

**Biochemische Analyse der Interaktion von P2X4 und P2X7
und Charakterisierung von P2X7B und genetisch verlinkten
P2X4/P2X7-Konkatameren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sanaria Hawro Yakoob

aus

Erbil, Irak

Bonn 2022

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Günther Schmalzing
2. Gutachterin: Prof. Dr. Christa E. Müller

Tag der Promotion: 15.02.2023

Erscheinungsjahr: 2023

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ligandengesteuerte Ionenkanäle	1
1.2	Purinerge Rezeptoren	4
1.2.1	Topologie und Struktur von P2X-Rezeptoren	5
1.2.2	Wichtige Strukturen und Sequenzmotive der P2XR-Untereinheiten	7
1.2.3	Pharmakologische Eigenschaften	10
1.2.4	Agonisten	11
1.2.5	Antagonisten	11
1.2.6	Modulatorische Regulation	12
1.2.7	Kinetik	13
1.3	P2X7-Rezeptor	14
1.3.1	Topologie und Struktur des P2X7-Rezeptors	15
1.3.2	Röntgenkristallstruktur	17
1.3.3	Porendilatation, Gate- und Selektivitätsfilter	19
1.3.4	Vorkommen und klinische Relevanz	21
1.3.5	P2X7 und weitere Splice-Varianten	22
1.3.6	Interaktion zwischen P2X4 und P2X7	23
1.3.7	Konkatamere	25
2	Zielsetzung der Arbeit	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Materialien	28
3.1.1	Chemikalien	28
3.1.2	Detergenzien	29
3.1.3	Oligonukleotide	29
3.1.4	Enzyme	29

3.1.5	Kits	30
3.1.6	Wasser	30
3.1.7	Medien zur Kultivierung von Bakterien	30
3.1.8	Puffer	31
3.2	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1	Verwendete Plasmide und Vektoren	35
3.2.2	QuickChange Site-Directed Mutagenese	35
3.2.3	Megaprimer-Synthese	37
3.2.4	Transformation und Isolierung der Plasmid-DANN	37
3.2.5	Herstellung von Konkatameren	38
3.2.6	cRNA-Synthese	40
3.3	<i>X. laevis</i> -Oozyten als Expressionssystem	41
3.3.1	Herkunft und Haltung der Frösche	41
3.3.2	Gewinnung und Vorbereitung der Oozyten	41
3.3.3	cRNA-Injektion	42
3.4	Proteinchemische Methoden	42
3.4.1	Metabolische Markierung der Proteine mit L-[³⁵ S] –Methionin	42
3.4.2	Fluoreszenz-Markierung mit IR800-NHS-Ester	43
3.4.3	Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA	43
3.4.4	Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin	44
3.4.5	Enzymatische Deglykosylierung	45
3.5	Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid- Gelelektrophorese	46
3.5.1	Denaturierende SDS-PAGE	46
3.5.2	Blue-Native-PAGE	48
3.6	Detektion der Proteine	50
3.6.1	Odyssey-Fluoreszenz-Imaging	50

3.6.2	Typhoon-Fluoreszenz-Imaging	50
3.6.3	Phosphor-Imaging	50
3.6.4	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Charakterisierung von hP2X7B	53
4.1.1	Elektrophysiologische Charakterisierung von hP2X7B	55
4.1.2	Elektrophysiologische Charakterisierung des hP2X7A/hP2X7B-Heteromers	58
4.1.3	Elektrophysiologische Charakterisierung der trunkierten hP2X7A- und hP2X7B-Varianten	59
4.1.4	Elektrophysiologische Charakterisierung der getaggtten bzw. trunkierten hP2X7A- und hP2X7B-Varianten	63
4.1.5	Biochemische Charakterisierung von hP2X7B	66
4.1.6	Interaktion von hP2X7B und hP2X4	70
4.2	Interaktion von rP2X7 und rP2X4	79
4.2.1	SDS-PAGE-Analyse der koexprimierten rP2X4- und rP2X7-Rezeptoren	80
4.2.2	BN-PAGE-Analyse der koexprimierten rP2X4- und rP2X7-Rezeptoren	81
4.2.3	Optimierung der Detergenzien	84
4.3	Interaktion von P2X7 und weiteren P2X-Isoformen	90
4.3.1	Interaktionsverhalten von rP2X7- und rP2X-Isoformen	91
4.3.2	Interaktionsverhalten von hP2X7- und hP2X-Isoformen	99
4.4	Interaktion von hP2X4 bzw. hP2X1 mit einem C-terminal trunkierten hP2X7	106
4.5	hP2X7-Mutanten	114
4.5.1	SDS-PAGE-Analyse der hP2X7-Mutanten	114
4.5.2	BN-PAGE-Analyse der hP2X7-Mutanten	118

4.5.3	SDS-PAGE-Analyse der rP2X7-Mutanten	120
4.6	Homomere Konkatomere	123
4.6.1	Einfluss der Linker auf die Expression der homomeren Konkatomere	123
4.6.2	Einfluss der Transkription auf die Expression der homomeren Konkatomere	127
4.6.3	Einfluss der Protease-Inhibitoren auf die Expression der homomeren Konkatomere	128
4.6.4	Einfluss der StrepIII-Tags auf die Expressionsausbeute der homomeren Konkatomere	130
4.7	Heteromere Konkatomere	133
4.7.1	Einfluss der Linker auf die Plasmamembranexpression der heteromeren Konkatomere	134
4.7.2	Einfluss der Reihenfolge auf die Expression der heteromeren Konkatomere	134
4.7.3	Einfluss der Protease-Inhibitoren auf die Expression der heteromeren Konkatomere	136
5	Diskussion	142
5.1	hP2X7B-Rezeptor	142
5.1.1	Elektrophysiologische Charakterisierung von hP2X7B	142
5.1.2	Biochemische Charakterisierung von hP2X7B	144
5.1.3	Nachweis der Interaktion von hP2X7B und hP2X4	146
5.2	P2X7-Rezeptor	147
5.2.1	Nachweis der Interaktion von hP2X7 und weiteren hP2X-Isoformen	147
5.2.2	Nachweis der Interaktion von rP2X7- und weiteren rP2X-Isoformen	148
5.3	Punktmutationen	150
5.3.1	Auswirkung der Punktmutationen auf die Proteinexpression von hP2X7	

5.3.2	Auswirkung der Punktmutationen auf die Proteinexpression von rP2X7	153
5.4	rP2X7 Konkatomere	155
5.4.1	Proteinexpression von homomeren rP2X4- und rP2X7-Konkatameren	155
5.4.2	Proteinexpression von heteromeren rP2X4- und rP2X7-Konkatameren	158
6	Zusammenfassung	160
7	Literaturverzeichnis	162
8	Anhang	172
8.1	Verwendete cDNA-Konstrukte	172
8.2	Abbildungsverzeichnis	182
8.3	Tabellenverzeichnis	184
8.4	Danksagung	185

1 Einleitung

1.1 Ligandengesteuerte Ionenkanäle

P2X- Rezeptoren gehören zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen, welche durch die Bindung von Signalmolekülen aktiviert werden. Die Aktivierung der Transmembranproteine ermöglicht den direkten, passiven Transport von hydrophilen Ionen (z.B. Calcium, Chlorid, Kalium oder Natrium) durch die hydrophobe Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Die Bindung spezifischer Signalmoleküle führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, sodass es zur Öffnung oder Schließung der Kanalpore kommen kann. Der Ein- und Ausstrom der Ionen erfolgt entsprechend dem Konzentrationsgradienten. Zu den physiologischen Liganden gehören unter anderem die Neurotransmitter 5-Hydroxytryptamin (5-HT₃/Serotonin), γ -Aminobuttersäure (GABA), Glycin, Glutamat, Acetylcholin (Ach) oder Adenosin-5'-triphosphat (ATP). Ebenso wie die ligandengesteuerten Ionenkanäle sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und Enzym-assoziierten Rezeptoren (metabotrope Rezeptoren) essentiell für die synaptische Signaltransduktion.

Die Ionenkanäle können entsprechend ihrer Struktur und Aktivierung unterschieden werden. Zur Aktivierung der ligandengesteuerten Ionenkanäle benötigt es die Bindung spezifischer Signalmoleküle. Die spannungsabhängigen Ionenkanäle (*voltage-gated ion channels*, VGICs) öffnen (Muttach et al. 2017) sich bei Änderungen im Membranpotential und die mechanosensitiven Ionenkanäle (*stretch-activated ion channels*) werden durch mechanische Reize, wie beispielsweise die Dehnung der Plasmamembran, aktiviert.

Die LGICs lassen sich ihrem Aufbau entsprechend in drei Klassen unterteilen. Alle drei Klassen weisen unterschiedliche Aminosäuresequenzen auf, haben aber einen sehr charakteristischen Grundaufbau. Sie besitzen eine oder mehrere extra- und intrazelluläre Domänen, welche durch die Transmembrandomäne miteinander verbunden sind. Darüber hinaus bilden die meisten Ionenkanäle multimere Proteine.

Zu den LGICs gehören:

1. Die Cys-Loop-Rezeptoren umfassen die exzitatorischen Kationenkanälen der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) und der Serotoninrezeptoren (5-

HT₃), und die inhibitorischen Anionenkanäle der Glycin-Rezeptoren und der γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren (GABA). Die funktionellen Cys-Loop-Rezeptoren, auch pLGICs (*pentameric ligand gated ion channels*) genannt, bestehen aus fünf Untereinheiten, wobei jede Untereinheit eine extrazelluläre N-terminale und C-terminale Endodomäne besitzt sowie vier Transmembrandomänen (TM1-TM4). Die fünf Untereinheiten stellen zumeist Heteromere dar, können aber auch zu Homomeren assemblieren. Der Name Cys-Loop deutet auf die Schleife in der N-terminalen Endodomäne hin, welche aus 15 Aminosäuren besteht und über eine Disulfidbindung zwischen zwei konservierten Cysteinresten gebildet wird. Inzwischen liegen die Röntgenkristallstrukturen zu den prokaryontischen LGIC-Homologen GLIC aus *Gloeobacter violaceus* und ELIC aus *Erwinia chrysanthemi* vor, welche die pentameren Strukturmodelle bestätigen (Bocquet et al. 2009; Hilf und Dutzler 2008; Corring et al. 2012).

2. Die Superfamilie der ionotropen Glutamaterezeptoren umfasst die N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA), die α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren (AMPA) und die Kainat-Rezeptoren (Hollmann und Heinemann 1994). Die tetramere Struktur setzt sich ebenfalls zumeist aus Heterooligomeren zusammen. Jede Untereinheit besteht aus einer N-terminalen Ektodomäne, drei Transmembrandomänen, dem *reentry loop* sowie einer C-terminalen Endodomäne. Die TM2 wird als *reentry loop* bezeichnet, da sie von der zytosolischen Seite her in die Membran ein- und wieder austritt. (Dani und Mayer 1995). Auch für Glutamaterezeptoren existieren Röntgenkristallstrukturen, welche den Aufbau und die Funktion besser verständlich machen (Sobolevsky et al. 2009).
3. Die trimere Rezeptor-Superfamilie umfasst die P2X-Rezeptoren (P2X1-P2X7) und die epithelialen Natriumkanäle (ENaCs). Je drei Untereinheiten assemblieren zu einem homomeren oder heteromeren funktionellen Rezeptor. Alle Untereinheiten bestehen dabei aus zwei Transmembransegmenten (TM1 und TM2), welche durch eine ca. 280 Aminosäuren umfassende Ektodomäne verbunden sind, sowie den intrazellulär lokalisierten N- und C-terminalen Endodomänen (Nicke et al. 1998). Die trimere Struktur wurde durch die

Röntgenkristallstruktur des Zebrafisch P2X4-Rezeptors bestätigt (Kawate et al. 2009).

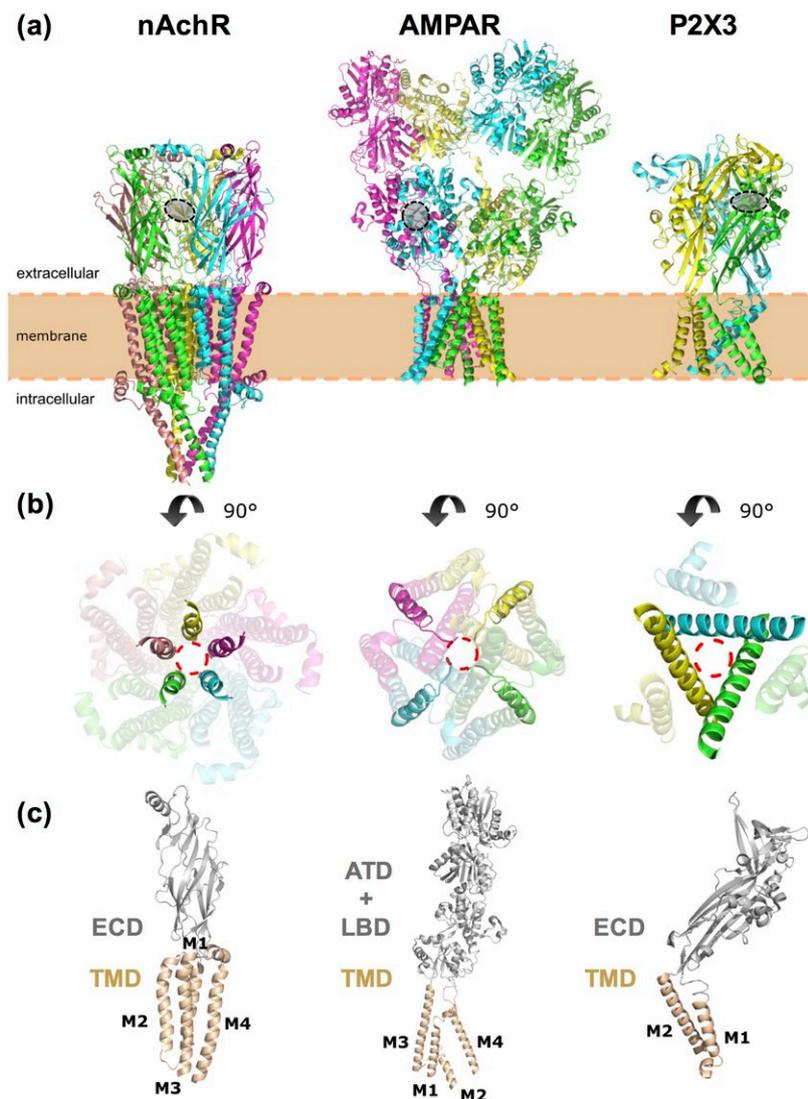


Abb. 1 Röntgenkristallstruktur je eines Mitgliedes von den drei LGIC-Superfamilien. (Nin-Hill et al. 2021)

(a) Die Strukturen der nAChR, AMPAR und P2X3-Rezeptoren sind in paralleler Sicht zur Plasmamembran dargestellt, wobei jede Untereinheit farblich anders gekennzeichnet ist. Der graue Kreis weist auf die orthosterische Bindungsstelle hin, an der die Agonisten und Antagonisten binden können. (b) Zu sehen sind die Transmembrandomänen der drei Rezeptoren von der extrazellulären Aufsicht. Die porenbildenden Strukturelemente der Untereinheiten sind in der jeweiligen Farbe hervorgehoben. Das entspricht der TM2 des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors und des P2X3-Rezeptors, sowie dem *reentry loop* des AMPA-Rezeptors. Die ionenleitende Pore ist durch einen rot gestrichelten Kreis gekennzeichnet. (c) Die Detailaufnahme der jeweiligen Proteinuntereinheit. Die Ektodomänen sowohl des nAChR als auch des P2X3-Rezeptors sind grau und die Transmembrandomänen (TMD) in Aprikose gefärbt. Auch der AMPAR wird mit demselben Farbschema dargestellt, jedoch ist der extrazelluläre Teil jeder Untereinheit in eine aminotermine Domäne (ATD) und eine Ligandenbindungsdomäne (LBD) unterteilt. Die Transmembran-Helices sind von M1 bis M4 bzw. M1 bis M2 beschriftet. Die intrazelluläre Domäne ist nicht dargestellt.

1.2 Purinerge Rezeptoren

Purinerge Rezeptoren sind in diversen Signaltransduktionswegen sowohl in neuronalen als auch in Nicht-neuronalen Zellen involviert. Dazu zählen immunologische Prozesse, exokrine und endokrine Sekretion, Entzündungen, Schmerzen, Zellproliferation, Apoptose, Thrombozytenaggregation und endothelvermittelte Vasodilatation (Ralevic und Burnstock 1998). Die differenzierte Einteilung der purinergen Rezeptoren in P1- (Adenosinrezeptoren) und P2- (sensitiv für Purine wie Adenosintriphosphat/ Adenosindiphosphat sowie Pyrimidine wie Uridintriphosphat/ Uridindiphosphat) Rezeptoren erfolgte erstmals durch Burnstock (Burnstock et al. 1978).

P0-Rezeptoren konnten erstmals in der Arbeitsgruppe von Müller funktionell nachgewiesen werden. Inzwischen wurden zwei Subtypen aus Geweben der Spezies Maus (mAde2R) und Ratte (rAde1R) kloniert. Die Aktivierung beider Subtypen führt zur Hemmung der Adenylatcyclase und bedingt dadurch die Verringerung der cAMP- (cyclisches Adenosinmonophosphat) Produktion (Kügelgen et al. 2008; Borrmann et al. 2009).

P1-Rezeptoren werden durch den natürlich vorkommenden Agonisten Adenosin aktiviert und können durch die Antagonisten der Gruppe Methylxanthine (z.B. Theophyllin oder Coffein) gehemmt werden. Sie besitzen den für G-Protein-gekoppelten Rezeptoren charakteristischen Aufbau aus sieben Transmembrandomänen mit einer C-terminalen Endodomäne und N-terminalen Ektodomäne. Vier verschiedene Subtypen A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ wurden aufgrund molekularer, biochemischer und pharmakologischer Unterschiede charakterisiert. Alle vier Subtypen sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die entweder über die Hemmung (A₁ und A₃) oder die Stimulation (A_{2A}, A_{2B}) der Adenylatcyclase und/oder über die Aktivierung der Phospholipase C (A₁, A_{2B} und A₃) ihre Wirkung entfalten (Ralevic und Burnstock 1998).

P2-Rezeptoren werden unterteilt in die metabotropen G-Protein-gekoppelten P2Y- und den ionotropen ligandengesteuerten P2X-Rezeptoren. Für die P2X-Rezeptoren sind sieben weitere Subtypen (P2X1-P2X7) bekannt, während die P2Y-Rezeptoren acht

Subtypen (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) umfassen (Abbraccio et al. 2006).

1.2.1 Topologie und Struktur von P2X-Rezeptoren

Topologisch besteht jede Untereinheit aus einer großen, glykosylierten und Cysteinreichen extrazellulären Schleife (loop), zwei α -helicalen Transmembrandomänen (TM1 und TM2) sowie einer N- und C-terminalen Endodomänen. Die Gesamtlänge der Aminosäurekette variiert dabei zwischen 379 Aminosäuren (P2X6R) und 595 Aminosäuren (P2X7). Vergleicht man die Aminosäuresequenz der Transmembranregionen inklusive der extrazellulären Schleife, stellt man eine Ähnlichkeit von 40-55 % der P2X-Rezeptoren fest, wobei der P2X4 den anderen Rezeptoren am meisten ähnelt, während der P2X7 Rezeptor die geringste Ähnlichkeit aufweist (North 2002). Drei Untereinheiten bilden einen funktionsfähigen Rezeptor, bei dem die Einheiten entweder einer P2X-Unterfamilie (Homomer) oder verschiedener P2X-Rezeptoren (Heteromer) zugeordnet werden können. Die Vielfalt an möglichen Homo- und Heterotrimeren führt zur Bildung von Rezeptoren mit veränderten Funktionen sowie Transporteigenschaften und pharmakologischen Charakteren.

Einen großen Fortschritt erzielten Kawate et al. im Jahr 2009 als sie das erste Mal die Röntgenkristallstruktur von dem P2X4R des Zebrafisches (*Danio rerio*) im geschlossenen Zustand veröffentlichten (Kawate et al. 2009). Einige Jahre später gelang es Hattori und Gouaux, die Röntgenkristallstruktur im ATP-gebundenen Zustand (Hattori und Gouaux 2012) aufzunehmen. Die Aufnahmen ermöglichten den direkten Vergleich zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand, sodass die Konformationsänderung genauer analysiert werden konnte. Diese Konformationsänderungen zeigen wie die drei inneren TM2 im ATP-gebundenen Zustand gegen den Uhrzeigersinn rotieren und so die Öffnung der Ionenpore ermöglichen.

Mansoor et al. haben im Jahr 2016 das erste Mal die Kristallstruktur eines humanen Rezeptors veröffentlichen können. Der humane P2X3-Rezeptor konnte im offenen, geschlossenen und inaktiven Zustand dargestellt werden. Im selben Jahr wurde die Röntgenkristallstruktur von dem P2X7-Rezeptor des Pandas (*Ailuropoda*

melanoleuca) veröffentlicht (Karasawa und Kawate 2016). Der pdP2X7 ist zu 45% mit dem Zebrafisch-P2X4R identisch und stimmt zu 38% mit dem hP2X3-Rezeptor überein (Karasawa und Kawate 2016). Neben dem Panda wurde der P2X7-Rezeptor von fünf weiteren Säugetierarten (Makaken, Hund, Maus, Ratte und Meerschweinchen) charakterisiert. Diese Spezies weisen eine Ähnlichkeit von mehr als 75% mit dem hP2X7-Rezeptor auf, von dem erst kürzlich die Kristallisation generiert werden konnte (Martínez-Cuesta et al. 2020; Sluyter 2017; Martínez-Cuesta et al. 2020). Die computergestützten Aufnahmen führen zur Auflösung einer dreidimensionalen Struktur, welche den trimeren Aufbau der P2X-Rezeptoren endgültig bestätigt.

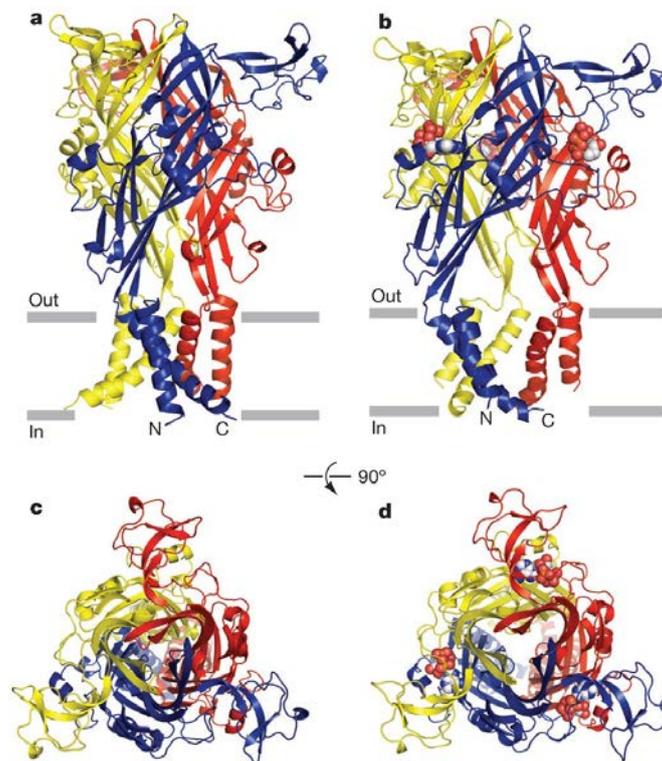


Abb. 2 Röntgenkristallstruktur des zfP2X4 im geschlossenen und offenen Zustand (Hattori und Gouaux 2012)

(a) Die Struktur des P2X4-Rezeptors ist im geschlossenen Zustand in paralleler Sicht zur Plasmamembran dargestellt, wobei jede Untereinheit farblich anders gekennzeichnet ist. Die grauen Balken der inneren und äußeren Membran umgeben die sechs α -helikalen Transmembrandomänen. Im Ruhezustand kreuzen sich die antiparallel angeordneten Transmembranhelices mittig und schnüren so die Transmembranpore ein. Die extrazelluläre Domäne, welche mit einem großen Anteil an β -Faltblattstrukturen versehen ist, ragt weit aus der Membran hinaus. Die N- und C-terminale Endodomäne sind intrazellulär lokalisiert. **(b)** Im Vergleich zu dem geschlossenen Zustand führt die Konformationsänderung bei der oberen Körper-Domäne zu keinem erkennbaren Unterschied, während die untere Körper-Domäne eine deutliche Strukturumwandlung zeigt. Die drei in Form eines Kugelmodells

dargestellten ATP-Moleküle binden an die Liganden-Bindungsstelle zwischen zwei benachbarten Untereinheiten im Bereich der extrazellulären Domäne. Dadurch resultiert ein Auseinanderdriften der Transmembranhelices, sodass es zur Ionenkanalöffnung kommt. **(c)** Geschlossener Zustand in einer Aufsicht von der extrazellulären Seite. **(d)** ATP-gebundener, offener Zustand in einer Aufsicht von der extrazellulären Seite.

1.2.2 Wichtige Strukturen und Sequenzmotive der P2XR-Untereinheiten

Die cytoplasmatische N-terminale Endodomäne umfasst etwa 30 Aminosäuren und beinhaltet ein konserviertes Y-X-T Motiv. Die konservierte Stelle dient zur Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC). Die Mutation der Konsensstelle TX(K/R) des langsam desensibilisierenden P2X2-Rezeptors unterbindet die Phosphorylierung des konservierten Threonin-Rests, wodurch es zu einer schnellen Desensibilisierung kommt (Boué-Grabot et al. 2000). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung und der Kinetik der P2X2-Rezeptoren konnte jedoch nicht bestätigt werden (Franklin et al. 2007). Weiterhin können Mutationen im N-terminalen Bereich unmittelbar vor der ersten Transmembrandomäne einen großen Einfluss auf das Desensibilisierungsverhalten haben. So reichen z.B. drei Punktmutationen (P¹⁹, V²¹, I²²) im N-terminalen Bereich der P2X3-Untereinheit aus, um eine langsame Desensibilisierung des ansonsten schnell desensibilisierenden Rezeptors zu verursachen (Hausmann et al. 2014). Insgesamt scheint die N-terminale Endodomäne einen direkten Einfluss auf die Regulierung der Leitfähigkeit von P2X-Rezeptoren zu haben.

Die Transmembranregionen TM1 und TM2 tragen zu verschiedenen Funktionen des Rezeptors bei. Die Röntgenkristallstruktur der Apo-Struktur des zfP2X4 zeigt, dass die TM1-Helix peripher zur TM2-Helix positioniert ist sowie, dass die TM2-Helices sich in der äußeren Hälfte der Membran kreuzen und dabei die Ionenpore einschnüren (Kawate et al. 2009). Die intra- und extrazelluläre Vestibuli flankieren die Pore und verleihen ihr so das sanduhrförmige Aussehen (Li et al. 2010). In Folge der Ligandenbindung kommt es zur Konformationsänderung, bei der sich die TM2 irisartig von der zentralen Achse der Pore zurückzieht und infolgedessen sich der Ionenkanal öffnet (Hattori und Gouaux 2012).

Die TM2 spielt nicht nur eine primäre Rolle bei der Porenöffnung, sondern auch bei der Assemblierung, der Ionenselektivität und dem Gating. Beispielsweise kommt beim Menschen der P2X5-Rezeptor als natürliche Deletionsmutante (bezeichnet als hP2X5

Δ328-349) vor. In folge des Ausspleißens von Exon 10 fehlt hier ein Teil der Prä-TM2 und TM2. Dies führt zur Bildung von Aggregaten höherer Ordnung, welche keinen funktionellen Ionenkanal darstellen können. Der Vollängen rP2X5 assembliert dahingegen zum funktionellen Homotrimer. Das konservierte Aspartat an Position 355 stabilisiert dabei die Trimerbildung durch Helix-Helix-Wechselwirkungen (Duckwitz et al. 2006). Weitere Aminosäuren im Bereich der TM2 wurden im Rahmen einer Alanin-Scanning-Mutagenese (P2X2) bzw. Cystein-Scanning-Mutagenese (P2X7) als Gate- und Selektivitätsfilter charakterisiert. Für den P2X2-Rezeptor sind es die Aminosäuren T336, T339 und S340 und für den P2X7-Rezeptor ist es S324 (Khakh und Egan 2005; Pippel et al. 2017).

Die Ektodomäne stellt mit einer Länge von ca. 280 Aminosäuren die längste Domäne dar und macht somit den größten Anteil am Gesamtprotein der P2X-Rezeptoren aus. Die Ektodomäne ist mit zehn vollständig konservierten Cysteinen, einer varrierenden Anzahl an N-Glykosylierungsstellen und einer ATP-Bindungsstelle pro Untereinheit der am stärksten konservierte Bereich. Die zehn unterschiedlich positionierten Cysteine sind über fünf Disulfidbrücken miteinander verknüpft und dienen zur Stabilisierung und Faltung der P2X-Rezeptoren. Mit Hilfe von einfachen und doppelten Cystein-Alanin-Mutationen konnten folgende Disulfidbindungspaare für den hP2X1 bestimmt werden: C117-C165, C126-C149, C132-C159, C217-C227 und C261-C270 (Ennion und Evans 2002). Analoge Disulfidbrücken sind an der Protonenmodulation in rP2X2, der Agonistenbindung und dem Kanal gating des rP2X4 sowie dem Rezeptortransport zur Zellmembran des rP2X7 beteiligt (Clyne et al. 2002; Rokic et al. 2010; Jindrichova et al. 2012).

Als weiteres wichtiges Strukturelement enthält die Ektodomäne spezifische Informationen für die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten (Hausmann et al. 2015). Um herauszufinden, welche Aminosäuren zur ATP-Bindung beitragen und wo die ATP-Bindungstasche lokalisiert ist, wurden acht konservierte Aminosäuren mit einer hohen ATP-Potenz durch Cysteinreste substituiert. Die Doppelmutante K68C/F291C konnte über Disulfidbrücken die benachbarten Untereinheiten miteinander vernetzen, sodass funktionelle Dimere und fast vollständige Trimere gebildet werden konnten. Die restlichen paarweise mutierten Cysteinreste führten nicht zur Vernetzung zwischen den Untereinheiten (Marquez-Klaka et al. 2007). Schlussfolgernd liegt die

Agonistenbindungsstellen an der Schnittstelle zwischen zwei benachbarten Untereinheiten. Anhand der Kristallstruktur des ATP-gebundenen zP2X4 konnten die Lokalisation der ATP-Bindungsstelle und die Beteiligung der analogen Aminosäuren an der ATP-Koordination bestätigt werden (Kawate et al. 2009; Hattori und Gouaux 2012).

Zudem befindet sich in der Ektodomäne folgende Konsensussequenz (Asn-X-Ser/Thr, mit X stellvertretend für alle Aminosäuren außer Prolin) für die N-Glykosylierungsstellen, wobei die Anzahl variieren kann. Studien mit artifiziell entfernten N-Glykosylierungssequenzen durch Tunicamycin oder gerichteter Mutagenese aus der potentiellen Ektodomäne belegten die Notwendigkeit der Glykosylierung für die Erzeugung der Kanalströme. So weisen Untereinheiten mit nur einer glykosylierten Stelle geringe Ströme auf, während die Abwesenheit einer Glykosylierungsstelle zu keinem Stromfluss führt (North 2002).

Die cytoplasmatische C-terminale Endodomäne variiert sowohl stark innerhalb der Aminosäuresequenz als auch in der Länge zwischen den einzelnen Isoformen. Die einzige konservierte Sequenz, Y-X-X-X-K, befindet sich in der Nähe der TM2 und hat einen direkten Einfluss auf die Plasmamembranexpression. Chaumont et al. konnten zeigen, dass die Konsensstelle ebenso zur Stabilisierung der P2X-Rezeptoren und einiger G-Protein gekoppelten Rezeptoren in der Zellmembran beiträgt (Chaumont et al. 2004). Die C-terminale Endodomäne scheint auch für die Internalisierung einiger P2X-Rezeptoren und der damit verbundenen funktionellen Regulation von Bedeutung zu sein (Royle et al. 2002). Durch Domänen austausch und Punktmutationen konnte zudem gezeigt werden, wie relevant die C-terminale Endodomäne für die Kanalporenbindung, das Permeationsverhalten sowie dem Gating ist (Eickhorst et al. 2002; Boldt et al. 2003). Schlussfolgernd trägt die C-terminale Endodomäne zur differenzierten Funktion der einzelnen P2XR-Untereinheiten bei.

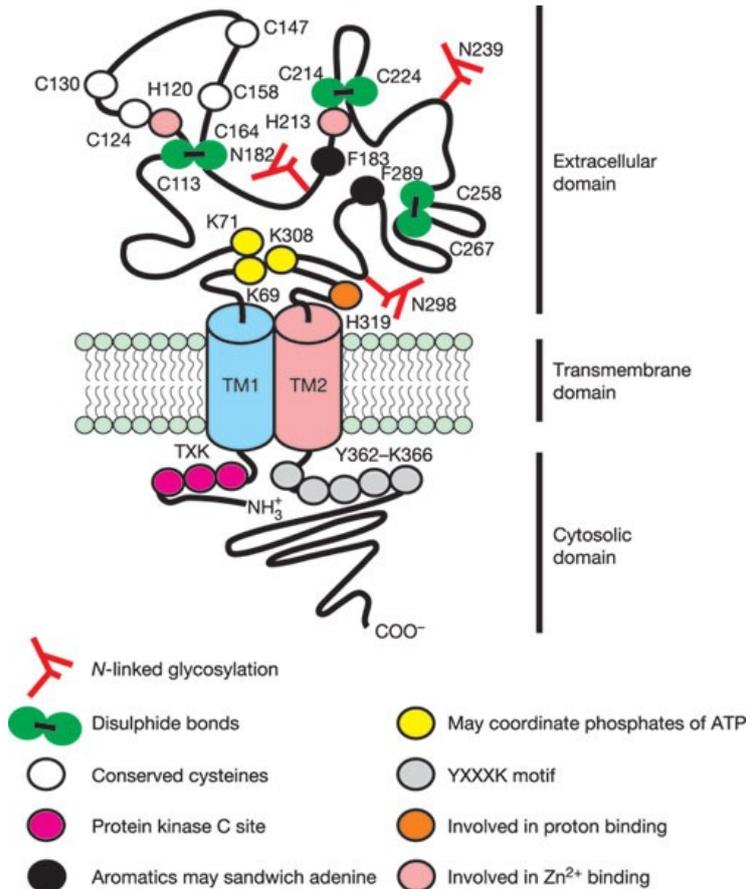


Abb. 3 Topologie und Hauptmerkmale von einer P2X-Rezeptor-Untereinheit (Khakh und North 2006)

Die Struktur basiert hauptsächlich auf den Kenntnissen über P2X1 und P2X2. Die Positionen der Aminosäuren entsprechen dem rP2X2-Rezeptor.

1.2.3 Pharmakologische Eigenschaften

Die P2X-Rezeptor-Subtypen können aufgrund der pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften differenziert werden. Sie sind durch ihre ubiquitäre Expression an vielen physiologischen Funktionen wie Schmerzsignalisierung, Kontraktion glatter Muskelzellen, Geschmacksempfindung und Entzündungen beteiligt (Khakh und North 2006). ATP wird aus geschädigtem Gewebe freigesetzt und bindet an mindestens zwei der drei P2X-Rezeptor-Bindungsstellen. Die Bindung führt innerhalb von Millisekunden zur Öffnung der Membrankationenkanäle, sodass Natrium, Kalium und Calcium aufgrund des elektrochemischen Gradienten in die Zelle permeieren können. Es kommt zur Depolarisation der Zelle und folglich zur Signalübertragung durch die Freisetzung

verschiedener Transmitter einschließlich Noradrenalin, ATP, GABA, Glycin, Glutamat und Acetylcholin (Khakh 2001).

1.2.4 Agonisten

Die ATP-Potenz variiert mit EC_{50} -Werten von niederen mikromolaren bis hin zu millimolaren Bereich in folgender Reihenfolge: 10 μ M für P2X1 und P2X3, 100 μ M für P2X2 und P2X4, 10mM für P2X7 (Coddou et al. 2011). P2X5 und P2X6 zeigen ähnliche agonistische Aktivierung und langsame Desensibilisierungstechnik wie P2X2 und P2X4 (Gever et al. 2006). Durch die Triphosphatmodifikation von ATP sind verschieden potente ATP-Derivate entstanden. Dazu zählen die Phosphonsäureanaloge Alphabeta-Methylen-ATP ($\alpha\beta$ -meATP) und β,γ -Methylen-ATP ($\beta\gamma$ -meATP), welche eine substituierte Methylengruppe zwischen den entsprechenden Phosphaten haben. Sie besitzen eine höhere Potenz zu den homo- und heteromeren P2X1- und P2X3-Rezeptoren, wobei $\alpha\beta$ -meATP eine vergleichbare Potenz zu beiden Rezeptoren zeigt, während $\beta\gamma$ -meATP bei dem P2X3-Rezeptor etwa 30- bis 50-fach weniger potent ist. Ein weiteres Beispiel ist das Adenosin- 5'-O-(3-thiotriphosphat) (ATP γ S), welches durch die Thio-Substitution am terminalen Phosphat gebildet wurde und an allen P2X-Rezeptoren außer P2X7 aktiv ist. Das modifizierte Ribosederivat 2'(3')-O-4-benzoylbenzoyl-ATP- (BzATP) ist wiederum der stärkste Agonist am P2X7-Rezeptor mit einem EC_{50} Wert von 50 μ M, während ATP einen EC_{50} Wert von 3 bis 4 mM aufweist. Zu den weniger relevanten Agonisten gehören Diadenosinpolyphosphate und andere Nukleotidtriphosphate (Coddou et al. 2011).

1.2.5 Antagonisten

Die Rezeptoren weisen nicht nur dem Agonisten ATP gegenüber sehr differente Empfindlichkeiten auf, sondern auch dem Antagonisten 2'-3'-O-(2,4,6,-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP). So bindet der Antagonist im nanomolaren Bereich an den P2X1-, P2X3- oder den heteromeren P2X2/3-Rezeptor, weist aber eine 1000-mal geringere Affinität gegenüber dem P2X2-, P2X4- oder P2X7-Rezeptor auf (Virginio et al. 1998).

Ein weitaus älterer Antagonist ist das Suramin, welcher 1988 als erster nicht-selektiver P2-Antagonist identifiziert wurde (Dunn und Blakeley 1988). Einige Jahre später wurde der nicht-selektive P2X-Antagonist Pyridoxal-5'-phosphat-6-azo-penyl-2,4-disulfonat (PPADS) entdeckt (Lambrecht et al. 1992). Beide Antagonisten dienten als Vorlage für die Entwicklung weiterer Antagonisten mit höherer Potenz und Selektivität. Beispielsweise besitzt das Sumarinanalogon NF449 eine 3000-fach stärkere Potenz an dem rP2X1-Rezeptor im Vergleich zu Sumarin sowie 400 bis 1000000-fach höhere Selektivität gegenüber den anderen rP2X-Subtypen (rP2X2, rP2X2/3, rP2X3, rP2X4) (Rettinger et al. 2005). Die Entdeckung des selektiven P2X3-Antagonisten NF110 führte ebenso zu der Erkenntnis, dass die Isoform-Selektivität der Suraminderivate von der Stellung der Sulfonsäuregruppen abhängig ist (Hausmann et al. 2006).

Im Vergleich zu den anderen P2X-Rezeptoren zeigt der rP2X4R keine Reaktion gegenüber den klassischen, P2X-Antagonisten wie Suramin und PPADS. Zu den wenigen selektiven P2X4-Antagonisten zählt das Benzodiazepin-Derivat 5-BDBD sowie die Phenoxazin-Derivate PSB-12054 und PSB-12062 (Balázs et al. 2013; Hernandez-Olmos et al. 2012). Soweit wurden nur wenige selektive Antagonisten für den P2X1, P2X2 und P2X4, und weitaus mehr selektive potente Antagonisten für P2X3 und P2X7 entwickelt (Illes et al. 2020). Zu den zahlreichen selektiven P2X7-Rezeptor Antagonisten gehören Brilliant Blue G (Jiang et al. 2000a), A-740003 (Honore et al. 2006), AZD-9056 (Baxter et al. 2003) und JNJ-54175446 (Recourt et al. 2020).

1.2.6 Modulatorische Regulation

Desweiteren verfügen die P2X-Rezeptoren über unterschiedliche allosterische Bindungsstellen. Die Besetzung der allosterischen Bindungsstellen durch verschiedene Metalle wie Spurenmetalle, Schwermetalle oder dreiwertige Kationen beeinflusst die Affinität und die Wirksamkeit des Agonisten am Rezeptor. Weitere nennenswerte Modulatoren sind Steroide, Alkohole, pH-Wert-Veränderungen, Proteinkinasen und Lipide. Man unterscheidet zwischen negativ allosterischen Modulatoren (NAM), welche nicht-kompetitive Antagonisten darstellen und positiv allosterischen Modulatoren (PAM), welche die Wirksamkeit eines orthosterischen Agonisten erhöhen können (Müller 2015). Ein bekanntes Beispiel für PAM ist das

makrozyklische ZNS-Lacton Ivermectin, welches reversibel und selektiv an zwei Stellen der Ektodomäne des hP2X4-Rezeptors bindet (Priel und Silberberg 2004).

Ein Vorteil der allosterischen Modulatoren ist die potentielle Subtyp-Selektivität, welche auch im Falle der Protonierung gegeben ist. P2X2 ist der einzige homomere Kanal, welcher durch saure Bedingungen potenziert wird, während P2X1-, P2X3-, P2X4- und P2X5- Rezeptoren bei sauren Bedingungen inhibiert werden. Die Senkung des extrazellulären pH-Wertes in den sauren Bereich erhöht ebenso die ATP-induzierten Ströme des P2X2/3-Rezeptors signifikant und ermöglicht somit eine weitere Differenzierung zu dem P2X3-Rezeptor (Stoop et al. 1997).

1.2.7 Kinetik

P2XRs werden aufgrund ihrer kinetischen Eigenschaften in schnell desensibilisierende und langsam oder nicht desensibilisierende Rezeptoren eingeteilt. Unter Desensibilisierung versteht man die ATP-stimulierte Stromabnahme bzw. verringerte bis aufgehobene Rezeptorantwort bei anhaltender Anwesenheit von ATP. Solange der Ligand im desensibilisierten Zustand gebunden ist, bleibt der Rezeptor geschlossen und inaktiv (Rettinger und Schmalzing 2004). Die Aktivierung der P2X1- und P2X3-Rezeptoren führt schon bei nanomolaren Konzentrationen von ATP zu einem Peak-Strom. Beide Rezeptoren desensibilisieren innerhalb weniger Millisekunden vollständig, eine erneute Aktivierung direkt im Anschluss ist aufgrund der langsamen Erholung aus dem desensibilisierten Zustand nicht möglich.

P2X2- und P2X4-Rezeptoren zeigen hingegen eine langsame Desensibilisierungskinetik bestehend aus einer initialen Peak-Strom-Komponente und einer konstanten Steady-State-Komponente. Die ATP-Stimulation löst bei dem langsam desensibilisierenden P2X5-Rezeptor nur kleine Ströme aus. Der P2X7-Rezeptor zählt ebenso zu den langsamen bzw. kaum desensibilisierenden Rezeptoren. ATP wirkt in verschiedenen Konzentrationen an allen Rezeptoren, während beispielweise der ATP-Derivat $\alpha\beta$ -me-ATP nur an den P2X1- und P2X3-Rezeptoren wirksam ist. Die Koexpression des langsam desensibilisierenden $\alpha\beta$ -me-ATP-insensitiven P2X2-Rezeptors mit dem schnell desensibilisierenden $\alpha\beta$ -me-ATP-sensitiven P2X3-Rezeptor führt zur Bildung des langsam desensibilisierenden und

$\alpha\beta$ -me-ATP-sensitiven P2X_{2/3}-Heteromers. Der Versuch lieferte den ersten Hinweis für die Existenz von funktionellen Heteromeren (Lewis et al. 1995).

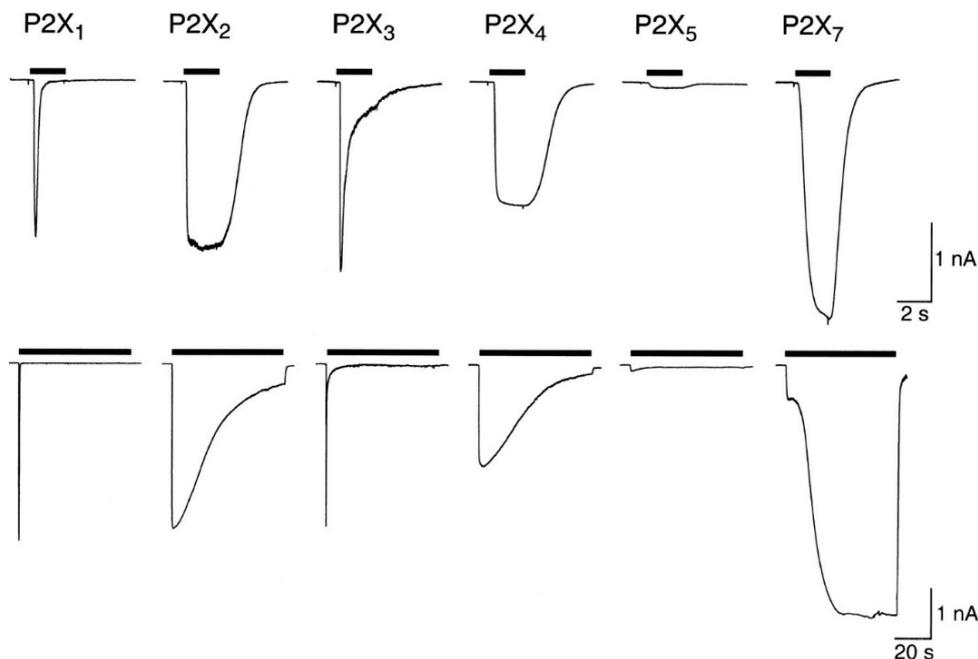


Abb. 4 Desensibilisierung der P2X-Rezeptoren der Ratte im Vergleich bei kurzer und langer ATP-Applikation (North 2002)

Die sechs homomeren P2X-Rezeptoren der Ratte wurden in HEK293-Zellen exprimiert und mit ATP (30 μ M, außer 1mM für P2X₇) für 2s (oben) und 60s (unten) induziert. Bei P2X₇ wurde eine zweiminütige ATP-Applikation vor der gezeigten Applikation durchgeführt. Es ist ein zehnfacher Unterschied in der Zeitskala zwischen oben und unten vorhanden.

1.3 P2X₇-Rezeptor

Der P2X₇-Rezeptor wurde als letzter P2X-Rezeptor Subtyp charakterisiert und bis zur Identifizierung, aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften, als P2Z-Rezeptor bezeichnet. Die Identifizierung erfolgte im Jahr 1996 durch Surprenant et al., denen die Isolierung des P2X₇-Rezeptors aus dem Rattenhirn gelang. Besonders auffällig an dem P2X₇-Rezeptor war die Durchlässigkeit für große Moleküle sowie die überdurchschnittlich lange C-terminale Endodomäne (Surprenant et al. 1996). Einige Zeit später konnte der hP2X₇-Rezeptor aus Monozyten und der mP2X₇-Rezeptor aus Mikroglia identifiziert werden (Rassendren et al. 1997; Chessell et al. 1998).

In den folgenden Jahren wurde die rekombinante P2X₇-cDNA aus vier weiteren Säugetierarten (Rhesusmakake, Hund, Panda und Meerschweinchen) sowie dem Zebrafisch isoliert. Während die Säugetierarten eine Ähnlichkeit von mehr als 75% mit

dem hP2X7-Rezeptor aufweisen, zeigt der Zebrafisch weniger als 40% Übereinstimmung (Sluyter 2017). Die Homologie gegenüber den anderen Subtypen ist ebenfalls gering, wobei der hP2X4-Rezeptor mit 48% noch die höchste Übereinstimmung innerhalb der Aminosäuresequenz aufweist (North 2002). Das hP2X7R-Gen besteht aus 13 Exons und ist auf dem Chromosom (12q24.31) in unmittelbarer Nähe von dem hP2X4-Rezeptor (12q24.32) lokalisiert (Buell et al. 1998). Die räumliche Nähe und die ähnliche Sequenzhomologie deuteten darauf hin, dass der P2X7R aus einer Verdopplung des P2X4-Gens entstanden sein konnte (Adinolfi et al. 2010).

