieben das Membranpotential der Zelle derart, dass sich der Unterschied zwischen Ist-Wert (V_M) und Soll-Wert (V_C) verringert (deshalb die Bezeichnung negative Rückkopplung).

Die Methode erlaubt schnelle Spannungsänderungen im Millisekunden-Bereich, wobei die Geschwindigkeit weniger durch die Elektronik als durch die räumliche Ausdehnung der Zelle bestimmt wird. Mit dem verwendeten Messverstärker können Ströme bis maximal $\pm 50 \mu\text{A}$ gemessen und Stromänderungen von wenigen nA aufgelöst werden. Die Messdaten wurden analog gefiltert, digitalisiert und gespeichert, so dass sie zur späteren Auswertung zur Verfügung standen. Als Elektroden wurden vier Silber-Silberchloridelektroden verwendet (eine geerdete Bad-Elektrode, eine Bad-Referenz-Elektrode für die Potenzial-Elektrode, eine intrazelluläre Strom-Elektrode und eine intrazelluläre Potenzial-Elektrode). Die intrazellulären Mikroelektroden (Strom- und Potentialelektrode) wurden aus Glaskapillaren hergestellt, die einen Spitzendurchmesser im μm -Bereich aufwiesen. Sie hatten elektrische Widerstände $< 1\text{-}1,5 \text{ M}\Omega$, wenn sie mit 3 M KCl gefüllt waren. Diese Methode ist in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (zum Beispiel (Rettinger et al., 2000b), (Rettinger and Schmalzing, 2003), (Rettinger and Schmalzing, 2004)).

Die Ganzzellmessungen an den Oozyten wurden bei einem Haltepotential von -60 mV 1-2 Tage nach Injektion der cRNA bei Raumtemperatur vorgenommen. Die Oozyten wurden in einer kleinvolumigen Badkammer (10 μ l) kontinuierlich Schwerkraft-getrieben mit Ca^{2+} -freiem ORi superperfundiert (5-10 ml/min). Hierbei wurde eine Ca^{2+} -freie Lösung gewählt, um eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von endogenen Cl^- -Kanälen an der Oozytenmembran zu vermeiden (Methfessel et al., 1986).

Die Agonistenlösung in Ca^{2+} -freier ORi-Lösung wurde jeweils frisch hergestellt. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der verschiedenen Konstrukte wurde, wenn nicht anders angegeben, eine ATP-Konzentration von 1 mM eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Assemblierung humaner P2X₅-Untereinheiten

4.1.1 Funktionelle rP2X₅-Rezeptoren haben eine trimere Architektur

Alle in dieser Dissertation verwendeten P2X₅-Konstrukte besitzen ein N-terminales Hexahistidyltag, um nach der Expression in *X. laevis*-Oozyten die Proteinaufreinigung mittels Ni²⁺-Chelatchromatographie zu ermöglichen. In der Elektrophysiologie reagierten sowohl der Wildtyp- als auch der His-rP2X₅-Rezeptor auf ATP mit nicht desensibilisierenden einwärts gerichteten Strömen ähnlicher Form und Stärke, so dass es bei der Verwendung der His-rP2X₅-Untereinheit keine Bedenken gab, die Ergebnisse könnten im Vergleich zur Wildtyp-rP2X₅-Untereinheit verfälscht sein. Da diese Übertragbarkeit der Ergebnisse von dem Wildtyp auf die His-getagten Untereinheiten in unserer Arbeitsgruppe auch in Studien mit anderen Isoformen der P2X-Rezeptoren gezeigt wurde, konnte ich auch für die Experimente mit den hP2X₅-Untereinheiten die His-getagten Konstrukte verwenden.

Eine typische durch ATP hervorgerufene Stromkurve des in Oozyten exprimierten rP2X₅-Rezeptors zeigt die Abb. 4-1A. Wurden die Rezeptoren wiederholt einer ATP-haltigen Lösung ausgesetzt, war eine deutliche Veränderung der Stromkurve zu beobachten. Es entwickelte sich ein langsam aktivierender einwärts gerichteter Strom, der höchstwahrscheinlich durch sekundär aktivierte endogene Oozyten-eigene Ionenkanäle hervorgerufen wurde. Durch Flufenaminsäure, einen Inhibitor von Ca²⁺-aktivierten Chloridkanälen (White and Aylwin, 1990), konnte dieser sekundäre Strom reduziert werden, ohne den Verlauf der ATP-aktivierten rP2X₅-Rezeptorstromkurve zu beeinflussen.

Um das Assemblierungsverhalten der rP2X₅-Untereinheiten zu untersuchen, wurde die Blaue-Native-PAGE-Technik eingesetzt, da diese in früheren Studien zuverlässig den Oligomerisierungszustand verschiedener Proteine zeigen konnte ((Nicke et al., 1998), (Aschrafi et al., 2004), (Gendreau et al., 2004), u.a.). Die Analyse der in Oozyten exprimierten Proteine zeigte, dass die rP2X₅-Untereinheiten ebenso wie alle anderen bisher untersuchten P2X-Untereinheiten, mit Ausnahme der P2X₆-Untereinheiten (Aschrafi et al., 2004), auf den Blauen-Nativen-Gelen als definierte Proteinbande liefen. Wurden die Proben mit Harnstoff partiell denaturiert, entstand eine dreistufige Bandenleiter, mit deren Hilfe die Bande der nativen rP2X₅-Rezeptor-Probe als Trimer identifiziert werden konnte (Abb. 4-1B).

rP2X₅-Untereinheiten enthalten drei Konsensussequenzen für N-Glykosylierung (N-X-S/T), deren Nutzung der Proteinmasse eine Kohlenhydratmasse von ungefähr 10 kDa hinzufügen

(Abb. 4-1C). Die aus der Proteinsequenz berechnete Masse der deglykosylierten rP2X₅-Untereinheiten beträgt inklusive His-tag 52 kDa. Dies stimmt gut mit der experimentell ermittelten Masse der deglykosylierten Untereinheiten von etwa 54 kDa überein. Eine Deglykosylierung mit EndoH und PNGase F zeigte, dass tatsächlich alle N-Glykosylierungsstellen (⁷⁷NTT⁷⁹, ¹⁵⁷NST¹⁵⁹, ²⁰²NFS²⁰⁴) verwendet wurden: bei plasmamembranständigen P2X₅-Untereinheiten war eines der drei N-Glykane core-, die anderen zwei komplex glykosyliert waren (Abb. 4-1D)

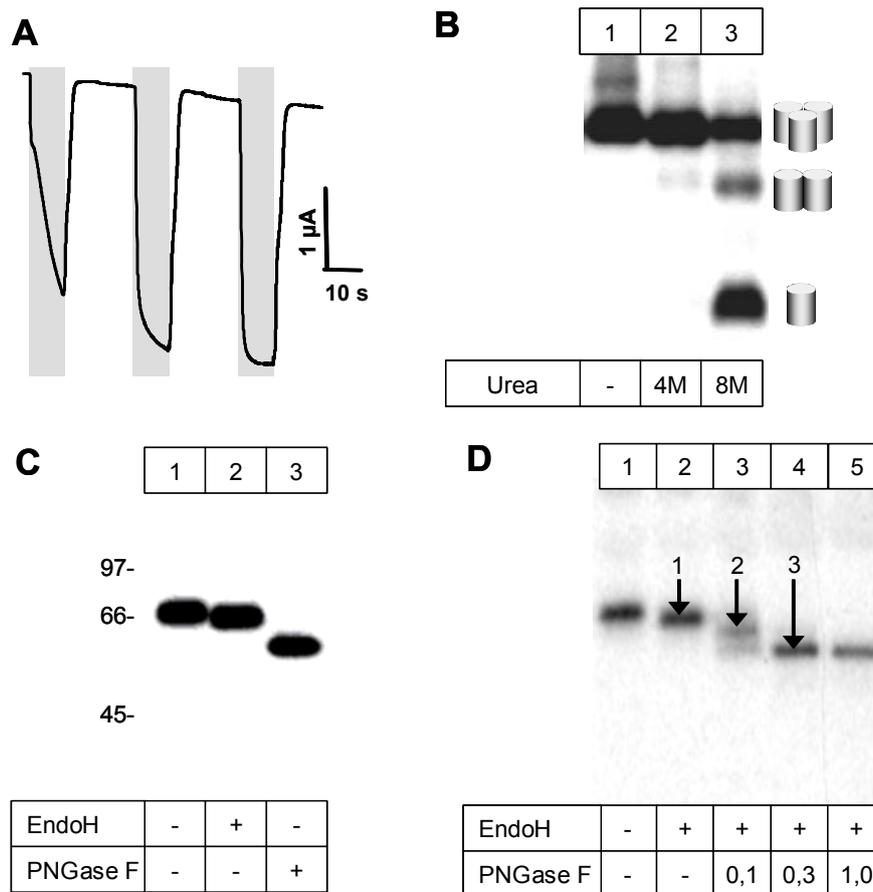


Abb. 4-1 Elektrophysiologische und biochemische Analyse von rP2X₅-Rezeptoren. **A**, Typische Stromkurven, hervorgerufen durch drei aufeinander folgende Aktivierungen mit je 10 μ M ATP (grau hinterlegt) in 30 s-Abständen. Der Lösung war 0,1 mM Flufenaminsäure zugesetzt, um die Aktivierung endogener Chloridkanäle zu verhindern. **B**, Autoradiographie eines Blaue-Native-PAGE-Gels [³⁵S]-Methionin-markierter rP2X₅-Rezeptoren im nativen und mit Harnstoff denaturierten Zustand. Die Zylinder neben dem Gel repräsentieren die Oligomerisierungszustände. **C**, Deglykosylierung der rP2X₅-Rezeptoren mit EndoH und PNGase F. Gezeigt ist die Autoradiographie eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (10% Acrylamid). **D**, Deglykosylierung mit EndoH und nachfolgender Behandlung mit steigenden PNGase F-Konzentrationen. Die Pfeile geben die Anzahl der N-Glykane an, die durch EndoH (1) und steigende PNGase F-Konzentrationen (2 und 3) entfernt wurden. Gezeigt ist die Autoradiographie eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (10% Acrylamid).

4.1.2 hP2X₅-Untereinheiten ohne Exon 10 können nicht trimerisieren

Die von Dr. Sven Sadtler während seiner Doktorarbeit in unserem Labor aus einer humanen Gehirn-cDNA-Bibliothek durch PCR-Amplifikation klonierte hP2X₅-Untereinheit hatte die gleiche Sequenz wie eine bereits veröffentlichte Splice-Variante der hP2X₅-Untereinheit, der das Exon 10 fehlte (Le et al., 1997). Diese Spleiß-Variante wurde hP2X₅^{Δ328-349} genannt, um anzuzeigen, dass die Codons für die Aminosäuren 328-349 der Volllängen-hP2X₅-Untereinheit (Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit) fehlen. Diese Aminosäuren umfassen einen Bereich vor und in der zweiten Transmembranregion. Die Lokalisierung der Exon 10-kodierten Region im Verhältnis zu der Transmembranregion (basierend auf den Programmen MEMSAT2.0 (Jones, 1998) und TMHMM2.0 (Krogh et al., 2001), die identische Grenzen für beide Transmembranregionen vorhersagten) ist in Abb. 4-2 (erstellt mit TeXtopo (Beitz, 2000)) dargestellt. Für mich war die Existenz dieser Splice-Variante von besonderem Interesse, da in einer früheren Studie mit rP2X₂-Untereinheiten (Torres et al., 1999b) beschrieben worden war, dass in genau der Region, die bei den hP2X₅-Untereinheiten durch Exon 10 kodiert wird, nämlich unmittelbar vor oder in der zweiten Transmembranregion, wahrscheinlich eine Assemblierungsdomäne liegt.

In Übereinstimmung mit bisherigen Erkenntnissen (Le et al., 1997), (Bo et al., 2003) führte die Expression von hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheiten in Oozyten nicht zu der Bildung von funktionellen ATP-aktivierten Ionenkanälen. Da die Ausbildung einer trimeren Struktur für die Funktion von P2X-Rezeptoren essentiell ist, habe ich das Assemblierungsverhalten der hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheiten durch Blaue-Native-PAGE untersucht, um herauszufinden, ob hier ein Grund für die fehlende Funktion dieses Konstruktes liegt. Abb. 4-3A zeigt, dass die in Oozyten exprimierte und mit [³⁵S]-Methionin markierte hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheit nur schwach exprimiert wurde und auf dem Blaue-Native-PAGE-Gel nicht als definierte Bande, sondern nur als amorphe Proteinmasse lief (Spur 1), was ein Hinweis auf eine Aggregation des Proteins ist. Im Gegensatz dazu lief die rP2X₅-Untereinheit überwiegend als definierte Bande mit der Masse eines Trimeres (Spur 10). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Fehlen von Exon 10 bei der hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheit einen schweren Defekt in der Assemblierung zur Folge hat und somit die Ausbildung funktioneller trimerer hP2X₅-Rezeptoren verhindert. Ein weiterer Grund für die fehlende Funktion ist höchstwahrscheinlich auch das Fehlen eines großen Teils der zweiten Transmembranregion, die für die Ausbildung und Funktion der Kanalpore eine wichtige Rolle spielt.

4.1.3 Nicht alle Exon 10-Aminosäuren sind für die Trimerisierung der hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheiten notwendig

Um zu untersuchen, welche der 22 Exon 10-kodierten Aminosäuren für eine korrekte Assemblierung der hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheiten und eine Ausbildung funktioneller Ionenkanäle essentiell sind, habe ich alle 22 Aminosäuren inseriert, indem ich schrittweise die Codons für 4 bis 8 Aminosäuren in die Konstrukte eingefügt habe, bis ich eine hP2X₅-cDNA in voller Länge generiert hatte (Abb. 4-3A). Die eingefügten Codons entsprachen denen, die schon zuvor durch eine TBLAST-Suche humangenomischer DNA als Exon 10 des hP2X₅ identifiziert worden waren (Bo et al., 2003). Die Expression der so gewonnenen hP2X₅-Konstrukte in *X. laevis*-Oozyten zeigte, dass das Einfügen von minimal 11 (Aminosäuren 328-338) der 22 Aminosäuren von Exon 10 notwendig war, um eine signifikante Bildung von Homotrimeren zu erreichen. Die Trimerisierung war sowohl mit einer verbesserten Proteinstabilität verbunden als auch mit einer Lokalisation in der Plasmamembran (Abb. 4-3B), korrespondierte allerdings nicht mit der Ausbildung funktioneller Ionenkanäle (Abb. 4-3C). Die Superfusion von Oozyten mit ATP-haltigem Medium konnte nur dann einen Strom erzeugen, wenn alle der 22 Exon 10 umfassenden Aminosäuren eingefügt waren (Abb. 4-3C). Die nicht assemblierenden hP2X₅-Untereinheiten waren nicht funktionell (Abb. 4-3C) und wurden nicht aus dem ER zur Plasmamembran exportiert (Abb. 4-3B). Daraus lässt sich schließen, dass, sobald die Länge der eingefügten Exon 10-Aminosäuren ausreichend ist, das resultierende Protein eine Struktur hat, die der nativen Faltung der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit ähnlich genug ist, um von dem ER-Qualitätskontrollsystem nicht mehr als defekt erkannt zu werden. Somit wird sie nicht im ER zurückgehalten, sondern zur Plasmamembran exportiert.

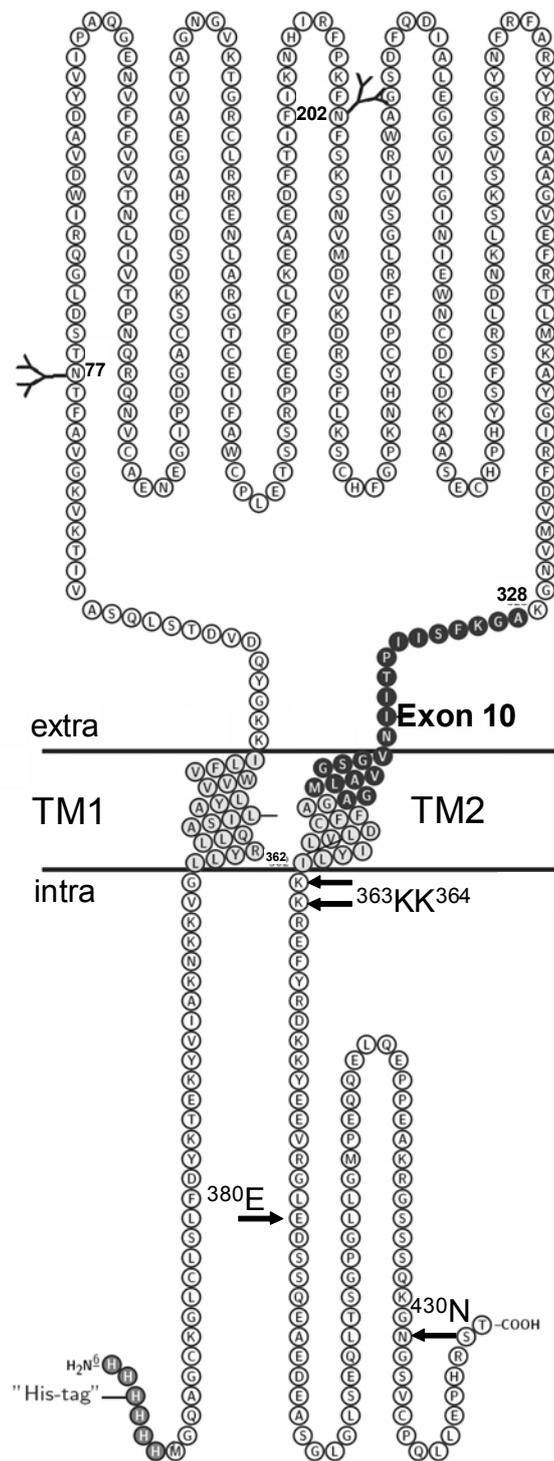


Abb. 4-2 Topologie-Modell der hP2X₅-Untereinheit. Lineare Aminosäuresequenz im 1-Buchstaben-Code. TM1 und TM2 sind hellgrau, das Hexahistidyltag ist mittelgrau und die durch Exon 10 kodierte Aminosäuresequenz ist schwarz dargestellt. In der Ektodomäne sind die beiden Konsensussequenzen für N-Glykosylierung eingezeichnet.

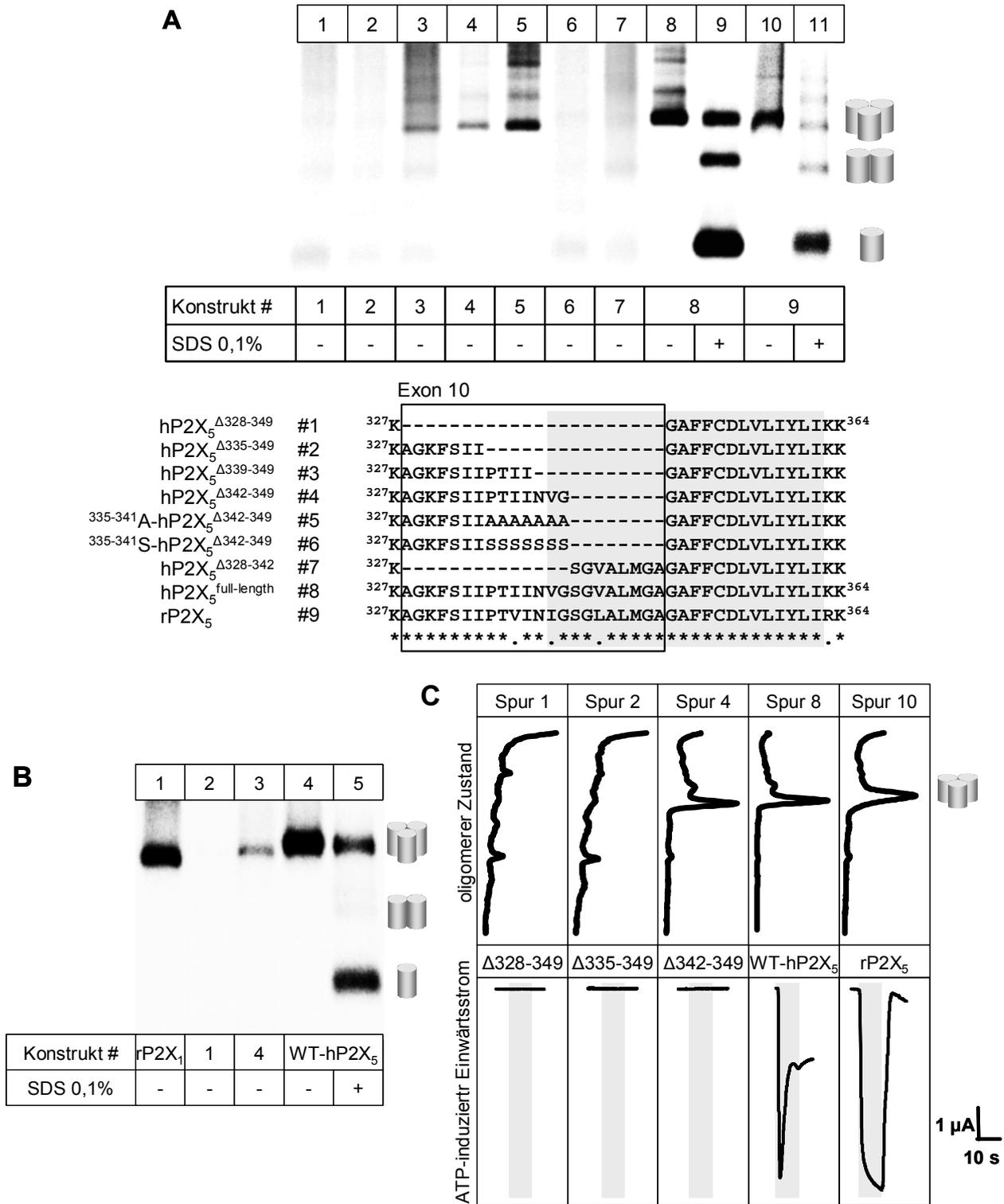
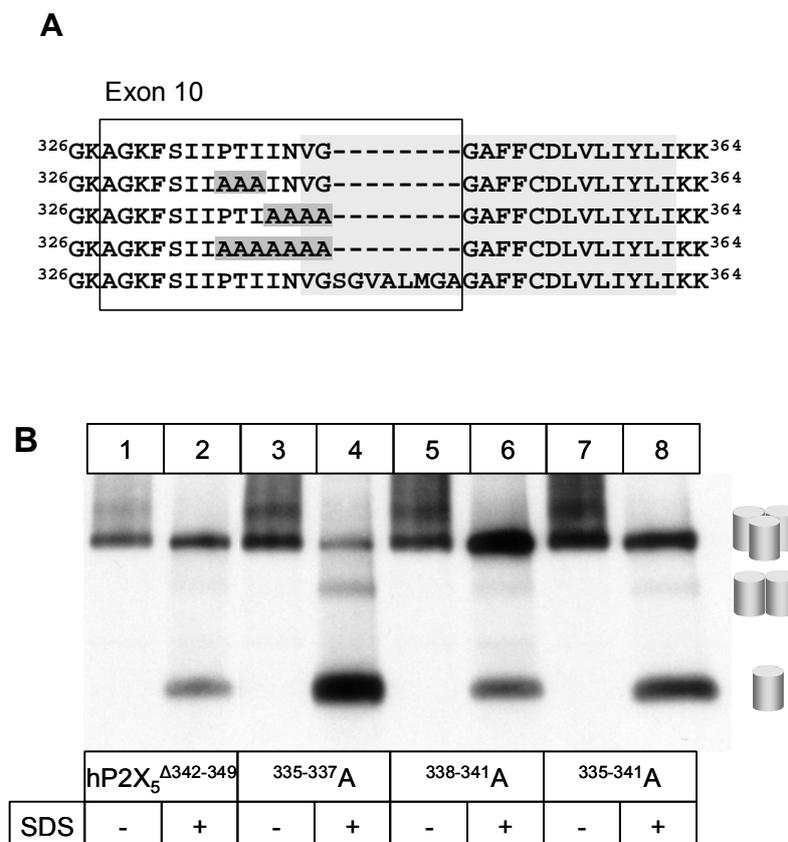


Abb. 4-3 Die Rolle von Exon 10 bei der Assemblierung und Funktion von hP2X₅-Untereinheiten. **A**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels [³⁵S]-Methionin-markierter hP2X₅-Konstrukte im nativen und teilweise mit SDS denaturierten Zustand. Die Sequenzen der jeweiligen Konstrukte mit der Lage von Exon 10 (Kasten) und TM2 (hellgrau hinterlegt) sind unter dem Gel dargestellt. **B**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels, das die Oberflächenexpression einiger ¹²⁵I-markierter hP2X₅-Konstrukte im nativen und mit SDS denaturierten Zustand zeigt. **C**, Obere Hälfte: quantitative Profile der jeweiligen PAGE-Gel-Spuren aus B, untere Hälfte: Stromkurven der jeweiligen Konstrukte (injizierte cRNA-Konzentration: 0,01 µg/µl), hervorgerufen durch die Aktivierung mit 1 mM ATP (grau hinterlegt).

4.1.4 In Exon 10 ist kein sequenzspezifisches Trimerisierungsmotiv enthalten

Um herauszufinden, ob innerhalb der für die Trimerisierung essentiellen Exon 10-Sequenz ein bestimmtes Aminosäuremotiv enthalten ist, das zur Ermöglichung der Assemblierung beiträgt, habe ich ein Alanin-Scanning dieses Bereiches durchgeführt. Hierzu benutzte ich die hP2X₅^{Δ342-349}-Untereinheit, die, wie bereits gezeigt, durch Einfügen der Exon 10-Aminosäuren ³³⁵PTIINVG³⁴¹ zur Trimerisierung fähig ist (Abb. 4-3A, Spur 4). Ich erzeugte durch Mutagenese drei Konstrukte, in denen ich 3, 4 oder alle 7 Aminosäuren dieser Sequenz zu Alanin mutierte (³³⁵⁻³³⁷A-, ³³⁸⁻³⁴¹A- und ³³⁵⁻³⁴¹A-hP2X₅^{Δ342-349}, Abb. 4-4A), um zu untersuchen, ob dies einen Einfluss auf das Assemblierungsverhalten der Konstrukte hat. Nach der Expression in *X. laevis*-Oozyten und Analyse mittels Blauer-Nativer-PAGE zeigte sich aber, dass alle drei Mutanten als definierte Banden in Höhe der Trimere liefen (Abb. 4-4B,C). Dies legt den Schluss nahe, dass es tatsächlich nur darauf ankommt, eine ausreichende Anzahl an Aminosäuren in dieser Region zu haben, ohne dass ein spezifischer Rest für die Assemblierung wichtig ist. In der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme erwies sich allerdings keines der untersuchten Konstrukte als funktionell (Abb. 4-4C).



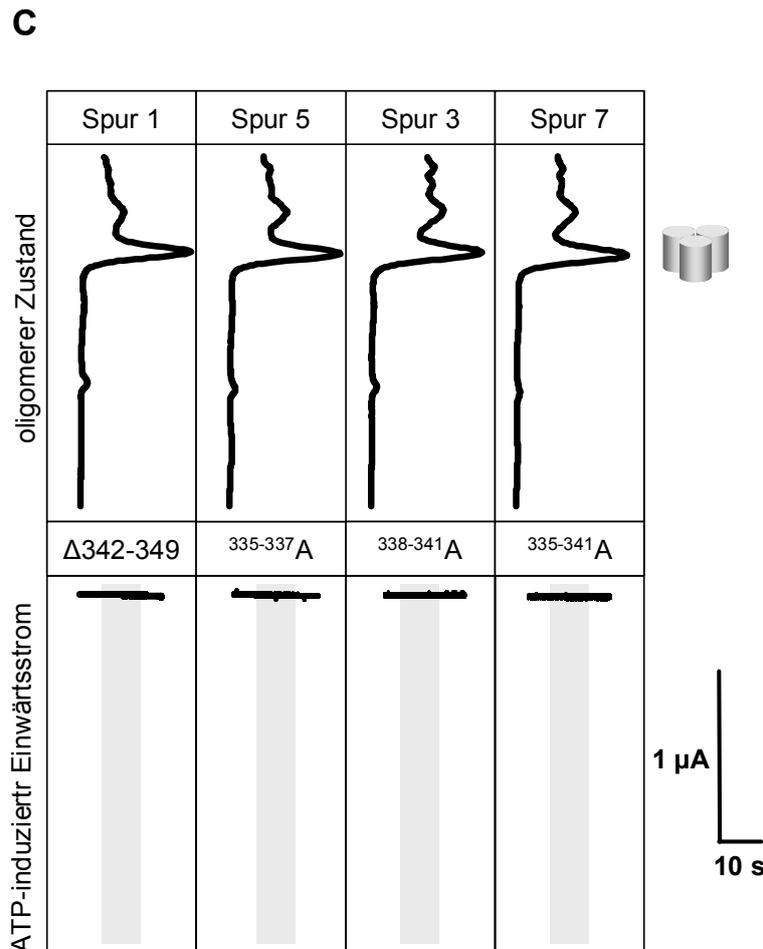


Abb. 4-4 Alanin-Scanning der durch Exon 10 kodierte Aminosäuren 335-341 der hP2X₅-Untereinheit.
A, Aminosäuresequenzen der untersuchten hP2X₅-Konstrukte im gescannten Bereich. Alanin-Mutationen sind dunkelgrau hinterlegt, TM2 ist hellgrau hinterlegt und Exon 10 ist durch einen Rahmen angezeigt. **B**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels der in A aufgeführten Konstrukte im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **C**, Obere Hälfte: quantitative Profile der jeweiligen PAGE-Gel-Spuren aus B, untere Hälfte: Stromkurven der jeweiligen Konstrukte (injizierte cRNA-Konzentration: 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), hervorgerufen durch die Aktivierung mit 1 mM ATP (grau hinterlegt).

4.1.5 Die Hydrophobizität der Exon 10-Sequenz ist essentiell für die Trimerisierung

Um zu überprüfen, ob es wirklich lediglich auf die Anzahl und nicht auch auf die Art der eingefügten Aminosäuren ankommt, habe ich die ³³⁵PTIINVG³⁴¹-Sequenz in der hP2X₅^{Δ342-349}-Untereinheit nicht nur durch Alanin, sondern auch durch Serin ersetzt (³³⁵⁻³⁴¹S- hP2X₅^{Δ342-349}). Im Gegensatz zu der Alanin-Mutante war dieses Konstrukt nach der Expression in Oozyten nicht in der Lage zu trimerisieren, sondern lief auf dem Blaue-Native-PAGE-Gel als amorphe Proteinmasse ohne definierten Assemblierungszustand (Abb. 4-3A, Spur 6).

Eine denkbare Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass Alanin, aber nicht Serin dazu in der Lage ist, das äußere fehlende Stück der zweiten Transmembranregion so zu ersetzen, dass eine Ausbildung der Transmembranregion und somit auch eine korrekte Platzierung der zytosolischen C-terminalen Domäne möglich ist. Serin unterscheidet sich von Alanin lediglich darin, dass es eine zusätzliche Hydroxylgruppe in der Seitenkette besitzt. Polyalaninsequenzen sind sehr gut in der Lage, Helices auszubilden (Marqusee et al., 1989), während Polyserinsequenzen strukturell eher unorganisiert sind (Howard et al., 2004). Außerdem ist Serin durch die Hydroxylgruppe hydrophiler, was dazu führen könnte, dass die Sequenz nicht als Transmembranregion erkannt und in die Membran integriert wird. Um diese Erklärung zu überprüfen, versuchte ich mir die Tatsache zunutze zu machen, dass in der zytosolisch gelegenen C-terminalen Domäne eine Konsensussequenz für N-Glykosylierung vorhanden ist (⁴³⁰NGS⁴³², Nummerierung bezogen auf die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit). Diese Sequenz wird normalerweise nicht glykosyliert, da die C-terminale Domäne während der Proteinsynthese nicht im ER lokalisiert ist und somit für eine N-Glykosylierung nicht zugänglich ist. Wird die zweite Transmembranregion nicht korrekt ausgebildet, könnte erwartet werden, dass die C-terminale Domäne nun nicht korrekt zytosolisch, sondern luminal platziert ist und somit im ER glykosyliert werden kann. Ich konnte aber keine Hinweise hierfür finden. Eine Deglykosylierung mit EndoH und PNGase F ergab, dass in der hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheit ebenso wie in der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit nur zwei N-Glykane vorhanden sind (Abb. 4-5A,B), was in Einklang mit dem Vorhandensein von zwei N-Glykosylierungsstellen (⁷⁷NTS⁷⁹ und ²⁰²NFS²⁰⁴, Abb. 4-2) in der Ektodomäne steht.

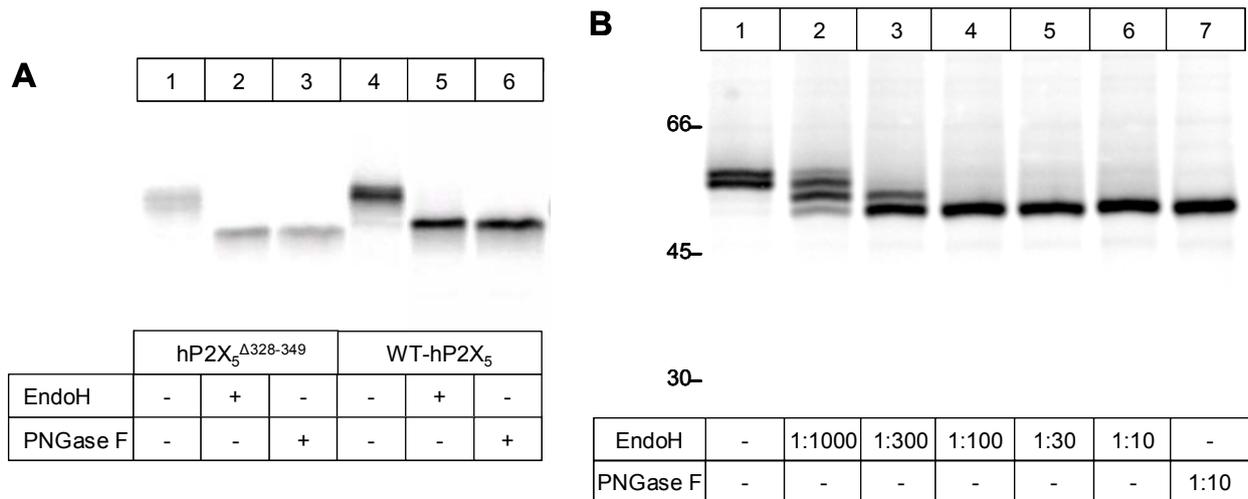


Abb. 4-5 Deglykosylierung von hP2X₅-Untereinheiten. **A**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit denaturierten hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheiten und Wildtyp-hP2X₅-Untereinheiten, die direkt nach dem Übernachts-[³⁵S]-Methionin-pulse aufgereinigt wurden. Beide tragen die gleiche Anzahl an N-Glykanen. **B**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen Tricin-SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheiten, die direkt nach dem Übernachts-[³⁵S]-Methionin-pulse aufgereinigt wurden und mit steigenden EndoH-Konzentrationen bzw. PNGase F behandelt wurden, um die Anzahl der N-Glykane zu ermitteln.

Nun vermutete ich, dass ⁴³⁰NGS⁴³² möglicherweise wegen des kurzen Abstands von nur 15 Aminosäuren zum C-terminalen Ende nicht glykosyliert sein könnte, da bereits gezeigt worden war, dass für eine effiziente N-Glykosylierung eine Distanz von mindestens 60 Aminosäuren zum C-Terminus notwendig ist (Nilsson and Von Heijne, 2000). Zur Überprüfung dieser Vermutung mutierte ich das normalerweise zytosolisch gelegene ³⁸⁰E zu N, um so eine artifizielle Konsensussequenz für eine N-Glykosylierung zu erzeugen (³⁸⁰NDS³⁸², Nummerierung bezogen auf die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit), die mit 65 Aminosäuren einen größeren Abstand zum C-terminalen Ende des Proteins hat. Und tatsächlich liefen die entsprechende hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheit und die ³³⁵⁻³⁴¹S-hP2X₅^{Δ342-349}-Mutante auf dem SDS-PAGE-Gel mit einer um 2-3 kDa höheren Masse als die Ausgangskonstrukte ohne diese weitere Glykosylierungssequenz (Abb. 4-6A, Spuren 1, 2, 6, 7). Dies spricht für eine luminaire Lokalisation der C-terminalen Domänen der beiden Konstrukte, da nur bei dieser Orientierung ³⁸⁰NDS³⁸² glykosyliert wird. Das Fehlen von Exon 10 sowie das Ersetzen dieser Sequenz durch polare Aminosäuren führt demnach zu einem negativen hydrophoben *Mismatch*, bei dem der hydrophobe Transmembranbereich des Proteins zu kurz ist, um die Plasmamembran vollständig zu durchspannen (Killian, 1998). So wird die kurze hydrophobe Sequenz entweder gar nicht oder nur in Form einer „reentry loop“

in die Membran integriert, was in beiden Fällen eine luminale Lokalisierung des C-Terminus zur Folge hat (Abb. 4-6B). Als Kontrolle für diese Schlussfolgerung fügte ich die artifizielle N-Glykosylierungssequenz auch in die trimerisierenden $hP2X_5^{\Delta 339-349}$ - und $^{335-341}A$ - $hP2X_5^{\Delta 342-349}$ -Konstrukte ein. Bei diesen Mutanten war auf dem SDS-PAGE-Gel kein Massenunterschied im Vergleich zu den Ausgangskonstrukten zu beobachten (Abb. 4-6A, Spuren 3, 4, 5). Damit war bewiesen, dass die Hypothese der fehlenden Membranintegration zutrifft. Da dies eine ausgesprochen große Änderung der Gesamtproteinstruktur zu Folge hat, ist die fehlende Trimerisierung nicht überraschend. Höchstwahrscheinlich sind bei dieser Fehlfaltung die Assemblierungsdomänen nicht in der korrekten Position, so dass keine Interaktion zwischen den Untereinheiten möglich ist. Dies spricht für eine wichtige Rolle der zweiten Transmembranregion bei der Trimerisierung von $hP2X_5$ -Untereinheiten.

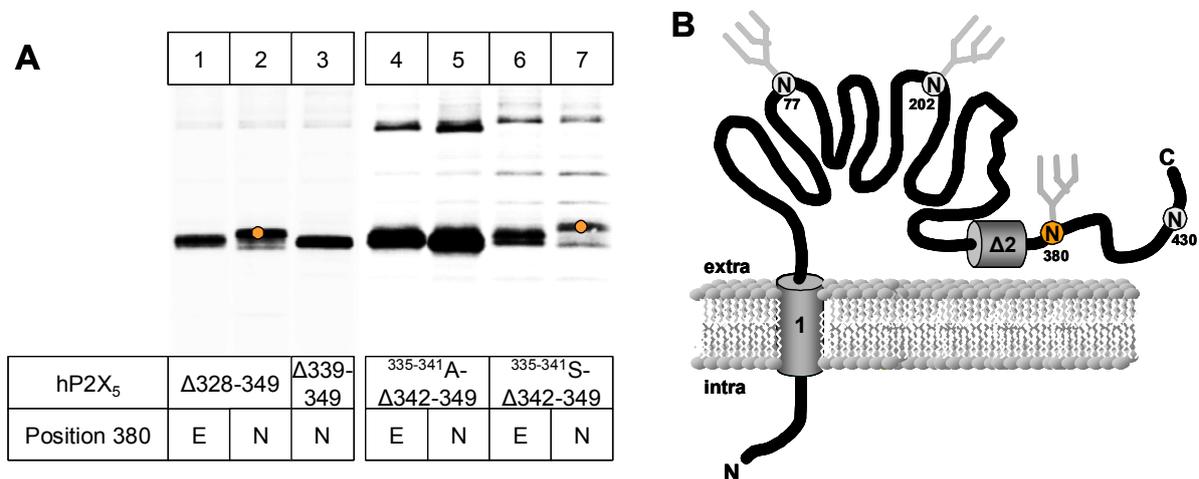


Abb. 4-6 Membrantopologie verschiedener $hP2X_5$ -Konstrukte. **A**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit $hP2X_5$ -Konstrukten. Wo angegeben, wurde ³⁸⁰E durch N ersetzt, um eine N-Glykosylierungssequenz (N-D-S) in die C-terminale Domäne einzufügen. **B**, Topologie-Modell, in dem die beiden natürlichen Konsensussequenzen für N-Glykosylierung in der Ektodomäne in Position 77 und 202 eingezeichnet sind sowie die durch Mutation eingeführte in Position 380, die bei Nichtausbildung der zweiten Transmembranregion glykosyliert wird. Die Konsensussequenz in Position 430 wird nicht glykosyliert, da sie zu nah am C-Terminus liegt.

4.1.6 Die Region N-terminal zur zweiten Transmembranregion enthält wichtige Assemblierungsinformationen

Um zu überprüfen, ob nicht nur der von mir durch Mutagenese untersuchte Exon 10-Bereich (³³⁵PTIINVG³⁴¹) für die Assemblierung wichtig ist, sondern eventuell auch die vorangehenden Aminosäuren eine Rolle spielen, führte ich hier ebenfalls ein Alanin-Scanning durch. Ich mutierte in der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit in Fünferblöcken die Aminosäuren ³²²VMVNG³²⁶, ³²⁷KAGKF³³¹ und ³³²SIIPT³³⁶ zu Alanin (Abb. 4-7A). Nach der Expression dieser Konstrukte in Oozyten und nachfolgender Analyse durch Blaue-Native-PAGE war zu erkennen, dass die ersten beiden Konstrukte eine sehr reduzierte Assemblierungskapazität hatten (Abb. 4-7B,C, Spuren 3, 5 und 9). Die ³³²⁻³³⁶A-hP2X₅-Mutante dagegen assemblierte vergleichbar mit der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit (Abb. 4-7B,C, Spur 11). Dies war auch die einzige Mutante, die sich bei der elektrophysiologischen Analyse als funktionell erwies.

Überraschenderweise zeigte sich aber in der Oberflächenmarkierung mit ¹²⁵I-Sulfo-SHPP, dass die ³²⁷⁻³³¹A-hP2X₅-Mutante an die Plasmamembran exportiert wurde und hier deutlich als definierte Bande auf dem Blaue-Native-PAGE-Gel zu erkennen war, die auf der Höhe eines Trimeres lief (Abb. 4-8, Spur 2). Die Oberflächenexpression war aber im Vergleich zur Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit reduziert, so dass es wahrscheinlich ist, dass nur ein kleiner Anteil des Proteins trimerisiert und zur Plasmamembran exportiert wurde. Dieser Anteil war so klein, dass er bei der Analyse des Gesamtproteins durch metabolische Markierung mit [³⁵S]-Methionin neben dem nicht assemblierenden Proteinanteil kaum zu erkennen war.

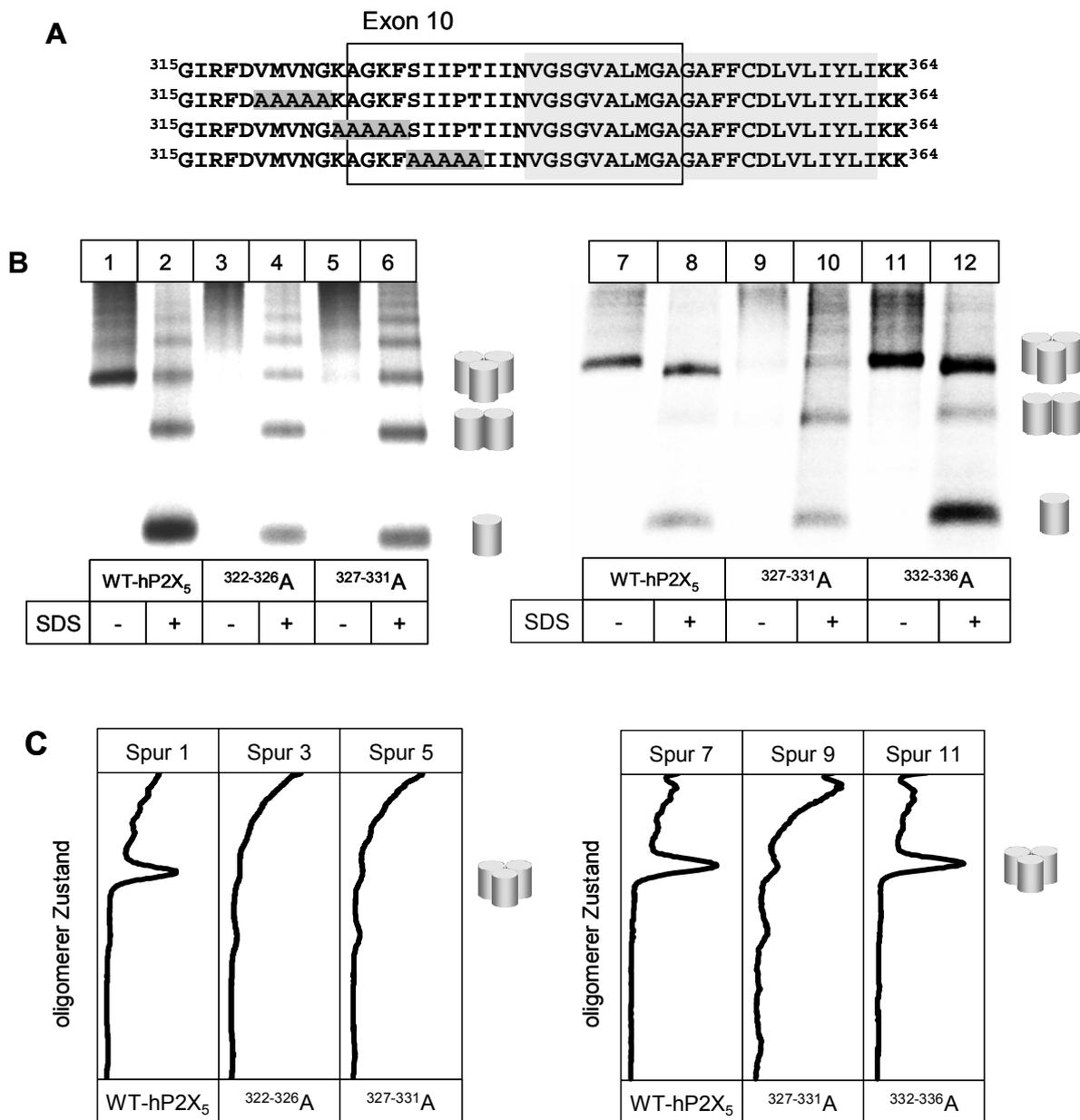


Abb. 4-7 Assemblierung von Alanin-Mutanten der Pre-TM2-Region der hP2X₅-Untereinheit. A, Aminosäuresequenz der untersuchten hP2X₅-Konstrukte im Bereich von Exon 10. Alanin-Mutationen sind dunkelgrau hinterlegt, TM2 ist hellgrau hinterlegt und Exon 10 ist durch einen Rahmen angezeigt. **B,** PhosphorImager Scans von Blaue-Native-PAGE-Gelen der in A aufgeführten Konstrukte im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. Links: die Proben wurden direkt nach dem Übernacht-[³⁵S]-Methionin-pulse aufgereinigt. Rechts: Die Proben wurden nach einem 4 h-pulse und einem chase aufgereinigt, die injizierte cRNA-Konzentration betrug 0,05 µg/µl. **C,** Quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus B.

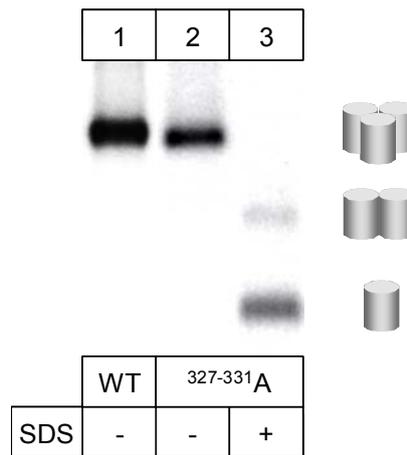


Abb. 4-8 Oberflächenexpression der $^{327-331}$ A-hp2X₅-Mutante. PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels, das die Oberflächenexpression zweier 125 I-markierter hp2X₅-Konstrukte im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand zeigt.

Ich generierte nun weitere Alanin-Mutanten, $^{327-329}$ A-, $^{330-331}$ A-, 330 A- und 331 A-hp2X₅, um diese Region noch detaillierter zu untersuchen und die Zahl der wichtigen Aminosäuren weiter einzugrenzen. Abb. 4-9A zeigt ein Blaue-Native-PAGE-Gel, auf dem die in *X. laevis*-Oozyten exprimierte Konstrukte zu sehen sind. Die $^{330-331}$ A-hp2X₅-Rezeptormutante (Spur 5) zeigte als einzige der neuen Mutanten eine ähnlich reduzierte Trimerisierung wie die $^{327-331}$ A-hp2X₅-Mutante (Spur 3), was am besten in den quantitativen Profilen zu erkennen ist (Abb. 4-9B). Im Gegensatz zu der $^{327-331}$ A-hp2X₅-Mutante zeigte allerdings die $^{330-331}$ A-hp2X₅-Doppelmutante in elektrophysiologischen Experimenten eine, wenn auch nur geringe, Funktionalität (Abb. 4-9B, Spur 5). Auch die $^{327-329}$ A-Tripelmutante und die Einzelmutanten waren, wenn auch gegenüber der Wildtyp-hp2X₅-Untereinheit mit reduzierten Amplituden, funktionell (Abb. 4-9B, Spuren 4, 6, 7). Erstaunlicherweise assemblierten aber die beiden Einzelmutanten 330 A und 331 A in einem vergleichbaren Ausmaß wie die Wildtyp-hp2X₅-Untereinheit (Abb. 4-9A,B, Spuren 6 und 7). Dies spricht dafür, dass es nicht eine einzelne Aminosäureseitenkette, sondern eine größere Region ist, die die Assemblierung der hp2X₅-Untereinheiten ermöglicht. Dies könnte daran liegen, dass die Gesamtstruktur dieser Region für die korrekte Platzierung von Assemblierungsdomänen wichtig ist. Durch die Mutation mehrerer, nicht aber einzelner Aminosäuren könnte diese Struktur so stark verändert werden, dass die Trimerisierung gestört wird. Die Region vor der zweiten Transmembranregion wurde auch bei der rP2X₁-Untereinheit durch Alanin-Scanning untersucht und erwies sich auch hier als wichtig für die Trimerisierung der Untereinheiten (siehe 4.2.8). Die Rolle der Ektodomäne

bei der Assemblierung von P2X₅-Untereinheiten wird in 4.2.8 genauer ausgeführt und diskutiert.

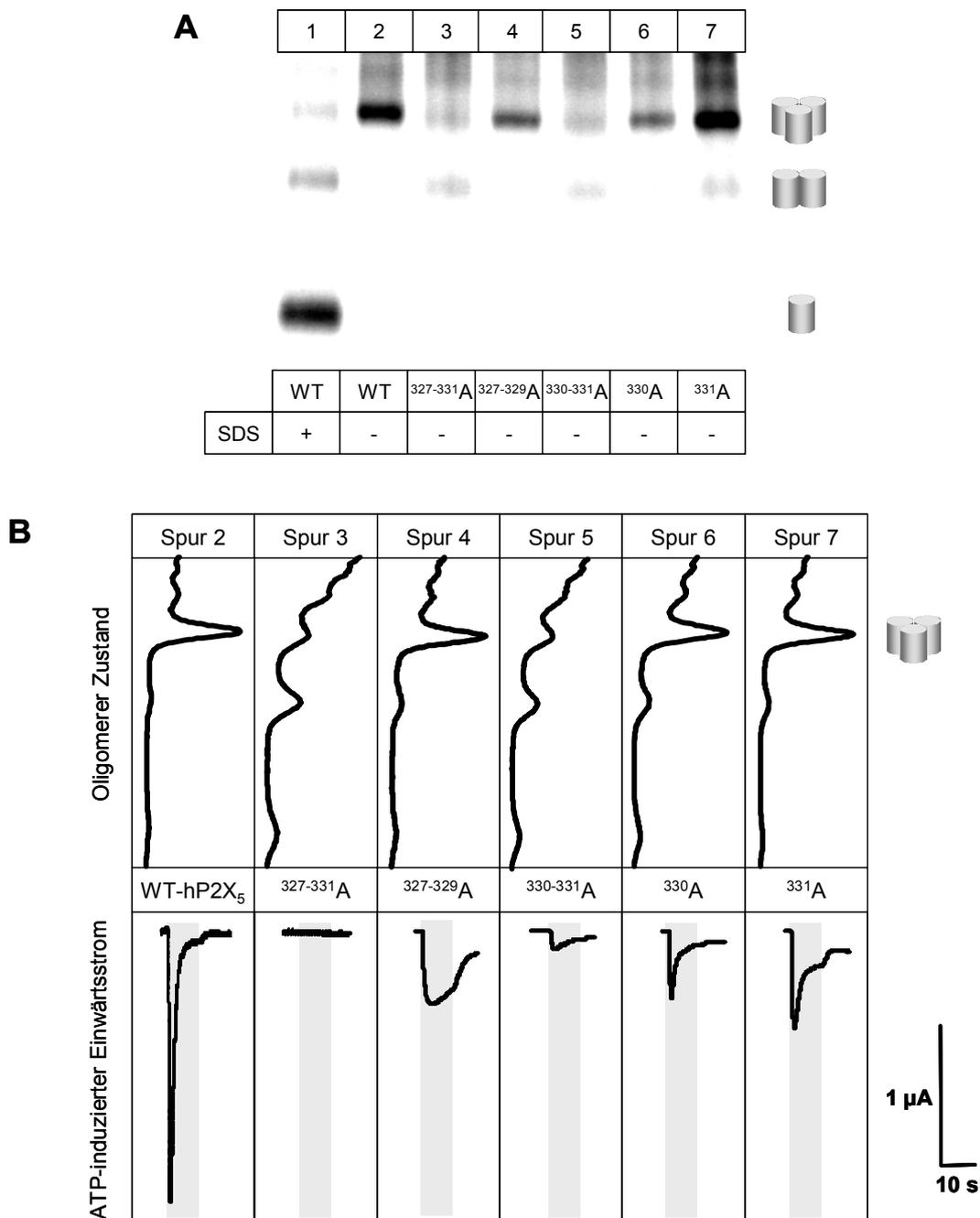
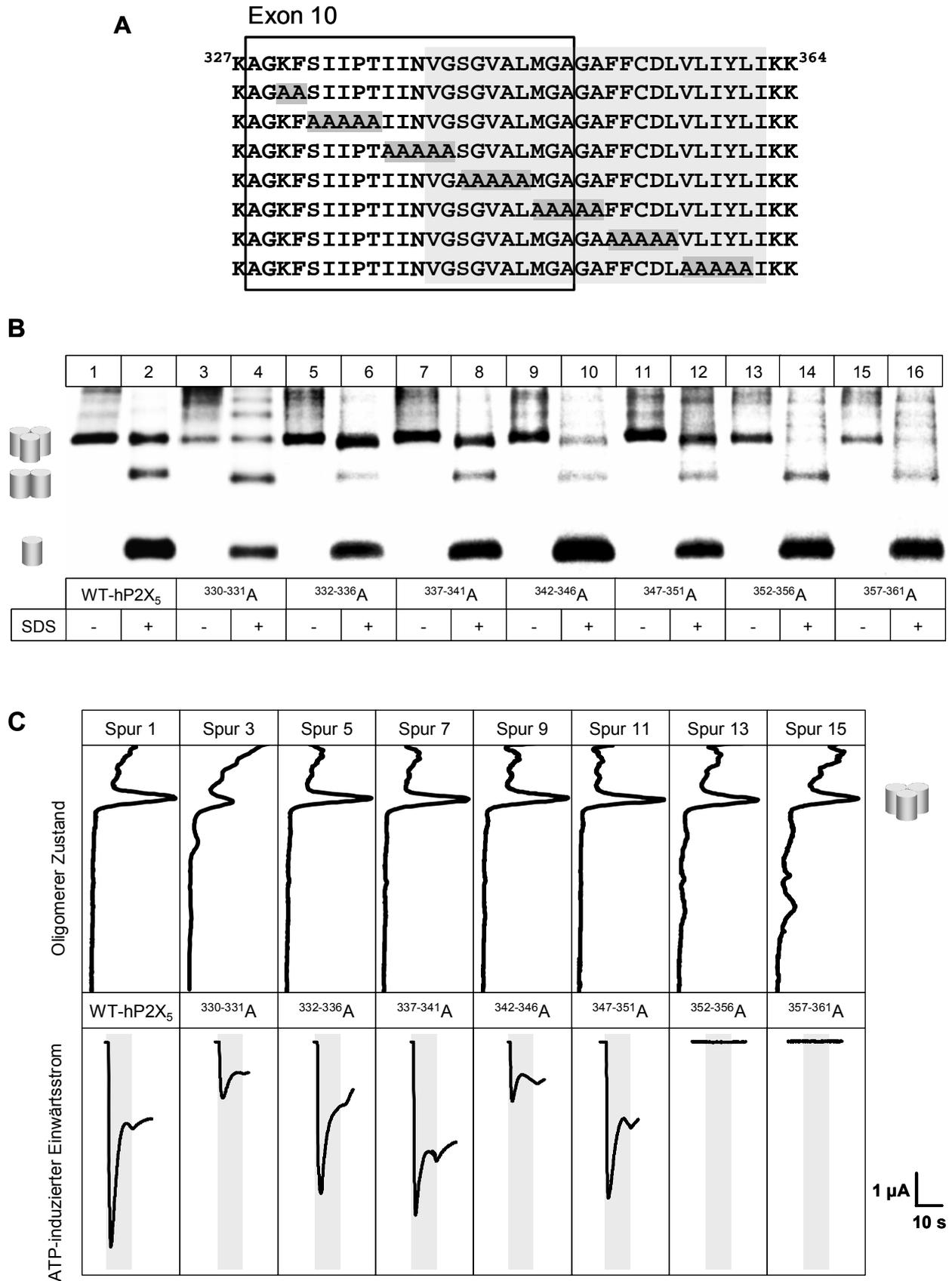


Abb. 4-9 Die Rolle der Pre-TM2-Aminosäuren 327-331 bei der Assemblierung und Funktion von hP2X₅-Untereinheiten. **A**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels der angezeigten Alanin-Mutanten, die direkt nach dem Übernachts-[³⁵S]-Methionin-*pulse* aufgereinigt wurden im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **B**, Obere Hälfte: quantitative Profile der jeweiligen angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus **A**, untere Hälfte: Stromkurven der jeweiligen Konstrukte (injizierte cRNA-Konzentration: 0,01 μ g/ μ l), hervorgerufen durch die Aktivierung mit 1 mM ATP (grau hinterlegt).

4.1.7 Die zweite Transmembranregion enthält kein spezifisches Assemblierungsmotiv

Da, wie oben bereits gezeigt, die Ausbildung der zweiten Transmembranregion von essentieller Bedeutung für die Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten ist, untersuchte ich nun die gesamte Region genauer, inklusive der dem Exon 10 nachfolgenden Aminosäuren. Um eventuelle spezifische Assemblierungsmotive zu identifizieren, führte ich auch hier ein systematisches Scanning durch, indem ich in der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit Exon 10 und die zweite Transmembranregion in mehreren Fünferblocks und einem Zweierblock (³³⁰KF³³¹) zu Alanin mutierte (Abb. 4-10A). Diese Blockmutationen hatten größtenteils keinen Einfluss auf das Assemblierungsverhalten der hP2X₅-Untereinheiten, lediglich die ³³⁰⁻³³¹A-hP2X₅-Mutante zeigte die oben bereits beschriebene reduzierte Trimerisierung (Abb. 4-10B,C, Spur 3) und auch eine geringere Amplitude in der elektrophysiologischen Funktionalitätsprüfung durch Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Abb. 4-10C, Spur 3). Wie aus der Funktionalität dieses Konstruktes zu schließen ist, wurde es auch zur Plasmamembran exportiert (Abb. 4-10D, Spur 4). Bemerkenswerterweise hatten die Fünferblock-Alanin-Mutationen in der zweiten Transmembranregion weder auf die Assemblierung der hP2X₅-Untereinheiten (Abb. 4-10B,C Spuren 5, 7, 9, 11, 13, 15) noch auf deren Export zur Plasmamembran einen signifikanten Einfluss (Abb. 4-10C, Stromkurven der Spuren 5, 7, 9, 11; Abb. 4-10D, Spuren 8 und 11). Die meisten dieser Mutanten erwiesen sich in der elektrophysiologischen Analyse als funktionell, nur die Alanin-Mutationen im inneren Drittel der zweiten Transmembranregion (Aminosäuren 352-361) zerstörten die Funktionalität (Abb. 4-10C, Spuren 13, 15), ohne aber den Export zur Plasmamembran zu verhindern (Abb. 4-10D, Spuren 8, 11).

Somit ergab das Alanin-Scanning, dass in der zweiten Transmembranregion kein spezifisches Assemblierungsmotiv vorhanden ist, zumindest keines, das durch das Ersetzen mit Alanin in seiner Funktion gestört wird.



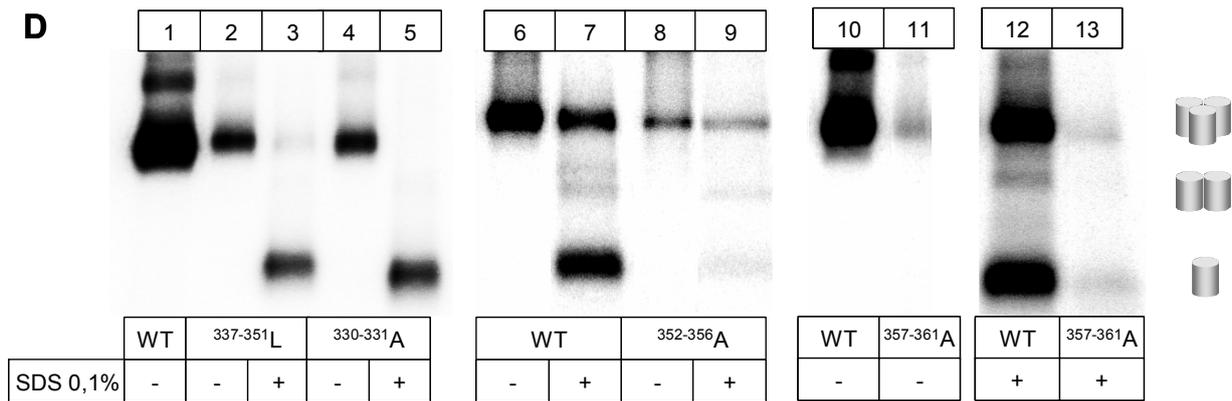


Abb. 4-10 Assemblierung und elektrophysiologische Funktion von TM2-Alanin-Mutanten der hP2X₅-Untereinheit. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten hP2X₅-Konstrukte im mutierten Bereich. Alanin-Mutationen sind dunkelgrau hinterlegt, TM2 ist hellgrau hinterlegt und Exon 10 ist durch einen Rahmen angezeigt. **B**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels der in A aufgeführten Konstrukte, die nach einem 4 h-*pulse* und einem *chase* aufgereinigt wurden. Die injizierte cRNA-Konzentration betrug 0,05 µg/µl. Die Proben wurden im nativen und im partiell durch SDS-denaturierten Zustand aufgetragen. **C**, Obere Hälfte: quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus B, untere Hälfte: Stromkurven der jeweiligen Konstrukte (injizierte cRNA-Konzentration: 0,01 µg/µl), hervorgerufen durch die Aktivierung mit 1 mM ATP (grau hinterlegt). **D**, PhosphorImager Scans von Blaue-Native-PAGE-Gelen, die die Oberflächenexpression einiger ¹²⁵I-markierter hP2X₅-Konstrukte im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand zeigen.

4.1.8 Die Positionierung der zweiten Transmembranregion ist wichtig für die Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten

Da durch dieses Alanin-Scanning kein spezifisches Assemblierungsmotiv identifiziert werden konnte, war das nächste Ziel herauszufinden, welcher Anteil der zweiten Transmembranregion für die korrekte Insertion in die Membran und das Assemblieren der Untereinheiten notwendig ist. Das Einfügen von Exon 10-Codons in mehreren Schritten hatte gezeigt, dass nicht alle Aminosäuren des N-terminalen Teils der zweiten Transmembranregion für eine Trimerisierung und Membraninsertion benötigt werden, sondern auch Aminosäuren der Ektodomäne diese Aufgabe erfüllen können, wenn sie lipophil genug und in ausreichender Anzahl vorhanden sind (Abb. 4-3A, Spuren 3, 4, 5). Eine weitere Mutante hatte sogar gezeigt, dass das alleinige Einfügen fast aller Transmembranregion-Aminosäuren mit Ausnahme der beiden am weitesten N-terminal lokalisierten Aminosäuren keine effiziente Assemblierung bewirkte (Abb. 4-3A, Spur 7). Dies könnte daran liegen, dass die N-terminale Hälfte der zweiten Transmembranregion eine große Zahl an kleinen nicht hydrophoben Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin) besitzt und somit ohne die weiter N-

terminal liegenden hydrophoben Exon 10-Aminosäuren die Insertion der zweiten Transmembranregion nicht möglich ist.

Nun wollte ich wissen, ob im C-terminalen Bereich der Transmembranregion auf Aminosäuren verzichtet werden kann, ohne die Trimerisierung der hP2X₅-Untereinheiten zu zerstören. Um dies zu untersuchen, fügten wir Stopp-Codons vor, in oder nach der zweiten Transmembranregion ein und erzeugten so trunkierte hP2X₅-Konstrukte (1-336, 1-342, 1-448, 1-355, 1-361, 1-362, 1-365, Abb. 4-11A). Da von früheren Experimenten in unserem Labor bekannt war, dass die C-terminale Endodomäne, ebenso wie die N-terminale Endodomäne, höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Oligomerisierung hat und für diese nicht notwendig ist (P. Minko, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse), hofften wir, so zu erfahren, wie viele Aminosäuren der zweiten Transmembranregion für eine korrekte Assemblierung der hP2X₅-Untereinheiten ausreichen. Nach der Expression dieser Konstrukte ergab die Analyse auf Blaue-Native-PAGE-Gelen, dass nur die längste hP2X₅-Deletionsmutante, hP2X₅¹⁻³⁶⁵, die schon drei Aminosäuren der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne beinhaltet, zu einer Trimerisierung fähig ist (Abb. 4-11B, Spur 8). Alle anderen Konstrukte liefen als amorphe Proteinmasse ohne definierten Assemblierungszustand (Abb. 4-11B, Spuren 2-7). Als Expressionskontrolle diente ein SDS-PAGE-Gel, auf dem zu sehen war, dass auch die nicht assemblierenden Mutanten in einer Menge synthetisiert wurden, die zur Beurteilung der Assemblierung ausreicht (Abb. 4-11C, Spuren 1-3). Außerdem zeigte das SDS-PAGE-Gel, dass die trunkierten Konstrukte auf der Höhe der erwarteten Massen liefen. Eine Oberflächenmarkierung der kürzesten Mutante, hP2X₅¹⁻³³⁶, ergab außerdem, dass sie nicht zur Plasmamembran exportiert wurde (Abb. 4-12, Spur 7).

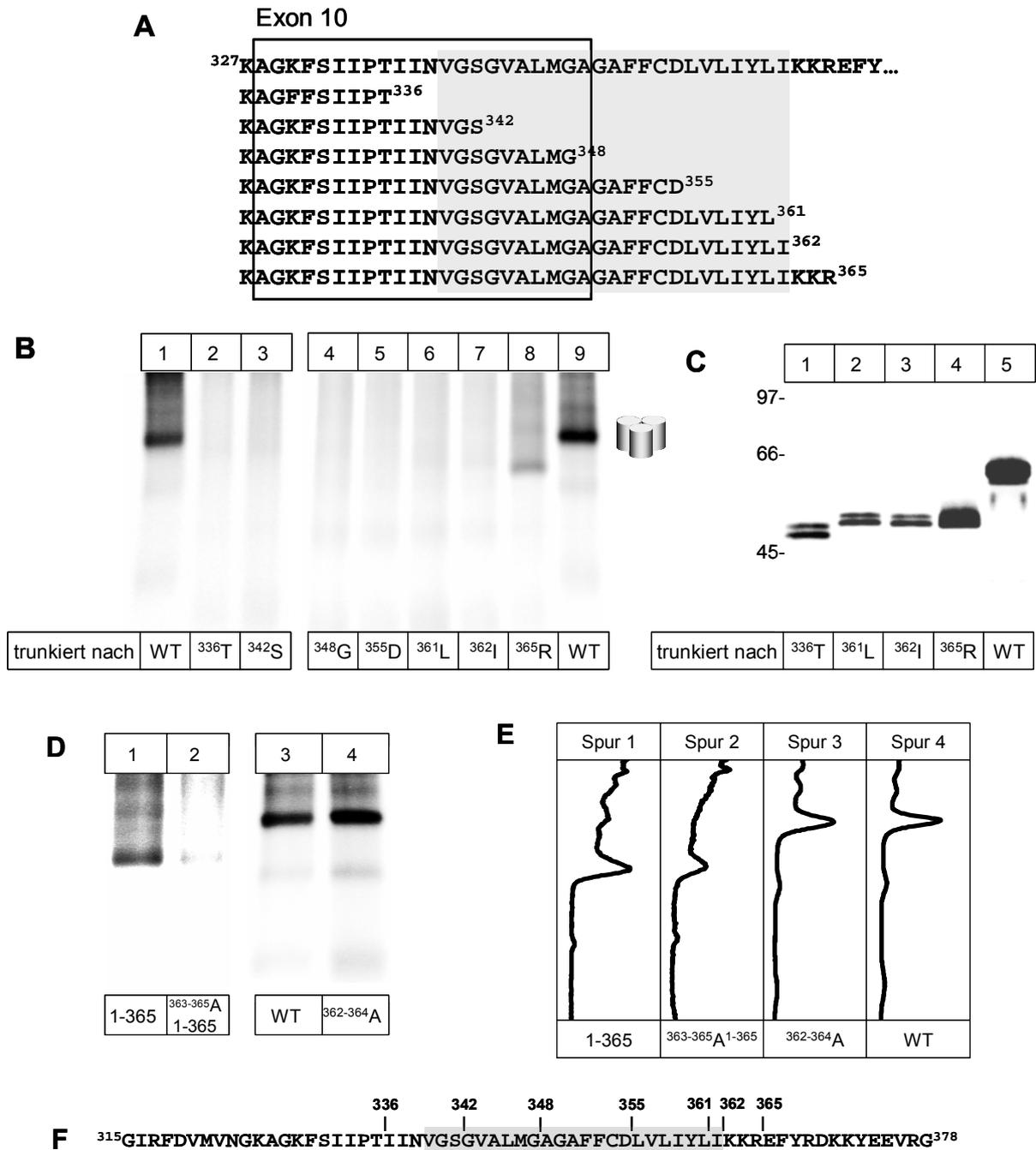


Abb. 4-11 Trunkierung von hP2X₅-Untereinheiten. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten hP2X₅-Deletionsmutanten im analysierten Bereich. TM2 ist grau hinterlegt und Exon 10 durch einen Rahmen gekennzeichnet. **B**, **C** und **E** zeigen PhosphorImager Scans der betreffenden PAGE-Gele. **B**, Blaues-Natives-PAGE-Gel der angezeigten Deletionsmutanten im nativen Zustand. **C**, Kontinuierliches SDS-PAGE-Gel (8% Acrylamid) mit den angezeigten trunkierten hP2X₅-Untereinheiten. **D**, Blaue-Native-PAGE-Gele mit einer Deletionsmutante, der WT-hP2X₅-Untereinheit und Alanin-Mutanten. **E**, Quantitative Profile der PAGE-Gel-Spuren aus **D**. **F**, Untersuchter Sequenzabschnitt der hP2X₅-Untereinheit. TM2 ist grau hinterlegt und positiv geladene Aminosäuren in der C-terminalen Domäne sind unterstrichen. Senkrechtstriche geben die Position der Trunkierungen an, die Zahlen bezeichnen die hP2X₅- Aminosäure, nach der trunkiert wurde.

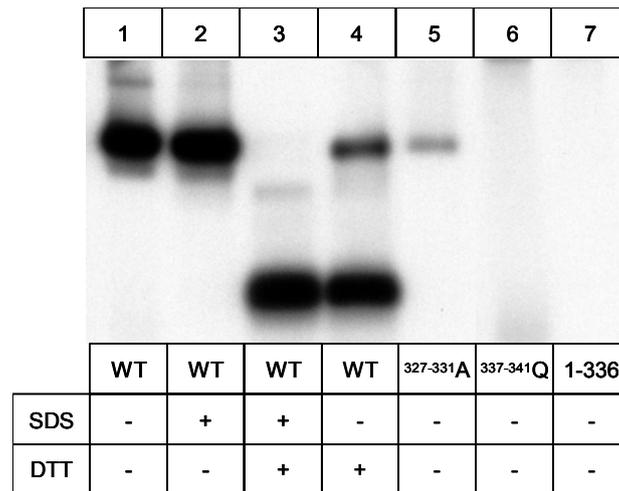


Abb. 4-12 Oberflächenexpression von ^{125}I -markierten hP2X₅-Rezeptoren. PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels, das die Oberflächenexpression der WT-hP2X₅-Rezeptoren, einer Deletionsmutante sowie weiterer Mutanten im nativen und mit SDS und/oder DTT denaturierten Zustand zeigt.

Das Ergebnis, dass nur die hP2X₅¹⁻³⁶⁵-Deletionsmutante zur Trimerisierung fähig ist, war zunächst überraschend, da die vorherigen Experimente ergeben hatten, dass zumindest im oberen Bereich der Transmembranregion nicht alle Aminosäuren benötigt werden, um eine Trimerisierung zu ermöglichen. Insofern wäre zu erwarten gewesen, dass nicht alle 25 Aminosäuren der zweiten Transmembranregion benötigt würden. Aber für eine effiziente Trimerisierung waren sogar zusätzlich Aminosäuren der zytosolischen C-terminalen Domäne notwendig. Da allerdings die drei Aminosäuren der Endodomäne eine positive Ladung trugen (³⁶³KKR³⁶⁵), überlegte ich, dass diese für die Positionierung der zweiten Transmembranregion in der Plasmamembran wichtig sein könnte, im Sinne der „positive inside rule“ (Von Heijne, 1989), die besagt, dass positiv geladene Aminosäuren bevorzugt in intrazellulären Proteinbereichen zu finden sind, ja sogar während der Proteinsynthese für die Orientierung der Transmembranregionen notwendig sind. Um diese Hypothese der inkorrekten Membraninsertion zu prüfen, konnte ich bei den trunkierten hP2X₅-Konstrukten nicht wie zuvor auf Glykosylierungsversuche zurückgreifen, da dies ohne C-terminale Domäne nicht möglich war. Stattdessen mutierte ich die drei positiv geladenen Aminosäuren ³⁶³KKR³⁶⁵ zu Alanin. Und tatsächlich war die Trimerisierungskompetenz dieses hP2X₅-Konstruktes (Abb. 4-11D,E, Spur 2) im Vergleich zu der hP2X₅¹⁻³⁶⁵-Deletionsmutante deutlich reduziert (Abb. 4-11D,E, Spur 1), wodurch gezeigt wurde, dass meine Vermutung, die positiven Ladungen könnten wichtig sein, richtig war.

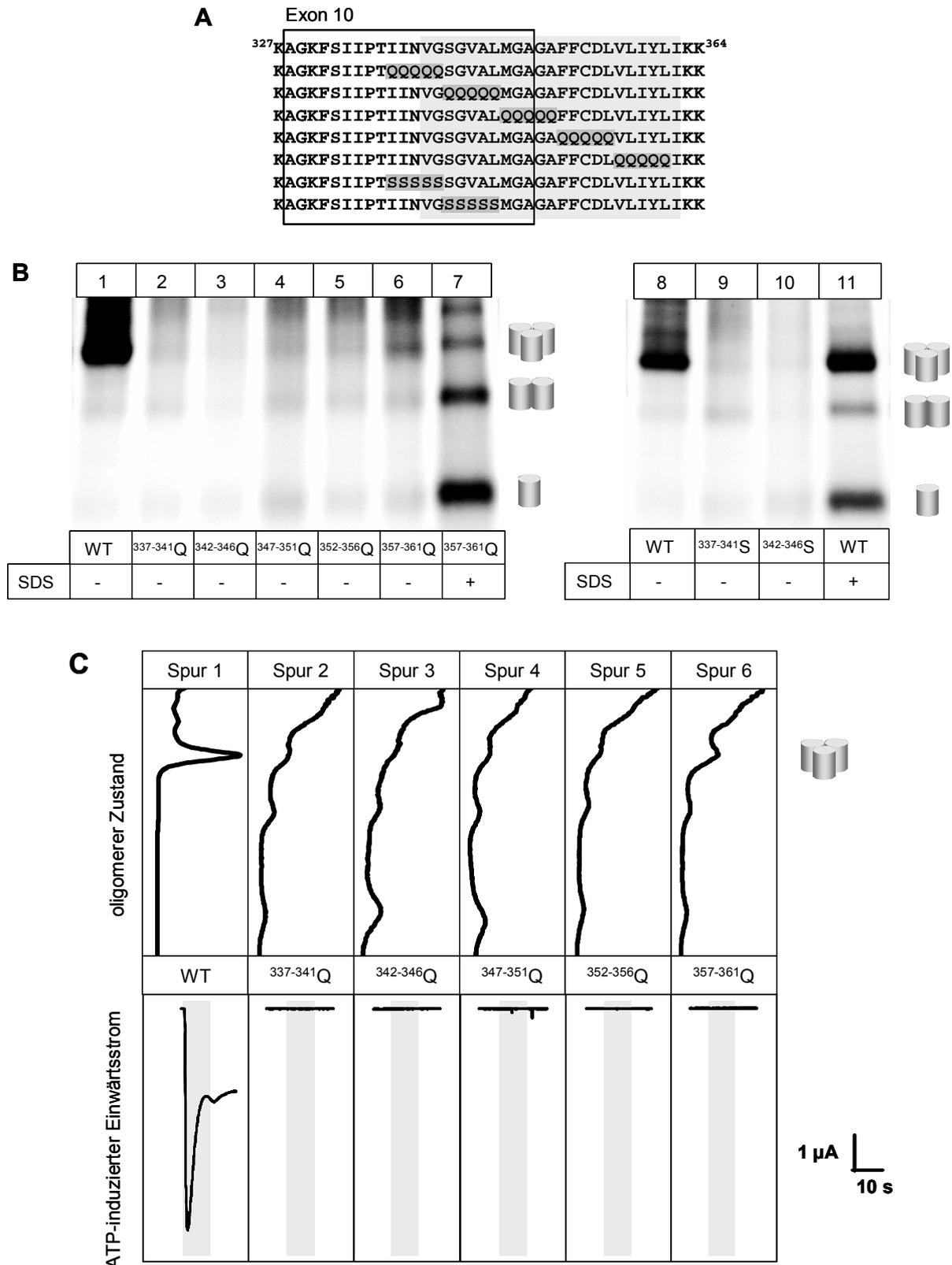
Um auszuschließen, dass ³⁶³KKR³⁶⁵ wider Erwarten doch ein wichtiges Assemblierungsmotiv beinhaltet, nahm ich eine ³⁶²⁻³⁶⁴A-Mutation in der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit vor. Die Analyse dieser Mutante auf dem Blaue-Native-PAGE-Gel zeigte, dass sie in der Lage war, in Trimere zu assemblieren (Abb. 4-11D,E, Spur 4). Die korrekte Orientierung konnte hier möglicherweise auch durch die positiven Ladungen bewirkt werden, die weiter C-terminal lokalisiert sind (Abb. 4-11F), oder durch andere Strukturen der C-terminalen Endodomäne. Somit ist in den trunkierten Konstrukten die Funktion dieser positiv geladenen Aminosäuren, für die Durchspannung der Membran durch die zweite Transmembranregion und damit für die korrekte Positionierung dieser Region zu sorgen. Dies könnte bedeuten, dass die Position der zweiten Transmembranregion entweder einen Einfluss auf die Struktur der Ektodomäne und darin befindlichen Assemblierungsdomänen hat oder dass die Transmembranregion selbst einen Anteil an der Assemblierung hat, ohne dabei auf spezifische Aminosäuren für eventuelle Interaktionen angewiesen zu sein.

4.1.9 Die Hydrophobizität der gesamten zweiten Transmembranregion ist wichtig für die korrekte Membraninsertion

Da, wie in 4.1.5 bereits gezeigt, eine korrekte Integration der zweiten Transmembranregion in die Membran nur bei einer ausreichenden Hydrophobizität der entsprechenden Exon 10-Aminosäuren möglich ist, führte ich als Nächstes ein Serin- und Glutamin-Scanning der vollständigen Transmembranregion durch, um diese Hypothese auf die gesamte Region auszuweiten. Hierfür generierte ich Fünferblock-Mutationen, in denen die entsprechenden Transmembranregion-Aminosäuren der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit durch Glutamin bzw. Serin ersetzt wurden (Abb. 4-13A). Die Expression dieser Konstrukte in *X. laevis*-Oozyten und anschließende Analyse durch Blaue-Native-PAGE ergab, dass durch die Mutation zu hydrophilen Aminosäuren die Assemblierung der hP2X₅-Untereinheiten zerstört wurde (Abb. 4-13B,C, Spuren 2-6 und 8-9). Durch die Expressionskontrolle auf einem SDS-PAGE-Gel konnte ausgeschlossen werden, dass die fehlende Assemblierung lediglich auf einer verminderten Expression beruht, da diese stark genug war, um eine eventuelle Assemblierung auf dem Blaue-Native-PAGE-Gel erkennen (Abb. 4-13D, Spuren 2-6 und 8-9). Alle Glutamin-Mutanten zeigten außerdem keine Funktion, wenn die das jeweilige Konstrukt exprimierenden Oozyten mit ATP-haltigem Medium superfundiert wurden (Abb. 4-13C). Auch eine Oberflächenexpression konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4-12, Spur 6).

Um eine Aussage über die Membraninsertion machen zu können, führte ich wiederum die artifizielle N-Glykosylierungssequenz ³⁸⁰NDS³⁸² in die C-terminale Domäne einiger Mutanten ein. Die Analyse dieser Konstrukte auf einem SDS-PAGE-Gel zeigte eine deutliche

Massenzunahme bei den Mutanten, die die zusätzliche N-Glykosylierungsstelle enthielten (Abb. 4-13E, Spuren 2 und 4). Somit wurde für die gesamte zweite Transmembranregion bewiesen, dass eine ausreichende Hydrophobizität ebenso wie eine ausreichende Länge für die korrekte Membraninsertion und Positionierung der Region essentiell ist.



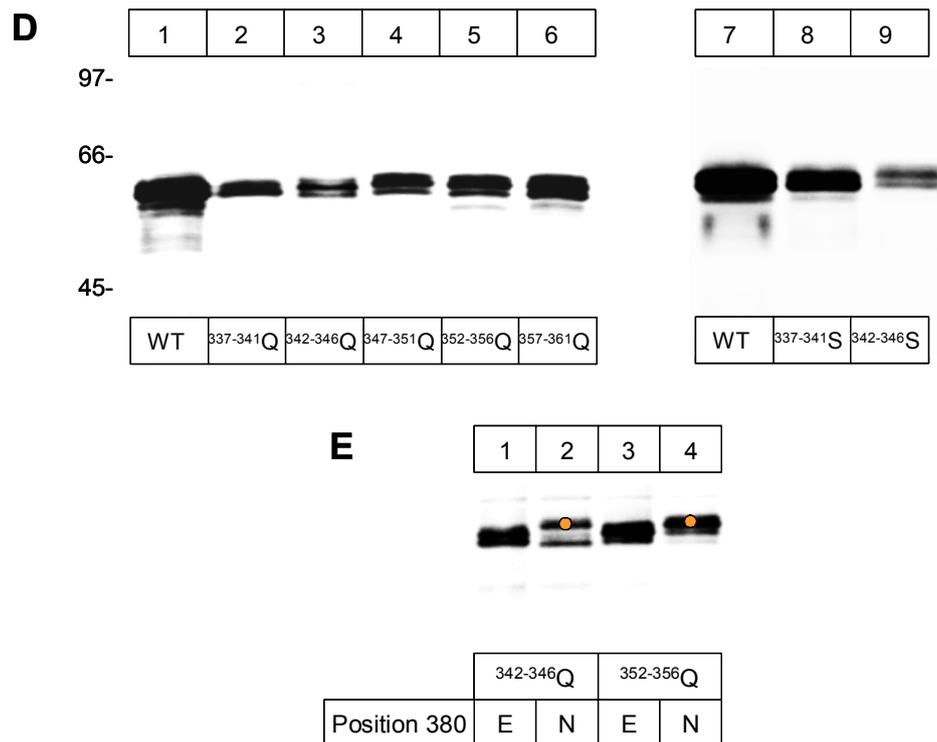
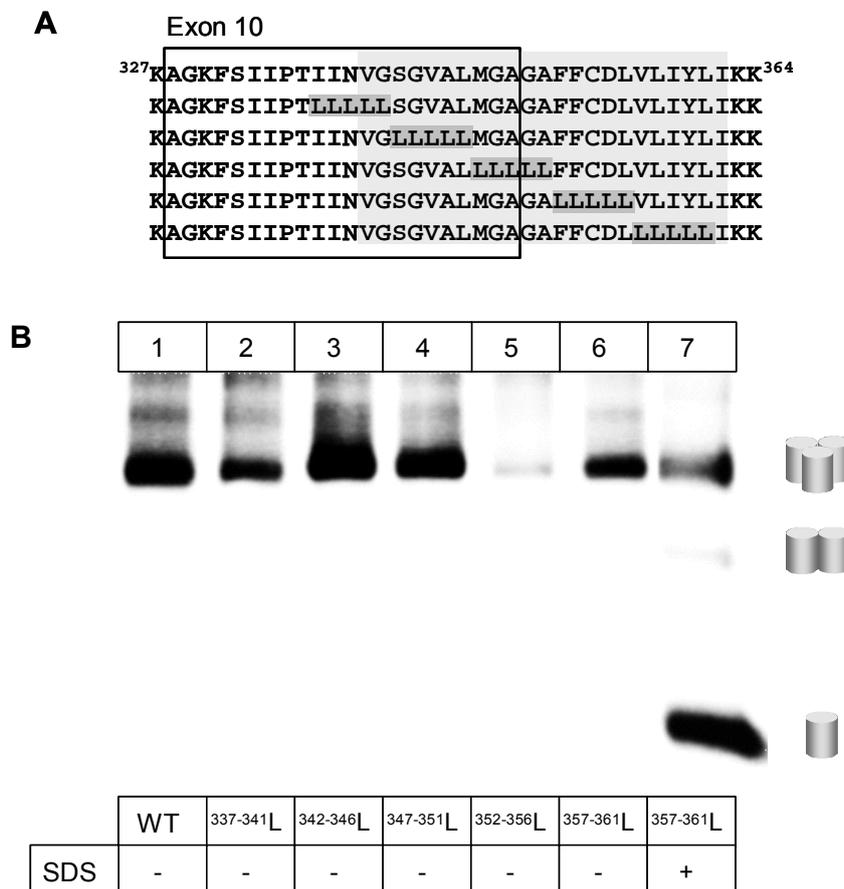


Abb. 4-13 Glutamin- und Serin-Scanning der TM2 der hP2X₅-Untereinheit in Fünferblock-Substitutionen. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten hP2X₅-Konstrukte im analysierten Bereich. Glutamin- und Serin-Mutationen sind dunkelgrau hinterlegt, TM2 ist hellgrau hinterlegt und Exon 10 durch einen Rahmen gekennzeichnet. **B**, PhosphorImager Scan von Blaue-Native-PAGE-Gelen mit den angezeigten Mutanten im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **C**, Obere Hälfte: quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus B, untere Hälfte: Stromkurven der jeweiligen Konstrukte (injizierte cRNA-Konzentration: 0,01 µg/µl), hervorgerufen durch die Aktivierung mit 1 mM ATP (grau hinterlegt). **D**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit den jeweiligen hP2X₅-Mutanten. **E**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit zwei Glutamin-Scanning-Mutanten sowie den gleichen Glutamin-Scanning-Mutanten mit zusätzlich eingefügter N-Glykosylierungssequenz in Position 380.

4.1.10 Aspartat 355 spielt eine wichtige Rolle bei der Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten

Nachdem durch das Alanin-Scanning der zweiten Transmembranregion kein spezifisches Assemblierungsmotiv identifiziert werden konnte und für alle übrigen Mutationen lediglich die Hydrophobizität von Bedeutung zu sein schien, wollte ich diese Ergebnisse durch ein Leucin-Scanning bestätigen. Da Leucin wegen seiner längeren Kohlenwasserstoffseitenkette stark hydrophob ist, war für Leucin-Mutanten ein ähnliches Assemblierungsverhalten zu erwarten wie für die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit. Ich generierte Fünferblock-Leucin-Mutanten, die anschließend in Oozyten exprimiert und durch Blaue-Native-PAGE analysiert

wurden (Abb. 4-14A). Die Ergebnisse waren tatsächlich vergleichbar mit denen des Alanin-Scannings, bis auf eine Ausnahme: die $^{352}\text{FFCDL}^{356}$ -Leucin-Mutante (Abb. 4-14B,C, Spur 5) trimerisierte wesentlich schwächer als die anderen Mutanten bzw. die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit (Abb. 4-14B,C, Spuren 1-4 und 6). TEVC-Experimente ergaben, dass nur die Leucin-Mutanten am Eingang (Aminosäuren 337-341) und am Ausgang (Aminosäuren 357-361) der zweiten Transmembranregion auf eine ATP-Behandlung mit einem Einwärtsstrom reagierten, während die übrigen Konstrukte nicht funktionell waren (Abb. 4-14C). Die Expressionskontrolle auf einem SDS-PAGE-Gel zeigte für die $^{352-356}\text{L}$ -hP2X₅-Mutante (Abb. 4-14D, Spur 5) eine vergleichbar starke Expression wie für die übrigen Konstrukte (Abb. 4-14D, Spuren 1-4 und 6).



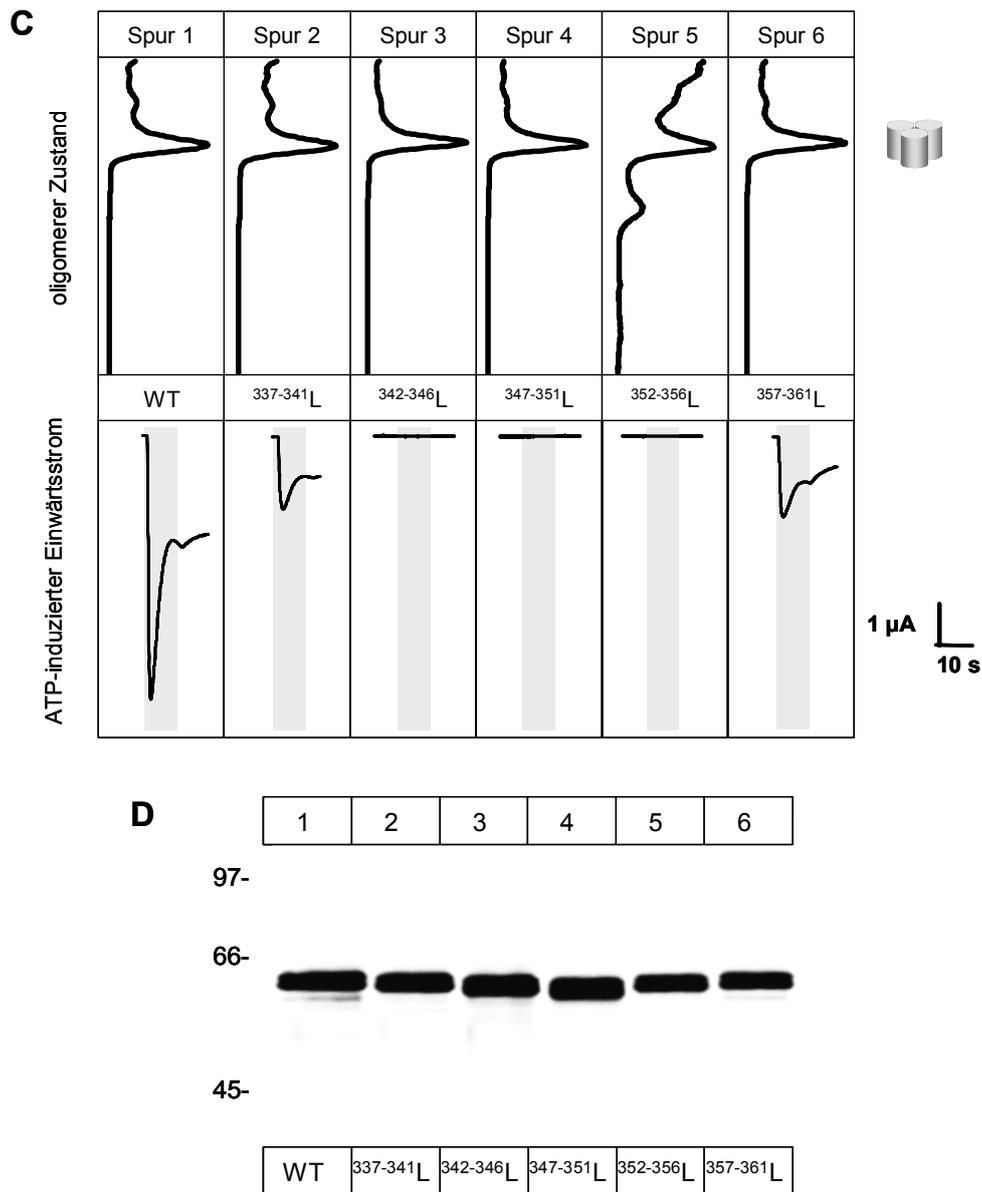


Abb. 4-14 Scanning der TM2 der hP2X₅-Untereinheit in Fünferblock-Leucin-Substitutionen. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten hP2X₅-Konstrukte im analysierten Bereich. Leucin-Mutationen sind dunkelgrau hinterlegt, TM2 ist hellgrau hinterlegt und Exon 10 durch einen Rahmen gekennzeichnet. **B**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit den angezeigten Mutanten im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **C**, Obere Hälfte: quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus B, untere Hälfte: Stromkurven der jeweiligen Konstrukte (injizierte cRNA-Konzentration: 0,01 μ g/ μ l), hervorgerufen durch die Aktivierung mit 1 mM ATP (grau hinterlegt). **D**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit den jeweiligen hP2X₅-Mutanten.

Um diese reduzierte Trimerisierung der $^{552-556}$ L-hP2X₅-Mutante genauer zu untersuchen, erzeugte ich Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten (Abb. 4-15A). Die Analyse dieser Konstrukte ergab, dass all jene Mutanten, die 355 L beinhaltenen (Abb. 4-15B, Spuren 3 und 4), ebenso schwach assemblierten wie die $^{352-356}$ L-Mutante (Abb. 4-15B, Spur 2). Die Quantifizierung der Radioaktivität zeigte, dass die 355 L enthaltenden Mutanten ungefähr zehnmal weniger Trimere ausbildeten als die 352 FFC 354 -Leucin-Mutante oder die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit. Zusätzlich lief ein Teil der 355 L enthaltenden Mutanten auf der Höhe eines Dimeres, was am besten in den quantitativen Profilen der Proteinbanden zu erkennen ist (Abb. 4-15C), in denen auch deutlich zu sehen ist, dass ein großer Anteil der Mutanten als höhermolekulare Aggregate ohne definierten Assemblierungszustand vorlagen. Keine der Mutanten, die durch 352 FFCDL 356 umfasst werden, bildete einen funktionellen Ionenkanal aus.

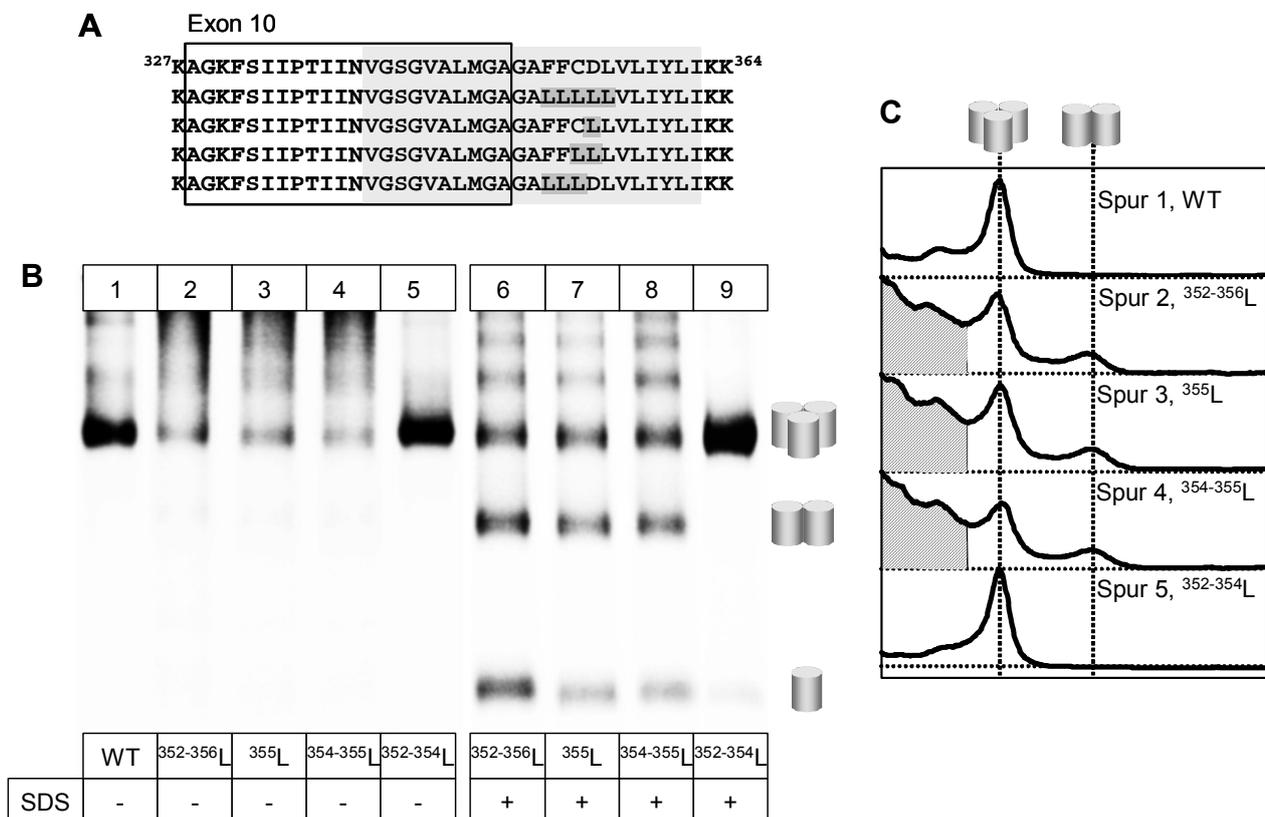


Abb. 4-15 Leucin-Substitutionen der Aminosäuren 352-355 der hP2X₅-Untereinheit. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten hP2X₅-Konstrukte im analysierten Bereich. Leucin-Mutationen sind dunkelgrau hinterlegt, TM2 ist hellgrau hinterlegt und Exon 10 durch einen Rahmen gekennzeichnet. **B**, Phosphorimager Scans von Blaue-Native-PAGE-Gelen mit den angezeigten Mutanten im nativen bzw. im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **C**, Quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus B. Die graue Schraffur zeigt Aggregate an, während die Zylinder Trimere bzw. Dimere kennzeichnen.

Zur weiteren Untersuchung der wichtigen Rolle von ³⁵⁵D bei der Oligomerisierung von hP2X₅-Untereinheiten mutierte ich schrittweise die gesamte zweite Transmembranregion zu Leucin, um anschließend einzelne Leucine wieder durch die nativen Aminosäuren zu ersetzen (Abb. 4-16A). Die Analyse dieser Mutanten ergab, dass das Ersetzen der ersten 15 Aminosäuren durch Leucin sehr gut toleriert wurde und die Konstrukte ähnlich der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit trimerisierten und auch an der Zelloberfläche exprimiert wurden (Abb. 4-16B, Spuren 2-4, Abb. 4-18), wenn auch nicht in funktioneller Form. Wurde allerdings die ³⁵²FFCDL³⁵⁶-Sequenz mit einbezogen, um 20 Aminosäuren durch Leucin zu ersetzen (³³⁷⁻³⁵⁶L-hP2X₅), verschwanden die Trimere zugunsten einer amorphen Proteinmasse (Abb. 4-16B, Spur 5, Abb. 4-17B, Spur 3). Ein vergleichbares Ergebnis gab es beim Ersetzen aller Aminosäuren der zweiten Transmembranregion durch Leucin (³³⁷⁻³⁶¹L-hP2X₅, Abb. 4-16B, Spur 10, Abb. 4-17B, Spur 3). Das Wiedereinsetzen von ³⁵⁵D in die ³³⁷⁻³⁶¹L-hP2X₅-Mutante verbesserte die Trimerisierung leicht (Abb. 4-16B, Spur 11, besser noch in Abb. 4-17B, Spur 5), das Wiedereinsetzen in die ³³⁷⁻³⁵⁶L-hP2X₅-Mutante deutlich (Spur 9). Am besten ist dieser Effekt in den quantitativen Profilen der Gele zu erkennen (Abb. 4-16C, 4-17C). Diese Verbesserung der Trimerisierung durch das Einführen einer einzigen Aminosäure beweist wiederum die Bedeutung von ³⁵⁵D für die Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten.

Da aber nicht die vollständige Trimerisierung wiederhergestellt werden konnte, untersuchte ich als Nächstes den Einfluss weiterer authentischer Aminosäuren der zweiten Transmembranregion auf die Assemblierung der Poly-leucin-Mutanten. Hierzu ersetzte ich zusätzlich zu ³⁵⁵D einzelne oder mehrere Leucine in der ³³⁷⁻³⁶¹L-hP2X₅-Mutante durch die nativen Aminosäuren (Abb. 4-17A). Die Analyse dieser Konstrukte durch Blaue-Native-PAGE ergab eine zusätzliche Verbesserung der Trimerisierung für das Ersetzen des Leucins durch ³⁶⁰Y sowie ausgehend von dieser Mutante eine sehr leichte weitere Verbesserung durch ³⁵⁴C und ³⁴⁸G (Abb. 4-17B,C, Spuren 7-9). ³⁴¹G und ³⁴⁵A hatten keinen verbessernden Einfluss (Spuren 10, 11, 13). Da aber die Fünferblock-Leucin-Mutanten, die ³⁶⁰Y und ³⁴⁸G enthielten, kein reduziertes Assemblierungsverhalten zeigten (Abb. 4-14B,C, Spuren 4 und 6), ist auszuschließen, dass der Einfluss von ³⁶⁰Y und ³⁴⁸G ebenso groß ist wie der von ³⁵⁵D. Auch für ³⁵⁴C hatte sich keine Rolle bei der Assemblierung ergeben. So war die ³⁵²⁻³⁵⁴L-hP2X₅-Mutante ebenso in der Lage zu trimerisieren (Abb. 4-15B,C, Spur 5) wie die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit (Spur 1). Die Verbesserung der Assemblierung der Poly-leucin-Mutante durch das Substituieren einiger Leucine durch native Aminosäuren ist wahrscheinlich nicht durch spezielle Interaktionen, sondern eher durch eine allgemeine Verbesserung der Struktur der zweiten Transmembranregion durch Angleichen an die native Faltung zu erklären. ³⁴⁸G

könnte dabei als kleine flexible Aminosäure eine Rolle bei der Faltung spielen, ebenso wie ^{360}Y als große aromatische Aminosäure mit hydrophiler Hydroxylgruppe am Ausgang der Membran wichtig für die Positionierung sein könnte („snorkel-effect“ (Liang et al., 2005), (Killian, 2003)).

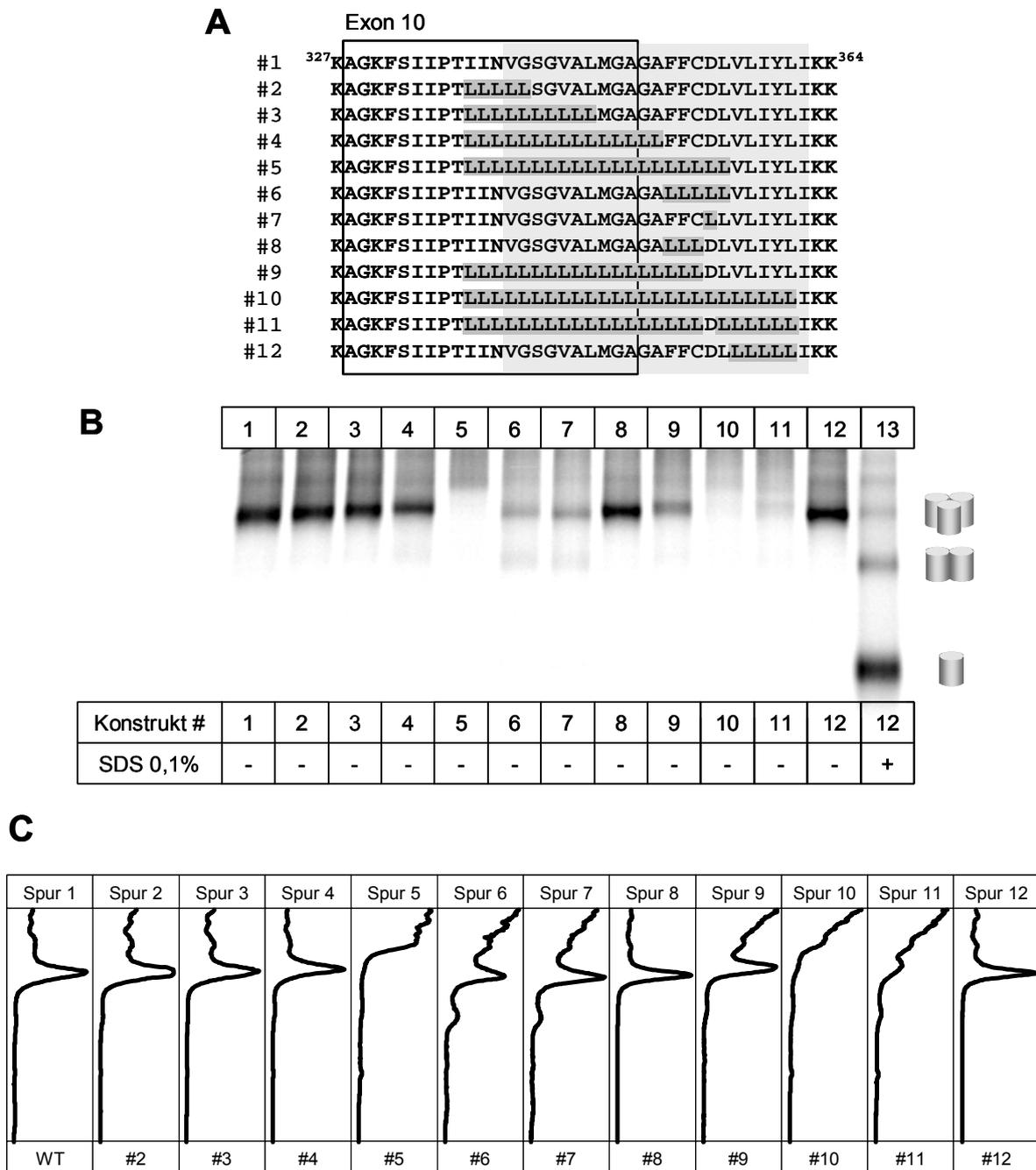


Abb. 4-16 TM2-Leucin-Mutanten und die Rolle von ^{355}D bei der Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten hP2X₅-Konstrukte im analysierten Bereich. Leucin-Mutationen sind dunkelgrau hinterlegt, TM2 ist hellgrau hinterlegt und Exon 10 durch einen Rahmen gekennzeichnet. **B**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit den angezeigten Mutanten im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **C**, Quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus B.