1.3.1 Topologie und Struktur des P2X7-Rezeptors

Der P2X7-Rezeptor besteht wie die restlichen Familienmitglieder aus zwei Transmembrandomänen, der extrazellulären Schleife und den N- und C-terminalen Endodomänen. Die N-terminale Endodomäne hat eine spezifische Stelle, welche die Selektivität und Aktivität des P2X7R-Ionenkanals sowie die Steuerung des Rezeptor-Gatings reguliert. Darüber hinaus sind bestimmte Motive vorhanden, die an der Wechselwirkung mit MAPKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und der Proteinkinase C, welche die Desensibilisierung steuert, beteiligt sind (Amstrup und Novak 2003). Der größte Unterschied zu den anderen P2X-Rezeptoren liegt hauptsächlich in der Länge der C-terminalen Endodomäne. Dementsprechend werden funktionelle Besonderheiten wie die Bildung der Membranpore, die Regulation des Ionenflusses oder die Apoptose dem C-terminalen Endodomäne zugeordnet.

Zudem handelt es sich um eine Cysteinreiche und Lipopolysaccharidbindende Domäne, die die Signalaktivierung und die posttranslationale Modifikation moduliert (Costa-Junior et al. 2011; Denlinger et al. 2001). Die C-terminale Endodomäne ist an den meisten Funktionen des P2X7-Rezeptors beteiligt, daher wird im Folgenden genauer auf die wichtigsten Motive eingegangen. Besonders auffällig ist die hohe Anzahl an intra- und extrazellulär lokalisierten Cysteinresten. Die N-terminale Endodomäne der hP2X7-Untereinheit ist mit drei Cysteinresten ausgestattet und die C-terminalen Endodomäne mit 18. Aufgrund der reduzierenden Umgebung im Zytosol ist es kaum möglich, dass stabile Disulfidbrücken intrazellulär ausgebildet werden.

Um die Rolle der C-terminalen Cysteine für die posttranslationale Modifikation zu untersuchen wurden 17 Cysteine der mP2X7-Untereinheit mutiert. Die Mutationen führten zu starken Defekten der Plasmamembranexpression, da der Transport vermindert und der proteolytische Abbau verstärkt wurde. Durch Substitution der Cysteine zu Alanin konnte gezeigt werden, dass vier Cysteingruppen essentiell für die Palmitoylierung sind (Gonnord et al. 2009). Unter Palmitoylierung versteht man die posttranslationale Modifikation, bei der die Palmitinsäure an die Thiolgruppe der Cysteine gehängt wird und dadurch die Konformationsänderung begünstigt.

Neben der Stabilisierung der modifizierten Proteine kann die Palmitoylierung auch den Rezeptortransport und die Zellsignalisierung beeinflussen. Die weitere Aufklärung der Palmitoylierung und seiner Rolle erfolgte erst kürzlich mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopiestrukturen von rP2X7 im apo (geschlossen) und ATP-gebundenen (offenen) Zustand. Dazu wurde die Funktion von zwei zytoplasmatischen Elementen, dem C-Cys-Anker und dem zytoplasmatischen Ballast, genauer untersucht. Zum einen verankert der sogenannte C-Cys-Anker die Palmitoylgruppen an die Membran und zum anderen stellt der C-Cys-Anker eine Verbindung zwischen der TM2 und der zytoplasmatischen Kappe dar. Die zytoplasmatische Kappe dient wiederum zur Stabilisierung der offenporigen Konformation und ist im geschlossenen und offenen Zustand des P2X7-Rezeptors vorhanden (McCarthy et al. 2019; Mansoor et al. 2016).

Die Kryo-EM-Strukturen konnten jedoch zeigen, dass aufgrund der verborgenen Lage der Cysteine im zytoplasmatischen Ballast eine Palmitoylierung kaum möglich ist. Viel mehr deuten die Strukturen darauf hin, dass sieben Cysteinreste einen Ionenkomplex mit zwei Zinkionen bilden und zudem eine Guanosinnukleotid-Bindungsstelle besitzen. Der dinukleäre Zinkionenkomplex und das Guanosinnukleotid sind nicht an dem Rezeptor-Gating beteiligt (McCarthy et al. 2019).

Weitere Cysteine sind in der Ektodomäne enthalten, davon sind zehn über fünf Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Bei der Verknüpfung werden die Thiolgruppe der Cysteine oxidiert und das resultierende Cystin bildet kovalente Bindungen aus. Die kovalenten Bindungen dienen zur Stabilisierung und Faltung der P2X-Rezeptoren, denn sie sind deutlich fixierender als nicht-kovalente Wechselwirkungen. Des Weiteren sind konservierte Cysteinreste in der Ektodomäne an dem Transport der P2X7-

Rezeptoren in der Plasmamembran beteiligt. Einzel- und Doppelpunktmutationen zu Threonin resultierten in verringerter Plasmamembranexpression, was wiederum auf den gehemmten Rezeptortransport zurückzuführen ist (Jindrichova et al. 2012).

Die Cysteine zählen zu den am höchsten konservierten Aminosäuren in Proteinen und können auch zwischen den verschiedenen Untereinheiten Disulfidbrückenbindungen bilden. Ebenso nennenswert sind die partiell konservierten Sequenzmotive für die N-Glykosylierung (Asp-X-Ser/Thr mit X stellvertretend für alle Aminosäuren außer Prolin). Die hP2X7-Untereinheit besitzt fünf und die rP2X7-Untereinheit sechs N-Glykosylierungsstellen. Bei der Glykosylierung wird das Oligosaccharid im endoplasmatischen Retikulum mit dem Asparagin verknüpft. Durch die Glukosidasen I und II werden zwei Glukosereste und ein Mannoserest abgespalten. Das gebildete N-glykosylierte Protein kann die Chaperone Calnexin und Calreticulin binden, diese unterstützen wiederum den Faltungsprozess. Erst bei der richtigen Faltung können die kernglykosylierten Proteine das ER verlassen und im Golgi-Apparat weiter modifiziert werden (Komplexglykosylierung). Die N-Glykosylierungen erhöhen die Stabilität der Proteine und schützen sie vor dem proteolytischen Abbau.

1.3.2 Röntgenkristallstruktur

Die genaue Aufklärung der Kristallstruktur des pdP2X7-Rezeptors konnte mit Hilfe der vorhandenen Kristallstrukturen des Zebrafisches P2X4R (45% identisch) und des hP2X3R (38% identisch) erzielt werden (Kawate et al. 2009, 2009; Hattori und Gouaux 2012; Mansoor et al. 2016). Die dreidimensionale Struktur des P2X7R wird in Form eines springenden Delfins abgebildet, wobei die extrazelluläre Region den Hauptkörper einschließlich Kopf, Ober- und Unterkörper sowie Flossen (linke, rechte und Rückenflosse) darstellt, während die TM1 und TM2 den Egel formen.

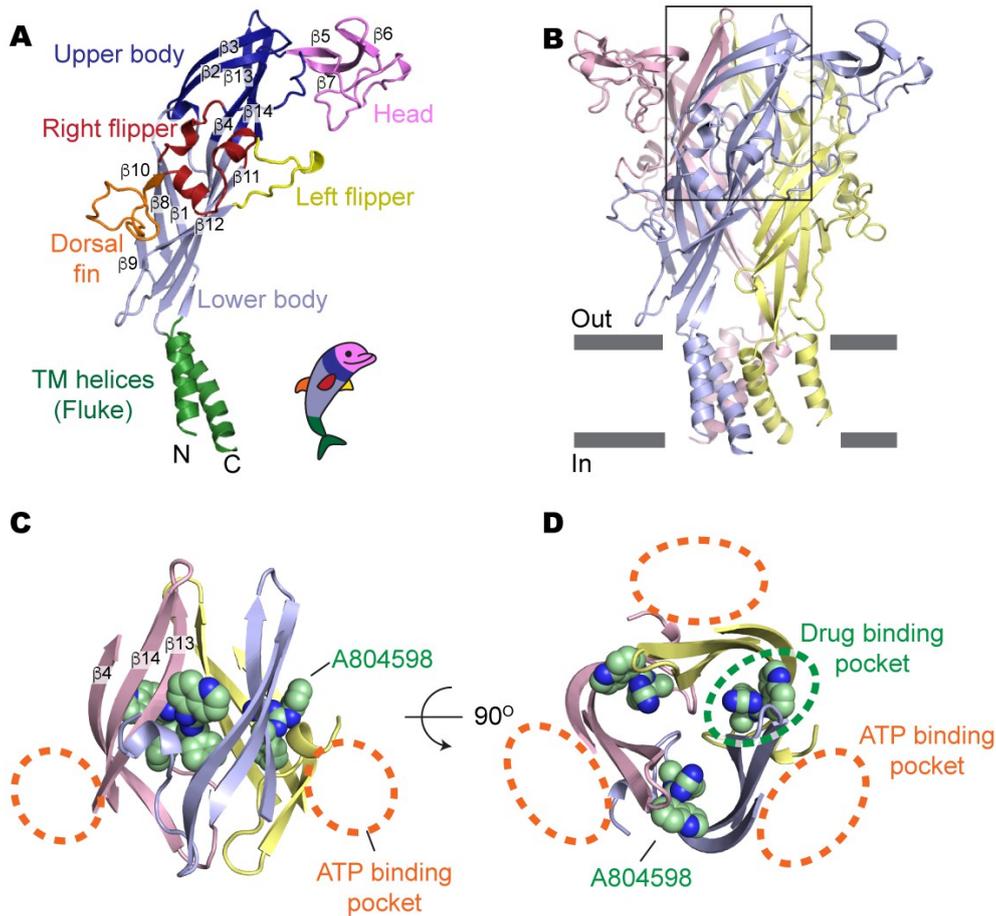


Abb. 5 Cartoon-Darstellung Apo-geschlossenen Struktur des pdP2X7 (Karasawa und Kawate 2016)

(A) Seitliche Ansicht der delphinartigen Untereinheit. (B) Cartoon-Darstellung der trimerischen pdP2X7 von der Seite betrachtet. Das schwarze Feld zeigt eine ungefähre Position der oberen Körperdomänen an, die unter (C) und (D) angezeigt werden. (C) Seitenansicht der oberen Körperdomäne mit A804598-Bindungsstellen in Bezug auf die ATP-Bindungstaschen (orange gestrichelte Linien). (D) Aufsicht auf die Apo-Struktur mit Hinblick auf die ATP-Bindungstaschen und eine der medikamentenbindenden Taschen (grün gestrichelte Linie).

Die Transmembrandomänen weisen eine α -helicalen Struktur auf (α_1 und α_6) und die extrazelluläre Domäne besteht aus vier α -Helices und vierzehn β -Strängen. Der N-terminale Endodomäne umfasst eine α -Helix (α_0) und zwei β (β_{-1} und β_0), die C-terminale Endodomäne enthält weitere zehn α -Helices (α_7 bis α_{16}) und vier β -Stränge (β_{15} bis β_{18}). Der distale Abschnitt der C-terminalen Endodomäne in jeder Untereinheit umfasst α_9 bis α_{16} und β_{16} bis β_{18} und bildet den zytoplasmatischen Ballast. Zu der zytoplasmatischen Kappe zählen die β -Stränge (β_{-1} und β_0) der N-terminalen Domäne sowie β_{15} und α_8 der C-terminalen Domäne. Die TM2- α -Helix ist über den C-Cys-Anker mit der zytoplasmatischen Kappe verbunden. Der P2X7-Trimer umfasst somit sechs Transmembrandomänen, davon bilden die drei α -helicalen TM2 den

Die erste Hypothese besagt, dass es zu einer Erweiterung der integralen P2X7-Rezeptorpore kommt. Durch Einzelkanalmessungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Porendilatation keine intrinsische Eigenschaft des P2X7-Rezeptors ist, wie bis vor einigen Jahren vermutet wurde. Denn trotz anhaltender Aktivierung durch ATP⁴⁻, bleibt der Porendurchmesser bei Kationen mit zunehmender Größe gleich. Die zytolytische Pore besitzt einen konstant minimalen Porendurchmesser von etwa 8,5Å (Riedel et al. 2007).

Die zweite Hypothese besagt, dass es als Reaktion auf die lange ATP-Stimulation zu einer Rekrutierung sekundärer Proteine wie Pannexin und Connexin kommt. Diese porenbildenden Kanalproteine sind für große Moleküle einschließlich Fluoreszenzfarbstoffe permeabel. Umgekehrt können P2X7-Rezeptoren in Abwesenheit von Pannexin1 keine farbdurchlässige Pore bilden (Pelegriin und Surprenant 2006). Unabhängig davon, ob der P2X7-Rezeptor selbst die Pore bildet oder ein P2X7-Pannexin1-Komplex gebildet wird, ist es eindeutig, dass Trunkierungen der C-terminalen Endodomäne die Permeabilität großer Moleküle verhindern und nur für kleine Kationen durchlässig sind.

Relevant für die Permeabilität scheint hier die Cys-reiche Region (CRR, C362-C379) zu sein. Die CRR trägt dazu bei, der hemmenden Wirkung von Cholesterin entgegenzuwirken. Die Mutation von C362 und C363 verhinderte die YO-PRO-1-Aufnahme, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Plasmamembranexpression. Des Weiteren konnte in Kombination mit der Cysteinmutagenese-Studie gezeigt werden, dass die Palmitoylierung von C362 und C363 die Kanalöffnung erleichtert und die hemmende Wirkung von Cholesterin verringern kann. Ursache hierfür könnte die direkte Interaktion zwischen Cholesterin und Palmitat sein (Karasawa et al. 2017).

Anhand der Cystein-Scanning-Mutagenese konnten für folgende Aminosäuren: I331, V335, Y336, G338, S339, L341, S342, Y343 und G345, Änderungen der Kanalleitfähigkeit und/oder Offenkanalwahrscheinlichkeit durch die modifizierende Wirkung von MTSEA (Methanethiosulfonat-Ethylammonium) in Anwesenheit von ATP⁴⁺ aufgezeichnet werden. MTSEA bindet kovalent an das Cysteinsulfhydryl und es entsteht eine Verbindung, die bei einem physiologischen pH-Wert positiv geladen ist. Sie besitzt eine Durchschnittsgröße von 4.6Å und ist somit klein genug, um den offenen ATP-gebundenen hP2X7-Kanal zu durchdringen. Die chemische Modifikation

von den systematisch mutierten Cysteine im Bereich I331 bis G345 mit geladenen MTS (Methanethiosulfonat) Reagenzien reduzierte die einkanalige Stromamplitude und erhöhte die Offenkanalwahrscheinlichkeit gleichzeitig. Die einzige Ausnahme stellte die Aminosäure S342 dar. Der Grund für die erhöhte Offenkanalwahrscheinlichkeit sind Wasserstoffbrückenwechselwirkungen. Die Wasserstoffatome aus MTSEA bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxyl- und Carbonylsauerstoffen von S342 und stabilisieren so den offenen Zustand der hP2X7R-Kanäle. Anhand von Einzelkanalmessungen in Kombination mit MTSEA konnte die divergenteste Aminosäure S342 als Gate- und Ionenselektivitätsfilter bestimmt werden (Pippel et al. 2017).

1.3.4 Vorkommen und klinische Relevanz

Der P2X7 kommt in allen Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, neutrophilen und basophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Mastzellen) vor und ist somit entscheidend für die Entzündung- und Immunantwort. Der P2X7 vermittelt Zytokin- und Chemokinfreisetzung, T-Lymphozyten-Differenzierung sowie Zelltod und fördert das Krebszellwachstum (Di Virgilio et al. 2017). Demzufolge stellt der P2X7 einen sehr interessanten Aspekt für die therapeutische Entwicklung dar.

Als Reaktion auf eine schwere Schädigung oder einem hohen Stresslevel wird in der Zelle eine hohe Menge an ATP durch ATP-Kanäle oder aus ATP-dichten Granulaten sezerniert. Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch die hohe Konzentration an extrazellulärem ATP führt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-18. Interleukin-1 β ist als proinflammatorisches Zytokin ein Hauptmediator von chronischen Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen und wird aus der inaktiven Vorstufe durch das Caspase-1 bzw. ICE (Interleukin 1 β converting enzyme) in die aktive Form gespalten (Estrov und Talpaz 1996). Bei Interleukin-18 handelt es sich ebenso um ein proinflammatorisches Zytokin, dessen Freisetzung und Reifung aus menschlichen Monozyten durch ATP induziert wird. Die ATP-Stimulation allein reicht jedoch nicht für die Freisetzung von IL-1 β und IL-18, sondern benötigt eine zusätzliche Präinkubation der Monozyten mit Lipopolysaccharid. Die Freisetzung und Reifung von IL-1 β und IL-18 kann zudem durch P2X7-Antagonisten, oxidiertes ATP und teilweise durch einen Antikörper gegen

P2X vollständig gehemmt werden. Die ICE-Hemmung kann dahingegen die Freisetzung der LPS-präparierten, ATP-stimulierten Zytokine nicht verhindern (Mehta et al. 2001).

1.3.5 P2X7 und weitere Splice-Varianten

In den letzten zehn Jahren haben die P2X7-Varianten an großer Bedeutung dazu gewonnen. Die zwei Hauptursachen für die verschiedenen P2X7-Varianten sind Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) und das alternative Spleißen. Die SNPs im hochgradig polymorphen P2X7-Gen können dabei einen Funktionsgewinn oder einen Funktionsverlust auslösen und haben dadurch infektiöse, entzündliche sowie kardiovaskuläre Erkrankungen zur Folge (Roger et al. 2010). Durch das alternative Spleißen entstehen hingegen eine Reihe von natürlich vorkommenden P2X7-Isoformen, die sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren schon identifiziert werden konnten (Nicke et al. 2009). Neben dem P2X7A gibt es neun bekannte humane P2X7-Rezeptor-Isoformen (P2X7B bis P2X7J), welche unter anderem durch das Spleißen der C-terminalen Endodomäne zustande gekommen sind.

Beginnend mit P2X7B, der um 231 Aminosäuren gekürzt ist, aber eine Insertion aus 18 veränderten Aminosäuren trägt, welche aus dem intrazellulären Drittel der Transmembrandomäne 2 (VRDSIFH) als extrazelluläre C-Terminale Endodomäne (ALGKWFGEESD) fortschreitet (Adinolfi et al. 2010). Gefolgt von P2X7D, P2X7F und P2X7H, bei denen die C-terminale Endodomäne zwar in voller Länge vorliegt, die Funktionalität jedoch aufgrund der fehlenden TM1 nicht gegeben ist. Ursache hierfür ist der Einbau eines neuen Start-Codons. Bei den Varianten G und H wird das Exon N3 in die intronische Region zwischen den Exons 2 und 3 eingebaut und fungiert ebenso als neues Start-Codon, wodurch die TM1 bei der Translation ausgelassen wird. Bei den Spleißvarianten P2X7RE und P2X7RG wird, wie bei dem P2X7B, ein weiteres Intron zwischen den Exonen 10 und 11 eingebaut, dadurch kommt es zu einem frühzeitigen Stopp-Codon. Daraus resultiert die um 171 Aminosäuren verkürzte C-terminale Endodomäne (Cheewatrakoolpong et al. 2005). P2X7I kodiert für ein Null-Allel und ist das Ergebnis von einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (Skarratt et al. 2005). Dem P2X7J (258 AS) fehlt neben der C-terminalen Endodomäne, die TM2 sowie das distale Drittel der extrazellulären Schleife. Das führt zu einer verminderten

Kanalfunktionalität sowie einer verringerten Fähigkeit der Porenbildung. Auf die Aktivierung durch Benzoyl-ATP reagiert der P2X7J mit Apoptose (Feng et al. 2006).

Der P2X7B stellt die einzige funktionelle trunkierte Isoform dar. Er weist eine Kanalpermeabilität für kleine Ionen auf, ist aber im Gegensatz zu P2X7A nicht in der Lage, die große Leitfähigkeitspore zu bilden. Die Ko-Expression von P2X7A und P2X7B resultiert in einem Heterotrimer, welcher die Funktionalität und das Verhalten, des P2X7A-Rezeptors widerspiegelt bzw. teilweise potenziert. Grund dafür könnte eine erhöhte Affinität für ATP oder Benzoyl-ATP sein. Besonders interessant ist der P2X7B aufgrund seiner hohen Verbreitung im Immun- und Nervensystem sowie im lymphatischen Gewebe. Durch den Verlust der für den P2X7 typischen proapoptischen Aktivität, stellt der P2X7B einen weniger gefährlichen, aber dennoch wachstumsfördernden Rezeptor dar (Adinolfi et al. 2010).

1.3.6 Interaktion zwischen P2X4 und P2X7

Die verschiedenen P2X-Isoformen können zu Homotrimeren und Heterotrimeren assemblieren. In den vergangenen Jahren konnte bereits die Expression für folgende Heteromere nachgewiesen werden: P2X1/2 (Brown et al. 2002; Aschrafi et al. 2004), P2X1/4 (Nicke et al. 2005), P2X1/5 (Torres et al. 1998b; Haines et al. 1999; Lê et al. 1998), P2X2/3 (Lewis et al. 1995; Liu et al. 2001; Radford et al. 1997), P2X2/5 (Compan et al. 2012), P2X2/6 (King et al. 2000; Barrera et al. 2007) und P2X4/6 (Lê et al. 1998). Die funktionellen Eigenschaften der Heteromere liegen dabei meist zwischen denen der beiden Monomere. Der P2X7 ist der einzige Rezeptor aus der P2X Familie, bei dem bis heute noch kontrovers diskutiert wird, ob er zu Heteromeren assembliert. Während die ersten Ko-Immünpräzipitationsstudien zu P2X7 eine Interaktion mit anderen Isoformen ausgeschlossen haben, deuten aktuellere Studien auf eine Interaktion zwischen den P2X4- und P2X7-Untereinheiten hin (Torres et al. 1999). Wie bereits erwähnt, hat der P2X7-Rezeptor die höchste Aminosäuresequenzähnlichkeit mit dem P2X4-Rezeptor und ist auf demselben Gen kolokalisiert. Auf sekretorischen Epithelzellen und Zellen des Immun- und Entzündungssystems sind die Untereinheiten der Isoformen P2X4 und P2X7 koexprimiert. In den Flimmerepithelzellen der Atemwege werden P2X-Rezeptoren exprimiert, deren Zusammensetzung noch nicht eindeutig geklärt ist.

Ma et al. konnten pharmakologischen nachweisen, dass höchstwahrscheinlich eine Heteromerbildung aus P2X4- und P2X7-Untereinheiten vorliegt. Die ATP-evozierten Reaktionen deuten darauf hin, dass die vorhandenen P2X-Rezeptoren entweder aus P2X4- und P2X7-Untereinheiten zusammengesetzt sind oder aus modifizierten P2X4-Untereinheiten. Grund für die Annahme sind die Eigenschaften der sogenannten P2X_{Wimp}, die den Eigenschaften der jeweiligen Rezeptoren P2X4 und P2X7 entsprechen. So können beispielsweise die ATP-evozierten Ströme durch P2X7-Rezeptorantagonisten Brilliant Blue G oder KN-62 gehemmt werden oder durch den allosterischen Modulator Ivermectin und Zink potenziert werden (Ma et al. 2006). Die heterolog exprimierten Rezeptoren wurden für weitere Untersuchungen in HEK293-Zellen koimmunpräzipitiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die P2X4-Untereinheiten in der Gegenwart von P2X7-Untereinheiten, die Plasmamembranexpression um das zweifache zunahm und der P2X4-Rezeptor in der Plasmamembran stabilisiert wurde.

Auch die funktionale Untersuchung konnte eine Wechselwirkung zwischen den P2X4- und P2X7-Untereinheiten bestätigen. Dazu wurden zwei nicht funktionierende P2X4-Rezeptormutanten, C353W und S341W, mit dem P2X7-Wildtyp in *X. laevis*-Oozyten koexprimiert. Die Koexpression der dominant-negativen P2X4-Mutante (C353W) mit P2X7, hemmt die P2X7-vermittelten Ströme um mehr als das Zweifache. Darüber hinaus erzeugt die Koexpression von P2X7 mit negativ dominanten P2X4-Untereinheiten Ivermectin-sensitivie bzw. reduzierte ATP-aktivierte Ströme, obwohl P2X7 alleine keine veränderten Ströme in Bezug auf Ivermectin aufweist (Guo et al. 2007). Guo et al. waren, aufgrund der physikalischen und funktionellen Interaktion zwischen den P2X4- und P2X7-Untereinheiten, überzeugt von der Existenz der Heteromere. Viele weitere Studien in nativen und transfizierten Systemen befürworten eher die starke Wechselwirkung zwischen zwei separaten Homotrimeren anstelle der Existenz von Heterotrimeren. Die FRET-Daten unserer Arbeitsgruppe sprechen für eine Heteromerisierung, auch wenn noch kein charakteristischer Phänotyp nachgewiesen werden konnte (Schneider et al. 2017).

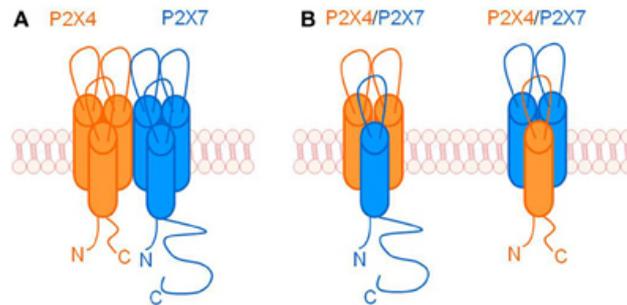


Abb. 7 Schematische Darstellung, wie P2X4 und P2X7 interagieren können (Craigie et al. 2013)

A Einzelne P2X4- und P2X7- Homotrimeren, die aufgrund der räumlichen Nähe miteinander wechselwirken. **B** P2X4- und P2X7 bilden Heterotrimeren mit verschiedenen stöchiometrischen Zusammensetzung.

1.3.7 Konkatomere

Konkatamere sind aneinander ligierte kodierende Sequenzen mehrerer Untereinheiten in einem offenen Leseraster. Dabei sind die Untereinheiten über ihr C-terminales Ende kovalent mit dem N-terminalen Ende der darauffolgenden Untereinheit verknüpft. Durch den Einbau flexibler und relativ langer Linker soll eine ausreichende Mobilität der N- und C-terminalen Enden gegeben sein. Zudem soll die Flexibilität der Linkersequenz die korrekte Faltung der kovalent verknüpften Untereinheiten gewährleisten. Studien an $\alpha\beta$ -Rezeptoren haben gezeigt, dass die Länge des Linkers entscheidend für den funktionalen Ausdruck verknüpfter Untereinheiten ist. Zu kurze Linker können die Kanäle physikalisch einschränken und zu einer verminderten GABA-Empfindlichkeit führend, während zu lange Linker zu einem degenerierten Zusammenbau führen (Baumann et al. 2001).

Nicke et al. konnten ähnliche Beobachtungen bezüglich der Degradierung an dem P2X1-Rezeptor feststellen. Die Validierung der verketteten P2X1-Rezeptoren ergab, dass die in der Plasmamembran exprimierten Konkatomere abgesehen von dem Trimer, größtenteils aus degradierten monomeren und dimeren Untereinheiten bestanden. Demzufolge waren beispielsweise die P2X1-Tetramere aus nicht kovalent verknüpften Dimeren zusammengesetzt (Nicke et al. 2003).

Nicke und Kollegen haben ausgeschlossen, dass die rP2X1-Tetramere aus dem ER exportiert werden und konnten nachweisen, dass die im ER vorhandenen Tetramere zu Monomeren und Trimeren dissoziieren und als solche in die Plasmamembran gelangen (Nicke et al. 2003)

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Trunkierung der C-terminalen Endodomäne auf die Expression biochemisch und elektrophysiologisch untersucht werden. Des Weiteren sollte ein direkter Vergleich zwischen den C-terminal trunkierten hP2X7A-Variante und der Spleißvariante hP2X7B durchgeführt werden. Hierzu sollten die Aminosäuren der hP2X7A-Variante auf die Länge der hP2X7B-Spleißvariante (1-364) gekürzt werden. Darüber hinaus sollten beide Varianten schrittweise bis zur übereinstimmenden Aminosäuresequenz (1-346) gekürzt werden. Die Fragestellung konzentrierte sich auf die Rolle der Länge der C-terminalen Endodomäne und der Bildung der zytoplasmatischen Kappe für die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik.

Ein weiterer Ansatz, Informationen über die hP2X7B-Spleißvariante zu erhalten, war die Interaktion von hP2X7B mit weiteren hP2X-Subtypen zu untersuchen. Zur biochemischen Charakterisierung der Heteromerbildung wurden die einzelnen Subtypen mit dem hP2X7B in *X. laevis*- Oozyten koexprimiert und nach dem „Köder und Beute“-System analysiert. Basierend auf bekannten Methoden in unserem Labor, sollte die Interaktion mittels Metall-Affinitätschromatographie geprüft und mittels Strep-Tactin-Chromatographie nachgewiesen werden. Die Detektion der Heterome in der Plasmamembran bzw. im Gesamtprotein sollte anschließend mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung bzw. der metabolischen Markierung erfolgen.

Ebenfalls ungeklärt ist die Heteromerisierung von P2X7-Untereinheiten mit anderen P2X-Subtypen. Bisher konnte die hP2X4/hP2X7-Heteromerisierung biophysikalisch nachgewiesen werden (Schneider et al. 2017) und auch biochemische Experimente von vorherigen Doktoranden deuten auf die Assemblierung der hP2X7- und hP2X4-Untereinheiten zu Heteromeren hin. Daher war es ein weiteres Ziel die Heteromerbildung des P2X7 mit weiteren P2X-Subtypen, insbesondere mit P2X4, zu identifizieren und biochemisch nachzuweisen. Hierzu sollten ebenso die koexprimierten Untereinheiten nach den bekannten Methoden des Labors untersucht werden und anschließend nach dem „Köder und Beute“ System analysiert

Eine weitere Fragestellung, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte, ist die Auswirkung von Punktmutationen der hochkonservierten basischen Aminosäuren. Diese tragen bekanntermaßen wesentlich zur ATP-Bindung bei und

sind essenziell für eine hohe ATP-Potenz des P2X7-Rezeptors. Um die biochemische Bedeutung der jeweiligen konservierten Aminosäuren in der extrazellulären Domäne von hP2X7 zu untersuchen, sollen Einzel- und Doppelmutationen der Lysine und des Arginins zu Alanin durchgeführt werden. Die Auswirkungen der Substitution auf die Expression in der Plasmamembran und die Gesamtexpression in *X. laevis*-Oozyten soll mittels Fluoreszenzmarkierung und metabolischer Markierung geprüft werden.

Das letzte Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung und Untersuchung von homomeren und heteromeren Konkatomeren. Zur Herstellung der Konkatomere sollen mehrere P2X4- und P2X7-Untereinheiten in bestimmter Reihenfolge aneinander ligiert werden. Die Verknüpfung der Untereinheiten soll durch verschiedene Linker mit unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung der Aminosäuren erfolgen. Es soll geklärt werden, welche Linker am besten geeignet sind um die proteolytische Spaltung der Konkatomere zu verhindern. Zudem soll der Einfluss der cRNA-Synthese auf die Stabilität der Konkatomere geprüft werden. Dazu werden basierend auf denselben DNA-Konstrukten die kotranskriptionelle und posttranskriptionelle Synthese durchgeführt. Die biochemische Untersuchung der Konkatomere erfolgt anschließend durch Fluoreszenzmarkierung und metabolischer Markierung der in *X. laevis*-Oozyten exprimierten Konkatomere.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Falls abweichend, wird dies explizit erwähnt.

Chemikalie/Detergenz	Firma
Acetonitril	AppliChem, Darmstadt
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA
All Blue-Marker	Bio-Rad, München
6-Aminocapronat	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Calbiochemie, Darmstad
Antipain	AppliChem, Darmstadt
Bovines Serum Albumin	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
n-Dodecyl- β -D-maltosid	Serva, Heidelberg
Digitonin	Calbiochemie, Darmstad
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidium bromide solution	Buchs, Schweiz
Gentamycin-Sulfat	AppliChem, Darmstadt
Glyzerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Sigma Aldrich, Steinheim
Iodacetamid	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	VWR, Leuven, Belgien
L-[³⁵ S]-Methionin	PerkinElmer, Überlingen
Luria Bertani	Roth, Karlsruhe

Leupeptin	Biomol, Hamburg
Natriumacetat	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	VWR, Leuven, Belgien
NEB-Puffer	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Ni-NTA-Agarose	(MACHEREY-NAGEL, Düren
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin	Roth, Karlsruhe
Pefabloc-SC	Biomol, Hamburg
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
Peptin	Roth, Karlsruhe
Phusion High-Fidelity PCR Master-Mix	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem, Darmstadt

Tab. 1 Verwendete Chemikalien

3.1.2 Detergenzien

Zur Proteinextraktion und –isolierung wurde das Detergenz Digitonin von Calbiochem (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) bezogen. Weiterhin wurden hierzu die Detergenzien Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (NG 310) und Glyco-diosgenin (GDN) der Firma Anatrache (Maumee, Ohio, USA) sowie n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM) von der Firma AppliChem (Darmstadt) verwendet. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden Natriumdodecylsulfat (SDS) und das Lithiumdodecylsulfat (LiDS) der Firma Merck (Darmstadt) verwendet.

3.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Klonierung und Sequenzierung wurden von den Firmen Eurogentec (Köln) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

3.1.4 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme inklusive der zugehörigen Puffer und die in der Proteinchemie verwendeten Endoglykosidasen wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt, Main) erworben.

3.1.5 Kits

Zur Aufreinigung und Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia (E). coli* wurde das GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich, Steinheim) verwendet. Für eine größere Ausbeute an Plasmid-DNA wurde das Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mittels dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgearbeitet. Schließlich wurde zur Linearisierung der Plasmid-DNA das Nucleotide Removal Kit, (Qiagen, Hilden) verwendet. Für die *in vitro*-cRNA-Synthese der Konkatomere wurde die posttranskriptionale Modifikation mit Hilfe des ScriptCap m7G Capping System Cellscript (Biozym) durchgeführt.

3.1.6 Wasser

Es wurde Wasser in verschiedenen Qualitäten für die unterschiedlichen Methoden verwendet. Über einen Ionenaustauscher wurde aus Trinkwasser demineralisiertes Wasser gewonnen. Darüber hinaus wurde aus dem demineralisiertem Wasser durch Ultrafiltration DNase- und RNase- freies Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit von $< 0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ gewonnen (Reinstwassersystem Ultra-Clear).

3.1.7 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Zur Kultivierung von *E. coli* Bakterien wurde ein Ampicillin-haltiges (LB)-Medium benötigt. Hierzu wurde 20g LB-Broth in einem Liter deionisiertem Wasser gelöst und anschließend für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Vor Gebrauch wurde das LB-Medium mit Ampicillin (Calbiochem, Hamburg) in einer Endkonzentration von 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ versetzt oder Kanamycin mit 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Für die Agarplatten wurde das LB Medium mit 1,5 % Agar gemischt und autoklaviert. Das Antibiotikum wurde hinzugegeben, sobald die Lösung auf 55 °C abgekühlt war und anschließend wurde die Lösung zur Aushärtung in Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt.

3.1.8 Puffer

Puffer	Komponenten	Konzentration
Oozyten-Ringer-Lösung (ORi ⁺) pH 7,4	NaCl (VWR, Leuven, Belgien) KCL CaCl ₂ MgCl ₂ HEPES pH-Wert mit NaOH eingestellt	90 mM 1 mM 1 mM 1 mM 10 mM
ORi ⁺ versetzt mit Gentamycin pH 7,4	NaCl (VWR, Leuven, Belgien) KCL CaCl ₂ MgCl ₂ HEPES Gentamycin-Sulfat (AppliChem, Darmstadt) pH-Wert 7,4 mit NaOH eingestellt	90 mM 1 mM 1 mM 1 mM 10 mM 5 % (w/v)
Oozyten-Ringer-Lösung (ORi ⁻) Mg ²⁺ u. Ca ²⁺ -frei pH 7,4	NaCl (VWR, Leuven, Belgien) HEPES KCl pH-Wert mit NaOH eingestellt	90 mM 1 mM 1 mM

Tab. 2 Puffer für die Inkubation der *X. laevis*-Oozyten

Puffer	Komponenten	Konzentration
TAE-Puffer	TRIS (AppliChem, Darmstadt)	40 mM
50x TRIS-Acetat- EDTA pH 8,5	Essigsäure (Roth, Karlsruhe)	1,14 mM
	EDTA	1 mM
5x Agarose Ladepuffer pH 8,0	EDTA	0,1 M
	Sucrose (Sigma Aldrich, Steinheim)	40 %
	Bromphenolblau	0,05 %

Tab. 3 Puffer für die Agarosegele

Puffer	Komponenten	Konzentration
Oozyten-PBS pH 8,5	NaCl	110 mM
	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	MgCl ₂	1 mM
Phosphatpuffer 0,1 M pH 8,0	Na ₂ HPO ₄	93,2 mM
	NaH ₂ PO ₄	6,8 mM
Homogenisierung spuffer	Phosphatpuffer pH 8,0	0,1 M
	Iodacetamid (AppliChem, Darmstadt)	10 mM
	Pefabloc SC (Biomol, Hamburg)	100 µM
	Antipain (Biomol, Hamburg)	50 µM
	Leupeptin (Biomol, Hamburg)	50 µM

	Pepstain (Biomol, Hamburg)	50 μ M
	DDM	0,2 % (w/v)
Inkubationspuffer	Phosphatpuffer (pH 8,0)	0,1 M
	Pefabloc SC (Biomol, Hamburg)	100 μ M
	Antipain (Biomol, Hamburg)	50 μ M
	Leupeptin (Biomol, Hamburg)	50 μ M
	Pepstain (Biomol, Hamburg)	50 μ M
	DDM	0,2 % (w/v)
Waschpuffer	Phosphatpuffer pH 8,0	0,1 M
	Imidazol	25 mM
	Iodacetamid	1 mM
	Pefabloc SC (Biomol, Hamburg)	100 μ M
	DDM	0,05 % (w/v)
Elutionspuffer für Ni ²⁺ -NTA	Imidazol pH 8,0	250 mM
	Digitonin	1 %
Elutionspuffer für Strep-Tactin	(D)-Biotin (Roth, Karlsruhe)	12,22 mg/ml
	Imidazol pH 10,0	250 mM
	Digitonin	1 % (w/v)

Tab. 4 Puffer zur Proteinaufreinigung aus *X. laevis*-Oozyten

Puffer	Komponenten	Konzentration
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	Glycin (AppliChem, Darmstadt)	1,92 M
	TRIS (AppliChem, Darmstadt)	250 mM
	SDS	1 %

5x SDS-PAGE- Ladepuffer farblos pH 6,8	TRIS	310 mM
	Glycerol (AppliChem, Darmstadt)	50 % (m/v)
	SDS (für Proteine mit GFP)	1 % (w/v)
	SDS (für Proteine ohne GFP)	10 % (w/v)
5x SDS-PAGE- Ladepuffer farbig pH 6,8	TRIS	310 mM
	Glycerol (AppliChem, Darmstadt)	50 % (m/v)
	SDS (für Proteine mit GFP)	1 % (w/v)
	SDS (für Proteine ohne GFP)	10 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,5 %
BN-PAGE- Anodenpuffer pH 7,0	Imidazol	25 mM
	pH-Wert mit HCl eingestellt	
BN-PAGE- Kathodenpuffer pH 7,0	Tricin (AppliChem, Darmstadt)	50 mM
	Imidazol	7,5 mM
	Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Heidelberg)	0,002 %
3x BN-PAGE- Gelpuffer pH 7,0	6-Aminocapronat (AppliChem, Darmstadt)	1,5 M
	Imidazol	75 mM
	pH mit HCl eingestellt	
5x BN-PAGE- Ladepuffer	6-Aminocapronat (AppliChem, Darmstadt)	100 mM
	Glycerol	50% (m/v)
	Coomassie Blue G-250	1 %
Entfärber für BN- PAGE	Ammoniumhydrogencarbonat (Roth, Karlsruhe)	25 mM
	Acetonitril	50 % (w/v)

	(AppliChem, Darmstadt)	
Fixierer	Isopropanol (VWR, Leuven)	25% (w/v)
	Essigsäure	10% (w/v)

Tab. 5 Puffer für die BN-und SDS-PAGE

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Verwendete Plasmide und Vektoren

Für die cRNA-Synthesen und zur Expression der cRNA in *X. laevis*-Oozyten wurden folgende Vektoren verwendet:

- pNKS 2 Der Vektor pNKS2 wurde bereits 1995 beschrieben (Gloor et al., 1995). Vor Verwendung wurde er im Bereich der 5'-translatierten Region optimiert.
- pNKS 3 Der Vektor pNKS3 entstand durch Einbringen einer *EcoR*I- und einer *Not*I-Erkennungssequenz zur Linearisierung hinter der Poly-A-Sequenz im 3'-nicht-translatierten Bereich.
- pNKS 4 Der Vektor pNKS4 entstand durch Modifikation des Vektors pNKS3. Die *EcoR*I-Erkennungssequenz wird durch zwei *Xho*I-Erkennungssequenzen im 3'-Bereich der Poly-A-Sequenz ersetzt.

3.2.2 QuickChange Site-Directed Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese ist eine weit verbreitete Methode zum Einfügen einer Mutation in ein Gen. Sie dient zur Deletion, Insertion oder dem Austausch von Basen. Analog zu dem QuickChange-Kit der Firma Stratagene (Waldbronn, Deutschland) wurde die zu mutierende doppelsträngige Plasmid-DNA als Matrize in die PCR eingesetzt. Zwei zueinander komplementären PCR-Primer, welche die gewünschte Änderung des Basencodes aufweisen, dienen als Synthesestart. Die Elongation erfolgt anschließend mit Hilfe der Phusion High Fidelity DNA-Polymerase in Anwesenheit von dNTPs. Dabei entstehen geknickte zirkuläre DNA-Stränge mit den inkorporierten

Primern, die die gewünschte Veränderung enthalten. Im Anschluss an die PCR, wird die methylierte Ausgangs-DNA enzymatisch durch *Dpn* I (New England Biolabs, Frankfurt am Main) abgebaut. Hierzu werden die Proben 1 h bei 37 °C inkubiert und mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Das unmethylierte und damit *Dpn* I-resistente PCR-Produkt wurde daraufhin in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue transformiert und anschließend durch Kontrollrestriktionen und Sequenzierung verifiziert.

Komponenten	Volumen
Phusion High Fidelity Master Mix	25 µl
Forward Primer	125 ng
Reverse Primer	125 ng
DNA-Template	3 µl
Bidest. H ₂ O	ad 50 µl

Tab. 6 Ansatz einer QC-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95-98 °C	1-5 min	1
Denaturierung	95-98 °C	30 s – 1 min	12-18
Primer Annealing	53-55 °C	1 min	
Elongation	68 °C	2 min / 1 kB	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Tab. 7 PCR-Programm für die QC Site-Directed Mutagenese

3.2.3 Megaprimer-Synthese

Im Vergleich zu der QuickChange Site-Directed Mutagenese ermöglicht die Megaprimer-Synthese die Einführung von bis zu mehreren hundert Basenpaaren. Diese Methode wurde hauptsächlich zur Fusionierung von verschiedenen Fluoreszenz-Proteinen (mGFP, sfGFP, GFP) sowie den Einbau des StrepIII-Tags verwendet. Um den Einbau des Megaprimers zu ermöglichen, wurden zwei Primer mit einer neuen Sequenz geplant, welche den zu inserierenden Bereich sowie flankierend die Sequenzen des Gens enthalten. Im ersten Schritt wurde mittels PCR der gewünschte Bereich amplifiziert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit 50 präparativ aufgereinigt. Dazu wird das PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Aufreinigung wurde die DNA-Konzentration mittels dem GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific TV SM 0312) abgeschätzt und in einer zweiten PCR in die Plasmid-DNA eingebaut. Dem *Dpn*I-Verdau folgte auch hier die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen.

3.2.4 Transformation und Isolierung der Plasmid-DNA

Die kompetenten *E. coli* Zellen des Stammes XL1-Blue sind dazu in der Lage die Einzelstrangbrüche (Nicks) der DNA, welche durch die QuickChange-PCR entstanden sind, zu ligieren. Zur Transformation wurden 50 µl Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µl der unmethylierten Plasmid-DNA versetzt. Für die Retransformation wurden 50 µl DH5α-Zellen mit 1-2 µl einer 1:10 Verdünnung der Plasmid DNA für 5-10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Nur Klone, welche die DNA mit einem Ampicillinresistenzgen aufgenommen haben, konnten wachsen. Am nächsten Tag wurden sechs der *E. coli* Klone in je 2 mL ampicillinhaltiges LB-Medium ($c = 100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) überführt und über Nacht bei 37 °C bis zu 16 h in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die vermehrte DNA wurde mit dem GenElute Plasmid-Miniprep-Kit isoliert und aufgereinigt. Die DNA-Isolation wurde mittels Agarosegelelektrophorese geprüft.

3.2.5 Herstellung von Konkatameren

Zur Untersuchung der Assemblierung von P2X4- und P2X7-Untereinheiten wurden Konkatamere mit einer definierten Zusammensetzung von Untereinheiten kloniert. Die kodierenden Sequenzen der P2X4- und P2X7-Untereinheiten können dabei in der Reihenfolge und im stöchiometrischen Verhältnis variieren. Für die Herstellung von Konkatameren wurden zunächst Linkersequenzen verschiedener Längen (AGAG, AGSAGSAGSL, AGSAGGGSAGGSGG oder GGSAGGGSAGGSGG) mittels PCR am 5'-Ende des Inserts eingeführt. Zusätzlich wurden kompatible Enzymschnittstellen jeweils im 3'- und 5'- Bereich der DNA-Sequenz eingebaut um die gewünschten Vektoren bzw. Inserts aus dem Ursprungsplasmid herausschneiden zu können.

Der Vektor wurde mit einer *Hind* III und *Nco* I Schnittstelle versehen, während das Insert mit *Hind* III und *Bsp*HI Schnittstellen ausgestattet wurde. Die Enzyme schnitten die doppelsträngige DNA unter Bildung von 3' - und 5' -Überhängen (sticky ends) und ermöglichten so die Verknüpfung der komplementären Enden. Zwischen den beiden enzymatischen Reaktionen, wurde das erste Enzym *Hind* III durch Hitze inaktiviert und die DNA über die AutoSeq™ G-50 Säulen (GE Healthcare, Freiburg) entsalzen. Anschließend erfolgte die zweite Restriktion mit *Nco* I bzw. *Bsp*HI mit nachfolgender Inaktivierung des Enzyms und Entsalzung der DNA. Nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel wurde das linearisierte vorliegende Plasmid im UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt. Die Größe bzw. Menge der aufgereinigten DNA-Fragmente erfolgte anhand des Vergleichs mit dem Standard *Eco*R I / *Hind* III restringierte λ -DNA (Fermentas GmbH, St-Leon-Rot) bzw. MassRuler™Express DNA Ladder Mix (Fermentas GmbH, St-Leon-Rot). Die benötigte Menge an DNA wurde nach der Formel

$$ng(Insert) = 3 * ng(Insert) * \frac{bp(Insert)}{bp(Vektor)}$$

berechnet und in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l zusammen mit 50 U /1 μ l T4 - Ligase und 1 μ l T4-Ligase-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main) über Nacht bei 16 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die ligierte DNA in kompetente DH5 α -Zellen überführt. Um eine effiziente Transformation zu erzielen, wurde bei den Konkatameren die Hitzeschock-Methode angewandt. Dazu wurden 100 μ l DH5 α -

Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5 µl des Ligationsansatzes versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis, erfolgt der Hitzeschock bei 42° C für 30 Sekunden. Die Zellen wurden wieder für kurze Zeit auf Eis runter gekühlt, bevor sie mit 500 µl SOC-Medium bei 37 °C für 2 h inkubiert wurden. Anschließend wurde das Medium ausplattiert und für 16 bis 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die korrekte Insertion wurde durch Restriktionsanalysen geprüft.

Die Klonierung der Konkatomere erfolgte konventionell nach einem bewährten Verfahren. Angefangen beim Dimer, wofür die StrepIII-rP2X7 kodierende cDNA unter Erhalt des Leserahmens vor die StrepIII-rP2X7 kodierende cDNA kloniert wurde, wurde das Verfahren bis hin zum Tetramer wiederholt. Mit Hilfe der Konkatomer-Strategie wurden eine bestimmte Anzahl von Untereinheiten über kompatible Enden ligiert. Aus den linearisierten Plasmid-cDNAs wurde anschließend die cRNA transkribiert. Das gesamte Gen wird transkribiert, sodass ein langes primäres Transkript entsteht. Durch verschiedene Prozessierungsschritte wie dem Capping, der Polyadenylierung und dem Spleißen, wird die prä-mRNA in die funktionelle RNA umgewandelt. Das Capping kann während der Transkription (kotranskriptionell) oder nach Abschluss der Transkription (posttranskriptionell) erfolgen. Das Capping dient zur Stabilisierung der RNA, verhindert den frühzeitigen Abbau durch Exonukleasen und reguliert den Transport der RNA aus dem Zellkern.