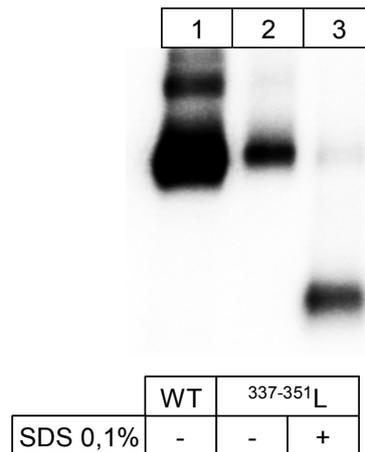


Abb. 4-18 Oberflächenexpression des hP2X₅^{337-351L}-Rezeptors. PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels, das die Oberflächenexpression des ¹²⁵I-markierten WT-hP2X₅-Rezeptors und des ¹²⁵I-markierten hP2X₅^{337-351L}-Rezeptors im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand zeigt.

4.1.11 Aspartat 355 ist wahrscheinlich an einer Wasserstoffbrückenbildung beteiligt

Da die Experimente mit Leucin-Mutanten der hP2X₅-Untereinheit eine wichtige Funktion der Membran-Aminosäure ³⁵⁵D nahe legten, wollte ich nun herausfinden, worin diese Funktion besteht. Ich ersetzte in mehreren Einzelmutanten ³⁵⁵D durch V, F, W, N, R, E, T oder C, um die verschiedensten Eigenschaften von Aminosäuren abzudecken. In der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme war keines der Konstrukte funktionell, wenn die Oozyten, die das jeweilige Konstrukt exprimierten, mit ATP-haltigem Medium superfundiert wurden. Dies lässt auf eine essentielle Rolle von ³⁵⁵D für die Funktion des Ionenkanals schließen. Die Expression dieser Mutanten in *X. laevis*-Oozyten und die anschließende Analyse durch Blaue-Native-PAGE zeigte, dass die Konstrukte mit den apolaren Aminosäuren Valin und Phenylalanin in Position 355 ein ähnlich reduziertes Trimerisierungsvermögen besaßen wie die entsprechende Leucin-Mutante (Abb. 4-19A,B, Spuren 5, 9, 10). Die Konstrukte mit den polaren Aminosäuren Asparagin, Arginin und Glutamat in der Position 355 dagegen assemblierten ebenso wie der Wildtyp-hP2X₅ mit Aspartat in der Position 355 (Spuren 3, 4, 8). Erstaunlich war zunächst das Verhalten der Tryptophan enthaltenden Mutante (Spur 14), die ebenfalls wie die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit trimerisierte, obwohl Tryptophan stark hydrophob ist. Auch das leicht reduzierte Assemblierungsverhalten der Mutanten, die in der Position 355 die polaren Aminosäuren Threonin und Cystein enthielten (Spuren 17 und 18), passte nicht zu den übrigen Ergebnissen. Ebenfalls überraschend war das Assemblierungsverhalten der Arginin-Mutante, da Arginin sich als basische Aminosäure stark

von dem sauren Aspartat unterscheidet. Die wahrscheinlichste Erklärung wäre eine Beteiligung von ^{355}D an einer Wasserstoffbrücke, da alle Aminosäuren, die eine Aspartat-Mutanten-ähnliche Trimerisierung ermöglichen, dazu in der Lage sind, Wasserstoffbrücken auszubilden. Somit liegt der Schluss nahe, dass ^{355}D die Assemblierung von hP2X_5 -Untereinheiten durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke unterstützt. Allerdings ist dies nicht das alleinige Assemblierungsmotiv, da eine Trimerisierung auch ohne diese Wasserstoffbrücke erfolgt, wenn auch in reduziertem Ausmaß. Es kann aber nach den bisherigen Experimenten vermutet werden, dass die Trimerisierung von hP2X_5 -Untereinheiten durch eine Wasserstoffbrückenbildung über ^{355}D deutlich stabilisiert wird.

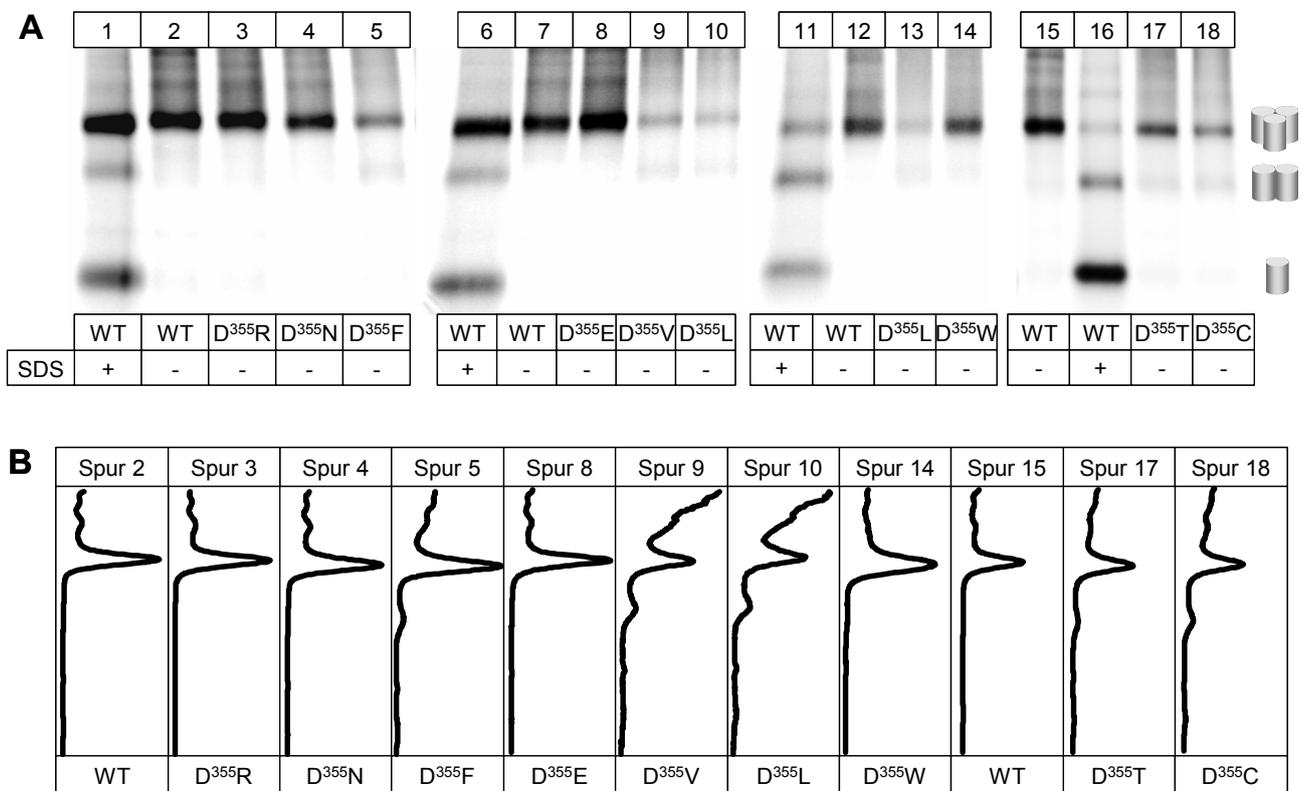


Abb. 4-19 Assemblierung von Einzelmutationen von ^{355}D der hP2X_5 -Untereinheit. **A**, PhosphorImager Scans von Blaue-Native-PAGE-Gelen mit Einzelmutationen von ^{355}D im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **B**, Quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus A.

4.1.12 Suche nach einem Interaktionspartner von ³⁵⁵D

Da die bisherigen Experimente darauf hinwiesen, dass die zweite Transmembranregion neben einer unspezifischen strukturellen Funktion über ³⁵⁵D auch eine spezifische Rolle bei der Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten spielt, war das nächste Ziel herauszufinden, welche Aminosäure der Interaktionspartner von ³⁵⁵D ist. In einer früheren Studie war für rP2X₂- und rP2X₄-Rezeptoren beschrieben worden, dass die drei Untereinheiten, die ein Trimer ausbilden, zueinander in einer sogenannten „head to tail“-Weise angeordnet sind, das heißt, dass die zweite Transmembranregion der einen Untereinheit mit der ersten Transmembranregion einer Nachbaruntereinheit in Kontakt steht (Jiang et al., 2003). Somit hoffte ich, den Interaktionspartner von ³⁵⁵D in der ersten Transmembranregion finden zu können. Um dies zu erreichen, plante ich Versuche nach zwei verschiedenen Ansätzen, die Punktmutationen in der ersten Transmembranregion und Doppel-Cystein-Mutanten in der ersten und zweiten Transmembranregion beinhalteten.

Der erste Ansatz beruhte auf der Vorstellung, dass die Wasserstoffbrücke zwischen der polaren Seitenkette von ³⁵⁵D und der polaren Seitenkette einer Aminosäure in der ersten Transmembranregion gebildet wird. Um diese Vermutung zu überprüfen, generierte ich drei Einzelmutanten, in denen ich in der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit ³³Y, ³⁴R und ³⁷Q zu Leucin mutierte (Abb. 4-20A). Zwar gibt es noch weitere Aminosäuren mit polaren Seitengruppen in der ersten Transmembranregion, doch liegen diese in der äußeren Membranhälfte und kommen somit für das in der inneren Membranhälfte lokalisierte ³⁵⁵D weniger als Interaktionspartner in Frage. Ich wählte Leucin als Ersatz für die nativen Aminosäuren, da es bei dem Austausch von ³⁵⁵D die Assemblierung und damit die Ausbildung der potentiellen Wasserstoffbrücke deutlich reduziert hatte und ich einen ähnlichen Effekt in der ersten Transmembranregion erwartete. Die Expression der Konstrukte in Oozyten und anschließende Analyse durch Blaue-Native-PAGE ergab allerdings keinen Effekt der Mutationen auf das Assemblierungsverhalten der hP2X₅-Untereinheiten. Alle drei Mutanten (Abb. 4-20B,C, Spuren 4, 5, 9) trimerisierten in einem ähnlichen Ausmaß wie die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit (Spuren 2 und 7). Die ebenfalls konstruierte Doppelmutante ³⁷L, ³⁵⁵L-hP2X₅ zeigt zwar eine reduzierte Trimerbildung (Abb. 4-20B,C, Spur 6), dieser Effekt lag aber in der gleichen Größenordnung wie bei der ³⁵⁵L-hP2X₅-Einzelmutante (Spur 3), so dass er nur der ³⁵⁵L- Mutation zugeschrieben werden kann. Mit diesem Ansatz konnte ich daher keinen Interaktionspartner von ³⁵⁵D in der ersten Transmembranregion identifizieren.

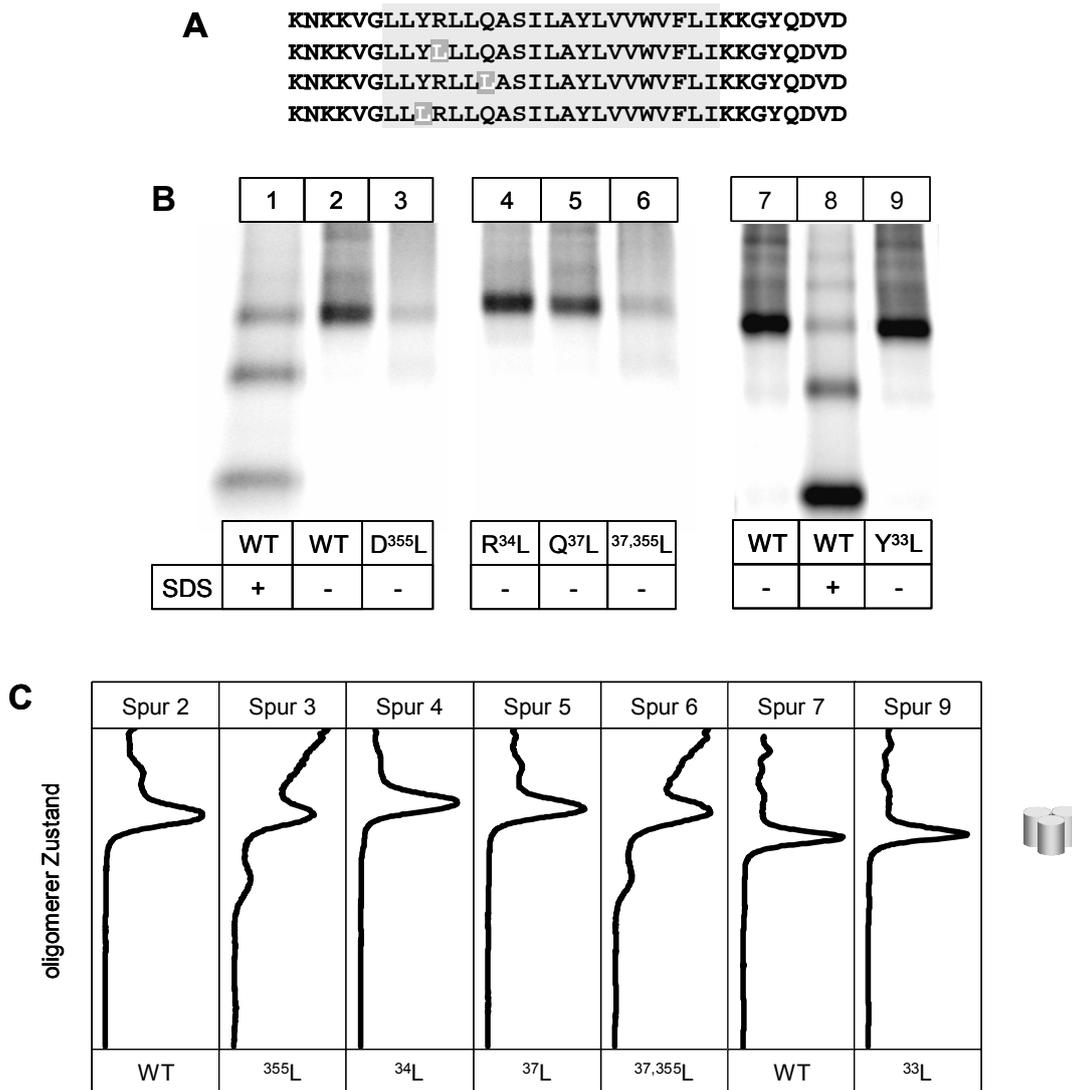


Abb. 4-20 Leucin-Substitutionen in TM1 der hP2X₅-Untereinheit. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten hP2X₅-Konstrukte im analysierten Bereich. Leucin-Einzelmutationen sind durch weiße Buchstaben gekennzeichnet und dunkelgrau hinterlegt, TM1 ist hellgrau hinterlegt. **B**, PhosphorImager Scans von Blaue-Native-PAGE-Gelen mit den angezeigten Konstrukten im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **C**, Quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus B.

Nachdem durch den ersten Ansatz kein Interaktionspartner in der ersten Transmembranregion identifiziert werden konnte, testete ich noch eine zweite Methode, um dieses Ergebnis zu überprüfen. Hierzu generierte ich Doppel-Cystein-Mutanten, in denen ich jeweils ³⁵⁵D und zusätzlich eine der Aminosäuren 33-39 durch Cystein ersetzte, um den gesamten in Frage kommenden Bereich der ersten Transmembranregion abzudecken (Abb. 4-21A). Wenn sich nun ³⁵⁵C und ein in die erste Transmembranregion eingefügter Cysteinrest in der ersten Transmembranregion einer Nachbaruntereinheit in räumlicher Nähe befinden, so könnte es spontan zu der Ausbildung einer Disulfidbrücke kommen. Dies war zuvor von Jiang

(Jiang et al., 2003) beschrieben worden, der bei den rP2X₂- bzw. rP2X₃-Rezeptoren eine spontane Disulfidbrückenbildung zwischen den mutierten Aminosäuren V⁴⁸C und I³²⁸C bzw. V⁴⁷C und I³³³C beobachtet hatte. Diese Information nutzte ich als Kontrolle für meine Experimente, indem ich jeweils auch die Doppel-Cystein-Chimäre V⁴⁸C,I³²⁹C-rP2X₂/P2X₁ exprimierte und analysierte. Bei einer Disulfidbrückenbildung würde ich auf einem SDS-PAGE-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen SDS-resistente Oligomere erwarten, die nach der Zugabe von DTT als Reduktionsmittel in Monomere dissoziieren würden.

Die Expression und Analyse der Doppel-Cystein-Mutanten durch SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen ergaben allerdings für keine der Doppelmutanten eine Ausbildung höhermolekularer Banden, die sich signifikant von denen der anderen Konstrukte unterschieden hätte (Abb. 4-21B, Spuren 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15). Und auch nach der Reduktion der Disulfidbrücken verhielten sich alle Doppelmutanten sehr ähnlich. Nach der Zugabe von DTT war zwar in allen Fällen eine Abnahme der höhermolekularen Banden erkennbar (Spuren 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16), doch wurde keine vollständige Dissoziation dieser Banden zum Monomer erreicht. Somit scheinen die höhermolekularen Banden nicht allein von hP2X₅-Multimeren herzurühren, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Hinzu kam die Beobachtung, dass die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit sogar ein stabileres Crosslinking zeigte als die Cystein-Doppelmutanten (Spur 1), das sich ebenfalls nicht vollständig durch DTT aufheben ließ (Spur 2). Auch die Kontrollgruppe (Spuren 17 und 18) besaß ein ähnliches Verhalten wie die Doppelmutanten und war in einem geringeren Maße dimerisiert als die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit. Somit lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass keine signifikante spontane Disulfidbrückenbildung stattgefunden hat, sondern ein Crosslinking, das auch in der nicht mutierten Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit auftrat. Dies könnte entweder durch das Crosslinking N- und/oder C-terminaler Cysteine erklärt werden oder durch andere Interaktionen. Auf jeden Fall ließ sich auf diesem Wege kein Interaktionspartner für ³⁵⁵D finden. Auch auf dem Blaue-Native-PAGE-Gel gab es kein Anzeichen für die Bildung stabilerer, SDS-resistenter Di- oder Trimere, wie es bei durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten bei den SDS-behandelten Proben der Fall hätte sein müssen (Abb. 4-21C). Wieder verhielten sich alle untersuchten Konstrukte sehr ähnlich, so dass wir keine Informationen über einen Interaktionspartner von ³⁵⁵D erhielten.

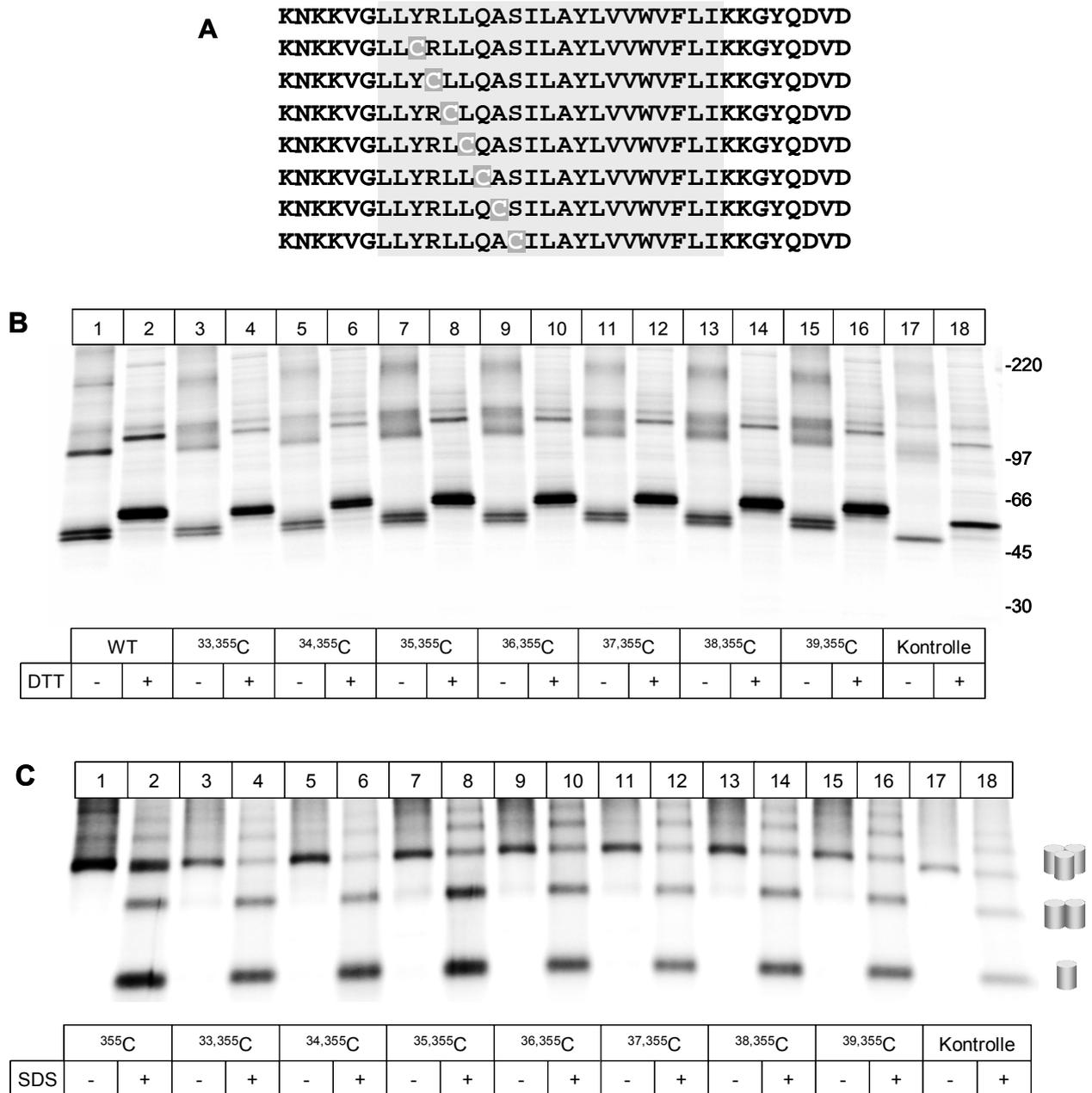


Abb. 4-21 Analyse von Doppel-Cystein-Mutanten der hP2X₅-Untereinheit. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten hP2X₅-Konstrukte im analysierten Bereich. Cystein-Mutationen in TM1 sind durch weiße Buchstaben gekennzeichnet und dunkelgrau hinterlegt, TM1 ist hellgrau hinterlegt. Zusätzlich war stets ³⁵⁵D in TM2 zu Cystein mutiert. **B**, PhosphorImager Scan eines diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (4-10% Acrylamid), das die jeweiligen Konstrukte reduziert (+DTT) bzw. nicht reduziert (-DTT) darstellt. Als Positivkontrolle diente die Chimäre V⁴⁸C₁I³²⁹C-rP2X₂/P2X₁. **C**, PhosphorImager Scan eines Blue-Native-PAGE-Gels mit den angezeigten Mutanten im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand.

Um eine potentielle Ausbildung der Disulfidbrücken zu forcieren, behandelte ich nun die Proteine vor oder während der Aufreinigung mit Oxidationsmitteln, um auszuschließen, dass die Cysteine aufgrund unzureichender pro-oxidativer Bedingungen nicht zu Disulfiden oxidiert wurden. Hierzu verwendete ich Kupferphenanthrolin (Abb. 4-22A) oder diverse Konzentrationen an H_2O_2 (Abb. 4-22B,C). Aber auch nach diesen Maßnahmen konnte ich kein vermehrtes Crosslinking der Untereinheiten beobachten, auch nicht bei den Kontrollgruppen, weder auf den SDS-PAGE-Gelen (Abb. 4-22A,B,C), noch auf den Blaue-Native-PAGE-Gelen (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit war es mir auch durch die Verwendung der Doppel-Cystein-Mutanten nicht gelungen, einen Interaktionspartner von ^{355}D in der ersten Transmembranregion zu identifizieren.

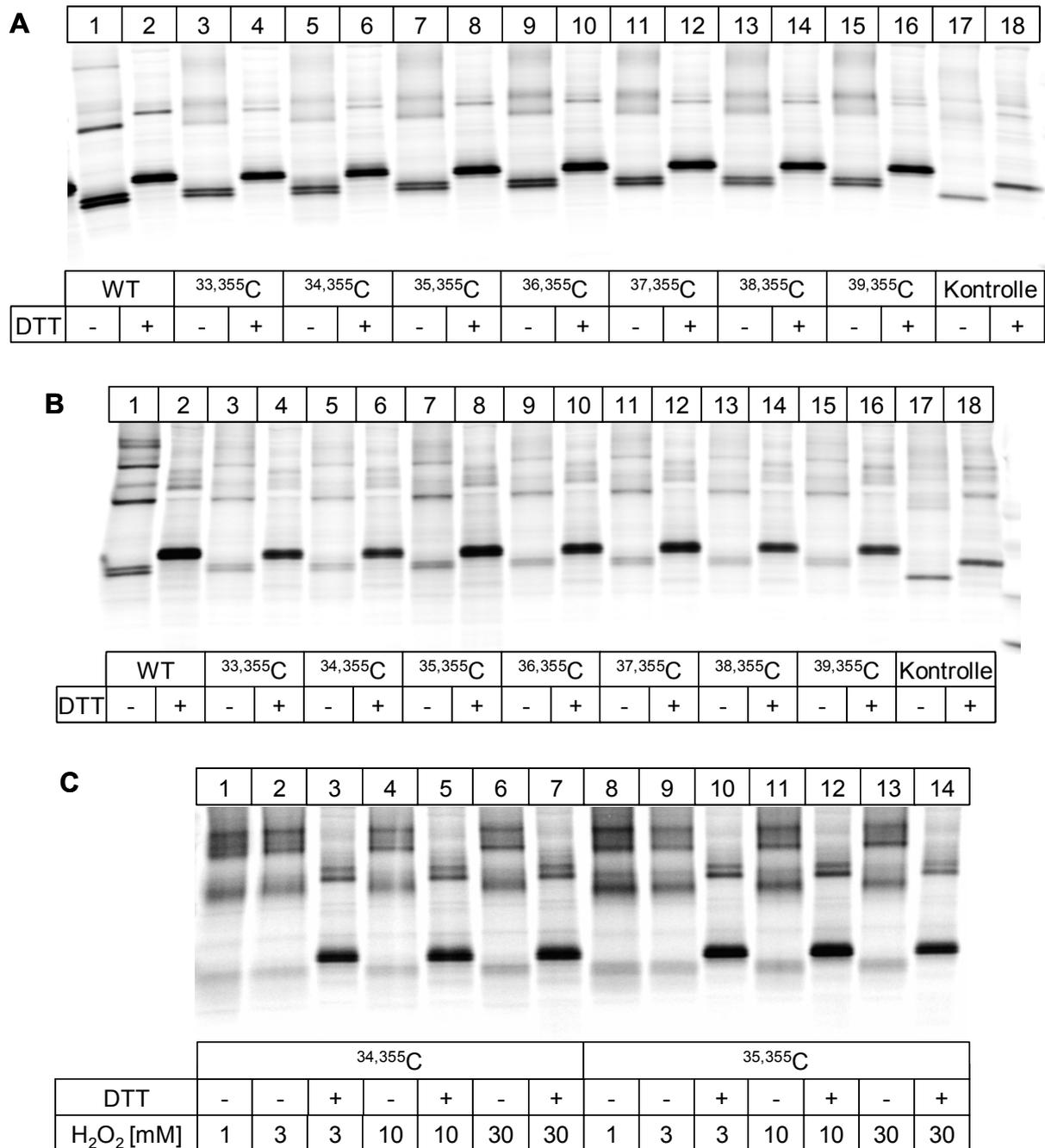


Abb. 4-22 Analyse von Doppel-Cystein-Mutanten der hP2X₅-Untereinheit. **A, B und C** zeigen PhosphorImager Scans von diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gelen (4-10% Acrylamid), die die angezeigten Konstrukte reduziert (+ DTT) und nicht reduziert (- DTT) darstellen. **A**, Die Oozyten wurden vor der Lyse für 1h bei Raumtemperatur in ORi mit 100 μ M CuSO₄ und 200 μ M 1,10-Phenanthrolinmonohydrat inkubiert. **B**, Die Proben wurden vor der nativen Elution für 30 min bei Raumtemperatur mit 3 mM H₂O₂ inkubiert. **C**, Die Proben wurden vor der nativen Elution für 30 min bei Raumtemperatur mit der jeweils angegebenen Konzentration an H₂O₂ inkubiert.

4.1.13 Trimerisierende hP2X₅-Mutanten sind ebenso kompakt gefaltet wie die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit

Bei allen vorangegangenen Experimenten war ich davon ausgegangen, dass die hP2X₅-Untereinheiten, die in der Lage sind zu trimerisieren, auch ebenso gefaltet sind wie die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit. Die fehlende Funktionalität einiger dieser Konstrukte führte ich auf die Veränderungen zurück, die die Mutationen eventuell in für die Funktion wichtigen Regionen hervorgerufen hatten, wie zum Beispiel in der Kanalpore oder den zum Gating beitragenden Bereichen. Es bestand aber die Möglichkeit, dass diese Konstrukte eine von der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit abweichende Struktur haben und somit nicht mit dieser verglichen werden können. Diese Möglichkeit war zwar nicht groß, da ich ja bereits durch die N-Glykosylierungsexperimente gezeigt hatte, dass eine andere Faltung die Assemblierung negativ beeinflusst, da für eine korrekte Trimerisierung die Assemblierungsdomänen richtig lokalisiert sein müssen. Um diese Möglichkeit aber gänzlich auszuschließen, untersuchte ich die Faltung einiger repräsentativer hP2X₅-Untereinheiten, indem ich einen partiellen Trypsinabbau vornahm.

Die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit enthält 31 Lysin- und 23 Argininreste, die potentielle Angriffsstellen für die Serinprotease Trypsin darstellen. Trypsin spaltet Peptidbindungen auf der Carboxylseite von Lysin- und Argininresten. Nach einer Behandlung der aufgereinigten hP2X₅-Rezeptoren mit Trypsin war daher eine starke Fragmentierung der einzelnen Untereinheiten zu erwarten. Nach der Trypsinolyse der nativ isolierten Wildtyp-hP2X₅-Rezeptoren und anschließender Analyse durch Tricin-SDS-PAGE zeigte sich, dass die Behandlung mit der niedrigsten Trypsin-Konzentration einen Abbau der hP2X₅-Untereinheit mit der ursprünglichen Masse von 61 kDa in zwei Hauptfragmente mit den Massen von 57 kDa und 51 kDa sowie weitere kleinere Fragmente (Abb. 4-23, Spur 2) zur Folge hatte. Diese Hauptfragmente entstanden offensichtlich durch die proteolytische Abspaltung der zytoplasmatischen N- und/oder C-terminalen Domänen, die eine berechnete Masse von 3,1 kDa beziehungsweise 9,0 kDa haben. Das 51 kDa-Fragment war auch nach der Behandlung mit einer 10fach höheren Trypsin-Konzentration noch die vorherrschende Bande (Spur 3). Die Behandlung mit einer 100fach höheren Trypsin-Konzentration bewirkte einen stärkeren Abbau der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit mit der 17 kDa-Bande als resultierendes Hauptfragment (Spur 4). Im Gegensatz zu diesem Ergebnis für die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit wurden zwei Mutanten, ¹⁻³³⁶hP2X₅ und ³⁵²⁻³⁵⁶Q-hP2X₅, die zuvor durch Blaue-Native-PAGE als nicht assemblierend identifiziert worden waren, schon durch die niedrigste Trypsin-Konzentration fast vollständig abgebaut (Abb. 4-23, Spuren 6 und 10). Dies mag

zunächst überraschen, da in den Mutanten die gleichen Trypsinschnittstellen vorhanden sind wie in der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit, doch wird der initiale proteolytische Abbau durch Trypsin nicht allein durch die Aminosäuresequenz, sondern vor allem durch die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins bestimmt (Hubbard, 1998). Daher schloss ich aus den obigen Ergebnissen, dass insbesondere die Ektodomäne der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit sehr kompakt gefaltet und dadurch resistent gegenüber dem Abbau durch Trypsin-Konzentrationen ist, die bei aggregierenden, nicht assemblierenden Mutanten zum vollständigen Abbau ausreichen. Der Umkehrschluss ist, dass diese aggregierenden hP2X₅-Untereinheiten nicht so kompakt gefaltet und aus diesem Grunde anfälliger gegenüber proteolytischem Abbau sind als die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheiten.

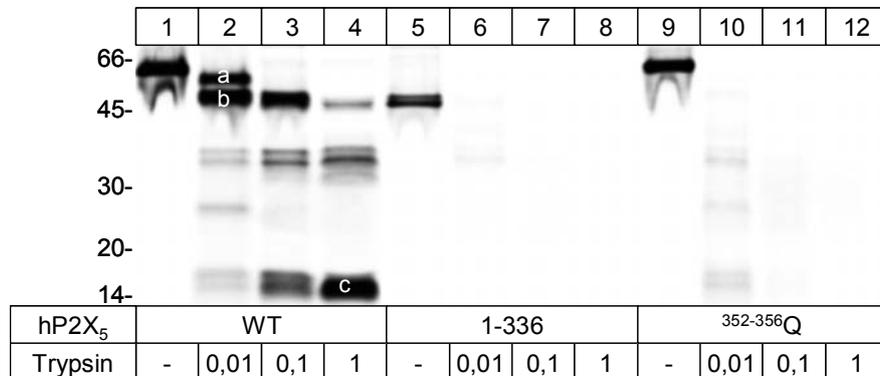


Abb. 4-23 Limitierte Trypsinolyse von hP2X₅-Konstrukten. PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen Tricin-SDS-PAGE-Gels (4%/10%/16,5% Acrylamid) mit verschiedenen hP2X₅-Konstrukten. Nach der nativen Elution wurden die Proben für 15 min auf Eis mit der jeweils angegebenen Trypsin-Konzentration [mg/ml] inkubiert. a, b und c kennzeichnen die 57, 51 und 17 kDa-Hauptfragmente.

Als Nächstes testete ich systematisch die Trypsin-Resistenz von sechs Leucin-Mutanten, die die gesamte zweite Transmembranregion umfassten und alle, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz, zur Trimerisierung fähig waren (Abb. 4-14B und 4-15B). Vier dieser Mutanten waren nicht funktionell. Nach der Behandlung der nativ aufgereinigten Rezeptoren mit Trypsin unter den gleichen Bedingungen wie in dem obigen Experiment ergab sich für alle Konstrukte ein ähnliches Bandenmuster wie bei der Trypsin-Behandlung des Wildtyp-hP2X₅-Rezeptors (Abb. 4-24A), sowohl für die funktionellen (Spuren 5-8 und 21-24) als auch die nicht funktionellen Rezeptormutanten (Spuren 9-20 und 25-28). Eine Mutante aber, ³⁵²⁻³⁵⁶L-hP2X₅, wurde schon bei niedrigeren Trypsin-Konzentrationen stärker abgebaut als die übrigen Mutanten, wenn auch nicht so extensiv wie die bereits getesteten nicht

assemblierenden Konstrukte (Abb. 4-24A, Spur 18). Dasselbe galt für die in einem weiteren Experiment ebenfalls untersuchte ^{355}L -hP2X₅-Mutante (Abb. 4-24B, Spur 10).

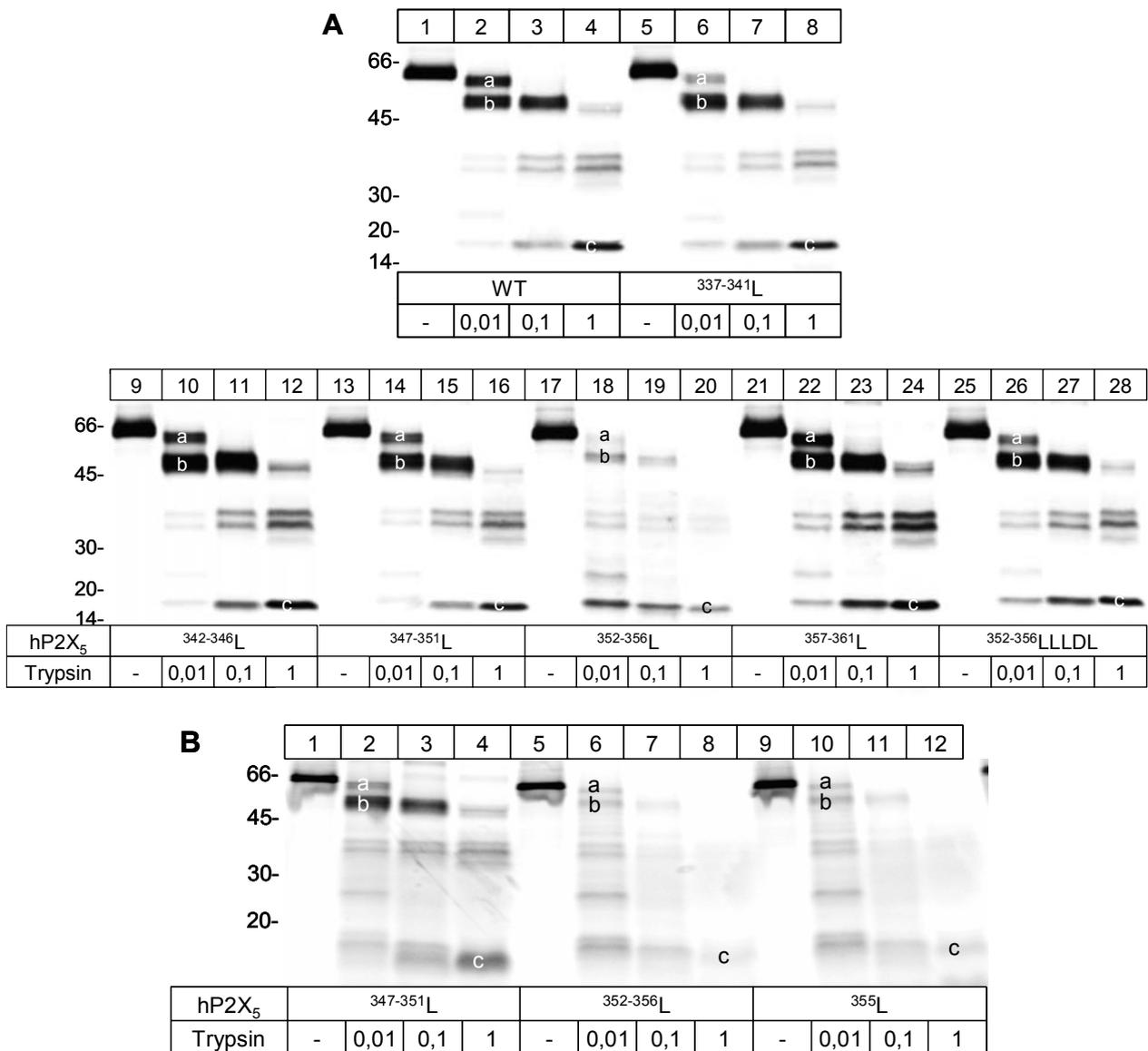


Abb. 4-24 Limitierte Trypsinolyse von hP2X₅-Konstrukten. A und B, PhosphorImager Scans von kontinuierlichen Tricin-SDS-PAGE-Gelen (4%/10%/16,5% Acrylamid) mit verschiedenen hP2X₅-Konstrukten. Nach der nativen Elution wurden die Proben für 15 min auf Eis mit der jeweils angegebenen Trypsin-Konzentration [mg/ml] behandelt. a, b und c kennzeichnen die 57, 51 und 17 kDa-Hauptfragmente.

Nun wollte ich diese Ergebnisse quantitativ darstellen, um das Verhalten der verschiedenen Konstrukte besser vergleichen und genauere Aussagen über ihre Faltung machen zu können. Bei dem proteolytischen Abbau von Proteinen ist der erste Schnitt der entscheidende, um Aussagen über die strukturelle Stabilität machen zu können, da Proteinfragmente, die bereits geschnitten wurden, wegen ihrer erhöhten Flexibilität leichter einem weiteren Abbau

zugänglich sind als intakte Strukturen (Hubbard, 1998). Daher quantifizierte ich die Trypsin-Resistenz der hP2X₅-Rezeptormutanten, indem ich für jedes Konstrukt die Summe der beiden bei niedrigster Trypsin-Konzentration entstehenden Hauptfragmente zu der Menge des unbehandelten intakten Proteins ins Verhältnis setzte. Dies ergab, dass die untersuchten nicht funktionellen hP2X₅-Rezeptormutanten gegenüber Trypsin ebenso resistent sind wie die funktionellen hP2X₅-Rezeptormutanten (Abb. 4-25). Die Konstrukte, in denen ³⁵⁵D durch Leucin ersetzt worden war, wurden signifikant stärker proteolytisch abgebaut als die anderen, besaßen aber immer noch eine Trypsin-Resistenz von ~10-15% im Vergleich mit dem Wildtyp-hP2X₅-Rezeptor. Wie oben gezeigt, lagen die ³⁵⁵L enthaltenden hP2X₅-Konstrukte mehr in einem aggregierten und weniger in einem trimeren Zustand vor (Abb. 4-15C). Daher ist davon auszugehen, dass die Intensität der ³⁵²⁻³⁵⁶L-hP2X₅-Mutanten der nicht mit Trypsin behandelten Kontrolle auf dem Tricin-SDS-PAGE-Gel (Abb. 4-24A, Spur 17) vornehmlich von Proteinaggregaten und nur zu einem geringeren Anteil aus Trimeren herrührt. Da hP2X₅-Mutanten, die in unstrukturierten Aggregaten vorliegen, durch Trypsin stärker angegriffen werden als solche, die in stabilen Trimeren organisiert sind, müssen die schwachen 57 kDa- und 51 kDa-Banden, die nach der Behandlung mit der niedrigsten Trypsin-Konzentration vorhanden sind, von dem kleinen Anteil an Trimeren stammen, die dem Abbau widerstehen. Dieses Verhalten der Mutanten, die ³⁵⁵L enthalten, zeigt wiederum die Bedeutung, die ³⁵⁵D für die effiziente Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten hat. Zusätzlich unterstrichen wird dies noch durch die starke Zunahme der Trimerbildung, die die ³⁵²LLL³⁵⁶DL³⁵⁶-hP2X₅-Mutante gegenüber der ³⁵²⁻³⁵⁶L-hP2X₅-Mutante aufweist (Abb. 4-15B,C). Diese Zunahme in der Trimerisierung ging einher mit einer ebenso großen Zunahme der Trypsin-Resistenz (Abb. 4-25).

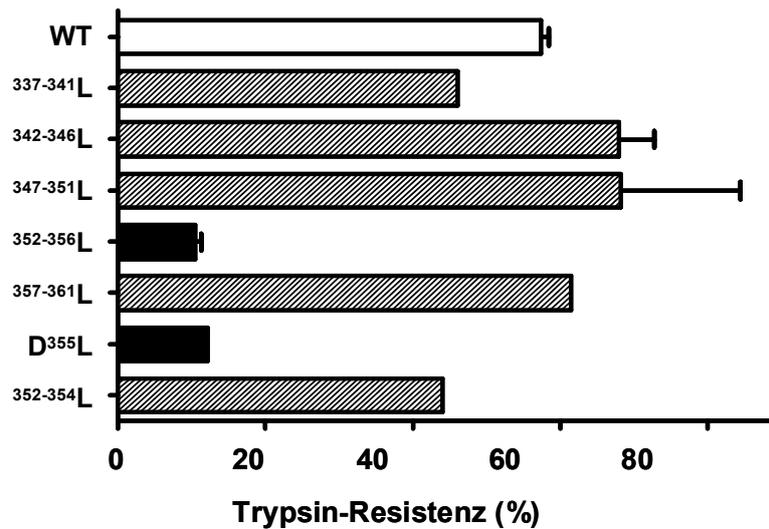


Abb. 4-25 Quantifizierung der Trypsin-Resistenz der hP2X₅-Konstrukte. Die Resistenz ist dargestellt als prozentualer Anteil der Radioaktivität in den Banden a und b aus Abb. 4-24 nach der Behandlung mit 0,01 mg/ml Trypsin im Verhältnis zu der Radioaktivitätsmenge in der entsprechenden Bande ohne Trypsin-Behandlung. Schwarz gefüllte Säulen: Daten von Konstrukten, die ³⁵⁵L enthalten; weiße Säule: WT-hP2X₅-Rezeptor; schraffierte Säulen: Daten der übrigen Konstrukte.

Die Trypsin-Resistenz der trimerisierten hP2X₅-Rezeptoren ist auch auf den Blaue-Native-PAGE-Gelen gut zu erkennen (Abb. 4-26A). Die Behandlung der aufgereinigten Rezeptormutanten mit der niedrigsten Trypsin-Konzentration führte bei allen untersuchten Konstrukten zu einer deutlichen Abnahme der Masse der Trimerbande (Spuren 3, 11, 19, 23, 27, 31, 35, 39). Diese Massenabnahme dürfte auf dem Abspalten der N- und/oder C-terminalen Domänen beruhen. Warum aber im Gegensatz zu den Tricin-SDS-PAGE-Gelen keine Doppelbande zu sehen ist, bleibt unklar. Wurde nun die Trypsin-Konzentration erhöht, blieb diese Trimerbande geringerer Masse erhalten und wurde nicht weiter abgebaut. Lediglich bei der höchsten Trypsin-Konzentration war bei einigen Konstrukten eine sehr schwache weitere Bande sichtbar, die etwa auf der Höhe eines Dimers lief (Spuren 5, 13, 21, 25, 29, 33, 37, 41). Das Laufverhalten der Banden in diesen Spuren, das sich durch die krumme Form und die scheinbar höhere Masse von den anderen Spuren unterscheidet, ist wahrscheinlich auf die hohe Trypsin-Konzentration zurückzuführen. Außerdem war zu erkennen, dass bei den nicht assemblierenden Mutanten ¹⁻³³⁶hP2X₅ (Spuren 6-9) und ³⁵²⁻³⁵⁶Q-hP2X₅ (Spuren 14-17) die Behandlung mit Trypsin zu einem vollständigen Abbau der amorph vorliegenden Proteine führte, während bei den trimerisierenden Konstrukten auch bei der höchsten Trypsin-Konzentration noch sehr deutliche Trimer-Banden vorhanden waren. Auffällig war dabei, dass auch die schwächer trimerisierenden ³⁵⁵L enthaltenden Mutanten ³⁵²⁻

³⁵⁶L-hP2X₅ (Spuren 30-33) und ³⁵⁵L-hP2X₅ (Spuren 10-13) nach der Behandlung mit Trypsin noch eine vergleichbare Menge an Trimer hatten (Spuren 31, 32 und 11, 12) wie vor der Behandlung (Spuren 30 und 10), obwohl sich auf den Tricin-SDS-PAGE-Gelen eine deutliche Abnahme schon nach der niedrigsten Trypsin-Konzentration gezeigt hatte (Abb. 4-24A, Spur 18 und Abb. 4-24B, Spuren 6 und 10). Lediglich die höchste Trypsin-Konzentration hatte eine etwas stärkere Abnahme an Trimer zur Folge (Spuren 33 und 13). Somit kann aus den Ergebnissen der Blauen-Nativen-PAGE geschlossen werden, dass Trimere sehr resistent gegenüber Trypsin sind. Auch wenn eine Mutante nur zu einem geringen Anteil trimerisiert, sind diese trimerisierten Rezeptoren sehr stabil. Die partielle Denaturierung des Wildtyp-hP2X₅-Rezeptors durch niedrige SDS-Konzentrationen gewährte einen zusätzlichen Einblick in den starken Zusammenhalt der trimerisierten Untereinheit. Ohne Trypsin-Abbau waren nach der partiellen Denaturierung drei definierte Banden zu erkennen, die auf der Höhe des Trimers, des Dimers und des Monomers liefen (Abb. 4-26B, Spur 2). Nach der Behandlung mit der niedrigsten Trypsin-Konzentration dagegen erschien die Trimer-Bande schwächer und es waren zwei Monomer-Banden vorhanden (Spur 4). Die Steigerung der Trypsin-Konzentration führte schließlich zu einem vollständigen Verschwinden der Trimer-Bande und einem Übergang von definierten Banden zu einer Proteinmasse ohne definierte Assemblierungszustände (Spuren 6 und 8). Dieses Ergebnis sprach dafür, dass die nativ gefalteten Untereinheiten des Wildtyp-hP2X₅-Rezeptors sehr stark miteinander interagierten. Auch nach einem partiellen Abbau durch Trypsin blieben diese Wechselwirkungen erhalten. Erst die Behandlung mit SDS führte zu einer Dissoziation der Fragmente, die durch den proteolytischen Abbau entstanden sind. Je höher die Trypsin-Konzentration war, desto empfindlicher waren die Rezeptoren gegenüber der denaturierenden Wirkung von SDS. Somit sind die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten so stark, dass selbst partiell proteolytisch geschnittene Untereinheiten untereinander verbunden und somit im assemblierten Zustand verbleiben.

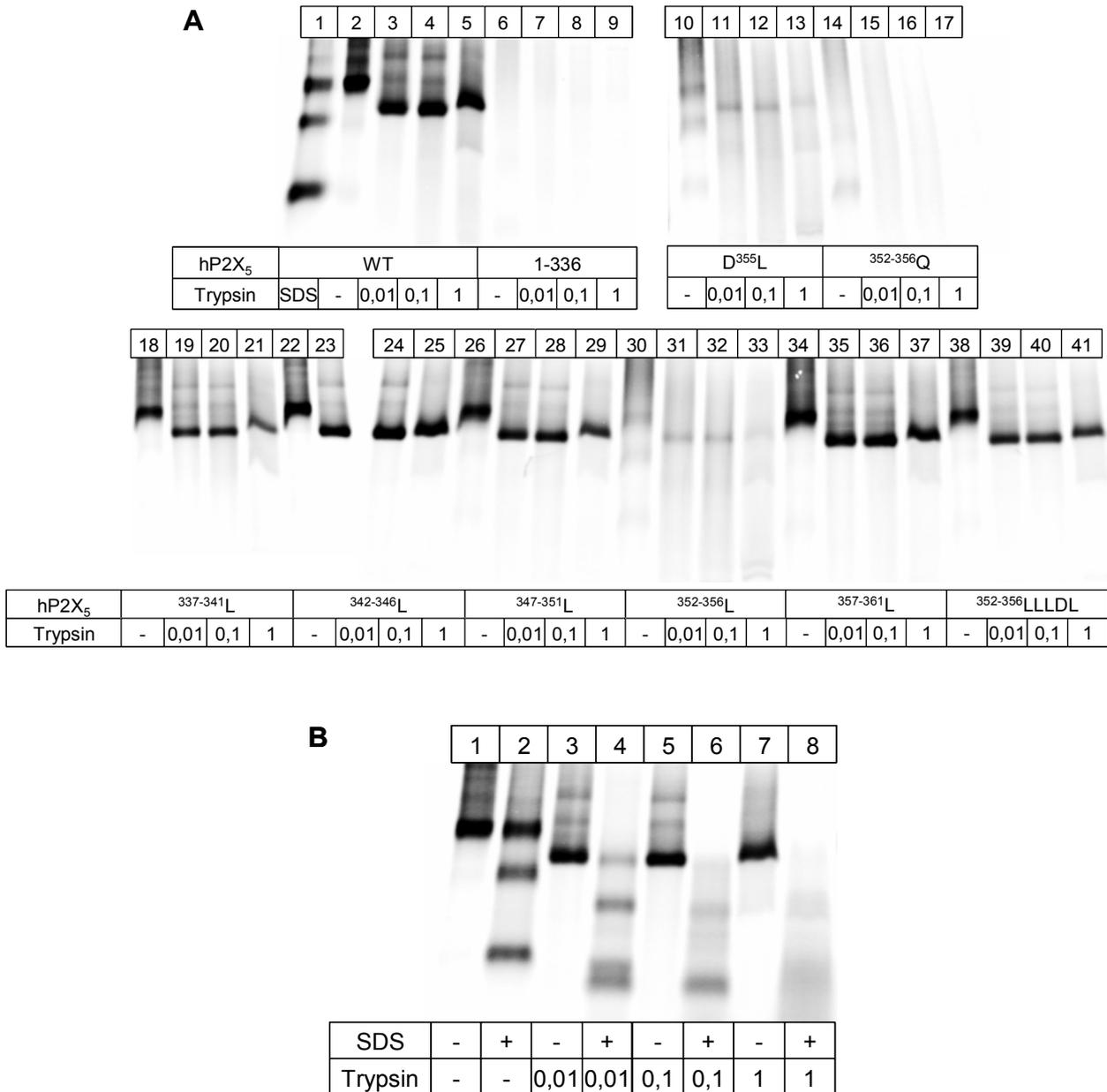


Abb. 4-26 Limitierte Trypsinolyse von hP2X₅-Konstrukten. **A**, PhosphorImager Scans von Blaue-Native-PAGE-Gelen mit den Mutanten aus Abb. 4-23 und 4-24 im nativen Zustand. Nach der nativen Elution wurden die Proben für 15 min auf Eis mit der jeweils angegebenen Trypsin-Konzentration [mg/ml] behandelt. **B**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels, das die unbehandelte Probe und die mit den jeweils angegebenen Trypsin-Konzentrationen [mg/ml] behandelten Proben des WT-hP2X₅-Rezeptors im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand zeigt.

Um nun noch stärker zu verdeutlichen, dass Trimere die Trypsin-resistente Form der hP2X₅-Rezeptoren darstellen, wurde die Menge an Trimer (im Verhältnis zur Menge an Monomer) gegen die prozentuale Trypsin-Resistenz aufgetragen (Abb. 4-27). Sowohl die

Werte für funktionelle als auch für nicht funktionelle Konstrukte lagen auf einer Gerade. Eine lineare Regression ergab eine signifikante Korrelation ($r = 0,76$, $p < 0,0001$), so dass daraus geschlossen werden konnte, dass die Trypsin-Resistenz tatsächlich im Verhältnis zu der Menge an hP2X₅-Untereinheiten steht, die als Trimer assemblieren. Diese deutliche Beziehung lässt zusätzlich darauf schließen, dass die gesamte Faltung des Wildtyp-hP2X₅-Rezeptors und der untersuchten assemblierenden Mutanten ähnlich oder identisch sein muss.

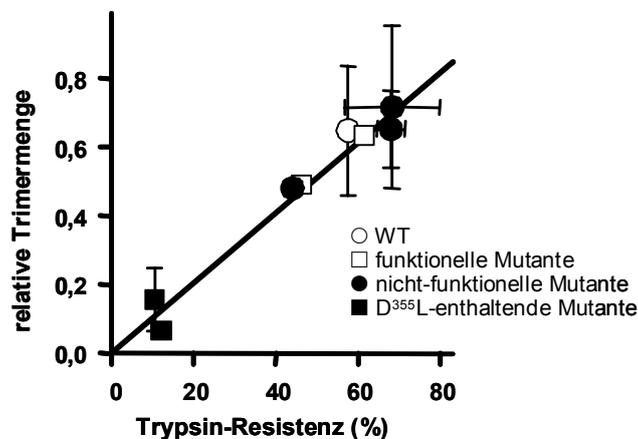


Abb. 4-27 Verhältnis zwischen Trimerisierungseffizienz und Trypsin-Resistenz. Die relative Trimermenge wurde bestimmt, indem die Radioaktivität der Trimer-Banden auf den entsprechenden Blaue-Native-PAGE-Gelen (Abb. 4-26) quantifiziert und ins Verhältnis zu der Radioaktivitätsmenge der unbehandelten Proben auf den Tricin-SDS-PAGE-Gelen aus Abb. 4-24 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, wenn zwei Versuche durchgeführt wurden.

4.2 Assemblierung von P2X₁-Untereinheiten der Ratte

4.2.1 Die Transmembranregionen der rP2X₁-Untereinheit enthalten keine spezifischen Assemblierungsmotive

Nachdem für die hP2X₅-Untereinheit gezeigt worden war, dass die zweite Transmembranregion kein sequenzspezifisches essentielles, sondern nur ein stabilisierendes Assemblierungsmotiv enthält, wollte ich überprüfen, ob sich dieses Ergebnis auch auf die rP2X₁-Untereinheit übertragen lässt. Hierfür wurden die Aminosäuren der zweiten Transmembranregion in Fünferblöcken zu Alanin mutiert (Abb. 4-28A). Das Abweichen der geplanten Mutationen von der Transmembranregion ist mit unterschiedlichen Vorhersagen der genauen Lokalisation der Transmembranregion zu begründen. Die angegebene

Transmembranregion beruht auf der oben erwähnten Vorhersage durch die Programme MEMSAT2.0 (Jones, 1998) und TMHMM2.0 (Krogh et al., 2001). Frühere Planungen beruhten aber teilweise auf anderen Vorhersagen, wie Abb. 4-28B zeigt, in der die Angaben aus verschiedenen Veröffentlichungen (North, 2002), (Silberberg et al., 2005), (Egan et al., 1998), (Khakh and Egan, 2005), (Li et al., 2004), (Migita et al., 2001), (Rassendren et al., 1997), (Vial et al., 2004a), jeweils übertragen auf die rP2X₁-Untereinheit, aufgeführt sind. Es ist natürlich auch möglich, dass die Transmembranregionen der verschiedenen Isoformen der P2X-Untereinheiten unterschiedlich lang sind, so dass die Vorhersagen für die eine nicht auf die anderen übertragbar wären. Auf jeden Fall besteht noch keine Einigkeit über die genaue Lokalisation der Transmembranregionen, so dass es immer zu Überlagerungen kommt und auch in meinen Studien dazu führte, dass initial hergestellte Mutanten nicht immer zu meiner zuletzt angenommenen Vorhersage passten.

Die Expression der Alanin-Mutanten in *X. laevis*-Oozyten und anschließende Analyse durch Blaue-Native-PAGE ergab, dass alle Konstrukte gleich gut assemblierten (Abb. 4-28C,D), mit Ausnahme der ³⁴⁶⁻³⁵⁰A-rP2X₁-Mutante, die eine geringfügig schwächere Trimerbildung und einen größeren Anteil an Aggregaten aufwies (Abb. 4-28C,D, Spur 4). Diese Abschwächung war sehr gering und könnte an der ³⁵⁰D-Alanin-Mutation liegen, die in dem Konstrukt enthalten ist. Zwar zeigten auch die ³³⁶⁻³⁴⁰A-rP2X₁-Mutante und die ³⁴¹⁻³⁴⁵A-rP2X₁-Mutante etwas mehr Aggregatbildung und die ³⁴⁶⁻³⁵⁰A-rP2X₁-Mutante etwas schwächere Trimerbildung als der Wildtyp-rP2X₁-Rezeptor, aber diese Effekte waren nicht besonders ausgeprägt und lassen auf keinen besonderen Einfluss dieser Region auf die Assemblierung schließen. Dieses Ergebnis für die zweite Transmembranregion der rP2X₁-Untereinheit ist vergleichbar mit dem für die hP2X₅-Untereinheit. Eine spezifische Assemblierungssequenz konnte somit in der zweiten Transmembranregion der rP2X₁-Untereinheit nicht identifiziert werden.

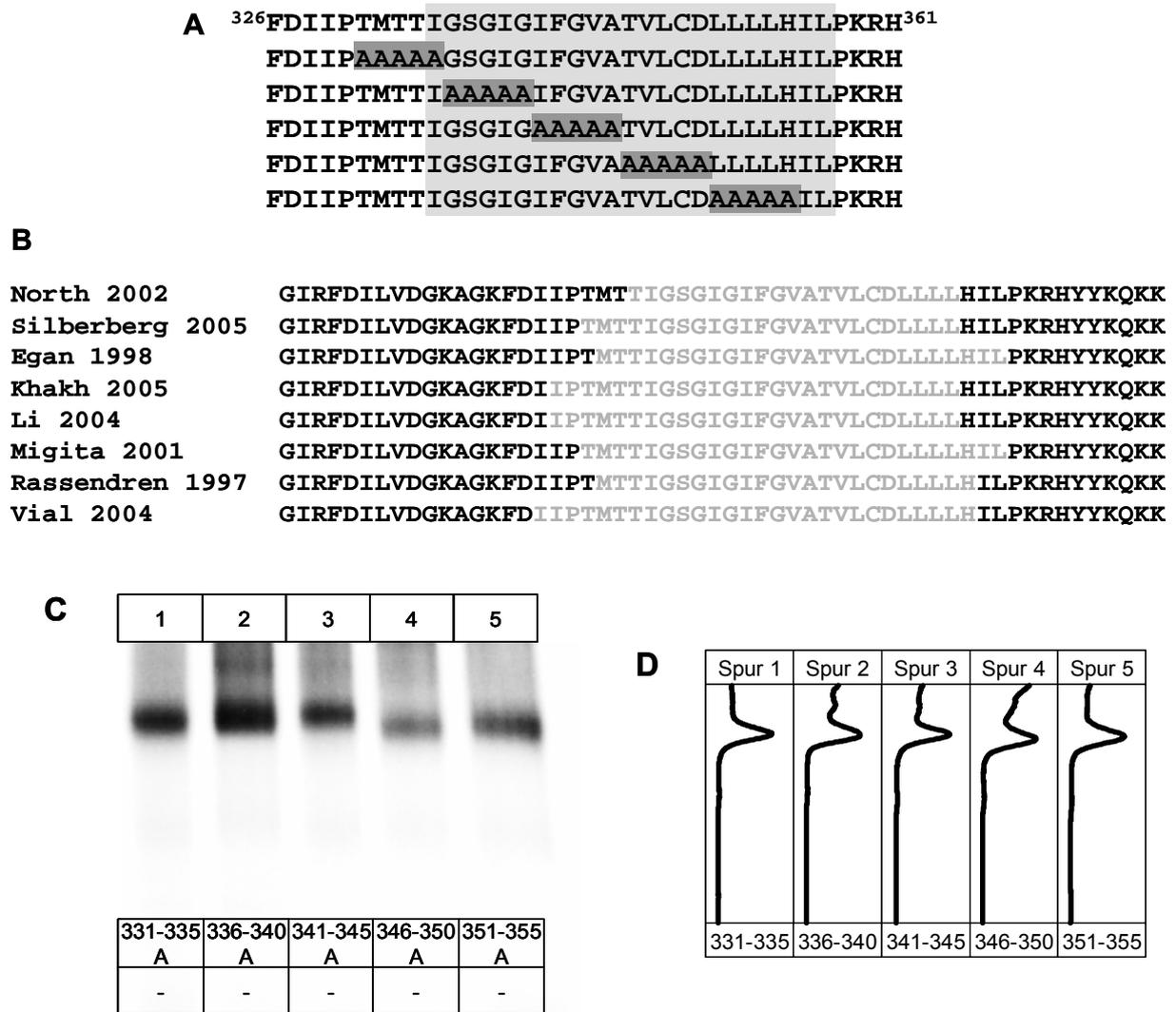


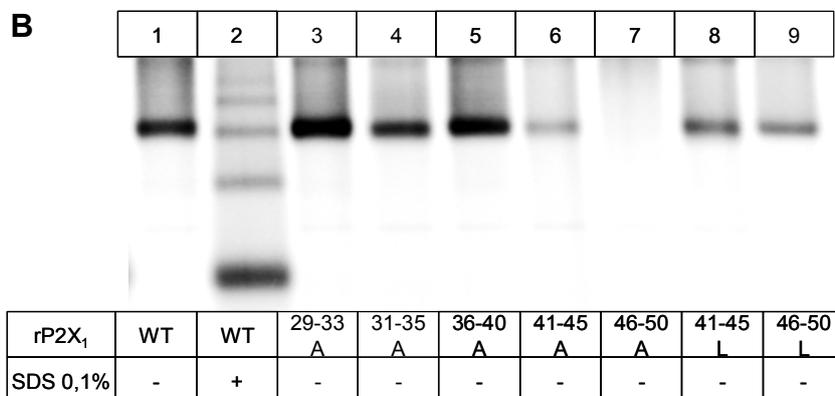
Abb. 4-28 Scanning der TM2 der rP2X₁-Untereinheit in Fünferblock-Alanin-Substitutionen. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten rP2X₁-Konstrukte im analysierten Bereich. Alanin-Mutationen sind dunkelgrau hinterlegt, TM2 ist hellgrau hinterlegt. **B**, Verschiedenen Veröffentlichungen zugrunde liegende Positionen von TM2. **C**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit den angezeigten Mutanten im nativen Zustand. **D**, Quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus C.

Nun interessierte mich, ob die erste Transmembranregion sich ähnlich verhalten würde wie die zweite Transmembranregion oder ob ich hier auf ein Assemblierungsmotiv stoßen würde. Um dies herauszufinden, wurde ein Alanin-Scanning der ersten Transmembranregion durchgeführt, indem die betreffenden Aminosäuren in Fünferblocks zu Alanin mutiert wurden (Abb. 4-29A). Die Analyse der exprimierten Konstrukte durch Blaue-Native-PAGE zeigte, dass nur die ⁴⁶⁻⁵⁰A-rP2X₁-Mutante nicht assemblierte (Abb. 4-29B,C, Spur 7), während fast alle anderen Mutanten ähnlich gut wie die Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit trimerisierten. Auffällig war nur die schwächere Trimerbande der ⁴¹⁻⁴⁵A-rP2X₁-Mutante (Abb. 4-29B, Spur

6). Die Expressionskontrolle durch SDS-PAGE ergab eine schwächere Expression dieses Konstruktes (Abb. 4-29D, Spur 5). Auch die ⁴⁶⁻⁵⁰A-rP2X₁-Mutante wurde nur schwach exprimiert (Abb. 4-29D, Spur 6), wodurch die fehlende Bande auf dem Blaue-Native-PAGE-Gel aber nicht erklärt werden konnte, da die Proteinmenge mit der der ⁴¹⁻⁴⁵A-rP2X₁-Mutante vergleichbar war. Auffällig war auf dem SDS-PAGE-Gel das von den anderen Konstrukten abweichende Bandenmuster der ⁴⁶⁻⁵⁰A-rP2X₁-Mutante (Spur 6), das wahrscheinlich auf Unterschiede in der N-Glykosylierung zurückzuführen ist. Dies müsste aber noch untersucht werden.

Um eine Erklärung für die schwache Expression beziehungsweise fehlende Trimerisierung dieser beiden Mutanten zu finden, erzeugte ich Leucin-Mutanten dieser Region (Abb. 4-29A). Bei der Untersuchung der hP2X₅-Untereinheit hatte sich gezeigt, dass die Verwendung des größeren hydrophoberen Leucins Informationen liefern kann, die über die durch Alanin erhaltenen hinausgehen. Die Analyse dieser beiden Leucin-Mutanten ergab, dass beide trimerisierten (Abb. 4-29B,C, Spuren 8 und 9) und eine verbesserte Expression besaßen (Abb. 4-29D, Spuren 7 und 8) als die entsprechenden Alanin-Mutanten (Abb. 4-28D, Spuren 5 und 6).

A ²⁵RNKKVGVIFRLIQLVVLVYVIGWVVFVYEKGYQ⁵⁶
 RNKKA^{AAAA}ARLIQLVVLVYVIGWVVFVYEKGYQ
 RNKKVG^{AAAAA}AIQLVVLVYVIGWVVFVYEKGYQ
 RNKKVGVIFRL^{AAAAA}L^{VYVIGWVVFVYEKGYQ}
 RNKKVGVIFRLIQLV^{AAAAA}AGWVVFVYEKGYQ
 RNKKVGVIFRLIQLVVLVYV^{IAAAAA}YEKGYQ
 RNKKVGVIFRLIQLV^{LLLLL}L^LGWVVFVYEKGYQ
 RNKKVGVIFRLIQLVVLVYV^{ILL}LLLLLYEKGYQ



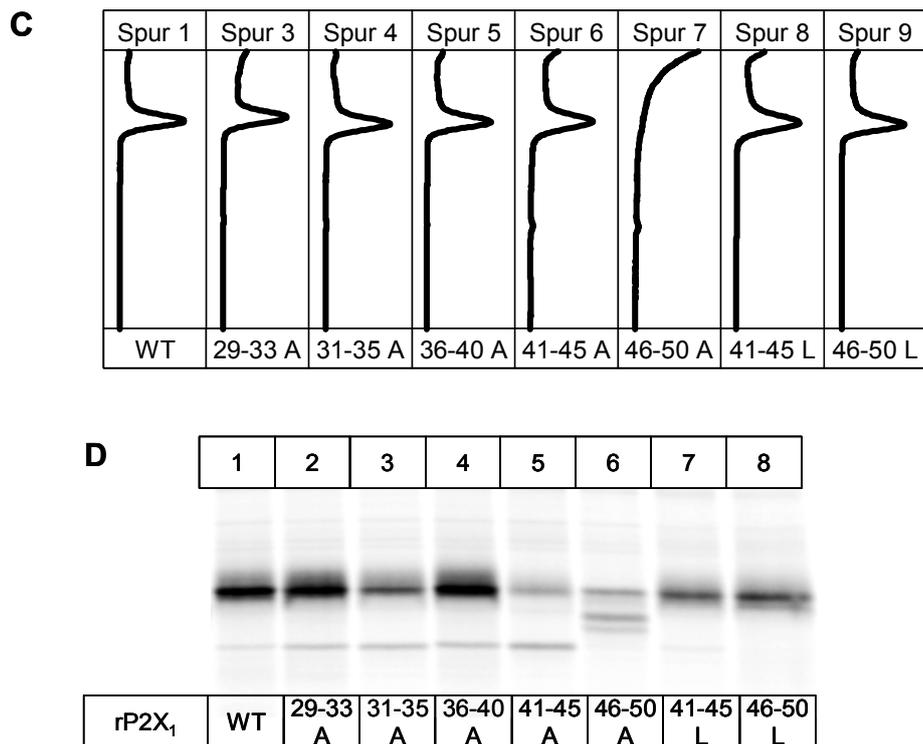


Abb. 4-29 Alanin- und Leucin-Scanning von TM1 der rP2X₁-Untereinheit in Fünferblock-Substitutionen. **A**, Aminosäuresequenzen der untersuchten rP2X₁-Konstrukte im analysierten Bereich. Alanin- und Leucin-Mutationen sind dunkelgrau hinterlegt, TM1 ist hellgrau hinterlegt. **B**, PhosphorImager Scan eines Blue-Native-PAGE-Gels mit den angezeigten Mutanten im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **C**, Quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus **B**. **D**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit den entsprechenden Proben aus **B**.

Um zu überprüfen, ob dieses Ergebnis auch auf die erste Transmembranregion anderer P2X-Isoformen übertragen werden kann, führte ich auch für die hP2X₅-Untereinheit ein entsprechendes Scanning dieses Bereiches der ersten Transmembranregion durch. Die Abb. 4-30C zeigt auch hier eine deutlich verminderte, fast fehlende Expression der ⁴⁶⁻⁵⁰A-hP2X₅-Mutante (Spur 3). Eine Trimerisierung konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4-30A,B, Spur 3), hier könnte der Grund allerdings die schwache Expression sein. Die ⁴¹⁻⁴⁵A-hP2X₅-Mutante verhielt sich wie die Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit (Abb. 4-30A,B, Spuren 1 und 2) und unterschied sich somit von der entsprechenden rP2X₁-Mutante. Die ⁴⁶⁻⁵⁰L-hP2X₅-Mutante wurde wieder gut exprimiert (Abb. 4-30C, Spur 4), wie auch die entsprechende rP2X₁-Mutante. Die Trimerisierung fiel dagegen sehr viel geringer aus, als es bei der rP2X₁-Mutante der Fall gewesen war (Abb. 4-30A,B, Spur 4). Somit lassen sich die Ergebnisse mit der rP2X₁-Untereinheit nur teilweise auf die P2X₅-Untereinheit übertragen. Gemeinsam scheint

allen aber zu sein, dass die letzten Aminosäuren der ersten Transmembranregion groß und hydrophob sein müssen, um eine ausreichende Expression zu gewährleisten.

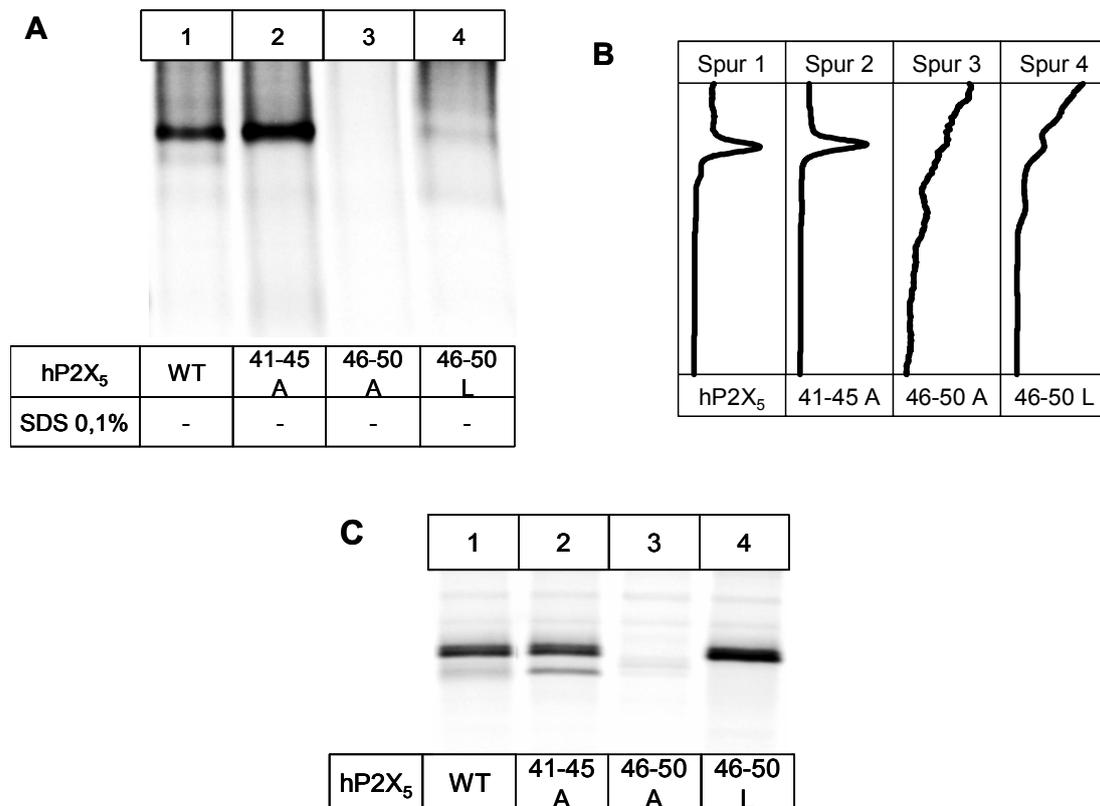


Abb. 4-30 Rolle der Aminosäuren 41-50 für das Assemblieren von hP2X₅-Untereinheiten. **A**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit den angezeigten Alanin- und Leucin-Mutanten des hP2X₅-Rezeptors, die direkt nach dem Übernachten-[³⁵S]-Methionin-pulse aufgereinigt wurden, im nativen Zustand. **B**, Quantitative Profile der angezeigten PAGE-Gel-Spuren aus A. **C**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen Tricin-SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit den entsprechenden Proben aus A.

4.2.2 Die Ausbildung der zweiten Transmembranregion ist essentiell für die Assemblierung von rP2X₁-Untereinheiten

Ebenso wie für die hP2X₅-Untereinheit wollte ich nun herausfinden, inwieweit die zweite Transmembranregion für die Assemblierung von rP2X₁-Untereinheiten von Wichtigkeit ist. Ich generierte trunkeierte rP2X₁-Untereinheiten, indem ich vor, in oder nach der zweiten Transmembranregion Stopp-Codons einfügte (1-327, 1-332, 1-338, 1-343, 1-347, 1-352, 1-357). Nach der Expression dieser Konstrukte in *X. laevis*-Oozyten und der Analyse durch Blaue-Native-PAGE zeigte sich, dass eine signifikante Trimerisierung erst auftrat, wenn die gesamte zweite Transmembranregion mit eingeschlossen war (rP2X₁¹⁻³⁵⁷, Abb. 4-31A, Spur 17). Alle anderen Konstrukte liefen im Blaue-Native-PAGE-Gel nur als amorphe

Proteinmassen ohne definierten oligomeren Zustand. Die Expressionskontrolle durch SDS-PAGE-Gele ergab eine vergleichbare Expression aller untersuchten Konstrukte (Abb. 4-31B), so dass ausgeschlossen werden konnte, dass die fehlende Assemblierung durch eine geringere Expression zu begründen ist. Somit war auch für die rP2X₁-Untereinheit gezeigt, dass für eine Trimerisierung die gesamte zweite Transmembranregion notwendig ist.

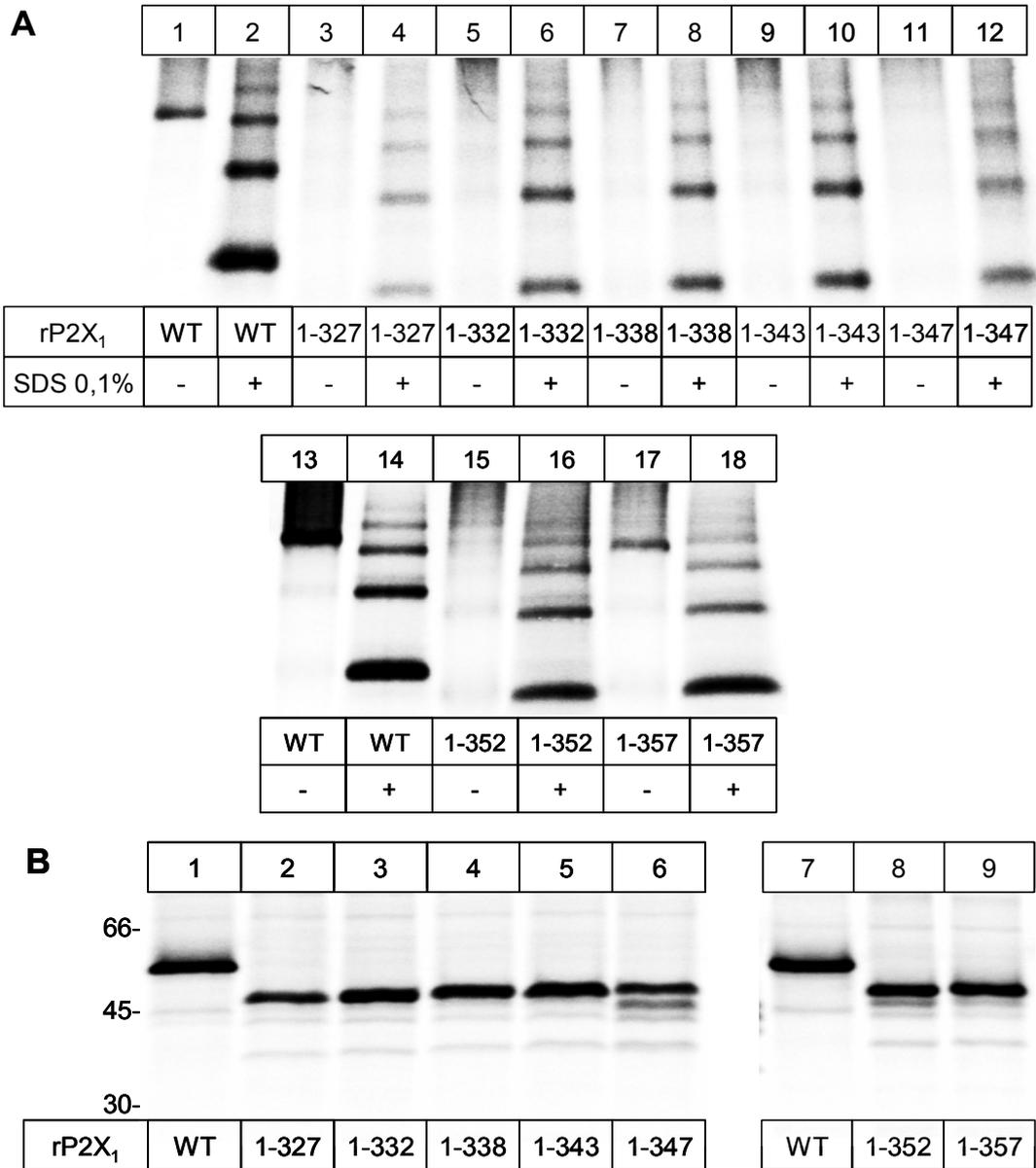


Abb. 4-31 Einfluss C-terminaler Trunkierungen auf die Assemblierung von rP2X₁-Untereinheiten. **A**, PhosphorImager Scans von Blaue-Native-PAGE-Gelen mit C-terminal trunkierten rP2X₁-Untereinheiten im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. **B**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen Tricine-SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit den Proben aus A.

Es besteht aber ein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Isoformen. Bei den hP2X₅-Untereinheiten war eine korrekte Ausbildung der zweiten Transmembranregion und damit eine Assemblierung erst beobachtet worden, wenn auch positiv geladene Aminosäuren nach der zweiten Transmembranregion mit eingeschlossen waren (hP2X₅¹⁻³⁶⁵, Abb. 4-11B, Spur 8). Die hP2X₅¹⁻³⁶²-Deletionsmutante, die alle Aminosäuren der zweiten Transmembranregion beinhaltet, assemblierte nicht (Abb. 4-11B, Spur 7). Bei der rP2X₁-Untereinheit scheint es auszureichen, alle Aminosäuren der zweiten Transmembranregion mit einzuschließen, um die korrekte Membranintegration zu ermöglichen, zusätzliche zytosolische Aminosäuren werden nicht benötigt.

4.2.3 Die Transmembranregionen allein besitzen kein Assemblierungsvermögen.

Da die bisherigen Versuche mit rP2X₁-Untereinheiten gezeigt hatten, dass eine Ausbildung beider Transmembranregionen für eine Assemblierung der Untereinheiten notwendig ist, stellte sich nun die Frage, ob die beiden Transmembranregionen ausreichen, um eine Trimerisierung zu ermöglichen. Um dies zu untersuchen, erzeugte ich ein Konstrukt, in dem fast die gesamte Ektodomäne durch einen flexiblen Linker aus 19 Aminosäuren ((AGS)₆A, Abb. 4-32A) ersetzt war (Zhou et al., 2003). Durch die Flexibilität des Linkers sollte gewährleistet werden, dass die Transmembranregionen die jeweils richtige Orientierung einnehmen können. Die zytosolischen Bereiche sowie die Transmembranregionen blieben unverändert.

Die Analyse des *in X. laevis*-Oozyten exprimierten Konstruktes durch Blaue-Native-PAGE ergab, dass es lediglich als amorphe Proteinmasse ohne definierten Assemblierungszustand lief (Abb. 4-32B, Spur 1). Somit ist anzunehmen, dass die Transmembranregionen für sich genommen nicht in der Lage sind zu trimerisieren. Es ist natürlich auch denkbar, dass die Länge oder die Struktur des Linkers nicht geeignet ist, die Transmembranregionen in die notwendige Position zu bringen und so eine potentielle Assemblierung zu ermöglichen (Minier and Sigel, 2004). Aber der erste Eindruck ist, dass die Transmembranregionen alleine nicht assemblieren können. Demnach scheinen die wichtigen Assemblierungsinformationen in der Ektodomäne enthalten zu sein.

A **N-Term** ¹MARRLQDELSAFFFEYDTPRMVLVRNKKVG³⁰
TM1 ³¹VIFRLIQLVVLVYVIGWVFVY⁵¹
Ekto ⁵²EKG YQAGSAGSAGSAGSAGSAGSAGSALVDGKAGKFDI IPTMTT³³⁴
TM2 ³³⁵IGSGIGIFGVATVLCDLLLHIL³⁵⁷
C-Term ³⁵⁸PKRHYYKQKKFKYAEDMGPEGEHDPVATSS TLGLQENMSTS³⁹⁹

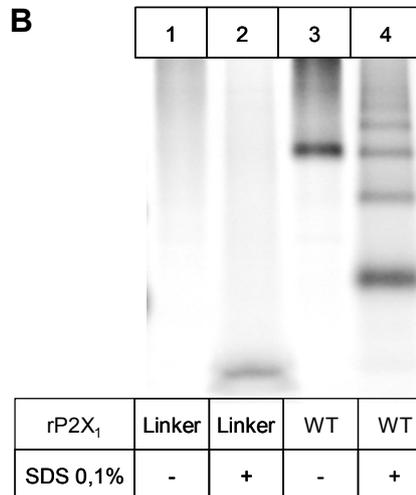


Abb. 4-32 Assemblierung eines rP2X₁-Konstruktes mit weitgehend deletierter Ektodomäne. **A**, Aminosäuresequenz des rP2X₁-Konstruktes, bei dem der Hauptteil der Ektodomäne durch einen Linker ersetzt wurde. **B**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit dem Ektodomänen-freien Konstrukt und dem WT-rP2X₁-Rezeptor im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand.

4.2.4 Die Ektodomäne der rP2X₁-Untereinheit kann teilweise assemblieren

Alle bisherigen Experimente hatten sich auf die Untersuchung der Transmembranregionen von P2X-Isoformen konzentriert und konnten keine sequenzspezifische Interaktion zwischen ihnen zeigen, die essentiell für eine Assemblierung ist. Lediglich stabilisierende (³⁵⁵D in der hP2X₅-Untereinheit) und strukturelle Einflüsse durch die Verankerung in der Membran (hP2X₅ und rP2X₁) konnten nachgewiesen werden. Daher interessierte mich als Nächstes, welche Rolle die extrazelluläre Ektodomäne bei der Trimerisierung von rP2X₁-Untereinheiten spielt.

Dazu wurden zunächst drei Konstrukte erzeugt, die die gesamte Ektodomäne oder Abschnitte derselben umfassten, wobei darauf geachtet wurde, dass in jedem der Konstrukte die bei allen P2X-Isoformen konservierten zehn Cysteine enthalten waren, die durch die Ausbildung von fünf Disulfidbrücken eine wichtige Rolle bei der Faltung der Ektodomäne

spielen (Ennion and Evans, 2002a), (Clyne et al., 2002b). Damit sich diese Disulfidbrücken und auch die unter anderem für die Expression, Stabilität und Funktion von P2X-Rezeptoren wichtigen N-Glykosylierungen (Rettinger et al., 2000a), (Torres et al., 1998a) ausbilden können, wurden alle Konstrukte mit einem N-terminalen abspaltbaren Signalpeptid versehen. Dieses hatte die Aufgabe, die löslichen Ektodomänen-Konstrukte, die sonst im Zytosol synthetisiert werden würden, in das ER einzuschleusen und so die Ausbildung der Disulfidbrücken, der Glykosylierungen, der Faltung und der Assemblierung zu ermöglichen. Als Signalpeptid wurde das abspaltbare Signalpeptid des *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) verwendet, das die Sequenz LRTKDLIWTLFFLGTAVSLQVDIVP besitzt und wahrscheinlich in der Position AVS-LQV gespalten wird (Nielsen et al., 1997). Somit erhielt ich die drei Konstrukte $^{NCAM-Ecto}rP2X_1^{52-327}$, $^{NCAM-Ecto}rP2X_1^{108-327}$ und $^{NCAM-Ecto}rP2X_1^{52-299}$.

Die Abb. 4-33A zeigt, dass alle drei Konstrukte ein ähnliches Assemblierungsverhalten aufwiesen, nämlich eine Assemblierung in mehrere oligomere Zustände, von denen das Dimer und das Monomer die auffälligsten waren (Abb. 4-33A,B, Spuren 3, 5 und 7). Somit schienen die Ektodomänen-Konstrukte die Fähigkeit zu haben, partiell zu assemblieren, was sie von anderen Mutanten, die lediglich als amorphe Proteinmassen ohne definierten oligomeren Zustand laufen, unterschied. Eine signifikante Trimerbildung war aber nicht zu beobachten, dazu fehlten wahrscheinlich die Transmembranregionen als Membrananker, die, wie bereits gezeigt, von essentieller Bedeutung sind.

Auf dem Tricin/SDS-PAGE-Gel, das als Expressionskontrolle diente, sind für jedes Konstrukt mehrere Banden mit unterschiedlichen Massen zu sehen (Abb. 4-33C). Eine Berechnung der Massen ergab in Spur 1 für die beiden Banden der Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit 55,6 kDa und 45,2 kDa, was den Massen der vollständig (viermal) glykosylierten und nicht glykosylierten rP2X₁-Untereinheiten entspricht (theoretische Masse der nicht glykosylierten rP2X₁-Untereinheit: ~45,9 kDa). Eine Glykosylierung fügt einem Protein eine zusätzliche Masse von etwa 3 kDa hinzu. In Spur 2 haben die vier Banden Massen von 45,7 kDa, 43,7 kDa, 40,5 kDa und 33,9 kDa (theoretische Masse des nicht glykosylierten Proteins: ~32,7 kDa). Somit bestand zwischen der größten und der niedrigsten Masse ein Unterschied von 11,8 kDa, was vier benutzten N-Glykosylierungssequenzen entspricht. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da das $^{NCAM-Ecto}rP2X_1^{52-327}$ -Konstrukt alle fünf in der Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit vorhandenen N-Glykosylierungssequenzen enthielt, von denen jedoch nur vier benutzt werden (Nicke et al., 1998), (Rettinger et al., 2000a), (Roberts J.A. and Evans R.J., 2006). In Spur 3 sind zwei Banden mit den Massen 42,2 und 39,1 kDa zu erkennen, was auf einen Unterschied von einer N-Glykosylierung zwischen diesen Banden schließen lässt,

ebenso wie in Spur 4, wo die beiden Banden Massen von 41,7 kDa und 38,6 kDa besitzen. Um die Massen der nicht glykosylierten Grundformen dieser beiden Konstrukte zu überprüfen, die auf dem Gel in Abb. 4-33C nicht zu erkennen sind, führte ich eine Deglykosylierung durch. Abb. 4-33D zeigt das Ergebnis. Es ist deutlich zu erkennen, dass das $^{NCAM-Ecto}rP2X_1^{52-299}$ -Konstrukt ein N-Glykan weniger besitzt als das $^{NCAM-Ecto}rP2X_1^{108-327}$ -Konstrukt. Ihm fehlt die Sequenz $^{300}NGT^{302}$, die einzige der vier benutzten N-Glykosylierungssequenzen, die eine Glykosylierung von Komplextyp erfährt (Nicke et al., 1998), (Rettinger et al., 2000a), (Roberts J.A. and Evans R.J., 2006). Bei beiden Konstrukten stimmten die Massen der vollständig deglykosylierten Proteine mit den theoretisch berechneten überein ($^{NCAM-Ecto}rP2X_1^{52-299}$: 29,7 kDa, Spur 3; $^{NCAM-Ecto}rP2X_1^{108-327}$: 26,9 kDa, Spur 6). Allerdings war nur bei der Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit eine EndoH-Resistenz und damit eine Komplextyp-Glykosylierung zu sehen (Spur 11). Alle anderen Konstrukte waren vollständig EndoH-sensitiv, auch die, die die $^{300}NGT^{303}$ -Glykosylierungssequenz enthielten. Dies lässt auf eine ER-Retention der $^{NCAM-Ecto}$ Konstrukte schließen. Dieses Phänomen wurde in unserem Labor bereits zuvor beschrieben (C. Niculescu, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse).

Somit kann ich zusammenfassen, dass die $^{NCAM-Ecto}$ Konstrukte in der richtigen Größe synthetisiert wurden. Das NCAM-Signalpeptid leitete die Konstrukte in das ER, wo sie glykosyliert wurden, und wurde selbst höchstwahrscheinlich wieder abgespalten (C. Niculescu, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Konstrukte waren dazu in der Lage, partiell zu assemblieren, lagen aber in diversen oligomeren Zuständen vor, nicht als definierte Trimere. Somit enthält die Ektodomäne der P2X-Untereinheiten anscheinend wichtige Assemblierungsinformationen, die sie trotz der fehlenden Membrananker zu einer partiellen Assemblierung befähigen. Allerdings fand vermutlich kein ER-Export statt, da, wie durch die fehlende Komplex-Glykosylierung gezeigt werden konnte, die Proteine im ER verblieben.

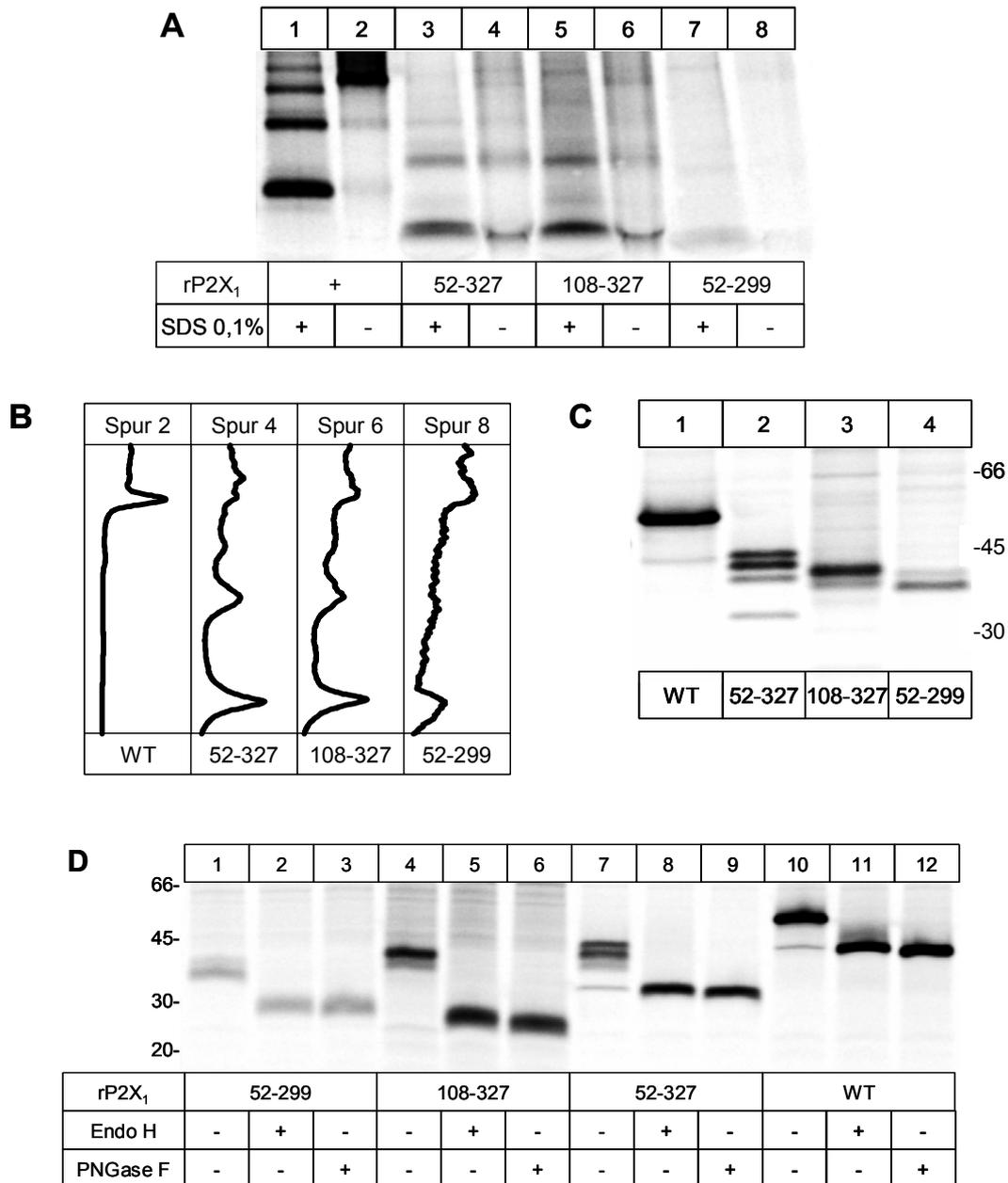


Abb. 4-33 Assemblierung von rP2X₁-Ektodomänen-Konstrukten. **A**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit den angezeigten rP2X₁-Ektodomänen-Konstrukten, die direkt nach dem Übernachts-[³⁵S]-Methionin-pulse aufgereinigt wurden. Die Proben wurden nativ und im partiell durch SDS denaturierten Zustand aufgetragen. **B**, Quantitative Profile der nativen PAGE-Gel-Spuren aus **A**. **C**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen Tricin-SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) mit den Proben aus **A**. **D**, PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen Tricin-SDS-PAGE-Gels (8% Acrylamid) der mit EndoH bzw. mit PNGase F deglykosylierten Proben aus **A**.

4.2.5 Die Ektodomänen-Konstrukte bilden SDS-resistente, DTT-sensitive Oligomere

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse für die $^{NCAM-Ecto}rP2X_1$ -Konstrukte auch auf andere P2X-Isoformen übertragbar sind, wurde als Nächstes ein $^{NCAM-Ecto}rP2X_2^{52-276}$ -Konstrukt generiert, das die gesamte Ektodomäne der $rP2X_2$ -Untereinheit umfasste. Die Analyse dieses Konstruktes durch Blaue-Native-PAGE nach Expression in *X. laevis*-Oozyten zeigte, dass das Assemblierungsverhalten mit diversen oligomeren Zuständen mit prominenten Dimeren und Monomeren dem des $^{NCAM-Ecto}rP2X_1^{52-327}$ -Konstruktes entsprach (Abb. 4-34A,B, Spuren 1 und 5). Bei den Denaturierungen war auffällig, dass weder durch SDS allein noch durch DTT allein eine vollständige Dissoziation der Polypeptide erreicht wurde, eine Kombination beider Reagenzien aber in einer fast vollständigen Dissoziation zum Monomer resultierte (Abb. 4-34A, Spuren 3 und 7). Auch in der Abb. 4-35A ist dieses Verhalten deutlich zu sehen. Dies spricht dafür, dass die Untereinheiten sowohl durch Disulfidbrücken als auch durch nicht kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind. Nur eine Zerstörung beider Interaktionen kann eine vollständige Dissoziation bewirken.

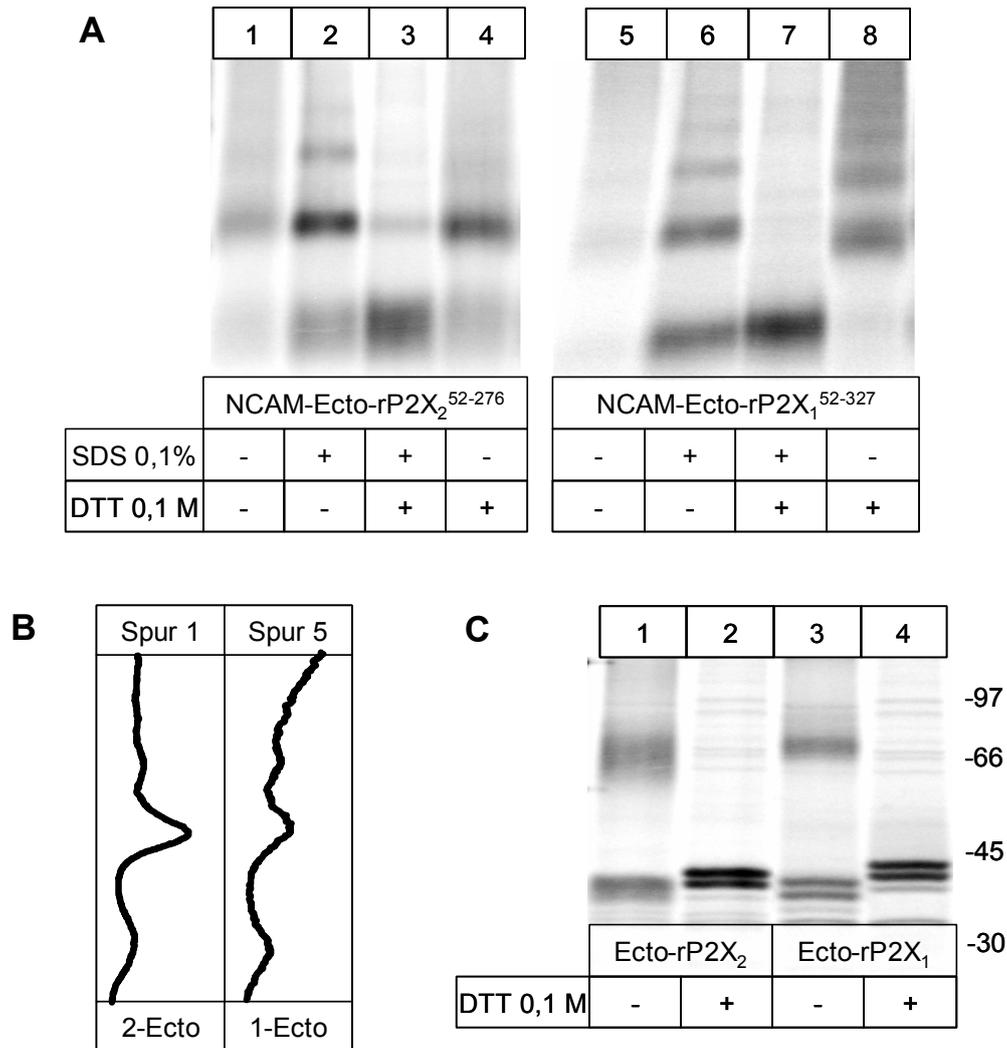


Abb. 4-34 Assemblierung von Ektodomänen-Konstrukten. **A**, PhosphorImager Scans von Blauen-Nativen-PAGE-Gelen mit rP2X₁- und rP2X₂-Ektodomänen-Konstrukten, die direkt nach dem Übernacht-[³⁵S]-Methionin-pulse aufgereinigt wurden. Die Proben wurden nativ und im partiell durch SDS und/oder DTT denaturieren Zustand aufgetragen. **B**, Quantitative Profile der nativen PAGE-Gel-Spuren aus A. **C**, PhosphorImager Scan eines diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (4-10% Acrylamid) mit den Proben aus A im nicht reduzierten (-DTT) und reduzierten (+DTT) Zustand.

Eine Analyse der beiden Konstrukte auf einem SDS-PAGE-Gel unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zeigte eine deutliche Ausbildung von SDS-resistenten Dimeren, die durch die Zugabe von DTT dissoziierten (Abb. 4-34C). Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Polypeptiden. Somit ist denkbar, dass neben den nicht kovalenten Wechselwirkungen, die wahrscheinlich über Assemblierungsdomänen in der Ektodomäne vermittelt werden, auch Disulfidbrücken zu der Entstehung der oligomeren Zustände der Ektodomänen-Konstrukte beitragen.

4.2.6 Das Einfügen der zweiten Transmembranregion bringt keine verbesserte Trimerisierung des ^{NCAM-Ecto}rP2X₁⁵²⁻³²⁷-Konstruktes

Da ich aus früheren Versuchen wusste, dass die zweite Transmembranregion als Strukturelement einen großen Einfluss auf die Faltung und Stabilität von P2X-Untereinheiten hat, wurde nun versucht, durch das schrittweise Einfügen von Teilen der zweiten Transmembranregion die Trimerisierung des ^{NCAM-Ecto}rP2X₁⁵²⁻³²⁷-Konstruktes zu verbessern. Das Ziel war immer noch das Erzeugen einer trimerisierenden Teilstruktur der rP2X₁-Untereinheit, die möglichst wenige hydrophobe Anteile enthält, um eine Kristallisierung zu ermöglichen.

Die Abb. 4-35 zeigt ein Blaue-Native-PAGE-Gel (A) und die quantitativen Profile der untersuchten Konstrukte (B). Es ist zu sehen, dass keines der Konstrukte eine signifikant bessere Trimerisierung aufwies als das ^{NCAM-Ecto}rP2X₁⁵²⁻³²⁷-Konstrukt. Alle assemblierten in diversen oligomeren Zuständen, auch das ^{NCAM-Ecto}rP2X₁⁵²⁻³⁶⁷-Konstrukt, das bereits acht C-terminale zytosolische Aminosäuren enthielt. Auffällig waren wieder die prominenten Dimerbanden (Spuren 1, 5, 9, 13, 14, 15 und 16). Auch das Verhalten bei der Behandlung mit denaturierenden Reagenzien war sehr gut zu erkennen. Die alleinige Behandlung mit SDS führte lediglich zu einer Auflösung der Aggregate mit einer Verstärkung der niedermolekularen Banden, ohne das Bandenmuster an sich zu verändern (Spuren 2, 6, 10 und 17). Ein ähnlicher, etwas schwächer ausgeprägter Effekt war bei der alleinigen Behandlung mit DTT zu beobachten (Spuren 4, 8, 12 und 19), während die kombinierte Behandlung mit SDS und DTT zu einer fast vollständigen Dissoziation der Oligomere in die Monomere führte (Spuren 3, 7, 11 und 18). Diese Ergebnisse zeigen wieder, dass die Multimere durch eine Kombination von nicht kovalenten Wechselwirkungen und kovalenten Disulfidbrücken zusammengehalten werden.