Es gibt verschiedene Cap-Strukturen, welche an das 5'-Ende der RNA geknüpft werden können. Für unsere In-vitro-Transkription wurde das Anti-Reverse Cap Analogon (ARCA) zur Generierung von gekappten Transkripten verwendet. ARCA ist so modifiziert, dass es nur in die richtige Orientierung eingefügt werden kann. Da das Cap-Analogon mit GTP um die Initiierung der Transkription durch die RNA-Polymerase konkurriert, wird die kotranskriptionellen Capping-Effizienz durch die Konzentration des Cap-Analogons und des GTPs begrenzt. Bedingt wird die Konzentration des GTPs reduziert, damit das Cap-Analogon um die Initiierung der Transkription konkurrieren kann. Da es sich bei den Konkatomeren jedoch um lange Transkripte handelt, kann die verringerte GTP-Konzentration in unvollständiger Transkription resultieren.

Bei der posttranskriptionellen Synthese wird eine höhere GTP-Konzentration eingesetzt, sodass keine Einschränkung der RNA-Synthese aufgrund des GTP-Mangels erfolgen kann. Die RNA wird vorerst ohne Cap-Struktur synthetisiert und

nachträglich findet das Capping statt. Das Ziel der posttranskriptionellen Synthese ist es, die Translationseffizienz von längeren Transkripten zu erhöhen. Die cRNA-Synthese wurde basierend auf den gleichen cDNA-Konstrukten sowohl kotranskriptionell als auch posttranskriptionell durchgeführt.

3.2.6 cRNA-Synthese

Zur Herstellung der cRNA wurde die Plasmid-DNA mit dem Enzym *Xho* I hinter der Poly-A-Sequenz linearisiert und die Linearisierung mittels Gelelektrophorese geprüft. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA unter Verwendung des QIAquick-Nucleotide Removal Kits (Qiagen, Hilden). Über Nacht folgte die Fällung in 100 %-igem Ethanol (67 % Endkonzentration) (Ethanol für die Molekularbiologie, Merck, Darmstadt) und 3 M Natriumacetat (pH 5,2) (Sigma, Steinheim) bei -20 °C. Am nächsten Morgen wurde die DNA per Zentrifugation bei 4 °C pelletiert und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde für 1 - 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30 µl 0,5 x TE-Puffer aufgenommen. Das resultierende Template wurde auf einem Agarosegel verifiziert und als Matrize für die in-vitro-cRNA-Synthese genutzt. Hierzu wurde es für 2 h bei 37 °C mit der SP6-Polymerase (Jena Bioscience, über Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland), den dNTPs (NTP Set, New England Biolabs, Frankfurt am Main) und dem Cap-Nukleotid (ARCA Cap Analog, Jena Bioscience, Jena) in TR-Puffer (15 mM MgCl₂, 2 mM Spermidin, 80 mM HEPES, pH 7,5, 40 mM DTT, 5 U/ml anorganische Pyrophosphatase) versetzt. Zwischenzeitlich wurde das Transkript auf einem Agarosegel geprüft. Nach 2 h wurde die Ausgangs-DNA durch Zugabe von *DNAse* I für 10 min bei 37 °C fragmentiert und die Reaktion mit 5 mM EDTA gestoppt. Anschließend wurde die cRNA mit 25 µl 8M LiCl-Lösung (Merck, Darmstadt) versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Die cRNA wurde pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 5 mM Tris/HCl, pH 7,2 gelöst. Die Konzentration wurde durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm ermittelt und auf etwa 1 µg/µl eingestellt. Um die Stabilität und Reinheit zu prüfen, wurde die cRNA nach der Synthese auf ein Agarosegel aufgetragen. Ebenso wurden 0,5 µl über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und mittels ein Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80 °C.

3.3 *X. laevis*-Oozyten als Expressionssystem

3.3.1 Herkunft und Haltung der Frösche

Die afrikanischen Krallenfrösche wurden von der Firma Xenopus Express (Vernassal, Frankreich) erworben und im Tierstall des Instituts für Versuchstierkunde des Universitätsklinikums der RWTH Aachen gehalten. Bis zu zehn Weibchen wurden in einem Becken mit 200 l Leitungswasser und kontinuierlicher Pressluft-Begasung aufbewahrt. Die Wassertemperatur lag bei 16 – 20 °C. Der Raum wurde 12-stündig belichtet, um einen künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus zu schaffen.

3.3.2 Gewinnung und Vorbereitung der Oozyten

Die Entnahme des Ovars aus *X. laevis*-Weibchen erfolgte durch meine Person im Einklang mit den geltenden Tierschutzgesetzen. Eine entsprechende Genehmigung erfolgte durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen 84-.02.04.2014.A366 & 81-02.04.2019.A355). Vor der Entnahme der Ovarien wurde ein weiblicher Frosch für 20 min in 1 L einer 0,2 % -igen 3 – Aminobezoesäureethylester (Tricaine, MS-222) (Sigma Chemicals, St-Louis, USA) mit Tris (Sigma, Steinheim) auf pH 7,4 eingestellten Lösung narkotisiert. Nach Feststellung der Narkose, durch Überprüfung fehlender Reflexe, wurde die Abdominalhöhle durch einen paramedianen Schnitt eröffnet. Ein Teil des Ovars wurde nach Ligation des Ovarialstiels mit einem resorbierbarem Faden entnommen und in ORi⁺ (s. Tabelle 1) überführt und bei 19 °C gelagert. Die Haut und Muskelschicht wurden separat mit einer chirurgischen Naht ebenso mit einem resorbierbarem Faden geschlossen. Anschließend erfolgte eine engmaschige Überwachung über 18–24 h, um eventuelle Komplikationen oder Nachblutungen auszuschließen. Nach Verheilen der Wunde und ausreichender Zeit zur Regeneration des Ovars konnte eine weitere Ovarentnahme erfolgen. Um die Oozyten von dem Bindegewebe und den Follikelzellen zu befreien, wurden die Ovarien vorsichtig zerlegt und über Nacht mit dem Enzym Kollagenase (SERVA, Heidelberg), welches in ORi⁺ /Gentamycin in der Konzentration 1,8 mg/ml gelöst wurde, behandelt. Am folgenden Tag sind die Oozyten mehrfach mit ORi⁺ gewaschen wurden, um die Reste der Kollagenase und Zelldebris zu entfernen. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation in Ca²⁺-freiem ORi⁻,

bei der durch den Calciumentzug die *tight junctions*, eine Form von Zell-Zell-Verbindungen, aufgelöst wurden. Auf diese Weise wurden restliche verbliebene Follikelzellen entfernt. Die Oozyten wurden erneut mit ORI⁺ gewaschen bis der neu entstehende Überstand klar blieb. Zur weiteren Verwendung wurden Oozyten der Entwicklungsstadien V oder VI mit möglichst homogenem Aussehen bezüglich Größe und Färbung selektiert (Dumont 1972).

3.3.3 cRNA-Injektion

Für die cRNA-Injektion wurden Oozyten gleicher Größe und Färbung der Entwicklungsstadien V oder VI (Colman, 1984) selektiert. Die cRNA-Injektion fand an einem speziellen Injektionsplatz statt, welcher mit einem Stereomikroskop (Stemi DV4, Zeiss, Jena) einer Mikroinjektionspumpe (Nanoliter Injector, World Precision Instruments, Sarasota, USA) und einem Mikromanipulator (World Precision Instruments) ausgestattet wurde. Die verwendeten Glaskapillaren wurden mit einem Mikropipettenpuller (Modell PP-830, Narishige, Tokyo, Japan) gezogen. Anschließend wurden in ca. 10-15 Oozyten pro Gruppe 50,6 nl cRNA injiziert. Die verschiedenen Gruppen wurden in ORI⁺ gefüllten Petrischalen über Nacht bei 19 °C inkubiert. Für die elektrophysiologischen Messungen wurde je nach Größe des durch die Mutante induzierten Stromes in Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 µg/µl injiziert.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Metabolische Markierung der Proteine mit L-[³⁵S] –Methionin

Nach der Injektion wurden die Oozyten in dem sogenannten Pulse-Chase-Verfahren mit dem [³⁵S]-Methionin (PerkinElmer, Überlingen) radioaktiv markiert. Dazu wurden die Oozyten dreimal in ORI⁺ gewaschen und anschließend in spezielle Probengefäße (Sarstedt, Nümbrecht) überführt, deren Innenwand zuvor mit Oozyten-Homogenat beschichtet worden war, um ein Anhaften der Zellen zu verhindern. Darin erfolgte die metabolische Markierung der neu synthetisierten Proteine durch Zugabe einer Lösung aus 10 mM NaCl und L-[³⁵S]-Methionin (ca. 0,1 MBq/Oozyte). Die Oozyten wurden über Nacht bei 19 °C inkubiert und am nächsten Morgen dreimalig in ORI⁺ gewaschen, um die Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Proteasen bei der nachfolgenden Zellyse zu

verhindern. Hierauf folgte die Chase-Phase, bei der die Oozyten 24-48 h in Gentamycin-haltigem ORI+ inkubiert wurden. Somit wurden nur noch Reste an intrazellulär vorhandenem L-[³⁵S]-Methionin in die während der Chase-Phase neu synthetisierten Proteine eingebaut.

3.4.2 Fluoreszenz-Markierung mit IR800-NHS-Ester

Nach Abschluss der Chase-Phase wurden die in der Zellmembran exprimierten Proteine der Oozyten markiert. Dazu erfolgten initial drei Waschschriffe in alkalischem Oozyten-PBS (20 mM NaH₂PO₄, 110 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 8,5), wodurch die ε-Aminogruppen überwiegend deprotoniert vorlagen und für den Fluoreszenzfarbstoff besser zugänglich waren. Dadurch werden alle Membranproteine markiert, die im extrazellulären Bereich zugängliche Lysine enthalten. Für ein definiertes Reaktionsvolumen wurde auch hier überstehende Flüssigkeit soweit wie möglich entfernt. Pro Gruppe wurde 1 µl IR800 CW NHS mit 100 µl Oozyten-PBS vermenget und auf die Oozyten gegeben. Die Oozyten wurden abgedunkelt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Aufarbeitung der Proteine wurden die Oozyten dreimal in Oozyten-PBS gewaschen, um die Färbungsreaktion abzustoppen.

3.4.3 Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA

Die Proteinaufreinigung erfolgte in mehreren Schritten unmittelbar im Anschluss an die Fluoreszenzmarkierung der Proteine. Nach dreimaligem Waschen in Oozyten-PBS wurden je 10 Oozyten in Safe-Lock-Reaktionsgefäße überführt und die überschüssige Flüssigkeit wurde verworfen. Zu den Oozyten wurden 200 µl Homogenisierungspuffer (s. Tabelle 3) gegeben und die Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Das Homogenat wurde für 15 min auf Eis inkubiert und währenddessen mehrmals für kurze Zeit auf dem Vortex (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) aufgeschüttelt. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Detergenzextrakt zentrifugiert (15 min bei 4 °C und 13.200 rpm), um den löslichen Anteil mit den solubilisierten Membranproteinen von den unlöslichen Bestandteilen (Lipide und Dotter) zu trennen. Der klare Zwischenstand wurde erneut für 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der Ni²⁺-NTA-Agarose Beads (Qiagen, Hilden), welche hierzu mit 900 µl Na-

Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8) versetzt und bei Raumtemperatur für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert wurden. Anschließend wurden 100 µl des klaren Überstandes, 400 µl Inkubationspuffer (s. Tabelle 3) und 5 µl Imidazol auf die Beads gegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 19 °C im Über-Kopf-Schüttler (REAX 2, Heidolph, Kelheim). Während dieser Zeit bildeten die Proteine Chelatkomplexe durch Bindung der His-Tags (N- oder C-terminale Hexahistidylsequenz) an die Ni²⁺-NTA-Beads. Nach der Inkubation wurden die Ni²⁺-NTA-Beads mit den daran gebundenen Proteinen für 1,5 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Vor der Elution der Proteine wurden die Beads 5–6 x mit je 1 mL Waschpuffer gewaschen, indem die Beads vollständig resuspendiert und wieder abzentrifugiert wurden, bevor der Überstand verworfen werden konnte. Anschließend erfolgte eine zweimalige Elution mit je 50 µl Elutionspuffer (s. Tabelle 3) für je 15 min im Horizontalschüttler bei 1050 rpm. Die Eluate aus den jeweiligen Schritten wurden für 1,5 min abzentrifugiert und anschließend zusammen gepoolt.

3.4.4 Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin

Eine weitere Möglichkeit der Affinitätschromatographie war durch die Aufarbeitung mit dem Strep-Tag (Schmidt und Skerra 2007) gegeben. Im Vergleich zur Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie ermöglicht die Aufreinigung mit dem Strep-Tag eine Erhöhung der spezifischen Bindung an die Proteine. Dadurch eignete sich der Strep-Tag auch zur Ko-Aufreinigung interagierender Proteine. Die Aminosäuresequenz WSHPQFEK (StrepII-Tag) oder WSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (StrepIII-Tag) wurde durch gerichtete Mutagenese an das N- oder C-terminal des Zielproteins angefügt. Die Proteinaufreinigung erfolgte analog zu der unter 3.4.3 beschriebenen Ni²⁺-Affinitätschromatographie durch spezifische Bindung der Strep-Tag-Sequenz an immobilisiertes Streptavidin (Strep-Tactin-Sepharose, IBA, Göttingen, Deutschland). Bei der Inkubation wurde dabei auf die Zugabe von 5 µl Imidazol verzichtet, alle anderen Puffer wurden wie beschrieben verwendet. Die Elution erfolgte durch kompetitive Verdrängung des Strep-getaggten Proteins aus der Bindung an die Strep-Tactin-Matrix mit 2,5 mM Biotinin-haltigen Elutionspuffer (s. Tabelle 3). Um die Interaktion zwischen den koexprimierten Gruppen zu untersuchen, wurden die Überstände parallel über Ni²⁺-NTA und Strep-Tactin aufgereinigt. Bis zur Aufbereitung für die Gelelektrophorese wurden die nativen Proteine auf Eis aufbewahrt.

3.4.5 Enzymatische Deglykosylierung

Die in *X. laevis*-Oozyten exprimierte Proteine wurden in einigen Fällen zur weiteren Analyse enzymatisch deglykosyliert. Die Abspaltung der N-glykosidisch verknüpften Zuckerketten erfolgte unter Verwendung der Endoglykosidase H (Endo H) und dem Peptid N-Glycosidase F (PNGase F) (New England Biolabs, Frankfurt am Main). Endoglykosidase H (Endo H) spaltet die β (1-4) -Bindung zwischen den ersten beiden N-Acetylglukosaminen der N-glykosidisch gebundenen Zuckerkette. Nach der Spaltung liegt das Oligosaccharid intakt mit einem einzigen N-Acetylglukosamin am reduzierenden Ende vor, das andere N-Acetylglukosamin bleibt am Protein gebunden. PNGase F spaltet dahingegen beide N-Acetylglukosamine unmittelbar vom Asparagin ab. Initial wurden 30 μ l Probe mit 7,5 μ l 5x SDS Ladepuffer (s. Tabelle 4) versetzt und für 15 min bei 56°C denaturiert. Anschließend wurde die Probe in drei Gruppen aufgeteilt und zu je 10 μ l auf drei unterschiedliche Reaktionsgefäße aliquotiert. Die erste Gruppe wurde nicht weiter behandelt und diente als Kontrolle. Der zweiten Gruppe wurde das Enzym Endo H, welches zuvor 1:10 in Endo-H-Puffer verdünnt wurde, zugesetzt. Die dritte Gruppe wurde mit dem Enzym PNGase F, welches zuvor im Verhältnis 1:10 mit 10% Octylglycosid verdünnt wurde, behandelt. Anschließend wurden alle drei Gruppen für 3 h bei 37°C inkubiert. Bei beiden Enzymen handelt es sich um Glykosidasen, welche posttranslational angefügte N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharid von der Proteinkette abspalten können. Im Gegensatz zu dem Enzym PNGase F ist das Enzym Endo H allerdings nicht in der Lage, im trans-Golgi-Apparat modifizierte N-Glykane abzuspalten. Dadurch lässt sich durch die Deglykosylierungsmuster eine Aussage zur Prozessierung eines Proteins treffen. Im Falle Endo-H-sensibler N-Glykane spricht man von einer Kern-Glykosylierung des Proteins, wohingegen Endo-H-resistente N-Glykane eines Proteins als komplexglykosyliert bezeichnet werden. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden Gruppe eins und zwei ebenfalls mit 2 μ l 10% Octylglycosid versetzt, um ein vergleichbares Laufverhalten der Proben zu gewährleisten und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

3.5 Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid- Gelelektrophorese

3.5.1 Denaturierende SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE nach dem System von Laemmli (Laemmli 1970). Dies beruht darauf, dass SDS durch die Anlagerung an Proteine in festem Verhältnis von ca. 1,4 g SDS pro Gramm Protein) eine gleichmäßige Ladungsverteilung bewirkt. Dadurch dissoziieren die Proteine, sofern sie nicht durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind, in ihre Untereinheiten. Die Untereinheiten werden durch die zur Elektrophorese angelegte Spannung nun ihrer Größe entsprechend im Gel aufgetrennt. Die Gele wurden mit einer Prozentigkeit von 4-12 % zwischen zwei Glasplatten (Phase, Lübeck, Deutschland) in einer Größe von 8 x 16 cm und einer Geldicke von 1 mm eigens hergestellt. Zuerst wurde das Trenngel (s. Tabelle 4) mittels eines Gradientenmischers gegossen, wobei zwei Trenngel-Lösungen mit unterschiedlicher Acrylamid-Prozentigkeit nach und nach so miteinander vermischt wurden, dass am Ende im Gel die Acrylamidkonzentration in Laufrichtung der Proben zunahm. Das Trenngel wurde unmittelbar vor dem Gießen mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N, N, N', N' -Tetramethyldiamin (Temed) (s. Tabelle 7) versetzt und nach dem Gießen mit Wasser überschichtet. Die Überschichtung verhinderte die Reaktion der zur Polymerisation erforderlichen Radikale mit dem Luftsauerstoff und ein Austrocknen an der Oberfläche des Gels. Das Wasser wurde vor dem Gießen des Sammelgels entfernt und die Reste des Wassers mit einem Filterpapier getrocknet. Die Ausbildung der Probestaschen wurde durch das Einschieben eines Kammes in das Sammelgel (s. Tabelle 4) vor dessen Aushärtung erreicht. Des Weiteren gab es die Möglichkeit Fertiggele mit der Prozentigkeit 4-15% (BioRad, München) zu verwenden. Diese eigneten sich um bis zu 24 Proben zusätzlich des Markers auf ein Gel aufzutragen.

Die nativ eluierten Proben wurden unter Zugabe von 2,5 µl 5 x SDS- Ladepuffer (s. Tabelle 4) ohne oder mit 20 mM DDT 15 min bei 56 °C denaturiert. Nach der Denaturierung wurden die Proben mit 1,38 µl Iodacetamid versetzt, um überschüssiges DTT zu quenchen und eine Kontamination der Proben ohne DTT zu verhindern. Je 12,5 µl der Proben wurden in Geltaschen pipettiert. Flankierend zu den Proteinproben wurden zwei Marker aufgetragen: der All-Blue-Marker (250 – 10 kDa), zur Massenbestimmung der fluoreszierenden Gelbanden und die radioaktiv markierte

Mischung aus aufgearbeiteten Proteinen mit den Größen 83 kDa (Gephyrin), 68 kDa (Moesin) und 43 kDa (Rapsyn). Beide Marker wurden mit farbigem SDS-Ladepuffer (s. Tabelle 4) versetzt, um die Lauffront des Gels sichtbar zu machen und den Endpunkt der Elektrophorese besser bestimmen zu können.

Die Elektrophorese erfolgte in einem für das Laemmli-System charakteristischen Laufpuffer (s. Tabelle 4). Hierbei wurden die Proteine anfänglich bei einer konstanten Spannung von 80 V im Sammelgel aufkonzentriert. Nach Einlauf der Proteine in das Trenngel erfolgte die weitere Auftrennung bei einer Spannung von 125–150 V. Die Gesamtdauer der Elektrophorese betrug je nach Konzentration und Größe des Trenngels 2–4 h. Für die Fertiggele wurde eine konstante Spannung von 180 V angelegt, die Laufdauer betrug dadurch ca. 1 h.

Zur Immobilisierung der Proteine in der Polyacrylamid-Matrix wurden die Gele mindestens 15 min in einem Gemisch aus 25% Isopropanol und 10% Essigsäure fixiert. Anschließend wurden die Gele auf Whatman® Chromatographie-Papier (3mm Chr, Whatman, Maidstone, GB) aufgezogen und 1,5-2 h bei 80 °C und vermindertem Druck getrocknet (Model 583 Gel-Dryer, Bio-Rad, München).

	Sammelgel	Trenngel	
	4 %	4 %	12 %
0,5 M Tris-Gelpuffer (pH 6,8)	1,125 ml	-	-
1,5 M Tris-Gelpuffer (pH 8,8)	-	1,125 ml	1,125 ml
40% Acrylamid/ Bisacrylamid, 32:1 (Serva, Heidelberg, Deutschland)	0,45 ml	0,45 ml	1,35 ml
Harnstoff	1,52 g	1,52 g	1,52 g

Bidest	1,803	1,803	0,335
Glycerol	-	-	0,72
10 % APS	30 μ l	15 μ l	15 μ l
TEMED	6 μ l	3 μ l	3 μ l

Tab. 8 Zusammensetzungen diskontinuierlicher SDS-PAGE-Gele

3.5.2 Blue-Native-PAGE

Die Auftrennung der Proteine im nativen sowie im partiell denaturierten Zustand erfolgte mittels Blauer Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) nach dem Prinzip von Schägger und Jagow (Schägger und Jagow 1991) sowie Wittig und Mitarbeiter (Wittig et al. 2006). Die Methode ermöglicht die Analyse der molekularen Masse, des Oligomerisierungszustandes und der Homogenität von nativen Proben. Um den Proteinen die notwendige negative Ladung zu geben, wurde der Proteinfarbstoff Coomassie Blue G-250 (Serva, Heidelberg) im Kathodenpuffer (s. Tabelle 4) eingesetzt. Er bindet an die hydrophoben Domänen der Proteinoberfläche und bewirkt dadurch eine negative Aufladung, somit können auch basische Proteine bei einem pH von 7,5 zur Anode wandern. Die Trennung erfolgt hierbei nicht nach der Ladung/ Masse-Verhältnis, sondern aufgrund der hydrodynamischen Größe. Je nach Fragestellung wurden diskontinuierliche Trenngele mit einer Prozentigkeit von 4-16% oder 6-16% verwendet. Um die Auflösung der Proteinbanden zu optimieren, wurde das hochprozentige Trenngel (s. Tabelle 8) mit einem 4%igen Sammelgel (s. Tabelle 8) überschichtet. Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen und hatten die Ausmaße 16 cm x 8 cm mit der Breite von 1 mm.

Die nativ eluierten Proben wurden unmittelbar vor dem Auftragen mit 5 x BN-Ladepuffer (s. Tabelle 4) versetzt. Neben der nativen Form wurden die Proben in einer partiell denaturierten Form aufgetragen. Dazu wurden die Proben zusätzlich mit Lithiumdodecylsulfat und/ oder TCEP Tris-2(carboxyethyl)-phosphin (TCEP) für 1h bei 37 °C inkubiert. Als Marker diente das mit Fluoreszenz markierte BSA (bovines Serumalbumin, Roche, Mannheim 1mg/ml, 1:1 in Glycerol). Leere Taschen wurden mit

1 x BN-PAGE Ladepuffer (s. Tabelle 1) aufgefüllt. Anders als bei dem SDS-PAGE wurden für die BN-PAGE separate Anoden- und Kathodenpuffer benötigt. Der Kathodenpuffer wurde vor der Verwendung mit 0,002% m/V Coomassie Blue G-250 versetzt, während der Anodenpuffer ohne weitere Zusätze verwendet werden konnte. Die Elektrophorese erfolgte für 12 – 16 h bei einer konstanten Spannung von 40 V. Am nächsten Morgen wurde das Sammelgel abgeschnitten und das Trenngel anschließend unter leichtem Schütteln (Horizontalschüttler, Edmund Bühler GmbH, Hechingen) entfärbt. Die Entfärberlösung (s. Tabelle 4) wurde nach einigen Stunden gewechselt und für weitere 48 h unter Lichtausschluss verwendet. Vor der Detektion wurde das Gel für eine Stunde in 0,1 M Phosphatpuffer rehydriert. Die Fixierung sowie die Trocknung des Gels erfolgten analog zur Trocknung des SDS-PAGE-Gels.

	Sammelgel	Trenngel		
		4 %	6 %	16 %
BN-Gelpuffer (1,5M 5- Aminocapronat, 75 mM Imidazol, pH 7,0)	1,43 ml	1,43 ml	1,43 ml	1,43 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid, 32:1 (Serva, Heidelberg, Deutschland)	0,43 ml	0,65 ml	1,72 ml	1,94 ml
Bidest	2,44 ml	2,2 ml	0,58 ml	0,36 ml
Glycerol	-	-	0,57 ml	0,57 ml
10 % APS	30 µl	15 µl	15 µl	15 µl
TEMED	6 µl	3 µl	3 µl	3 µl

Tab. 9 Zusammensetzungen diskontinuierlicher BN-PAGE-Gele

3.6 Detektion der Proteine

3.6.1 Odyssey-Fluoreszenz-Imaging

Zur Detektion des Fluoreszenz-markierten Proteine wurden die SDS-PAGE und die BN-PAGE-Gele auf den Odyssey-Scanner (LI-COR, Lincoln, NE, USA) aufgelegt und gescannt. Das IR800 wurde durch einen Laser der Wellenlänge 778 nm angeregt und die Emission bei 794 nm durch den LI-COR-Kanal 800 gemessen. Parallel wurden SDS-Polyacrylamidgele im 700er Kanal gescannt, um den All Blue-Standard aufzuzeichnen. Die generierten Gelbilder wurden mit dem Programm ImageQuant Version 5.1 (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) und BioRad Image Lab 6.0.1 bearbeitet und quantitativ ausgewertet. Zur Beschriftung und Erstellung der Abbildungen wurden die Gelbilder in Power Point 2016 (Microsoft, Corporation, Redmond, WA, USA) überführt.

3.6.2 Typhoon-Fluoreszenz-Imaging

Die Detektion von GFP-fusionierten und Cy5-Mono-NHS-Ester markierten Proteinen erfolgte mit Hilfe des Typhoon 9410- Fluoreszenzscanners (Amersham Biosciences, Freiburg). Das Fluorophor von GFP wurde durch einen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission mit Hilfe eines entsprechenden Filters (520 BP 40/Blue2) bei 520 nm detektiert. Die Anregung des Fluorophors des Cy5-Mono-NHS-Esters erfolgte bei 633 nm, die Emission wurde bei 670 nm mit Hilfe des 670 BP 30/Red Filters detektiert. Der Typhoon Scanner diente notfalls auch zur Messung der Radioaktivität der getrockneten Gele. Die Emission wurde ebenso bei 670 nm detektiert, jedoch fand hier der Filter 390 BP 100/Red Verwendung. Mittels der Software BioRad Image Lab 6.0.1® wurden auch hier die Gele qualitativ und quantitativ ausgewertet.

3.6.3 Phosphor-Imaging

Die Radioaktivität wurde mit Hilfe des Storm 820 PhosphorImager (Amersham Biosciences, Freiburg) gescannt. Dazu wurden die getrockneten Gele 3 Tage (Short Exposure) oder 7 Tage (Long Exposure) auf einen PhosphorImager-Screen aufgelegt. Dabei werden die im Screen enthaltenen BaFBR:EU2+-Kristalle durch die ionisierende

Strahlung der radioaktiv markierten Proteinbanden angeregt. Die durch den Laser angeregte Energie wird wiederum in Form von blauem Licht abgestrahlt und durch den Phosphorlimer ausgelesen. Nachdem die aufgenommene Radioaktivität auf dem Phosphorlimer gemessen wurden, kann der Screen gelöscht und wiederverwendet werden. Die quantitative Auswertung der Proteinbanden erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Programms ImageQuant Version 5.1 (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld).

3.6.4 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Eine weitere angewandte Methode war gegeben durch die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two Electrode Voltage Clamp, TEVC), welche zur Untersuchung der Funktionalität der Proteine diente. Für die Messungen wurde das Membranpotential (V_M) auf einen konstanten Wert eingestellt und gehalten (geklemmt). Durch die Spannungselektrode wird das Membranpotential gemessen und an einen Messverstärker (Rückkopplungsverstärker Turbo TEC-05 NPI Elektronik, Tamm) weitergeleitet. Unterscheiden sich das gewünschte und das gemessene Membranpotential, wird durch den Rückkopplungsverstärker eine Spannung (V_0) produziert, die über einen Rückkopplungswiderstand zu einem Kompensationsstrom (I_0) wird. Auf diese Weise gelingt es, das Membranpotential (V_M) auf das Zielpotential (V_C) von -60 mV zu klemmen. Zwei Mikroelektroden mit chloriertem Silberdraht dienten als Strom- und Potentialelektrode. Diese Mikroelektroden wurden eigens aus Glaskapillaren hergestellt und mit 3M KCl befüllt. Der elektrische Widerstand der Elektroden lag zwischen 0,5-1,5 M Ω .

Die elektrophysiologischen Messungen sind ein bis drei Tage nach der cRNA Injektion bei Raumtemperatur (22-24 °C) durchgeführt wurden. Hierzu wurde die Oozyte mit einer feuerpolierten Pasteurpipette in eine kleinvolumige Badekammer (10 μ l) platziert, welche mit einem kontinuierlichen Fluss (5-10 ml/min) von ORI- ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ perfundiert wurde. Die Messungen erfolgten in einer Ca²⁺ und Mg²⁺-freien Lösung, um durch den Ca²⁺-Einstrom induzierte Ströme sowie Ca²⁺ und Mg²⁺-bedingte Komplezierungen des ATP zu vermeiden. Die Entfernung zweiwertiger Kationen aus der extrazellulären Lösung verursachte wiederum einen Cl⁻-bedingten Leckstrom, der durch den Cl⁻-Kanalblocker Flufenaminsäure (100 μ M) gehemmt werden konnte (Weber et al. 1995). Aus der Badekammer austretende Lösung wurde kontinuierlich

mittels einer Saugpumpe abgesaugt. In der Badekammer befanden sich zwei Silberchlorid-Pellets, welche als Badeelektroden dienten.

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung von den hP2X7A- und hP2X7B-Rezeptoren habe ich TEVC-Messungen 2 bis 3 Tage nach der cRNA-Injektion bei Raumtemperatur durchgeführt. Am Tag des Experiments wurden der Agonist ATP⁴⁻ und der Cl⁻-Kanalblocker Flufenaminsäure aus den gefrorenen wässrigen Stammlösungen in der ORi⁻-Lösung (s. Tab. 1) auf die gewünschte Konzentration runter verdünnt. Zur Bestimmung der gewünschten freien Metallkonzentration in Gegenwart von Chelatoren wurde das Programm MaxChelator verwendet. Die erzielte Endkonzentration von ATP⁴⁻ lag bei 300 µM und von Flufenaminsäure bei 100 µM. Die in der Plasmamembran exprimierten Rezeptoren wurden mit 300 µM ATP⁴⁻ aktiviert. Die ATP-Applikation erfolgte über eine Dauer von 20 s, durch dieselbe Kapillare, mit der auch das ORi⁻ appliziert wurde. Flufenaminsäure war in beiden Badelösungen enthalten.

Das Umschalten zwischen den beiden Badelösungen wurde durch das computergesteuerte Magnetventil ermöglicht. Dazu wurde die Software CellWorks 5.1 verwendet (NP Elektronik, Tamm). Zur Aufzeichnung von den ATP⁴⁻ vermittelten Strömen an den hP2X7A und hP2X7B-Rezeptoren wurde das Programm CellWorks Reader 6.2 (NP Elektronik, Tamm) verwendet. Die Auswertung und Visualisierung der elektrophysiologischen Messungen wurde mittels GraphPad Prisma 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Die ermittelten Daten der Quantifizierung und der maximalen Ströme wurden anschließend mit dem Programm Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) ausgewertet.

Die elektrophysiologische Bestimmung der Funktionalität, der in *X. laevis*-Oozyten exprimierten Konstrukte erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fritz Markwardt (Medizinische Fakultät, Julius-Bernstein-Institut für Physiologie Martin-Luther-Universität, Halle/Saale) unter Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC, Two Electrode Voltage Clamp). Die an *X. laevis*-Oozyten vorgenommene Ganzzellmessung wurde bei einem Haltepotential von -40 mV 1-2 Tage nach Injektion der Zellen mit der zu untersuchenden cRNA bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Analyse und graphischen Darstellung der Daten wurde das SigmaPlot Programm (SPSS, Chicago, USA) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von hP2X7B

Die C-terminale Endodomäne stellt eine sehr wichtige Einheit für die funktionellen Eigenschaften von P2X-Kanälen dar, da Mutationen oder Deletionen in dieser Region die Kinetik, Permeabilität und Desensibilisierung der Kanäle stark beeinflussen (Khakh 2001). Insbesondere die Eigenschaften des P2X7A-Rezeptors, wie beispielweise die Funktion des Kationenkanals werden durch den außergewöhnlich langen C-terminalen Endodomäne bestimmt (Adinolfi et al. 2010; Becker et al. 2008). In voller Länge umfasst die P2X7A-Untereinheit 595 Aminosäuren und ist somit um 231 Aminosäuren länger als die natürlich vorkommende Spleißvariante P2X7B (Adinolfi et al. 2010). Die von der P2X7A-Untereinheit abweichende Sequenz aus 18 Aminosäuren beginnt in etwa in der Mitte der TM2 und endet mit der kurzen C-terminalen Endodomäne. Zur Veranschaulichung der abweichenden Sequenzen wurden Topologie-Modelle der hP2X7B-Untereinheit sowie der hP2X7A-Untereinheit in voller Länge und die beiden trunkierten hP2X7A-Untereinheiten mit Längen von 1-346 und 1-364 Aminosäuren erstellt (Abb. 8 und 9).

Das Topologie-Modell der hP2X7B-Spleißvariante zeigt eine Übersicht über die Lokalisationen der wichtigen Elemente (wie intrazelluläre N- und C-terminale Domäne, die Transmembrandomäne TM1 und TM2 und die N-glykosylierte Ektodomäne) und ermöglicht eine Einsicht in die von der hP2X7A-Untereinheit abweichenden Aminosäuresequenz. Die abweichende Aminosäuresequenz sind türkise markiert (Abb. 8). In Abb. 9 sind die Reste der hP2X7A-Untereinheit und den beiden künstlich durch Einbau eines Stopp-Codons trunkierten hP2X7A-Varianten hP2X7A¹⁻³⁴⁶ und hP2X7A¹⁻³⁶⁴ ab der TM2 dargestellt. Die 18 abweichenden Aminosäuren der hP2X7B-Untereinheit liegen in dem Abschnitt zwischen 346-364. Anhand der dargestellten Topologie-Modelle ist zu vermuten, dass die trunkierte hP2X7A-Variante hP2X7A¹⁻³⁴⁶ über keine C-terminale Domäne verfügt und die C-terminale Domäne der hP2X7A-Variante hP2X7A¹⁻³⁶⁴ nur neun Aminosäuren umfasst.

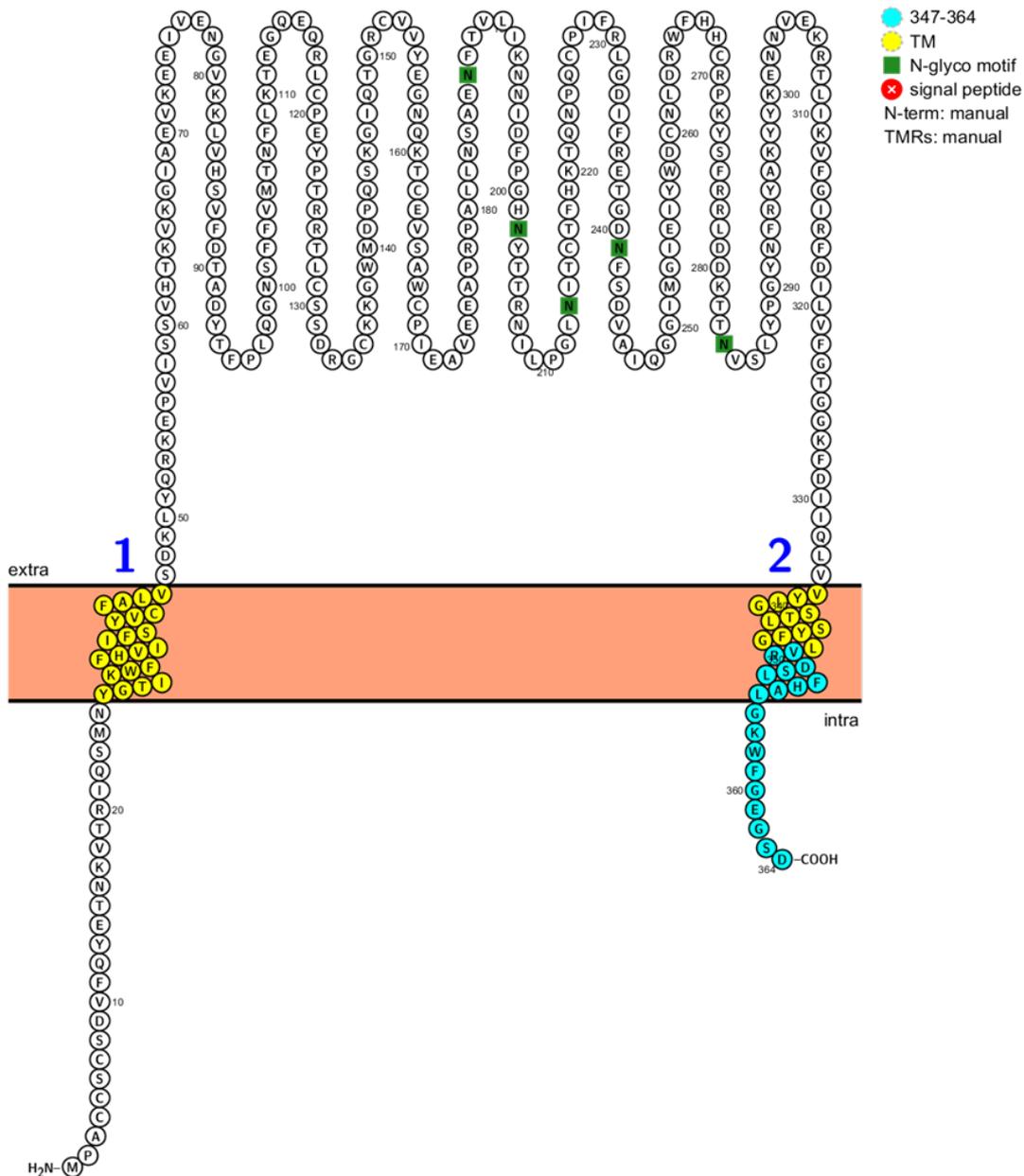


Abb. 8 Topologie der hP2X7B-Untereinheit

Die N- und C-terminale Domäne befinden sich intrazellulär. Zwischen den Transmembrandomänen (TM1 gelb und TM2 gelb/türkis) befindet sich die extrazelluläre Domäne inklusive der fünf N-Glykosylierungsstellen (grüne Vierecke). Die 18 türkis markierten Aminosäuren weichen komplett von der hP2X7A-Sequenz ab. Mit einer Gesamtlänge von 364 Aminosäuren ist die hP2X7B-Untereinheit 231 Aminosäuren kürzer als die 595-Aminosäuren umfassende hP2X7A-Untereinheit, wobei die Kürzung ausschließlich den intrazellulären C-terminalen Bereich betrifft. Das Topologiemodell wurde mittels der Protter Software (Omasits et al. 2014) erstellt (Sequence ID: AAX82087.1).

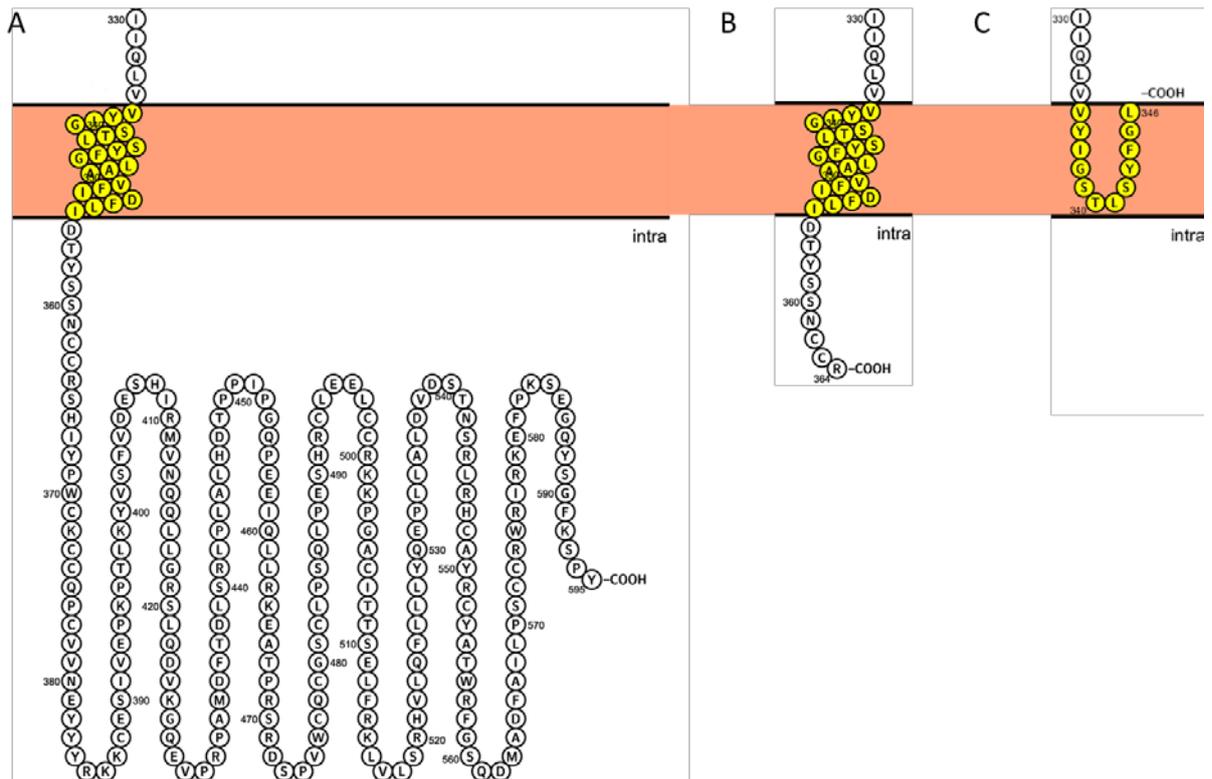


Abb. 9 Topologie der vollständigen P2X7A-Untereinheit und der beiden trunkierten Varianten hP2X7A¹⁻³⁶⁴ und hP2X7A¹⁻³⁴⁶ ab der TM2 (gelb)

A Die hP2X7A-Untereinheit besteht aus 595 Aminosäuren und hat eine lange intrazelluläre C-terminale Domäne. **B** Der in der Natur nicht vorkommende hP2X7A¹⁻³⁶⁴ ist um 231 Aminosäure kürzer und hat demzufolge die gleiche Länge wie die hP2X7B-Untereinheit, die Sequenz entspricht ansonsten dem hP2X7A. **C** Die kürzeste Variante umfasst 346 Aminosäuren, in denen die hP2X7B-Untereinheit mit der hP2X7A-Untereinheit übereinstimmt. Ab der Aminosäure 346 weichen die Sequenzen von hP2X7A und hP2X7B voneinander ab. Die verschiedenen Topologiemodelle wurden mittels der Protter Software erstellt (Sequence ID: NP_062129.1)

4.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von hP2X7B

P2X-Rezeptoren bilden in der Plasmamembran von *X. laevis*-Oozyten Ionenkanäle, welche als Homo- oder Heterotrimere zusammengesetzt sind und durch extrazelluläres ATP aktiviert werden (Nicke et al. 1998; Aschrafi et al. 2004). Der maßgebende Unterschied zwischen der hP2X7A- und hP2X7B-Untereinheit liegt, abgesehen von der Länge der C-terminalen Domäne, in der abweichenden Aminosäuresequenz, beginnend in etwa der Mitte der TM2 und fortlaufend bis zum terminalen Ende. Um den Einfluss der unterschiedlichen Länge der C-terminalen

Endodomänen auf die Funktion des hP2X7A- und hP2X7B-Rezeptors zu untersuchen, habe ich elektrophysiologische und biochemische Experimente durchgeführt. Neben dem hP2X7B-Wildtyp wurden weitere hP2X7A- und hP2X7B-Varianten mit unterschiedlicher Länge der C-terminalen Domäne und zusätzlichen Affinitätstags einschließlich His- und StreptII-Tag oder mit dem GFP-Fusionsprotein konstruiert. Durch die schrittweise Trunkierung der C-terminalen Endodomäne der hP2X7A- und hP2X7B-Untereinheit wurde versucht, den Bereich zu bestimmen, der für die Funktionalität der betreffenden Rezeptoren entscheidend ist. Zusätzlich wurden hP2X7A- und hP2X7B-Untereinheiten koexprimiert und die durch ATP induzierten Ströme der verschiedenen Konstrukte miteinander verglichen.

Zu Beginn wurde die cRNA des hP2X7A-Rezeptors verdünnt in *X. laevis*-Oozyten injiziert und der ATP-induzierte Stromverlauf bei einem Haltepotential von -60 mV aufgenommen. Der hP2X7A vermittelt nach innen gerichteten Ströme mit einem typischen biphasischen Stromverlauf. Die erste Phase **a** der Aktivierung zeigt einen exponentiellen sättigenden Stromverlauf, während die zweite Phase **b** eine linear ansteigende Komponente darstellt (Abb. 10 A, Kennzeichnung a und b) (Becker et al. 2008). Die Deaktivierung kann auch in zwei Abschnitte eingeteilt werden, bestehend aus einer schnellen und langsamen Komponente (Abb. 10 A, Kennzeichnung c und d). Die wiederholte Applikation von ATP resultiert in größer werdenden Stromamplituden, bei der die lineare Komponente größer und deutlicher wird (Abb. 10 A) wie bereits beschrieben wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass der P2X7-Rezeptor langsame bzw. kaum vorhandene Desensibilisierungseigenschaften besitzt (Klapperstück et al. 2001). Wie in Abb. 9 A zu sehen ist, ist der Rezeptor auch bei mehrfach wiederholter Applikation aktivierbar. Zwischen den ATP-Applikationen wurden die Oozyten mit der ORi⁻-Badelösung für 60 Sekunden ausgewaschen, wodurch die Deaktivierung der Ionenkanäle und die Rückkehr zum Ruhepotential erfolgen konnte. Durch die erneute Aktivierung mit derselben ATP-Konzentration und der gleichen Applikationsdauer kommt es zu einer größeren Stromamplitude, ohne dass der Rezeptor desensibilisiert. Insgesamt ist zu beobachten, dass die Deaktivierungskinetik des Kanals mit jeder ATP-Applikation langsamer wird und die Stromamplitude mit jeder weiteren Applikation zunimmt.

Im Vergleich zu dem hP2X7A-Rezeptor, weist der hP2X7B-Rezeptor eine ganz andere Stromkinetik auf. Die erste ATP-Applikation erzeugt einen Strompeak, der nach

wenigen Sekunden wieder abnimmt. Das spricht dafür, dass der hP2X7B-Rezeptor in Gegenwart von ATP desensibilisiert. Die zweite und dritte Applikation löst dagegen einen nicht-desensibilisierenden leichtzunehmenden Strom aus, was auf den Verlust zur Desensibilisierung zurückzuführen ist. Im Gegensatz zum hP2X7A-Rezeptor kommt es bei wiederholter ATP-Applikation beim hP2X7B-Rezeptor nach der ersten Stromantwort zu einer signifikanten Reduktion der maximal erreichbaren Stromamplitude bei Folgeapplikationen. Diese entspricht bei der zweiten und dritten Applikation ungefähr dem letzten gemessenen Wert kurz vor der Deaktivierung des Rezeptors nach der ersten Applikation. Der waagerechte Doppelpfeil zeigt, dass die Stromamplituden am Ende der ersten Applikation praktisch gleich groß sind, wie die Gesamtamplitude nach der zweiten und dritten Applikation (Abb. 10 B). Des Weiteren verläuft die Deaktivierung des hP2X7B-Rezeptors, d.h. nach Auswaschen des ATPs, deutlich langsamer als die des hP2X7A-Rezeptors. Eine schnell deaktivierende Komponente wie beim hP2X7A-Rezeptor ist nicht zu beobachten. Viel mehr deutet der Verlauf auf einer exponentiellen Sättigung hin (Abb. 10 B, Kennzeichnung a).