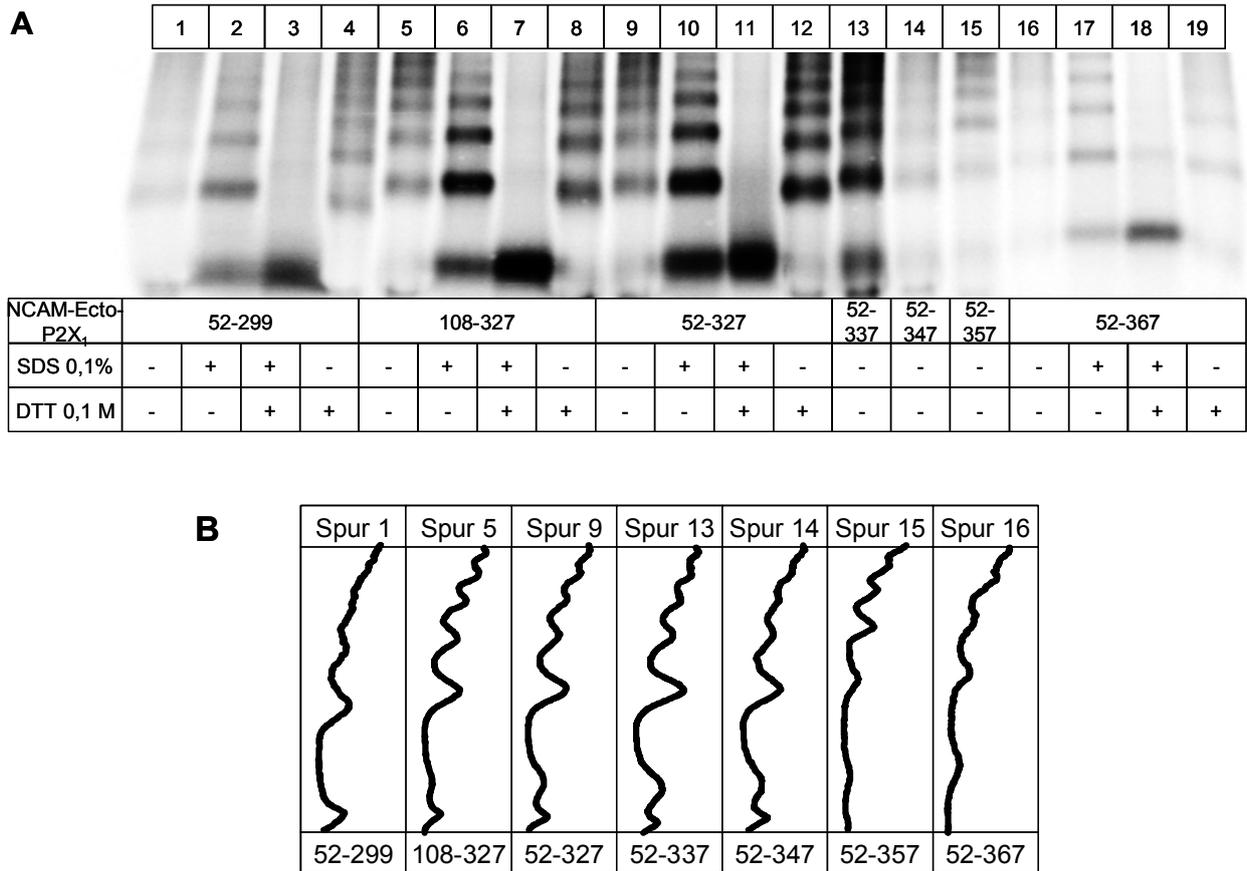


Abb. 4-35 Der Einfluss der TM2 auf die Assemblierung von rP2X₁-Ektodomänen-Konstrukten. **A**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit verschiedenen rP2X₁-Ektodomänen-Konstrukten sowie rP2X₁-Ektodomänen-Konstrukten, an deren C-terminales Ende schrittweise die TM2-Aminosäuren eingefügt wurden. Die Proben wurden direkt nach dem Übernachten-[³⁵S]-Methionin-*pulse* aufgereinigt und teilweise vor dem Auftragen wie angegeben mit SDS und/oder DTT partiell denaturiert. **B**, Quantitative Profile der nativen PAGE-Gel-Spuren aus A.

Abschließend kann also festgehalten werden, dass das alleinige Vorhandensein der zweiten Transmembranregion nicht genügte, um die Assemblierung der Ektodomänen-Konstrukte zu verbessern. Es scheinen beide Transmembranregionen notwendig zu sein, damit eine effiziente Trimerisierung stattfinden kann.

4.2.7 Koexprimierte, sich überlappende Teilstrukturen der rP2X₁-Untereinheit trimerisieren besser als die Teilstrukturen allein

Als Nächstes untersuchte ich, ob es möglich ist, bei einer Koexpression des ^{NCAM-Ecto}rP2X₁⁵²⁻³⁶⁷-Konstruktes, das die gesamte zweite Transmembranregion enthält, mit einer Teilstruktur der rP2X₁-Untereinheit, die die erste Transmembranregion beinhaltet, eine Interaktion zwischen den beiden Konstrukten zu beobachten. So wurde in Versuchen mit anderen

Proteinen unter anderem gezeigt, dass die Koexpression von zwei nicht überlappenden, sich ergänzenden Teilstücken der *E. coli* LacY-Permease, eines Laktose-Transporters, in der Expression eines funktionellen Proteins resultierte (Wrubel et al., 1990). Auch bei Bakteriorhodopsin, einem Protonen-Transporter, ließen sich durch die Koexpression von sowohl überlappenden als auch nicht überlappenden, komplementären Teilstücken funktionsfähige Transporter bilden (Liao et al., 1983), (Liao et al., 1984). Um dies für die P2X₁-Untereinheit zu untersuchen, wurden ein rP2X₁¹⁻¹¹⁶- und ein rP2X₁¹⁻¹³¹-Konstrukt generiert, so dass jeweils zwei sich mit dem ^{NCAM-Ecto}rP2X₁⁵²⁻³⁶⁷-Konstrukt überlappende Teilstrukturen entstanden. Nach der Koexpression dieser Konstrukte in Oozyten war auf dem Blaue-Native-PAGE-Gel eine deutliche Trimerbildung zu erkennen (Abb. 4-36A,B, Spuren 3 und 5). Das SDS-PAGE-Gel bewies, dass alle Teilstrukturen exprimiert worden waren und unter reduzierenden Bedingungen als Monomere vorlagen (Abb. 4-36C, Spuren 2 und 3).

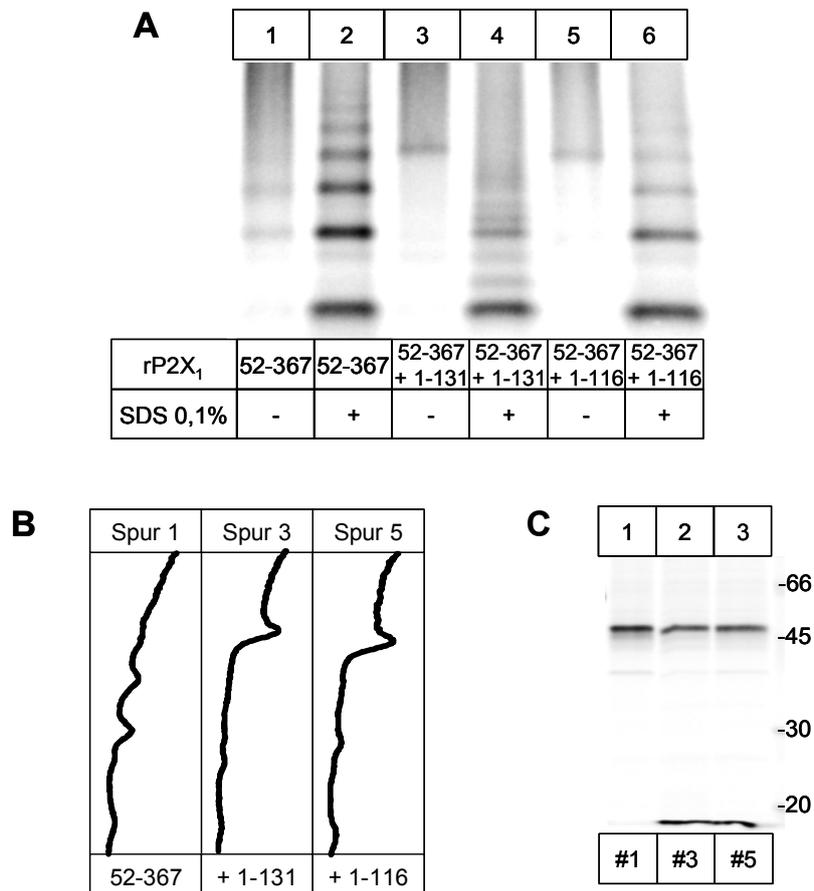


Abb. 4-36 Koexpression eines rP2X₁-Konstruktes aus Ektodomäne und TM2 (Aminosäuren 52-367) mit dem TM1-einschließenden N-terminalen Drittel der rP2X₁-Untereinheit (Aminosäuren 1-116 bzw. 1-131). **A**, Phosphorimager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit der Koexpression der angezeigten rP2X₁-Konstrukte; die Zahlen beziehen sich auf die entsprechenden Aminosäuren der WT-rP2X₁-Untereinheit. Die Proben wurden in nativer und partiell durch SDS denaturierter Form aufgetragen. **B**, Quantitative Profile der nativen PAGE-Gel-Spuren aus **A**. **C**, Phosphorimager Scan eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (10% Acrylamid) mit den Proben aus **A**.

Abb. 4-37A zeigt, dass das rP2X₁¹⁻¹¹⁶- und das rP2X₁¹⁻¹³¹-Konstrukt alleine nicht assemblierten (Spuren 5 und 7), während auch in diesem Experiment bei der Koexpression der Teilstrukturen wieder eine signifikante Trimerisierung zu beobachten war (Spuren 9 und 10). Funktionell waren diese durch Koexpression entstandenen Konstrukte allerdings nicht, was daran liegen könnte, dass sich die Teilstrukturen stark überlappen. Auf diese Weise könnte die ATP-Bindungsstelle oder das Gating sterisch behindert werden.

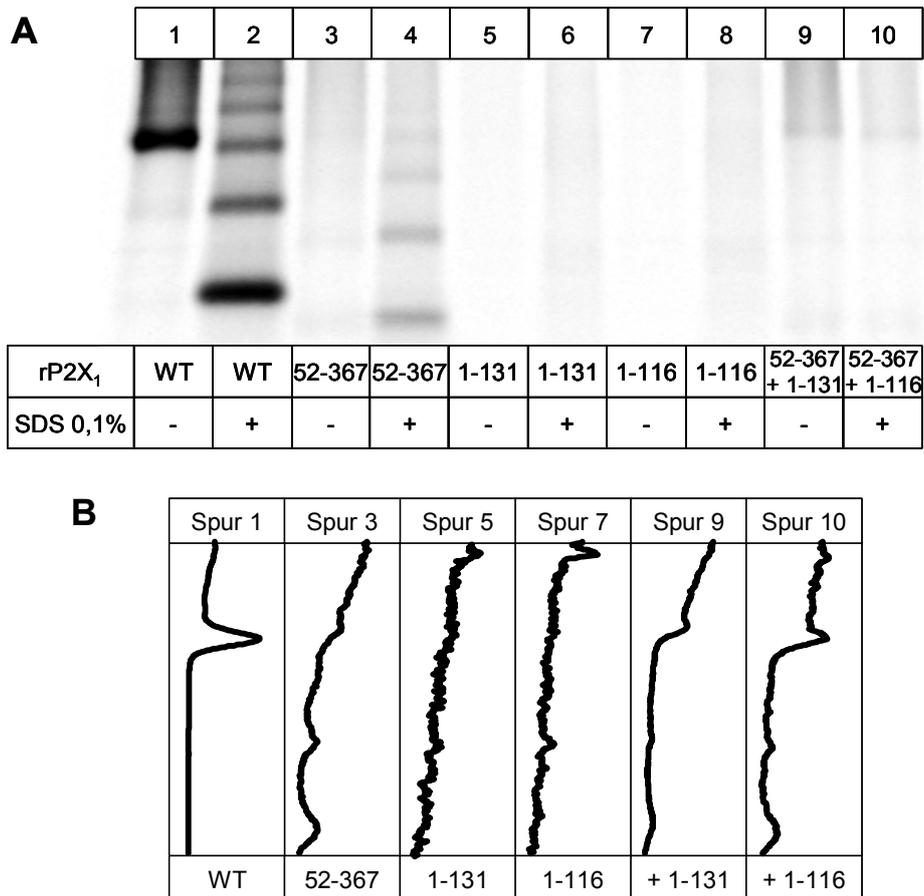


Abb. 4-37 Koexpression eines rP2X₁-Konstruktes aus Ektodomäne und TM2 (Aminosäuren 52-367) mit dem TM1- einschließenden N-terminalen Drittel der rP2X₁-Untereinheit (Aminosäuren 1-116 bzw. 1-131). **A**, PhosphorImager Scan eines Native-PAGE-Gels mit der Koexpression der angezeigten rP2X₁-Konstrukte; die Zahlen beziehen sich auf die entsprechenden Aminosäuren der WT-rP2X₁-Untereinheit. Die Proben wurden in nativer und partiell durch SDS denaturierter Form aufgetragen. **B**, Quantitative Profile der nativen PAGE-Gel-Spuren aus A.

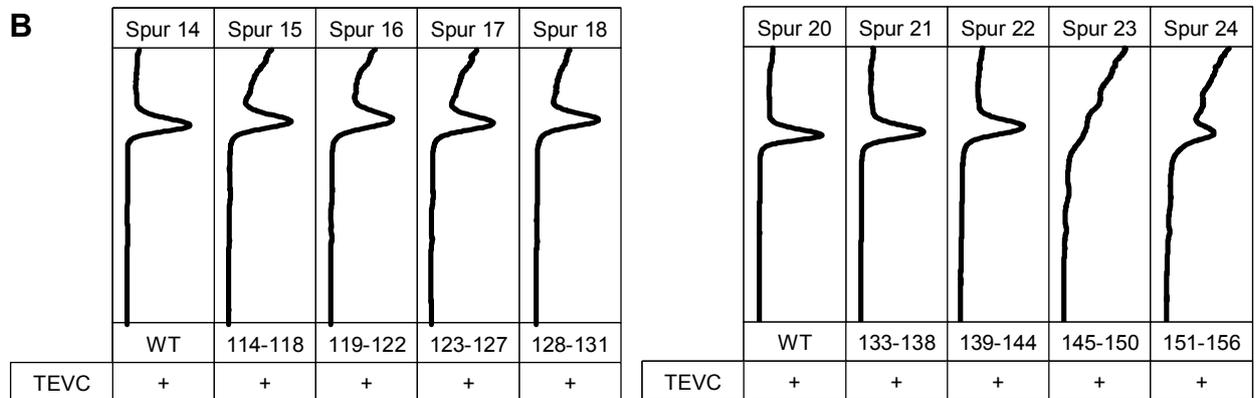
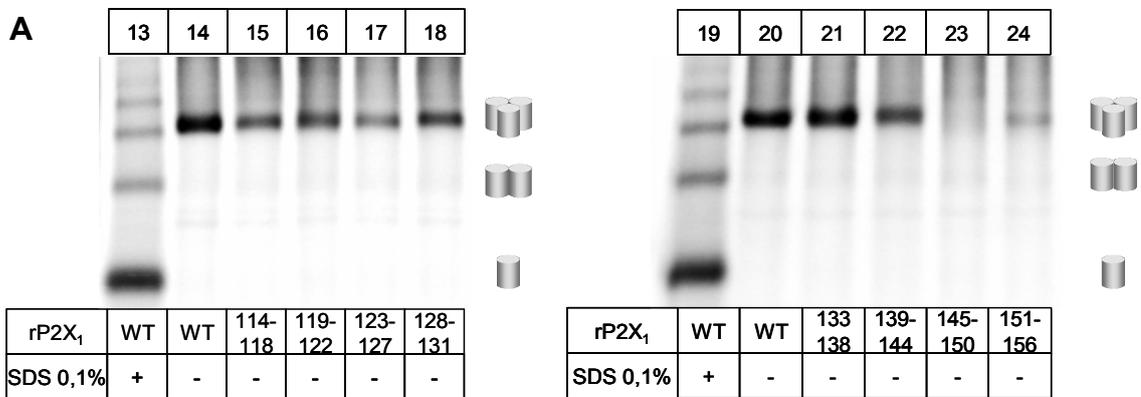
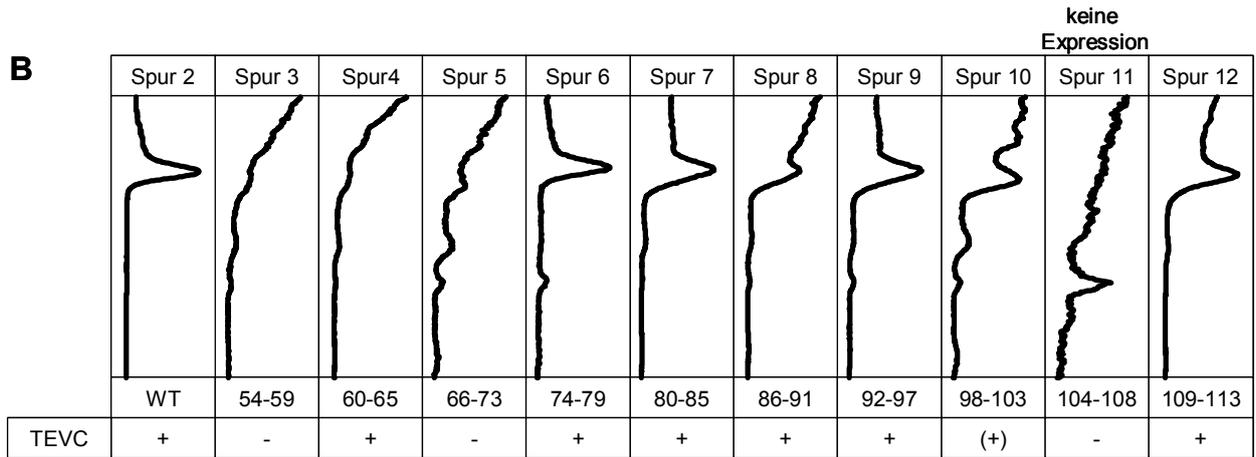
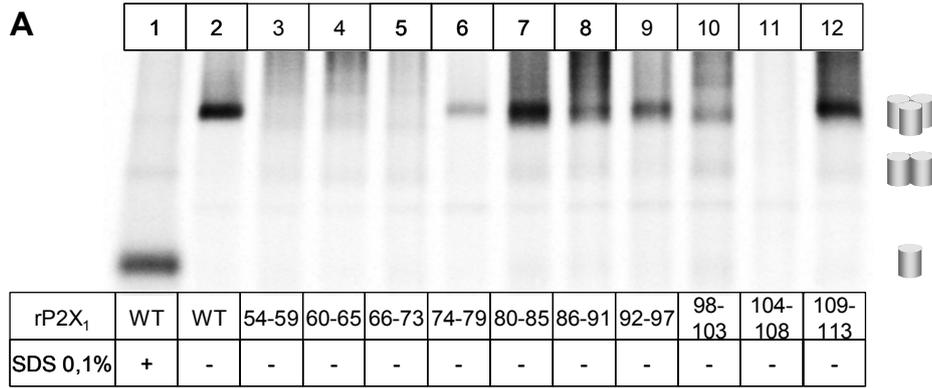
Die Tatsache, dass die Teilstrukturen aber zumindest teilweise zu Trimeren assemblieren können, spricht für eine starke Interaktion zwischen den Teilstrukturen, die nach den bisherigen Erkenntnissen aller Wahrscheinlichkeit nach in der Ektodomäne stattfindet, aber auch zwischen den Transmembranregionen möglich ist. Diese Interaktion zwischen den

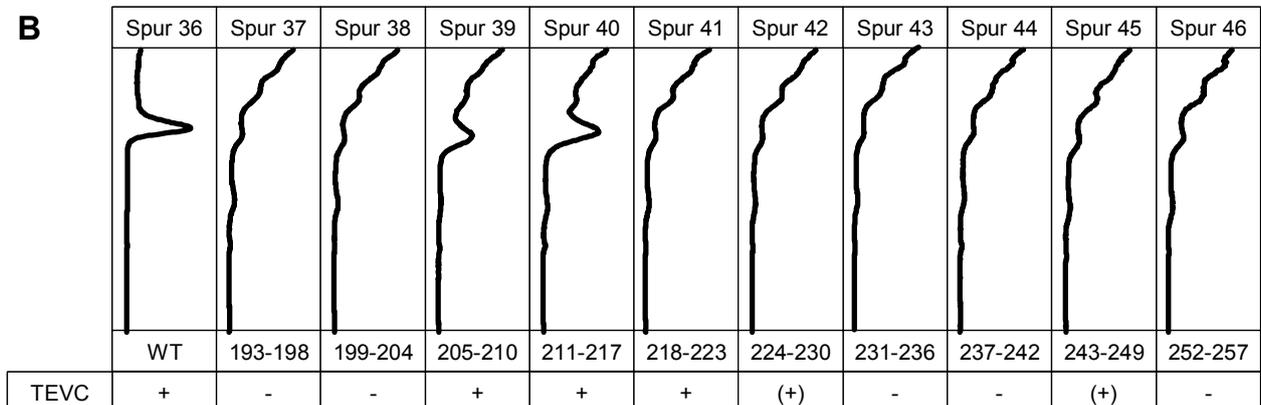
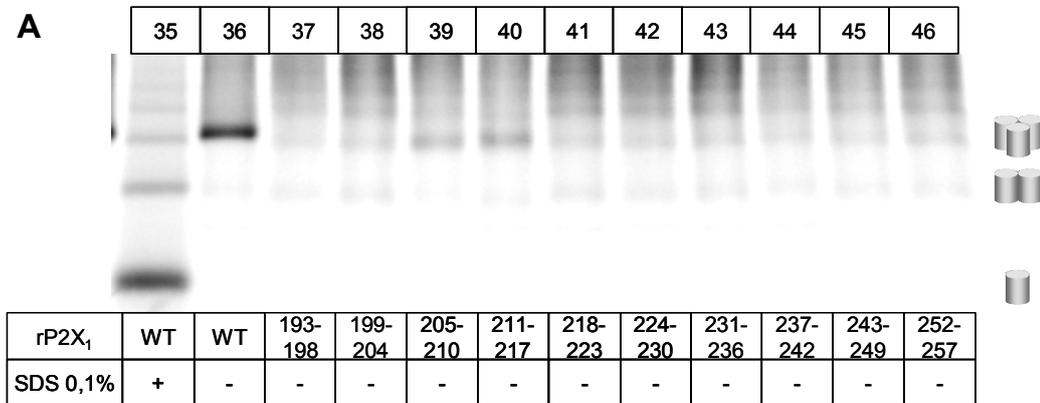
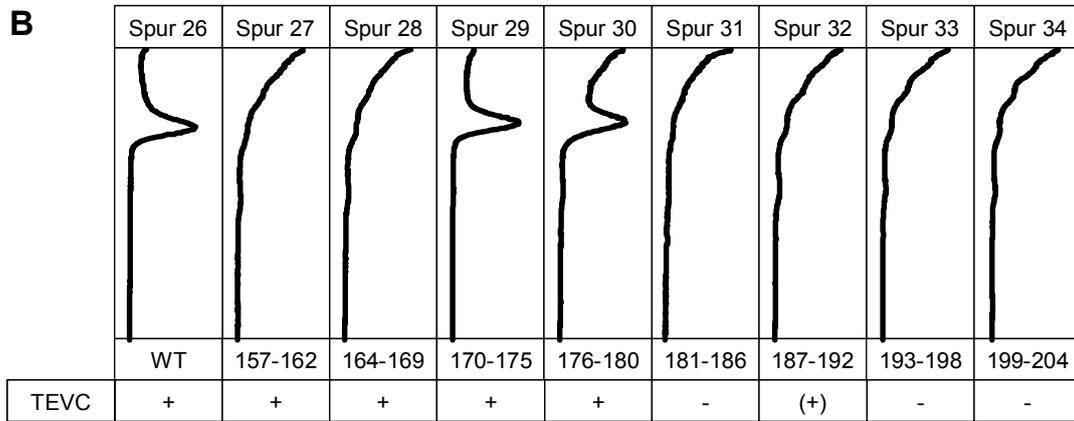
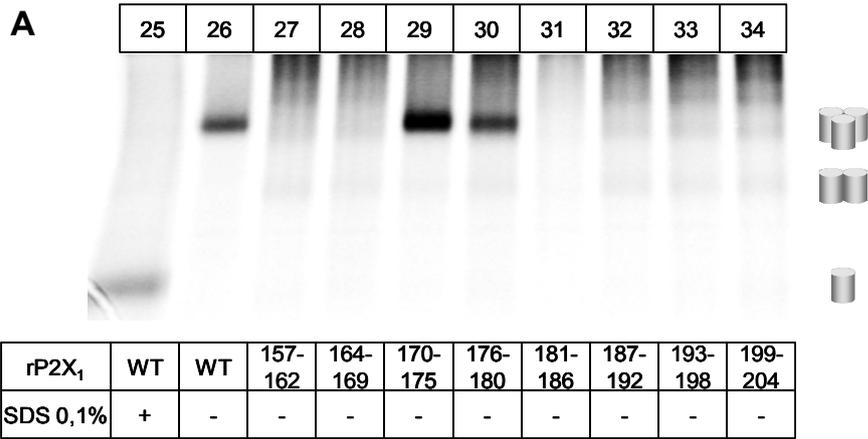
Teilstrukturen ist dazu in der Lage, die Fehlfaltung, die sonst ohne das Vorhandensein beider Transmembranregionen auftritt, teilweise zu unterbinden und so eine Trimerisierung zu ermöglichen.

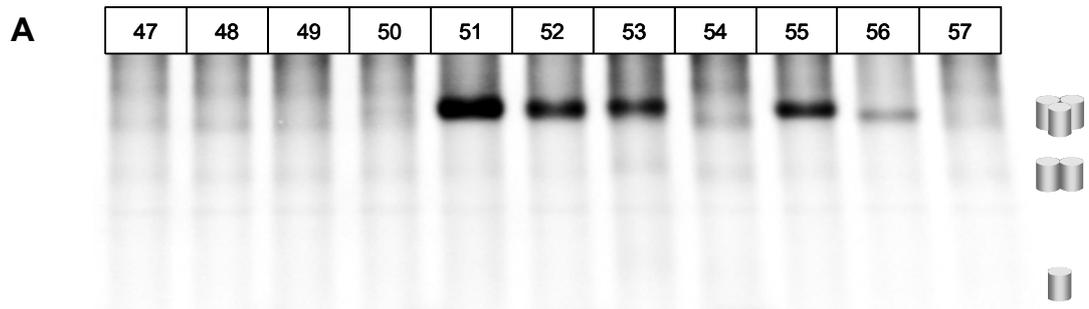
4.2.8 Die gesamte Ektodomäne der rP2X₁-Untereinheit enthält wichtige Assemblierungsinformationen

Da in den bisherigen Experimenten vieles darauf hingewiesen hatte, dass in der Ektodomäne sowohl von rP2X₁- als auch von hP2X₅-Untereinheiten (s. 4.1.6) und damit wahrscheinlich auch von anderen Isoformen wichtige Assemblierungsinformationen enthalten sind, wurde von Peter Minko und mir ein systematisches Alanin-Scanning durchgeführt, um diese Region zu untersuchen. Hierfür wurden jeweils vier bis sechs aufeinanderfolgende Aminosäuren zu Alanin mutiert, wobei die, wie bereits erwähnt, strukturell wichtigen Cysteine unverändert gelassen wurden ebenso wie die meisten Glycine, da diese keine Seitenkette besitzen, deren Funktion durch die Mutation zu Alanin zerstört werden könnte. Zudem geben Glycine einem Protein auch eine gewisse Flexibilität, die für die korrekte Faltung von Bedeutung sein könnte. Außerdem wurden die beiden Lysine in den Positionen 68 und 70 nicht substituiert, da diese eventuell eine Rolle bei der ATP-Bindung spielen (Jiang et al., 2000b), (Roberts and Evans, 2004). Für die Scanning-Mutationen wählte ich wie auch in den meisten vorangegangenen Versuchen die Aminosäure Alanin, da dies eine bewährte Methode zur Analyse der Funktion einzelner Aminosäuren-Seitenketten innerhalb eines Proteins ist. Die Substitution durch Alanin verkürzt die Seitenkette bis auf eine Methylgruppe, so dass große Reste und funktionelle Gruppen verschwinden. Dies ist der sogenannte „Rasureffekt“ (Jin and Wells, 1994), der schon früher zur Untersuchung diverser Ionenkanäle genutzt worden ist, zum Beispiel von Na⁺-Kanälen (McPhee et al., 1994), (McCormick et al., 1998), K⁺-Kanälen (Swartz and Mackinnon, 1997), (Collins et al., 1997), Ca⁺-Kanälen (Kraus et al., 1998), 5-HT₃-Rezeptoren (Yan et al., 1999), Glycin-Rezeptoren (Schofield et al., 2004) und auch P2X-Untereinheiten (Li et al., 2004).

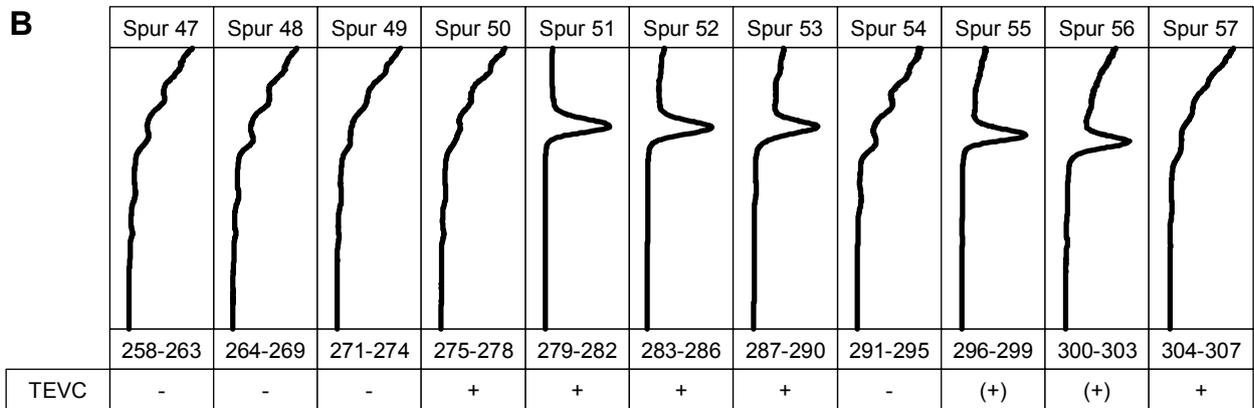
Die Analyse der so erhaltenen fünfzig Konstrukte durch Blaue-Native-PAGE nach Expression in *X. laevis*-Oozyten ergab ein sehr vielschichtiges Bild für die Ektodomäne. Die Abb. 4-38 zeigt die Blaue-Native-PAGE-Gele (A) sowie die quantitativen Profile der Gelspuren (B).







rP2X ₁	258-263	264-269	271-274	275-278	279-282	283-286	287-290	291-295	296-299	300-303	304-307
SDS 0,1%	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



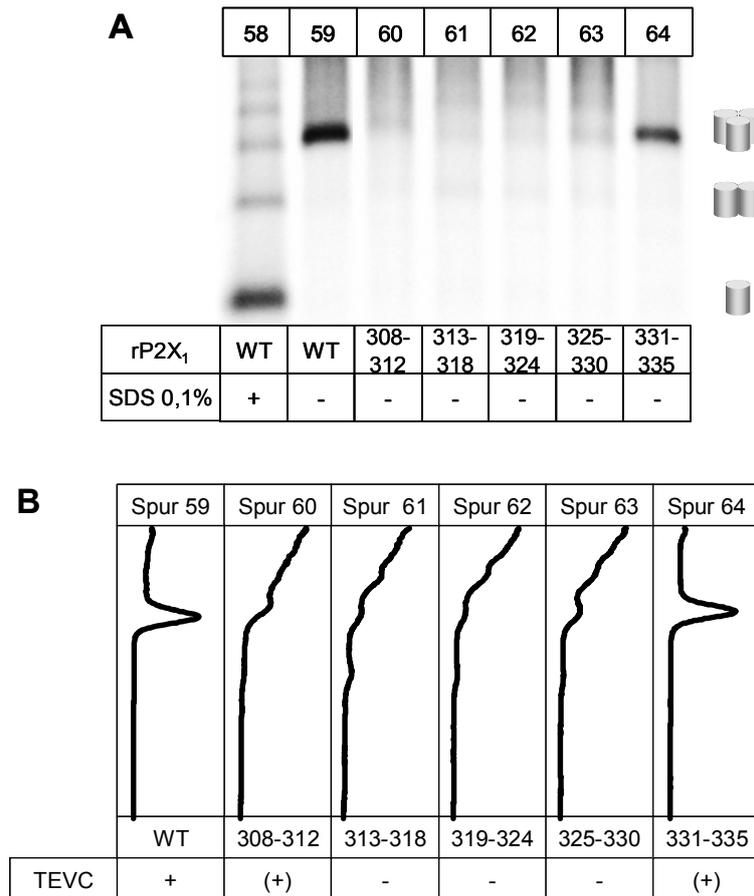


Abb. 4-38 Alanin-Scanning der Ektodomäne des rP2X₁-Rezeptors. **A**, PhosphorImager Scans von Blaue-Native-PAGE-Gelen mit den angezeigten Alanin-Mutanten im nativen Zustand sowie dem WT-rP2X₁-Rezeptor im nativen und im partiell mit SDS denaturierten Zustand. **B**, Quantitative Profile der angezeigten nativen PAGE-Gel-Spuren aus A. Zusätzlich ist angegeben, ob die Konstrukte in TEVC-Messungen funktionell (+), nur schwach ((+)) oder nicht funktionell (-) waren.

In Abb. 4-39 ist ein Cartoon dargestellt, in dem die Lage der nicht assemblierenden Mutanten in der Ektodomäne deutlich wird. Dabei fallen vor allem vier große, zusammenhängende Regionen auf, in denen keine signifikante Trimerisierung stattfand: Aminosäuren 54-73, 181-204, 218-278 und 304-330. Es gab auch einige Mutanten, die zwar assemblierten, aber in einem wesentlich geringeren Ausmaß als die Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit, so zum Beispiel die Konstrukte ⁹⁸⁻¹⁰³A-rP2X₁ (Abb. 4-38A,B, Spur 10), ¹⁵¹⁻¹⁵⁶A-rP2X₁ (Spur 24), ²⁰⁵⁻²¹⁰A-rP2X₁ (Spur 39) oder ²²¹⁻²¹⁷A-rP2X₁ (Spur 40). Die Grenzen zwischen keiner Assemblierung und nur geringer Assemblierung waren nicht immer leicht zu erkennen. Eines der Konstrukte, ¹⁰⁴⁻¹⁰⁸A-rP2X₁, wurde gar nicht exprimiert (Abb. 4-38A, Spur 11), was auch durch SDS-PAGE und in wiederholten Experimenten bestätigt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).

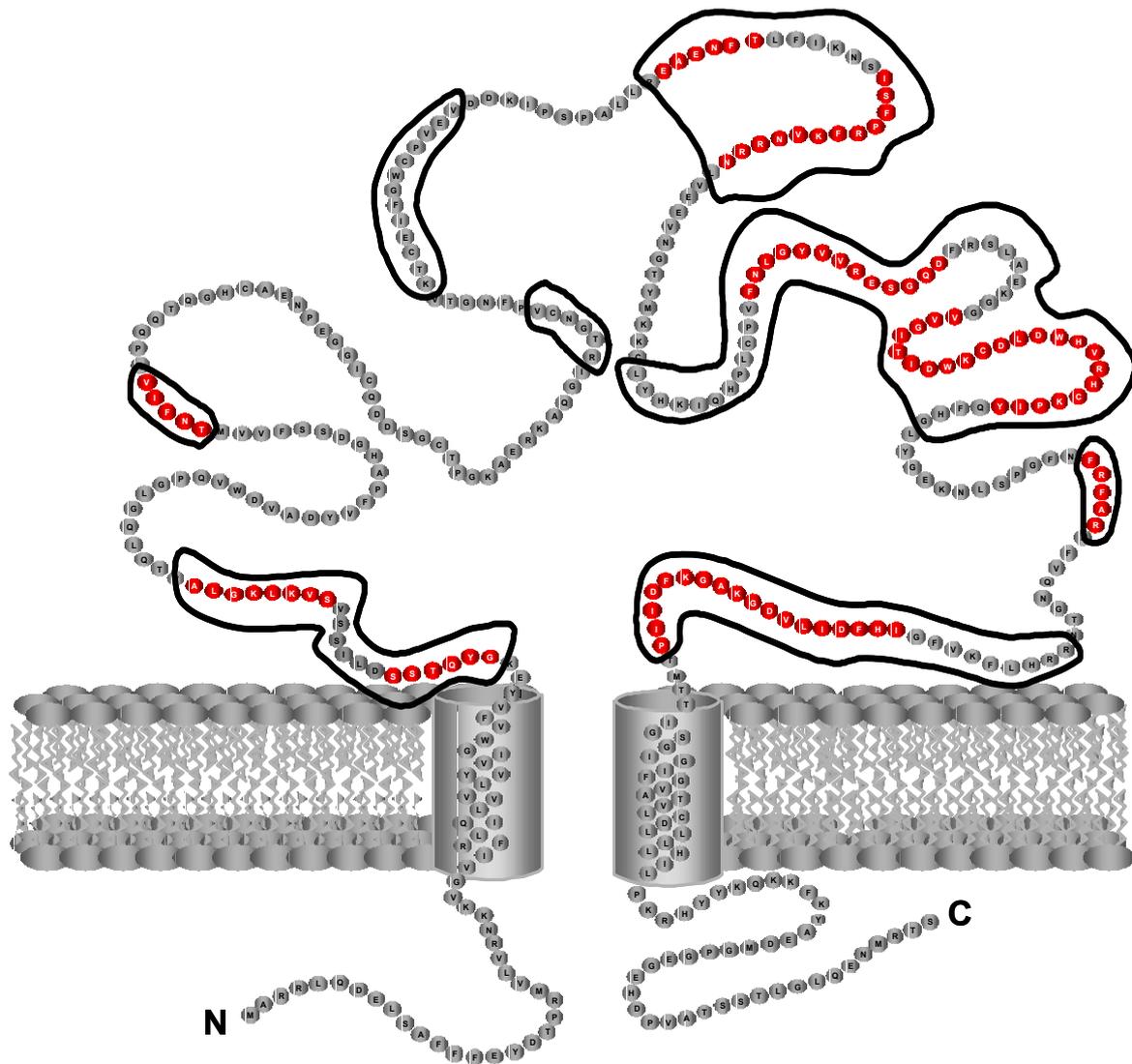


Abb. 4-39 Zusammenfassung der Ergebnisse des Alanin-Scannings der Ektodomäne des rP2X₁-Rezeptors. Topologiemodell der rP2X₁-Untereinheit mit der linearen Aminosäuresequenz im 1-Buchstaben-Code. Aminosäuren, deren blockweiser Austausch gegen Alanin zu nicht funktionellen Konstrukten führten, sind rot hervorgehoben, Aminosäuren, deren blockweiser Austausch gegen Alanin zu nicht assemblierenden Polypeptiden führte, sind schwarz umrandet.

Die Region direkt vor der zweiten Transmembranregion war schon zuvor bei der hP2X₅-Untereinheit aufgefallen, bei der die Mutation der Aminosäuren ³²²DVMVN³²⁶ und ³²⁷KAGKF³³¹ die Assemblierung zerstörten (Abb. 4-7B, Spuren 3, 5 und 9). Eine Untersuchung der Oberflächenexpression der ³²⁷⁻³³¹A-hP2X₅-Untereinheit hatte allerdings ergeben, dass der Anteil des Proteins, der zur Zellmembran exportiert wird, als Trimer vorliegt (Abb. 4-8, Spur 2). Wahrscheinlich ist dieser Anteil an Protein im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge so gering, dass die Trimere neben den Aggregaten nicht zu erkennen sind. Somit wäre es sinnvoll, auch die augenscheinlich nicht assemblierenden Mutanten der

rP2X₁-Untereinheit hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression und des Assemblierungszustandes an der Oberfläche zu untersuchen. So ließe sich ausschließen, dass nicht geringe Mengen der Untereinheiten doch trimerisieren können. Andererseits ist auch eine verminderte Assemblierung bereits von Interesse. Die Ergebnisse des Alanin-Scannings der Ektodomäne lassen darauf schließen, dass es mehrere Regionen gibt, die zu der Trimerisierung von rP2X₁-Untereinheiten beitragen. Die Mutation einer Assemblierungsdomäne müsste demnach eine Trimerisierung nicht unbedingt vollständig unmöglich machen, sondern könnte die Interaktion lediglich schwächen, wie dies auch bei der ³⁵⁵L-hP2X₅-Untereinheit der Fall ist. Neben der Untersuchung der Oberflächenexpression wäre ebenfalls die Erzeugung weiterer Mutanten in den auffälligen Bereichen bis hin zu Einzelmutationen von Interesse. So könnte man eventuell bestimmte funktionelle Seitenketten identifizieren, die für die Interaktion zwischen den Untereinheiten verantwortlich sind: In den Mutanten waren jeweils vier bis sechs Aminosäuren substituiert worden, von denen aber eventuell nicht alle von Bedeutung sind. So konnte bei der ³²⁷⁻³³¹A-hP2X₅-Untereinheit die Mutation der Aminosäuren ³³⁰KF³³¹ für die reduzierte Assemblierung verantwortlich gemacht werden (Abb. 4-9A,B). Und in der ⁵⁴⁻⁵⁹A-rP2X₁-Untereinheit konnte der Einfluss auf die Trimerisierung auf ⁵⁵YQ⁵⁶ reduziert werden (P. Minko, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse), zwei Aminosäuren, die auch bei der Assemblierung der hP2X₅-Untereinheit eine Rolle spielen (Ergebnisse nicht gezeigt). Außerdem könnte man so einen Teil der Mutationen erkennen, die lediglich eine Strukturveränderung eines Proteinbereiches bewirken und so den Kontakt zwischen Assemblierungsdomänen verhindern, ohne selbst direkt zu einer Interaktion beizutragen.

Auch bei den Funktionsmessungen dieser Mutanten durch Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ergab sich ein sehr heterogenes Bild der Ektodomäne. In der Abb. 4-38B ist unter den Profilen jeweils angegeben, ob die Konstrukte in den elektrophysiologischen Experimenten funktionell waren. Nicht funktionelle Mutanten sind zusätzlich in Abb. 4-39 rot eingefärbt, um deren Lage in der Ektodomäne und im Verhältnis zu den nicht assemblierenden Mutanten darzustellen. Die Stromkurven der verschiedenen Konstrukte unterschieden sich nicht nur in der Amplitude, sondern auch in dem Verlauf der ATP-Konzentrations-Stromkurven und in dem Desensibilisierungsverhalten (C. Rosefort, R. Hausmann, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse). Es fiel auf, dass immer wieder eine Diskrepanz zwischen der Assemblierung und der Funktion auftrat. So waren zum Beispiel die Konstrukte mit den substituierten Aminosäuren 60-65 (Abb. 4-38A,B, Spur 4), 145-150 (Spur 23) oder 157-162 (Spur 62) funktionell, obwohl sie auf dem Blaue-Native-PAGE-Gel nicht assembliert aussahen. Dies könnte an der oben beschriebenen schwachen Expression trimerer

Rezeptoren an der Plasmamembran liegen, die im Verhältnis zum Gesamtprotein nicht zu erkennen ist, für die Entstehung messbarer Ströme jedoch ausreicht. Dies müsste untersucht werden. Das Auftreten gut assemblierender, aber nur schwach funktioneller Mutanten, wie zum Beispiel bei den Mutationen der Aminosäuren 296-299 (Abb. 4-38A,B, Spur 55) oder 331-335 (Abb. 4-38A,B, Spur 64), kann unterschiedliche Gründe haben. So könnten etwa die ATP-Bindung, das Gating oder der Transport zur Plasmamembran gestört sein. Auch dies müsste durch weitere gezielte Mutationen und die Untersuchung der Oberflächenexpression geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich nach dem Alanin-Scanning der Ektodomäne der rP2X₁-Untereinheit sagen, dass wahrscheinlich der wichtigste Anteil an spezifischen Interaktionen zwischen den Untereinheiten eines funktionellen trimeren P2X₁-Rezeptorproteins innerhalb der Ektodomäne stattfindet. Weitere Mutanten und Experimente müssten nun die genauen Kontaktpunkte und die Art der Wechselwirkungen identifizieren.

4.3 Assemblierung von Chimären zwischen rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten

4.3.1 rP2X₆-Untereinheiten können keine funktionellen Homotrimere ausbilden

Aus der Literatur und früheren Studien in unserem Labor war mir bekannt, dass rP2X₆- und auch hP2X₆-Untereinheiten als einzige P2X-Isoformen keine funktionellen homomeren Rezeptoren ausbilden können. Dies war in verschiedenen Expressionssystemen untersucht worden (King et al., 2000), (Le et al., 1998), (Soto et al., 1996). Nur zwei Studien zeigten eine geringe Funktion in 5% der transfizierten HEK-293-Zellen (Collo et al., 1996), (Jones et al., 2004). Auch unsere eigenen Messungen in Oozyten von sowohl rP2X₆- als auch hP2X₆-Untereinheiten ergaben keine Ausbildung funktioneller Rezeptoren.

Auch die Untersuchung des Assemblierungszustandes der P2X₆-Untereinheiten führte zu signifikant anderen Ergebnissen als bei anderen P2X-Isoformen. Die Analyse von in Oozyten exprimierten rP2X₆- und hP2X₆-Untereinheiten durch Blaue-Native-PAGE zeigte, dass in Oozyten exprimierte rP2X₆- und hP2X₆-Untereinheiten in diversen oligomeren Zuständen und als Aggregate vorlagen, wobei bei der hP2X₆-Untereinheit ein Tetramer als prominenteste Bande auffiel (Abb. 4-40A,B, Spur 7, (Aschrafi et al., 2004), C. Niculescu, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch in HEK-293-Zellen wurde bei hP2X₆-Untereinheiten ein ähnliches Assemblierungsmuster mit diversen oligomeren Zuständen beobachtet (C. Niculescu, G. Schmalzing unveröffentlichte Ergebnisse). Im Gegensatz zu diesen Studien

hatte eine Untersuchung von rP2X₆-Untereinheiten in HEK-293-Zellen durch Kraftfeld-Mikroskopie ergeben, dass diese als Monomere vorlagen, während für die rP2X₂-Untereinheit ein trimerer Zustand gezeigt werden konnte (Barrera et al., 2005). Auch wenn diese Studien unterschiedliche Ergebnisse erzielt hatten, war doch beiden gemeinsam, dass sie bei P2X₆-Untereinheiten ein auffälliges Assemblierungsverhalten beschrieben, das von der ansonsten für alle anderen P2X-Isoformen anerkannten Trimerisierung abweicht. Dieser Trimerisierungsdefekt könnte die fehlende Funktionalität erklären.

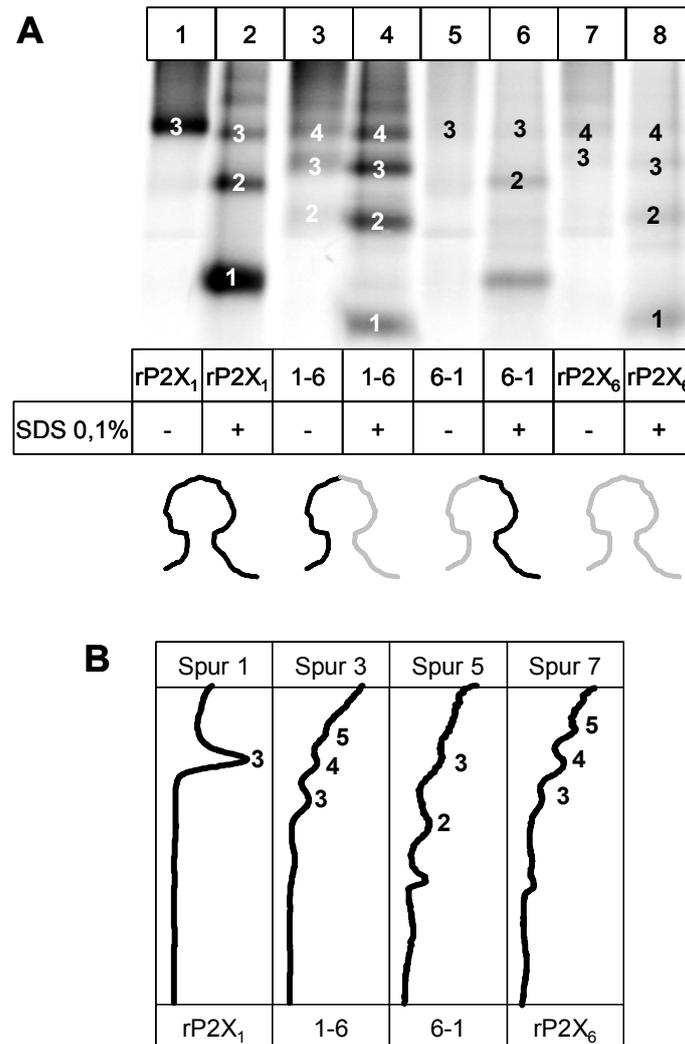


Abb. 4-40 Assemblierung von Chimären aus rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten. **A**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit rP2X₁- und rP2X₆-Rezeptoren sowie verschiedenen Chimären im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. Unter dem PhosphorImager Scan sind Modelle der einzelnen Untereinheiten bzw. Chimären dargestellt, die die Anteile an den verschiedenen Untereinheiten schematisch darstellen. Schwarz, rP2X₁-Anteil; grau, rP2X₆-Anteil. **B**, Quantitative Profile der nativen PAGE-Gel-Spuren aus A. Die Zahlen geben den Oligomerisierungszustand der Banden an

Allerdings haben weitere Studien auch gezeigt, dass P2X₆-Untereinheiten zwar nicht dazu in der Lage sind, homomere Rezeptorproteine auszubilden, mit anderen P2X-Isoformen aber heteromere funktionelle Ionenkanäle formen können. Dies ist für P2X₄₊₆- und P2X₂₊₆-Rezeptoren beschrieben worden (Egan et al., 2004), (King et al., 2000), (Le et al., 1998). P2X₄- und P2X₂-Untereinheiten weisen im Organismus auch oft sich überschneidende Lokalisationen auf (Rubio and Soto, 2001), (Glass et al., 2002), so dass diese Heteromere auch die physiologische Form der P2X₆-Untereinheiten darstellen könnten. Darüber hinaus hatte Torres (Torres et al., 1999a) in Immunpräzipitations-Versuchen beobachtet, dass P2X₆-Untereinheiten mit P2X₁-, P2X₂-, P2X₄- und P2X₅-Untereinheiten koassemblieren konnten, nicht aber mit sich selbst. Somit scheinen P2X₆-Untereinheiten dazu in der Lage zu sein, mit anderen P2X-Isoformen in trimere Strukturen zu assemblieren und funktionelle Ionenkanäle auszubilden. Eine Assemblierung in Homotrimere dagegen findet nicht statt. P2X₆-Untereinheiten besitzen wahrscheinlich Assemblierungsdomänen, die spezifisch nur mit anderen P2X-Isoformen interagieren können. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei Untereinheiten von Cys-Loop-Rezeptoren beschrieben. So können zum Beispiel die β -Untereinheiten von Glycin-Rezeptoren keine Homopentamere bilden und verbleiben im ER, während sie mit α -Untereinheiten koassemblieren und funktionelle heteropentamere Ionenkanäle ausbilden können (Griffon et al., 1999). Die α -Untereinheiten dagegen können in funktionelle Homopentamere assemblieren. Ebenso wurde für NMDA-Rezeptoren beschrieben, dass homomere Komplexe aus NR1-, NR2-, oder NR3-Untereinheiten keine funktionellen Ionenkanäle ergeben, während sie als Heteromere funktionell sind (McIlhinney and Molnar, 1996), (Perez-Otano et al., 2001).

4.3.2 rP2X₁-rP2X₆- und rP2X₆-rP2X₁-Chimären haben ein defektes Assemblierungsverhalten

Nun wollte ich herausfinden, wo sich die Assemblierungsdomänen in der rP2X₆-Untereinheit befinden. Dies war nicht nur speziell für die P2X₆-Untereinheiten von Interesse für mich, sondern auch im Hinblick auf die anderen Isoformen, da wegen der Homologie der Isoformen davon auszugehen ist, dass zumindest einige Kontaktpunkte in den verschiedenen P2X-Untereinheiten sehr ähnlich sind. Ich generierte Chimären, die aus Anteilen der rP2X₁- und der rP2X₆-Untereinheit bestehen. So hoffte ich, die Bereiche der rP2X₆-Untereinheit identifizieren zu können, die für die fehlende Homotrimerisierung verantwortlich sind. Die ersten beiden Chimären waren eine P2X₁-P2X₆-Chimäre, bestehend aus den Aminosäuren 1-161 der P2X₁- und 166-379 der P2X₆-Untereinheit, und eine P2X₆-P2X₁-Chimäre, bestehend aus den Aminosäuren 1-165 der P2X₆- und 162-399 der P2X₁-Untereinheit (Nummerierung

bezogen auf die jeweilige Wildtyp-Untereinheit). Die Analyse dieser Konstrukte auf einem Blaue-Native-PAGE-Gel zeigte, dass beide ein ähnliches Assemblierungsmuster besaßen wie die Wildtyp-rP2X₆-Untereinheit (Abb. 4-40A,B, Spuren 3, 5 und 7), während die Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit trimerisierte (Spur 1). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass beide Hälften der P2X-Untereinheiten zu der Assemblierung beitragen. Es genügt nicht, jeweils die N- oder C-terminale Hälfte der rP2X₆-Untereinheit durch die jeweilige rP2X₁-Hälfte zu ersetzen, um eine Trimerisierung zu erreichen.