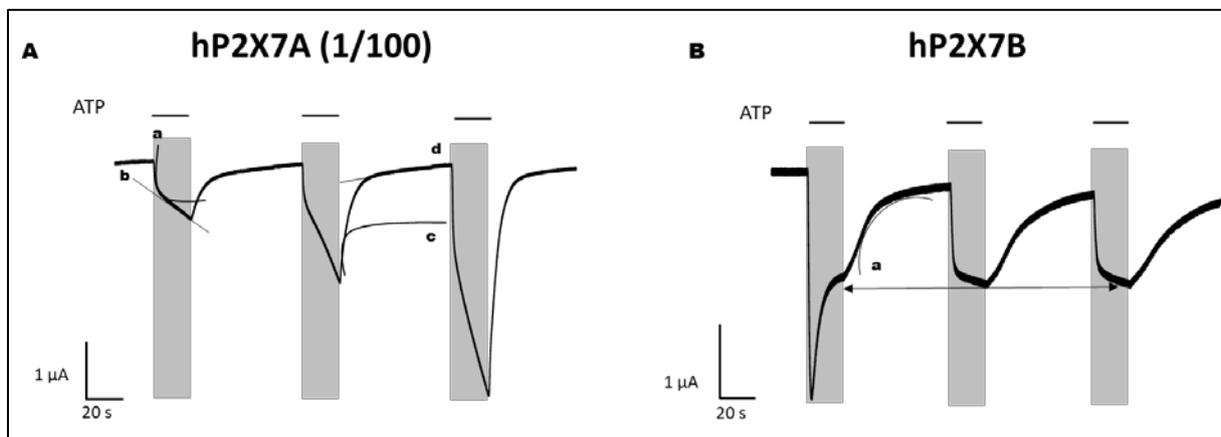


Abb. 10 Elektrophysiologische Charakterisierung der hP2X7A- und hP2X7B-Rezeptoren (Exp. 38)

Dargestellt sind repräsentative Stromkurven von hP2X7A- und hP2X7B-Rezeptor exprimierenden Oozyten, die mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme aufgenommen wurden. Die schwarzen, horizontalen Linien bzw. der dunkelgraue Bereich symbolisieren die ATP-Applikationsdauer von 20 s. Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgte durch $300 \mu\text{M ATP}^{4-}$. Nach jeder ATP-Applikation wurden die Oozyten 60 s mit ORi^{-} superfundiert. **A** Die hP2X7A-cRNA ($50,4 \text{ nl}$) wurde 1:100 ($0,0116 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) verdünnt in die Oozyten injiziert. Der Stromverlauf ist repräsentativ für den nicht desensibilisierenden hP2X7A-Rezeptor mit größer werdenden Stromamplituden nach jeder weiteren Applikation. Die exponentielle (a) und linear (b) verlaufende Komponente nach der Aktivierung durch die erste Applikation werden durch zusätzliche Linien dargestellt. Zur Veranschaulichung der schnellen und langsamen verlaufenden Komponente nach der Deaktivierung, wurden die zusätzlichen Linien im

Stromverlauf der zweiten Applikation eingefügt. **B** Die hP2X7B-cRNA (50,4 nl; 1,05 µg/µl) wurde unverdünnt injiziert. Der Stromverlauf während der ersten Applikation entspricht dem eines desensibilisierenden Rezeptors, welcher bei den weiteren Applikationen nicht mehr in der Lage ist zu desensibilisieren. Der maximale Strom wird nur bei der ersten Applikation erreicht.

4.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung des hP2X7A/hP2X7B-Heteromers

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung heteromerer hP2X7A/B-Rezeptoren habe ich hP2X7A- und hP2X7B-cRNAs in verschiedenen Verhältnissen in *X. laevis*-Oozyten koinjiziert. Aus Abb. 10 ist zu entnehmen, wie sich die heteromere Assemblierung auf den elektrophysiologischen Phänotyp auswirkt, je nachdem in welchem Verhältnis die Rezeptoren koexprimiert wurden. Dazu wurde die cRNA des hP2X7A-Rezeptors 1:100 verdünnt sowie unverdünnt jeweils im Verhältnis 1:1 mit der cRNA des hP2X7B-Rezeptors koinjiziert. Der Phänotyp des verdünnten hP2X7A-Rezeptors koexprimiert mit dem hP2X7B-Rezeptor (Abb. 10 A) entspricht ungefähr dem Phänotyp des hP2X7B-Rezeptors (Abb. 9 B). Die gemessene Peak-Stromkomponente der Oozyten, die hP2X7A- und hP2X7B-Untereinheiten koexprimieren, zeigt im Vergleich zu ausschließlich hP2X7B-Rezeptor exprimierenden Oozyten jedoch eine deutlich geringere Amplitude (s. Skalierung in der Abb. 10). Interessanterweise kann durch die zweite und dritte Applikation nur ein Steady-State-Strom mit relativ niedrigen Werten beobachtet werden. Der exprimierte heteromere Rezeptor kann nicht desensibilisieren und bleibt während der Applikationsdauer geöffnet. In diesem Verhältnis scheint die Verhaltenskinetik des hP2X7B-Rezeptors zu dominieren. Wird die cRNA des hP2X7A-Rezeptors jedoch ohne vorherige Verdünnung mit der cRNA des hP2X7B-Rezeptors koinjiziert, scheint der Phänotyp des hP2X7A-Rezeptors im gesamten Verlauf die dominantere Variante zu sein (Abb. 10 B). So erkennt man zwar noch bei der ersten Agonistenapplikation, die für den hP2X7B-Rezeptor charakteristische initiale Strompeak-Komponente, diese geht jedoch schnell in die nicht desensibilisierende Verlaufsform des hP2X7A-Rezeptors über. Bei wiederholter Applikation kommt es bei den koexprimierten Rezeptoren zu einem relativ hohen Anstieg der ATP-induzierten Stromantwort. Während der Verlauf der ersten Applikation noch zum Teil dem Phänotyp des hP2X7B-Rezeptors ähnelt, entsprechen die Stromkurvenverläufe nach wiederholter ATP-Applikation vollständig dem Phänotyp des hP2X7A-Rezeptors. Auch die Kinetik der Deaktivierung zeigt deutlich die zwei charakteristischen Phasen des hP2X7A-Rezeptors. Insbesondere

nach der zweiten und dritten Applikation sind die linear steigende schnelle und anschließend langsame Komponente deutlich zu erkennen.

Übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen, kommt es durch die Koexpression von P2X7B zur Potenzierung der P2X7A-Eigenschaften (Adinolfi et al. 2010). Die dadurch verstärkte Offen-Wahrscheinlichkeit erzeugt doppelt so große Stromamplituden wie der allein exprimierte hP2X7B-Rezeptor (s. Abb. 9B und 10 B). Abschließend lässt sich sagen, dass der Phänotyp einschließlich der Deaktivierungskinetik der koexprimierten Rezeptoren von dem hP2X7A-Rezeptor dominiert wird.

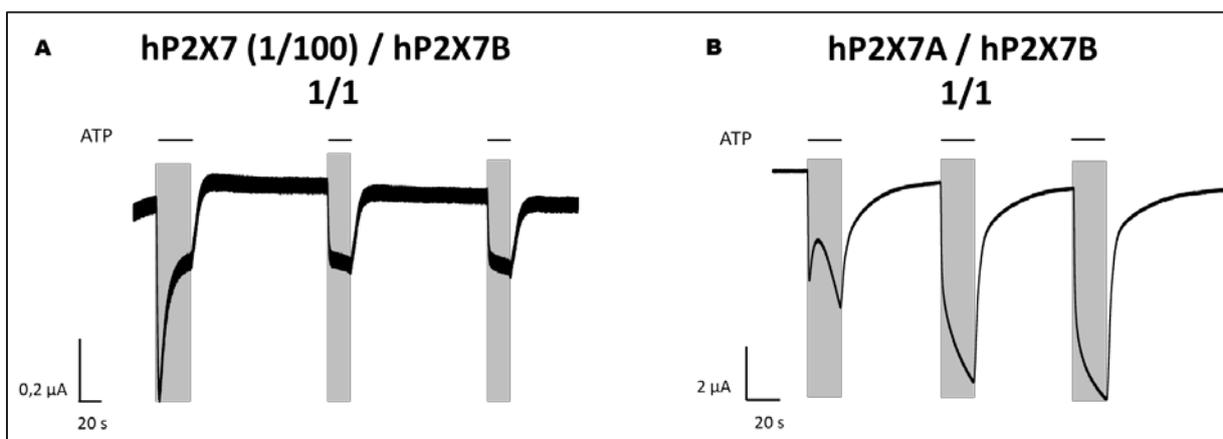


Abb. 11 Koexpression von hP2X7A und hP2X7B in *X. laevis*-Oozyten (Exp. 38 + 39)

Exemplarische Stromkurven der koexprimierten hP2X7A- und hP2X7B-Rezeptoren, die unter denselben Messbedingungen wie in Abb. 10 aufgenommen wurden. Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgte nach zweitägiger Inkubation nach der cRNA-Injektion. **(A)** Die hP2X7A-cRNA wurde 1:100 (0,0116 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) verdünnt und mit der hP2X7B-cRNA (1,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) im Verhältnis 1:1 verdünnt in *X. laevis*-Oozyten koinjiziert (50,4 nl). Der Stromverlauf entspricht am ehesten dem Stromverlauf des desensibilisierenden hP2X7B-Rezeptors, der nach der 1.ATP-Applikation, kleinere nicht desensibilisierende Ströme von etwa der gleichen Stromamplitude zeigt. **(B)** Die hP2X7A-cRNA (1,16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde mit der hP2X7B-cRNA (1,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) im Verhältnis 1:1 koinjiziert (50,4 nl). Der Stromverlauf der ersten Applikation besteht aus einer desensibilisierenden und nicht desensibilisierenden Phase. Die weiteren Applikationen spiegeln den Verlauf des hP2X7A-Rezeptors wieder, bei dem die Stromamplituden mit jeder ATP-Applikation größer werden. Zur Auswertung wurde das Programm CellWorks Reader 6.2 (NP Elektronik, Tamm) verwendet.

4.1.3 Elektrophysiologische Charakterisierung der trunkierten hP2X7A- und hP2X7B-Varianten

Zur weiteren Untersuchung des hP2X7B-Rezeptors wurden Trunkierungen am Ende der kurzen C-terminalen Endodomäne vorgenommen. Hierzu wurden Konstrukte exprimiert, denen von den C-terminalen neun Aminosäureresten entweder die C-

terminalen drei Reste GSD (verbleibende C-terminale Sequenz GKWFGE) oder die C-terminalen fünf Reste GEGSD (verbleibende C-terminale Sequenz GKWF) fehlten. Das Ziel war es herauszufinden, ob bzw. wie die extrem kurze C-terminale Endodomäne die Funktion des hP2X7B-Rezeptors beeinflusst. Die Aktivierung der verschiedenen hP2X7B-Varianten erfolgte, wie in den vorherigen Versuchen, bei einer 20 s andauernden Applikation von 300 μM ATP⁴⁻. Beide C-terminal verkürzten hP2X7B-Varianten reagierten auf die erste Applikation mit einem schnellen Stromanstieg gefolgt von einem schnellen Stromabfall auf ein niedrigeres Plateau (Abb.12), ähnlich wie bei der Erstapplikation beim wt-hP2X7B. Demnach zeigen beide Rezeptoren einen dem hP2X7B-Wildtyp entsprechenden desensibilisierenden Verlauf. Die darauffolgenden Applikationen führen bei der um drei Aminosäuren gekürzten hP2X7B-Variante zu einem Steady-State-Strom, der bis zur Deaktivierung des Rezeptors, durch Auswaschen des ATPs, geöffnet blieb. Abgesehen von den signifikant kleineren absoluten Stromwerten ähnelt der Stromverlauf dem charakteristischen Stromprofil des hP2X7B-Rezeptors. Hingegen zeigt die um fünf Aminosäuren gekürzte hP2X7B-Variante nur noch eine minimale Stromantwort auf die 2. ATP⁴⁻-Applikation, die bei der dritten ATP⁴⁻-Applikation noch kleiner ausfiel (Abb. 12 B). Dies entspricht einem desensibilisierenden Verhalten bei sehr kleinen Einwärtsströmen.

Durch die Deletion aller fünf Aminosäuren unmittelbar am C-terminalen Ende der TM2, zeigte sich im Vergleich zu der Deletion der letzten drei Aminosäuren eine doppelt so starke Reduktion der Stromamplitude. Trotz der Deletion des gesamten intrazellulären C-terminalen Endes bleibt der Rezeptor funktionell.

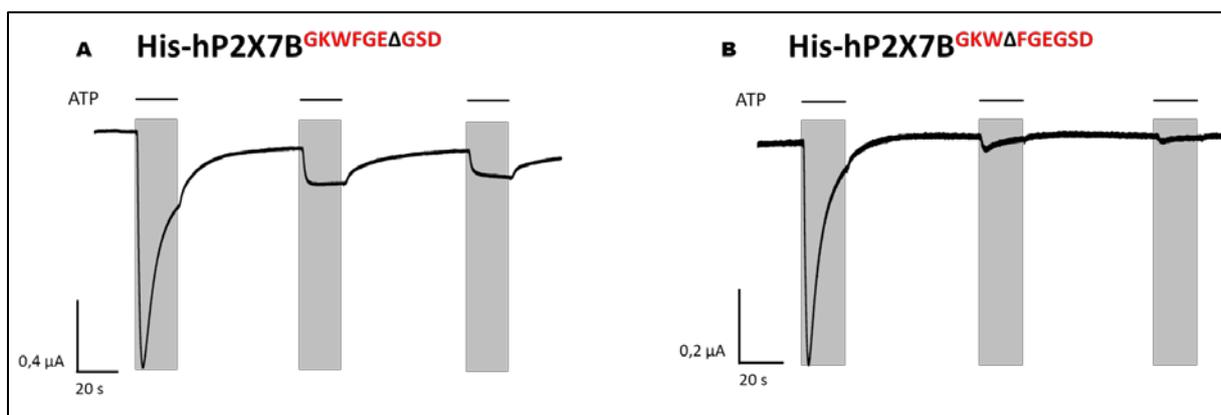


Abb. 12 Einfluss der Länge der C-terminalen Endodomäne auf die hP2X7B-Rezeptorfunktion (Exp. 38)

Exemplarische Stromkurve der trunkierten hP2X7B-Variante, die unter denselben Messbedingungen wie in Abb. 10 beschrieben, aufgenommen wurden. **A** Die dargestellte hP2X7B-Variante ist mit einem am N-terminalen His-Tag versehen und am C-terminalen Ende um drei Aminosäuren verkürzt. Der hP2X7B-Variante kann durch $300 \mu\text{M ATP}^{4-}$ aktiviert werden, d.h. sie ist funktionell. Der Stromverlauf ähnelt dem wt-hP2X7B-Rezeptor, vermittelt aber deutlich kleinere Stromamplituden. **B** Die um fünf C-terminale Aminosäuren verkürzte hP2X7B-Variante trägt ebenso einen N-terminalen His-Tag und kann durch $300 \mu\text{M ATP}^{4-}$ aktiviert werden. Die weiteren ATP-Applikationen erzeugen nur noch sehr kleine Ströme mit einer desensibilisierenden Verlaufsform. Die aufgenommenen Messdaten, wurden mit dem Programm CellWorks Reader 6.2 (NP Elektronik, Tamm) ausgewertet. Für einen direkten Vergleich zwischen dem hP2X7A- und hP2X7B-Rezeptor, wurde die hP2X7A-Untereinheit so trunkiert, dass sie dieselbe Länge aufwies wie die wt-hP2X7B-Untereinheit. Außerdem wurde das Konstrukt hP2X7A¹⁻³⁴⁶ untersucht, dem der hP2X7B-spezifische Teil fehlte, nämlich die zweite Hälfte der TM2 und die kurze C-terminale Endodomäne der hP2X7B-Untereinheit. Beide Konstrukte hP2X7A¹⁻³⁴⁶ und hP2X7A¹⁻³⁶⁴ reagierten auf ATP nur mit kleinen Stromamplituden bei der 1. Applikation und sehr viel kleineren Stromamplituden auf die 2. und 3. Applikation (Abb. 13). In Bezug auf die Länge sind hP2X7A¹⁻³⁶⁴ und hP2X7B gleich. Vergleicht man die gemessenen Ströme der beiden Rezeptoren, wird ersichtlich, dass die 1.ATP-Applikation eine zehnfach höhere Stromamplitude bei dem hP2X7B-Rezeptor auslöst als bei hP2X7A¹⁻³⁶⁴ (vgl. Abb.10 B und 13 B). Anhand der dargestellten Abbildungen ist zu erkennen, dass beide trunkierten hP2X7A-Rezeptoren hP2X7A¹⁻³⁴⁶ und hP2X7A¹⁻³⁶⁴ während der jeweiligen ATP-Applikation nahezu vollständig desensibilisieren. Die Deaktivierung des Rezeptors verläuft in einer langsamen linearen Komponente. Insgesamt ähneln die Stromverläufe eher dem hP2X7B-Rezeptor als dem hP2X7A-Rezeptor.

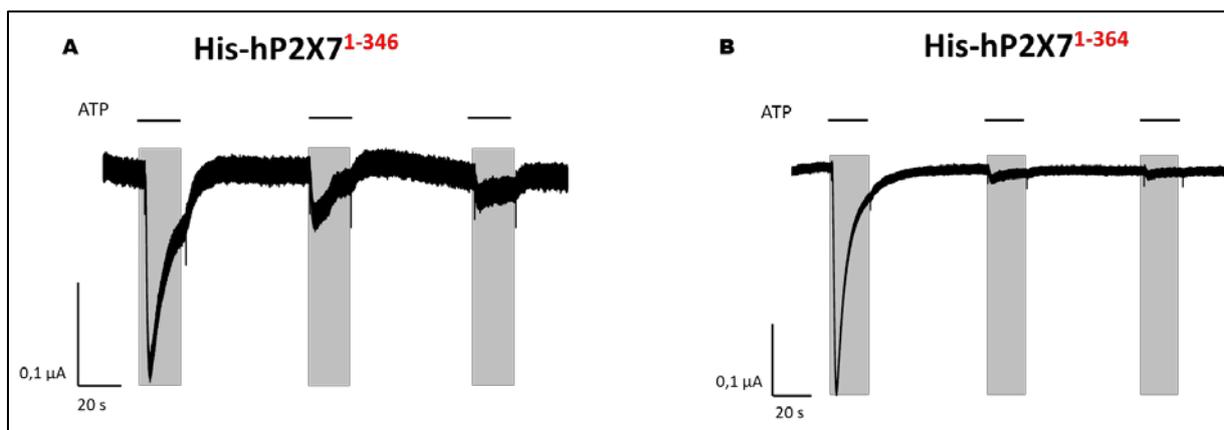


Abb. 13 Einfluss der Länge der C-terminalen Endodomäne auf die hP2X7A-Rezeptorfunktion (Exp. 38)

Exemplarische Stromkurve der trunkierten P2X7A-Varianten, die unter denselben Messbedingungen wie in Abb. 10 aufgenommen wurden. **A** Die Aktivierung der Variante hP2X7A¹⁻³⁴⁶ zeigt desensibilisierende Stromverläufe mit kleinen Stromamplituden. **B** Die Aktivierung der Variante hP2X7A¹⁻³⁶⁴ erzeugt einen desensibilisierenden Stromverlauf mit einer relativ großen Stromamplitude bei der ersten ATP-Applikation. Die darauffolgenden ATP-Applikationen resultieren in deutlich kleineren desensibilisierenden Strömen. Die aufgenommenen Messdaten wurden mit dem Programm CellWorks Reader 6.2 (NP Elektronik, Tamm) ausgewertet.

Um einen direkten Vergleich zwischen den gemessenen Stromamplituden bei wiederholter ATP-Applikation durchführen zu können, wurden die Durchschnittswerte von fünf bis acht Oozyten der jeweiligen Gruppe eines Experiments (Exp. 38) quantifiziert und graphisch dargestellt (Abb. 14). Es ist deutlich zu erkennen, bei welchen homomeren bzw. heteromeren exprimierten Rezeptoren eine Steigung bzw. Reduktion der Stromantwort auf die weitere ATP-Applikation erfolgt. Die cRNA-Verhältnisse der heteromer koexprimierten hP2X7A- und hP2X7B-Rezeptoren entscheiden weiterhin, wie sich die Interaktion auf das elektrophysiologische Verhalten auswirkt. Der nicht desensibilisierende hP2X7A-Rezeptor reagiert als einziger homomer Rezeptor mit einem Anstieg der Stromamplitude bei wiederholter ATP-Applikation. Sowohl der hP2X7B-Rezeptor als auch die trunkierten hP2X7A- und hP2X7B-Varianten reagieren auf ATP mit immer kleiner werdenden Strömen, die teilweise bei der dritten Applikation kaum noch vorhanden sind. Die Koinjektion der cRNA des hP2X7B-Rezeptors mit der 100-fach verdünnten cRNA des hP2X7A-Rezeptors resultiert in ähnlichen Strömen wie der homomer exprimierte hP2X7B-Rezeptor, während das Mischungsverhältnis der unverdünnten cRNAs von 1:1 die steigenden Ströme des hP2X7A-Rezeptors widerspiegelt. Somit dominiert die Kinetik des hP2X7A-Rezeptors bei einer 1:1 cRNA-Koinjektion mit hP2X7B.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der hP2X7B-Rezeptor auch ohne die lange C-terminale Endodomäne funktionell ist. Der schnell desensibilisierende hP2X7B-Rezeptor, der bereits auf die erste Applikation mit einem maximalen Strompeak antwortet, reagiert auf die darauffolgenden ATP-Applikationen mit nicht desensibilisierenden Strömen, die fortlaufend kleiner ausfallen. Der hP2X7A-Rezeptor benötigt dahingegen die C-terminale Endodomäne, um große Ströme fließen zu lassen. Der C-terminale Endodomäne des hP2X7B-Rezeptors ist im Vergleich zu dem hP2X7A-Rezeptor um 231 Aminosäuren kürzer, dennoch sind die der langen C-

terminalen Endodomäne zugeordneten Eigenschaften teilweise vorhanden. Dagegen ist die in Position 364 trunkierte hP2X7A-Untereinheit trotz gleicher Gesamtlänge wie die hP2X7B-Untereinheit nicht in der Lage, hP2X7B-typische Ströme zu vermitteln.

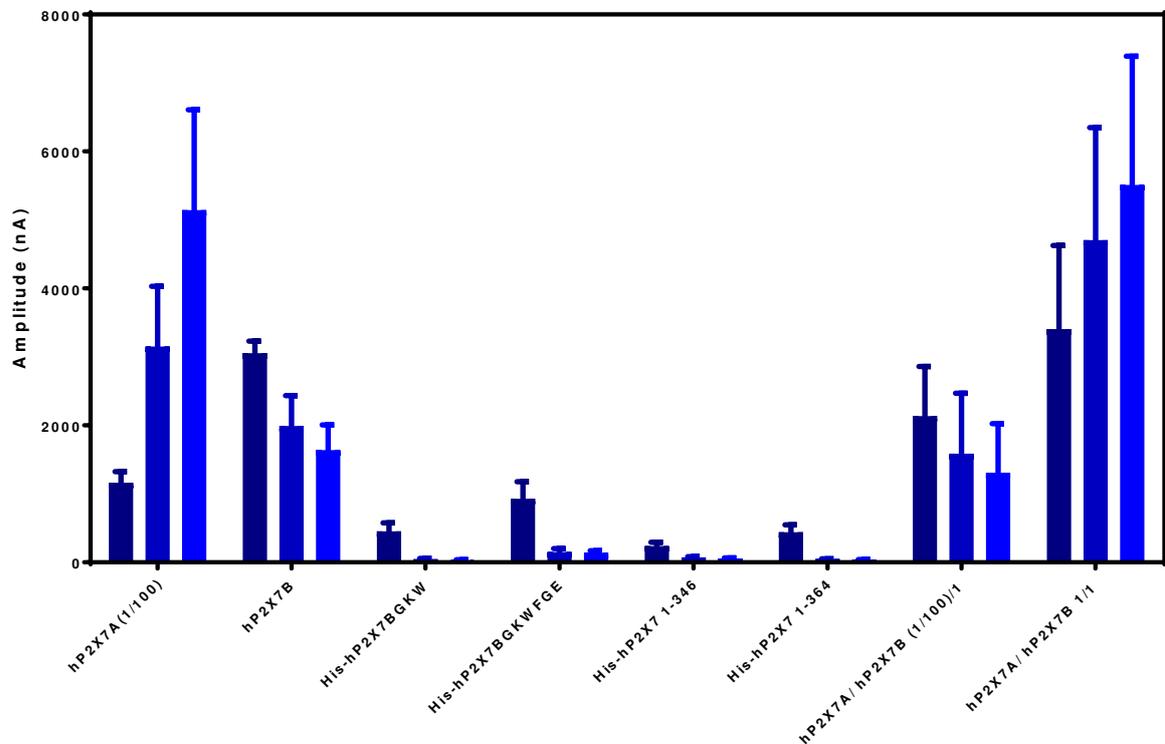


Abb. 14 Stromamplituden induziert durch drei aufeinander folgenden ATP-Applikationen

Quantitative Darstellung der Amplituden durch drei aufeinander folgende ATP-Applikationen induzierten Stromamplituden nach homo- bzw. heteromere Expression der angezeigten P2X7A- und P2X7B-Varianten. Die drei, im Abstand von 60 s, aufeinanderfolgenden ATP-Applikationen sind in verschiedenen Blautönen markiert. Die dicken Balken stellen die Mittelwerte \pm S.D. der Stromamplituden von 3 bis 9 Messungen pro Gruppe nach jeder der drei ATP-Applikation dar. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (S.D.), d.h. Streuung der einzelnen Werte an. Oozyten, die homomere hP2X7A-Untereinheiten oder heteromere hP2X7A und hP2X7B im cRNA-Verhältnis 1:1 exprimieren, reagieren auf ATP-Applikationen mit größer werdenden Stromamplituden. Das Balkendiagramm wurde mittels GraphPad Prism 7.04 erstellt.

4.1.4 Elektrophysiologische Charakterisierung der getaggtten bzw. trunkierten hP2X7A- und hP2X7B-Varianten

Da für die biochemische Charakterisierung Affinitätstags wie His- und Strep-Tags zur Aufreinigung, aber auch die Fusionierung mit dem GFP-Protein zur Visualisierung benötigt werden, wurde die Rolle dieser Extradomänen auf die hP2X7B-

Rezeptorfunktion elektrophysiologisch untersucht. Die His-, StrepII-, StrepIII-Tags und das GFP-Fusionsprotein wurden entweder einzeln oder kombiniert am N- oder C-Terminus mittels gerichteter Mutagenese-Verfahren eingefügt. Alle cRNAs wurden unverdünnt in *X. laevis*-Oozyten injiziert und die exprimierten Rezeptoren mit 300 μM ATP^{4-} induziert. In der Abb. 15 sind die Mittelwerte der aufgezeichneten maximalen Stromamplituden der ersten drei ATP-Applikationen aus fünf Oozyten dargestellt. Zu erkennen ist, dass die unveränderte hP2X7B-Spleißvariante die größten Ströme induziert. Durch jede Veränderung wie beispielsweise die Trunkierung oder Fusionierung mit dem GFP-Protein, werden kleinere Ströme induziert. Vergleicht man die N-terminal mit den C-terminal His-getaggen hP2X7-Konstrukten erkennt man, dass der His-Tag am N-Terminus zwar die Funktionalität beeinträchtigt, der His-Tag am C-Terminus die Funktionalität komplett aufhebt. Bemerkenswert ist, dass durch die Kombination des StrepII-Tags mit dem His-Tag wiederum sehr kleine Ströme messbar sind. Der StrepII-Tag am C-Terminus hat im Vergleich zu den restlichen Tags den geringsten negativen Effekt auf die Stromamplitude. Im Kontrast dazu stehen die GFP-Fusionsproteine, sie führen zu einer signifikanten Reduktion der Ströme. Insgesamt reduzieren alle angebrachten Tags unabhängig davon, ob sie C-oder N-terminal eingesetzt werden, die ATP-induzierten Ströme.

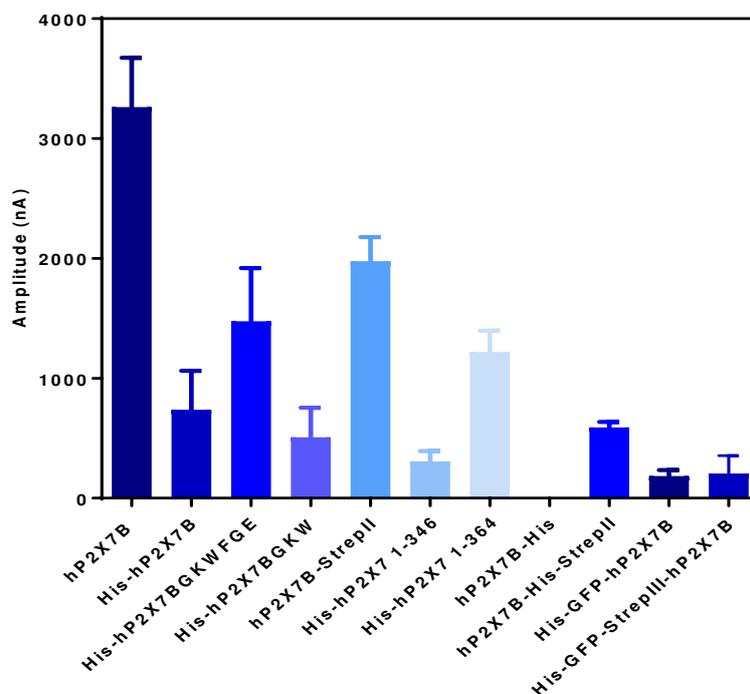


Abb. 15 Der Effekt von verschiedenen Tags bzw. Trunkierungen an den hP2X7A- und hP2X7B-Varianten (Exp. 36)

Statistischer Vergleich der ATP-induzierten Stromamplituden der unterschiedlich getaggten hP2X7A- und hP2X7B-Varianten. Die dicken Balken stellen die Mittelwerte \pm S.D. der Stromamplituden von 3 bis 9 Messungen pro Gruppe nach der ersten ATP-Applikation dar. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (S.D.), d.h. Streuung der einzelnen Werte an. Die aufgezeichneten Messdaten sind mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an hP2X7A- und hP2X7B-exprimierenden Oozyten aufgenommen wurden. Die Erstellung des Diagramms mit Hilfe von GraphPad Prism 7.04.

Zur Veranschaulichung der verschiedenen Aminosäuresequenzen wurde ein Alignment zwischen den in Abb. 14 dargestellten hP2X7A und hP2X7B- Varianten erstellt. Unterschiede in der Sequenz der N- bzw. C-terminalen Endodomäne sind durch farbliche Markierungen hervorgehoben. Die dazwischenliegende Aminosäuresequenz ist bei allen dargestellten hP2X7A- und hP2X7B-Varianten identisch und wurde daher weggelassen. Das Alignment ermöglicht einen direkten Vergleich der verschiedenen Längen der C-terminalen Endodomäne. Zu erkennen ist die schrittweise Verlängerung der His-hP2X7A¹⁻³⁴⁶-Untereinheit bis hin zu der His-hP2X7B Spleißvariante.

His-hP2X71-346	MHHHHHHMPACCSCSDVFQYETNK*YGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	32
His-hP2X7BGKWFGEΔGSD	MHHHHHHMPACCSCSDVFQYETNK*YGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	32
His-hP2X7BGKWFGEΔGSD	MHHHHHHMPACCSCSDVFQYETNK*YGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	32
His-hP2X7B Splice	MHHHHHHMPACCSCSDVFQYETNK*YGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	32
hP2X7B	MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	25
hP2X7B-StrepII	MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	25
hP2X7B-His	MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	25
hP2X7B-His-StrepII	MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	25
His-GFP-hP2X7B	MHHHHHHVSK*PACCSCSDVFQYE*YGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	269
His-GFP-StrepIII-hP2X7B	MHHHHHHVSK*GSA*PACCSCSDV*YGTIKWFFHVIIIFSIVCFALV	300
His-hP2X71-346	VYIGSTLSYFGL-----	353
His-hP2X7BGKWFGEΔGSD	VYIGSTLSYFGLVRDSLPHALGKW-----	365
His-hP2X7BGKWFGEΔGSD	VYIGSTLSYFGLVRDSLPHALGKWFGE-----	368
His-hP2X7Bsplice	VYIGSTLSYFGLVRDSLPHALGKWFGEΔGSD-----	371
hP2X7B	VYIGSTLSYFGLVRDSLPHALGKWFGEΔGSD-----	363
hP2X7B-StrepII	VYIGSTLSYFGLVRDSLPHALGKWFGEΔGSDNWSHPQFEK-----	373
hP2X7B-His	VYIGSTLSYFGLVRDSLPHALGKWFGEΔGSDHHHHHH-----	370
hP2X7B-His-StrepII	VYIGSTLSYFGLVRDSLPHALGKWFGEΔGSDHHHHHHNWSHPQFEK-----	379
His-GFP-hP2X7B	VYIGSTLSYFGLVRDSLPHALGKWFGEΔGSD-----	608
His-GFP-StrepIII-hP2X7B	VYIGSTLSYFGLVRDSLPHALGKWFGEΔGSD-----	639

Abb. 16 Alignment der Aminosäuresequenzen der elektrophysiologisch und/oder biochemisch untersuchten hP2X7A- und hP2X7B-Konstrukte

Die angegebenen Polypeptide sind der Länge nach aufgelistet, beginnend mit dem kürzesten Polypeptid His-hP2X7A¹⁻³⁴⁶. Der N- oder C-terminal eingefügte His-Tag ist türkis unterlegt. Die

TM1 und TM2 sind gelb, der StrepII-Tag ist rot unterlegt. Die Position des 239-Aminosäuren langen GFP-Proteins ist durch die grüne Hinterlegung der ersten drei GFP-Aminosäuren angedeutet. Die Position des 30-Aminosäuren langen StrepIII-Tags ist durch die violette Hinterlegung der ersten drei StrepIII-Aminosäuren angedeutet. Es sind nur die N- und C-terminalen Endodomänen des Alignments dargestellt, um Unterschiede hervorzuheben. Fehlende Aminosäure sind durch Sternchen markiert. Das Alignment wurde mittels des Clustal Omega Algorithmus erstellt.

4.1.5 Biochemische Charakterisierung von hP2X7B

Zu deren biochemischen Charakterisierung wurden die trunkierten His-hP2X7B-Konstrukte in *X. laevis*-Oozyten exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die [³⁵S]-Methionin- und IR800-markierten Proteine wurden auf SDS- und BN-PAGE-Gelen aufgetrennt, um sowohl die Gesamtexpression als auch die Plasmamembranexpression in nicht-reduzierter und reduzierter Form und gleichzeitig den Oligomerisierungszustand darzustellen. In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass eine Trunkierung der C-terminalen Endodomäne der hP2X7A-Untereinheit die Plasmamembranexpression und die Kanalfunktionalität beeinträchtigen kann (Becker et al. 2008; Smart et al. 2003; Klapperstück et al. 2001). Um genauer zu untersuchen, inwieweit die Trunkierungen der C-terminalen Endodomänen Auswirkungen auf die Gesamt- und Plasmamembranexpression haben, wurden hP2X7A- und hP2X7B-Konstrukte mit verschiedenen langen C-terminalen Endodomänen erstellt und über die SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die zugehörigen Wildtypen wurden ebenso exprimiert und dienten als Referenzwert.

In diesem Experiment sind zwei verschiedene cRNAs basierend auf zwei verschiedenen cDNA-Konstrukten des His-hP2X7-Rezeptors in *X. laevis*-Oozyten injiziert wurden. Beide Konstrukte wurden von ehemaligen Mitarbeitern erstellt. Dabei wurde das erste Konstrukt (K-2228; cRNA 7280) basierend auf dem zweiten Konstrukt (K-1172; cRNA 6845) durch Codon-Optimierungen erstellt und wird. Die genaue Ursache, warum das Konstrukt K-1172 (cRNA 6845) nicht exprimiert wird, bleibt unaufgeklärt. Aufgrund der geringen Plasmamembranexpression ist es jedoch nicht möglich, den hP2X7A-Rezeptor als Referenzwert zu nehmen; daher wurde die His-hP2X7B-Spleißvariante (Abb. 18, Spuren 13 und 14) auch für die hP2X7A-Varianten

als Referenz herangezogen. In diesem Falle eignet sich das besonders, da die untersuchten hP2X7A-Konstrukte in ihrer Länge der hP2X7B-Untereinheit ähnelt.

Angefangen von hP2X7A¹⁻³⁴⁶ bis hin zu der hP2X7B-Spleißvariante nimmt die Länge der Aminosäuresequenz schrittweise zu. Das hP2X7A¹⁻³⁴⁶ Konstrukt besitzt eine unvollständige TM2 und keine C-terminale Endodomäne. hP2X7A¹⁻³⁴⁶ wurde gut in der Oozyte exprimiert, war aber in der Plasmamembran nicht nachzuweisen (Abb. 17 A, Spuren 5 und 6). Vergleicht man die Gesamtexpression, erkennt man, dass das hP2X7A¹⁻³⁴⁶-Konstrukt zu den stark exprimierten Konstrukten gehört (Abb. 17). In einem weiteren Experiment, werden auch die trunkierten hP2X7A-Varianten His-hP2X7A¹⁻³³⁵⁵, His-hP2X7A¹⁻³⁶⁴, His-hP2X7A¹⁻³⁷³ neben den trunkierten hP2X7A-hP2X7B- Varianten exprimiert und es ist zu erkennen, dass alle trunkierten hP2X7A-Varianten etwas stärker exprimiert werden als die trunkierten hP2X7B-Varianten (Lena, Exp. 48, Daten nicht gezeigt).

Die hP2X7B-Spleißvariante unterscheidet sich von der hP2X7A-Untereinheit im letzten Drittel der Sequenz der TM2 nach L346 sowie in einer kurzen C-terminalen Endodomäne bestehend aus nur neun Resten. Das Konstrukt hP2X7¹⁻³⁴⁶ VRDSLFGHALG enthält diese abweichende Aminosäuresequenz der TM2 des hP2X7B-Rezeptors und endet aber noch vor Beginn der C-terminalen Endodomäne, demzufolge entspricht hP2X7A¹⁻³⁴⁶ VRDSLFGHALG der hP2X7B-Splice Variante ohne C-Terminale Endodomäne, spricht hP2X7B¹⁻³⁵⁵. Die komplette TM2 des hP2X7B-Rezeptors ist dem Anschein nach auch ohne die C-terminale Endodomäne ausreichend für die Expression des Proteins in der Plasmamembran (Abb. 15 A, Spuren 7, 8).

Einen weiteren direkten Vergleich zwischen den hP2X7A- und hP2X7B-Untereinheiten ermöglicht die Expression der His-hP2X7A¹⁻³⁵⁵-Untereinheit. Sie besitzt dieselbe Länge wie die hP2X7¹⁻³⁴⁶-VRDSLFGHALG-Untereinheit, spricht hP2X7B ohne C-terminale Endodomäne, wird aber viel stärker exprimiert. Man beachte, dass die Länge aller hier aufgeführten trunkierten hP2X7B-Untereinheiten mindestens 355 Aminosäuren umfassen, aber die Proteine dennoch größtenteils im verhältnismäßig geringeren Maße in der Plasmamembran exprimiert werden als die His-hP2X7A¹⁻³⁵⁵-Untereinheit. Die Gesamtexpression des hP2X7A¹⁻³⁵⁵ zeigt keine große Abweichung von den restlichen hP2X7B-Varianten (Abb. 18 B, Spuren 15 und 16). Anhand der

Quantifizierung wird nochmal deutlich, dass die Plasmamembranexpression der hP2X7A¹⁻³⁵⁵-Untereinheit weit über die der hP2X7B-Untereinheit hinausragt, die Gesamtexpression jedoch nicht besonders hervorsteicht (Abb. 17).

Zusätzlich wurde die His-hP2X7B-Untereinheit mit einer unterschiedlich langen C-terminalen Endodomäne exprimiert. Die C-terminale Endodomäne der hP2X7B-Untereinheit wurde zum einen um drei (Δ GSD) und zum anderen um sechs (Δ FGEGSD) Aminosäuren gekürzt. Die Kürzung der C-terminale Endodomäne um sechs Aminosäuren wirkte sich negativ auf die Plasmamembranexpression aus, hatte aber in der Gesamtexpression im Vergleich zu den anderen hP2X7B-Varianten einschließlich dem Wildtyp die höchste Gesamtexpressionsrate (Abb. 17). Die Deletion der letzten drei Aminosäuren (Δ GSD) scheint keinen sonderlich großen Effekt auf die Gesamt- und Plasmamembranexpression zu haben (vgl. Abb. 18 A und B, Spuren 11 und 12). Zusätzlich wurde der in Aminosäureposition 125 His-getaggte wt-hP2X7- analysiert, welche eine geringe Plasmamembran- und Gesamtexpression aufweist.

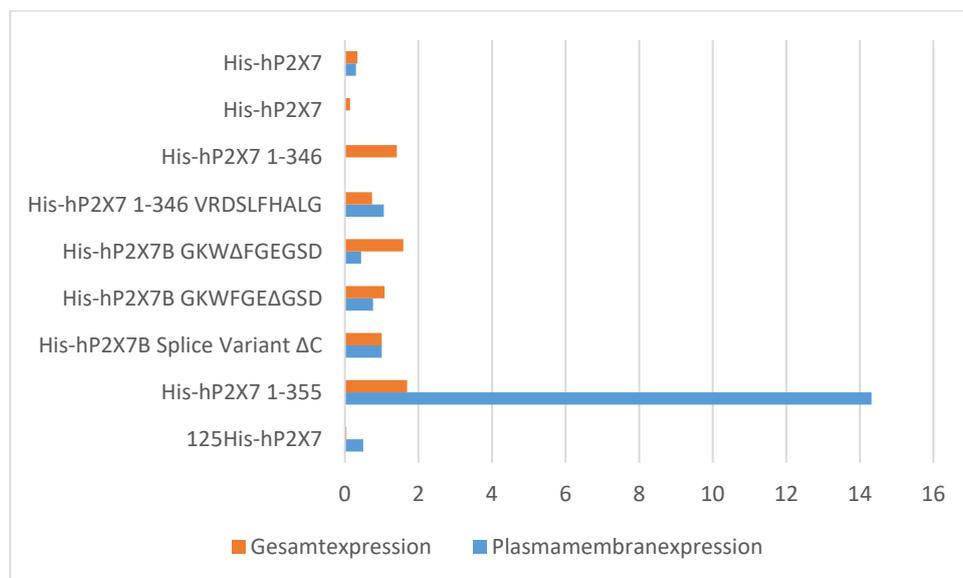


Abb. 17 Quantifizierung der Gesamt -und Plasmamembranexpression der hP2X7A- und hP2X7B-Varianten (Exp. 55, Lena)

Dargestellt sind die Intensitäten der Proteinbanden im reduzierten Zustand nach Normalisierung auf den His-hP2X7B. Die orangenen Balken stellen die Gesamtexpression dar, die blauen Balken die Werte der Expression in der Plasmamembran. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der BioRad ImageLab Software.

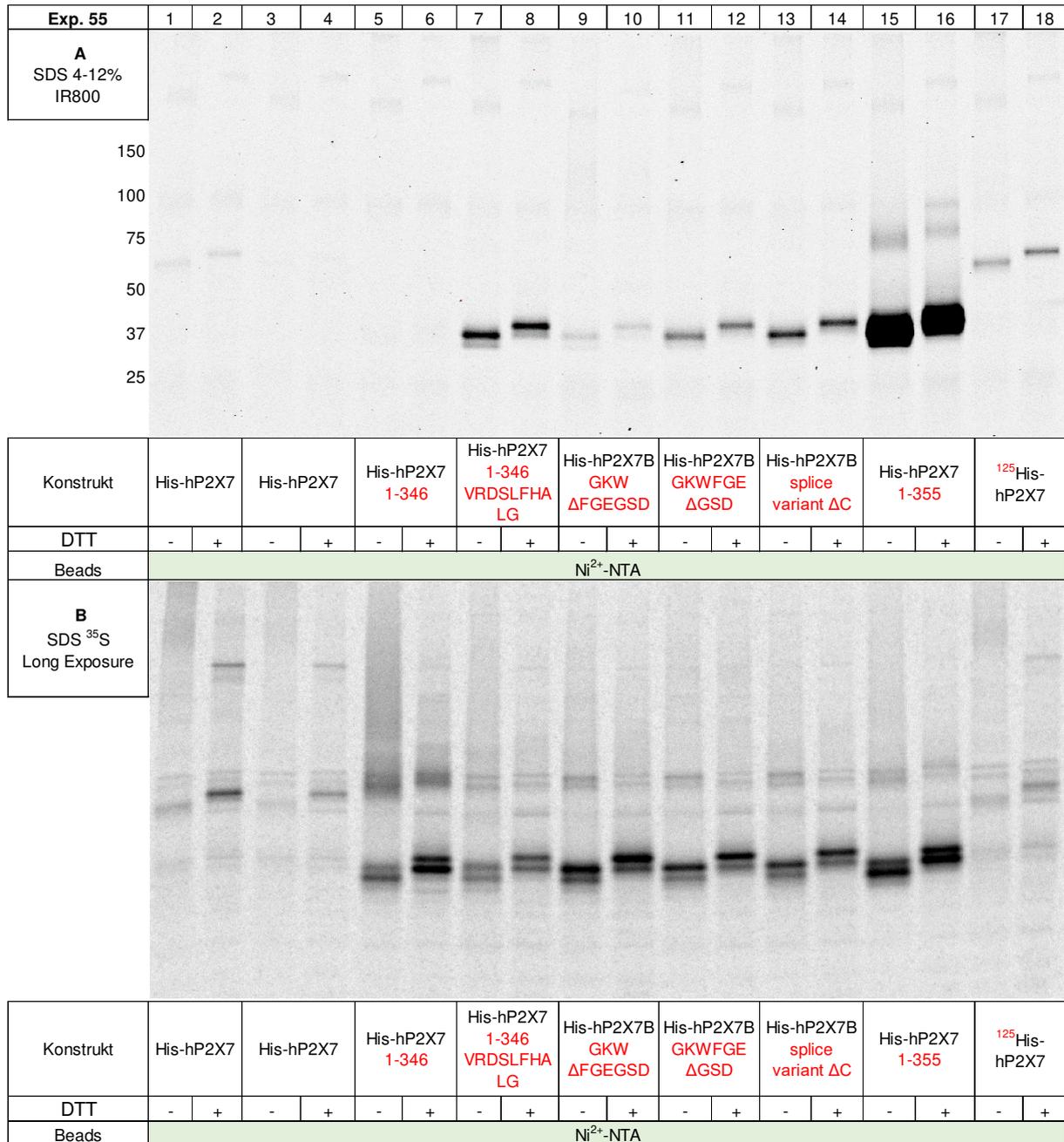


Abb. 18 Plasmamembran - und Gesamtexpression der hP2X7A- und hP2X7B-Konstrukte (Exp. 55, Lena Hauswirth)

Die über [³⁵S]-Methionin metabolisch und über IR800-NHS an der Plasmamembran markierten Proteine wurden mit Digitonin (1% m/v) nicht-denaturierend extrahiert und mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt. Die nativ eluierten Proben wurden durch Inkubation mit 1 % SDS in Abwesenheit und Gegenwart von 10 mM DTT für 15 min bei 56° C denaturiert. Die Proteine wurden jeweils ohne (-) DTT nicht reduziert und mit (+) DTT reduziert aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch SDS-Harnstoff-PAGE (4-12% Acrylamid). **A** Plasmamembranexpression Detektiert wurden die durch IR800-NHS Fluoreszenz markierten Proteine mittels Odyssey-Scanner. Am linken Rand sind die Massen der All-Blue-Marker Proteine angezeigt. **B** Gesamtexpression [³⁵S]-Methionin-Scan der exprimierten Proteine.

4.1.6 Interaktion von hP2X7B und hP2X4

Eine biochemische Charakterisierung von heteromeren P2X7A/P2X7B-Rezeptoren erfolgte bereits anhand von Pull-Down-Experimenten. Adinolfi konnte mit Hilfe eines Beute-Köder-Schemas die koexprimierten Rezeptoren koolisieren und nachweisen. Die Homo- und Heterooligomerisierung von P2X7A- und P2X7B-Untereinheiten konnte mittels SDS-PAGE und BN-PAGE gezeigt werden (Adinolfi et al. 2010). Für die Versuche wurde das Beute-Köder-Schema angewendet, bei dem die hP2X7A-Untereinheit (Köder) sowohl einen His-Tag als auch einen Strep-Tag besitzt und die hP2X7B-Untereinheit (Beute) nur einen His-Tag. Die Koolisierung der hP2X7B-Untereinheit diente zum Nachweis einer hP2X7A-hP2X7B-Interaktion. Auch die reziproke Variante führte zur Koolisierung und somit zum gleichen Ergebnis (Adinolfi et al. 2010). Ich habe mich an dieser Methodik orientiert, um eine mögliche Interaktion zwischen hP2X4- und hP2X7B-Untereinheiten mittels SDS-PAGE und BN-PAGE nachzuweisen. Da die berechneten Massen von nicht-getaggenen, N-glykosylierten hP2X7B- und hP2X4-Untereinheiten mit 54 bzw. 69 kDa nahezu identisch sind, können die hP2X7B- und hP2X4-Untereinheiten in der SDS-PAGE- und BN-PAGE nur schlecht oder gar nicht in ihrem Laufverhalten unterschieden werden.

Um die homo- oder heteromere Assemblierung trotzdem biochemisch untersuchen zu können, wurde die hP2X4-Untereinheit auf DNA-Ebene mit dem GFP-Protein fusioniert, sodass sie eine um 27 kDa größere Masse bekam. Zusätzlich wurde dadurch die Expression des GFP-Fusionsproteins im GFP-Fluoreszenzkanal des Scanners detektierbar. Zur Darstellung der Gesamtexpression wurden die intrazellulär exprimierten Proteine zudem metabolisch mit [³⁵S]-Methionin in einer Chase-Phase über Nacht markiert. Des Weiteren erfolgte die Markierung der Plasmamembranständigen Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff IR800-NHS.

Die Fusionierung mit dem GFP-Protein erhöht die Kernmasse der hP2X4-Untereinheit um 27 kDa und ist im SDS-PAGE-Gel als deutlich vergrößerte Bande sichtbar (Abb. 19, Spuren 1-4). So hat die His-hP2X4-GFP-StrepIII-Untereinheit ohne N-Glykane eine errechnete Masse von 82 kDa und mit N-Glykanen ca. 100 kDa. Im Vergleich dazu hat die His-hP2X4-StrepIII-Untereinheit eine deutlich kleinere Masse von 47 kDa ohne und ca. 65 kDa mit N-Glykanen. Die Vergrößerung der Untereinheit ist sehr hilfreich bei der Unterscheidung, da sonst die His-hP2X4-StrepIII-Untereinheit mit um nur 8 kDa größer

wäre His-hP2X7B-Untereinheit und es somit zu einer Überlagerung der homo- und heteromer exprimierten Proteine kommen könnte (s. Tab. 10). Die Denaturierung der nativen GFP-Fusionsproteine erfolgte mittels 0,1 % SDS für 15 min bei 21 °C, parallel zur Denaturierung der Proteine ohne GFP mittels 1,0 % SDS für 15 min bei 56 °C. Die Denaturierung der GFP-fusionierten Proteine erfolgt unter milderer Bedingungen, da eine zu hohe Temperatur zur irreversiblen Denaturierung des Proteins führen kann. Die Temperatur von 21°C reicht aus, um die kovalenten Bindungen aufzuheben ohne dabei das Protein zu zerstören.

Für das Experiment hatten die beiden koexprimierten P2X-Isoformen je einen N-terminalen His-Tag, der Köder (His-hP2X4-StrepIII bzw. His-hP2X4-StrepIII-GFP) trug zusätzlich einen StrepIII-Tag. Zur Identifikation der Interaktion zwischen den beiden koexprimierten Untereinheiten, wurden die Proteine aus den gleichen Zellhomogenaten parallel mittels Ni²⁺-NTA und Strep-Tactin aufgereinigt. Die Ni²⁺-NTA-Aufreinigung erfasst die Gesamtmenge an exprimierten Untereinheiten einschließlich der homo- und heteromer exprimierten Proteine. Über die Strep-Tactin-Aufreinigung können dahingegen nur die StrepIII-getaggten homomeren hP2X4-Rezeptoren sowie eventuell die mit hP2X4-Untereinheiten interagierenden hP2X7-Untereinheiten gebunden werden. Wie in früheren Versuchen (Adinolfi et al. 2010), wurde die allein exprimierte His-hP2X7B-Untereinheit nicht über Strep-Tactin aufgereinigt (Abb. 19 A, Spuren 19-20). Eine Koisolierung der IR800-NHS Fluoreszenz markierten, His-hP2X7B-Untereinheiten mittels Strep-Tactin konnte somit als Indiz für eine stabile Interaktion als Ausdruck einer möglichen Assemblierung der beiden P2X-Isoformen zum Heteromer gewertet werden. Zum eindeutigen Vergleich der beiden Protein-Isolierungsverfahren, wurden die interagierenden P2X-Untereinheiten einzeln und koexprimiert aufgereinigt.

Betrachtet man die parallelen Aufreinigungen der allein exprimierten hP2X4-Untereinheiten, so erkennt man eine stärkere Gesamt- und Plasmamembranexpression der His-hP2X4-StrepIII-Untereinheit im Vergleich zu der His-GFP-hP2X4-StrepIII-Untereinheit (Abb. 19 A, Spuren 1-4 und 15-18). Die koexprimierte His-hP2X4-StrepIII-Untereinheit zeigt wiederum nach beiden Proteinaufreinigungen eine geringere Plasmamembranexpression im Fluoreszenz-

Scan als die koexprimierte His-GFP-hP2X4-StrepIII-Untereinheit (vgl. Abb. 19 A, Spuren 7,8,11,12 mit 9,10,13,14).

Im GFP-Fluoreszenz-Scan sind, aufgrund der Denaturierung mit SDS in ihre monomere Form, nur die mit GFP-fusionierten hP2X4-Untereinheiten detektierbar, (Abb. 19 B, Spuren 3-4, 9-10, 13-14, 17-18). Die Intensität ist bei Koexpression mit dem hP2X7B deutlich geringer als bei alleiniger Expression von His-hP2X4-GFP-StrepIII.

Die Interaktion zwischen den hP2X4- und hP2X7B-Untereinheiten anhand der Plasmamembranexpression festzustellen, gestaltet sich aufgrund der schwachen Expression des hP2X7B-Rezeptors schwierig. Von Vorteil war in diesem Falle die Erfassung der Gesamtexpression mittels des fusionierten GFP-Proteins sowie der metabolischen Markierung. Die Abb. 19 A-C zeigen die im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine einschließlich der fluoreszenzmarkierten Membran- und Gesamtproteine sowie den metabolisch markierten intrazellulär exprimierten Proteinen. Falls eine Interaktion vorliegen sollte, würde die koisolierte His-hP2X7B-Untereinheit mittels Strep-Tactin auf derselben Höhe zu erkennen sein. Die blauen Pfeile sind parallel zu den grünen Pfeilen ausgerichtet und weisen auf die Banden der koisolierten His-hP2X7B-Untereinheit hin (Abb. 19 A, Spuren 13,14). Die entsprechenden Banden sind zwar schwach exprimiert, dennoch deutlich erkennbar, sodass hier eine mögliche Interaktion vorliegt.

Eine Interaktion zwischen den His-hP2X4-GFP-StrepIII- und His-hP2X7B-Untereinheiten kann man am ehesten im PhosphorImager-Scan erkennen (Abb. 19 C). In der Abb. 19 C ist - unter der Bande, der über Strep-Tactin aufgereinigten His-hP2X4-GFP-StrepIII-Untereinheit - eine weitere Bande erkennbar, die auf gleicher Höhe migriert wie die His-hP2X7B-Untereinheit. Die blauen Pfeile, welche parallel zu den grünen Pfeilen ausgerichtet sind, weisen auf die koisolierten His-hP2X7B-Untereinheit hin (vgl. Abb. 19 C, Spuren 9,10 und 13,14). Um einen direkten Vergleich zu haben, wurde die Kontrollgruppe der allein exprimierten His-hP2X4-GFP-StrepIII-Untereinheiten parallel aufgetragen (Abb.19 A-C, Spuren 17,18). Erwartungsgemäß ist hier nur die zugehörige Bande der His-hP2X4-GFP-StrepIII-Untereinheit detektierbar. Nachdem auf diese Weise die Spezifität der Aufreinigung belegt war,

konnte auch aufgrund der Laufhöhe der Banden bestätigt werden, dass es sich um die hP2X7B-Untereinheit handelt.

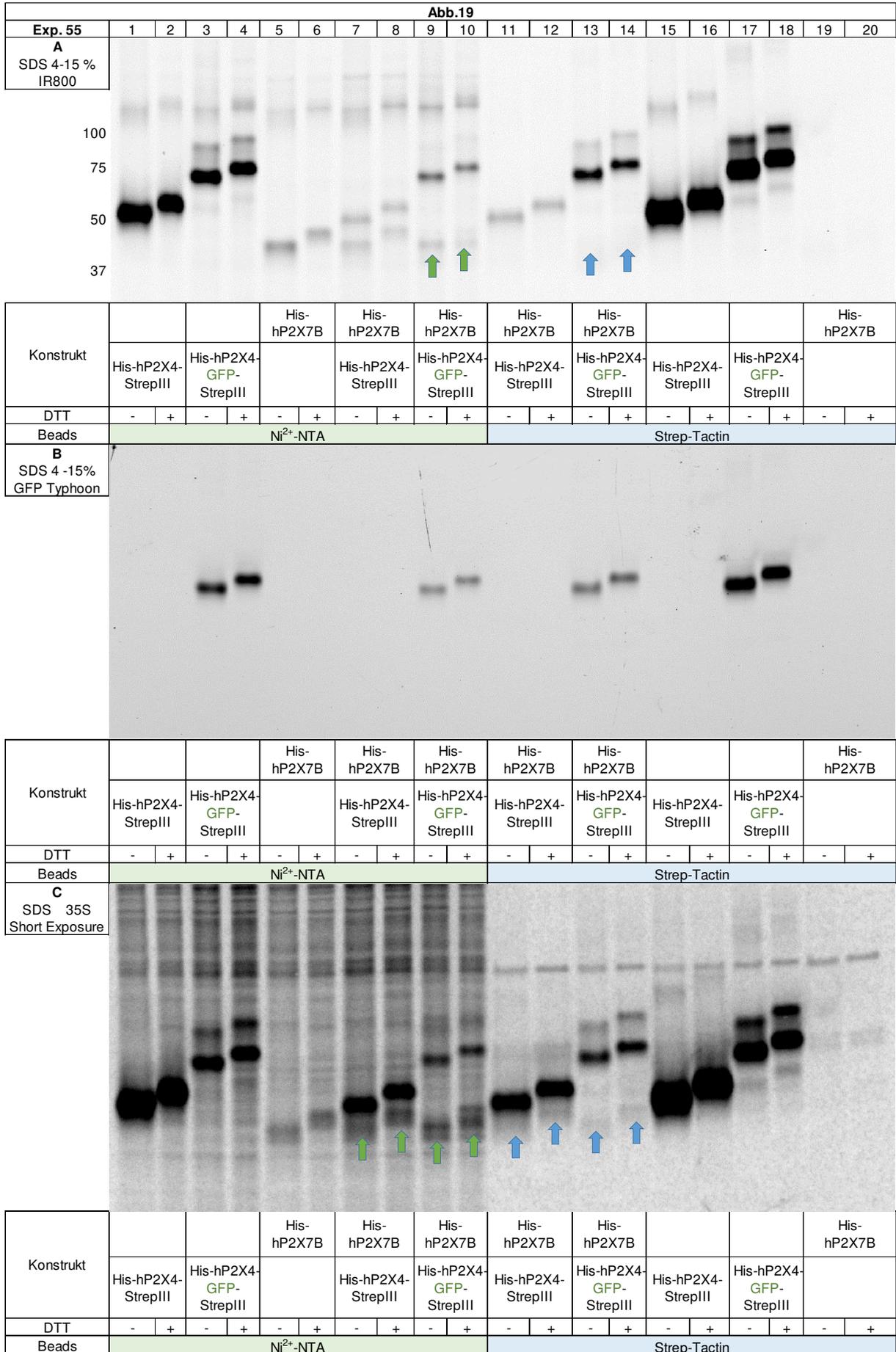


Abb. 19 Interaktion von His-hP2X7B und His-hP2X4-StrepIII bzw. His-hP2X4-StrepIII-GFP (Exp. 55)

Der His-hP2X7B wurde mit dem His-hP2X4-StrepIII bzw. His-hP2X4-StrepIII-GFP in einem cRNA-Verhältnis von 1:1 in *X. laevis*-Oozyten koexprimiert. Zur Kontrolle wurden die eventuell interagierenden Rezeptoren ebenso separat exprimiert. Die Markierung, Extraktion und Elution der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Abweichend ist die Konzentration von SDS, welche zur Denaturierung der nativ eluierten Proteine eingesetzt wird. Die Proteine ohne GFP werden weiterhin mit 1 % SDS inkubiert und die GFP-fusionierten Proteine mit 0,1 % SDS in Abwesenheit und Gegenwart von 10 mM DTT für 15 min bei 56° C. Die Proteine wurden über die SDS-Harnstoff-PAGE (4-12% Acrylamid) aufgetrennt. Die Laufhöhen der koiolierten His-hP2X4-Untereinheiten sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet **A** Plasmamembranexpression IR800-NHS-Fluoreszenz-Scan. Am linken Rand sind die Massen der All-Blue-Marker Proteine angezeigt **B** GFP-Fluoreszenz-Scan **C** Gesamtexpression [³⁵S]-Methionin-Scan.

Um nachzuweisen, dass die koiolierten Banden aus den zum Heteromer assemblierten Proteinen stammen, wurden die nativen Proben auf dem BN-PAGE-Gel aufgetragen und analysiert. Die aufgereinigten Proteine wurden nativ sowie partiell denaturiert über ein BN-PAGE-Gel aufgetrennt. Durch die partielle Denaturierung der Proteine mittels LiDS und TCEP wurde bewirkt, dass die Homo- und Heterotrimere in Dimere und Monomere dissoziieren. Da die jeweils vollständig N-glykosylierten Formen des His-hP2X4-StrepIII-Rezeptors und His-hP2X7B-Rezeptors ähnliche Proteinmassen aufweisen, ist eine deutliche Trennung der Trimere und insbesondere der dazwischenliegenden heteromeren Trimere nahezu unmöglich (s. Tab. 10). Sehr vorteilhaft ist hier die Vergrößerung der Proteine durch die Fusionierung mit dem GFP-Protein. Das His-hP2X4-GFP-StrepIII-Homotrimer ist um ca. 100 kDa größer als das His-hP2X4-StrepIII-Homotrimer.

Die Aufreinigung der koexprimierten N-glykosylierten His-hP2X4-GFP-StrepIII-Untereinheit und His-hP2X7B-Untereinheit über Ni²⁺-NTA führte zum Auftreten von zusätzlichen Proteinkomplexen, welche aufgrund der etwas höheren Masse als dem His-hP2X7B-Homotrimer und etwas geringeren Masse als dem His-hP2X4-GFP-StrepIII-Homotrimer genau zwischen den beiden Homotrimeren migrierten. Das heteromere Trimer, bestehend aus zwei His-hP2X4-GFP-StrepIII-Untereinheiten und einer His-hP2X7B-Untereinheit, ist als ~257 kDa große Proteinbande relativ gut im Typhoon-Fluoreszenz-Scanner detektierbar. Darüber hinaus gibt es eine sehr schwache native Bande, welche aus zwei His-hP2X7B-Untereinheiten und einer His-hP2X4-GFP-StrepIII-Untereinheit gebildet wird (Abb. 19 B, Spur 9). Die Abnahme der

detektierbaren Fluoreszenzintensität im GFP-Fluoreszenzkanal ist auf die verringerte Menge an GFP-fusionierten Untereinheiten zurückzuführen.

Bei der parallel durchgeführten Aufreinigung von His-hP2X7B (Beute) mit His-hP2X4-GFP-StrepIII (Köder) über Strep-Tactin ist eine zusätzliche Bande im GFP-Fluoreszenz-Scan sichtbar (Abb. 20 B, Spur 13). Die Detektion einer zusätzlichen Bande bei den nativen Proben ist nur dadurch zu erklären, dass die His-hP2X4-GFP-StrepIII-Untereinheit mit der His-hP2X7B-Untereinheit interagiert. Erwartungsgemäß kann die allein exprimierte His-hP2X7B-Untereinheit, weder im GFP-Fluoreszenz-Scan detektiert werden, noch über Strep-Tactin isoliert werden, wie im SDS-PAGE-Gel zu erkennen ist (Abb. 19 A, Spuren 19, 20, Abb. 19 B, Spuren 5, 6 und). Die Interaktion der beiden koexprimierten Rezeptoren kann somit durch die Detektion der zusätzlichen Bande der mittels Strep-Tactin aufgereinigten Proteine im GFP-Fluoreszenz-Scan bestätigt werden (Abb. 20, Spur 13).

Betrachtet man die [³⁵S]-Methionin metabolisch markierten, intrazellulär exprimierten Proteine, erkennt man eine weitere Bande, welche auf identischer Höhe zu den GFP-Fusionsproteinen läuft und somit die heteromeren Trimere darstellt (Abb. 20 C, Spuren 9, 13). Zudem ist auch der über Ni²⁺-NTA aufgereinigte koexprimierte His-hP2X7B-Rezeptor in nativer und denaturierter Form gut detektierbar (Abb. 120C, Spuren 9, 10). Im Vergleich dazu, ist die Interaktion zwischen His-hP2X4-StrepIII und His-hP2X7B relativ schwierig festzustellen. Falls eine heteromere Bande, deren Masse dem heteromeren Trimer entspricht, vorliegen sollte, würde diese von dem hP2X7B oder dem His-hP2X4-StrepIII-Trimer, aufgrund der ähnlichen Massen, verdeckt werden (s. Tab.9). Nach der Ni²⁺-NTA-Aufreinigung ist der Abstand zwischen den beiden homomer exprimierten Rezeptoren zu klein, um eine Intermediärbande deutlich erfassen zu können (Abb. 20 A, Spur 7). Die detektierte Bande ist breit genug, um sowohl die homomeren als auch die heteromeren Trimere zu umfassen (Abb. 20 C, Spuren 7, 11).

Durch die Kombination von Fluoreszenzmarkierung und der radioaktiven Markierung der Proteine konnte ein direkter Vergleich der Plasmamembran- und Gesamtexpression durchgeführt werden. In dem dargestellten Experiment (Exp. 55, Abb. 20) ist die Interaktion in der Plasmamembran aufgrund der geringen Plasmamembranexpression der hP2X7B-Untereinheiten kaum zu erfassen. Zudem

wird die Differenzierung zwischen homo- und heteromerer Assemblierung durch die ähnliche molekulare Masse der beiden His-hP2X4-StrepIII- und His-hP2X7B-Untereinheiten erschwert. Im Gegensatz dazu konnte aufgrund der erhöhten molekularen Masse des His-hP2X4-GFP-StrepIII eine Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten bestätigt werden. Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse des Experiments, dass die hP2X4- und hP2X7B-Untereinheiten zu einem Heteromer koassemblieren.

	His-hP2X4-StrepIII			His-hP2X4-GFP-StrepIII			His-hP2X7B		
His-hP2X4-StrepIII	65 X4	130 X4-X4	195 X4-X4-X4				122 X4-X7	187 X4- X4- X7	179 X4-X7-X7
His-hP2X4-GFP-StrepIII				100 X4	200 X4- X4	300 X4- X4- X4	157 X4-X7	257 X4- X4- X7	214 X4-X7-X7
His-hP2X7B							57 X7	114 X7- X7	171 X7- X7- X7

Tab. 10 Die errechneten molekularen Massen der zu homo- und heteromeren Dimeren und Trimeren interagierenden P2X4- und P2X7B-Untereinheiten. Zur Berechnung der Masse wurde die Anzahl der jeweiligen N-Glykosylierungstellen einbezogen.

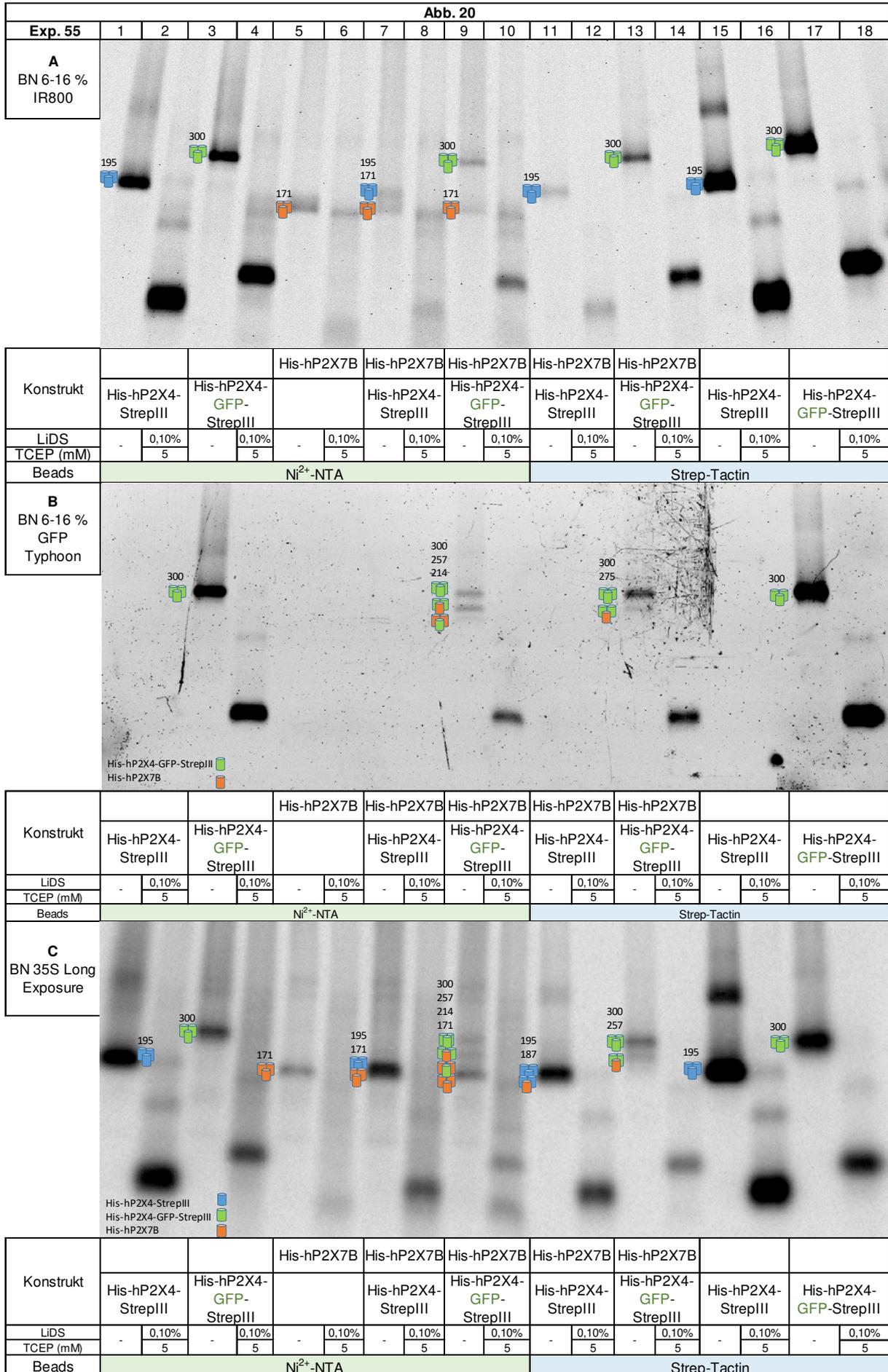


Abb. 20 Interaktion von His-hP2X7B und His-hP2X4-StrepIII bzw. His-hP2X4-StrepIII-GFP (Exp. 55)

Der His-hP2X7B wurde mit dem His-hP2X4-StrepIII bzw. His-hP2X4-StrepIII-GFP in einem cRNA-Verhältnis von 1:1 in *X. laevis*-Oozyten koexprimiert. Zur Kontrolle wurden die eventuell interagierenden Rezeptoren ebenso separat exprimiert. Die Markierung, Extraktion und Elution der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Die partielle Denaturierung der nativ eluierten Proben erfolgte durch Inkubation mit 0,1% LiDS und 5mM TCEP für 1 h bei 37° C. Die Proteine wurden jeweils ohne (-) LiDS nativ und mit (+) LiDS partiell aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch BN-PAGE (6-16% Acrylamid). Die Untereinheiten der exprimierten Rezeptoren sind durch verschieden gefärbte Zylinderformen dargestellt. **A** Plasmamembranexpression IR800-NHS Fluoreszenz-Scan. **B** Gesamtexpression GFP-Fluoreszenz-Scan **C** Gesamtexpression [³⁵S]-Methionin-Scan.

4.2 Interaktion von rP2X7 und rP2X4

Innerhalb der Familie der P2X-Rezeptoren stellt der P2X7-Rezeptor aufgrund der langen C-terminalen Domäne eine Ausnahme dar. Im Unterschied zu den anderen P2X-Rezeptoren, konnte ihm über einen langen Zeitraum nur die Bildung von Homotrimeren zugeordnet werden. Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargestellt ist, wurde in den vergangenen Jahren der P2X4-Rezeptor als möglicher Interaktionspartner des P2X7-Rezeptors identifiziert (Guo et al. 2007). Auf physikalischer und funktioneller Ebene konnten Wechselwirkungen zwischen den beiden Isoformen bestätigt werden (Schneider et al. 2017).

Zur Untersuchung der Interaktion von P2X7 und P2X4 habe ich verschiedene Experimente durchgeführt. Unter anderem habe ich den Wildtyp-rP2X7 sowie die trunkierte rP2X7-Variante mit der rP2X4-Untereinheit koexprimiert und anschließend aufgereinigt. Ein Vorteil des P2X7 der Spezies Ratte besteht darin, dass die Plasmamembranexpression stärker und somit besser detektierbar ist, als die der humanen Rezeptoren (Dissertation Cora Büttner 2001). Zur Untersuchung der Interaktion von rP2X7 und rP2X4 wurde, wie bei der zuvor beschriebenen Interaktion von hP2X7B und hP2X4, wieder das „Köder und Beute“ Prinzips gewählt. Damit der rP2X7-Rezeptor als Köder fungiert, wurde die rP2X7-Untereinheit zusätzlich zum His-Tag auch mit dem StrepII-Tag versehen, während die rP2X4-Untereinheit als Beute nur mit einem His-Tag ausgestattet wurde. Neben den jeweils einzeln exprimierten rP2X4- und rP2X7-Rezeptoren, wurde die cRNA auch in den Verhältnissen 1:1 koinjiziert. Die Aufreinigung der exprimierten Proteine erfolgte parallel unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA und Strep-Tactin. Anschließend wurden die Proteine auf SDS-PAGE- und BN-PAGE-Gelen aufgetrennt, sodass die Plasmamembran- und

Gesamtexpression detektiert werden konnte.

4.2.1 SDS-PAGE-Analyse der koexprimierten rP2X4- und rP2X7-Rezeptoren

Über die Ni-NTA konnten alle exprimierten Rezeptoren einschließlich der Kontrollgruppen aufgereinigt werden. Die Strep-Tactin-Aufreinigung ermöglichte parallel zu der eigentlichen Untersuchung, ob die Beute His-rP2X4 mit dem Köder rP2X7-His-StrepII koisoliert werden konnte. Zur Kontrolle wurde die einzeln exprimierte His-rP2X4-Untereinheit zusätzlich über Strep-Tactin aufgereinigt, wobei erwartungsgemäß keine Bande detektiert werden konnte (Abb. 21, Spuren 1, 2). Die Bestätigung der spezifischen Affinitätschromatographie erfolgt durch die Aufreinigung der einzeln exprimierten rP2X7-His-StrepII-Untereinheit, bei der nur die entsprechende Bande deutlich zu sehen ist (Abb. 21, Spuren 3, 4). Schlussfolgernd ist die Koisolierung der Beute ein Indiz für die mögliche Interaktion zwischen den rP2X4- und rP2X7-Untereinheiten. Im Fluoreszenz-Scan und ³⁵S-Scan sind Proteinbanden exakt in den Positionen zu erkennen, die für die vollständig N-glykosylierte (Spuren 5-6) und teilweise N-glykosylierten (Spuren 7-8) His-rP2X4-Untereinheit zu erwarten sind, und zwar jeweils unterhalb der über Strep-Tactin aufgereinigten rP2X7-His-StrepII-Untereinheiten. Die als Beute koisolierten His-P2X4-Untereinheiten sind zusätzlich durch blaue Pfeile markiert (Abb. 21, Spuren 5-8). Schlussfolgernd belegt die Koisolierung der Beute die Interaktion zwischen den rP2X4- und rP2X7-Untereinheiten.

In dem dargestellten Versuch wurde die rP2X7-Untereinheit neben der Koexpression mit der rP2X4-Untereinheit auch mit der mutierten Variante His-N^{75,110,153}Q-rP2X4 koexprimiert (s. Abb. 21). Die an drei N-Glykosylierungsstellen mutierte rP2X4-Variante konstruierte ich in aufeinander aufbauenden Schritten, durch die jeweils eine N-Glykosylierungsstelle entfernt wurde. Entsprechend der Primärsequenz weist die rP2X4-Untereinheit sechs Sequenzmotive (NXS/T) für N-Glykosylierungen in der Ektodomäne auf. Durch die Mutation von Asparagin zu Glutamin in drei definierten Positionen, habe ich insgesamt drei der sechs N-Glykosylierungsstellen eliminiert. Das verkleinert nicht nur die molekulare Masse, wie am Massenshift zu erkennen ist, sondern verringert auch die Expression in der Plasmamembran. Die verringerte Expression resultiert eventuell aus der schlechten Faltung oder Assemblierung der

rP2X4-Rezeptoren. Die N-Glykosylierung hat einen starken Einfluss auf die Faltung, demzufolge werden unvollständig N-glykosylierten P2X-Rezeptoren schneller proteolytisch abgebaut als vollständig N-glykosylierte P2X-Rezeptoren (Rettinger et al. 2000). Durchgeführte Studien am P2X2-Rezeptor haben bereits gezeigt, dass die Entfernung aller drei bzw. vier N-Glykosylierungsstellen der P2X2- bzw. P2X1-Untereinheit in stark verminderter Plasmamembranexpression und Funktionsverlust resultiert (Torres et al. 1998a; Rettinger et al. 2000). Anhand von mir durchgeführten elektrophysiologischen Messungen konnte ich bestätigen, dass die partielle Elimination der verfügbaren N-Glykosylierungsstellen mit einer geringeren funktionellen Expression des P2X4-Rezeptors einhergeht (Exp. 17, Daten nicht gezeigt).

Vergleicht man die wt-rP2X4-Untereinheit mit der mutierten His-N^{75,110,153}Q-rP2X4-Untereinheit, erkennt man, dass das vollständig N-glykosylierte Protein eine deutlich höhere Plasmamembran- und Gesamtexpression aufweist (vgl. Abb. 21 A–Spuren 13, 14 mit 15, 16). Ebenso wird der Massenunterschied zwischen der Mutante und dem Wildtyp sichtbar. Die Kernmasse jeder Untereinheit des rP2X4-Rezeptors liegt bei 44 kDa. Da die Ektodomäne der rP2X4-Untereinheit sechs N-Glykosylierungsstellen pro Untereinheit besitzt, wird durch die N-Glykosylierung die Kernmasse jeder Untereinheit um ca. 18 kDa erhöht. Die Massendifferenz zwischen der mutierten Variante und dem Wildtyp von rP2X4 liegt somit bei ca. 9 kDa pro Untereinheit (s. Tab. 10). Auf dem SDS-PAGE-Gel ist die Bande mit der entsprechenden Größe der vollständig N-glykosylierten und teilweise N-glykosylierten rP2X4-Untereinheit nach der Strep-Tactin-Aufreinigung nur detektierbar, wenn die His-rP2X4-Untereinheit zuvor mit der His-rP2X7-StrepII-Untereinheiten koexprimiert wurde. Die blauen Pfeile weisen auf die jeweiligen Banden der koinzidierten His-rP2X4-Untereinheiten hin (Abb. 21 A, B, Spuren 7,8). Die Isolierung des allein exprimierten His-rP2X4-Rezeptors über Strep-Tactin ist erwartungsgemäß nicht möglich (Abb. 21 A, Spuren 1, 2).

4.2.2 BN-PAGE-Analyse der koexprimierten rP2X4- und rP2X7-Rezeptoren

Anhand der BN-PAGE-Analyse wurde versucht, die durch die SDS-PAGE-Analyse dargelegte mögliche Interaktion der rP2X4- und rP2X7-Untereinheiten nachzuweisen. Auf dem BN-PAGE-Gel sind je nach Affinitätschromatographie, die

native Form des rP2X7-His-StrepII- und evtl. des His-rP2X4-Rezeptors bei 255 kDa bzw. 186 kDa detektierbar. Für die heteromeren Trimere, deren Größe zwischen denen der homomeren rP2X4 und rP2X7-Rezeptoren liegt, errechnet sich je nach Stöchiometrie eine molekulare Masse von 199 kDa oder 232 kDa (s. Tab. 11). Es ist zwar keine native Intermediärbande detektierbar, jedoch wird nach Denaturierung und Spaltung sämtlicher Disulfidbrücken durch LiDS und TCEP eine 62 kDa Bande sichtbar, die dem Monomer der vollständig N-glykosylierten rP2X4-Untereinheit entspricht (Abb. 21 C, Spuren 5, 6). Das Erscheinen des Monomers ist nur möglich, wenn es zuvor mit der StrepII-rP2X7-Untereinheit zu einem Heteromer assembliert ist und dadurch koisoliert werden konnte. Die Expression der teilweise glykosylierten rP2X4-Untereinheit ist wahrscheinlich zu schwach, um im Fluoreszenz-Scan des BN-PAGE-Gels detektiert werden zu können (Abb. 21 C, Spuren 7, 8). Insgesamt spricht das Ergebnis für eine mögliche rP2X4-rP2X7-Interaktion, wenn auch nicht unbedingt für eine Heterotrimerisierung.

	His-rP2X4 ^{wt}			His-N ^{75,110,153} Q-rP2X4			rP2X7-His-StrepII		
His-rP2X4 ^{wt}	62 X4	124 X4-X4	186 X4-X4-X4				147 X4-X7	199 X4- X4- X7	232 X4-X7-X7
His-N ^{75,110,153} Q-rP2X4				53 X4	106 X4- X4	159 X4- X4- X4	138 X4-X7	191 X4- X4- X7	223 X4-X7-X7
rP2X7-His-StrepII							85 X7	170 X7- X7	255 X7- X7- X7

Tab. 11 Die errechneten molekularen Massen der zu homo- und heteromeren Dimeren und Trimeren interagierenden P2X4- und P2X7-Untereinheiten. Zur Berechnung der Masse wurde die Anzahl der jeweiligen N-Glykosylierungsstellen einbezogen.

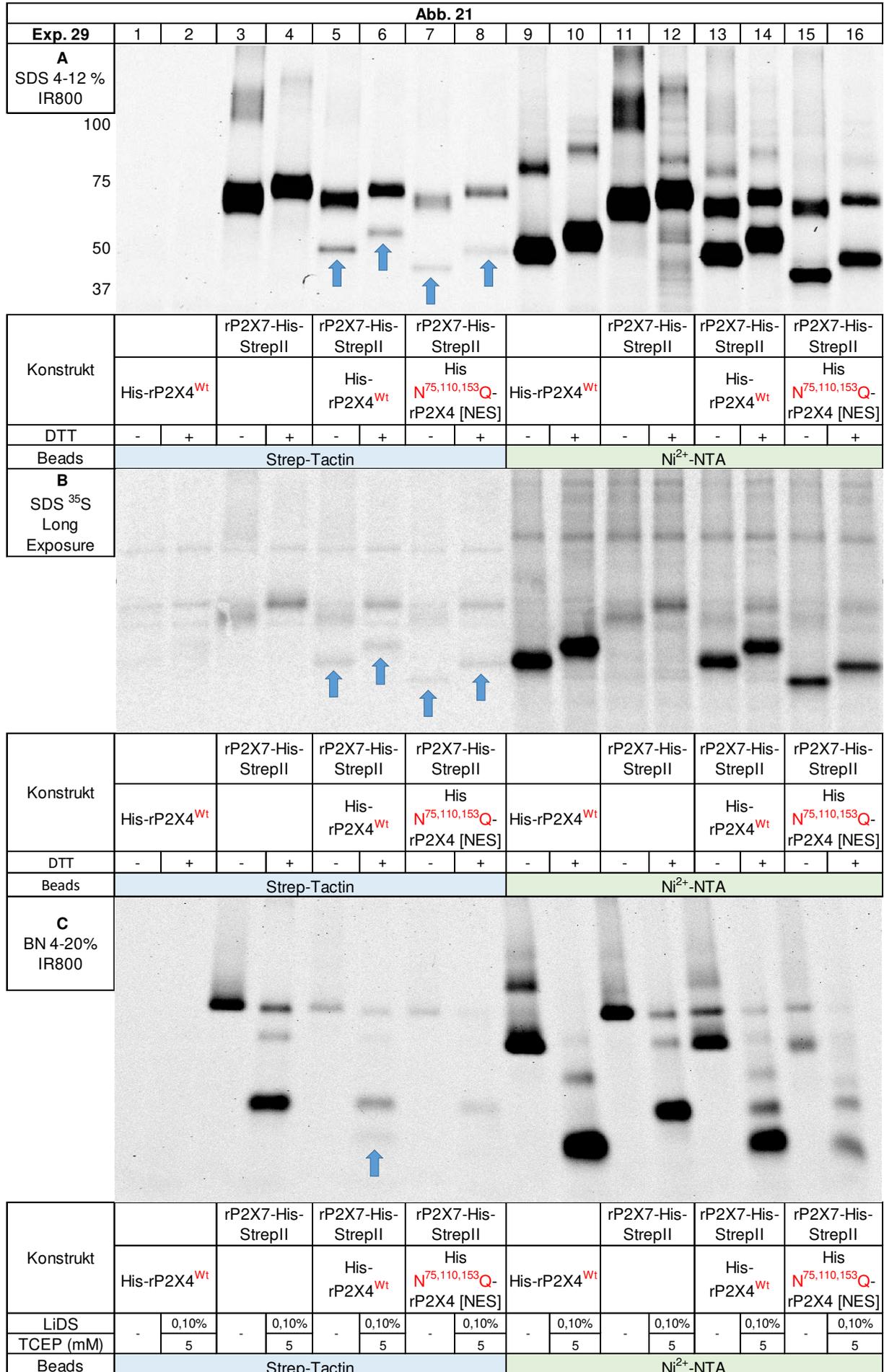


Abb. 21 Interaktion von rP2X7-His-StrepII und His-rP2X4 (Exp. 29)

Der rP2X7-His-StrepII wurde mit dem His-rP2X4 in einem cRNA-Verhältnis von 1:1 in *X. laevis*-Oozyten koexprimiert. Zur Kontrolle wurden die Rezeptoren ebenso einzeln exprimiert. Die Markierung, Extraktion und Elution der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Die Laufhöhe der koinzidierten His-rP2X4-Untereinheiten sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet **A und B**. Die Denaturierung und Auftrennung entspricht den unter Abb. 18 beschriebenen Bedingungen. **C** Die Denaturierung und Auftrennung entspricht den unter Abb. 20 beschriebenen Bedingungen **A** Plasmamembranexpression IR800-NHS Fluoreszenz-Scan. Am linken Rand sind die Massen der All-Blue-Marker Proteine angezeigt. **B** Gesamtexpression [³⁵S]-Methionin-Scan **C** Plasmamembranexpression IR800-NHS Fluoreszenz-Scan.

4.2.3 Optimierung der Detergenzien

Es wurden mehrere Schritte zur Optimierung der Elution der Rezeptorproteine von den Strep-Tactin-Beads unternommen, um die Ausbeute zu erhöhen und so die Interaktion schließlich besser nachweisen zu können. Zudem wurde die cRNA der interagierenden Rezeptoren in verschiedenen Verhältnissen koexprimiert, um das optimale cRNA-Verhältnis für eine annähernd gleiche Expression von rP2X4 und rP2X7 bestimmt. Dazu wurde das bis dahin verwendete Detergenz Digitonin mit weiteren nicht-ionischen Detergenzien wie Glyco-Diosgenin (GDN) und Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (NG310) verglichen. Ionische Detergenzien wie Natrium Dodecyl Sulfate wurden von vornherein ausgeschlossen, da sie als geladene Moleküle stark denaturierend wirken und somit den nativen bzw. trimeren Zustand des Proteins aufheben. Detergenzien können aufgrund ihrer amphipatischen Eigenschaften die Membranproteine aus der Membran solubilisieren. Um die Quartärstruktur der untersuchten Proteine zu erhalten, kommen praktisch nur nicht-ionische Detergenzien in Frage. Dabei muss die sogenannte kritische Mizellenkonzentration (CMC, critical micellar concentration) überschritten werden. Unterhalb dieser Konzentrationswertes, welcher temperatur- und ionenabhängig ist, bildet das Detergenz keine Mizellen. Die CMC ist für jedes Detergenz spezifisch und kann in Tabellen nachgeschlagen werden.

In dem Versuch wurden Digitonin 1 % (w/v), Glyco-Diosgenin (GDN) 0,05 % (w/v) und Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (NG310) 0,04 % (w/v) zur Elution von den koexprimierten rP2X4- und rP2X7-Rezeptoren eingesetzt (Abb. 22 A-C). In einem weiteren Versuch wurde die DDM-Konzentration von 0,2 % (w/v) auf 0,05 % (w/v) reduziert, um zu prüfen, ob eine mildere Konzentration eine höhere Ausbeute von Heterotrimeren zur Folge hat. Dazu wurden die in verschiedenen cRNA-Verhältnissen

koexprimierten rP2X4- und rP2X7-Untereinheiten parallel mit 0,05 % (w/v) und 0,2 % (w/v) DDM extrahiert. Die Verringerung der DDM-Konzentration brachte jedoch keine Verbesserung der Ausbeute, weswegen 0,2 % (w/v) in den darauffolgenden Experimenten zur Extraktion weiterhin verwendet wurde (Daten nicht gezeigt, Exp. 34).

Die exprimierten Rezeptoren wurden nach dem beschriebenen „Köder und Beute“ Prinzip untersucht. Zur Kontrolle wurden die Rezeptoren auch allein exprimiert. Nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA können alle Banden, welche den berechneten Massen der Untereinheiten entsprechen, detektiert werden (s. Tab. 10, s. Abb. 22, Spuren 1-12). Nur bei einer Assemblierung der beiden Untereinheiten zu einem Heteromer, kann die His-rP2X4-Untereinheit auch über Strep-Tactin aufgereinigt werden. Dadurch kann die His-rP2X4-Untereinheit nach der Denaturierung auch auf dem SDS-PAGE-Gel detektiert werden. Anhand des Fluoreszenz- und [³⁵S]-Methionin-Scans ist zu erkennen, dass eine Koisolierung der His-rP2X4-Untereinheit durch die rP2X7-His-StrepII-Untereinheit stattfindet.

Die Extraktion und anschließende Elution mit dem Detergenz GDN bzw. NG310 hat eine starke Reduzierung der Isolierung der jeweiligen Untereinheit zu Folge. Man kann davon ausgehen, dass die Expression der koexprimierten Rezeptoren gleich stark ist und somit die stark reduzierte Ausbeute der Proteine auf die Elutionsmittel zurückzuführen ist (Abb. 22 A, 13 – 18). Die quantitative Analyse bestätigt, dass die Elution mit GDN bzw. NG310 bezogen auf Digitonin eine Reduktion der Isolierung um ungefähr 70 % zur Folge haben (Abb. 23). Zudem nimmt auch die Koisolierung des rP2X4-Rezeptors deutlich ab (Abb. 22 A, 13 – 18 und Abb. 23). In der Abb. 22 A-C ist das zu erwartende Monomer am besten sichtbar, wenn es zuvor mit Digitonin eluiert wurde. Sowohl bei der Plasmamembran- als auch in der Gesamtexpression erscheint die Bande mit der erwartenden Masse von 62 kDa (Abb. 22 A und B, Spuren 13 – 18).

Des Weiteren beinhaltet der Versuch in Abb. 22 die rP2X4/rP2X7-Koexpression über verschiedenen cRNA-Verhältnisse, wie angezeigt. Die quantitative Analyse der detektierten Banden bestätigen, dass die Ausbeute der rP2X7-Untereinheit bei einem rP2X4/rP2X7-cRNA-Verhältnis von 1:4 höher ist als bei 1:2 (vgl. Abb. 22 A, Spuren 5, 6 und 7, 8). So beträgt der prozentuale Anteil der rP2X7-His-StrepII-Untereinheit ungefähr 40 % bei einer Koinjektion der rP2X4/rP2X7-cRNAs im Verhältnis 1:2 und steigt auf fast 54 %, wenn die rP2X4/rP2X7-cRNA im Verhältnis 1:4 koinjiziert wird

(Abb. 23). Demzufolge beträgt der prozentuale Anteil des His-rP2X4-Untereinheit ungefähr 46 % und entspricht somit in etwa gleiche Menge an Ausbeute wie die de rP2X7-Untereinheit. Das cRNA-Verhältnis 1:4 hat sich auch im darauffolgenden Versuch bewährt (Exp. 34, Daten nicht gezeigt). Hier wurden die cRNA-Verhältnisse 1:1 bis 1:4 schrittweise getestet und es ist zu erkennen, dass das cRNA-Verhältnis 1:4 für eine gleichmäßige Isolierung der beiden Rezeptoren am besten geeignet ist. Das ist darauf zurückzuführen, dass der rP2X4 deutlich stärker in der Plasmamembran exprimiert wird als der rP2X7, sodass bei einem cRNA-Verhältnis von 1:1 der rP2X4-Rezeptor mit einer sichtbar breiteren Bande detektiert werden kann.

Auf dem BN-PAGE-Gel ist nach der Ni-NTA-Aufreinigung unter nativen Bedingungen die homomeren Trimer der rP2X4- und rP2X7-Untereinheiten mit den entsprechenden Massen (s. Tab. 11) zu erkennen. Zusätzlich zu den jeweiligen Dissoziationsstufen, welche durch unterschiedlich gefärbte Zylinderformen gekennzeichnet sind, ist eine weitere Bande erkennbar, die dem heteromeren Dimer mit einer Masse von 147 kDa entspricht. Die Massen des homomeren rP2X7-Dimer und rP2X4-Trimers (s. Tab. 10) weichen kaum voneinander ab, sodass es zu einer Überschneidung der beiden Banden kommt (s. Abb. 22 C, Spur 8). Ebenso schwierig zu erfassen sind die Intermediärbanden, deren Massen zwischen den homomeren rP2X4- und rP2X7-Trimeren liegt (s. Tab. 11). Da über die Strep-Tactin-Chromatographie das homomere rP2X4-Trimer nicht erfasst werden kann, ergibt sich hier die Möglichkeit, die falls vorhandenen heteromeren Trimere im nativen Zustand detektieren zu können. Das Heterotrimer bestehend aus zwei rP2X7-Untereinheiten und einer rP2X4-Untereinheit ist mit einer Masse von ca. 232 kDa sehr schwach sichtbar. Die zugehörige monomere Bande ist nach der partiellen Denaturierung ebenso detektierbar (Abb. 22C, Spur 13). Die blauen Pfeile markieren das Heterotrimer im nativen Zustand sowie das Monomer des rP2X4-Rezeptors nach der Denaturierung des Heteromers (Abb. 22 C, Spuren 13,14).

Zusammenfassend ergaben diese Experimente, dass 0,2 % DDM (w/v) zur Extraktion, in der Kombination mit 1,0 % Digitonin (w/v) zur Elution, so wie es schon zuvor in unserer Arbeitsgruppe angewandt wurde, die höchste Ausbeute ergibt. Die dargestellte quantitative Analyse belegt, dass das Digitonin das mildeste Detergenz für eine hohe Ausbeute der Proteine ist (Abb. 23). Des Weiteren bestätigt die

quantitative Analyse, dass das Mischverhältnis 1:4 der cRNAs (rP2X4:rP2X7) am besten geeignet ist, um eine gleichmäßige Ausbeute beider Rezeptoren zu erhalten.