4.3.3 Eine rP2X₆-rP2X₁-rP2X₆-Chimäre ist in der Lage zu trimerisieren

Als Nächstes konstruierte ich zwei weitere Chimären, die jeweils aus den N- und C-terminalen Domänen sowie den Transmembranregionen der einen und der Ektodomäne der anderen Untereinheit bestanden. So entstanden die rP2X₆-rP2X₁-rP2X₆-Chimäre und die rP2X₁-rP2X₆-rP2X₁-Chimäre. Die rP2X₆-rP2X₁-rP2X₆-Chimäre bestand aus den Aminosäuren 1-53 und 318-379 der rP2X₆-Untereinheit und den Aminosäuren 53-319 der rP2X₁-Untereinheit, die rP2X₁-rP2X₆-rP2X₁-Chimäre dagegen aus den Aminosäuren 1-52 und 320-399 der rP2X₁-Untereinheit und 54-317 der rP2X₆-Untereinheit (Nummerierung bezogen auf die jeweiligen Wildtyp-Untereinheiten). Aus klonierungstechnischen Gründen stammten die letzten 15 Aminosäuren vor der zweiten Transmembranregion jeweils schon von der Untereinheit, von der auch die Transmembranregionen stammten. Da aber diese Region zwischen der rP2X₁- und der rP2X₆-Untereinheit stark konserviert ist (Abb. 4-41), erschien ein starker Einfluss auf die Assemblierungseigenschaften eher unwahrscheinlich.

```

rP2X1      MAHHHHHHMARRLQDELS-AFFFEYDTPRMVLVRNKKVGVIFRLIQLVVLVYVIGWVVFVY
rP2X6      MAHHHHHHMASAVAAALVSWGFLDYKTEKYVMTRNCWVGISQRLQLGVVVYVIGWALLA
*****   :   *       *::*. * : *:.** ** : **:* * :*****.::

rP2X1      EKG YQTS-SDLISSVSVKLGKGLAVTQLQGLGPQVWDVADYVFFPAHGDSSFFVMTNFIVTP
rP2X6      KKG YQEWDMDPQISVITKLGVSVTQVKELEKRLWDVADFVRPSQGENVFFLVTNFLVTP
*****   *   ** .*****:*****: *   :*****:* *::*. * :*****:***

rP2X1      QQTQGHCAENPEG--GICQDDSGCTPGKAERKAQGIRTGNCVPFNGTVKTCEIFGWCPVE
rP2X6      AQVQGRCPPEHPSVPLANCWADEDCPEGEMGTYSHGKGTGQCVAFNGTHRTEIWSWCPVE
*.*.*.*.*.*. . * *.*.* * :   :***:**.*.*.*.* * :*****.*****

rP2X1      VDDKIPSPALLREAENFTLFIKNSISFPRFKVNRRLVVEEVNGTYMKKCLYHKIQHPLCP
rP2X6      SS-AVPRKPLLAQAKNFTLFIKNTVTFNKFNFSRTNALDTWDNTYFKYCLYDSLSSPYCP
.   :*   .** :*:*****:***: *::*. * * : : .***: * **..* **

rP2X1      VFNLGYVVRESGQDFRSLAEKGGVVGITIDWKCDLDWHVRHCKPIYQFHGLYGEKNLSPG
rP2X6      VFRIGDLVAMTGGDFEDLALLGGAVGINIHWCNLDTKGSDCSPQYSFQLQER-----G
**.*.* :* :* **..** **.*.*.*.*.*.* : .*. *.* : *

rP2X1      FNF RFARHFVQN-GTNRRLFKVFGIHF DILVDGKAGKFDI IPTMTTIGSGIGIFGVATV
rP2X6      YNFRTANYWVAASGVESRLLKLYGIRFDILVTGQAGK FAL IPTAITVGTGAAWLGMVTF
*** *.* : *.* : * *::**:*:*:* * :***** :*** *::* . :*:.*.

rP2X1      LCDLLLLHILPKRHYYKQKKFYAEDMGPGEGEHDPVATSSTLGLQENMSTS
rP2X6      LCDLLLLYVDREAGFYWRTKYEEARAPKATTNS-----
*****: : :* :.*: * . . .

```

Abb. 4-41 Sequenzvergleich von rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten. Dargestellt ist ein Alignment (ClustalW Multiple Sequence Alignment) der Aminosäuresequenzen der rP2X₁- und der rP2X₆-Untereinheit. Die Transmembranregionen sind grau hinterlegt. Aminosäuren, die in beiden Sequenzen identisch sind, sind durch „*“ gekennzeichnet, „:“ bezeichnet Aminosäuren mit konserviertem Charakter, „.“ ähnliche Aminosäuren.

Das Blaue-Native-PAGE-Gel in der Abb. 4-42A und die quantitativen Profile in der Abb. 4-42B zeigen, dass die rP2X₆-rP2X₁-rP2X₆-Chimäre (Spur 3) dazu in der Lage war, ebenso wie die Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit zu trimerisieren (Spur 1). Die rP2X₁-rP2X₆-rP2X₁-Chimäre (Spur 4) hingegen verhielt sich so wie die rP2X₆-Untereinheit (Spur 5). Funktionell war die assemblierende Chimäre allerdings nicht, so dass eventuell nicht allein die defekte Assemblierung für die fehlende Funktion von rP2X₆-Untereinheiten verantwortlich gemacht werden kann.

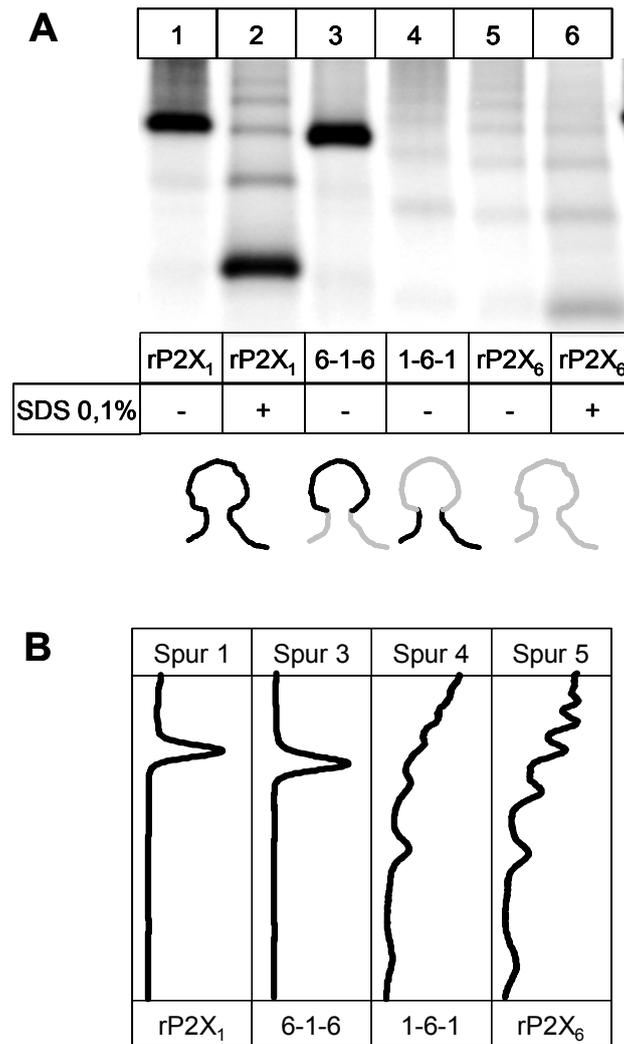


Abb. 4-42 Assemblierung von Chimären aus rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten. **A**, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit rP2X₁- und rP2X₆-Rezeptoren sowie verschiedenen rP2X₁/rP2X₆-Chimären im nativen und teilweise im partiell durch SDS denaturierten Zustand. Unter dem PhosphorImager Scan sind Modelle der einzelnen Untereinheiten bzw. Chimären dargestellt, die die Anteile an den verschiedenen Untereinheiten schematisch darstellen. Schwarz, rP2X₁-Anteil; grau, rP2X₆-Anteil. **B**, Quantitative Profile der nativen PAGE-Gel-Spuren aus A.

Das Ergebnis, dass eine Chimäre, deren zytosolische Bereiche und Transmembranregionen von nicht trimerisierenden rP2X₆-Untereinheiten stammen, während die Ektodomäne von trimerisierungskompetenten rP2X₁-Untereinheiten stammt, trimerisieren kann, ist ein weiterer Hinweis auf die wichtige Rolle der Ektodomäne bei der Assemblierung von P2X-Untereinheiten. In den Transmembranregionen und N- und C-terminalen Domänen ist jedenfalls nicht der Grund für das von den anderen P2X-Isoformen abweichende Assemblierungsverhalten der rP2X₆-Untereinheiten zu suchen. Wie auch schon die vorausgegangenen Versuche mit rP2X₁- und hP2X₅-Untereinheiten lieferten somit die

Experimente mit Chimären aus rP2X₆- und rP2X₁-Untereinheiten weitere Belege dafür, dass bei P2X-Rezeptoren die wichtigsten Kontaktpunkte zwischen den assemblierten Untereinheiten in der Ektodomäne liegen.

4.3.4 Das erste Drittel der Ektodomäne enthält mindestens eine wichtige Assemblierungsdomäne

Nun wollte ich herausfinden, in welchen Regionen der Ektodomäne die Unterschiede zwischen dem Assemblierungsverhalten von rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten begründet sind. Bei einem Alignment der beiden Untereinheiten (Abb. 4-41) fiel ein Bereich im hinteren Drittel der Ektodomänen auf, in dem beträchtliche Unterschiede vorkommen. Der rP2X₆-Untereinheit fehlen im Vergleich zur rP2X₁-Untereinheit sechs Aminosäuren (²⁸²EKNLSP²⁸⁷), und die vorangehenden Aminosäuren ²⁷⁷HGLYG²⁸¹ (Nummerierung der Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit) sind sehr verschieden von den entsprechenden Aminosäuren der rP2X₆-Untereinheit (²⁷⁷QLQER²⁸¹). Um zu untersuchen, ob dieser Bereich einen Einfluss auf die Assemblierung von rP2X₆-Untereinheiten hat, ersetzte ich in der assemblierenden rP2X₆-rP2X₁-rP2X₆-Chimäre die Aminosäuren 277-281 der von der rP2X₁-Untereinheit stammenden Ektodomäne durch die entsprechenden Aminosäuren der rP2X₆-Untereinheit. In einer zweiten Mutante entfernte ich zusätzlich die Aminosäuren 282-287. Die Analyse der beiden Konstrukte ergab allerdings keinen Einfluss dieser Region auf das Assemblierungsverhalten, beide trimerisierten weiterhin wie die Ausgangschimäre (Abb. 4-43A,B, Spuren 11 und 13).

In einem zusätzlichen Versuch, nähere Informationen über Assemblierungsdomänen in der Ektodomäne der rP2X₆-rP2X₁-rP2X₆-Chimäre zu erhalten, generierte ich eine weitere Chimäre, in der die Aminosäuren 1-160 und 318-379 (Nummerierung der Wildtyp-rP2X₆-Untereinheit) von der rP2X₆-Untereinheit und die Aminosäuren 157-319 (Nummerierung der Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit) von der rP2X₁-Untereinheit stammten. Der Anteil an der rP2X₆-Untereinheit wurde dadurch in das erste Drittel der Ektodomäne hinein verlängert. Die Analyse dieses Konstruktes auf einem Blaue-Native-PAGE-Gel zeigte, dass diese rP2X₆¹⁻¹⁶⁰-rP2X₁-rP2X₆-Chimäre im Gegensatz zur rP2X₆-rP2X₁-rP2X₆-Chimäre nicht dazu in der Lage war, zu trimerisieren (Abb. 4-43A,B, Spur 9), sondern sich so verhielt wie die rP2X₆-Untereinheit (Spur 3) und die rP2X₁-rP2X₆-rP2X₁-Chimäre (Spur 5). Es sieht also so aus, als sei in der Region zwischen den Aminosäuren 53 und 160 der rP2X₆¹⁻¹⁶⁰-rP2X₁-rP2X₆-Chimäre mindestens eine Assemblierungsdomäne durch die Substitution durch rP2X₆-Aminosäuren zerstört worden. Diese Region müsste nun genauer untersucht werden. Es ist außerdem immer noch möglich, dass in den C-terminalen Dritteln der Ektodomäne auch

wichtige Assemblierungsdomänen enthalten sind. Auch dieser Bereich muss in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

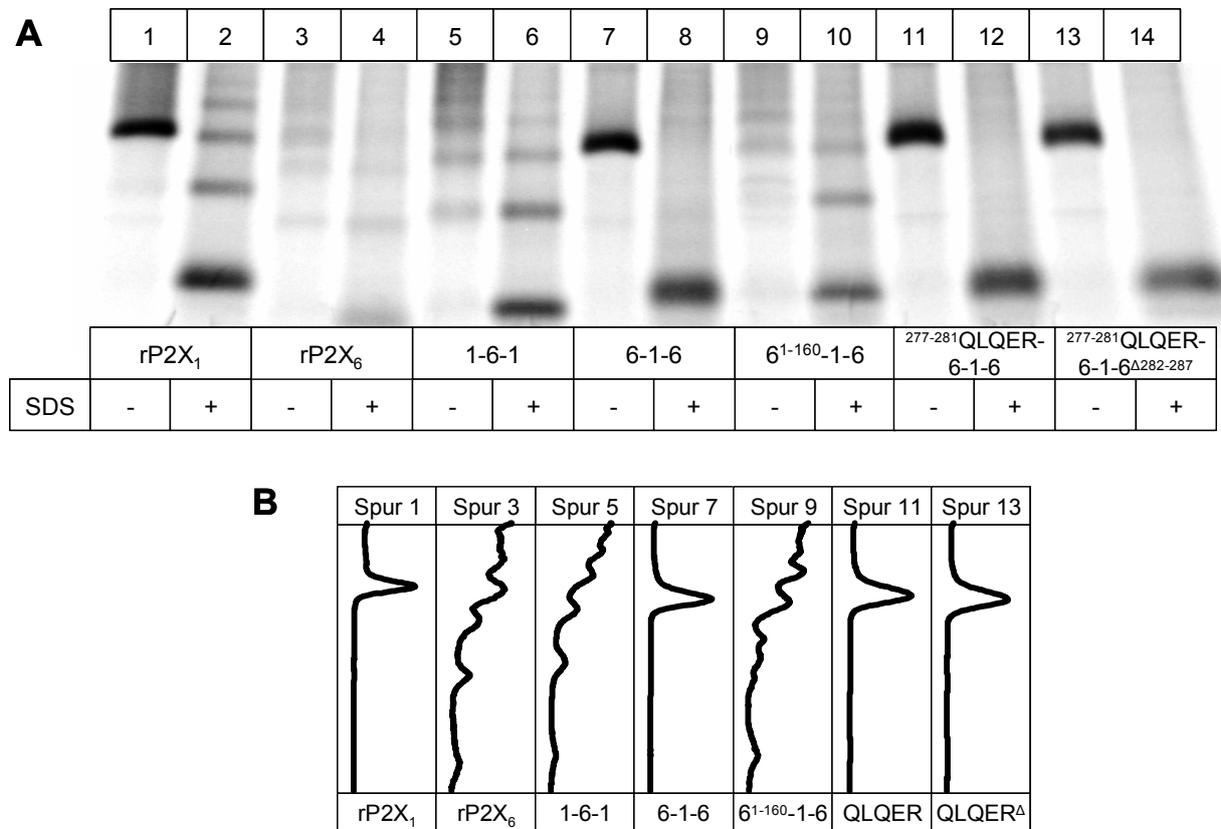


Abb. 4-43 Assemblierung verschiedener Chimären aus rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten. A, PhosphorImager Scan eines Blaue-Native-PAGE-Gels mit rP2X₁- und rP2X₆-Rezeptoren sowie verschiedenen Chimären im nativen und im partiell durch SDS denaturierten Zustand. Zusätzlich zu der 6-1-6-Chimäre wurden Chimären untersucht, in denen Teile der von der rP2X₁-Untereinheit stammenden Ektodomäne durch die entsprechende rP2X₆-Sequenz ersetzt wurden. **B,** Quantitative Profile der nativen PAGE-Gel-Spuren aus A.

Eine Deglykosylierung der verschiedenen Chimären und Wildtyp-Untereinheiten ergab, dass nur die Konstrukte, die trimerisieren konnten, auch komplex glykosyliert und somit aus dem ER exportiert wurden (Abb. 4-44, Spuren 2 und 11). Bei den nicht trimerisierenden Konstrukten war keine signifikante Komplex-Glykosylierung zu erkennen (Spuren 5, 8 und 14).

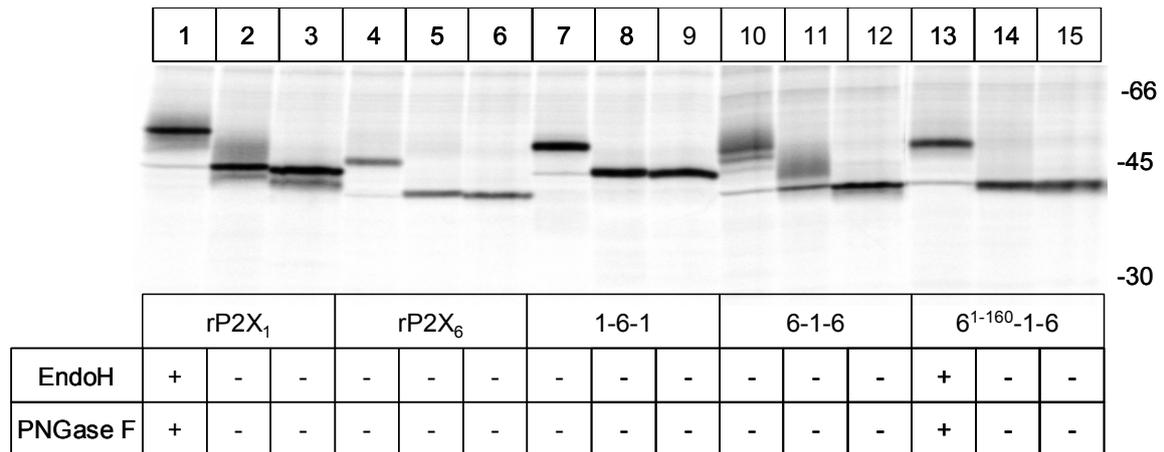


Abb. 4-44 N-Glykosylierungszustand von rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten sowie rP2X₁/rP2X₆-Chimären. PhosphorImager Scan eines kontinuierlichen SDS-PAGE-Gels (10% Acrylamid) mit nicht deglykosylierten bzw. durch EndoH oder PNGase F deglykosylierten rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten sowie rP2X₁/rP2X₆-Chimären.

5. Diskussion

5.1 Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten

P2X-Untereinheiten bilden durch die Assemblierung in homo- oder heterotrimere Komplexe ATP-sensitive Kationenkanäle (Nicke et al., 1998). Die Trimerisierung von P2X-Untereinheiten findet kotranslational im Endoplasmatischen Retikulum statt, so dass diese in intrazellulären Kompartimenten und an der Plasmamembran in trimeren Rezeptorkomplexen vorliegen (Nicke et al., 1998) („obligomers“ (Ofran and Rost, 2003)). Die Interaktion zwischen den Untereinheiten wird wahrscheinlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen spezifischen Assemblierungsdomänen vermittelt. Über die Art und Lokalisation dieser Assemblierungsdomänen ist bisher nicht viel bekannt. Lediglich eine Publikation hat sich intensiv mit dieser Frage auseinandergesetzt (Torres et al., 1999b). Eine Deletionsmutante der rP2X₂-Untereinheit, die 25 Aminosäuren vor der zweiten Transmembranregion trunziert war, konnte in dieser Studie nicht mit der Wildtyp-rP2X₂-Untereinheit koimmunopräzipitieren, während eine Mutante, die nach der zweiten Transmembranregion (³⁶²Y, entspricht der Aminosäure ³⁶⁸Y der hP2X₅-Untereinheit) trunziert war, dazu in der Lage war. Es konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass diese fehlende Koimmunopräzipitation der Deletionsmutante ihren Grund mehr in einer fehlerhaften Sekundär- oder Tertiärstruktur als in dem Fehlen von Assemblierungsdomänen hatte. Diese und weitere Ergebnisse, die durch die Untersuchung der Koimmunopräzipitation der rP2X₆-Untereinheit mit chimären Konstrukten aus rP2X₂- und rP2X₃-Untereinheiten erhalten worden waren, veranlassten Torres und Mitarbeiter zu dem Schluss, dass weder die N-terminalen noch die C-terminalen zytoplasmatischen Domänen an der Assemblierung beteiligt sind. Dieses Ergebnis konnte in unserem Labor durch Alanin-Scanning dieser Regionen bestätigt werden (P. Minko, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse). Vielmehr postulierten Torres und Mitarbeiter, dass eine Region in oder unmittelbar vor der zweiten Transmembranregion an der Assemblierung der Untereinheiten beteiligt sein könnte.

In der vorliegenden Studie untersuchte ich eine Spleiß-Variante der hP2X₅-Untereinheit (hP2X₅^{Δ328-349}), der durch Herausspleißen von Exon 10 die Codons für die Aminosäuren 328-349 der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit fehlen. Diese Aminosäuren umfassen den Bereich vor und einen Teil in der zweiten Transmembranregion und liegen somit in genau der Region, die von Torres und Mitarbeitern (Torres et al., 1999b) als für die Assemblierung wichtig beschrieben worden waren. Durch die Untersuchung dieser Spleißvariante und des Einflusses der von Exon 10 kodierten Aminosäuren auf die Assemblierung der hP2X₅-Untereinheiten

versuchte ich, genauere Informationen über die Lokalisation und die Art der Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten zu erhalten. Darüber hinaus hoffte ich, durch gezielte Mutagenese genauere Aussagen über die Rolle der zweiten Transmembranregion bei der Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten machen zu können.

5.1.1 Die zweite Transmembranregion spielt eine wichtige strukturelle Rolle bei der Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten

Durch den Einsatz von Blauer-Nativer-PAGE konnte ich zeigen, dass die hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheit keine Trimere, sondern Aggregate ausbildet, was ein Anzeichen für einen schwerwiegenden Defekt im Assemblierungsvermögen ist. Diese fehlende Assemblierung ist auch der Grund für die bekannterweise fehlende Funktion der hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheit (Le et al., 1997), (Bo et al., 2003). Das schrittweise Einfügen von Exon 10 ermöglichte sowohl die Trimerisierung als auch die Funktion der hP2X₅-Untereinheit.

Darüber hinaus gewähren meine Ergebnisse einen tieferen Einblick in die Rolle der zweiten Transmembranregion bei der Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten. Durch meine Versuche wurde deutlich, dass die zweite Transmembranregion hauptsächlich als hydrophober Membrananker fungiert, der die korrekte Lokalisation von Assemblierungsdomänen ermöglicht, ohne selber eine darzustellen. Diese Schlussfolgerung beruht auf folgenden Ergebnissen: Zum einen konnten in der gesamten Transmembranregion die Aminosäuren in Fünferblocks zu Alanin mutiert werden, ohne dass dies die Ausbildung von Trimeren behinderte. Zum anderen war es möglich, auf die gesamte äußere Hälfte der zweiten Transmembranregion zu verzichten, wenn vor der Transmembranregion eine Polyalanin-Sequenz mit ausreichender Länge vorhanden war. So konnte das Fehlen der Aminosäuren der Transmembranregion kompensiert und die Membran durchspannt werden. Außerdem führten alle Mutationen, die ein Ausbilden der zweiten Transmembranregion verhinderten, zu einer Aggregation und einem beschleunigten Abbau der Untereinheiten. Dies war der Fall bei der hP2X₅^{Δ328-349}-Untereinheit, bei einer Reihe von Mutanten, die vor oder in der zweiten Transmembranregion Fünferblock-Substitutionen durch polare Aminosäuren enthielten, und bei Deletionsmutanten, die vor oder in der zweiten Transmembranregion trunziert waren. Sogar eine Trunkierung nach der zweiten Transmembranregion führte nur dann zu assemblierenden Proteinen, wenn die positiv geladenen C-terminal gelegenen Aminosäuren ³⁶³KKR³⁶⁵ eingeschlossen waren. Somit lässt sich zusammenfassen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der korrekten Ausbildung, Insertion und Orientierung der zweiten Transmembranregion und der Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten besteht.

5.1.2 Die zweite Transmembranregion der hP2X₅-Untereinheit enthält keine spezifischen Assemblierungsmotive

Die Assoziierung von Transmembranregionen wird in der Regel durch zwei Arten von elektrostatischen Wechselwirkungen ermöglicht: van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Van-der-Waals-Wechselwirkungen sind in Transmembranregionen von besonderer Wichtigkeit, da sie unabhängig von funktionellen Gruppen sind und somit auch zwischen apolaren Aminosäuren mit großen Seitenketten auftreten. Außerdem sind van-der-Waals-Kräfte in dem unpolaren Umfeld der Membran mit niedriger Dielektrizitätskonstante wesentlich stärker als in wässriger polarer Umgebung. Besonders häufig ist die Interaktion zwischen Transmembranhelices über van-der-Waals-Kräfte, wenn zwei interagierende Helices komplementär geformt sind („knob into hole“ (Lupas, 1996) oder „ridge into groove“ (Lupas, 1996), so dass sie eine große Kontaktfläche besitzen. Dies ist der Fall bei dem membrandurchspannenden Leucin-Zipper-Motiv (Gurezka et al., 1999) und dem in bitopischen Proteinen häufigen GXXXG-Motiv (Russ and Engelman, 2000), das eventuell noch zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem C_α-Wasserstoff eines Glycins und dem Hauptketten-Carbonyl-Sauerstoff einer Aminosäure auf der Nachbarhelix stabilisiert wird (Senes et al., 2001).

Die Transmembranregionen von P2X-Untereinheiten enthalten kein Leucin-Zipper-Motiv, aber in der äußeren Hälfte der zweiten Transmembranregion sind kleine Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin) sehr häufig. Sie könnten eine dichte Packung zwischen benachbarten Helices über van-der-Waals-Bindungen ermöglichen. Die äußere Hälfte der zweiten Transmembranregion enthält acht kleine Aminosäuren (vier Glycine, drei Alanine, ein Serin) innerhalb einer Sequenz von elf Aminosäuren. Die Sequenz ³⁴⁰VGSGVA³⁴⁵ (GXXXXA) erinnert an das gängige Muster des GXXXG-Motivs in Glycophorin A. Auch hier sind kleine Reste neben den großen verzweigten Seitenketten der Aminosäuren Valin und Isoleucin (Russ and Engelman, 2000), so dass eine starke (SDS-resistente) Assoziation nach dem „ridge into groove“-Muster (Mackenzie et al., 1997) möglich ist. Und auch GXXXXA ist ein bekanntes Assoziations-stabilisierendes Motiv, wenn es auch nur für lösliche Proteine und Interaktionen zwischen α -Helices und β -Faltblattstrukturen beschrieben wurde (Kleiger et al., 2002). Allerdings unterscheidet sich die ³⁴⁰VGSGVA³⁴⁵-Sequenz der hP2X₅-Untereinheit von dem GXXXG-Motiv in Glycophorin A darin, dass die transmembranregionvermittelte Dimerisierung von Glycophorin A durch kleinste Veränderungen in der Kontaktregion signifikant destabilisiert wird (Lemmon et al., 1992), (Langosch et al., 1996), (Schneider and Engelman, 2004), während die Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten vollkommen

unempfindlich gegenüber solchen Mutationen war. Lediglich das Einbringen mehrerer polarer Reste störte das Ausbilden der Transmembranregion, Leucin- und Alanin-Substitutionen waren ohne negative Folgen für die Assemblierung. Sogar die Leucin-Substitution von 15 zusammenhängenden Resten der zweiten Transmembranregion, ^{337}I - ^{351}A , die alle acht kleinen Aminosäuren beinhalten, hatte keinen Einfluss auf die Trimerisierung. Reine Poly-leucin-Helices assoziieren in der Regel nur sehr schwach, wenn polare Aminosäuren fehlen, die interhelikale Wasserstoffbrücken ausbilden können (Zhou et al., 2000). Somit kann ich aus meinen Ergebnissen schließen, dass trotz der Häufigkeit von Motiven, die kleine Aminosäuren enthalten und die Assoziation von Helices vermitteln (Liu et al., 2004), die kleinen Aminosäuren in der zweiten Transmembranregion der hP2X₅-Untereinheit für eine effiziente Trimerisierung nicht notwendig sind.

```

rP2X1  326FDILVDGKAGKFDI IPTMTTIGSGIGIFGVATVLC D L L L L H I L P K 359
rP2X2  325IDVIVHGQAGKFS LIPTI I N L A T A L T S I G V G S F L C D W I L L T F M N K 358
rP2X3  316FDVLVYGNAGKFNI IPTI I S S V A A F T S V G V G T V L C D I I L L N F L K G 349
rP2X4  330FDIIVFGKAGKFDI IPTM I N V G S G L A L L G V A T V L C D V I V L Y C M K K 363
rP2X5  331FDVIVNGKAGKFS I IPTV I N I G S G L A L M G A G A F F C D L V L I Y L I R K 364
rP2X6  324FDILVTGQAGKFA LIPTA I T V G T G A A W L G M V T F L C D L L L L Y V D R E 357
rP2X7  328FDILVFGTGGKFDI IQLVVYIGSTLSYFGLATVCIDLIINTYAST 361

```

Abb. 5-1 Alignment der P2X-Isoformen der Ratte. Dargestellt ist die Region vor der zweiten Transmembranregion sowie die gesamte zweite Transmembranregion (hellgrau hinterlegt). In allen Isoformen konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau hinterlegt.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der zweiten Transmembranregion verschiedener P2X-Isoformen (Abb. 5-1), so ist das Fehlen eines spezifischen Assemblierungsmotivs nicht unbedingt überraschend. Es ist zu erkennen, dass in dieser Region kaum Aminosäuren vorkommen, die in allen Isoformen konserviert sind. Weiter N-terminal in der Proteinsequenz, in der Ektodomäne, wo sich Mutationen negativ auf die Trimerisierung auswirkten, befindet sich eine stark konservierte Region, so dass es wahrscheinlicher ist, hier wichtige Sequenzinformationen zu finden.

5.1.3 Eine Wasserstoffbrücke zwischen Transmembranregionen könnte die Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten stabilisieren

Die zweite häufige Wechselwirkung zwischen Transmembranhelices ist die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, die in der Membran zwischen (i) den Seitenketten polarer Aminosäuren, (ii) C_α-Wasserstoffen und Hauptketten-Carbonylgruppen oder Seitenketten-Sauerstoffatomen

und (iii) polaren Seitenketten und den Carbonyl- oder N-H-Gruppen von Hauptketten vorkommen (Adamian and Liang, 2002), (Senes et al., 2001). Wasserstoffbrücken sind stärker als van-der-Waals-Wechselwirkungen und ebenso wie diese in der unpolaren Membran stärker als in wässriger Lösung (Zhou et al., 2000).

Die Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten war bemerkenswert unempfindlich gegenüber der Substitution der Aminosäuren der zweiten Transmembranregion durch kleine (Alanin) und große (Leucin) Aminosäuren. Die einzige Ausnahme war die Position ³⁵⁵D, die einzige geladene Aminosäure in der zweiten Transmembranregion. Neuere Erkenntnisse über die Interaktionen zwischen Transmembranhelices haben ergeben, dass einzelne stark polare Aminosäuren (Aspartat, Glutamat, Glutamin, Asparagin) ausreichen, um eine Assoziation der Helices zu bewirken. Dies wird durch die Ausbildung von interhelikalen Wasserstoffbrücken zwischen ihren polaren Seitenketten ermöglicht, ohne dass, wie bei van-der-Waals-Interaktionen, eine dichte Packung der Kontaktflächen notwendig ist (Zhou et al., 2000), (Choma et al., 2000), (Gratkowski et al., 2001), (Zhou et al., 2001). Somit sind solche Helix-Interaktionen wesentlich unempfindlicher gegenüber Mutationen, es sei denn, die wasserstoffbrückenbildenden Aminosäuren werden substituiert. Einzelmутanten von ³⁵⁵D erhärteten den Verdacht auf eine Wasserstoffbrückenbildung, da Aminosäuren mit polaren (Arginin, Asparagin, Glutamat), nicht aber mit apolaren (Leucin, Valin, Phenylalanin) Seitenketten eine Wildtyp-ähnliche Trimerisierung ermöglichten. Auch die überraschend gute Assemblierung der ³⁵⁵W-Mutante könnte dadurch erklärt werden, da das eigentlich stark hydrophobe Tryptophan über den Indol-Stickstoff als Wasserstoffdonor ebenfalls Wasserstoffbrücken ausbilden kann (Görbitz, 1989), (Adamian and Liang, 2002), (Patel et al., 2005), besonders im apolaren Umfeld der Membran. Darüber hinaus hatten Studien ergeben, dass Tryptophan über bisher noch unbekannte Mechanismen die Interaktion von Transmembranhelices ermöglicht (Ridder et al., 2005). Auch das überraschende Ergebnis, dass Threonin und Cystein nicht dazu in der Lage sind, die Trimerisierung ebenso zu stabilisieren wie die anderen polaren Aminosäuren, könnte durch die Beteiligung von ³⁵⁵D an einer Wasserstoffbrücke erklärt werden. Mehrere Studien haben ergeben, dass ein einzelnes Threonin (ebenso wie Serin und Tyrosin) die Assoziation von Transmembranpeptiden im Gegensatz zu anderen polaren Aminosäuren nicht unterstützt (Gratkowski et al., 2001) (Zhou et al., 2000). Es bildet in der Membran hauptsächlich Wasserstoffbrücken zu den Hauptketten-Carbonylgruppen anderer Aminosäuren aus, die in derselben Helix eine Helixwindung entfernt liegen (Gratkowski et al., 2001), (Arkin and Brunger, 1998), nicht aber zu den Seitenketten von Aminosäuren in einer benachbarten Helix (Zhou et al., 2000), (Zhou

et al., 2001). Mehrere Threonine und Serine dagegen können Assemblierungsmotive darstellen (Dawson et al., 2002). Somit verhält sich ein einzelnes Threonin in der Membran eher wie eine apolare Aminosäure (Gratkowski et al., 2001). Auch Cystein bildet eher intramolekulare als interhelikale Wasserstoffbrücken aus (Gray and Matthews, 1984). Alle anderen untersuchten polaren Aminosäuren (E, R, N), die eine Wildtyp-ähnliche Trimerisierung ermöglichen, können Wasserstoffbrücken zu Aminosäuren in benachbarten Helices ausbilden (Görbitz, 1989), (Zhou et al., 2000).

Ein solcher Einfluss von ^{355}D und damit auch der Wasserstoffbrückenbildung wird allerdings dadurch limitiert, dass die ^{355}L -Mutation die Trimerisierung der hP2X₅-Untereinheiten zwar reduzierte, nicht aber völlig verhinderte. Darüber hinaus hatte die Substitution durch Alanin keinen Einfluss auf das Assemblierungsvermögen. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass ^{355}D in einem sehr frühen Stadium des Assemblierungsprozesses eine Wasserstoffbrücke ausbildet (Engelman et al., 2003). Eine dadurch bedingte lokale Konzentration von Untereinheiten könnte die Interaktion zwischen spezifischen Assemblierungsdomänen ermöglichen, die nach meinen Ergebnissen höchstwahrscheinlich in der Ektodomäne liegen. Dieses Modell liefert eine Erklärung dafür, dass ^{355}D zwar die Menge an Trimeren erhöht, nicht aber für den weiteren strukturellen Zusammenhalt der assemblierten Untereinheit notwendig ist. Die Trimerisierung der ^{355}A -hP2X₅-Mutante kann durch dieses Modell allerdings nicht erklärt werden, so dass weitere Experimente nötig sind, um das Ausmaß des Einflusses von Wasserstoffbrücken zwischen Transmembranregionen auf die Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten zu verstehen.

5.1.4 Ionische Wechselwirkungen zwischen Transmembranregionen haben keinen Anteil an der Assemblierung von hP2X₅-Untereinheiten

Eine weitere nicht kovalente elektrostatische Wechselwirkung, die in der Proteinbiochemie eine große Rolle spielt, ist die ionische Bindung. Diese kommt durch die Anziehung entgegengesetzt geladener Seitenketten zustande. Ionische Wechselwirkungen sind stärker als Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Kräfte, aber auch am stärksten von spezifischen funktionellen Gruppen abhängig. Die Existenz geladener Seitenketten in der Membran wird kontrovers diskutiert. Einerseits wäre das Einbringen von geladenen Seitenketten in die Membran energetisch ungünstig, andererseits wäre eine ionische Wechselwirkung sehr stark und die Ladungen würden sich aufheben. Wahrscheinlich liegen ionisierbare Seitenketten in der Membranregion aber meist ungeladen vor (Lew et al., 2000), (Zhou et al., 2000), wenn es

auch Hinweise gibt, dass Aminosäuren in der Membran ionisiert vorliegen können (Call et al., 2002).

Als einzige Aminosäure, die in der zweiten Transmembranregion der hP2X₅-Untereinheit die Assemblierung beeinflusst, wurde ³⁵⁵D identifiziert, also eine potentiell negativ geladene Aminosäure. Theoretisch wäre es daher möglich, dass ³⁵⁵D eine Salzbrücke zu einer positiv geladenen Seitenkette ausbildet. Der einzige in Frage kommende Interaktionspartner ist ³⁴R in der ersten Transmembranregion. Die Mutation dieser Aminosäure zu Leucin hatte aber keinen Einfluss auf die Trimerisierung. Auch die Substitution von ³⁵⁵D durch Arginin, also eine entgegengesetzt geladene Aminosäure, hatte keinerlei Auswirkungen auf das Assemblierungsvermögen. Die effiziente Trimerisierung der Leucin-Mutante von ³⁴R-hP2X₅ und der Arginin-Mutante von ³⁵⁵D-hP2X₅ schließt somit aus, dass der Beitrag von ³⁵⁵D zur Assemblierung durch die Ausbildung einer Salzbrücke vermittelt wird.

5.1.5 Wahrscheinlich interagieren die zweiten Transmembranregionen verschiedener Untereinheiten miteinander

Die Suche nach dem Interaktionspartner von ³⁵⁵D in der ersten Transmembranregion ist trotz des Einsatzes verschiedener Methoden ohne Erfolg geblieben. Eine denkbare Erklärung für den mangelnden Erfolg mit Einzelmutanten in der ersten Transmembranregion wäre, dass die vermutete Wasserstoffbrücke nicht über eine Seitenkette, sondern eine Hauptkette ausgebildet wird. Eine Veränderung in den Seitenketten hätte dann keinen großen Einfluss, oder der Interaktionspartner könnte auch eine der nicht überprüften apolaren Aminosäuren sein. Es wäre aber auch möglich, dass keine Wasserstoffbrücke über ³⁵⁵D zwischen der ersten und der zweiten Transmembranregion existiert, sondern zwischen den zweiten Transmembranregionen benachbarter Untereinheiten.

Auch der mangelnde Erfolg des Cystein-Crosslinkings ließe sich wieder mit mehreren Hypothesen erklären. Entweder waren die verwendeten Methoden nicht geeignet oder nicht ausgereift genug, um eine Interaktion zu zeigen, wofür das Verhalten der Kontrollgruppen spräche. Allerdings wurde diese Methode schon in mehreren Studien erfolgreich zur Identifizierung von Kontaktpunkten zwischen Proteindomänen angewandt (Jiang et al., 2003), (Marquez-Klaka et al., 2007). Möglicherweise wäre auch der Einsatz eines Crosslinkers erfolgreich (Soskine et al., 2002). Hier wäre Quecksilberchlorid wegen der Lokalisation in der Membran eventuell besser geeignet als Sulfhydryl-Reagenzien wie Maleimide oder Methanthiosulfonate (Soskine et al., 2002). Es ist natürlich auch möglich, dass es keine Interaktion zwischen der ersten und der zweiten Transmembranregion benachbarter

Untereinheiten gibt. Zum Nachweis der oben beschriebenen denkbaren Interaktion zwischen der Seitenkette von ^{355}D und der Hauptkette einer Aminosäure ist die Cystein-Crosslinking-Methode möglicherweise auch nicht anwendbar, da die Positionierung des Cysteinrestes eventuell nicht für die Ausbildung einer Disulfidbrücke mit ^{355}D geeignet ist. Eine Interaktion zwischen den zweiten Transmembranregionen benachbarter Untereinheiten hätte durch die Cystein-Mutanten dargestellt werden können, wenn ^{355}D der einen hP2X₅-Untereinheit mit ^{355}D oder ^{354}C einer Nachbaruntereinheit interagiert. Das Fehlen eines positiven Ergebnisses schließt diese Möglichkeit aber wegen einer mangelnden Positivkontrolle nicht aus, außerdem könnte ^{355}D auch mit einer anderen Aminosäure interagieren. Es wäre aber auch möglich, dass über ^{355}D gar keine Interaktion zwischen den Transmembranregionen benachbarter Untereinheiten stattfindet, sondern zwischen der ersten und der zweiten innerhalb einer Untereinheit. Diese Interaktion könnte die Struktur der Untereinheit stabilisieren und so die korrekte Positionierung der Assemblierungsdomänen gewährleisten. Diese Hypothese lässt sich biochemisch nicht durch Cystein-Mutanten überprüfen, hätte aber bei den Einzelmutanten zu einem Ergebnis führen können. Elektrophysiologische Untersuchungen der Cystein-Mutanten sind auch nicht durchführbar, da die ^{355}C -Mutante nicht funktionell ist und daher keine Änderungen der Funktionalität der eventuell quervernetzten Cystein-Mutanten nach Reduktion durch DTT überprüft werden können.

Am wahrscheinlichsten erscheint mir nach meinen Experimenten, dass eine Interaktion zwischen den zweiten Transmembranregionen benachbarter Untereinheiten stattfindet, auch wenn eine andere Studie mit Crosslinking-Versuchen von P2X₂- und P2X₃-Untereinheiten eher eine „head-to-tail“-Anordnung der P2X-Untereinheiten postuliert hatte, bei der die erste und die zweite Transmembranregion benachbarter Untereinheiten miteinander interagieren (Jiang et al., 2003). Hier wurde ein Crosslinking zwischen V⁴⁸C und I³²⁸C beobachtet, die an der äußeren Grenze der Transmembranregionen liegen. Ein Crosslinking zwischen diesen beiden Aminosäuren wurde bereits zuvor beobachtet (Spelta et al., 2003), wobei hier keine Aussage darüber gemacht werden konnte, ob diese Interaktion zwischen zwei Untereinheiten oder innerhalb einer Untereinheit stattfand. Somit sind weitere Studien notwendig, um den Interaktionspartner von ^{355}D zu finden. Ein möglicher Ansatz, eine Interaktion zwischen den Transmembranregionen zu untersuchen, ist neben weiteren Crosslinking-Experimenten mit verschiedenen Linkern die TOXCAT-Methode (Russ and Engelman, 1999). Diese Methode wäre aber nur anwendbar, wenn die Interaktion zwischen den Transmembranregionen stark genug ist, um eine Assoziation ohne die Ektodomäne zu gewährleisten.

5.1.6 Ein negativer hydrophober *Mismatch* führt zu der Aggregation von hP2X₅-Untereinheiten

Die Unfähigkeit der Spleiß-Variante hP2X₅^{Δ328-349} zu trimerisieren, ist auf das Fehlen der durch Exon 10 kodierten Region vor der zweiten Transmembranregion und der äußeren Hälfte der zweiten Transmembranregion zurückzuführen. Wenn man davon ausgeht, dass jede Aminosäure in einer α -Helix 0,15 nm von der nächsten entfernt ist, so beträgt die berechnete Länge der inneren Hälfte der zweiten Transmembranregion (wenn sie denn eine Helix darstellt, was nicht eindeutig geklärt ist, (Silberberg et al., 2005)), ³⁵⁰GAFFCDLVLIYLI³⁶², ungefähr 2 nm. Dies wäre eindeutig zu kurz, um den 3 nm breiten hydrophoben Kern der Membran zu durchspannen. Studien mit synthetischen Polyleucin- oder Polyleucin/Polyalanin-Peptiden haben gezeigt, dass Helices, die zu kurz sind, um die Modell-Phospholipidmembran zu durchspannen, bei denen also ein sogenannter negativer hydrophober *Mismatch* vorliegt, nicht in die Phospholipidmembran eingebracht werden. Da die hydrophoben Peptide in wässriger Umgebung schlecht löslich sind, neigen sie dazu, zu aggregieren (Ren et al., 1999), (de Planque et al., 2001). So verhalten sich zum Beispiel auch Bakteriorhodopsin (Ryba and Marsh, 1992) und die Ca²⁺-ATPase (Cornea and Thomas, 1994), wenn sie in Phospholipide aus kurzkettigen Fettsäuren eingebracht werden. Die von der Membran ausgeschlossenen Helices vermeiden den energetisch ungünstigen Kontakt mit der wässrigen Umgebung, indem sie miteinander assoziieren. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass bei Mutanten der hP2X₅-Untereinheit durch das Fehlen von Exon 10, das Trunkieren vor oder in der Transmembranregion oder die Substitution von Transmembran-Aminosäuren durch polare Reste ein hydrophober *Mismatch* zustande kommt. Dieser führt dazu, dass die zweite Transmembranregion vom Translokation-Komplex nicht als solche erkannt und somit nicht in die Membran integriert wird (Bowie, 2005). Aus energetischen Gründen neigen die hydrophoben Segmente der unvollständigen zweiten Transmembranregion in der wässrigen Umgebung des Extrazellulärraumes zur Aggregation.

Die Tatsache, dass dem hP2X₅^{Δ342-349}-Konstrukt durch das Einbringen einer Polyalanin-Sequenz anstelle eines Teils der Exon 10-Sequenz die Ausbildung der zweiten Transmembranregion ermöglicht wird (³³⁵⁻³⁴¹A-hP2X₅^{Δ342-349}-Mutante), war nicht unbedingt zu erwarten. Alanin hat zwar eine ausgeprägte Tendenz, α -Helices auszubilden (Marqusee et al., 1989), doch diese sind kaum hydrophob genug, um in die Membran integriert zu werden (Lewis et al., 2001), (Bowie, 2005). Werden allerdings wenige Alanine durch Leucine ersetzt, so genügt dies zur Ausbildung einer Transmembranhelix (Bechinger, 2001), (Bowie, 2005). So besaß beispielsweise eine Sequenz aus 16 Alaninen und 5 Leucinen gerade die

Hydrophobizität, die ausreichte, die Alkalische Phosphatase, ein wasserlösliches Protein, in der Membran von *E. coli* zu verankern (Chen and Kendall, 1995). Die stark hydrophobe innere Hälfte der zweiten Transmembranregion, ³⁵⁰GAFFCDLVLIYLI³⁶², scheint in der Lage zu sein, die schwache Hydrophobizität der Alanin-Sequenz zu kompensieren und so der gesamten Region eine ausreichende Hydrophobizität zu verleihen und die Integration in die Membran zu ermöglichen. Außerdem liegt die Sequenz ³³⁰KFSII³³⁴ unmittelbar N-terminal von der Polyalanin-Sequenz der ³³⁵⁻³⁴¹A-hP2X₅^{Δ342-349}-Mutante, so dass es auch vorstellbar wäre, dass einige dieser Aminosäuren ebenfalls in die Membran integriert werden und somit den Einfluss der Alanin-Sequenz ausgleichen.

5.1.7 Die Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten wird durch Aminosäuren an der Membran-Wasser-Grenze unterstützt

Überraschenderweise führte die Trunkierung der Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit auch dann zu einer Aggregation, wenn direkt nach der zweiten Transmembranregion ein Stopp-Codon eingeführt wurde, obwohl die C-terminale zytoplasmatische Region der P2X-Untereinheiten nicht zu ihrer Assemblierung beiträgt (Torres et al., 1999b), (P. Minko, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Trimerisierung wurde erst beobachtet, als die C-terminalen Aminosäuren ³⁶³KKR³⁶⁵ ebenfalls vorhanden waren. Positive Aminosäuren nahe der Grenze zur Membran sind dafür bekannt, dass sie überwiegend in zytoplasmisch gelegenen Bereichen von Membranproteinen vorkommen („positive inside rule“, (Von Heijne, 1989), (Bowie, 2005)). Darüber hinaus dienen Lysine dazu, die Positionierung der Transmembranhelix durch eine Verankerung zu unterstützen, indem sie elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide eingehen (Killian and Von Heijne, 2000). Diese Rolle von Lysininen als Anker in der Grenze zwischen Membran und wässriger Umgebung wurde insbesondere bei Versuchen mit synthetischen Transmembran-Peptiden deutlich. Hier ergab sich, dass Peptide, die von basischen Aminosäuren flankiert wurden, weniger aggregierten als Peptide ohne flankierende basische Aminosäuren (de Planque and Killian, 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass ausreichend lange und hydrophobe Peptide, die nur im C-terminalen Bereich ein Lysin besaßen, spontan eine transmembrane Orientierung einnahmen (Percot et al., 1999). Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass es verschiedene Mechanismen gibt, die die Rolle der Sequenz ³⁶³KKR³⁶⁵ bei der Assemblierung von C-terminal trunkierten hP2X₅-Untereinheiten erklären könnten. Da diese Sequenz in der nicht trunkierten Wildtyp-hP2X₅-Untereinheit aber keinen Einfluss auf das Assemblierungsvermögen hatte, ist sie wahrscheinlich nur von geringerer Bedeutung.

5.1.8 Der Einfluss der Aminosäuren-Seitenketten der zweiten Transmembranregion auf die Funktion des Ionenkanals

Eine detaillierte Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften der verschiedenen hP2X₅-Mutanten hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt. Daher wurden die in Oozyten exprimierte Konstrukte jeweils nur mit einer maximal aktivierenden Konzentration an ATP (1 mM) superfundiert und die maximalen Amplituden der Ströme aufgezeichnet.

Nach Alanin-Substitutionen in der äußeren Hälfte der zweiten Transmembranregion (³³⁷I-³⁵¹A) waren die Ströme lediglich reduziert, nicht völlig verschwunden, auch nicht, wenn die einzige polare Aminosäure in dieser Region, ³⁴²S, mutiert wurde. Diese Rezeptormutante ergab allerdings die Stromkurve mit der geringsten Amplitude. Die meisten Aminosäuren in dieser Region haben kleine Seitenketten (Glycin, Serin, Alanin), so dass die Substitution durch Alanin nur eine geringe Änderung der Volumina der Aminosäurereste hervorruft. Dagegen war die innere Hälfte der zweiten Transmembranregion (³⁵²F-³⁶¹L) empfindlich gegenüber der Substitution durch Alanin. Beide Alanin-Blockmutanten zeigten keine Funktion in TEVC-Messungen. Hier beinhaltet die native Sequenz überwiegend große Aminosäuren (Phenylalanin, Aspartat, Valin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin), so dass die Mutation zum kleinen Alanin eine erhebliche Veränderung in den Seitenketten bewirkt.

Die Blocksubstitutionen durch Leucin wurden weniger toleriert als die durch Alanin. Lediglich an der äußersten und der innersten Grenze (³³⁷IINVG³⁴¹ und ³⁵⁷VLIYL³⁶¹) der zweiten Transmembranregion waren die Leucin-Mutanten funktionell, wenn auch mit deutlich reduzierten Strömen. Diese beiden Regionen zeichnen sich durch einen hohen Anteil an großen hydrophoben Aminosäuren aus (Isoleucin, Valin, Leucin). Somit wird hier durch die Mutation zu Leucin keine allzu große Veränderung bewirkt. Im Inneren der zweiten Transmembranregion dagegen scheinen kleine Seitenketten wichtig zu sein. So ist für die rP2X₂-Untereinheit beschrieben, dass ³⁴²G und ³⁴⁴G eventuell Teil des Ionenkanal-Gates sind (Li et al., 2004), ähnlich wie bei K⁺-Kanälen, bei denen durch Glycine eine Art bewegliches Scharnier gebildet wird (Jiang et al., 2002), das an der Öffnung und Schließung der Kanalpore beteiligt ist. Nur einer dieser beiden Glycinreste ist in allen P2X-Isoformen konserviert (³⁴²G des P2X₂-Rezeptors, ³⁴⁸G des P2X₅-Rezeptors), aber in der zweiten Position (³⁴⁴G des P2X₂-Rezeptors, ³⁵⁰G des P2X₅-Rezeptors) befindet sich in fast allen anderen Isoformen ein Alanin (Abb. 5-1), das ebenfalls eine kleine Seitenkette hat, allerdings nicht so flexibel ist wie Glycin. Die einzige Ausnahme ist die P2X₆-Untereinheit, die in dieser Position ein Valin mit großer hydrophober Seitenkette hat. Ob dies einer der Gründe für die fehlende Fähigkeit zur

Ausbildung funktioneller Rezeptorkanäle von P2X₆-Untereinheiten ist, müsste untersucht werden.

Transmembranhelices können durch das Vorhandensein kleiner Aminosäuren ohne große Seitenketten die nötige Flexibilität besitzen, um Konformationsänderungen zur Öffnung der Pore zu ermöglichen (Curran and Engelman, 2003). Außerdem wäre es denkbar, dass nur die kleinen Aminosäuren eine ausreichend breite Kanalpore bilden, durch die Ionen strömen können. Somit hätte das Einbringen von Leucinresten einen erheblichen Einfluss auf die Funktionalität der hP2X₅-Rezeptoren.