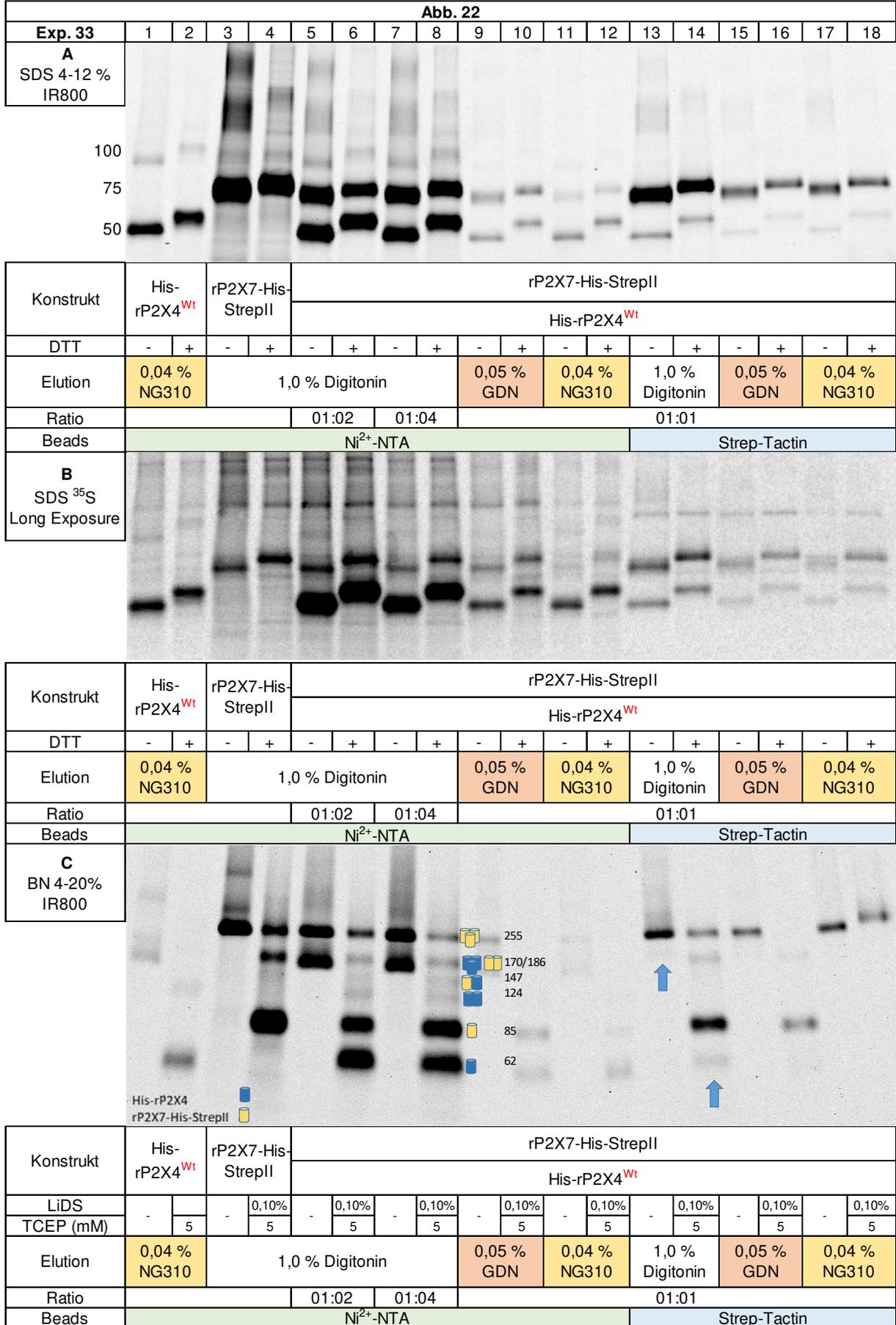


Abb. 22 Vergleich verschiedener nicht-ionischer Detergenzien zur Isolierung von rP2X4 und rP2X7-Rezeptoren (Exp. 33)

Unterschiedliche Detergenzien wurden zur Extraktion und Elution von koexprimierten rP2X4- und rP2X7-Untereinheiten verwendet. Zusätzlich wurden die cRNAs der interagierenden Rezeptoren in verschiedenen Mischverhältnissen koinjiziert. Zur Kontrolle wurden die eventuell interagierenden Rezeptoren ebenso separat exprimiert. Die über [³⁵S]-Methionin metabolisch und über IR800-NHS an der Plasmamembran markierten Proteine wurden mit Digitonin (1% m/v), GDN (0,05 % m/v) oder NG310 (0,04 % m/v) nicht-denaturierend extrahiert und mittels Ni-NTA-Chromatographie und Strep-Tactin-Chromatographie aufgereinigt. **A und B** Die Denaturierung und Auftrennung entspricht den unter Abb. 18 beschriebenen Bedingungen. **C** Die Denaturierung und Auftrennung entspricht den unter Abb. 20 beschriebenen Bedingungen **A Plasmamembranexpression IR800-NHS Fluoreszenz-Scan. B Gesamtexpression [³⁵S]-Methionin-Scan. C Plasmamembranexpression IR800-NHS Fluoreszenz-Scan.** Die Untereinheiten der exprimierten Rezeptoren sind durch verschieden gefärbte Zylinderformen dargestellt. Die Laufhöhe des heteromeren Trimers und der dissoziierten His-rP2X4-Untereinheit sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet.

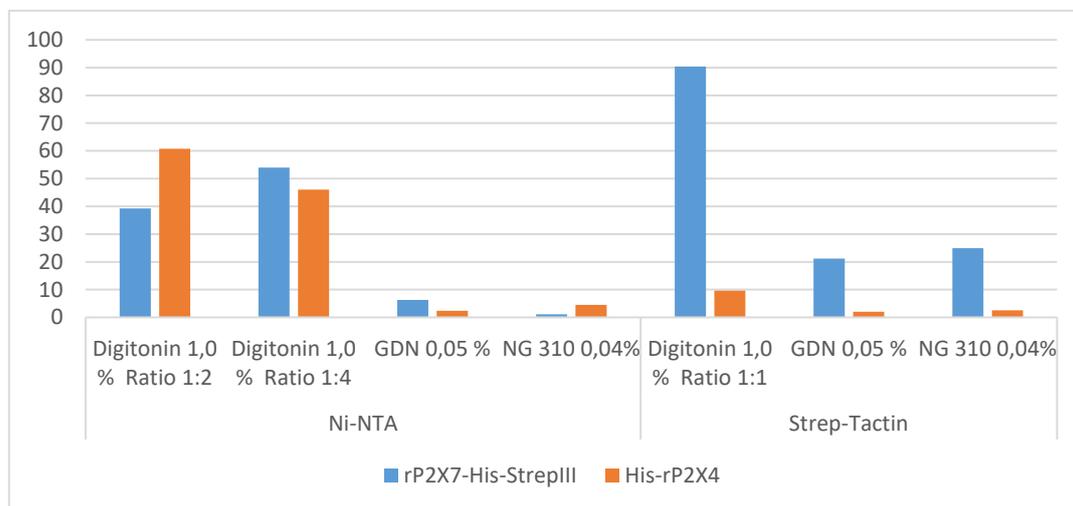


Abb. 23 Quantitativer Vergleich der Detergenzien

Angegeben ist die prozentuale Ausbeute an Rezeptoren je nach eingesetztem Detergenz. Die ermittelten Werte der über Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigten Proteine mit GDN (0,05 % m/v) und NG 310 (0,04 % m/v) beziehen sich auf den Maximalwert von Digitonin (1,0 % m/v) mit einer Ratio von 1:2. Digitonin 1,0 % mit der Ratio 1:4 wird als eigener Referenzwert gesehen. Die über Strep-Tactin Chromatographie parallel mit GDN (0,05 % m/v) und NG 310 (0,04 % m/v) aufgereinigten Proteine werden auf den Maximalwert von Digitonin (1,0 % m/v) mit einer Ratio von 1:1 bezogen. Für alle aufgeführten Werte wurden ausschließlich die mit DTT behandelten Proben einbezogen. Nachdem die Werte der eluierten Proteine auf den jeweiligen Referenzwert bezogen wurde, wurde zusätzlich der prozentuale Anteil, zwischen den rP2X4- und rP2X7-Untereinheiten mit einkalkuliert, sodass im Balkendiagramm sowohl die Ausbeute der cRNA-Mischverhältnisse als auch der verschiedenen Detergenzien direkt miteinander verglichen werden können. Das Diagramm wurden mittels BioRad ImageLab und Microsoft Excel erstellt.

4.3 Interaktion von P2X7 und weiteren P2X-Isoformen

Das Heteromerisierungsverhalten des P2X7-Rezeptors mit weiteren P2X-Isoformen wurde durch Koexpression in *X. laevis*-Oozyten bereits von früheren Doktoranden unserer Arbeitsgruppe untersucht. So konnten neben dem P2X4-Rezeptor, der P2X1, P2X2- und der P2X6-Rezeptor als weitere Interaktionspartner des P2X7-Rezeptors identifiziert werden (s. Dissertationen von Michaela Stolz und Thomas Eisele). Da eine Interaktion mit weiteren rP2X-Isoformem jedoch nicht ausgeschlossen ist, habe ich die Möglichkeiten der Heteromerisierung von P2X7-Untereinheiten mit allen Familienmitgliedern untersucht.

Dazu habe ich die P2X7-Untereinheiten mit den P2X1 bis P2X6-Untereinheiten sowohl von Menschen als auch von Ratte in *X. laevis*-Oozyten koexprimiert und anschließend über die Ni-NTA- und Strep-Tactin-Chromatographie mit dem wiederholt beschriebenen Köder/beute-System aufgereinigt. Alle P2X-Untereinheiten trugen wieder einen His-Tag und die P2X7-Untereinheit zusätzlich einen C-terminalen StrepII- oder StrepIII-Tag, zum Interaktionsnachweise über die Strep-Tactin-Aufreinigung. Wegen der großen Probenzahl war es erforderlich jeweils zwei SDS-PAGE-Gele anzufertigen, eines für alle Strep-Tactin-Proben, das andere für alle Ni-NTA-Proben. Zur Kontrolle wurden zwei der sechs möglichen Interaktionspartner sowie der P2X7 allein exprimiert und aufgereinigt.

In den von mir durchgeführten Experimenten wurde mehrfach entweder der StrepII- oder StrepIII-Tag eingesetzt. Der Unterschied zwischen den beiden Streptavidin-Derivaten ist, dass der StrepII-Tag aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK) besteht, während der StrepIII-Tag, auch genannt Twin-Strep-Tag, das Motiv zweimal verbunden über den Linker GGGSGGGSGGSA enthält. Beide Derivate haben Bindungsaffinitäten zu Strep-Tactin in nM-zu-pM-Bereich. Die höhere Bindungsaffinität zu Strep-Tactin besitzt jedoch der StrepIII-Tag, da die Bindungskapazität des Strep-Tactins besser genutzt wird. Ich habe mehrere Experimente zum Vergleich der Tags (Daten nicht gezeigt) durchgeführt, die bestätigen, dass der StrepIII-Tag eine bessere Isolierung der Proteine bewirkt. Da die vorherigen Doktoranden die P2X7-Konstrukte überwiegend mit dem StrepII-Tag erstellt hatten, wurden diese zu Beginn der Arbeit

eingesetzt. Die wichtigsten P2X7-Konstrukte habe ich mit dem StrepIII-Tag neu erstellt und auch die neuen Konstrukte trugen alle den StrepIII-Tag.

4.3.1 Interaktionsverhalten von rP2X7- und rP2X-Isoformen

Um die Heteroassemblierung von rP2X7-His-StrepIII mit den weiteren rP2X-Rezeptoren zu untersuchen, wurden die *X. laevis*-Oozyten zusätzlich zur Fluoreszenzmarkierung mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Die Gesamtexpression der Proteine ist in derselben Anordnung wie die Plasmamembranexpression dargestellt. Demzufolge sind die über Strep-Tactin-Chromatographie aufgereinigten Proteinen in der unteren Bildhälfte analog zu den über Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigten Proteinen abgebildet.

Die Reihenfolge der His-rP2X1/rP2X7-His-StrepIII-koexprimierenden Proben und der rP2X7-His-StrepIII allein exprimierten Proben wurden in den Abbildungen 24 und 25 versehentlich vertauscht: somit entsprechen die Spuren 7 und 8 den Spuren 5 und 6. Die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie diente dem Nachweis der Expression beider Proteine.

Bei jeder Koexpression sind die zu erwartenden Banden der koexprimierten Untereinheiten mit der entsprechenden Masse nach Ni-NTA Aufreinigung detektierbar (s. Tab. 12; Abb. 24 A u. 25 A). Die rP2X7-His-StrepIII-Untereinheit migriert bei einer Masse von 88 kDa und kann, aufgrund der ihrer größeren Masse entsprechenden Laufhöhe, von allen weiteren rP2X-Untereinheiten unterschieden werden (Abb. 24 A, Spuren 5, 6; Abb. 24 B, Spuren 7, 8). Die rP2X-Untereinheiten besitzen nach der N-Glykosylierung eine Masse zwischen ca. 52 und 62 kDa (s. Tab. 12). Die Differenz der Masse des jeweiligen rP2X-Isoforms zu dem rP2X7 ermöglicht die direkte Zuordnung der detektierten Untereinheiten, auch wenn es wie bei der His-rP2X2-Untereinheit teilweise aufgrund der breiten Proteinbande, welche vermutlich auf die Komplex-Glykosylierung des rP2X2-Rezeptors zurückzuführen ist, zur Überdeckung der rP2X7-Untereinheit kommen kann (Abb. 47 A, Spuren 9,10). Die breite Proteinbande wird nur in der Plasmamembran detektiert und kann somit über die Fluoreszenzstärke reguliert werden.

Die rP2X7-His-StrepIII-Untereinheit ist nach separater Expression und Aufreinigung mittels der Strep-Tactin-Chromatographie deutlich besser detektierbar als

beispielsweise nach der Koexpression mit der stark exprimierenden rP2X1-Untereinheit (vgl. Abb. 24 B, Spuren 5, 6 mit 7, 8). Bei der Koexpression wird die Expression der jeweiligen Rezeptoren verringert, da einerseits die cRNA beider Rezeptoren koinjiziert werden und demzufolge eine Verdünnung stattfindet. Andererseits scheint es bei der Translation der Aminosäuren zur Konkurrenz um die Ribosomen kommen, dadurch wird insgesamt weniger Protein des jeweiligen Rezeptors exprimiert.

Die zusätzlich zum rP2X7-His-StrepIII sichtbaren rP2X-Isoformen nach der Strep-Tactin-Aufreinigung können nur durch die Koisolierung zurückgeführt werden. Sie zeigen dementsprechend deutlich schwächere Signale als bei alleiniger Ni-NTA-Aufreinigung (s. Abb. 24 A, Spuren 7-18). Dennoch ist anhand der spezifischen Bandenmuster eine klare Zuordnung der exprimierten Untereinheiten möglich.

Die exprimierten His-rP2X1- und rP2X7-His-StrepIII-Untereinheiten lassen sich aufgrund der deutlichen Massenunterschiede gut unterscheiden. Das Vorhandensein der Banden in der Plasmamembran- und Gesamtexpression mit einer Masse von etwa 58 kDa bestätigt eine mögliche rP2X1/rP2X7-Interaktion (Abb. 24 B u. 25 B, Spur 5, 6).

Auch nach His-rP2X2- und rP2X7-His-StrepII-Koexpression konnte eine zusätzliche Bande unmittelbar unterhalb der Bande der rP2X7-His-StrepII-Untereinheit detektiert werden (Abb. 24 B u. 25 B, Spuren 9 und 10). Die koisolierte Proteinbande entspricht der Masse der koexprimierten His-rP2X2-Untereinheit (s. Tab. 12), sodass auch hier eine mögliche Interaktion der beiden Untereinheiten vorliegt.

Auch His-rP2X3 und His-rP2X4 sind korrespondierend zu ihrer jeweils erwarteten Masse als koisolierte Proteine deutlich sichtbar. Sowohl die Plasmamembran- als auch die Gesamtexpression zeigen die mittel Strep-Tactin-Aufreinigung koisolierten His-rP2X3- bzw. His-rP2X4-Banden (Abb. 24 B u. 25 B, Spuren 11- 14). Sie migrieren in Höhe der zu erwartenden Massen von 57 kDa für den His-rP2X3 und 62 kDa für den His-rP2X4 (s. Tab. 12).

Die Gesamtexpression ermöglicht die Überprüfung der Interaktion zwischen der rP2X5-Untereinheit und der rP2X7-His-StrepII-Untereinheit. Abb. 24 A zeigt His-rP2X5-Untereinheit nach Ni-NTA-Aufreinigung als deutlich erkennbare ~ 62 kDa

Bande (s. Abb. 24 A, Spuren 15, 16). Durch Strep-Tactin-Aufreinigung ist die identische Bande sichtbar, deutet somit auf die Interaktion zwischen His-rP2X5 und rP2X7-His-StrepIII hin (s. Abb. 24 B, Spuren 15, 16). In der Plasmamembran ist die Interaktion zwischen den rP2X5- und rP2X7-Untereinheiten nicht nachweisbar, da keine Differenzierung der Banden möglich ist. Höchstwahrscheinlich sind nicht alle Oozyten intakt gewesen, sodass es zu einer Überstrahlung der Signale gekommen ist (Abb. 25 A, Spuren 15, 16).

Die rP2X6-Untereinheit stellt bekanntermaßen eine Ausnahme unter den P2X-Rezeptoren dar, da er bei alleiniger Expression keinen funktionellen Rezeptor ausbildet. Sie ist nicht in der Lage zum homomeren Trimer zu assemblieren und ist somit auch kein eigenständiger Rezeptor (Aschrafi et al. 2004). In der Plasmamembran ist nach der Ni-NTA- und Strep-Tactin-Aufreinigung eine Bande bei ~ 52 kDa, welche der koiolierten His-rP2X6-Untereinheit entspricht, detektierbar (Abb. 24 A und B, Spuren 17 und 18). Das Vorhandensein der rP2X6-Untereinheit ist auf eine Interaktion mit der rP2X7-His-StrepIII-Untereinheit zurückzuführen. Die koiolierte His-rP2X6-Untereinheit kann in der Gesamtexpression deutlich stärker detektiert werden als in der Plasmamembran (vgl. Abb. 24 B und 25 B, Spuren 17 und 18).

Insgesamt entsprechen die detektierten Signale der koiolierten rP2X-Isoformen den mittels Ni-NTA-aufgereinigten rP2X-Banden und bestätigen so die mögliche Interaktion der rP2X7-Untereinheit mit den weiteren rP2X-Untereinheiten.

				rP2X7-His-StrepII		
His-rP2X1	58 X1	116 X1-X1	174 X1-X1-X1	146 X1-X7	204 X1-X1-X7	234 X1-X7-X7
His-rP2X2	62 X2	124 X2-X2	186 X2-X2-X2	150 X2-X7	212 X2-X2-X7	238 X2-X7-X7
His-rP2X3	57 X3	114 X3-X3	171 X3-X3-X3	145 X3-X7	202 X3-X3-X7	233 X3-X7-X7
His-rP2X4	62 X4	124 X4-X4	186 X4-X4-X4	150 X4-X7	212 X4-X4-X7	238 X4-X7-X7
His-rP2X5	61 X5	122 X5-X5	183 X5-X5-X5	149 X5-X7	210 X5-X5-X7	237 X5-X7-X7
His-rP2X6	52 X6	104 X6-X6	156 X6-X6-X6	140 X6-X7	192 X6-X6-X7	228 X6-X7-X7

rP2X7-His-StrepIII	88	176	264			
	X7	X7- X7	X7- X7- X7			

Tab. 12 Die errechneten molekularen Massen der zu homo- und heteromeren Dimeren und Trimeren interagierenden P2X7- und den weiteren P2X-Untereinheiten. Zur Berechnung der Masse wurde die Anzahl der jeweiligen N-Glykosylierungstellen einbezogen.

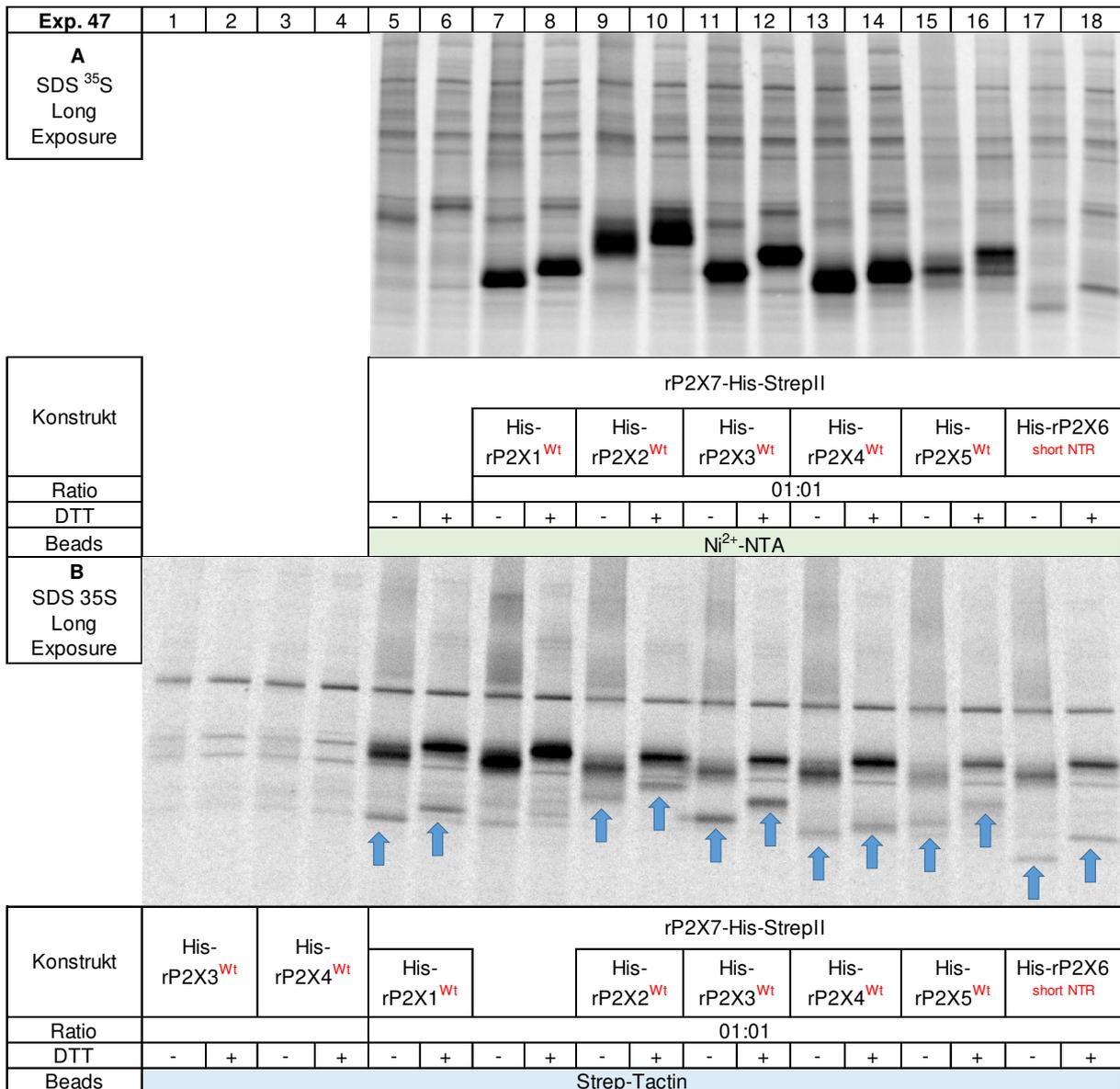


Abb. 24 SDS-PAGE-Analyse der Interaktion von rP2X7-His-StrepII mit anderen His-rP2X-Isoformen (Exp. 47)

Die cRNAs der angegebenen His-rP2X7-StrepII- und His-rP2X-Rezeptoren wurden im Mischverhältnis 1:1 koinjiziert. Zur Kontrolle wurden zwei der sechs eventuell interagierenden Rezeptoren ebenso allein exprimiert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Die Laufhöhen der koinjizierten P2X-Untereinheiten sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. A und B Gesamtexpression (³⁵S]-Methionin-Scan).

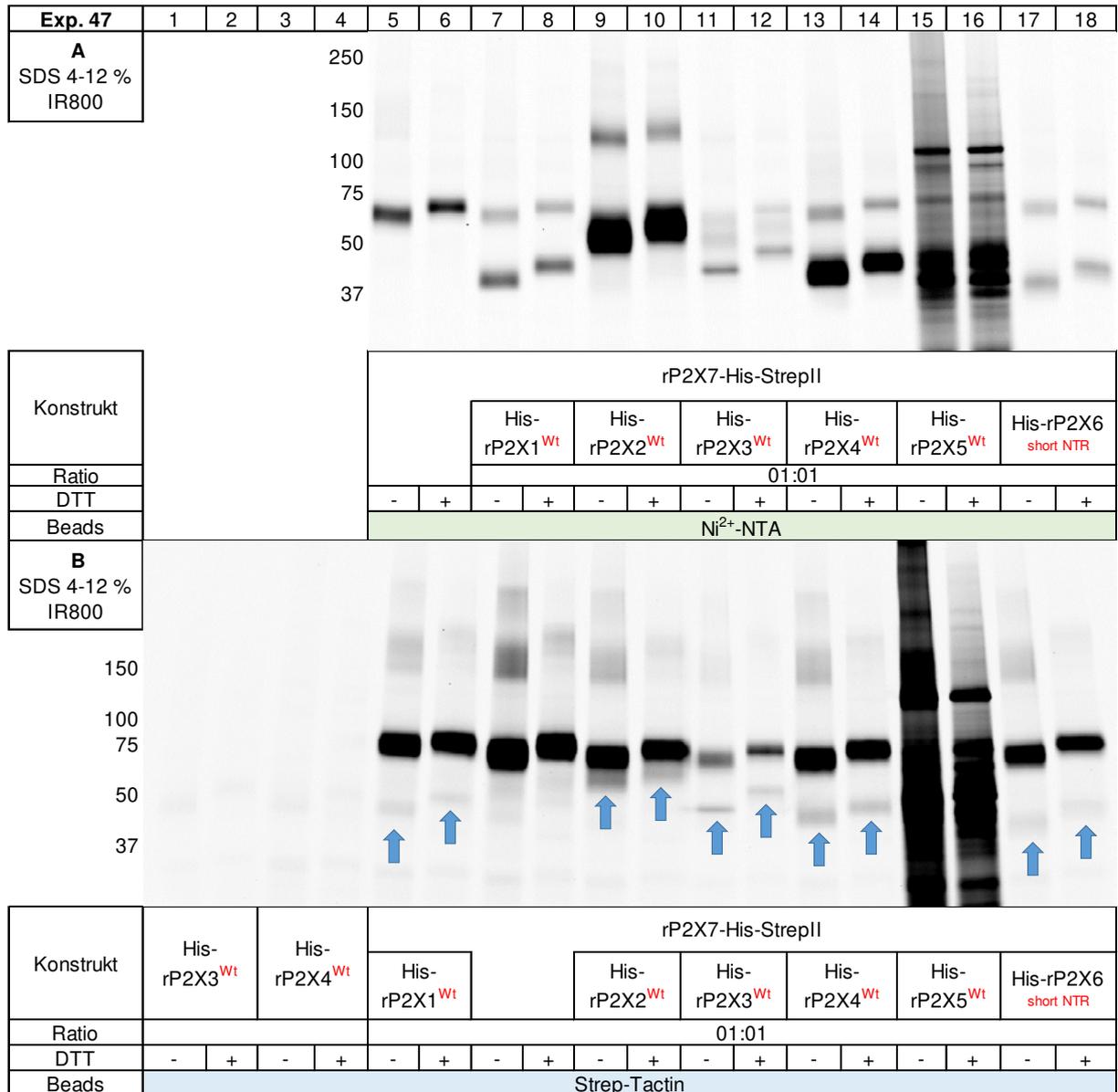


Abb. 25 SDS-PAGE-Analyse der Interaktion von rP2X7-His-StrepIII mit anderen His-rP2X-Isoformen in der Plasmamembran (Exp. 47)

Die cRNAs der angegebenen His-rP2X7-StrepIII- und His-rP2X-Isoformen wurden im Mischverhältnis 1:1 koinjiziert. Zur Kontrolle wurden zwei der sechs Isoformen ebenso allein exprimiert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Die koinjizierten P2X-Untereinheiten sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. **A u. B** Plasmamembranexpression (IR800-NHS-Fluoreszenz-Scan).

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob eine Heterotrimerisierung der Untereinheiten stattfindet oder es nur zu Wechselwirkungen zwischen dem rP2X7 und den weiteren rP2X-Isoformen kommt. Um das herauszufinden, ist es erforderlich die BN-PAGE-Analyse durchzuführen. Anhand der nativen und denaturierten Proben erkennt man,

ob die Untereinheiten der verschiedenen P2X-Isoformern zu heteromeren Trimeren assemblieren können.

Abb. 26 zeigt die BN-PAGE-Auftrennung der Plasmamembran-gebundenen und der ³⁵S-Gesamtexpression der P2X-Proteine aus dem Exp. 47 in derselben Reihenfolge wie Abb. 25 A. Zudem sind auch die Kontrollgruppen der allein exprimierten His-rP2X3, His-rP2X4-, rP2X7-His-StrepIII-Rezeptoren dargestellt. Erwartungsgemäß sind His-rP2X3 und His-rP2X4 nach der Strep-Tactin-Aufreinigung nicht detektierbar. Der rP2X7-His-StrepIII wird in nativer Form isoliert und anschließend nativ und partiell denaturiert über das BN-PAGE-Gel aufgetrennt. Das Homotrimer, Homodimer und Monomer des rP2X7 sind nach partieller Denaturierung bei alleiniger Expression und bei Koexpression in Höhe der entsprechenden Masse deutlich erkennbar (s. Abb. 26 A und B, Spur 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 u. Tab. 12).

Leider sind in diesem Experiment die nativen Proteinbanden der koexprimierten Untereinheiten weder in der Plasmamembran noch in der Gesamtexpression gut detektierbar. Die partielle Denaturierung der koexprimierten Untereinheiten resultiert in einem Bandenmuster, das dem Bandenmuster des dissoziierten rP2X7 entspricht. Vergleicht man die Masse des rP2X7-Dimers mit den Massen der möglichen heteromeren Dimere, erkennt man, dass die Massen kaum voneinander abweichen (s. Tab. 12). Demzufolge könnte die Bande des heteromeren Dimers von der rP2X7-Dimerbande verdeckt worden sein. Bei allen koexprimierten Gruppen ist jedoch nach der partiellen Denaturierung unterhalb der P2X7-Monomerbande eine weitere Bande vorhanden, die der Masse der koexprimierten rP2X-Isoform entspricht (s. Abb. 26). Die Strep-Tactin-Aufreinigung ermöglicht nur die Isolierung des rP2X7-His-StrepII, sodass das Erscheinen der monomeren rP2X-Isoformen auf die heteromere Assemblierung mit dem rP2X7-His-StrepII zurückzuführen ist.

Die Massen der heteromeren Trimere liegen zwischen dem homomeren P2X7-Dimer bzw. heteromeren Dimeren und dem homomeren rP2X7-Trimer. Der theoretische prozentuale Anteil der heteromeren Trimere mit der Stöchiometrie 1:2 oder 2:1 liegt jeweils bei 25 %. Besteht das heteromere Trimer beispielsweise aus zwei His-rP2X1-Untereinheiten und einer rP2X7-His-StrepII-Untereinheit, so kann das Protein nur über den StrepII-Tag einer rP2X7-Untereinheit isoliert werden. Der homomere rP2X7-Trimer trägt dahingegen in jeder Untereinheit einen StrepII-Tag, sodass man von einer

höheren Ausbeute des rP2X7-Trimeres nach der Strep-Tactin-Aufreinigung ausgehen kann. Demzufolge ist es möglich, dass die heteromeren Trimere vorliegen, aber in zu geringem Maße mittels Strep-Tactin aufgereinigt werden und somit nicht detektiert werden konnten.

Es sind keine stabilen Heteromere detektierbar, jedoch können die koiolierten hP2X-Isoformen der Masse entsprechend zugeordnet werden. Eine Koisolation mittels der Strep-Aufreinigung ist nur möglich, wenn eine Interaktion zwischen den koexprimierten Untereinheiten vorliegt. Insgesamt deuten die SDS-PAGE- und BN-PAGE-Analyse darauf hin, dass der rP2X7-His-StrepII mit allen anderen rP2X1- rP2X6-Isoformen möglicherweise zu Heteromeren assembliert oder zumindest eine Interaktion zwischen den Untereinheiten vorliegt.

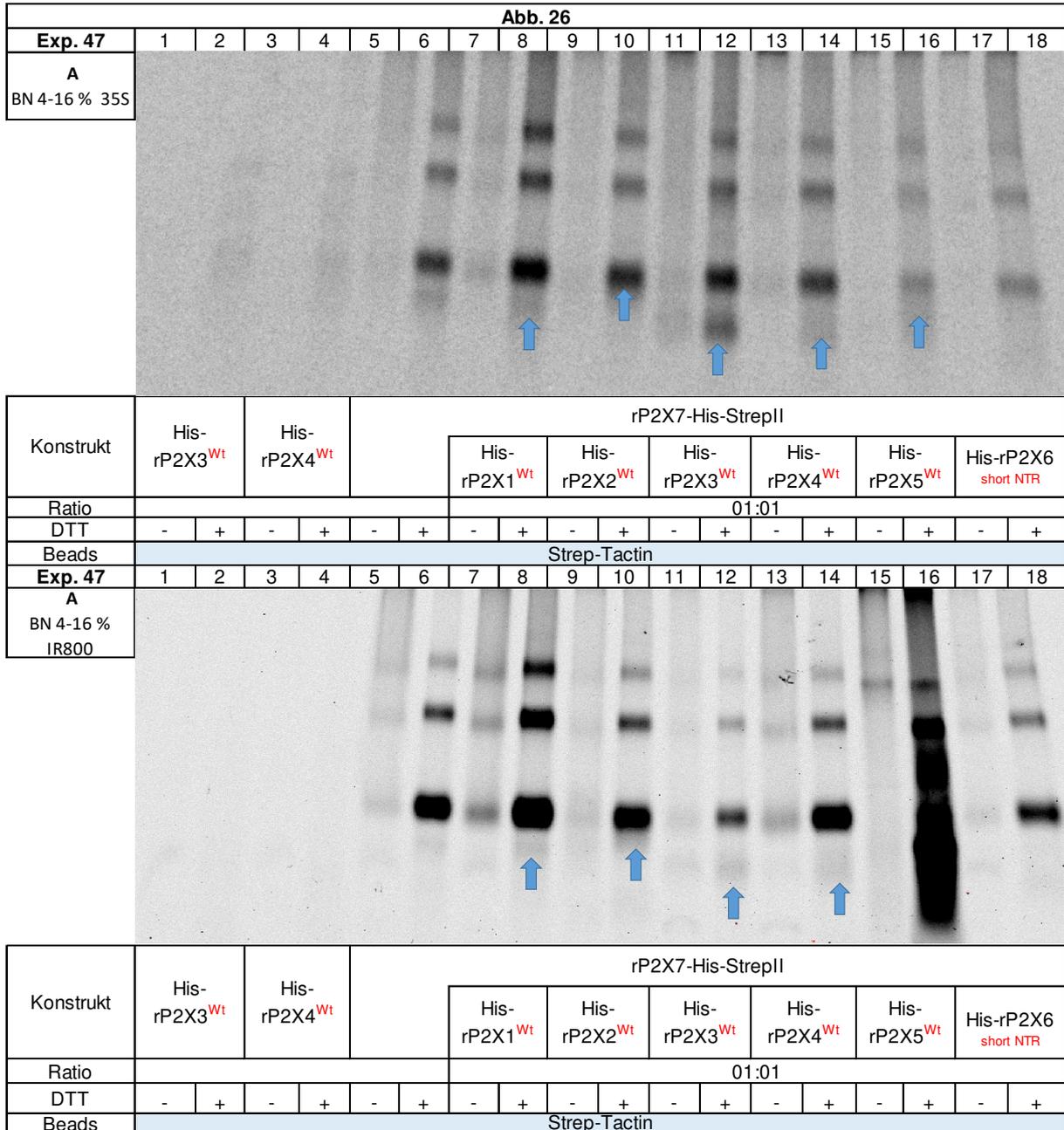


Abb. 26 BN-PAGE-Analyse der Interaktion von rP2X7-His-StrepIII und His-rP2X-Isoformen in der Plasmamembran (Exp. 47)

Der rP2X7-His-StrepII wurde mit den His-rP2X-Isoformen in einem cRNA-Verhältnis von 1:1 in *X. laevis*-Oozyten koexprimiert. Zur Kontrolle wurden die Rezeptoren ebenso einzeln exprimiert. Die Markierung, Extraktion und Elution der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Die koiolierten His-rP2X-Untereinheiten sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet A und B. Die Denaturierung und Auftrennung entspricht den unter Abb. 20 beschriebenen Bedingungen **A** Gesamtexpression [³⁵S]-Methionin-Scan **B** Plasmamembranexpression IR800-NHS Fluoreszenz-Scan.

4.3.2 Interaktionsverhalten von hP2X7- und hP2X-Isoformen

Zusätzlich wurde der oben beschriebene Versuchsaufbau auch mit humanen P2X-Isoformen durchgeführt. Demzufolge wurde der hP2X7-His-StrepIII mit allen hP2X-His-Rezeptor in *X. laevis*-Oozyten nach dem „Köder und Beute“ Schema analysiert.

Um nachzuweisen, dass es über den His-Tag allein zu keiner Aufreinigung von hP2X-Isoformen kommt, wurden His-hP2X3 und His-hP2X4 separat exprimiert und sowohl über Ni-NTA- als auch Strep-Tactin aufgereinigt. Über Strep-Tactin konnte weder die 57 kDa His-hP2X3-Bande noch die 62 kDa His-hP2X4-Bande detektiert werden (Abb. 27 B u. 28 B Spuren 1-4, Tab. 13). Im Vergleich dazu, sind die über Ni-NTA aufgereinigten Proteinen deutlich mit der zu erwartenden Masse sichtbar (Abb. 27 A u. 28 A, Spuren 1-4). Das Ergebnis belegt, dass unspezifische Strep-Tactin-Aufreinigung der P2X-Untereinheiten ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren ermöglicht der direkte Vergleich zwischen den Ni-NTA und Strep-Tactin aufgereinigten Proteinen die Zuordnung der koinizierten Untereinheiten und bestätigt somit die mögliche Interaktion der jeweiligen hP2X-Isoform mit hP2X7 (Abb. 27 u. 28).

Der hP2X7 wird nach der Koinjektion der cRNAs in einem Mischungsverhältnis von 1:1 deutlich schwächer exprimiert als die restlichen hP2X-Rezeptoren. Alle koexprimierten His-hP2X-Untereinheiten, mit Ausnahme von His-hP2X6, sind nach der Ni-NTA-Aufreinigung sehr gut detektierbar (Abb. 27 A, Spuren 7-18). Dagegen die separate Expression der hP2X7-His-StrepIII-Untereinheit resultiert in sehr schwachen Signalen (Abb. 27 A, Spuren 5, 6). Jedoch war die Signalintensität der hP2X7-His-StrepIII-Untereinheit bei Strep-Tactin-Aufreinigung in diesem Experiment deutlicher als bei Ni-NTA-Aufreinigung, ohne dass die Gründe dafür klar sind (vgl. Abb. 27 A und B, Spuren 5, 6).

Die koinizierten Untereinheiten migrieren ihrer Masse entsprechend auf dem SDS-PAGE-Gel (Tab. 13, Abb. 27). So ist die 58 kDa His-hP2X1-Bande unterhalb der 87 kDa hP2X7-His-StrepIII-Bande in der Plasmamembran- und in der Gesamtexpression detektierbar (Abb. 27 B, Spuren 7 und 8). Die Masse der His-hP2X2-GFP-Untereinheit nimmt aufgrund der GFP-Fusionierung um ca. 27 kDa auf ~ 87 kDa zu. Das Laufverhalten wird durch die Komplexglykosylierung beeinflusst, sodass der His-

hP2X2-GFP trotz gleicher Masse leicht oberhalb der hP2X7-His-StrepIII-Untereinheit migriert (Abb. 27 B, Spuren 9 und 10).

Die koisolierte His-hP2X3-Untereinheit ist mit 57 kDa wiederum deutlich kleiner als die hP2X7-His-StrepIII-Untereinheit, sodass ein eindeutiges Bandenmuster in der Plasmamembran- und Gesamtexpression erkennbar ist (Abb. 27 B u. 28 B, Spuren 11 und 12). Auch die koisolierten His-hP2X4- und His-hP2X5-Banden von je 62 kDa und 56 kDa lassen sich gut von der hP2X7-His-StrepIII-Untereinheit, sind in der Plasmamembran- und Gesamtexpression deutlich detektierbar (Tab. 13; Abb. 27 B u. 28 B, Spuren 13-16).

Wie die rP2X6-Untereinheit, ist auch die hP2X6-Untereinheit nicht in der Lage zum funktionellen Homotrimer zu assemblieren. Eine Aussage über die mögliche Interaktion von hP2X7-His-StrepIII und His-hP2X6 in der Plasmamembran ist kaum möglich, da die Expression von beiden Untereinheiten insgesamt sehr gering ist (Abb. 28 A, Spuren 17, 18). Falls beide Untereinheiten gut assemblieren sollten, könnte es zu einer Detektion des Heteromers an der Plasmamembran kommen. Es ist möglich, dass einige Oozyten nicht mehr intakt waren und deswegen weniger Proteinexpression vorhanden ist. Die Gesamtexpression ist ebenfalls schwach, reicht aber aus, um die koisolierte His-hP2X6-Bande mit der entsprechenden Masse detektieren zu können. Die Koisolation nach der Strep-Tactin-Aufreinigung lässt auf eine mögliche intrazelluläre hP2X6/hP2X7-Interaktion zurückzuführen (Abb. 27 B, Spur 17, 18).

Zusammenfassend deutet die SDS-PAGE-Analyse darauf hin, dass hP2X7-His-StrepIII möglicherweise mit allen His-hP2X-Isoformen, bis auf His-hP2X6, in der Plasmamembran zu Heteromeren assembliert, sodass eine Koisolation möglich ist. Die hP2X6/hP2X7-Interaktion konnte nur in der Gesamtexpression gezeigt werden. Ob eine Heterotrimerisierung tatsächlich erfolgt, wurde mittels BN-PAGE-Analyse geprüft.

	Homotrimere			rP2X7-His-StrepIII- Heterotrimere		
	His-hP2X1 ^{Wt}	58 X1	116 X1-X1	174 X1-X1-X1	146 X1-X7	204 X1-X1-X7
His-hP2X2-GFP	87 X2	174 X2- X2	261 X2-X2-X2	174 X2-X7	261 X2-X2-X7	261 X2-X7-X7
His-hP2X3 ^{Wt}	60 X3	120 X3-X3	180 X3-X3-X3	147 X3-X7	207 X3-X3-X7	234 X3-X7-X7
His-hP2X4 ^{Wt}	62 X4	124 X4- X4	186 X4- X4-X4	150 X4-X7	212 X4-X4-X7	238 X4-X7-X7
His-hP2X5 ^{Wt}	56 X5	122 X5- X5	178 X5- X5- X5	149 X5-X7	210 X5-X5-X7	230 X5-X7-X7
His-hP2X6 ^{Wt}	59 X6	118 X6- X6	177 X6- X6- X6	146 X6-X7	205 X6-X6-X7	231 X6-X7-X7
hP2X7-His-StrepIII	87 X7	174 X7- X7	261 X7- X7- X7			

Tab. 13 Die errechneten molekularen Massen der homomeren und heteromeren rP2X7- und rP2X-Isoformen. Zur Berechnung der Masse wurde die Anzahl der jeweiligen N-Glykosylierungstellen einbezogen.

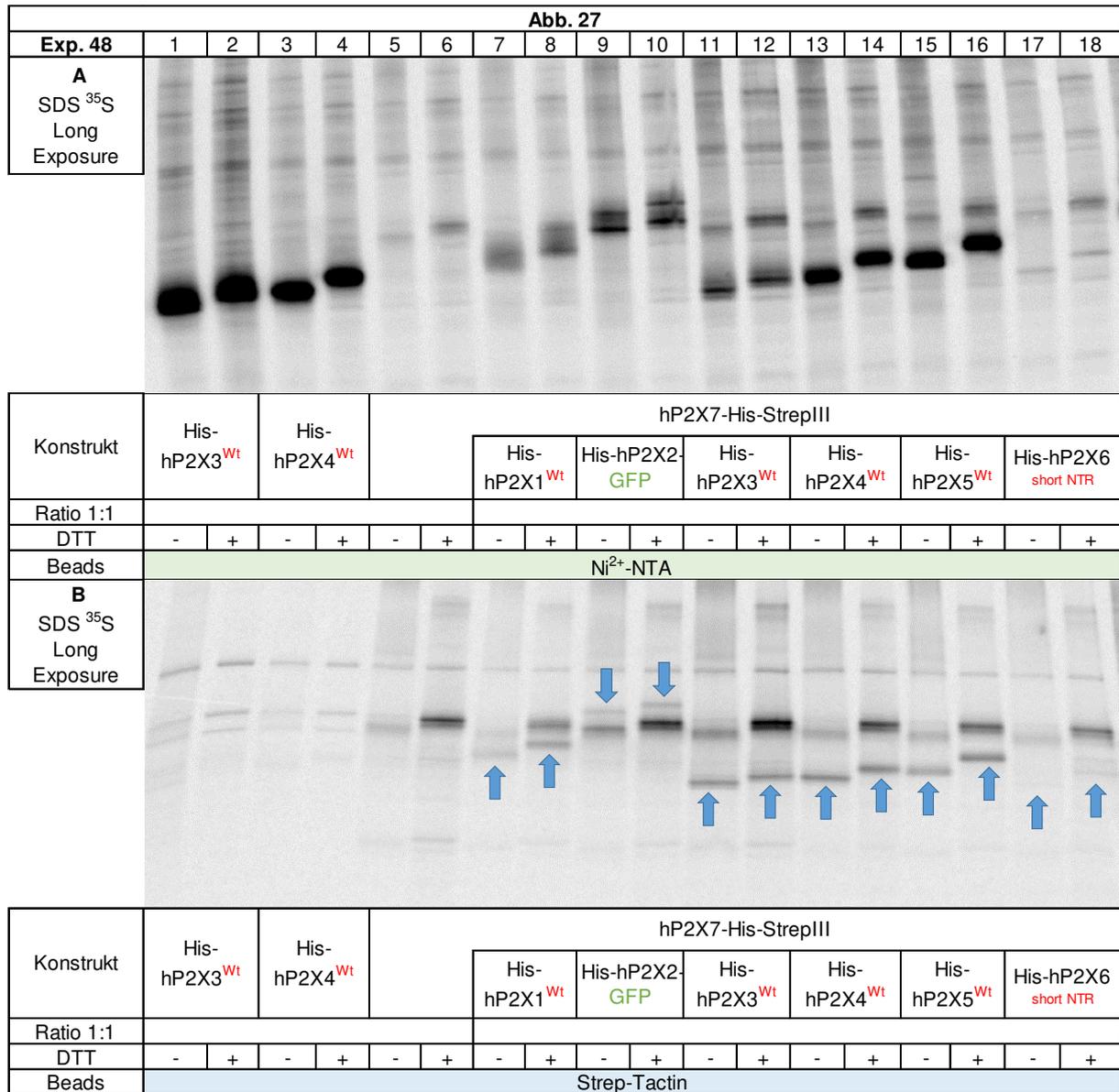


Abb. 27 SDS-PAGE-Analyse der Interaktion von hP2X7-His-StrepIII und His-hP2X-Isoformen (Exp. 48)

Die cRNAs der angegebenen His-hP2X7-StrepIII- und His-hP2X-Rezeptoren wurden im Mischverhältnis 1:1 koinjiziert. Zur Kontrolle wurden zwei der sechs eventuell interagierenden Rezeptoren allein exprimiert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Die Laufhöhen der koinizierten P2X-Untereinheiten sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. **A** und **B** Gesamtexpression (³⁵S]-Methionin-Scan).

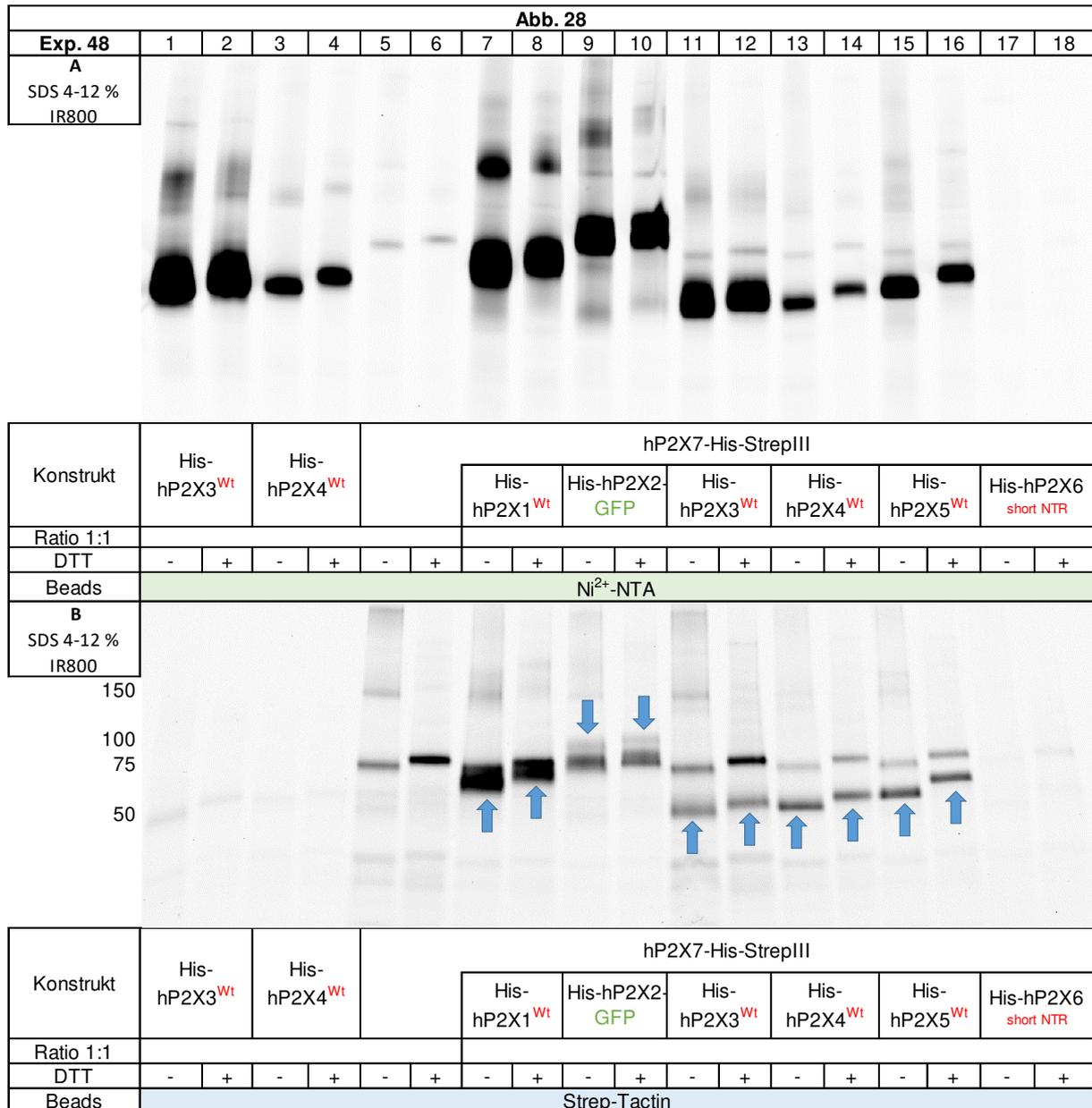


Abb. 28 SDS-PAGE-Analyse der Interaktion von hP2X7-His-StrepIII mit His-hP2X-Isoformen in der Plasmamembran (Exp. 48)

Die cRNAs der angegebenen His-hP2X7-StrepIII- und His-hP2X-Rezeptoren wurden im Mischverhältnis 1:1 koinjiziert. Zur Kontrolle wurden zwei der sechs eventuell interagierenden Rezeptoren ebenso allein exprimiert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Die Laufhöhen der koisolierten P2X-Untereinheiten sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. Am linken Rand sind die Massen der All-Blue-Marker Proteine angezeigt **A** und **B** Plasmamembranexpression

Die SDS-PAGE-Analyse der koexprimierten hP2X7 mit den hP2X-Isoformen zeigt eine Interaktion des hP2X7 mit allen weiteren hP2X-Isoformen hin. Um zu überprüfen, ob es zur Heteromerisierung der Untereinheiten kommt, wurden die nativen und partiell denaturierten Proteine über die BN-PAGE aufgetrennt. Für die heteromeren Dimere

und Trimere ergeben sich die in Tab. 12 aufgeführten Massen, welche durch das Laufverhalten etwas von den errechneten Massen abweichen können (s. Tab. 13).

Betrachtet man die Spuren der nativen Proben, erkennt man, dass diese sich leider noch größtenteils in den „Taschen“ des Sammelgels befinden. Der Grund für das schlechte Laufverhalten bzw. die Aggregate in diesem Experiment ist unklar. Dennoch ist in der Plasmamembranexpression die homomere 261 kDa hP2X7-Trimerbande bei alleiniger Expression und nach Koinjektion mit weiteren hP2X-Isoformen deutlich erkennbar.

Interessanterweise erkennt man bei der Koexpression mit His-hP2X2-GFP zwei weitere Banden, die höher migrieren als die homomere hP2X7-Trimerbande (Abb. 29, Spur 9). Die errechnete Masse der Heterotrimeren, liegt bei 261 kDa und entspricht somit der Masse des hP2X7-Homotrimers (s. Tab. 13). Wie bereits im SDS-PAGE-Gel zu sehen ist, ist das Laufverhalten des Proteins durch das GFP-Protein beeinflussbar. Trotz gleicher Masse, migriert die His-hP2X2-GFP-Untereinheit mit scheinbar höherer Masse als die hP2X7-His-StrepIII-Untereinheit (Abb. 27 u. 28, Spuren 9, 10). Erwartungsgemäß laufen die heteromeren hP2X2/hP2X7-Trimere mit höherer Masse als das hP2X7-Homotrimers (Abb. 29, Spur 9). Nach der partiellen Denaturierung läuft die korrespondierende hP2X2-Untereinheit leicht oberhalb der hP2X7-Untereinheit.

Für die beiden hP2X4/hP2X7-Heterotrimeren errechnet sich die Masse 212 (X4-X4-X7) und 238 kDa (X4-X7-X7), sodass die Banden gut differenzierbar sind von der hP2X7-Trimerbande. Unter nativen Bedingungen ist leider keine hP2X7-Trimerbande zu erkennen, aber es ist eine Bande erkennbar, die zwischen dem homomeren Dimer und Trimer des hP2X7 migriert (Abb. 29, Spur 13). Diese Bande entspricht der hP2X4/hP2X7-Heterotrimerbande mit einer Masse von 212 kDa (Tab. 12). Nach der partiellen Denaturierung ist hP2X4-Untereinheit unterhalb der hP2X7-Untereinheit detektierbar (Abb. 29, Spur 14).

Die weiteren hP2X-Isoformen besitzen alle eine niedrigere molekulare Masse als der hP2X7. Leider konnte in diesem Experiment unter nativen Bedingungen keine weitere Heterotrimer-Bande detektiert werden. Nach partieller Denaturierung ist jedoch die entsprechende hP2X-Untereinheit bei allen koexprimierten Untereinheiten, mit Ausnahme von hP2X6, unterhalb der hP2X7-Untereinheit erkennbar (s. Tab. 12).

Die BN-PAGE-Analyse der koexprimierten hP2X7 und hP2X-Isoformen zeigt keine stabilen Heteromere. Die Koisolation der koexprimierten hP2X-Isoformen im SDS-PAGE und BN-PAGE spricht dennoch dafür, dass eine Interaktion zwischen dem hP2X7 und den Isoformen hP2X1-hP2X6 vorliegt. Ob die Untereinheiten zum Heteromer assemblieren, welche nicht detektiert werden konnte, oder ob eine andere Art von Wechselwirkung vorliegt, kann jedoch nicht eindeutig gesagt werden.

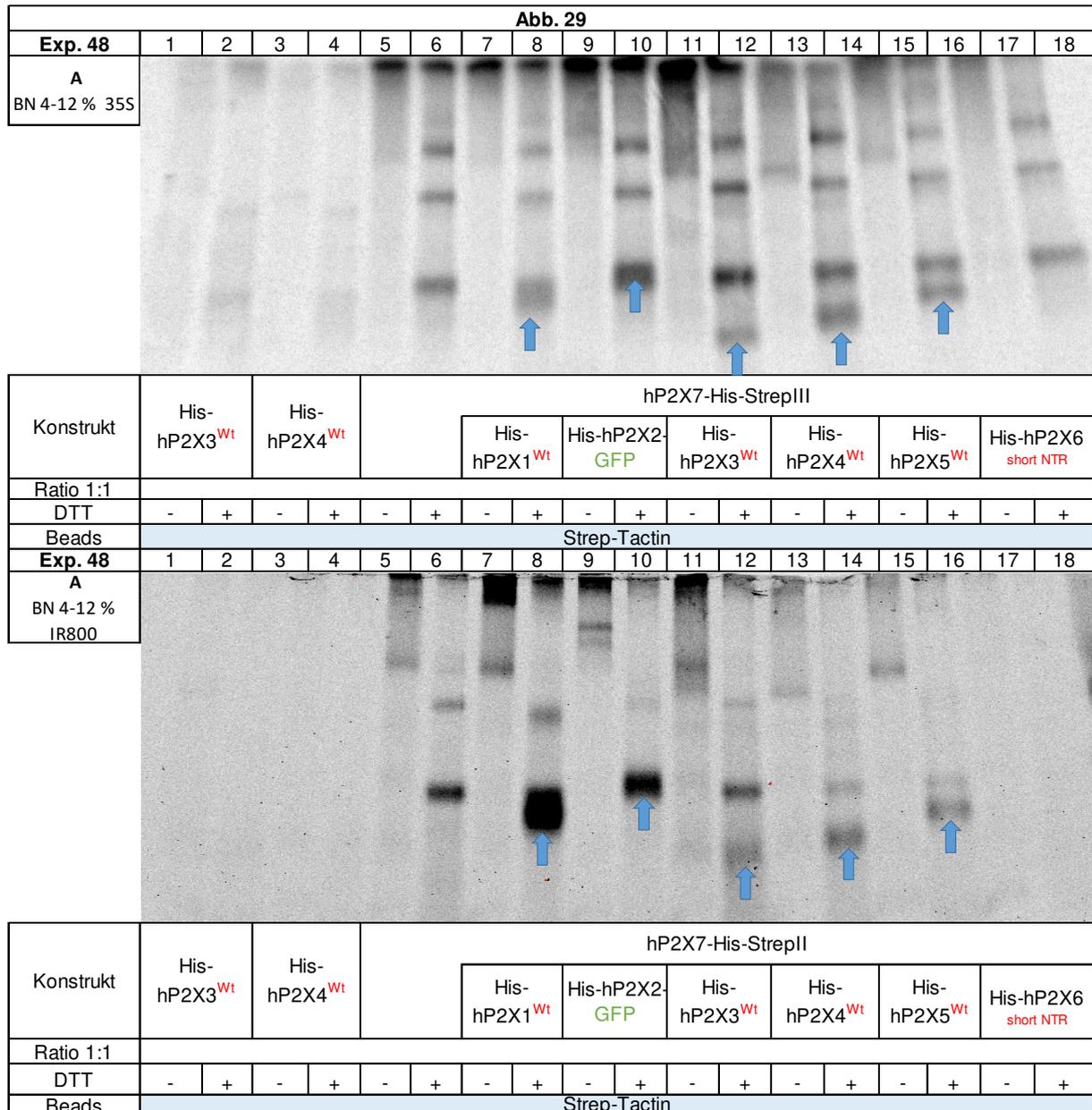


Abb. 29 Analyse der Interaktion von hP2X7-His-StrepIII mit His-hP2X-Isoformen in der Plasmamembran mittels BN-PAGE (Exp. 48)

Der hP2X7-His-StrepIII wurde mit den His-hP2X-Isoformen in einem cRNA-Verhältnis von 1:1 in *X. laevis*-Oozyten koexprimiert. Zur Kontrolle wurden die Rezeptoren ebenso einzeln exprimiert. Die Markierung, Extraktion und Elution der exprimierten Proteine entspricht dem

unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Die koiolierten His-hP2X-Untereinheiten sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet **A** und **B**. Die Denaturierung und Auftrennung entspricht den unter Abb. 20 beschriebenen Bedingungen **A** Gesamtexpression (^{35}S -Methionin-Scan) **B** Plasmamembranexpression (IR800-NHS Fluoreszenz-Scan).

4.4 Interaktion von hP2X4 bzw. hP2X1 mit einem C-terminal trunkierten hP2X7

Zur Identifikation der Proteindomäne, welche zu der Trimerisierung von P2X-Untereinheiten beitragen, wurden Untersuchungen an der hP2X5-Spleißvariante durchgeführt (Duckwitz et al. 2006). Die hP2X5-Spleißvariante kommt als nicht-funktionelle Variante beim Menschen vor, da die Trimerisierung aufgrund der fehlenden TM2 nicht möglich ist. Durch die Insertion der fehlenden Aminosäuren sowie der systematischen Mutagenese konnte gezeigt werden, dass die wichtige Region für die Assemblierung in der äußeren Hälfte der zweiten Transmembranregion liegt. Die TM2 trägt zur räumlichen Einschränkung der Mobilität der Polypeptidkette sowie zur Oligomerisierung durch die korrekte Positionierung spezifischer Erkennungsflächen bei (Duckwitz et al. 2006).

Wegen ihrer stark verbesserten Expression wurden die C-terminal trunkierte hP2X7-Konstrukte hP2X7⁻¹⁻⁴⁰⁸-GFP-His und hP2X7⁻¹⁻⁴³⁶-GFP-His mit dem His-hP2X4-StrepIII bzw. His-hP2X1-StrepIII koexprimiert und die Interaktion nach dem beschriebenen „Köder und Beute“ Prinzip analysiert. Da die Massen der trunkierten hP2X7- und hP2X4-Untereinheiten sehr ähnlich sind, wurde der C-terminal trunkierte hP2X7 zusätzlich mit dem GFP-Protein fusioniert. Dadurch wird zum einen die Differenz der Massen zwischen den interagierenden Untereinheiten größer und zum anderen ist die Detektion der GFP-Fusionsproteine im GFP-Fluoreszenzkanal möglich. So können selektiv die hP2X7-GFP-His-Homotrimere und alle Heterotrimere, die aus mindestens einer oder zwei hP2X7-GFP-His-Untereinheiten bestehen, im GFP-Kanal detektiert werden.

In Abb. 30 sind die Ergebnisse der Ni-NTA aufgereinigten koexprimierten trunkierten hP2X7 mit hP2X1 bzw. hP2X4 gezeigt. Die Assemblierungsstöchiometrie ist in unterschiedlich gefärbten Zylinderformen illustriert. Durch die Ni-NTA-Aufreinigung können alle exprimierten Proteine einschließlich der Heteromere isoliert werden. Die C-terminal trunkierten hP2X7⁻¹⁻⁴⁰⁸ (Abb. 30, Spuren 1, 2, 6) und hP2X7⁻¹⁻⁴³⁶ (Abb. 30, Spuren, 10, 11, 15 und 19) wurden zum direkten Vergleich auch alleine exprimiert und

sind sowohl im IR800- (Abb. 30 A) als auch im GFP-Fluoreszenz-Scan (Abb. 30 B) sowie im [³⁵S]-Methionin-Scan (Abb. 30 C) mit der zu erwartenden Masse detektierbar (s. Tab. 13). Ebenso migrierten das hP2X1-Homotrimer (Abb. 30 A und C, Spuren 3, 4, 12, 13) und das hP2X4-Homotrimer (Abb. 30 A und C, Spuren 7,8, 16, 17) ihrer Masse entsprechend.

Bei Koexpression von His-hP2X1-StrepIII und hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-GFP-His ist eine ca. 240 kDa Bande mit allen drei Markierungen IR800-NHS, GFP und 35S detektierbar (Abb. 30, Spuren 3, 4); sie entspricht dem Heterotrimer mit einer Stöchiometrie von 2:1 (X7:X1) (Tab. 13). Die partielle Denaturierung des Rezeptorkomplexes resultiert in weiteren Proteinbanden, welche der dimeren und monomeren Dissoziationsstufe entsprechen. Durch die partielle Denaturierung mit einer geringen LiDS-Konzentration sind die jeweiligen Monomere, Dimere sowie die Homo- und Heterotrimere noch deutlich erkennbar (Abb. 30 A, Spur 4). Nach der Denaturierung mit 0,1 % LiDS erkennt man hauptsächlich die hP2X1- und hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-Monomere (Abb. 30 A, Spur 5). Der GFP-Fluoreszenzscan ermöglicht die Detektion des homomeren hP2X7¹⁻⁴⁰⁸- und heteromeren hP2X1/hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-Dimers mit den entsprechenden Massen (Abb. 30 B, Spur 4, Tab. 13). Die homotrimeren Rezeptorkomplexe scheinen insgesamt stabiler als die heterotrimeren Rezeptorkomplexe, sodass auch nach Zugabe von 0,1% LiDS noch drei Proteinbanden detektierbar sind, welche (von oben nach unten) dem Homotrimer, Homodimer und Monomer des allein exprimierten hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-Rezeptors entsprechen (Abb. 30 B, Spur 5).

Die Koexpression der His-hP2X1-StrepIII- und hP2X7¹⁻⁴³⁶-GFP-His-Untereinheiten resultiert aufgrund ihrer ähnlichen Massen (s. Tab. 13) in einem ähnlichen Bandenmuster (vgl. Abb. 30, Spuren, 3-5 und 7-9). Nach der partiellen Denaturierung mit 0,01 % LiDS konnten die homo- und heteromeren Dissoziationsstufen detektiert werden (Abb. 30 A, Spur 13). Die erhöhte LiDS-Konzentration (0,1 %) resultiert hauptsächlich in den monomeren hP2X1- und hP2X7¹⁻⁴³⁶-Banden (Abb. 30 A, Spur 13).

Der His-hP2X4-StrepIII wurde parallel mit hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-GFP-His und hP2X7¹⁻⁴³⁶-GFP-His koexprimiert und über Ni-NTA aufgereinigt. Im Vergleich zu der Koexpression mit hP2X1, sind nach der Koexpression mit hP2X4 zwei Intermediärbanden bei ca. 220 kDa und 250 kDa detektierbar (vgl. Abb. 30, Spuren 3, 4, 12, 13 mit 7, 8, 16, 17). Die

Intermediärbanden sind ebenso im GFP-Kanal detektierbar (Abb. 30, Spuren 7, 8, 16, 17). Aufgrund der Laufhöhe kann der hP2X7-Homotrimer ausgeschlossen werden, demzufolge handelt es sich hier um ein weiteres Heterotrimer. Für die Heterotrimere errechnen sich je nach Stöchiometrie molekulare Massen von 220 kDa und 245 kDa (Tab. 13). Im IR800-Fluoreszenzscan sind in aufsteigender Reihenfolge das hP2X4-Homotrimer, die beiden Heterotrimere und das hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-Homotrimer detektierbar (Abb. 30, Spuren 7, 8). Bis auf das hP2X4-Homotrimer sind alle Proteinbanden auch im GFP-Kanal sichtbar (Abb. 30 B, Spuren 7, 8). Nach der partiellen Denaturierung mit 0,1 % LiDS sind die entsprechenden dimeren und monomeren Banden detektierbar (Abb. 30 A und B, Spur 9). Um einen direkten Vergleich der exprimierten Proteine durchführen zu können, wurde der trunkierte hP2X7¹⁻⁴⁰⁸ bzw. hP2X7¹⁻⁴³⁶ mehrfach in nativer und partiell denaturierter Form zwischen den zu untersuchenden Proben exprimiert (Abb. 28 Spuren 1, 2, 6, 10, 11, 15 und 19).

His-hP2X4-StrepIII wurde ebenso mit hP2X7¹⁻⁴³⁶-GFP-His koexprimiert über Ni-NTA aufgereinigt. Unter nativen Bedingungen konnten in der Plasmamembran das hP2X4-Homotrimer, die beiden Heterotrimere und das hP2X7¹⁻⁴³⁶ Homotrimer ihrer Masse entsprechend, detektiert werden (Abb. 30 A, Spuren 16, 17). Die Heterotrimere sowie das hP2X7¹⁻⁴³⁶-Homotrimer können auch im GFP-Kanal detektiert werden (Abb. 30 A, Spuren 16 und 17).

Zusammengefasst konnte eine Interaktion der His-hP2X1-StrepIII- sowie His-hP2X4-StrepIII-Untereinheit mit hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-GFP-His bzw. mit hP2X7¹⁻⁴³⁶-GFP-His auf den Ebenen der 35S-Gesamtexpression, GFP-Gesamtexpression und Plasmamembran-Expression gezeigt werden (Abb. 30). Die Intermediärbanden entsprechen den berechneten Massen (s. Tab. 13). Um die Interaktion nachzuweisen, wurden die koexprimierten Rezeptoren über die Strep-Tactin-Chromatographie aufgereinigt. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

			hP2X7 ¹⁻⁴⁰⁸ -GFP-His			hP2X7 ¹⁻⁴³⁶ -GFP-His		
			90 X7	180 X7-X7	270 X7-X7-X7	93 X7	186 X7-X7	279 X7-X7-X7
His-hP2X1-StrepIII			151 X1-X7	212 X1-X1-X7	241 X1-X7-X7	154 X1-X7	215 X1-X1-X7	247 X1-X7-X7
61 X1	122 X1-X1	183 X1-X1-X1						
His-hP2X4-StrepIII			155 X4-X7	220 X4-X4-X7	245 X4-X7-X7	158 X4-X7	223 X1-X1-X7	251 X1-X7-X7
65 X4	130 X4-X4	195 X4-X4-X4						

Tab. 14 Die errechneten molekularen Massen entsprechen der mit hP2X7 zu homo- und heteromeren Dimeren und Trimeren interagierenden hP2X1- und hP2X4-Untereinheiten. Zur Berechnung der Masse wurde die Anzahl der jeweiligen N-Glykosylierungsstellen einbezogen.

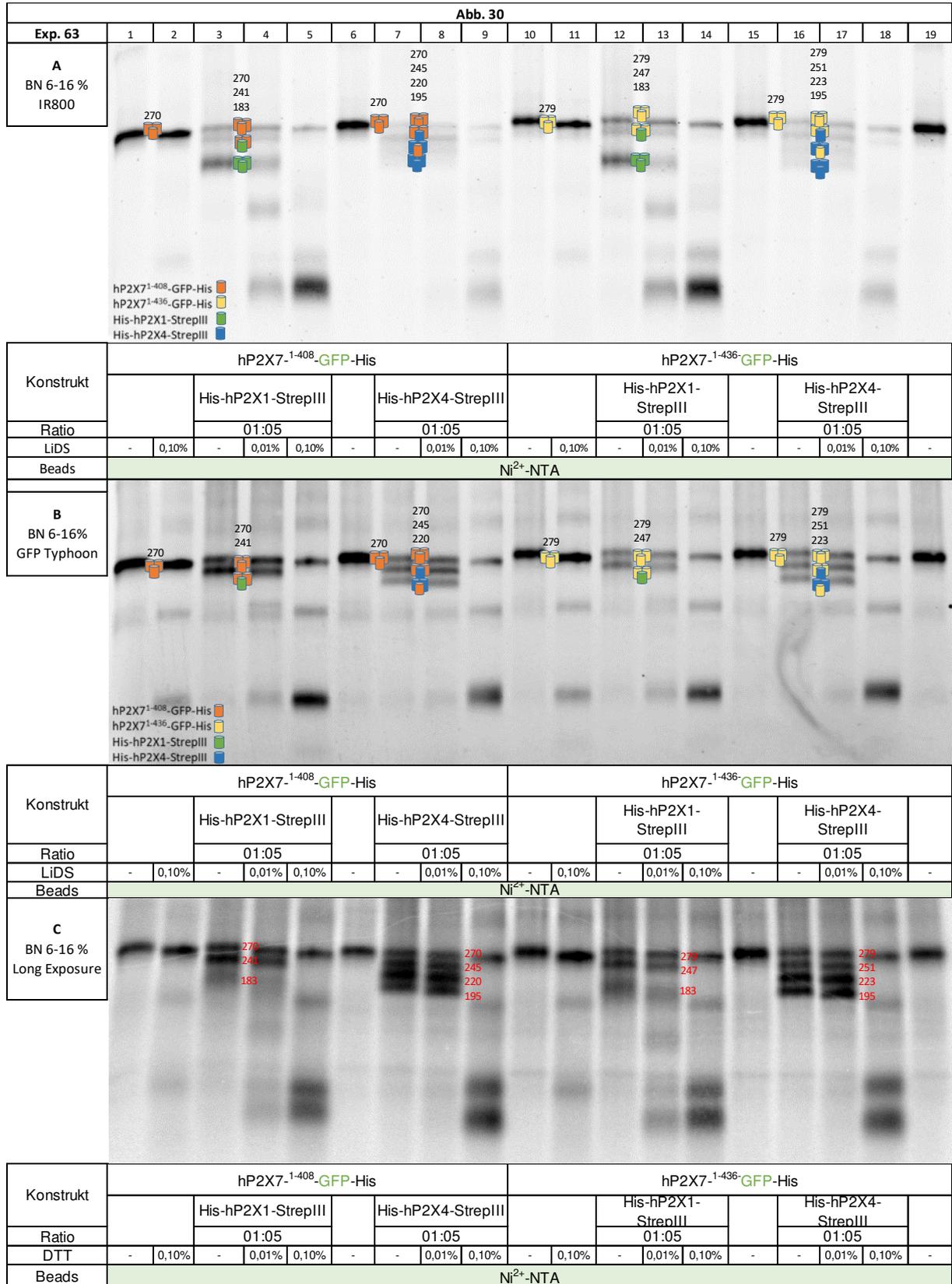


Abb. 30 Interaktion von trunkierten hP2X7-Varianten mit His-hP2X1-StrepIII und His-hP2X4-StrepIII (Exp. 63)

Die C-terminal trunkierten Rezeptoren hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-GFP-His und hP2X7¹⁻⁴³⁶-GFP-His wurden jeweils mit dem His-hP2X1-StrepIII bzw. His-hP2X4-StrepIII in einem cRNA-Verhältnis von 1:1 in *X. laevis*-Oozyten koexprimiert. Zur Kontrolle wurden die trunkierten hP2X7-Rezeptoren ebenso allein exprimiert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 20 detailliert beschriebenen Verlauf. Die Untereinheiten der exprimierten Rezeptoren sind durch verschieden gefärbte Zylinderformen dargestellt. **A** Plasmamembranexpression IR800-NHS (Fluoreszenz-Scan) **B** Gesamtexpression (GFP-Fluoreszenz-Scan) **C** Gesamtexpression (³⁵S]-Methionin-Scan).

Zur Untersuchung der Interaktion wurden die koexprimierten Rezeptoren im Exp. 63 zusätzlich über Strep-Tactin aufgereinigt (Abb. 31). Die Anordnung der koexprimierten und allein exprimierten Proteine auf den BN-PAGE-Gelen wurde beibehalten. Abweichend ist, dass die Eluate der koexprimierten Rezeptoren in drei Stufen mit steigender LiDS-Konzentration denaturiert wurden und dass die allein exprimierten trunkierten hP2X7-Rezeptoren nur in nativer Form analysiert wurden.

Für den direkten Vergleich wurde der über Ni-NTA aufgereinigte hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-GFP-His mehrfach in nativer Form auf das Gel aufgetragen und ist als 270 kDa Bande auf allen drei Detektionsebenen ³⁵S, GFP und IR800-Plasmamembran deutlich erkennbar (Abb. 31, Spuren 1, 6). Der hP2X7¹⁻⁴³⁶ kann nicht über Strep-Tactin aufgereinigt werden und ist demzufolge auf keiner Detektionsebene wiederzufinden (Abb. 31, Spuren 2-5, 7-10).

Bei der Koexpression von hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-GFP-His und His-hP2X1-StrepIII ist im IR800-NHS-Fluoreszenzscan über dem gut exprimierten hP2X1-Trimer, eine weitere Bande bei ca. 240 kDa detektierbar (Abb. 31 A, Spur 2). Die Bande entspricht dem heteromeren Trimer mit einer Stöchiometrie von 2:1 (X7:X1) und ist aufgrund der fusionierten GFP-Proteine somit auch im GFP-Kanal detektierbar (Abb. 29 B, Spur 2). Die zweite heteromere Trimerbande mit einer Stöchiometrie von 1:2 (X1:X7) kann weder in einem der beiden Fluoreszenzkanäle noch im [³⁵S]-Scan detektiert werden (Abb. 31, Spur 2). Diese Intermediärbande ist somit weder über Ni-NTA noch über Strep-Tactin nachweisbar (vgl. Abb. 30, Spur 3 u. Abb. 31, Spur 2). Die partielle Denaturierung mit aufsteigenden LiDS-Konzentrationen führte zur Dissoziation der Oligomere in die zugehörigen Dimere und Monomere (Abb. 31, Spuren 4, 5). Im GFP-Kanal ist der hP2X7¹⁻⁴⁰⁸- detektierbar, was auf eine hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-/hP2X1-Interaktion zurückschließen lässt.

hP2X7¹⁻⁴³⁶-GFP-His und His-hP2X1-StrepIII wurden ebenso koexprimiert über die Strep-Tactin aufgereinigt. Auch hier ist nur eine Intermediärbande in beiden Fluoreszenzkanälen und im [³⁵S]-Methionin-Scan detektierbar (Abb. 31, Spur 12). Die 247 kDa Bande entspricht dem heteromeren Trimer mit einer Stöchiometrie von 2:1 (X7:X1) (Abb. 31 A, B, Spur 12 u. Tab. 14). Nach der partiellen Denaturierung mit steigender LiDS-Konzentration sind im IR800-NHS-Fluoreszenzscan die hP2X1- und hP2X7¹⁻⁴³⁶-Untereinheiten bei entsprechender Masse detektierbar (Abb. 31 A, Spuren 13-15). Des Weiteren ist der hP2X7¹⁻⁴³⁶ auch im GFP-Kanal sichtbar (Abb. 31 B, Spur 13-15). Ohne eine Interaktion der koexprimierten Rezeptoren, ist es nicht möglich hP2X7¹⁻⁴³⁶ über Strep-Tactin aufzureinigen. Somit deutet das Erscheinen von hP2X7¹⁻⁴³⁶ auf eine hP2X1/hP2X7¹⁻⁴³⁶-Interaktion.

Beide C-terminal trunkierten hP2X7-Untereinheiten hP2X7¹⁻⁴⁰⁸ und hP2X7¹⁻⁴³⁶ wurden parallel mit dem His-hP2X4-StrepIII koexprimiert und über Strep-Tactin aufgereinigt. Vergleicht man die Ni-NTA- mit der Strep-Tactin aufgereinigten Proteine, erkennt man ein übereinstimmendes Bandenmuster der nativen Probe. Mit Ausnahme des hP2X7¹⁻⁴⁰⁸-Homotrimer sind alle Banden in beiden Fluoreszenzkanälen und im [³⁵S]-Methionin-Scan detektierbar (vgl. Abb. 30, Spur 7 und Abb. 31, Spur 7). Anders als bei der Koexpression von hP2X7¹⁻⁴⁰⁸ und hP2X1, sind nach der Koexpression von hP2X7¹⁻⁴⁰⁸ und hP2X4 zwei Intermediärbanden detektierbar, welche den heteromeren Trimeren entsprechen und daher auch im GFP-Fluoreszenzkanal erkennbar sind (Abb. 31 B, Spuren 7, 8). Des Weiteren [³⁵S]-Methionin-Scan auch das homomere hP2X4-Dimer mit der entsprechenden Masse detektierbar (Abb. 31 C, Spuren 8, 9, Tab.14). Die Koisolierung von hP2X7¹⁻⁴⁰⁸ über Strep-Tactin- ist auf eine hP2X7¹⁻⁴⁰⁸/hP2X4-Interaktion zurückzuführen.

Die Koisolierung von hP2X7¹⁻⁴³⁶ mit hP2X4 resultiert in einem ähnlichen Bandenmuster. Im IR800-NHS-Fluoreszenzkanal sind unter nativen Bedingungen ebenfalls zwei Intermediärbanden detektierbar (Abb. 31 A, Spur 17). Die heteromeren 223 kDa und 251 kDa Trimerbanden sind ebenso im GFP-Kanal detektierbar (Abb. 31 B, Spur 17). Nach der partiellen Denaturierung mit LiDS sind die homomeren Monomerbanden in beiden Fluoreszenzkanälen und im [³⁵S]-Methionin-Scan detektierbar (Abb. 31 A-C, Spur 18-20).

Abschließend lässt sich sagen, dass eine Koisolierung des C-terminal trunkierten hP2X7 sowohl mit hP2X1 als auch mit hP2X4 möglich ist. Die Koisolation ist in beiden Fluoreszenzkanälen und im [³⁵S]-Methionin-Scan sichtbar und deutet somit auf eine Interaktion mit hP2X1 und hP2X4 hin.

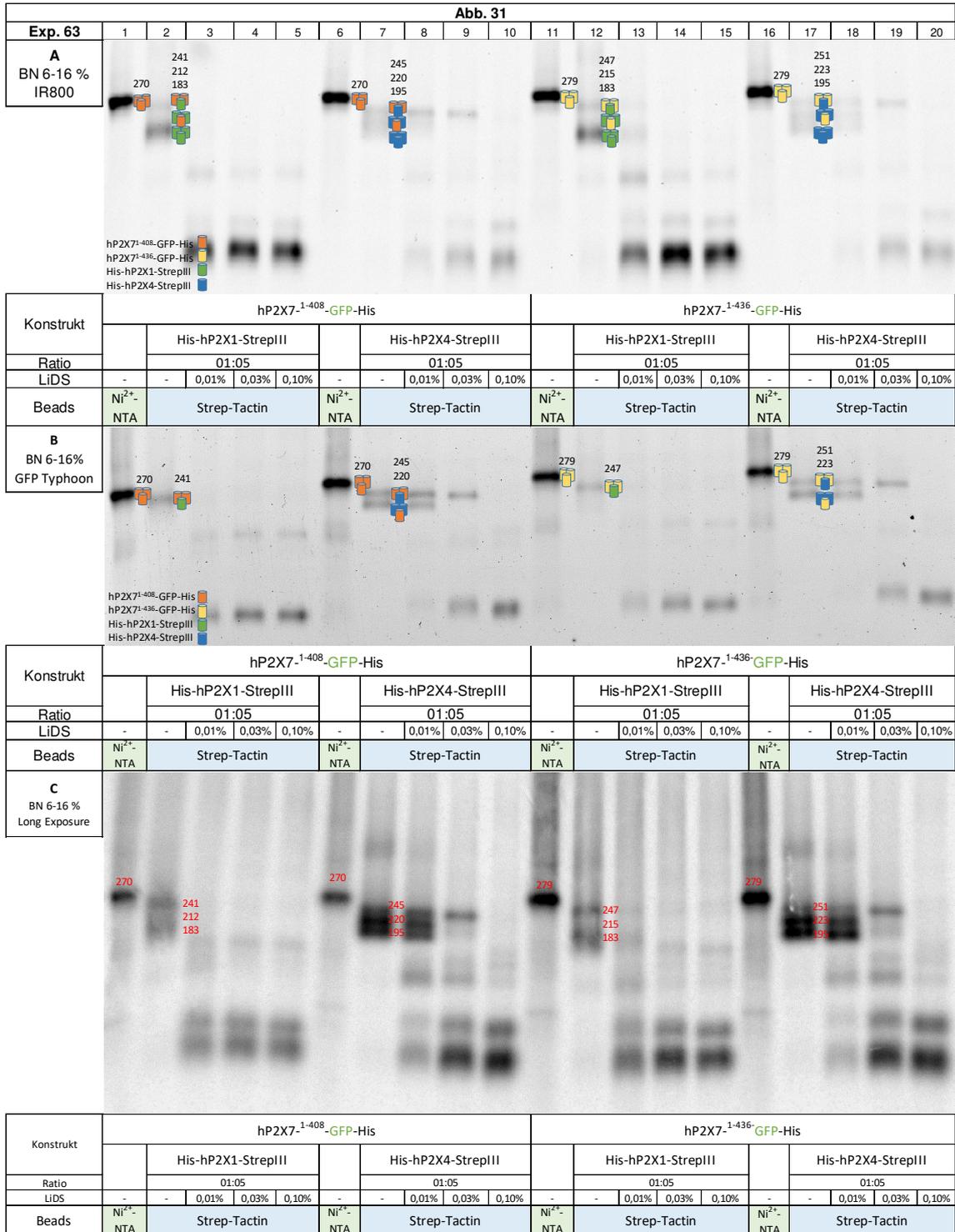


Abb. 31 BN-PAGE-Analyse der Interaktion von C-terminal trunkierten hP2X7-GFP-Untereinheiten mit His-hP2X1-StrepIII und His-hP2X4-StrepIII (Exp.63)

Die C-terminal trunkierten Untereinheiten hP2X7-1-⁴⁰⁸-GFP-His und hP2X7-1-⁴³⁶-GFP-His wurden jeweils mit dem His-hP2X1-StrepIII bzw. His-hP2X4-StrepIII in einem cRNA-Verhältnis von 1:1 in *X. laevis*-Oozyten koexprimiert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 20 detailliert beschriebenen Verlauf. Die Untereinheiten der exprimierten Rezeptoren sind durch verschieden gefärbte Zylinderformen dargestellt. **A** Plasmamembranexpression IR800-NHS (Fluoreszenz-Scan) **B** Gesamtexpression (GFP-Fluoreszenz-Scan). **C** Gesamtexpression (³⁵S]-Methionin-Scan).

4.5 hP2X7-Mutanten

4.5.1 SDS-PAGE-Analyse der hP2X7-Mutanten

P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die durch die Bindung des natürlichen Liganden ATP aktiviert werden. Auf Basis der vorliegenden Mutagenesestudien an anderen P2X-Rezeptoren, wählte ich vier hoch-konservierte basische Aminosäurereste K⁶⁴, K¹⁹³, R²⁹⁴, K³¹¹ aus, die sich zuvor als essentiell für eine hohe ATP-Potenz des hP2X7-Rezeptors erwiesen haben. Frühere Studien am hP2X4-Rezeptor konnten zeigen, dass die Reste K⁶⁷ und R²⁹⁵ (homolog zu K⁶⁴ und R²⁹⁴ im hP2X7-Rezeptor) eine wichtige Funktion für die Bindung der Agonisten und für die nachfolgende Konformationsänderung, die zur Öffnung des Kanals führt, haben (Zemkova et al. 2007). Das einzige Arginin, das bei Mutationen die ATP-Potenz in allen bisher analysierten P2X-Rezeptoren beeinträchtigt, ist der Rest R²⁹⁴ (Roberts und Evans 2007).

Um die biochemische Bedeutung der jeweiligen konservierten Aminosäuren in der extrazellulären Domäne von hP2X7 zu untersuchen, führte ich Einzel- und Doppelmutationen der Lysine und des Arginins zu Alanin durch. Die Doppelmutationen bestehen aus jeweils zwei Mutationen der basischen Reste desselben Interfaces. Anschließend analysierte ich die Auswirkungen der Substitution auf die Expression in der Plasmamembran und die Gesamtexpression in *X. laevis*-Oozyten. Da alle zu untersuchenden hP2X7-Untereinheiten mit einem His-Tag versehen waren, konnten die Proteine über die Ni-NTA aufgereinigt werden.

Die Plasmamembran- und Gesamtexpression der untersuchten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sind dargestellt (Abb. 32 A, B). Auffallend ist, dass die Einzelmutationen K⁶⁴A und K³¹¹A die Plasmamembranexpression nahezu vollständig unterdrücken, während die Mutationen der konservativen Reste K¹⁹³A und R²⁹⁴A eine verstärkte Plasmamembranexpression hervorrufen (Abb. 32 A, Spuren 5-12, Abb. 33). Betrachtet

man die Positionen der Mutationen im Interface erkennt man, dass jeweils eine Mutation des (+) und eine des (-) -Interfaces die Expression in der Plasmamembran gravierend reduziert, während die andere Mutation auf demselben Interface keinen Einfluss auf die Plasmamembranexpression hat. Da schon die alleinige Mutation des basischen Aminosäurerestes K⁶⁴ zu Alanin ausreicht, um die Expression in der Plasmamembran zu verhindern, ist es zu erwarten, dass auch die Doppelmutante K⁶⁴A,K¹⁹³A-hP2X7 kaum in der Plasmamembran exprimiert wird (Abb. 32, Spur 13 und 14). Ähnlich verhält sich die Doppelmutante R²⁹⁴A,K³¹¹A-hP2X7, die wahrscheinlich aufgrund der Mutation K³¹¹A ebenfalls nicht in der Plasmamembran exprimiert werden kann wird (Abb. 32, Spur 15 und 16).

Im Vergleich zu der Plasmamembranexpression wird die Gesamtproteinexpression durch keine der Einzel- und Doppelmutationen vollständig unterdrückt. Die Substitution der konservativen Reste K⁶⁴ und K³¹¹ durch Alanin verminderte die Gesamtproteinexpression, was darauf hindeutet, dass Lysin an diesen Positionen für die Expression des Proteins auf beiden Ebenen erforderlich ist (Abb. 32 B, Spuren 5, 6, 11 und 12). Die Einzelmutationen K¹⁹⁴A- und R²⁹³A-hP2X7, welche in der Plasmamembran stärker exprimiert, werden als der Wildtyp, zeigen wiederum in der Gesamtexpression vergleichsweise eine etwas verringerte Expression (Abb. 32 B, Spuren 7-10). Für die Doppelmutanten K⁶⁴A,K¹⁹³A-hP2X7 und R²⁹⁴A,K³¹¹A-hP2X7 konnte die Gesamtproteinexpression in einem weiteren Versuch nachgewiesen werden, wobei die Gesamtexpression der Doppelmutante R²⁹⁴A, K³¹¹A-hP2X7 deutlich schwächer ist (vgl. Abb. 32 B, Spuren 11,12 und 13, 14).

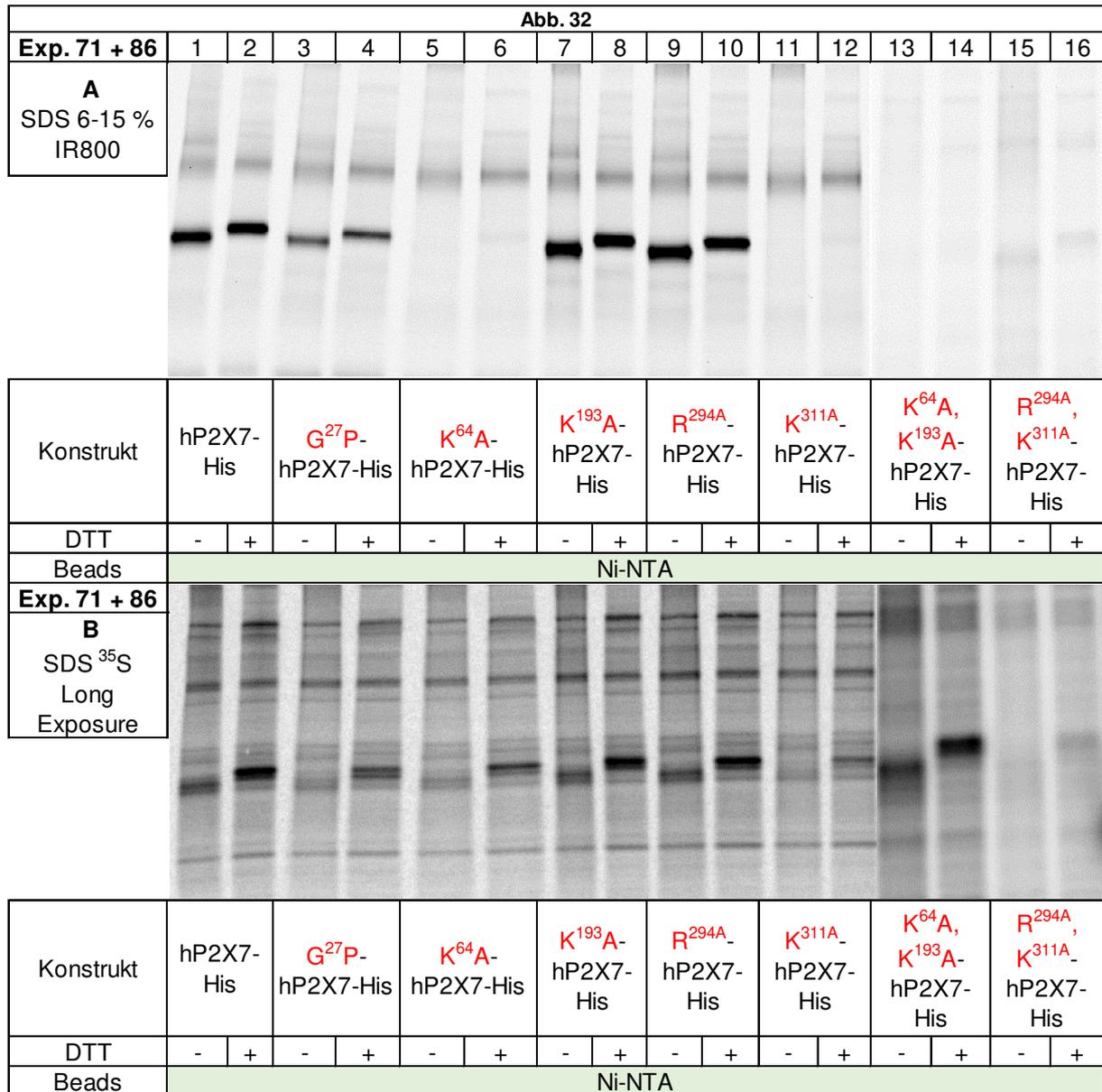


Abb. 32 Plasmamembran- und Gesamtexpression der hP2X7-Mutanten (Exp. 71, Lena Hauswirth + 86, Sanaria)

Die cRNA der angegebenen Konstrukte wurde in *X. laevis*-Oozyten injiziert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. Die Proteinbanden stammen aus zwei verschiedenen Gelen und wurden für dieses Bild digital aneinandergesetzt. **A** Plasmamembranexpression (IR800-NHS Fluoreszenz-Scan) **B** Gesamtexpression (³⁵S]-Methionin-Scan).

Unter Verwendung von BioRad ImageLab wurden die einzelnen Banden der mit DTT reduzierten Proteine quantifiziert und die Expression der Einzel- und Doppelmantanten auf den hP2X7-Wildtyp normalisiert. In Abb. 33 sind die auf den hP2X7-Wildtyp normalisierten Ergebnisse der Plasmamembran- und Gesamtproteinexpression

dargestellt. Da die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Experimenten stammen, wurden die detektierten Banden in den Spuren 13 bis 16 auf den gut exprimierten K¹⁹³A-hP2X7 aus dem zweiten Versuch (Exp. 86) normalisiert (Versuch 86 teilweise dargestellt). Die Mutante G²⁷P-hP2X7 gehört nicht zu den hoch-konservierten Aminosäuren und wird daher nicht mit in die statistische Datenanalyse einbezogen.

Die statistische Analyse legt dar, dass die Plasmamembranexpression der Rezeptormutanten K¹⁹³A-hP2X7 und R²⁹⁴A-hP2X7 im Vergleich zur Plasmamembranexpression der wt hP2X7-Untereinheit erhöht ist. Abgesehen von der Doppelmutante K⁶⁴A,K¹⁹³A-hP2X7, welche auch nur eine sehr geringe Plasmamembranexpression aufweist, wird keine weitere Mutante im Fluoreszenzscan detektiert. Alle radioaktiv markierten Mutanten zeigen aber im [³⁵S]-Methionin-Scan deutliche Signale, auch wenn die Expression unterschiedlich stark ausfällt. Insgesamt bestätigt die statistische Analyse alle beschriebenen Beobachtungen.