Die einzige Aminosäuresequenz, die sowohl gegenüber der Substitution durch Alanin als auch der durch Leucin empfindlich war, war ³⁵²FFCDL³⁵⁶. Keine der beiden Blockmutanten war dazu in der Lage, in Oozyten funktionelle Rezeptoren auszubilden. Dies war ebenfalls der Fall, wenn lediglich ³⁵⁵D allein zu Alanin oder Leucin oder anderen Aminosäuren mutiert wurde. Selbst die konservierende Mutation zu Glutamat zerstörte die Funktionalität. Daraus folgt, dass ³⁵⁵D eine zweifach wichtige Aufgabe in hP2X₅-Rezeptoren ausübt. Zum einen stabilisiert es die Assemblierung der Untereinheiten, zum anderen ist es von essentieller Bedeutung für die Funktion der Ionenkanäle. Das Aspartat, das dem ³⁵⁵D in der hP2X₅-Untereinheit entspricht, ist in allen P2X-Isoformen konserviert (Abb. 5-1). Seine Wichtigkeit für die Funktionalität wurde bereits bei dem rP2X₂-Rezeptor beschrieben, bei dem eine D³⁴⁹A-Mutante in HEK-293-Zellen keine Funktion zeigte (Li et al., 2004). Zusätzlich konnte durch die Untersuchung der Zugänglichkeit von Cystein-Mutationen gezeigt werden, dass ³⁴⁹D in P2X₂-Rezeptoren auf der intrazellulären Seite des Kanal-Gates liegt (Rassendren et al., 1997), (Egan et al., 1998) und wahrscheinlich eine wichtige funktionelle Rolle spielt. Meine Ergebnisse stimmen auch gut mit denen eines Tryptophan-Scannings des rP2X₄-Rezeptors überein. Hier wurde beobachtet, dass nicht funktionelle Rezeptoren vor allem bei Tryptophan-Substitutionen in der inneren Hälfte der zweiten Transmembranregion auftraten (Silberberg et al., 2005), so dass bei dieser Region von einer großen Bedeutung für die Funktionalität ausgegangen werden kann. Ungeklärt ist bisher die Sekundärstruktur der zweiten Transmembranregion, aber es scheint wahrscheinlich, dass vor allem die innere Hälfte der zweiten Transmembranregion von rP2X₂ und rP2X₄-Rezeptoren keine α -helikale Struktur besitzt (Rassendren et al., 1997), (Egan et al., 1998), (Li et al., 2004), (Silberberg et al., 2005).

In der Abb. 5-2 sind die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen des hP2X₅-Rezeptors schematisch zusammengefasst. Aus meinen Ergebnissen über die strukturelle und funktionelle

Rolle, die ^{355}D für hP2X₅-Rezeptoren spielt, folgt, dass ^{355}D dazu dient, die Positionierung der inneren Hälfte der zweiten Transmembranregion während der Konformationsänderungen des Gatings zu kontrollieren und zu stabilisieren.

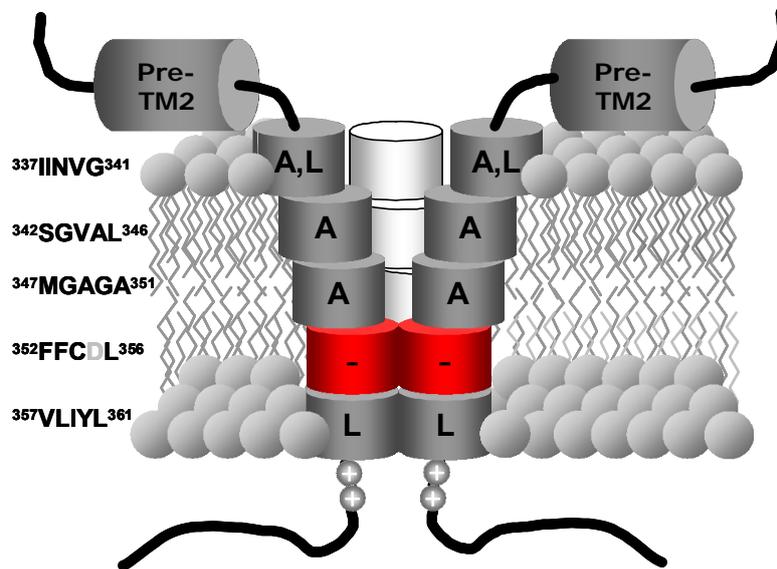


Abb. 5-2 Zusammenfassung der Auswirkungen der Blockmutationen auf die Funktionalität des hP2X₅-Rezeptors. Jeder Zylinder repräsentiert eine Block-Mutation von fünf Aminosäuren, deren native Sequenzen links angegeben sind. A bzw. L gibt an, welche Mutationen in funktionellen Rezeptoren resultierten. Die einzige Sequenz, die keine Mutation tolerierte, ist rot eingefärbt und enthält ^{355}D . Die Pluszeichen geben die Lage der positiv geladenen Aminosäuren an, die die Verankerung der zweiten Transmembranregion unterstützen (nach (Duckwitz et al., 2006)).

5.2 Assemblierung von rP2X₁-Untereinheiten

5.2.1 Die Transmembranregionen enthalten keine spezifischen Assemblierungsmotive

Die Ergebnisse für die zweite Transmembranregion der rP2X₁-Untereinheit entsprachen denen der hP2X₅-Untereinheit. Auch hier konnte durch Alanin-Scanning kein spezifisches Assemblierungsmotiv in der zweiten Transmembranregion identifiziert werden, während ihre Ausbildung für die Assemblierung essentiell war. Wegen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird die zweite Transmembranregion der rP2X₁-Untereinheit nicht ausführlicher diskutiert.

Die erste Transmembranregion der rP2X₁-Untereinheit verhielt sich etwas anders als die zweite. Die Alanin-Mutanten $^{41-45}\text{A-rP2X}_1$ und $^{46-50}\text{A-rP2X}_1$ zeigten eine deutlich schwächere ($^{41-45}\text{A-rP2X}_1$) beziehungsweise fehlende ($^{46-50}\text{A-rP2X}_1$) Assemblierung. Auch die Expression war bei beiden Mutanten erheblich schwächer als bei der Wildtyp-rP2X₁-Untereinheit, was

bei der ⁴¹⁻⁴⁵A-rP2X₁-Mutante die schwächere Trimer-Bande erklären könnte. Im Gegensatz zu den Alanin-Mutanten konnten die ⁴¹⁻⁴⁵L-rP2X₁ und ⁴⁶⁻⁵⁰L-rP2X₁-Mutanten erheblich besser assemblieren, und auch die Expression war deutlich verbessert.

Diese Beobachtung kann damit begründet werden, dass Leucin als stark hydrophobe Aminosäure besser als Teil einer Transmembranregion erkannt wird als Alanin. Die Wichtigkeit einer ausreichenden Hydrophobizität hatten bereits meine Ergebnisse für die hP2X₅-Untereinheit ergeben. Dass die Alanin-Mutationen bei der zweiten Transmembranregion ohne Einfluss auf die Assemblierung blieben, könnte daran liegen, dass die zweite Transmembranregion zwei Aminosäuren länger ist als die erste und somit eventuell nicht jede Aminosäure zum Durchspannen der Membran notwendig ist. Ein Blick in die Sequenz der ersten Transmembranregion zeigt, dass in der zweiten Hälfte (Aminosäuren 43-51) überwiegend große hydrophobe Aminosäuren vorhanden sind (Leucin, Valin, Tryptophan, Abb. 5-3). Somit kann die Mutation zum kleinen Alanin hier einen großen Einfluss haben. Wird die erste Transmembranregion nicht korrekt ausgebildet, so kommt es zu einer Fehlfaltung des Proteins, wodurch die fehlende Trimerisierung und die schwache Expression der ⁴⁶⁻⁵⁰A-rP2X₁-Mutante erklärt werden könnten. Diese Theorie könnte zum Beispiel durch Glykosylierungsversuche überprüft werden.

```

hP2X5      25KNKKVGLLYRLLQASILAYLVVWVFLIKKGYQDVDT60
rP2X1      25RNKKVGVIFRLIQLVVLVYVIGWVVFVYEKGYQTSSD60
rP2X2      25RNRRLGFVHRMVQLLILLYFVWYVFIVQKSYQDSET60
rP2X3      19KSWTIGIINRAVQLLIISYFVGWVFLHEKAYQVRDT54
rP2X4      24RSRKVGLMNRAVQLLILAYVIGWVVFWEKGYQETDS59
rP2X5      25KSKKVGLLYRVLQLIILLYLLIWWVFLIKKSYQDIDT60
rP2X6      26RNCWVGISQRLQLGVVVYVIGWALLAKKGYQEWD61
rP2X7      22QSVNYGTIKWILHMTVFSYVS-FALMSDKLYQRKEP56

```

Abb. 5-3 Alignment der hP2X₅-Untereinheit sowie der P2X-Isoformen der Ratte. Dargestellt ist die Region um die erste Transmembranregion. Die erste Transmembranregion ist hellgrau hinterlegt. In allen Isoformen konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau hinterlegt.

Allerdings wurde bereits in früheren Studien mit P2X₂-Untereinheiten beobachtet, dass die Expression deutlich zurückging, wenn ⁴³Y und ⁴⁴F einzeln zu Alanin mutiert wurden (Li et al., 2004), (Khakh and Egan, 2005). Außerdem wurde für die V⁴⁵A-rP2X₂-Mutante kein beziehungsweise nur ein sehr geringer Strom gemessen. Diese Aminosäuren entsprechen ⁴³Y, ⁴⁴V und ⁴⁵I in der rP2X₁-Untereinheit. Da schon die Mutation einzelner Aminosäuren diesen

Effekt erzeugte, schien es unwahrscheinlich, dass die schwache Expression der ⁴¹⁻⁴⁵A-rP2X₁-Mutante durch die fehlende Gesamthydrophobizität begründet werden kann. Die Substitution durch Leucin verbesserte die Expression allerdings erheblich, so dass ein Einfluss der Hydrophobizität aber dennoch nahe liegt. Eine besondere Schlüsselrolle könnte ⁴³Y spielen, da diese Aminosäure in allen Isoformen konserviert ist (Abb. 5-3). Auch für die Y⁴⁷A- und die V⁵¹A-rP2X₂-Mutante, die ⁴⁷W und ⁵¹Y in der rP2X₁-Untereinheit entsprechen, waren keine Ströme messbar.

In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass HEK-293-Zellen, die ⁴³A- oder ⁴⁴A-P2X₂-Rezeptoren exprimierten, schneller starben als Zellen mit anderen Rezeptormutanten (Li et al., 2004). Dies wurde mit einer ständigen Aktivität der Ionenkanäle auch in Abwesenheit von ATP begründet. Aus den Daten wurde geschlossen, dass ⁴³Y und ⁴⁴F eine wichtige Rolle bei den Konformationsänderungen während des Gatings der P2X₂-Rezeptoren spielen und die Alanin-Substitutionen den offenen Zustand des Ionenkanals stabilisierten oder den geschlossenen Zustand destabilisierten. Auch bei der P2X₄-Untereinheit ergab sich ein ähnliches Resultat für die Y⁴²A-Mutante (Silberberg et al., 2005). Hier wurde als weitere Erklärungsmöglichkeit für die gesteigerte Konduktivität dieses Rezeptorkanals das Fehlen der großen Seitenkette und damit eine größere Durchlässigkeit des Ionenkanals aufgeführt. Ein schnelles Absterben der Zellen durch die ständigen starken Ionenströme könnte auch die schwache Expression der ⁴¹⁻⁴⁵A-rP2X₁-Mutante erklären. In meinen Experimenten unterschied sich die Qualität der Zellen, die die ⁴¹⁻⁴⁵A-rP2X₁-Mutante exprimierten, allerdings nicht von denen, die andere Mutanten exprimierten.

Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der rP2X₁- und hP2X₅-Untereinheiten geben die oben aufgeführten Hypothesen allerdings nicht. Abb. 5-3 zeigt, dass die großen hydrophoben Aminosäuren in der äußeren Hälfte der ersten Transmembranregion in fast allen Isoformen konserviert sind (Ausnahme: P2X₆ und P2X₇). Dies gilt auch für die hP2X₅-Untereinheit. Somit ist unverständlich, warum die Mutation des konservierten ⁴³Y hier nicht zu einer verminderten Expression führte und die ⁴⁶⁻⁵⁰L-hP2X₅-Mutante nicht besser assemblierte. Dieses Phänomen müsste mit weiteren Mutanten genauer untersucht werden.

Zusammenfassend kann nach der Untersuchung der ersten Transmembranregion der rP2X₁-Untereinheit festgestellt werden, dass hier wahrscheinlich ebenfalls kein Assemblierungsmotiv zu finden ist. Die Alanin-Mutationen, die zu einer verminderten Trimerisierung oder Expression führten, scheinen eher strukturelle oder funktionelle Einflüsse zu haben, ohne direkt in einem Assemblierungsmotiv lokalisiert zu sein. In der Literatur ist

nur ein Hinweis auf eine Beteiligung der ersten Transmembranregion bei der Assemblierung von P2X-Untereinheiten zu finden. Allerdings wurde dies nicht weiter ausgeführt und auch die fünf Aminosäuren, die als eventuell wichtig erkannt worden waren, nicht benannt (Egan et al., 2004). Eine weitere Studie, die sich mit der ersten Transmembranregion auseinandergesetzt hatte, schloss eine Rolle bei der Assemblierung aus (Torres et al., 1999b). Und wie bei der zweiten fehlen auch in der ersten Transmembranregion, die nur eine in allen Isoformen konservierte Aminosäure besitzt (Abb. 5-3) und höchstwahrscheinlich eine α -Helix darstellt (Silberberg et al., 2005), (Li et al., 2004), bekannte, in anderen Proteinen häufig auftretende Assemblierungsmotive. Somit erscheint ein Anteil der ersten Transmembranregion an der Trimerisierung von P2X-Untereinheiten im Sinne eines Assemblierungsmotives unwahrscheinlich. Da allerdings in Cystein-Crosslinking-Versuchen festgestellt worden war, dass $V^{48}C$ und $I^{329}C$ (Nummerierung bezogen auf die P2X₁-Untereinheit) eine Disulfidbrücke ausbilden können (Jiang et al., 2003), also in großer räumlicher Nähe zueinander liegen, ist nicht ganz auszuschließen, dass ^{48}V zu der Trimerisierung beiträgt. Dies müsste genauer untersucht werden.

5.2.2 Ektodomänen-Konstrukte der rP2X₁-Untereinheit assemblieren nicht nur über nicht kovalente Wechselwirkungen

Die Ektodomänen-Konstrukte waren von besonderem Interesse für die Untersuchung von P2X-Rezeptoren, da die Hoffnung bestand, lösliche Teilstrukturen der Rezeptoren exprimieren zu können, die in der Lage sind, zu trimerisieren.

Die Expression von ^{NCAM-Ecto}rP2X₁-Konstrukten führte allerdings nicht zu definierten Trimeren, sondern zu Multimeren mit diversen oligomeren Zuständen. Die Denaturierung der nativen Proben sowie die Analyse durch SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen ergab eine mögliche Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei und eventuell mehr der ^{NCAM-Ecto}rP2X₁-Konstrukte zu höhermolekularen Oligomerisierungszuständen. Nun stellte sich die Frage, wie diese Disulfidbrückenbildung zustande gekommen sein könnte. Die Ektodomänen enthalten zehn Cysteine, die wahrscheinlich alle in fünf Disulfidbrücken innerhalb einer Untereinheit eingebunden sind (Ennion and Evans, 2002a), (Clyne et al., 2002b), so dass es bei einer nativen Faltung der ^{NCAM-Ecto}Polypeptide keine freien Cysteine geben dürfte, die miteinander reagieren könnten. Es könnte aber sein, dass durch das Fehlen der Transmembranregionen eine Fehlfaltung der Proteine bewirkt wird, die zu ungepaarten Cysteinen führt, die wiederum mit freien Cysteinen von Nachbaruntereinheiten reagieren könnten. Es wäre auch möglich, dass die Polypeptide wegen der Ausbildung der fünf Disulfidbrücken so stabil sind, dass nicht kovalente

Wechselwirkungen zwischen den Polypeptiden durch SDS nicht ganz zerstört werden können und eine vollständige Dissoziation erst nach der Reduktion der Disulfidbrücken möglich ist. Die Frage, ob alle Cysteine in Disulfidbrücken gepaart sind oder auch freie vorliegen, könnte durch die Reaktion mit thiolreaktiven Reagenzien, zum Beispiel mit pegylierten Maleimiden (Lu and Deutsch, 2001), untersucht werden. Außerdem könnten Cystein-freie Mutanten der ^{NCAM-Ecto}Konstrukte Auskunft über die Wichtigkeit der Disulfidbrücken für die Faltung und Stabilität der Oligomere geben.

5.2.3 Ohne die Transmembranregionen findet keine effiziente Trimerisierung von rP2X₁-Untereinheiten statt

Durch die Versuche mit den ^{NCAM-Ecto}rP2X₁-Konstrukten wurde das Ergebnis der hP2X₅- und rP2X₁-Studien bestätigt, dass ohne die Transmembranregionen keine effiziente Trimerisierung stattfinden kann. Auch das Einfügen einer, im Falle des ^{NCAM-Ecto}rP2X₁⁵²⁻³⁶⁷-Konstruktes der zweiten Transmembranregion verbesserte die Assemblierung nicht, ebenso wenig wie trunkierte rP2X₁- oder hP2X₅-Untereinheiten ohne die zweite Transmembranregion assemblieren konnten. Die Wichtigkeit von Transmembranregionen für die Oligomerisierung wurde bereits bei anderen Membranproteinen beobachtet. So konnten zum Beispiel trunkierte N-terminale Domänen von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren vom Muskeltyp der Maus und des Menschen erst assemblieren und α -Bungarotoxin binden, wenn die gesamte erste Transmembranregion ebenfalls vorhanden war (Wang et al., 1996), (Person et al., 2005).

Somit erscheint es schwierig, lösliche Teilstrukturen der P2X-Untereinheiten zu exprimieren, die nativ gefaltet und damit in der Lage sind, zu assemblieren und ATP zu binden. Es gäbe aber noch die Möglichkeit, nach der Expression der nativen Rezeptoren die Transmembranregionen über eingefügte spezifische Erkennungssequenzen für proteolytische Enzyme abzuspalten und so die assemblierten, nativ gefalteten Ektodomänen in löslicher Form zu erhalten. Dies wurde zum Beispiel für den α 7-nAChR beschrieben (Wells et al., 1998). Diese Methode könnte sich aber auch als nicht anwendbar erweisen, da das Alanin-Scanning der Ektodomäne ergeben hatte, dass gerade die Regionen der Ektodomäne, die die Transmembranregionen flankieren, wichtig für die Assemblierung sind. Somit könnte hier das Einfügen von Schnittstellen für proteolytische Enzyme die native Faltung der P2X-Untereinheiten stören. Eine weitere mögliche Methode, assemblierte Ektodomänen ohne die Transmembranregionen zu erhalten, wäre die Konstruktion von Konkatameren, in denen drei Ektodomänen miteinander verbunden sind. Ob solche Konstrukte nativ gefaltet wären, ist aber

nicht vorherzusagen und müsste zum Beispiel durch ATP-Bindungsversuche oder Trypsin-Resistenzanalysen untersucht werden.

5.2.4 Die Ektodomäne enthält multiple Assemblierungsdomänen

Bei vielen multimeren Membranproteinen wird die Oligomerisierung größtenteils durch die Interaktion der Transmembranregionen vermittelt. Dies ist zum Beispiel bei der Dimerisierung von Glycophorin A (Lemmon et al., 1992) oder der Tetramerisierung des M2-Protonenkanals von Influenzaviren (Kochendoerfer et al., 1999) der Fall. Aber auch die extrazellulären Bereiche vieler Ionenkanäle tragen zu der Assemblierung ihrer Untereinheiten bei. So wurden zum Beispiel bei den pentameren Cys-loop-Rezeptoren wie dem nAChR (Chavez et al., 1992), (Sugiyama et al., 1996), dem GABA_A-Rezeptor (Hackam et al., 1997) oder dem GlyR (Griffon et al., 1999) Regionen in den extrazellulären N-terminalen Domänen identifiziert, die an der Homo- und Heterooligomerisierung beteiligt sind. Auch bei ionotropen Glutamat-Rezeptoren wie NMDA- oder AMPA-Rezeptoren sind Teile der extrazellulären ATD-Domäne und der S1S2-Ligandenbindungsdomäne an der Assemblierung der Untereinheiten in Tetramere beteiligt (Armstrong and Gouaux, 2000), (Meddows et al., 2001), (Ayalon and Stern-Bach, 2001). Somit war es nicht überraschend, dass das Alanin-Scanning der Ektodomäne der rP2X₁-Untereinheit eine maßgebliche Beteiligung dieser Domäne an der Trimerisierung der Untereinheiten ergab.

Die Ektodomäne der P2X₁-Untereinheit umfasst die Aminosäuren ⁵²E bis ³³⁴T. Das Alanin-Scanning ergab vier große Regionen, in denen das Ersetzen der nativen Aminosäuren in Blöcken durch Alanin eine fehlende oder stark eingeschränkte Assemblierung zur Folge hatte. Dies waren die Aminosäuren 54-73, 181-204, 218-278 und 304-330. Darüber hinaus waren vier kleinere Bereiche auffällig, die die Aminosäuren 104-108, 145-150 und 157-169 und 291-295 (sehr schwach assemblierend) umfassten. Die ¹⁰⁴⁻¹⁰⁸A-rP2X₁-Mutante zeigte allerdings keine Expression, so dass sich hier keine Aussage über die Assemblierung oder die Funktion machen ließ. Der Grund für die fehlende Expression müsste durch Einzelmutanten geklärt werden.

In den meisten Fällen stimmten die Ergebnisse für die Trimerisierung mit denen der Funktionsprüfungen überein, das heißt, dass eine fehlende Assemblierung mit einer fehlenden Funktion zusammenfiel. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da zur Ausbildung funktioneller Rezeptorkanäle eine Trimerisierung der Untereinheiten notwendig ist. Aber diese Übereinstimmung trat nicht immer auf. Die schwache Funktionalität bei guter Assemblierung der ²⁹⁶⁻²⁹⁹ArP2X₁-, der ³⁰⁰⁻³⁰³A- und der ³³¹⁻³³⁵A-rP2X₁-Mutanten muss andere Gründe haben.

Die 296-299- und 300-303-Viererblöcke liegen in der Nähe von Aminosäuren, die eventuell an der ATP-Bindung beteiligt sind (^{292}R und ^{309}K ; (Roberts and Evans, 2004), (Ennion et al., 2000)). Es ist möglich, dass die Alanin-Mutationen die Struktur in dieser Region so stark verändert haben, dass die ATP-Bindung behindert wurde, wodurch die sehr schwache Funktionalität bewirkt worden sein könnte. Die Aminosäuren 331-335 liegen N-terminal von und in der zweiten Transmembranregion. Mutationen in dieser Region könnten die Konformationsänderungen während des Gatings beeinflussen (Silberberg et al., 2005) und so die Funktionalität des Ionenkanals behindern. Allerdings hatten Alanin-Mutationen in der entsprechenden Region der hP2X₅-Untereinheit keine so starke Abnahme der Ströme zur Folge. Somit ist das potentielle funktionell wichtige Motiv, das sich hier im P2X₁-Rezeptor befindet, nicht in allen Isoformen konserviert.

Die Region N-terminal von den Aminosäuren 331-335 dagegen hat sowohl auf die Assemblierung als auch auf die Funktionalität der P2X₁-Rezeptoren Einfluss. Dieser Bereich (Aminosäuren 288-329 der P2X₁-Untereinheit) ist in allen P2X-Isoformen stark konserviert (Abb. 5-1), so dass eine nähere Untersuchung nahe liegt, um die genauen Funktionen der einzelnen Aminosäuren zu bestimmen. Die Nähe zur Kanalpore lässt wieder auf einen Einfluss auf das Gating schließen, aber auch die Trimerisierung wird hier stark beeinflusst. Der lipophile Bereich zwischen ^{310}V und ^{323}A wurde früher als „reentry-loop“ diskutiert (Brake et al., 1994). Wegen der Hydrophobizität könnte hier die Assemblierung über hydrophobe Interaktionen stabilisiert werden.

Wie bereits erwähnt, müssten die Bereiche, in denen funktionelle Rezeptor-Mutanten bei augenscheinlich fehlender Assemblierung vorliegen, durch Oberflächenmarkierung untersucht werden. So könnte überprüft werden, ob neben dem überwiegenden aggregierten Anteil an Protein, der im ER verbleibt, ein geringer Anteil, der als Trimer assembliert, an die Oberfläche transportiert wird und dort funktionelle Kanäle ausbildet. Funktionelle Kanäle setzen generell eine Trimerisierung voraus, so dass man in diesen Fällen nur von schwach assemblierenden anstelle von nicht assemblierenden Konstrukten sprechen muss. Diese schwache Assemblierung ist aber auch von Interesse, da sie auf eine gestörte Interaktion der Untereinheit schließen lässt, die durch die Alanin-Mutation bewirkt wird.

Aminosäuren, die in bisherigen Studien mit verschiedenen Isoformen als eventuell wichtig für die ATP-Bindung identifiziert wurden, sind ^{68}K , ^{70}K , ^{185}F , ^{291}F , ^{292}R und ^{309}K (P2X₁-Nummerierung) (Jiang et al., 2000b), (Roberts and Evans, 2004), (Ennion et al., 2000), (Marquez-Klaka et al., 2007). Somit überrascht es nicht, dass die Block-Mutationen 66-72,

181-186 und 291-295 in der rP2X₁-Untereinheit die Ausbildung funktioneller Rezeptoren verhinderten und die ³⁰⁸⁻³¹²A-rP2X₁-Mutante nur schwache Ströme vermittelte. Erstaunlicherweise aber trimerisierten diese rP2X₁-Mutanten zusätzlich auch nur schwach. Diese starke Übereinstimmung von Funktion und Assemblierung spricht für eine Kollokalisierung von Assemblierungsdomänen und ATP-Bindungsstellen. Die ATP-Bindungsstelle wird zwischen zwei Untereinheiten vermutet (Marquez-Klaka et al., 2007), (Wilkinson et al., 2006), (Nagaya et al., 2005). Somit könnte es möglich sein, dass zumindest einige Assemblierungsdomänen in der Nähe der ATP-Bindungsstellen liegen, da der Abstand zwischen den Untereinheiten in der Umgebung der Ligandenbindungsstelle nicht zu groß sein darf. Cystein-Crosslinking-Versuche haben bereits eine große räumliche Nähe zwischen ⁶⁸K und ²⁹¹F in der rP2X₁-Untereinheit gezeigt (Marquez-Klaka et al., 2007). Außerdem könnten Alanin-Mutationen eine Veränderung der Struktur in der Nähe der ATP-Bindungsstelle hervorrufen, die dazu führt, dass Assemblierungsdomänen nicht mehr interagieren können. Auch die Aminosäuren ¹⁸⁶T, ²⁰⁴N und ²⁰⁹N tragen eventuell zur ATP-Bindung bei (Roberts J.A. and Evans R.J., 2006). Dies würde die fehlende Funktion der ¹⁸¹⁻¹⁸⁶A- und der ¹⁹⁹⁻²⁰⁴A-rP2X₁-Mutanten erklären, wohingegen die ²⁰⁵⁻²¹⁰A-rP2X₁-Mutante funktionell war. Von Bedeutung ist darüber hinaus ²⁷²P, das die ATP-Bindung beeinflusst (Roberts and Evans, 2005). Die ²⁷¹⁻²⁷⁴A-rP2X₁-Mutante war weder funktionell noch trimerisierungsfähig, so dass ²⁷²P nicht nur für die ATP-Bindung, sondern auch für die Assemblierung wichtig zu sein scheint. Auch andere Alanin-Mutationen in Prolin-haltigen Regionen der rP2X₁-Untereinheit waren nicht oder nur sehr schwach funktionell oder assemblierungsfähig (¹⁶⁴⁻¹⁶⁹A, ¹⁹³⁻¹⁹⁸A, ²²⁴⁻²³⁰A und ³²⁵⁻³³⁰A). Die Studie von Roberts und Evans (Roberts and Evans, 2005) hatte allerdings mit Ausnahme von ²⁷²P bei keinem Prolin in der Ektodomäne der hP2X₁-Untereinheit eine essentielle Funktion für die Rezeptorkanäle feststellen können. Somit wären Einzelmutanten notwendig, um die Rolle der Prolin in den nicht funktionellen beziehungsweise nicht assemblierenden Mutanten zu untersuchen. Allgemein kann die ringförmige Iminosäure Prolin die Struktur von Proteinen stark beeinflussen. Eine Mutation zu Alanin könnte große strukturelle Veränderungen und damit den Abstand von Assemblierungsdomänen und/oder Regionen, die an der ATP-Bindung beteiligt sind, bewirken. In einer weiteren Studie wurde der C-terminale Bereich der Ektodomäne der P2X₄-Untereinheit mit der bekannten Struktur der Klasse-II-Aminoacyl-tRNA-Synthase, die, basierend auf Sequenzvergleichen und Strukturvorhersagen, Ähnlichkeiten mit P2X-Rezeptoren aufweisen soll (Freist et al., 1998), verglichen, um Informationen über die ATP-Bindungsstelle zu erhalten (Yan et al., 2005). Hier zeigte sich eine mögliche Beteiligung der

Aminosäuren ¹⁹⁰K, ²³⁰F, ²⁸⁰D und ²⁷⁸R an der Ligandenbindung. Dies entspricht in der rP2X₁-Untereinheit den Aminosäuren ¹⁹⁰K, ²³⁰F, ²⁷⁸G und ²⁸⁰Y. Die Ergebnisse meines Alanin-Scannings waren in diesen Regionen nicht eindeutig. Während die ¹⁸⁷⁻¹⁹²A- und die ²²⁴⁻²³⁰A-rP2X₁-Mutanten kaum funktionell waren und scheinbar nicht assemblierten, war die ebenfalls scheinbar nicht assemblierende ²⁷⁵⁻²⁷⁸A-rP2X₁-Mutante funktionell und die ²⁷⁹⁻²⁸²A-rP2X₁-Mutante assemblierte und war funktionell.

Die fehlende Assemblierung der ⁵⁴⁻⁵⁹A-rP2X₁-Mutante konnte in früheren Experimenten bereits auf die Mutation der beiden Aminosäuren ⁵⁵Y und ⁵⁶Q zurückgeführt werden (P. Minko, G. Schmalzing, unveröffentlichte Ergebnisse). Beide Aminosäuren sind in allen P2X-Isoformen konserviert (Abb. 5-3). Es sind polare Aminosäuren, die in der Lage sind, über ihre Seitenketten Wasserstoffbrücken auszubilden. Alanin dagegen kann über seine Seitenkette keine Wasserstoffbrücken ausbilden. Da Wasserstoffbrücken bei der Interaktion von Peptiden eine große Rolle spielen (Pace et al., 2001), könnte hier der Grund für die fehlende Trimerisierung der ⁵⁴⁻⁵⁹A-rP2X₁-Mutante liegen. Dieser Grund könnte allgemein bei allen Mutanten aufgeführt werden, die polare Aminosäuren enthalten. Geladene Aminosäuren können zudem über Salzbrücken miteinander agieren. Auch hydrophobe Bereiche können zu einer Assemblierung beitragen. In der polaren Umgebung des Extrazellulärraumes tendieren apolare Regionen zur Assoziation. Außerdem sind apolare Aminosäuren oft im Inneren eines löslichen Proteins verborgen, um die Kontaktfläche mit der polaren Umgebung zu minimieren. Die Faltung solcher Regionen ist sehr empfindlich gegenüber Mutationen (Pace et al., 2001), (Xu et al., 1998). Um einzelne Aminosäuren oder Regionen zu identifizieren, die für die Trimerisierung von P2X-Untereinheiten wichtig sind, ist es daher notwendig, Einzelmutanten herzustellen. Sind auf diese Weise einzelne wichtige Aminosäuren identifiziert, wäre der nächste Schritt das Zuordnen von Interaktionspartnern. Es muss auch unterschieden werden zwischen Interaktionen innerhalb einer Untereinheit, die die native Faltung stabilisieren und auf diesem Wege die Assemblierung unterstützen, und Interaktionen zwischen benachbarten Untereinheiten, die direkt zur Trimerisierung beitragen.

5.3 Assemblierung von Chimären zwischen rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten

Die Herstellung von chimären Konstrukten durch das Verbinden von Teilstrukturen ähnlicher Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften ist eine bewährte Methode, um auf relativ einfache Weise spezifische Proteineigenschaften zu identifizieren. So kann die Lokalisation funktioneller Proteindomänen oder der Einfluss verschiedener Proteinbereiche auf das

Verhalten dieses Proteins bestimmt werden. Auch bei der Untersuchung von P2X-Rezeptoren wurden schon chimäre Konstrukte eingesetzt, um Proteindomänen zu identifizieren, die bei der Ligandenbindung (Zemkova et al., 2004), dem Gating (Haines et al., 2001a), (Zemkova et al., 2004), der Agonisten-Selektivität (Koshimizu et al., 2002), der Deaktivierung (Rettinger and Schmalzing, 2004), der Desensibilisierung (Werner et al., 1996), (Koshimizu et al., 2002) und der Assemblierung (Torres et al., 1999b) eine Rolle spielen.

Wegen des sehr unterschiedlichen Assemblierungsverhaltens der sonst verhältnismäßig ähnlichen rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten (46,8% Identität in Ektodomänen und Transmembranregionen, (North, 2002)) versuchte ich, diese Frage durch die Konstruktion von rP2X₁/rP2X₆-Chimären anzugehen. Da die rP2X₁-Untereinheit grundsätzlich mit der rP2X₆-Untereinheit koassemblieren kann (Torres et al., 1999a), sollte eine ausbleibende Trimerisierung einer rP2X₁/rP2X₆-Chimäre nicht auf einer Unfähigkeit der Koassemblierung begründet sein. Die Tatsache, dass weder die rP2X₁-rP2X₆- noch die rP2X₆-rP2X₁-Chimäre in der Lage war zu trimerisieren, ließ darauf schließen, dass beide Hälften der Ektodomäne für die Assemblierung wichtig sind. Dieses Ergebnis passt auch zu den durch Alanin-Scanning bestimmten Assemblierungsdomänen (Abb. 4-39), die in beiden Hälften der Ektodomäne lokalisiert sind. Eventuell könnte eine Assemblierung von rP2X₁-rP2X₆- und rP2X₆-rP2X₁-Chimären aber möglich sein, wenn die Grenze nicht mittig in der Ektodomäne, sondern weiter N- oder C-terminal wäre. Da die Lokalisation der Interaktionspunkte aber nicht bekannt ist, müssten mehrere Chimären generiert werden, um diese Frage zu klären.

Die Trimerisierung der rP2X₆-P2X₁-rP2X₆-Chimäre ist ein weiterer Beleg für die wichtige Funktion der Ektodomäne bei der Assemblierung von P2X-Untereinheiten. Da in diesem Konstrukt die zytosolischen N- und C-terminalen Domänen sowie die Transmembranregionen von der rP2X₆-Untereinheit stammten, können diese Bereiche die fehlende Trimerisierung von rP2X₆-Untereinheiten nicht erklären. Diese Schlussfolgerung steht in Widerspruch zu den Ergebnissen von Torres und Mitarbeitern (Torres et al., 1999b). In deren Studie konnte eine rP2X₁-rP2X₃-rP2X₁-Chimäre, nicht aber eine rP2X₃-rP2X₁-rP2X₃-Chimäre mit rP2X₆-Untereinheiten koimmunopräzipitieren. Daraus wurde geschlossen, dass die spezifische Assemblierungsinformation nicht in der Ektodomäne liegt, sondern in den Transmembranregionen, da rP2X₁-, aber nicht rP2X₃-Untereinheiten mit rP2X₆-Untereinheiten koassemblieren können (Torres et al., 1999a). Weitere Experimente schlossen eine Beteiligung der ersten Transmembranregion aus. Die Ergebnisse einer späteren Studie mit chimären Konstrukten, in der jeweils nur die zweite Transmembranregion der P2X₂-Untereinheit durch die zweite Transmembranregion der P2X₆-Untereinheit (2.6) oder

umgekehrt (6.2) ersetzt wurde, sprachen allerdings nicht für eine alleinige Beteiligung der zweiten Transmembranregion an der spezifischen Assemblierung (Egan et al., 2004). Die 2.6-Mutante bildete funktionelle Rezeptoren aus und konnte mit P2X₂-Untereinheiten, nicht aber mit P2X₃- oder P2X₆-Untereinheiten koassemblieren. Somit besaß sie das Oligomerisierungsverhalten der P2X₆-Untereinheit (Koassemblierung mit P2X₂-Untereinheiten, keine Koassemblierung mit P2X₃- oder P2X₆-Untereinheiten (Torres et al., 1999a)), ohne dabei wie diese keine funktionellen Rezeptoren bilden zu können. Die 6.2-Mutante dagegen war nicht funktionell und assemblierte nicht. Daraus wurde geschlossen, dass die zweite Transmembranregion trotz einer wichtigen Rolle bei der Isoform-spezifischen Oligomerisierung nicht allein für die Trimerisierung verantwortlich ist, sondern auch andere Domänen bei der Assemblierung der Untereinheiten eine Rolle spielen. Diskutiert wurde hier eine unterstützende Beteiligung der ersten Transmembranregion oder der C-terminalen Region der Ektodomäne an der Assemblierung.

Da meine Ergebnisse aus den Versuchen mit den Chimären ebenso wie aus dem Alanin-Scanning aber sehr eindeutig waren, ist davon auszugehen, dass die spezifischen Assemblierungsdomänen von P2X₆-Untereinheiten in der Ektodomäne lokalisiert sind. Diese Hypothese könnte nun durch weitere Versuche, die die genaue Lokalisation dieser Domänen bestimmen, verifiziert werden. In einem ersten Ansatz hatte aber das Ersetzen der rP2X₁-Aminosäuren der Region 277-287 durch die entsprechenden rP2X₆-Aminosäuren für diese Region keine Beteiligung an der Assemblierung ergeben. Schaut man sich aber die Ergebnisse des Alanin-Scannings für diese Region an, ist dieses Ergebnis erklärbar. Die ²⁷⁹⁻²⁸²A-rP2X₁-, die ²⁸³⁻²⁸⁶A-rP2X₁- und die ²⁸⁷⁻²⁹⁰rP2X₁-Untereinheit trimerisierten und waren funktionell (Abb. 4-38A,B, Spuren 51-53). Die ²⁷⁵⁻²⁷⁸A-rP2X₁-Untereinheit war ebenfalls funktionell, wenn scheinbar auch nicht assemblierend (Spur 50). Somit wäre es wahrscheinlich sinnvoller, sich bei der Planung weiterer Mutanten auf die Regionen zu konzentrieren, die schon als wichtig für die Assemblierung identifiziert worden sind. Neben der Konstruktion weiterer P2X₁-rP2X₆-Chimären wäre auch gezielte Mutagenese ein denkbarer Ansatz. Durch den Austausch von beim Alanin-Scanning der Ektodomäne der rP2X₁-Untereinheit identifizierten Assemblierungsdomänen zwischen verschiedenen P2X-Isoformen wäre dann eine Aussage darüber möglich, welche Domänen oder Aminosäuren für die allgemeine Trimerisierung und welche für die spezifische Homo- oder Heteroassemblierung verantwortlich sind.

Auch die fehlende Funktion von rP2X₆-Untereinheiten wird weiterhin Gegenstand von Experimenten sein. Die Deglykosylierung der verschiedenen rP2X₁/rP2X₆-Chimären und Wildtyp-Untereinheiten hatte ergeben, dass die nicht trimerisierenden Konstrukte keine

Komplex-Glykosylierung erworben haben. Die aggregierenden und möglicherweise fehlgefalteten Proteine gelangten somit nicht an die Zellmembran. Die Komplex-Glykosylierung der nicht funktionellen rP2X₁-rP2X₆-rP2X₁-Chimäre lässt vermuten, dass ein fehlender Transport der assemblierten Proteine als Grund für die fehlende Funktion nicht in Frage kommt. Am sinnvollsten wäre es nach den Ergebnissen mit der rP2X₁-rP2X₆-rP2X₁-Chimäre, den Grund für die fehlende Funktion in den Regionen zu suchen, die in dieser Chimäre von der rP2X₆-Untereinheit stammen, also in den zytosolischen Bereichen, den Transmembranregionen oder der Region C-terminal von der zweiten Transmembranregion.

6. Zusammenfassung

P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Kationenkanäle, die durch extrazelluläres ATP aktiviert werden. Sie sind im gesamten Organismus sowohl in neuronalen als auch in nicht neuronalen Zellen weit verbreitet und erfüllen wichtige physiologische Funktionen, von der schnellen synaptischen Transmission im zentralen, peripheren und enterischen Nervensystem bis zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Immunzellen. Es wurden sieben Isoformen kloniert (P2X₁-P2X₇), die eine gemeinsame Topologie besitzen, bestehend aus intrazellulären N- und C-Termini, zwei Transmembranregionen und einer großen Ektodomäne, die N-glykosyliert ist und fünf konservierte Disulfidbrücken enthält. Um funktionelle Ionenkanäle ausbilden zu können, müssen P2X-Untereinheiten in Homo- oder Heterotrimere assemblieren.

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war das Identifizieren von Proteindomänen, die zu der Trimerisierung von P2X-Untereinheiten beitragen. Hierzu diente in erster Linie die hP2X₅-Untereinheit, der durch Herausspleißen von Exon 10 eine Region fehlt, die in der Literatur als eventuell wichtig für die Assemblierung beschrieben wird. Exon 10 kodiert 22 Aminosäuren, die in der distalen Ektodomäne und der äußeren Hälfte der zweiten Transmembranregion liegen. Das Fehlen dieser Aminosäuren führt zu Untereinheiten, die nicht in der Lage sind, zu trimerisieren und funktionelle Ionenkanäle auszubilden.

Durch das schrittweise Einsetzen der von Exon 10 kodierten Aminosäuren in die hP2X₅-Untereinheit sowie die Expression verschiedener Alanin-Mutanten mit nachfolgender Analyse durch Blaue-Native-PAGE konnte gezeigt werden, dass das fehlerhafte Assemblierungsverhalten der hP2X₅-Untereinheit in erster Linie durch das Fehlen der äußeren Hälfte der zweiten Transmembranregion bewirkt wird. Zusätzliche gezielte Mutationen und die Konstruktion von Deletionsmutanten ergaben weiterhin, dass die zweite Transmembranregion vornehmlich als hydrophober Membrananker dient, um die korrekte Topologie und Positionierung von Assemblierungsdomänen zu gewährleisten, ohne selbst spezifische Assemblierungsdomänen zu enthalten. Die wichtigsten Assemblierungsinformationen scheinen in der Ektodomäne zu liegen. Die einzige Aminosäure in der zweiten Transmembranregion, die einen spezifischen Einfluss auf die Trimerisierung von hP2X₅-Untereinheiten hatte, war ³⁵⁵D. Einzelmutationen in dieser Position zeigten, dass nur Aminosäuren, deren Seitenketten in der Membran interhelikale Wasserstoffbrücken ausbilden können, eine effiziente Trimerisierung ermöglichen. Dieses Ergebnis legte den Schluss nahe,

dass ³⁵⁵D die Assemblierung unterstützt, indem es die Interaktion zwischen den Untereinheiten über eine Wasserstoffbrückenbildung stabilisiert. Die Suche nach einem potentiellen Interaktionspartner von ³⁵⁵D in der ersten Transmembranregion durch Einzelmutationen und Cystein-Crosslinking war allerdings nicht erfolgreich. Dies könnte bedeuten, dass die beiden Transmembranregionen jeweils benachbarter Untereinheiten nicht, wie für P2X₂-Untereinheiten gezeigt, in einer „head to tail“-Orientierung angeordnet sind, sondern nur die zweiten Transmembranregionen miteinander in Kontakt stehen.

Limitierte Proteolyse von hP2X₅-Rezeptormutanten ergab einen engen Zusammenhang zwischen der Trimerisierung und der Resistenz gegenüber einer Proteolyse durch Trypsin. Daraus folgt, dass trimerisierungsfähige P2X-Mutanten korrekt gefaltet sind, während ein Verlust der Trimerisierungsfähigkeit eine Fehlfaltung anzeigt.

Neben dem hP2X₅-Rezeptor wurden auch rP2X₁-Rezeptoren untersucht. rP2X₁-Konstrukte, die lediglich aus der Ektodomäne sowie einem absplaltbaren Signalpeptid bestanden, konnten zwar partiell multimerisieren, aber keine definierten Trimere bilden. Die Analyse weiterer Konstrukte zeigte, dass beide Transmembranregionen für die Trimerisierung wichtig sind, auch wenn sie keine spezifischen Assemblierungsinformationen enthalten. Ein systematisches Alanin-Scanning der gesamten Ektodomäne der rP2X₁-Untereinheit ergab, dass die Ektodomäne multiple Sequenzmotive enthält, die zu der Trimerisierung beitragen. Die identifizierten Domänen müssen nun in weiteren Experimenten detaillierter untersucht werden.

Zusätzlich wurden Chimären aus rP2X₁- und rP2X₆-Untereinheiten untersucht. Da rP2X₆-Untereinheiten nicht in der Lage sind zu trimerisieren, könnten sie in Kombination mit Sequenzelementen aus rP2X₁-Untereinheiten ermöglichen, trimerisierungsrelevante Proteindomänen zu identifizieren. Es zeigte sich, dass eine Chimäre, die die Ektodomäne der rP2X₁-Untereinheit und die Transmembranregionen und zytosolischen Domänen der rP2X₆-Untereinheit enthielt, trimerisieren konnte, während die umgekehrte Chimäre dies nicht vermochte. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass die Sequenzmotive, die für die Trimerisierung von P2X-Untereinheiten essentiell sind, in der Ektodomäne lokalisiert sind.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass die entscheidenden Assemblierungsinformationen von P2X-Rezeptoren in deren Ektodomäne lokalisiert sind; die Rolle der Transmembranregionen bei der Assemblierung ist im Wesentlichen in ihrer Funktion als hydrophobe Membrananker zu sehen, die die korrekte räumliche Gesamtorientierung der extrazellulären Assemblierungsdomänen ermöglicht.

7. Literaturverzeichnis

- Abbracchio MP, Burnstock G (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64:445-475.
- Adamian L, Liang J (2002) Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers. *Proteins* 47:209-218.
- Arkin IT, Brunger AT (1998) Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim Biophys Acta* 1429:113-128.
- Armstrong N, Gouaux E (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 28:165-181.
- Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J, Schmalzing G (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X₂ and heteromeric P2X₁₊₂ receptor subtypes. *J Mol Biol* 342:333-343.
- Ayalon G, Stern-Bach Y (2001) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31:103-113.
- Barlowe C (2003) Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol* 13:295-300.
- Barnard EA, Burnstock G, Webb TE (1994) G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 15:67-70.
- Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2005) AFM imaging demonstrates that P2X₂ receptors are trimers, but that P2X₆ receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 280:10759-10765.
- Baxter A, Bent J, Bowers K, Braddock M, Brough S, Fagura M, Lawson M, McInally T, Mortimore M, Robertson M, Weaver R, Webborn P (2003) Hit-to-Lead studies: the discovery of potent adamantane amide P2X₇ receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 13:4047-4050.
- Bean BP (1990) ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics. *J Neurosci* 10:1-10.
- Bean BP, Williams CA, Ceelen PW (1990) ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: current-voltage relation and single-channel behavior. *J Neurosci* 10:11-19.
- Bechinger B (2001) Membrane insertion and orientation of polyalanine peptides: a ¹⁵N solid-state NMR spectroscopy investigation. *Biophys J* 81:2251-2256.
- Beitz E (2000) T_EX_{topo}: shaded membrane protein topology plots in L^AT_EX_{2 ϵ} . *Bioinformatics* 16:1050-1051.
- Belden WJ, Barlowe C (2001) Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* 294:1528-1531.

- Bigelow HR, Petrey DS, Liu J, Przybylski D, Rost B (2004) Predicting transmembrane beta-barrels in proteomes. *Nucleic Acids Res* 32:2566-2577.
- Bo X, Jiang LH, Wilson HL, Kim M, Burnstock G, Surprenant A, North RA (2003) Pharmacological and biophysical properties of the human P2X₅ receptor. *Mol Pharmacol* 63:1407-1416.
- Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X₂ ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275:10190-10195.
- Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Belanger D, Emerit MB, Seguela P (2003) Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J Neurosci* 23:1246-1253.
- Bowie JU (2005) Solving the membrane protein folding problem. *Nature* 438:581-589.
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371:519-523.
- Braun K, Rettinger J, Ganso M, Kassack M, Hildebrandt C, Ullmann H, Nickel P, Schmalzing G, Lambrecht G (2001) NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364:285-290.
- Brown DA, Yule DI (2007) Protein kinase C regulation of P2X₃ receptors is unlikely to involve direct receptor phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1773:166-175.
- Burnstock G (2004) Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem* 4:793-803.
- Burnstock G (1976) Purinergic receptors. *J Theor Biol* 62:491-503.
- Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27:166-176.
- Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16:433-440.
- Büttner C, Sadtler S, Leyendecker A, Laube B, Griffon N, Betz H, Schmalzing G (2001) Ubiquitination precedes internalization and proteolytic cleavage of plasma membrane-bound glycine receptors. *J Biol Chem* 276:42978-42985.
- Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig K.W. (2002) The Organizing Principle in the Formation of the T Cell Receptor-CD3 Complex. *Cell* 111:967-979.
- Cao GQ, Kuhn A, Dalbey RE (1995) The translocation of negatively charged residues across the membrane is driven by the electrochemical potential: Evidence for an electrophoresis-like membrane transfer mechanism. *EMBO J* 14:866-875.
- Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* 279:29628-29638.

- Chavez RA, Maloof J, Beeson D, Newsom-Davis J, Hall ZW (1992) Subunit folding and $\alpha\delta$ heterodimer formation in the assembly of the nicotinic acetylcholine receptor. Comparison of the mouse and human α subunits. *J Biol Chem* 267:23028-23034.
- Chen H, Kendall DA (1995) Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J Biol Chem* 270:14115-14122.
- Choma C, Gratkowski H, Lear JD, Degrado WF (2000) Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol* 7:161-166.
- Clarke CE, Benham CD, Bridges A, George AR, Meadows HJ (2000) Mutation of histidine 286 of the human P2X₄ purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *J Physiol* 523 Pt 3:697-703.
- Clyne JD, LaPointe LD, Hume RI (2002a) The role of histidine residues in modulation of the rat P2X₂ purinoceptor by zinc and pH. *J Physiol* 539:347-359.
- Clyne JD, Wang LF, Hume RI (2002b) Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X₂ purinoceptor. *J Neurosci* 22:3873-3880.
- Coddou C, Morales B, Gonzalez J, Grauso M, Gordillo F, Bull P, Rassendren F, Huidobro-Toro JP (2003) Histidine 140 plays a key role in the inhibitory modulation of the P2X₄ nucleotide receptor by copper but not zinc. *J Biol Chem* 278:36777-36785.
- Collins A, Chuang H, Jan YN, Jan LY (1997) Scanning mutagenesis of the putative transmembrane segments of Kir2.1, an inward rectifier potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5456-5460.
- Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G (1996) Cloning of P2X₅ and P2X₆ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 16:2495-2507.
- Colman A (1984) Translation of eucaryotic messenger RNA in *Xenopus* oocytes. In: *Transcription and Translation* (Hames BD, Higgins SI, eds), pp 271-302. Oxford: IRL Press Limited.
- Cornea RL, Thomas DD (1994) Effects of membrane thickness on the molecular dynamics and enzymatic activity of reconstituted Ca-ATPase. *Biochemistry* 33:2912-2920.
- Curran AR, Engelman DM (2003) Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 13:412-417.
- Damer S, Niebel B, Czeche S, Nickel P, Ardanuy U, Schmalzing G, Rettinger J, Mutschler E, Lambrecht G (1998) NF279: a potent and selective antagonist of P2X receptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol* 350:R5-R6.
- Dani JA, Mayer ML (1995) Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol* 5:310-317.
- Dawson JP, Weinger JS, Engelman DM (2002) Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices. *J Mol Biol* 316:799-805.

- de Planque MR, Goormaghtigh E, Greathouse DV, Koeppe RE, Kruijtz JA, Liskamp RM, de KB, Killian JA (2001) Sensitivity of single membrane-spanning α -helical peptides to hydrophobic mismatch with a lipid bilayer: effects on backbone structure, orientation, and extent of membrane incorporation. *Biochemistry* 40:5000-5010.
- de Planque MR, Killian JA (2003) Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Mol Membr Biol* 20:271-284.
- Denzer AJ, Nabholz CE, Spiess M (1995) Transmembrane orientation of signal-anchor proteins is affected by the folding state but not the size of the N-terminal domain. *EMBO J* 14:6311-6317.
- Deutsch C (2002) Potassium channel ontogeny. *Annu Rev Physiol* 64:19-46.:19-46.
- Deutsch C (2003) The birth of a channel. *Neuron* 40:265-276.
- Ding S, Sachs F (2000) Inactivation of P2X₂ purinoceptors by divalent cations. *J Physiol* 522:199-214.
- Ding S, Sachs F (1999) Single channel properties of P2X₂ purinoceptors. *J Gen Physiol* 113:695-720.
- Do H, Falcone D, Lin JL, Andrews DW, Johnson AE (1996) The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* 85:369-378.
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68:213-237.
- Duckwitz W, Hausmann R, Aschrafi A, Schmalzing G (2006) P2X₅ subunit assembly requires scaffolding by the second transmembrane domain and a conserved aspartate. *J Biol Chem* 281:39561-39572.
- Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136:153-180.
- Eddy SR (1995) Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 3:114-120.
- Egan TM, Cox JA, Voigt MM (2004) Molecular structure of P2X receptors. *Curr Top Med Chem* 4:821-829.
- Egan TM, Haines WR, Voigt MM (1998) A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X₂ receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J Neurosci* 18:2350-2359.
- Eickhorst AN, Berson A, Cockayne D, Lester HA, Khakh BS (2002) Control of P2X₂ channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol* 120:119-131.
- Engelman DM, Chen Y, Chin CN, Curran AR, Dixon AM, Dupuy AD, Lee AS, Lehnert U, Matthews EE, Reshetnyak YK, Senes A, Popot JL (2003) Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett* 555:122-125.

- Ennion S, Hagan S, Evans RJ (2000) The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X₁ receptors. *J Biol Chem* 275:29361-29367.
- Ennion SJ, Evans RJ (2002a) 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* 61:303-311.
- Ennion SJ, Evans RJ (2002b) P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 291:611-616.
- Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A, North RA (1996) Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP- gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol (Lond)* 497:413-422.
- Ford AP, Gever JR, Nunn PA, Zhong Y, Cefalu JS, Dillon MP, Cockayne DA (2006) Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. *Br J Pharmacol* 147:S132-S143.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46:143-156.
- Freedman RB (1994) Protein folding. Folding helpers and unhelpful folders. *Curr Biol* 4:933-935.
- Freist W, Verhey JF, Stühmer W, Gauss DH (1998) ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett* 434:61-65.
- Furukawa H, Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J* 22:2873-2885.
- Gargett CE, Wiley JS (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z- receptor of human lymphocytes. *Brit J Pharmacol* 120:1483-1490.
- Gendreau S, Schirmer J, Schmalzing G (2003) Identification of a tubulin binding motif on the P2X₂ receptor. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 786:311-318.
- Gendreau S, Voswinkel S, Torres-Salazar D, Lang N, Heidtmann H, Detro-Dassen S, Schmalzing G, Hidalgo P, Fahlke C (2004) A trimeric quaternary structure is conserved in bacterial and human glutamate transporters. *J Biol Chem* 279:39505-39512.
- Gething MJ (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10:465-472.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 452:513-537.
- Glass R, Loesch A, Bodin P, Burnstock G (2002) P2X₄ and P2X₆ receptors associate with VE-cadherin in human endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 59:870-881.
- Gloor S, Pongs O, Schmalzing G (1995) A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Gene* 160:213-217.

- Goder V, Spiess M (2003) Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 22:3645-3653.
- Goder V, Spiess M (2001) Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett* 504:87-93.
- Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Gualix J, Miras-Portugal MT (2003) GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes. *Neuropharmacology* 44:311-323.
- Görbitz CH (1989) Hydrogen-Bond Distances and Angles in the Structures of Amino Acids and Peptides. *Acta Cryst B* 45:390-395.
- Gratkowski H, Lear JD, Degrado WF (2001) Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:880-885.
- Gray TM, Matthews BW (1984) Intrahelical hydrogen bonding of serine, threonine and cysteine residues within alpha-helices and its relevance to membrane-bound proteins. *J Mol Biol* 175:75-81.
- Griffon N, Büttner C, Nicke A, Kuhse J, Schmalzing G, Betz H (1999) Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *EMBO J* 18:4711-4721.
- Gurezka R, Laage R, Brosig B, Langosch D (1999) A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J Biol Chem* 274:9265-9270.
- Hackam AS, Wang TL, Guggino WB, Cutting GR (1997) The N-terminal domain of human GABA receptor rho1 subunits contains signals for homooligomeric and heterooligomeric interaction. *J Biol Chem* 272:13750-13757.
- Haines WR, Migita K, Cox JA, Egan TM, Voigt MM (2001a) The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. *J Biol Chem* 276:32793-32798.
- Haines WR, Voigt MM, Migita K, Torres GE, Egan TM (2001b) On the contribution of the first transmembrane domain to whole-cell current through an ATP-gated ionotropic P2X receptor. *J Neurosci* 21:5885-5892.
- Hamman BD, Chen JC, Johnson EE, Johnson AE (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 angstrom during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89:535-544.
- Hammond C, Helenius A (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7:523-529.
- Hauri HP, Schweizer A (1992) The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr Opin Cell Biol* 4:600-608.

- Hausmann R, Rettinger J, Gerevich Z, Meis S, Kassack MU, Illes P, Lambrecht G, Schmalzing G (2006) The suramin analog 4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis (carbonylimino)))tetra-kis-benzenesulfonic acid (NF110) potently blocks P2X₃ receptors: subtype selectivity is determined by location of sulfonic acid groups. *Mol Pharmacol* 69:2058-2067.
- Heinrich SU, Mothes W, Brunner J, Rapoport TA (2000) The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell* 102:233-244.
- Helenius A, Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73:1019-49.:1019-1049.
- Hessa T, Kim H, Bihlmaier K, Lundin C, Boekel J, Andersson H, Nilsson I, White SH, von HG (2005) Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* 433:377-381.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF (2006) A-740003 [N-(1-{{(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X₇ receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1376-1385.
- Horner S, Menke K, Hildebrandt C, Kassack MU, Nickel P, Ullmann H, Mahaut-Smith MP, Lambrecht G (2005) The novel suramin analogue NF864 selectively blocks P2X₁ receptors in human platelets with potency in the low nanomolar range. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:1-13.
- Howard MB, Ekborg NA, Taylor LE, Hutcheson SW, Weiner RM (2004) Identification and analysis of polyserine linker domains in prokaryotic proteins with emphasis on the marine bacterium *Microbulbifer degradans*. *Protein Sci* 13:1422-1425.
- Hubbard SJ (1998) The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim Biophys Acta* 1382:191-206.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.
- Jacobs RE, White SH (1989) The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry* 28:3421-3437.
- Jaime-Figueroa S, Greenhouse R, Padilla F, Dillon MP, Gever JR, Ford AP (2005) Discovery and synthesis of a novel and selective drug-like P2X₁ antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 15:3292-3295.
- Jarvis MF, et al. (2002) A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17179-17184.

- Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo X, Surprenant A, North RA (2003) Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 23:8903-8910.
- Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A (2000a) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol* 58:82-88.
- Jiang LH, Rassendren F, Spelta V, Surprenant A, 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* 276:14902-14908.
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA (2000b) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* 275:34190-34196.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, Mackinnon R (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417:523-526.
- Jin L, Wells JA (1994) Dissecting the energetics of an antibody-antigen interface by alanine shaving and molecular grafting. *Protein Sci* 3:2351-2357.
- Jones CA, Vial C, Sellers LA, Humphrey PP, Evans RJ, Chessell IP (2004) Functional regulation of P2X6 receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel alpha beta-methylene ATP-sensitive phenotype. *Mol Pharmacol* 65:979-985.
- Jones DT (1998) Do transmembrane protein superfolds exist? *FEBS Lett* 423:281-285.
- Keller P, Simons K (1997) Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci* 110 (Pt 24):3001-3009.
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999a) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci* 2:322-330.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53:107-118.
- Khakh BS, Egan TM (2005) Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. *J Biol Chem* 280:6118-6129.
- Khakh BS, Fisher JA, Nashmi R, Bowser DN, Lester HA (2005) An angstrom scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X2 and alpha4beta2 nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Neurosci* 20;25:6911-6920.
- Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA (1999b) Allosteric control of gating and kinetics at P2X₄ receptor channels. *J Neurosci* 19:7289-7299.
- Killian JA (1998) Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1376:401-415.
- Killian JA (2003) Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Lett* 555:134-138.

- Killian JA, Von Heijne G (2000) How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem Sci* 25:429-434.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001a) Proteomic and functional evidence for a P2X₇ receptor signalling complex. *EMBO J* 20:6347-6358.
- Kim M, Yoo OJ, Choe S (1997) Molecular assembly of the extracellular domain of P2X₂, an ATP-gated ion channel. *Biochem Biophys Res Commun* 240:618-622.
- Kim YC, Brown SG, Harden TK, Boyer JL, Dubyak G, King BF, Burnstock G, Jacobson KA (2001b) Structure-activity relationships of pyridoxal phosphate derivatives as potent and selective antagonists of P2X₁ receptors. *J Med Chem* 44:340-349.
- King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G (2000) Coexpression of rat P2X₂ and P2X₆ subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 20:4871-4877.
- Kleiger G, Grothe R, Mallick P, Eisenberg D (2002) GXXXG and AXXXA: common alpha-helical interaction motifs in proteins, particularly in extremophiles. *Biochemistry* 41:5990-5997.
- Kochendoerfer GG, Salom D, Lear JD, Wilk-Orescan R, Kent SB, Degrado WF (1999) Total chemical synthesis of the integral membrane protein influenza A virus M2: role of its C-terminal domain in tetramer assembly. *Biochemistry* 38:11905-11913.
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann Rev Biochem* 54:631-664.
- Koshimizu TA, Ueno S, Tanoue A, Yanagihara N, Stojilkovic SS, Tsujimoto G (2002) Heteromultimerization modulates P2X receptor functions through participating extracellular and C-terminal subdomains. *J Biol Chem* 277:46891-46899.
- Kraus RL, Hering S, Grabner M, Ostler D, Striessnig J (1998) Molecular mechanism of diltiazem interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 273:27205-27212.
- Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392:945-948.
- Krogh A, Larsson B, von HG, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567-580.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambrecht G (2000) Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:340-350.
- Langosch D, Brosig B, Kolmar H, Fritz HJ (1996) Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol* 263:525-530.

- Laube B (2002) Potentiation of inhibitory glycinergic neurotransmission by Zn²⁺: a synergistic interplay between presynaptic P2X₂ and postsynaptic glycine receptors. *Eur J Neurosci* 16:1025-1036.
- Le KT, Babinski K, Seguela P (1998) Central P2X₄ and P2X₆ channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 18:7152-7159.
- Lê KT, Boue-Grabot E, Archambault V, Séguela P (1999) Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X₁ and P2X₅ subunits. *J Biol Chem* 274:15415-15419.
- Le KT, Paquet M, Nouel D, Babinski K, Seguela P (1997) Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system. *FEBS Lett* 418:195-199.
- Lemmon MA, Flanagan JM, Hunt JF, Adair BD, Bormann BJ, Dempsey CE, Engelman DM (1992) Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane α -helices. *J Biol Chem* 267:7683-7689.
- Lew S, Ren J, London E (2000) The effects of polar and/or ionizable residues in the core and flanking regions of hydrophobic helices on transmembrane conformation and oligomerization. *Biochemistry* 39:9632-9640.
- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995) Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377:432-435.
- Lewis RN, Zhang YP, Hodges RS, Subczynski WK, Kusumi A, Flach CR, Mendelsohn R, McElhaney RN (2001) A polyalanine-based peptide cannot form a stable transmembrane α -helix in fully hydrated phospholipid bilayers. *Biochemistry* 40:12103-12111.
- Li M, Jan YN, Jan LY (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the shaker potassium channel. *Science* 257:1225-1230.
- Li Z, Migita K, Samways DS, Voigt MM, Egan TM (2004) Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X₂ receptor. *J Neurosci* 24:7378-7386.
- Liang J, Adamian L, Jackups R, Jr. (2005) The membrane-water interface region of membrane proteins: structural bias and the anti-snorkeling effect. *Trends Biochem Sci* 30:355-357.
- Liao MJ, Huang KS, Khorana HG (1984) Regeneration of native bacteriorhodopsin structure from fragments. *J Biol Chem* 259:4200-4204.
- Liao MJ, London E, Khorana HG (1983) Regeneration of the native bacteriorhodopsin structure from two chymotryptic fragments. *J Biol Chem* 258:9949-9955.
- Liu GJ, Brockhausen J, Bennett MR (2003) P2X₁ receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci* 108:12-16.

- Liu W, Eilers M, Patel AB, Smith SO (2004) Helix packing moments reveal diversity and conservation in membrane protein structure. *J Mol Biol* 337:713-729.
- Lord JM, Davey J, Frigerio L, Roberts LM (2000) Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* 11:159-164.
- Lu J, Deutsch C (2001) Pegylation: a method for assessing topological accessibilities in Kv1.3. *Biochemistry* 40:13288-13301.
- Lupas A (1996) Coiled coils: New structures and new functions. *Trends Biochem Sci* 21:375-382.
- Mackenzie KR, Prestegard JH, Engelman DM (1997) A transmembrane helix dimer: Structure and implications. *Science* 276:131-133.
- Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, 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* 27:1456-1466.
- Marqusee S, Robbins VH, Baldwin RL (1989) Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5286-5290.
- Marth JD (1996) Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 6:701-705.
- Martoglio B, Hofmann MW, Brunner J, Dobberstein B (1995) The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* 81:207-214.
- Masin M, Kerschensteiner D, Dumke K, Rubio ME, Soto F (2006) Fe65 interacts with P2X2 subunits at excitatory synapses and modulates receptor function. *J Biol Chem* 281:4100-4108.
- Matlack KE, Mothes W, Rapoport TA (1998) Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92:381-390.
- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T, Catterall WA (1998) Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *J Biol Chem* 273:3954-3962.
- McIlhinney RA, Molnar E (1996) Characterization, cell-surface expression and ligand-binding properties of different truncated N-terminal extracellular domains of the ionotropic glutamate receptor subunit GluR1. *Biochem J* 315 (Pt 1):217-225.
- McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA (1994) A mutation in segment IVS6 disrupts fast inactivation of sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12346-12350.
- Meddows E, Le BB, Grimwood S, Wafford K, Sandhu S, Whiting P, McIlhinney RA (2001) Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 276:18795-18803.

- Methfessel C, Witzemann V, Takahashi T, Mishina M, Numa S, Sakmann B (1986) Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflugers Arch* 407:577-588.
- Migita K, Haines WR, Voigt MM, Egan TM (2001) Polar residues of the second transmembrane domain influence cation permeability of the ATP-gated P2X₂ receptor. *J Biol Chem* 276:30934-30941.
- Minier F, Sigel E (2004) Techniques: Use of concatenated subunits for the study of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 25:499-503.
- Mio K, Kubo Y, Ogura T, Yamamoto T, Sato C (2005) Visualization of the trimeric P2X₂ receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem Biophys Res Commun* 337:998-1005.
- Molloy SS, Thomas L, VanSlyke JK, Stenberg PE, Thomas G (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* 13:18-33.
- Nagaya N, Tittle RK, Saar N, Dellal SS, Hume RI (2005) An intersubunit zinc binding site in rat P2X₂ receptors. *J Biol Chem* 280:25982-25993.
- Nakazawa K, Fujimori K, Takanaka A, Inoue K (1990) An ATP-activated conductance in pheochromocytoma cells and its suppression by extracellular calcium. *J Physiol* 428:257-272.
- Nakazawa K, Hess P (1993) Block by calcium of ATP-activated channels in pheochromocytoma cells. *J Gen Physiol* 101:377-392.
- Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F (1998) Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273:15177-15182.
- Nicke A, Bäumer HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17:3016-3028.
- Nicke A, Büttner C, Eichele A, Lambrecht G, Schmalzing G (1999a) Evolving view of quaternary structures of ligand-gated ion channels. *Progr Brain Res* 120:61-80.
- Nicke A, Rettinger J, Mutschler E, Schmalzing G (1999b) Blue native PAGE as a useful method for the analysis of the assembly of distinct combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J Recept Signal Transduct Res* 19:493-507.
- Nicke A, Rettinger J, Schmalzing G (2003) Monomeric and dimeric byproducts are the principal functional elements of higher order P2X₁ concatamers. *Mol Pharmacol* 63:243-252.
- Nicke A, Thurau H, Sadtler S, Rettinger J, Schmalzing G (2004) Assembly of nicotinic $\alpha 7$ subunits in *Xenopus* oocytes is partially blocked at the tetramer level. *FEBS Lett* 575:52-58.

- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von HG (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1-6.
- Nilsson I, Von Heijne G (2000) Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *J Biol Chem* 275:17338-17343.
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.
- North RA, Surprenant A (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:563-580.
- Ofran Y, Rost B (2003) Analysing six types of protein-protein interfaces. *J Mol Biol* 325:377-387.
- Ortells MO, Lunt GG (1995) Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18:121-127.
- Pace CN, Horn G, Hebert EJ, Bechert J, Shaw K, Urbanikova L, Scholtz JM, Sevcik J (2001) Tyrosine hydrogen bonds make a large contribution to protein stability. *J Mol Biol* 312:393-404.
- Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358.
- Parodi AJ (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J* 348 Pt 1:1-13.
- Patel AB, Crocker E, Reeves PJ, Getmanova EV, Eilers M, Khorana HG, Smith SO (2005) Changes in interhelical hydrogen bonding upon rhodopsin activation. *J Mol Biol* 347:803-812.
- Paukert M, Osteroth R, Geisler HS, Brandle U, Glowatzki E, Ruppertsberg JP, Grunder S (2001) Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X(3) subunit. *J Biol Chem* 276:21077-21082.
- Percot A, Zhu XX, Lafleur M (1999) Design and characterization of anchoring amphiphilic peptides and their interactions with lipid vesicles. *Biopolymers* 50:647-655.
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 21:1228-1237.
- Person AM, Bills KL, Liu H, Botting SK, Lindstrom J, Wells GB (2005) Extracellular domain nicotinic acetylcholine receptors formed by alpha4 and beta2 subunits. *J Biol Chem* 280:39990-40002.
- Pope B, Kent JD (1996) High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. pp 536-537.
- Popot JL, Engelman DM (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 29:4031-4037.

- Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389:81-85.
- Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA, Kawashima E (1997) Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X₂ and P2X₃ receptors. *J Neurosci* 17:6529-6533.
- Rapoport TA, Goder V, Heinrich SU, Matlack KES (2004) Membrane-protein integration and the role of the translocational channel. *Trends Cell Biol* 14:568-575.
- Rapoport TA, Jungnickel B, Kutay U (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* 65:271-303.
- Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA, Surprenant A (1997) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J* 16:3446-3454.
- Ren J, Lew S, Wang J, London E (1999) Control of the transmembrane orientation and interhelical interactions within membranes by hydrophobic helix length. *Biochemistry* 38:5905-5912.
- Rettinger J, Aschrafi A, Schmalzing G (2000a) Roles of individual *N*-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X₁ receptor. *J Biol Chem* 275:33542-33547.
- Rettinger J, Braun K, Hochmann H, Kassack MU, Ullmann H, Nickel P, Schmalzing G, Lambrecht G (2005) Profiling at recombinant homomeric and heteromeric rat P2X receptors identifies the suramin analogue NF449 as a highly potent P2X(1) receptor antagonist. *Neuropharmacology* 48:461-468.
- Rettinger J, Schmalzing G (2003) Activation and desensitization of the recombinant P2X₁ receptor at nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol* 121:451-461.
- Rettinger J, Schmalzing G (2004) Desensitization masks nanomolar potency of ATP at the P2X₁ receptor. *J Biol Chem* 279:6426-6433.
- Rettinger J, Schmalzing G, Damer S, Müller G, Nickel P, Lambrecht G (2000b) The suramin analogue NF279 is a novel and potent antagonist selective for the P2X₁ receptor. *Neuropharmacology* 39:2044-2053.
- Ridder A, Skupjen P, Unterreitmeier S, Langosch D (2005) Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *J Mol Biol* 354:894-902.
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F (2007) Kinetics of P2X₇ receptor-operated single channel currents. *Biophys J* 92:2377-2391.
- Roberts J.A., Evans R.J. (2006) Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X₁ receptors for ATP. *J Neurosci* 26:843-852.
- Roberts JA, 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* 92:1256-1264.

- Roberts JA, 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* 279:9043-9055.
- Royle SJ, Bobanovic LK, Murrell-Lagnado RD (2002) Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J Biol Chem* 277:35378-35385.
- Rubio ME, Soto F (2001) Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21:641-653.
- Russ WP, Engelman DM (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 296:911-919.
- Russ WP, Engelman DM (1999) TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:863-868.
- Ryba NJ, Marsh D (1992) Protein rotational diffusion and lipid/protein interactions in recombinants of bovine rhodopsin with saturated diacylphosphatidylcholines of different chain lengths studied by conventional and saturation-transfer electron spin resonance. *Biochemistry* 31:7511-7518.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato Y, Sakaguchi M, Goshima S, Nakamura T, Uozumi N (2002) Integration of Shaker-type K⁺ channel, KAT1, into the endoplasmic reticulum membrane: Synergistic insertion of voltage-sensing segments, S3-S4, and independent insertion of pore-forming segments, S5-P-S6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:60-65.
- Schägger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1:16-22.
- Schägger H, Cramer WA, 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* 217:220-230.
- Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
- Schägger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199:223-231.
- Schneider D, Engelman DM (2004) Motifs of two small residues can assist but are not sufficient to mediate transmembrane helix interactions. *J Mol Biol* 343:799-804.
- Schofield CM, Trudell JR, Harrison NL (2004) Alanine-scanning mutagenesis in the signature disulfide loop of the glycine receptor alpha 1 subunit: critical residues for activation and modulation. *Biochemistry* 43:10058-10063.

- Senes A, Ubarretxena-Belandia I, Engelman DM (2001) The Calpha ---H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9056-9061.
- Silberberg SD, Chang TH, Swartz KJ (2005) Secondary Structure and Gating Rearrangements of Transmembrane Segments in Rat P2X₄ Receptor Channels. *J Gen Physiol* 125:347-359.
- Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, Petrou S (2003) P2X₇ receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem* 278:8853-8860.
- Soskine M, Steiner-Mordoch S, Schuldiner S (2002) Crosslinking of membrane-embedded cysteines reveals contact points in the EmrE oligomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12043-12048.
- Soto F, Garcia-Guzman M, Karschin C, Stühmer W (1996) Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 223:456-460.
- Spelta V, Jiang LH, Bailey RJ, Surprenant A, North RA (2003) Interaction between cysteines introduced into each transmembrane domain of the rat P2X₂ receptor. *Brit J Pharmacol* 138:131-136.
- Stokes L, Jiang LH, Alcaryz L, Bent J, Bowers K, Fagura M, Furber M, Mortimore M, Lawson M, Theaker J, Laurent C, Braddock M, Surprenant A (2006) Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X₇ receptors, AZ11645373. *Br J Pharmacol* 149:880-887.
- Stoop R, Thomas S, Rassendren F, Kawashima E, Buell G, Surprenant A, North RA (1999) Contribution of individual subunits to the multimeric P2X₂ receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T³³⁶C. *Mol Pharmacol* 56:973-981.
- Sugiyama N, Boyd AE, Taylor P (1996) Anionic residue in the alpha-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor contributing to subunit assembly and ligand binding. *J Biol Chem* 271:26575-26581.
- Swartz KJ, Mackinnon R (1997) Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels. *Neuron* 18:675-682.
- Thompson JA, Lau AL, Cunningham DD (1987) Selective radiolabeling of cell surface proteins to a high specific activity. *Biochemistry* 26:743-750.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999a) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274:6653-6659.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999b) Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly. *J Biol Chem* 274:22359-22365.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998a) N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X₂ receptor. *Biochemistry* 37:14845-14851.

- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998b) Topological analysis of the ATP-gated ionotropic [correction of ionotropic] P2X2 receptor subunit. *FEBS Lett* 425:19-23.
- Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM (1998c) Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* 54:989-993.
- Toulme E, Soto F, Garret M, Boue-Grabot E (2006) Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin. *Mol Pharmacol* 69:576-587.
- Traub LM, Kornfeld S (1997) The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr Opin Cell Biol* 9:527-533.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P_{2x} receptor for extracellular ATP. *Nature* 371:516-519.
- Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427:36-44.
- van Klompenburg W, Nilsson I, Von Heijne G, de Kruijff B (1997) Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *EMBO J* 16:4261-4266.
- Vial C, Roberts JA, Evans RJ (2004a) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 25:487-493.
- Vial C, Tobin AB, Evans RJ (2004b) G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation. *Biochem J* 382:101-110.
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1285-1294.
- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2:315-321.
- Von Heijne G (1999) Recent advances in the understanding of membrane protein assembly and structure. *Q Rev Biophys* 32:285-307.
- Von Heijne G (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J* 5:3021-3027.
- Von Heijne G (1989) Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* 341:456-458.
- Wahlberg JM, Spiess M (1997) Multiple determinants direct the orientation of signal-anchor proteins: the topogenic role of the hydrophobic signal domain. *J Cell Biol* 137:555-562.
- Walter P, Blobel G (1981a) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* 91:557-561.

- Walter P, Blobel G (1981b) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 91:551-556.
- Walter P, Johnson AE (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10:87-119.
- Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K, Lindstrom J (1996) Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J Biol Chem* 271:17656-17665.
- Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA (1993) Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 324:219-225.
- Welford LA, Cusack NJ, Hourani SM (1986) ATP analogues and the guinea-pig taenia coli: a comparison of the structure-activity relationships of ectonucleotidases with those of the P2-purinoceptor. *Eur J Pharmacol* 129:217-224.
- Wells GB, Anand R, Wang F, Lindstrom J (1998) Water-soluble nicotinic acetylcholine receptor formed by alpha7 subunit extracellular domains. *J Biol Chem* 273:964-973.
- Werner P, Seward EP, Buell GN, North RA (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15485-15490.
- Wessels HP, Spiess M (1988) Insertion of a multispanning membrane protein occurs sequentially and requires only one signal sequence. *Cell* 55:61-70.
- White MM, Aylwin M (1990) Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 37:720-724.
- White SH, Von Heijne G (2004) The machinery of membrane protein assembly. *Curr Opin Struct Biol* 14:397-404.
- White SH, Wimley WC (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:319-65.:319-365.
- Wildman SS, King BF, Burnstock G (1998) Zn²⁺ modulation of ATP-responses at recombinant P2X2 receptors and its dependence on extracellular pH. *Br J Pharmacol* 123:1214-1220.
- Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, North RA (2006) Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol Pharmacol* 70:1159-1163.
- Wilson HL, Wilson SA, Surprenant A, North RA (2002) Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X₇ receptor C terminus. *J Biol Chem* 277:34017-34023.
- Wimley WC (2003) The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol* 13:404-411.
- Wittig I, Braun H-P, Schägger H (2006) Blue native PAGE. *Nature Protocols* 1:418-428.

- Woolhead CA, McCormick PJ, Johnson AE (2004) Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell* 116:725-736.
- Wrubel W, Stochaj U, Sonnewald U, Theres C, Ehring R (1990) Reconstitution of an active lactose carrier in vivo by simultaneous synthesis of two complementary protein fragments. *J Bacteriol* 172:5374-5381.
- Xu J, Baase WA, Baldwin E, Matthews BW (1998) The response of T4 lysozyme to large-to-small substitutions within the core and its relation to the hydrophobic effect. *Protein Sci* 7:158-177.
- Yan D, Schulte MK, Bloom KE, White MM (1999) Structural features of the ligand-binding domain of the serotonin 5HT3 receptor. *J Biol Chem* 274:5537-5541.
- Yan Z, Liang Z, Tomic M, Obsil T, Stojilkovic SS (2005) Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel. *Mol Pharmacol* 67:1078-1088.
- Zemkova H, He ML, Koshimizu TA, Stojilkovic SS (2004) Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors. *J Neurosci* 24:6968-6978.
- Zhou FX, Cocco MJ, Russ WP, Brunger AT, Engelman DM (2000) Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Biol* 7:154-160.
- Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM (2001) Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2250-2255.
- Zhou Y, Nelson ME, Kuryatov A, Choi C, Cooper J, Lindstrom J (2003) Human alpha4beta2 acetylcholine receptors formed from linked subunits. *J Neurosci* 23:9004-9015.
- Ziyal R, Ziganshin AU, Nickel P, Ardanuy U, Mutschler E, Lambrecht G, Burnstock G (1997) Vasoconstrictor responses via P2X-receptors are selectively antagonized by NF023 in rabbit isolated aorta and saphenous artery. *Brit J Pharmacol* 120:954-960.

8. Anhang

8.1 cDNA-Konstrukte

8.1.1 Von mir verwendete und hergestellte cDNA-Konstrukte

Tab. 8-1 Herstellung der verwendeten Konstrukte

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
1779 NCAM-Ecto-rP2X ₁ ⁵²⁻³²⁷ -His	1727 His-rP2X ₁ ^{codon optimized}	PCR 2038 & 1780	Ligation in 1663 (NcoI und SpeI)
2013 His-rP2X ₁ ¹⁻³²⁷	1727 His-rP2X ₁ ^{codon optimized}	2393 & 2394	QC
2034 His- ³⁶ L-hP2X ₅	1887 His-rP2X _{5A} ^{full length}	2448 & 2449	QC
2076 His-rP2X ₁ ¹⁻³³²	1727 His-rP2X ₁ ^{codon optimized}	2473 & 2474	QC
2077 His-rP2X ₁ ¹⁻³³⁸	1727 His-rP2X ₁ ^{codon optimized}	2475 & 2476	QC
2140 His- ³⁶ L hP2X _{5A} ^{Δ335-349}	1885 His-rP2X _{5A} ^{Δ334-349}	2448 & 2449	QC
2141 His- ³⁶ L hP2X _{5A} ^{Δ342-349}	1886 His-hP2X _{5A} ^{Δ341-349}	2448 & 2449	QC
2142 His- P ³⁶ L ³³⁵ PTI ³³⁷ AAA- hP2X ₅ ^{Δ342-349}	2035 His- ³³⁴ PTI ³³⁷ AAA- hP2X ₅ ^{Δ342-349}	2448 & 2449	QC
2143 His- ³⁶ L ³³⁸ INVG ³⁴¹ AAAA- hP2X ₅ ^{Δ342-349}	2036 His- ³³⁸ INVG ³⁴¹ AAAA-hP2X ₅ ^{Δ342-349}	2448 & 2449	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2144 His- ³⁶ L ³³⁵ PTIINVG ³⁴¹ A- hP2X ₅ ^{Δ342-349}	2037 His- ³³⁵ PTIINVG ³⁴¹ A- hP2X ₅ ^{Δ342-349}	2448 & 2449	QC
2147 His-rP2X ₁ ¹⁻³⁴³	1727 His-rP2X ₁ ^{codon optimized}	2564 & 2565	QC
2148 His-rP2X ₁ ¹⁻³⁴⁷	1727 His-rP2X ₁ ^{codon optimized}	2566 & 2567	QC
2165 His- ⁵⁵ YQ ⁵⁶ -hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2607 & 2608	QC
2166 His- ³²⁷ KAGKF ³³¹ AAAAA- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2609 & 2610	QC
2167 His- ³³² SIIPT ³³⁶ AAAAA- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2611 & 2612	QC
2168 His- ³³⁷ IINVG ³⁴¹ AAAAA- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2613 & 2614	QC
2169 His- ³⁴² SGVAL ³⁴⁶ AAAAA- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2615 & 2616	QC
2170 His- ³⁴⁷ MGAGA ³⁵¹ AAAAA-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2617 & 2618	QC
2171 His- ³⁵² FFCDL ³⁵⁶ AAAAA- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2619 & 2620	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2172 His- ³⁵⁷ VLIYL ³⁶¹ AAAAA- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2621 & 2622	QC
2203 His-P ³⁶ L-hP2X ₅ ^{Δ328-349}	1314 His-hP2X _{5A} ^{Δ328-349}	2448 & 2449	QC
2204 His- ³³⁷ IINVG ³⁴¹ QQQQQ- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2668 & 2669	QC
2213 His-rP2X ₁ ¹⁻³⁵²	1727 His-rP2X ₁ ^{codon optimized}	2693 & 2694	QC
2214 His-rP2X ₁ ¹⁻³⁵⁷	1727 His-rP2X ₁ ^{codon optimized}	2695 & 2696	QC
2249 His- ⁴¹ LAYLV ⁴⁵ AAAAA- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2743 & 2744	QC
2250 His- ⁴⁶ VWVFL ⁵⁰ AAAAA- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2745 & 2746	QC
2279 His- ³³⁷ IINVG ³⁴¹ LLLLL- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2775 & 2776	QC
2302 His- ⁴¹ LAYLV ⁴⁵ LLLLL- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2819 & 2820	QC
2303 His- ⁴⁶ VWVFL ⁵⁰ LLLLL- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2821 & 2822	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2310 His- ³³⁷⁻³⁴⁶ LLLLLLLLL- hP2X ₅	2279 His-hP2X ₅	2823 & 2824	QC
2323 His- ³²² VMVNG ³²⁶ AAAAA-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2851 & 2852	QC
2324 His- ³³⁷⁻³⁵¹ L-hP2X ₅	2310 His- ³³⁷⁻³⁴⁶ LLLLLLLLL-hP2X ₅	3028 & 3029	QC
2325 His- ³²⁷⁻³²⁹ A-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2855 & 2856	QC
2335 His-KF ^{330,331} AA-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2883 & 2884	QC
2342 His- ³⁴² SGVAL ³⁴⁶ QQQQQ- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2891 & 2892	QC
2350 His-hP2X ₅ ¹⁻³³⁶	2034 His-hP2X ₅	2906 & 2907	QC
2351 His-hP2X ₅ ¹⁻³⁴²	2034 His-hP2X ₅	2908 & 2909	QC
2352 His-hP2X ₅ ¹⁻³⁴⁸	2034 His-hP2X ₅	2910 & 2911	QC
2353 His-hP2X ₅ ¹⁻³⁵⁵	2034 His-hP2X ₅	2912 & 2913	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2354 His-hP2X ₅ ¹⁻³⁶¹	2034 His-hP2X ₅	2914 & 2915	QC
2386 His-K ³³⁰ A-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2961 & 2962	QC
2387 His-F ³³¹ A-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	2963 & 2964	QC
2397 His-hP2X ₅ ¹⁻³⁶²	2034 His-hP2X ₅	2972 & 2973	QC
2398 His-hP2X ₅ ¹⁻³⁶⁵	2034 His-hP2X ₅	2974 & 2975	QC
2492 His- ³⁴⁷ MGAGA ³⁵¹ QQQQQ-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3134 & 3135	QC
2493 His- ³⁵² FFCDL ³⁵⁶ QQQQQ- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3136 & 3137	QC
2494 His- ³⁵⁷ VLIYL ³⁶¹ QQQQQ- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3138 & 3139	QC
2495 His- ³⁶² IKK ³⁶⁴ AAA-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3132 & 3133	QC
2499 His- ³³⁷ IINVG ³⁴¹ SSSSS- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3142 & 3143	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2500 His- ³⁴² SGVAL ³⁴⁶ SSSSS- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3144 & 3145	QC
2501 His- ³³⁵ PTIINVG ³⁴¹ S- hP2X ₅ ^{Δ342-349}	2140 His-hP2X _{5A} ^{Δ335-349}	3146 & 3147	QC
2506 His-hP2X ₅ ^{Δ328-341}	2203 His- ³⁶ LhP2X ₅ ^{Δ328-349}	3156 & 3157	QC
2507 His-hP2X ₅ ^{Δ339-349}	2140 His-hP2X ₅ ^{Δ335-349}	3158 & 3159	QC
2508 His- ³⁴² SGVAL ³⁴⁶ LLLLL- hP2X ₅	2034 His-hP2X _{5A}	3164 & 3165	QC
2509 His- ³⁴⁷ MGAGA ³⁵¹ LLLLL- hP2X ₅	2034 His-hP2X _{5A}	3166 & 3167	QC
2510 His- ³⁵² FFCDL ³⁵⁶ LLLLL- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3168 & 3169	QC
2511 His- ³⁵⁷ VLIYL ³⁶¹ LLLLL- hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3170 & 3171	QC
2600 His-rP2X ₁ -rP2X ₆	2599 , 2224 His-rP2X ₁ -rP2X ₆ , His- rP2X ₆ ^{shor t3'NTR}	-	Ligation in 2224 (HindIII und Sall)
2628 His-E ³⁸⁰ N-hP2X ₅ ^{korrr}	2203 His- ³⁶ LhP2X ₅ ^{Δ328-349}	3383 & 3384	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2635 His- ³³⁷⁻³⁵⁵ L-hP2X ₅	2324 His- ³³⁷⁻³⁵¹ L-hP2X ₅	3391 & 3392	QC
2637 His- ¹³³ TPGKAE ¹³⁸ - AAGAAA-P2X ₁	1727 His-rP2X ₁ codon optimized	3403 & 3404	QC
2638 His- ¹³⁹ RKAQGI ¹⁴⁴ - AAAAGA -P2X ₁	1727 His-rP2X ₁ codon optimized	3405 & 3406	QC
2639 His- ¹⁴⁵ RTGNCV ¹⁵⁰ - AAGACA -P2X ₁	1727 His-rP2X ₁ codon optimized	3407 & 3408	QC
2640 His- ¹⁵¹ PFNGTV ¹⁵⁶ - AAAGAA -P2X ₁	1727 His-rP2X ₁ codon optimized	3409 & 3410	QC
2678 His- ²⁰⁵ LVEEVN ²¹⁰ - AAAAAA-rP2X ₁	1727 His-rP2X ₁ codon optimized	3497 & 3498	QC
2692 His- ⁴¹ LVYVI ⁴⁵ LLLLL- rP2X ₁	1727 His-rP2X ₁ codon optimized	3460 & 3461	QC
2693 His- ⁴⁶ GWV ⁵⁰ FWV ⁵⁰ LLLLL- rP2X ₁	1727 His-rP2X ₁ codon optimized	3462 & 3463	QC
2694 His- ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	2635 His- ³³⁷⁻³⁵⁵ L-hP2X ₅	3464 & 3465	QC
2700 His-D ³⁵⁵ L-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3477 & 3478	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2701 His- ³⁵⁴ CD ³⁵⁵ LL-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3479 & 3480	QC
2702 His- ³⁵² FFCDL ³⁵⁶ LLLD-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3481 & 3482	QC
2727 His-E ³⁸⁰ N-hP2X ₅ ^{Δ339-349}	2507 His-hP2X ₅ ^{Δ339-349}	3383 & 3384	QC
2733 His-D ³⁵⁵ N-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3528 & 3529	QC
2734 His-D ³⁵⁵ R-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3530 & 3531	QC
2735 His-D ³⁵⁵ F-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3532 & 3533	QC
2736 His- ³⁵⁵ D ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	2694 His- ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	3536 & 3537	QC
2746 His- ³⁴² QQQQQ ³⁸⁰ N-hP2X ₅	2342 His- ³⁴² SGVAL ³⁴⁶ QQQQQ-hP2X ₅	3383 & 3384	QC
2747 His- ³⁵² QQQQQ ³⁸⁰ N-hP2X ₅	2493 His- ³⁵² FFCDL ³⁵⁶ QQQQQ-hP2X ₅	3383 & 3384	QC
2748 His- ³³⁵ AAAAAAA ³⁸⁰ N-hP2X ₅ ^{Δ342-349}	2144 His- ³⁶ L ³³⁵ PTIINVG ³⁴¹ A-hP2X ₅ ^{Δ342-349}	3383 & 3384	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2749 His- ³³⁵ SSSSSSS ³⁸⁰ N- hP2X ₅ ^{Δ342-349}	2501 His- ³³⁵ PTIINVG ³⁴¹ S- hP2X ₅ ^{Δ342-349}	3383 & 3384	QC
2774 His-L ³⁵⁵ D- ³³⁷⁻³⁵⁵ L-hP2X ₅	2635 His- ³³⁷⁻³⁵⁵ L-hP2X ₅	3594 & 3595	QC
2775 His- ³⁶³ KKR ³⁶⁵ AAA-hP2X ₅ ¹⁻³⁶⁵	2398 His-hP2X ₅ ¹⁻³⁶⁵	3596 & 3597	QC
2776 His-D ³⁵⁵ E-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3598 & 3599	QC
2795 His-D ³⁵⁵ V-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3625 & 3626	QC
2807 His-rP2X ₁ -(AGS) ₆ -rP2X ₁	2615 His-rP2X ₁ ^{Asp718,SpeI}	PCR 3648 & 3649	Ligation in 2615 (KpnI und SpeI)
2842 His-D ³⁵⁵ W-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3707 & 3708	QC
2844 His- ³⁵⁵ D ³⁶⁰ Y ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	2736 His- ³⁵⁵ D ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	3711 & 3712	QC
2865 His-R ³⁴ L-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3737 & 3738	QC
2866 His-Q ³⁷ L-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3739 & 3740	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2867 His-Q ³⁷ L,D ³⁵⁵ L-hP2X ₅	2700 His-D ³⁵⁵ L-hP2X ₅	3739 & 3740	QC
2907 His-rP2X ₁ -rP2X ₆ -rP2X ₁ ^{korrr}	2034 His-hP2X ₅	3815 & 3816	QC
2915 His-D ³⁵⁵ T-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3827 & 3828	QC
2916 His-Y ³³ L-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3829 & 3830	QC
2918 His- ³⁵⁴ C, ³⁵⁵ D, ³⁶⁰ Y ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	2844 His- ³⁵⁵ D ³⁶⁰ Y ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	3831 & 3832	QC
2941 His-D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	2034 His-hP2X ₅	3850 & 3851	QC
2942 His- ³⁴⁸ G, ³⁵⁵ D, ³⁶⁰ Y ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	2844 His- ³⁵⁵ D ³⁶⁰ Y ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	3852 & 3853	QC
2943 His-rP2X ₆ -rP2X ₁ -rP2X ₆ ^{korrr}	2806 His-rP2X ₆ -rP2X ₁ -rP2X ₆	3854 & 3855	QC
2945 His- ³⁴¹ G, ³⁵⁵ D, ³⁶⁰ Y ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	2844 His- ³⁵⁵ D ³⁶⁰ Y ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	3856 & 3857	QC
2946 His- ³⁴¹ G, ³⁴⁵ A, ³⁵⁵ D, ³⁶⁰ Y ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	2945 His- ³⁴¹ G, ³⁵⁵ D, ³⁶⁰ Y ³³⁷⁻³⁶¹ L-hP2X ₅	3858 & 3859	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
2979 His-Y ³³ C,D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	2941 His-D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	3893 & 3894	QC
2980 His-R ³⁴ C,D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	2941 His-D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	3895 & 3896	QC
2981 His-L ³⁵ C,D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	2941 His-D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	3897 & 3898	QC
2982 His-L ³⁶ C,D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	2941 His-D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	3899 & 3900	QC
2983 His-Q ³⁷ C,D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	2941 His-D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	3901 & 3902	QC
2984 His-A ³⁸ C,D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	2941 His-D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	3903 & 3904	QC
2985 His-S ³⁹ C,D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	2941 His-D ³⁵⁵ C-hP2X ₅	3905 & 3906	QC
3009 His- ²⁷⁸⁻²⁸² QLQER-rP2X ₆ - rP2X ₁ -rP2X ₆	2943 His-rP2X ₆ -rP2X ₁ - rP2X ₆ ^{korr}	3948 & 3949	QC
3010 His- ²⁷⁸⁻²⁸² QLQER- rP2X ₆ - rP2X ₁ -rP2X ₆ ^{Δ283-288}	2943 His-rP2X ₆ -rP2X ₁ - rP2X ₆ ^{korr}	3950 & 3951	QC
3094 His-rP2X ₆ ¹⁻¹⁶⁰ -TCE-rP2X ₁ - rP2X ₆	3041 His-rP2X ₆ ¹⁻¹⁶⁰ -rP2X ₁ - rP2X ₆	4096 & 4097	QC

Konstrukt	Ausgangskonstrukt	primer	Verfahren
3098 His-Q ⁹ L-rP2X ₆ -rP2X ₁ - rP2X ₆ ^{korrr}	2943 His-rP2X ₆ -rP2X ₁ - rP2X ₆ ^{korrr}	4108 & 4109	QC
3099 His-Q ⁹ L-rP2X ₆ ¹⁻¹⁶⁰ -TCE- rP2X ₁ -rP2X ₆	3094 His-rP2X ₆ ¹⁻¹⁶⁰ -TCE- rP2X ₁ -rP2X ₆	4108 & 4109	QC

8.1.2 Von mir verwendete, aber nicht hergestellte cDNA-Konstrukte

- 1187** His-rP2X₆-rP2X₁
- 1207** His-rP2X₅
- 1385** NCAM-ectoP2X₁⁵²⁻²⁹⁹-His
- 1528** His-⁵⁴GYQTSS⁵⁹AAAAAA-rP2X₁
- 1529** His-⁶⁰DLISSV⁶⁵AAAAAA-rP2X₁
- 1530** His-⁶⁶SVKLGKGLA⁷³AAKAKAAA-rP2X₁
- 1531** His-⁷⁴VTQLQG⁷⁹AAAAAA-rP2X₁
- 1532** His-⁸⁰LGPQVW⁸⁵AAAAAA-rP2X₁
- 1533** His-⁸⁶DVADYV⁹¹AAAAAA-rP2X₁
- 1534** His-⁹²FPAHGD⁹⁷AAAAAA-rP2X₁
- 1535** His-⁹⁸SSFVVM¹⁰³AAAAAA-rP2X₁
- 1570** NCAM-Ecto-rP2X₁¹⁰⁸⁻³²⁷-His
- 1727** His-rP2X₁^{codon optimized}
- 1879** His-VIFRL³¹AAAAA-rP2X₁
- 1880** His-KFDIIP³²⁴AAAAAA-rP2X₁
- 1881** His-VDGKAG³¹⁸AAAAAA-rP2X₁
- 1882** His-IHFDIL³¹²AAAAAA-rP2X₁
- 1917** His-rP2X₁-IQLVV³⁶AAAAA

- 1918 His-rP2X₁-LVYVI⁴¹AAAAA
- 1942 NCAM-rP2X₂⁵¹⁻²⁷⁶
- 1966 His-TMTTI³³¹⁻³³⁵AAAAA-rP2X₁
- 1967 His-GSGIG³³⁶⁻³⁴⁰AAAA-rP2X₁
- 1968 His-IFGVA³⁴¹⁻³⁴⁵AAAAA-rP2X₁
- 1969 His-TVLCD³⁴⁶⁻³⁵⁰AAAAA-rP2X₁
- 2003 His-²⁹VGVIF³³AAAAA-rP2X₁
- 2025 His-¹⁰⁴TNFIV¹⁰⁸A-rP2X₁
- 2026 His-¹⁰⁹TPQQT¹¹³A-rP2X₁
- 2027 His-¹¹⁴QGHCA¹¹⁸A-rP2X₁
- 2028 His-¹¹⁹ENPE¹²²A-rP2X₁
- 2029 His-¹²³GGICQ¹²⁷A-rP2X₁
- 2030 His-¹²⁸DDSG¹³¹A-rP2X₁
- 2071 His-³⁵¹LLLLH³⁵⁵AAAAA-rP2X₁
- 2122 His-²⁷¹KPIY²⁷⁴AAAA-rP2X₁
- 2123 His-²⁷⁵QFHG²⁷⁸AAAA-rP2X₁
- 2124 His-²⁷⁹LYGE²⁸²AAAA-rP2X₁
- 2125 His-²⁸³KNLS²⁸⁶AAAA-rP2X₁
- 2126 His-²⁸⁷PGFN²⁹⁰AAAA-rP2X₁
- 2127 His-²⁹¹FRFAR²⁹⁵AAAA-rP2X₁
- 2128 His-²⁹⁶HFVQ²⁹⁹AAAA-rP2X₁
- 2129 His-³⁰⁰NGTN³⁰³AAAA-rP2X₁
- 2130 His-³⁰⁴RRHL³⁰⁷AAAA-rP2X₁
- 2131 His-³⁰⁸FKVFG³¹²AAAA-rP2X₁
- 2224 His-rP2X₆^{shor t3'NTR}
- 2289 His-¹⁷⁶PALLR¹⁸⁰AAAAA-rP2X₁
- 2290 His-¹⁸⁷LFIKNS¹⁹²AAAAAA-rP2X₁

- 2619 His-¹⁸¹EAENFT¹⁸⁶AAAAAA-rP2X₁
- 2673 His-¹⁵⁷KTCEIF¹⁶²AACAAA-rP2X₁
- 2674 His-¹⁶³GWCPVEV¹⁶⁹ACAAAA-rP2X₁
- 2675 His-¹⁷⁰DDKIPS¹⁷⁵AAAAAA-rP2X₁
- 2676 His-¹⁹³ISFPRF¹⁹⁸AAAAAA-rP2X₁
- 2677 His-¹⁹⁹KVNRRN²⁰⁴AAAAAA-rP2X₁
- 2679 His-²¹¹GTYMKKC²¹⁷GAAAAAC-rP2X₁
- 2680 His-²¹⁸LYHKIQ²²³AAAAAA-rP2X₁
- 2681 His-²²⁴HPLCPVF²³⁰AAACAAA-rP2X₁
- 2682 His-²³¹NLGYVV²³⁶AAGAAA-rP2X₁
- 2683 His-²³⁷RESGQD²⁴²AAAGAA-rP2X₁
- 2684 His-²⁴³FRSLAEK²⁴⁹AAAAAAA-rP2X₁
- 2685 His-²⁵²VVGITI²⁵⁷AAGAAA-rP2X₁
- 2686 His-²⁵⁸DWKCDL²⁶³AAACAA-rP2X₁
- 2687 His-²⁶⁴DWHVRH²⁶⁹AAAAAA-rP2X₁
- 2830 NCAM-Ecto-rP2X₁⁵²⁻³³⁷-His
- 2831 NCAM-Ecto-rP2X₁⁵²⁻³⁴⁷-His
- 2832 NCAM-Ecto-rP2X₁⁵²⁻³⁵⁷-His
- 2833 NCAM-Ecto-rP2X₁⁵²⁻³⁶⁷-His
- 2856 His-rP2X₁^{1-116,final}
- 2857 His-rP2X₁^{1-131,final}
- 2892 His-³³¹TMTTI³³⁵AAAAA-rP2X₁

8.2 Abkürzungen

$\alpha\beta$ -meATP	α,β -Methylen-ATP
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
ANAPP ₃	Arylazidoaminopropionyl-adenosin-5'-triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP γ S	Adenosin 5'-O-(3-thiotriphosphat)
$\beta\gamma$ -meATP	β,γ -Methylen-ATP
BiP	<i>immunoglobulin binding protein</i>
BN	Blaue-Native
BSA	bovines Serumalbumin
BzATP	3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl-ATP
COP	coat protomer complex
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoH	Endoglycosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GABA	γ -Aminobuttersäure
GlyR	Glycinrezeptor
h	<i>human</i>
HCl	Salzsäure

HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
His-	Hexahistidyl-
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
5HT ₃ R	Serotoninrezeptor Typ3
2-meSATP	2-Methylthio-ATP
MTSET	Ethyltrimethylammonium-methanthiosulfonat
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NF	Abkürzung für Suraminderivate
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
NP40	Nonidet P40 (Oktylphenolpoly(ethylenglykolether))
NTA	Nitriloessigsäure
ORi	Oozyten-Ringerlösung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PNGase F	Peptid:N-Glycosidase F
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
QC	QuikChange-Mutagenese
r	<i>rat</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHPP	Succinimidyl-3-(hydroxyphenyl)-propionat

SRP	<i>signal recognition particle</i>
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEVC	<i>two-electrode voltage clamp</i>
TM	Transmembranregion
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-adenosin-5'-triphosphat
WT	Wildtyp

9. Lebenslauf

19.05.1977 geboren in Hamburg

Schulbildung

08/1983 - 07/1987 Gartenstadt-Grundschule, Neumünster
08/1987 - 07/1993 Immanuel-Kant-Gymnasium, Neumünster
09/1993 - 06/1994 Penn Manor High School, Millerville, Pennsylvania, USA
08/1994 - 06/1997 Immanuel-Kant-Gymnasium, Neumünster
06/1997 Abitur

Studium

10/1997 - 03/2002 Pharmaziestudium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
02/1998 Famulatur in der Flora-Apotheke, Neumünster
08/1998 Famulatur in der Apotheke des Friedrich-Ebert-Krankenhauses,
Neumünster
03/2000 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
03/2002 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
05/2002 - 04/2003 Praktisches Jahr:
05/2002 - 10/2002 Apotheke Paul im Seerheincenter,
Konstanz
11/2002 - 04/2003 Dr. Kade Pharmazeutische Fabrik GmbH,
Konstanz
06/2003 Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
06/2003 Approbation als Apothekerin

Promotion

11/2003 - 04/2007 Anfertigen der vorliegenden Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Schmalzing,
Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Abteilung Molekulare Pharmakologie 2,
Universitätsklinikum der RWTH Aachen
Titel: Identifizierung von Assemblierungsdomänen von P2X-Rezeptoren

Originalarbeiten

Duckwitz W., Hausmann R., Aschrafi A., Schmalzing G.
P2X₅ Subunit Assembly Requires Scaffolding by the Second Transmembrane Domain and a Conserved Aspartate
J.Biol.Chem., 281:39561-39572 (2006)

Posterpräsentationen

46. Frühjahrstagung der DGPT

Duckwitz W., Hausmann R., Schmalzing G.
Identification of protein domains involved in homotrimerization of human P2X₅ subunits
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 371 (Suppl. 1), A129 (2005)

46. Frühjahrstagung der DGPT

Cottmann S., Eisele T., **Duckwitz W.**, Minko P., Braam U., Hausmann R., Schmalzing G.
Role of transmembrane domains in trimerization of P2X₁ receptor subunits and formation of functional receptor channels
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 371 (Suppl. 1), A92 (2005)

First Joint Italian-German Purine Club Meeting (Chieti, 18.-20.09.2005)

Duckwitz W., Hausmann R., Schmalzing G.

The role of Exon 10 and transmembrane domain 2 in homotrimerization of human P2X₅ subunits

47. Frühjahrstagung der DGPT

Duckwitz W., Hausmann R., Schmalzing G.

Role of transmembrane domain 2 (TM2) and TM2 residue aspartate 355 in the homotrimerization of human P2X₅ subunits

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 372 (Suppl. 1), A121 (2006)

48. Frühjahrstagung der DGPT

Duckwitz W., Hausmann R., Schmalzing G.

Role of transmembrane domains 1 and 2 in homo-trimerization of human P2X₅ subunits

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 375 (Suppl 1), A44 (2007)