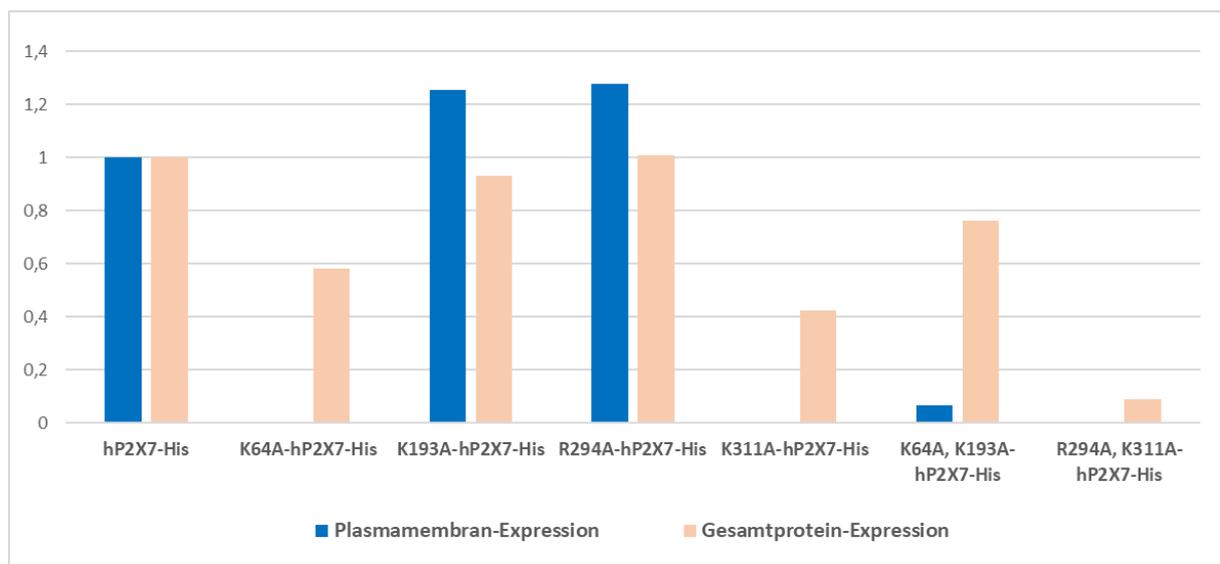


Abb. 33 Quantifizierung der Gesamt- und Plasmamembranexpression der hP2X7-Mutanten (Exp. 71 + 86)

Dargestellt sind die Intensitäten der Proteinbanden im reduzierten Zustand nach Normalisierung auf den hP2X7-His. Die orangenen Balken stellen die Gesamtexpression dar, die blauen Balken die Plasmamembranexpression. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der BioRad ImageLab Software.

4.5.2 BN-PAGE-Analyse der hP2X7-Mutanten

Um zu untersuchen, ob die mutierten Untereinheiten zu Trimeren assemblieren und sich in die korrespondierenden Assemblierungsstufen zerlegen lassen, wurden die exprimierten Proteine im BN-PAGE aufgetrennt und die partielle Denaturierung mittels 0,1% LiDS durchgeführt. Die dargestellten Proteinbanden stammen aus denselben zwei Versuchen wie die SDS-PAGE-Gele und wurden ebenfalls für die Abbildung aneinandergesetzt. Leider tauchen im Fluoreszenz-Scan des ersten Versuchs zwei weitere Banden nach der partiellen Denaturierung auf, die zu keiner Dissoziationsstufe korrespondierend sind. Diese Banden, dessen Ursache noch ungeklärt ist, sind mit roten Sternchen markiert (Abb. 34 A, Spuren 1-12).

Sieht man über die zwei Banden hinweg, erkennt man für den wt-hP2X7-His und die Einzelmutationen K¹⁹³A-hP2X7-His und R²⁹⁴A-hP2X7-His drei Banden, die korrespondierend zur trimeren, dimeren und monomeren Dissoziationsstufe sind (Abb. 34 A, Spuren 2, 8, 10). In nativer Form ist ebenso die Trimerbande deutlich erkennbar (Abb. 34 A, Spuren, 1, 7, 9). Im Vergleich dazu, zeigen die Einzelmutationen K⁶⁴A-hP2X7-His und K³¹¹A-hP2X7-His weder eine Trimerbande in nativer Form noch weitere Banden nach der partiellen Denaturierung, die den drei Dissoziationsstufen entsprechen (Abb. 34 A, Spuren 5, 6, 11, 12). Die Doppelmutationen K⁶⁴A-,K¹⁹³A-hP2X7-His und K²⁹⁴A,K³¹¹A-hP2X7-His wurden in einem weiteren Versuch über BN-PAGE aufgetrennt und können weder in nativer noch in dissoziierter Form im Fluoreszenzscan detektiert werden (Abb. 34 A, Spuren 13 - 16).

Die radioaktiven Signale der exprimierten Proteine zeigen, dass sowohl die Einzel- als auch die Doppelmutanten in den drei Assemblierungsstufen im BN-PAGE-Gel migrieren. Die native Form ist teilweise als sehr schwache Trimerbande detektierbar (Abb. 34 B, Spuren 5, 7, 9 und 13). Leider tauchen in den nativen Proben des ersten Versuchs Hintergrundsignale auf, die nicht zugeordnet werden können. Zusammenfassend ergab die Analyse, dass alle untersuchten Mutanten im [³⁵S]-Methionin-Scan in den drei Dissoziationsstufen detektiert werden können. Im IR800-NHS-Fluoreszenz-Scan sind nur die Dissoziationsstufen der Proteine sichtbar, die auch zuvor im Fluoreszenz-Scan des SDS-PAGE-Gels detektiert werden konnten, sprich die Einzelmutanten K¹⁹³A-hP2X7 und R²⁹⁴A-hP2X7.

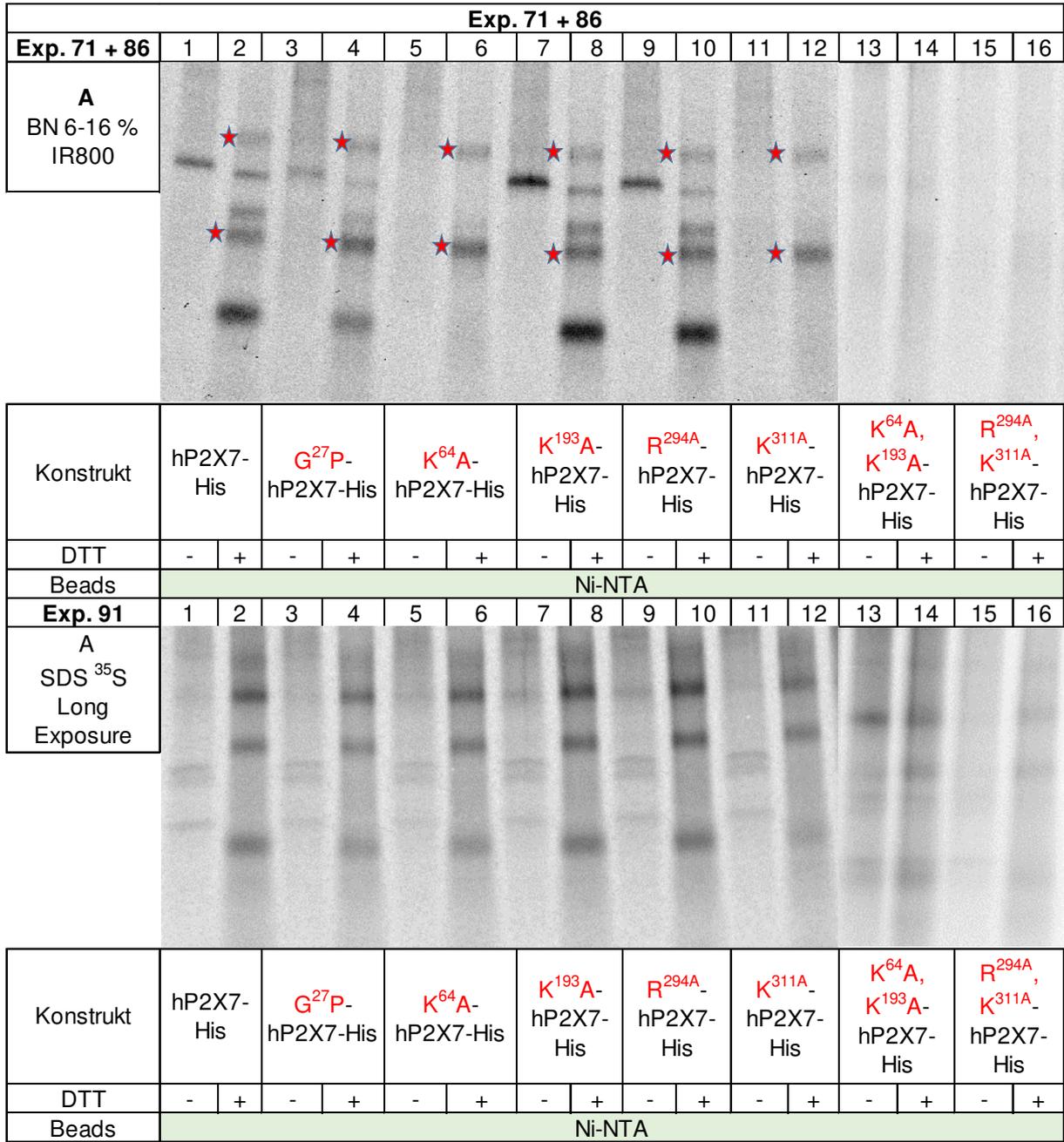


Abb. 34 Plasmamembran- und Gesamtexpression der hP2X7-Mutanten (Exp. 71, Lena Hauswirth + 86, Sanaria)

Die cRNA der angegebenen Konstrukte wurde in *X. laevis*-Oozyten injiziert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 20 detailliert beschriebenen Verlauf. **A** Plasmamembranexpression (IR800-NHS Fluoreszenz-Scan) markierten Proteine mittels Odyssey-Scanner. Die mit roten Sternchen markierten Banden können keiner Dissoziationsstufe des Trimers zugeordnet werden. **B** Gesamtexpression ([³⁵S]-Methionin-Scan).

4.5.3 SDS-PAGE-Analyse der rP2X7-Mutanten

Die Sequenzhomologie des P2X7-Rezeptors zwischen *H. sapiens* und der Ratte (*rattus norvegicus*) beträgt 86 % (North 2002). Da die untersuchten Lysine und das Arginin der hP2X7-Untereinheit an derselben Position in der rP2X7-Untereinheit vorkommen, habe ich die identischen Einzel- und Doppelmutationen in die rP2X7-Untereinheit einkloniert. Des Weiteren konnten McCarthy und Kollegen durch einen direkten Vergleich der orthosterischen Bindungstaschen von hP2X3 und rP2X7 feststellen, dass die konservativen Aminosäuren K⁶⁶, T¹⁸⁹ und N²⁹² ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindung und ionische Wechselwirkungen ATP koordinieren (McCarthy et al. 2019). Die konservativen Aminosäuren wurden als Einzel- und Doppelmutationen in den Wildtyp Strep3-rP2X7 eingebaut, sodass alle zu untersuchenden Proteine im Nachhinein über Strep-Tactin aufgereinigt werden konnten.

Interessanterweise resultierte die Mutation des Restes K⁶⁴, welche für die Plasmamembranexpression der hP2X7-Untereinheit essenziell zu sein scheint, in keiner Verminderung der Plasmamembranexpression des rP2X7 (Abb. 35, Spur 5 und 6). Dahingegen reduziert die Mutation K⁶⁶A die Plasmamembranexpression gravierend (Abb. 35, Spur 7 und 8). Gemeinsam ist den beiden P2X7-Rezeptoren, dass durch die Einzelmutationen K¹⁹³A- und R²⁹⁴A die Plasmamembranexpression nicht beeinflusst wird (Abb. 35, Spur 11, 12, 15 und 16). Im Kontrast dazu, wird durch die Mutation K³¹¹A sowohl in der hP2X7- als auch in der rP2X7-Untereinheit die Plasmamembranexpression stark reduziert. Insbesondere auffällig ist jedoch die Mutation T¹⁸⁹A, da sie als einzige Mutation die Plasmamembranexpression vollständig verhindert. Da die Doppelmutante K⁶⁶A,T¹⁸⁹A-rP2X7 beide Mutanten beinhaltet, die einzeln die Plasmamembranexpression stark unterdrücken, ist es erwartungsgemäß, dass auch die Doppelmutante kaum in der Plasmamembran exprimiert wird.

Die Doppelmutante K⁶⁴A, K¹⁹³A-rP2X7 beinhaltet beide Mutanten, die einzeln keinen Einfluss auf die Plasmamembranexpression haben, demzufolge wird auch die Doppelmutante gut exprimiert. Bei der Doppelmutante R²⁹⁴A,K³¹¹A-rP2X7 ist wahrscheinlich die Mutation von Lysin an Position 311 für die verringerte Expression in der Plasmamembran verantwortlich. Im [³⁵S]-Methionin-Scan und IR800-NHS-Fluoreszenzscan sind dieselben Signale detektierbar. So sind die Einzelmutationen

K⁶⁶A-, T¹⁸⁹A-, N²⁹²A- und K³¹¹A-rP2X7 und die Doppelmutationen K⁶⁶A,T¹⁸⁹A- und R²⁹⁴A,K³¹¹A-rP2X7 sehr schwach exprimiert. Die restlichen Einzel- und Doppelmutationen sind bezogen auf die Signalstärke ähnlich gut exprimiert wie der Wildtyp.

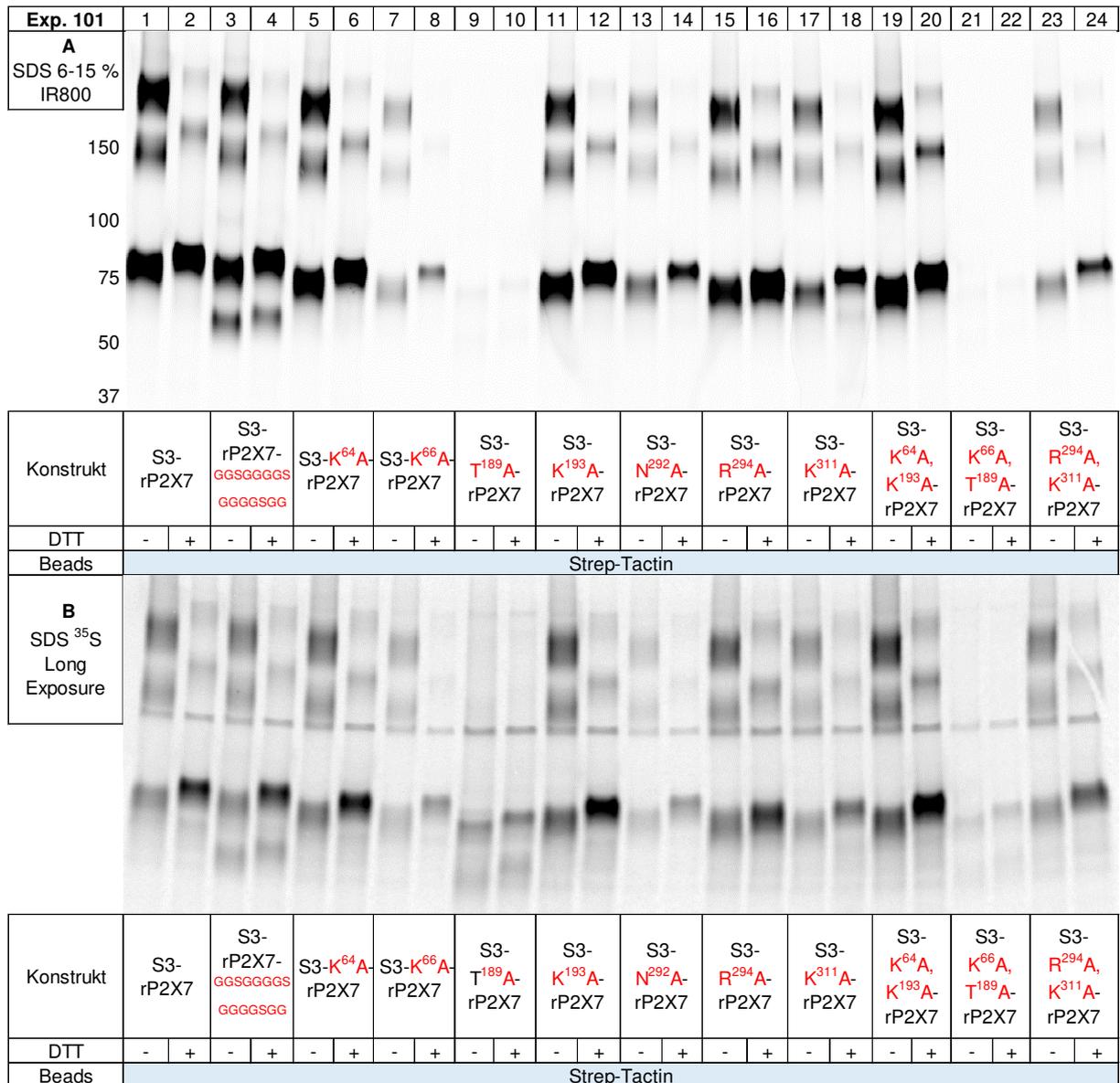


Abb. 35 Plasmamembran- und Gesamtexpression der rP2X7-Mutanten

Die cRNA der angegebenen Konstrukte wurde in *X. laevis*-Oozyten injiziert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf A Plasmamembranexpression (IR800-NHS Fluoreszenz-Scan). Am linken Rand sind die Massen der All-Blue-Marker Proteine angezeigt B Gesamtexpression ([³⁵S]-Methionin-Scan).

Anhand der Quantifizierung ist zu erkennen, dass die Plasmamembranexpression des wt StrepIII-rP2X7 und der Mutanten K⁶⁴A-rP2X7, K¹⁹³A-rP2X7, R²⁹⁴A-rP2X7 sowie K⁶⁴A,K¹⁹³A-rP2X7 gleich stark ist. Bei der Gesamtexpression stechen die Einzelmutation K¹⁹³A-rP2X7 und insbesondere die Doppelmutation K⁶⁴A,K¹⁹³A-rP2X7 aufgrund der starken Expression hervor. Im Kontrast dazu stehen die Einzelmutationen K⁶⁶A-rP2X7 und T¹⁸⁹A-rP2X7 und die Doppelmutation K⁶⁶A,T¹⁸⁹A-rP2X7, welche sowohl sehr geringe Plasmamembranexpression als auch geringe Gesamtexpression aufweisen. Für die Einzelmutationen K¹⁹³A-rP2X7 und K³¹¹A-rP2X7 und die Doppelmutante R²⁹⁴A,K³¹¹A-rP2X7 sind ebenfalls eine verminderte Gesamtprotein- und Plasmamembranexpression zu beobachten. Insgesamt bestätigt die Quantifizierung alle beschriebenen Beobachtungen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die konservativen Aminosäuren K⁶⁶, T¹⁸⁹ und R²⁹² einen sehr großen Einfluss sowohl auf die Plasmamembranexpression als auch auf die Gesamtproteinexpression haben. Da es sich bei der gezeigten Quantifizierung um ein Experiment (n=1) handelt, müsste das Experiment reproduziert werden und die Quantifizierung erneut durchgeführt werden.

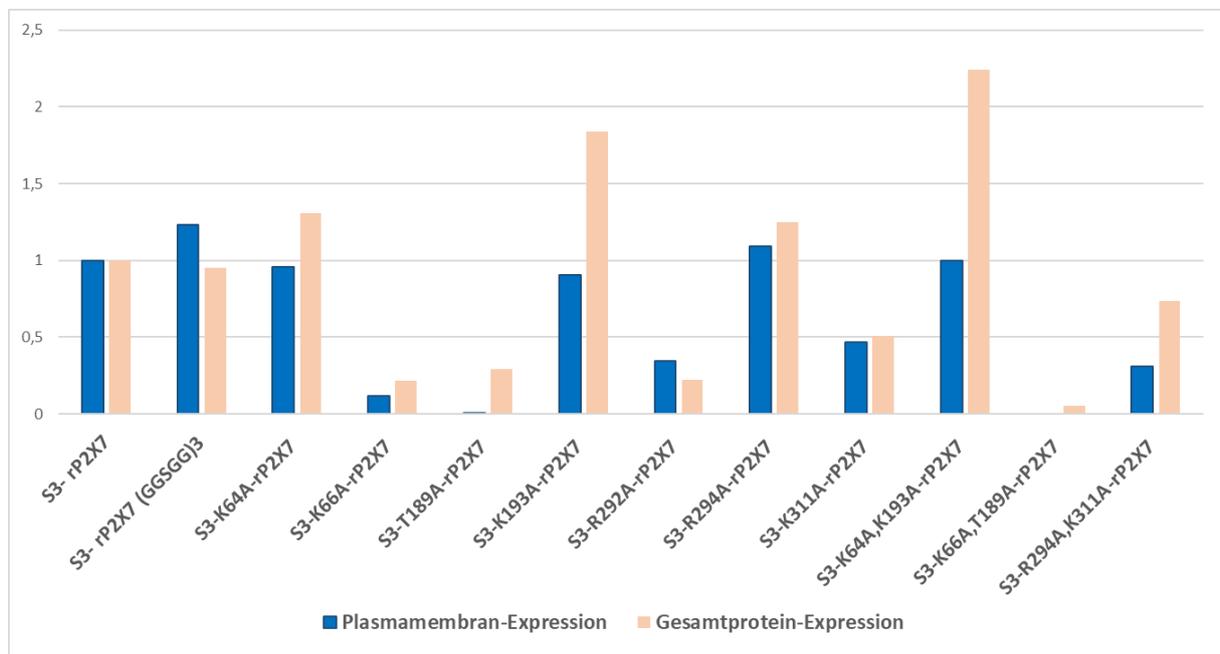


Abb. 36 Quantifizierung der Gesamt- und Plasmamembranexpression der hP2X7-Mutanten (Exp. 71 + 86)

Dargestellt sind die Intensitäten der Proteinbanden im reduzierten Zustand nach Normalisierung auf den hP2X7-His. Die orangenen Balken stellen die Gesamtexpression dar,

die blauen Balken die Plasmamembranexpression. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der BioRad ImageLab Software (n=1).

4.6 Homomere Konkatomere

Nicke et al. stellten im Jahr 2003 erstmals P2X1-Konkatamere vor. Für die Herstellung der P2X1-Konkatamere wurden in der Studie die P2X1-Untereinheiten mehrfach aneinander fusioniert. Durch die angewandte Strategie konnten alle Stufen zwischen dem P2X1-Dimer und Hexamer generiert werden. Für die Verknüpfung der Untereinheiten wurden drei gleich lange Linker eingesetzt, von denen zwei jeweils fünf Glutaminreste und einen Hexahistidin-Tag kodierten und der dritte fast ausschließlich aus Glutaminresten bestanden. Der Einfluss der Linkersequenz auf die Bildung von monomeren Nebenprodukten wurde biochemisch und elektrophysiologisch untersucht. Dabei konnte die proteolytische Spaltung und die Translationsinitiierung innerhalb der Linker-Region ausgeschlossen werden (Nicke et al. 2003). Die Linker haben dennoch einen großen Einfluss auf die Expression der Konkatomere. Zur Erstellung der Konkatomere habe ich unterschiedlich lange Linker in die homotrimeren Konkatomere eingebaut und die Expression verglichen.

4.6.1 Einfluss der Linker auf die Expression der homomeren Konkatomere

Linker spielen eine große Rolle für die Stabilität und die Expressionsausbeute von rekombinanten Fusionsproteinen. Die Linker werden ihrer Struktur entsprechend eingeteilt: flexible Linker, starre Linker und *in vivo* spaltbare Linker. Die flexiblen Linker ermöglichen ein gewisses Maß an Bewegung und beinhalten zumeist kleine, polare (Glycin, Serin oder Threonin) Aminosäuren. Die Zusammensetzung aus mehreren Glycin- und Serin-Resten (GS-Linkern) ermöglicht eine angemessene Trennung der Funktionsdomänen. Der zusätzliche Einsatz von Aminosäuren wie Threonin und Alanin dient zur Erhaltung der Flexibilität und die polaren Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure werden eingesetzt, um die Löslichkeit zu verbessern (Chen et al. 2013).

Für unsere Linker wurden die drei Aminosäuren Glycin, Alanin und Serin in verschiedenen Längen und Häufigkeiten der jeweiligen Aminosäuren kombiniert. Zu den kurzen Linkern zählten die Aminosäuresequenzen AGAG und (AGS)₃, zu den langen Linker (GGSGG)₃ und AGSAGGSAGGSGG. Die Topologie des homomeren rP2X7-Konkatamers sowie ein detaillierter Ausschnitt der verwendeten Linker AGAG

und (GGSGG)₃ sind dargestellt (Abb. 37 u. 38). Die Eignung der unterschiedlichen Linker wurde biochemisch untersucht und verglichen.

Dazu wurden die unterschiedlich verlinkten dimere und trimere rP2X7-Konkatamere exprimiert und die Ergebnisse quantitativ ausgewertet. Vergleicht man die unterschiedlich verlinkten trimere rP2X7-Konkatamere, welche unter den gleichen Bedingungen synthetisiert und aufgearbeitet wurden, erkennt man, dass die Expressionsausbeute sowie der prozentuale Anteil an Abbau-Produkten nahezu identisch sind (vgl. Abb. 41, Spuren 7, 8 mit 13, 14). Insgesamt scheint es keinen gravierenden Unterschied für die Expression auszumachen, welcher der beiden Linker eingesetzt wird.

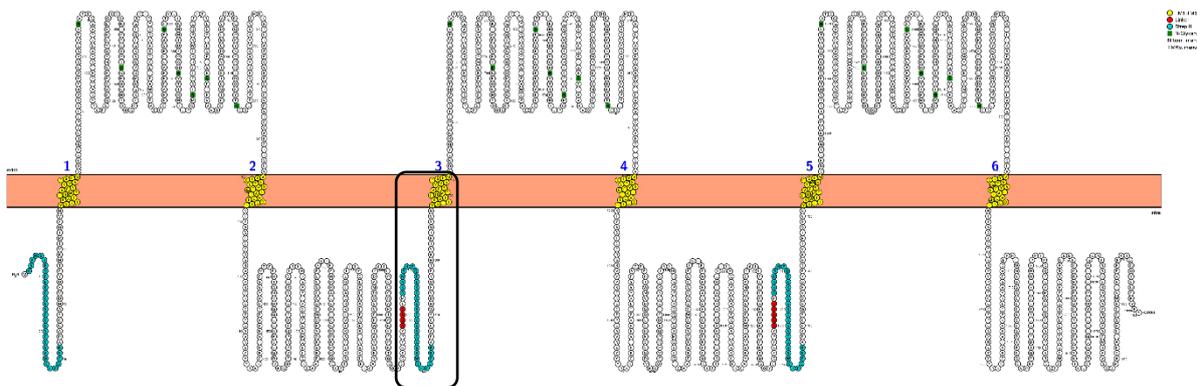


Abb. 37 Topologie des trimeren rP2X7-Konkatamers mit dem AGAG-Linker

Drei rP2X7-Untereinheiten sind zum trimeren rP2X7-Konkatamer fusioniert wurden. Die N- und C-terminalen Domänen befinden sich intrazellulär. Zwischen den Transmembrandomänen (TM1 bis TM6 gelb) befinden sich die extrazellulären Domänen inklusive der insgesamt 18 N-Glykosylierungsstellen (grüne Vierecke). Intrazellulär befinden sich der StrepIII-Tag (türkis) sowie der AGAG-Linker (rot). Das Topologiemodell wurde mittels der Protter Software (Omasits et al. 2014) erstellt.

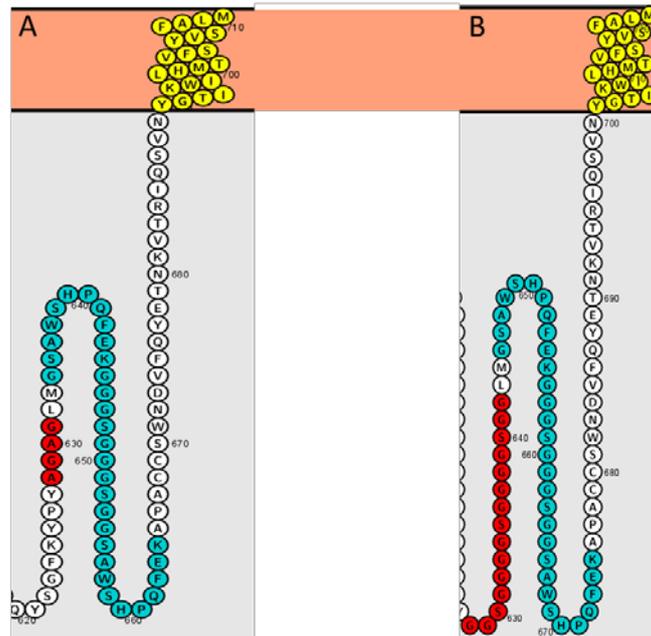


Abb. 38 Topologie der Linker und StrepIII-Sequenz der rP2X7-Untereinheit

Die verschiedenen Linker der rP2X7-Konkatamere sind zum direkten Vergleich nebeneinander abgebildet. Linker-Sequenzen AGAG (rot) und $(GGSGG)_3$ (rot) sowie der StrepIII-Tag (türkis) befinden sich intrazellulär vor Beginn der TM3 (gelb).

Ich habe neben den dimeren und trimeren rP2X7-Konkatameren, auch die dimere und trimere Konkatamere des rP2X4 hergestellt und exprimiert. Generell besitzen die in dem Exp. 84 (Abb. 43) exprimierten rP2X4-Konkatamere den Linker $(AGS)_3$. Die Topologie des homomeren rP2X4-Konkatamers sowie ein detaillierter Ausschnitt der verwendeten Linker $(AGS)_3$ sind ebenfalls dargestellt (Abb. 39 u. 40). Für die trimeren rP2X4-Konkatamere wurde kein weiterer Linker verwendet, sodass auch kein Vergleich möglich ist.

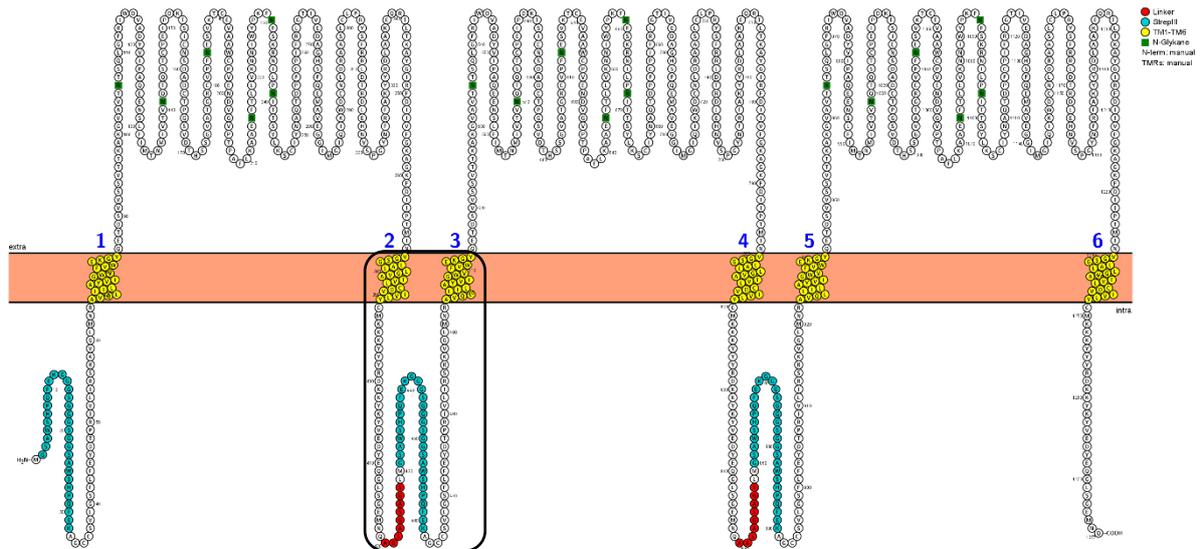


Abb. 39 Topologie des trimeren rP2X4-Konkatamers mit dem (AGS)₃-Linker

Die rP2X4-Untereinheit ist dreimal über den (AGS)₃-Linker kovalent aneinandergelknüpft. Die N- und C-terminalen Domänen befinden sich intrazellulär. Zwischen den Transmembrandomänen (TM1 bis TM6 gelb) befinden sich die extrazellulären Domänen inklusive der insgesamt 18 N-Glykosylierungsstellen (grüne Vierecke). Intrazellulär befinden sich der StrepIII-Tag (türkis) sowie der AGAG-Linker (rot). Das Topologiemodell wurde mittels der Protter Software (Omasits et al. 2014) erstellt.

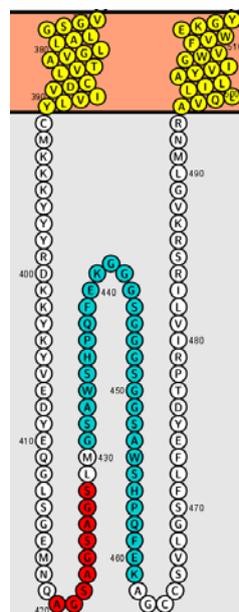


Abb. 40 Topologie der Linker und StrepIII-Sequenz der rP2X4-Untereinheit

Die Linker-Sequenz (AGS)₃ (rot) der rP2X4-Untereinheit sowie der StrepIII-Tag (türkis) befinden sich intrazellulär zwischen der TM2 und TM3 (gelb).

4.6.2 Einfluss der Transkription auf die Expression der homomeren Konkatomere

Um einen weiteren direkten Vergleich der Expressionsausbeute durchführen zu können, wurde das Capping der homotrimeren und homotetrameren Konkatomere sowohl posttranskriptionell als auch kotranskriptionell durchgeführt. Die Unterschiede der Synthese sind im Kapitel 3.2.5 ausführlich erläutert wurden.

Zu erkennen ist, dass die Plasmamembranexpression des kotranskriptionell gecappten, homotrimeren StrepIII-rP2X7-Konkatamers etwas stärker als die des posttranskriptionell gecappten homotrimeren StrepIII-rP2X7-Konkatamers (vgl. Abb. 41 A, Spuren 7, 8 mit 9, 10). Im Vergleich dazu ist die Gesamtexpression des posttranskriptionell gecappten, trimeren StrepIII-rP2X7-Konkatamers etwas stärker (vgl. Abb. 41 B, Spuren 7,8 mit 9, 10). Insgesamt weisen beide trimeren rP2X7-Konkatamere sehr wenige bzw. keine Abbau-Produkte weder an der Plasmamembran noch in der Gesamtexpression auf (Abb. 40).

Des Weiteren wurde das kotranskriptionell und posttranskriptionell gecappte, homotetramere StrepIII-rP2X7-Konkatamer verlinkt mit (GGSGG)₃-Linker exprimiert. In der Plasmamembran sind in beiden Fällen hauptsächlich trimere und tetramere StrepIII-rP2X7-Konkatamere zu erkennen (Abb. 41 A, Spuren 17 - 20). Ob es sich bei den detektierten Tetrameren in der Plasmamembran auch tatsächlich um StrepIII-rP2X7-Tetramere handelt, oder sich ein Trimer mit einem Monomer zum Tetramer zusammengefügt hat, kann nicht eindeutig gesagt werden. Da auch nach der partiellen Denaturierung Banden mit der entsprechenden Masse des Monomers, Trimers und Tetramers zu erkennen sind (Abb. 41 A, Spuren 19 und 20).

Die Dissoziation des tetrameren StrepIII-rP2X7-Konkatamers Tetramers beim ER-Export könnte die Ursache für die verringerte Plasmamembranexpression des Tetramers sowie das Vorhandensein der weiteren Spaltprodukte, insbesondere des Trimers sein (vgl. Abb. 41 A und B, Spuren 18, 20). Das posttranskriptionell gecappte, tetramere StrepIII-rP2X7-Konkatamer zeigt insgesamt mehr Abbau-Produkte in der Plasmamembran als das kotranskriptionell gecappte Tetramer.

In einem weiteren Versuch (Exp. 84) wird das ko- und posttranskriptionell gecappte, trimere (StrepIII-rP2X7)-Konkatamer sowie das ko- und posttranskriptionell gecappte StrepIII-(rP2X7)-Konkatamer exprimiert. Vergleicht man die unterschiedlich gecappten

Konstrukte, erkennt man, dass in beiden Fällen das posttranskriptionelle Capping in erhöhter Expression resultiert, jedoch auch mehr Hintergrundbanden bzw. Abbau-Produkte detektierbar sind (Abb. 44, Spuren 17-24).

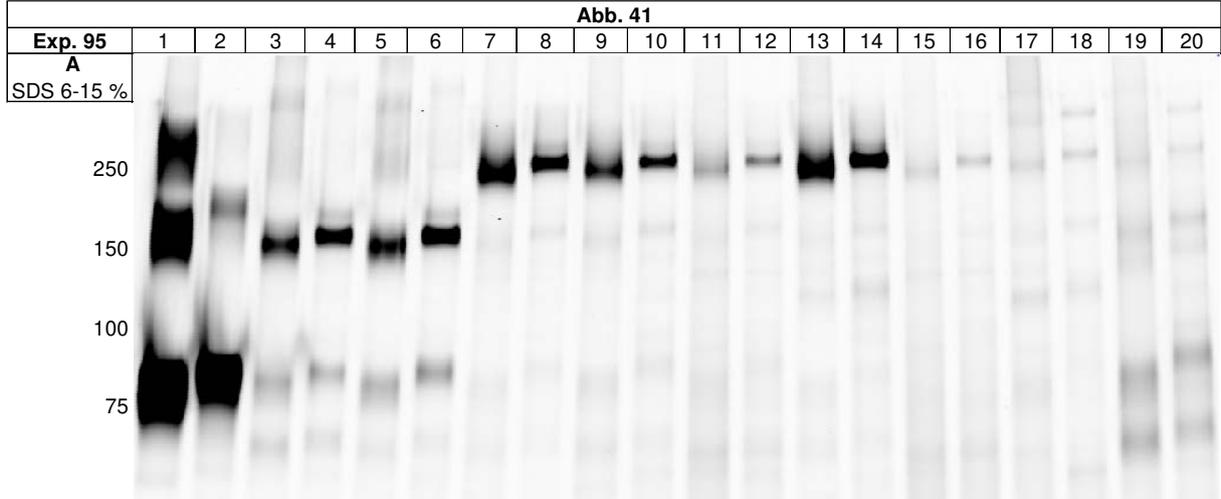
Um genauer zu überprüfen, ob das kotranskriptionelle oder posttranskriptionelle Capping besser für die Expression geeignet ist, wurden weitere cRNAs basierend auf denselben DNAs der rP2X4-Konkatamere synthetisiert. Auch hier lässt sich die Erkenntnis machen, dass das posttranskriptionelle Capping eine höhere Expressionsausbeute erzielt, aber gleichzeitig zu mehr Abbau-Produkten und Hintergrundbanden führt (Abb. 44, 5-12 u. Abb. 45). Daher habe ich entschieden das kotranskriptionelle Capping für die Synthese der weiteren Konkatamere anzuwenden.

4.6.3 Einfluss der Protease-Inhibitoren auf die Expression der homomeren Konkatamere

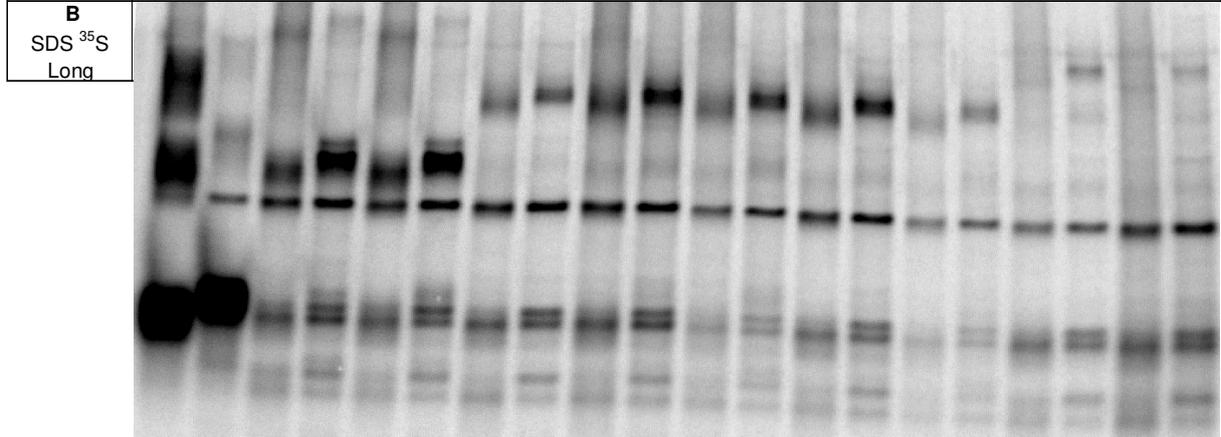
Bei der Aufarbeitung wurden einige Gruppen zusätzlich mit dem Protease-Inhibitor Pefabloc inkubiert. Das Pefabloc sollte dazu dienen die Entstehung unerwünschter Addukte durch proteolytische Spaltung zu verhindern, indem es die Serin- und Cystein-Proteasen inhibiert.

Die posttranskriptionell gecappten, trimeren rP2X7-Konkatamere wurden in *X. laevis*-Oozyten exprimiert, welche am Tag der Aufarbeitung zusätzlich mit Pefabloc inkubiert wurden. Die zusätzliche Behandlung wurde an den unterschiedlich verlinkten Trimeren durchgeführt und führt in beiden Fällen zur verminderten Plasmamembran- und Gesamtproteinexpression (Abb. 41, Spuren 9 – 16). Zur weiteren Untersuchung der Konkatamere wurde daher die konventionelle Aufarbeitung durchgeführt.

Abb. 41



Konstrukt	S3-rP2X7	S3-rP2X7		S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7		S3- rP2X7 _{2AG} ⁻ - S3- rP2X7 _{2AG} ⁻ - S3-rP2X7		S3- rP2X7 _{2AG} ⁻ - S3- rP2X7 _{2AG} ⁻ - S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3- rP2X7 - 3(GGSGG) ⁻ - S3- rP2X7		
Modifikation									Post-Capping	Post-Capping			Post-Capping				Post-Capping			
Protease Inhibitor										Pefabloc				Pefabloc						
DTT	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Beads	Strep-Tactin																			



Konstrukt	S3-rP2X7	S3-rP2X7		S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7		S3- rP2X7 _{2AG} ⁻ - S3- rP2X7 _{2AG} ⁻ - S3-rP2X7		S3- rP2X7 _{2AG} ⁻ - S3- rP2X7 _{2AG} ⁻ - S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3-rP2X7		S3-rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - rP2X7- 3(GGSGG) ⁻ - S3- rP2X7 - 3(GGSGG) ⁻ - S3- rP2X7		
Modifikation									Post-Capping	Post-Capping			Post-Capping				Post-Capping			
Protease Inhibitor										Pefabloc				Pefabloc						
DTT	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Beads	Strep-Tactin																			

Abb. 41 Plasmamembran- und Gesamtexpression der homomeren rP2X7-Konkatamere (Exp. 95)

Die cRNA der angegebenen Konstrukte wurde in *X. laevis*-Oozyten injiziert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. **A** Plasmamembranexpression (IR800-NHS Fluoreszenz-Scan). Am linken Rand sind die Massen der All-Blue-Marker Proteine angezeigt. **B** Gesamtexpression ($[^{35}\text{S}]$ -Methionin-Scan).

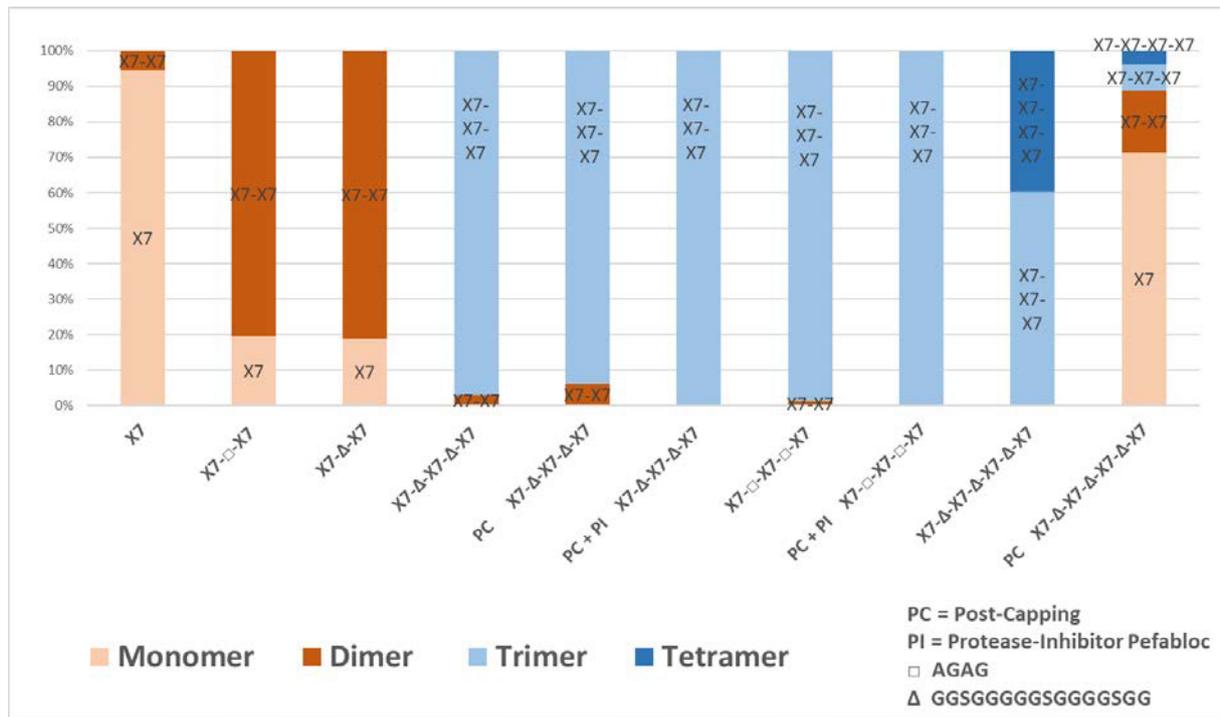


Abb. 42 Quantifizierung der Abbau-Produkte der rP2X7-Konkatamere in der Plasmamembran (Exp. 95)

Dargestellt sind die Verhältnisse der Abbau-Produkte der Konkamate in der reduzierten Zustand (+DTT). Die hellorangenen Balken stellen die Monomere dar, die dunkelorange Balken die Dimere, die hellblauen Balken die Trimere und die dunkelblauen die Tetramere. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der BioRad ImageLab Software.

4.6.4 Einfluss der StrepIII-Tags auf die Expressionsausbeute der homomeren Konkamate

Ein weiterer Unterschied der aufgeführten Konstrukte besteht in der Anzahl der angefügten StrepIII-Tags. So sind die Konkamate entweder mit einem StrepIII-Tag in der N-terminalen Endodomäne des Trimers versehen oder jede Untereinheit des Trimers besitzt einen StrepIII-Tag in der N-terminalen Endodomäne, sodass insgesamt der StrepIII-Tag dreimal im Konstrukt vorkommt (Abb. 37 u. 39). Das Einfügen des StrepIII-Tags in jede Untereinheit führt zur erhöhten Affinität des Proteins an das Strep-Tactin. So ist nach der Aufreinigung des trimeren (StrepIII-rP2X7)-Konkaters eine

intensivere Bande bei ~ 270 kDa detektierbar als bei dem trimeren StrepIII-(rP2X7) – Konkamer (vgl. Abb. 43, Spuren 17, 18 mit 21, 22). Der trimere (StrepIII-rP2X4)-Konkamer kann ebenfalls besser detektiert werden als der trimere StrepIII-(rP2X4)-Konkamer (vgl. Abb. 43, Spuren 5, 6 mit 9, 10).

Vergleicht man die rP2X4-Dimere erkennt man, dass das dimere (StrepIII-rP2X4)-Konkamer einen höheren Anteil an StrepIII-rP2X4-Monomeren aufweist als das dimere StrepIII-(rP2X4)²-Konkamer (Abb. 44). Die Ursache liegt darin, dass das dimere StrepIII-(rP2X4)-Konkamer in die Untereinheiten StrepIII-rP2X4 und rP2X4 dissoziiert, aber nur StrepIII-rP2X4 über Strep-Tactin aufgereinigt werden kann. Im Falle des dimeren (StrepIII-rP2X4)-Konkamers sind beide Untereinheiten mit dem StrepIII-Tag versehen, sodass alle dissoziierten Proteine über Strep-Tactin aufgereinigt werden können (vgl. Abb. 43 A, Spuren 1, 2 mit 3, 4). Um die Dissoziation der Konkamere in die Untereinheiten besser nachverfolgen zu können, wurde bei den nachfolgenden Konkameren ein StrepIII-Tag an jede Untereinheit geknüpft.

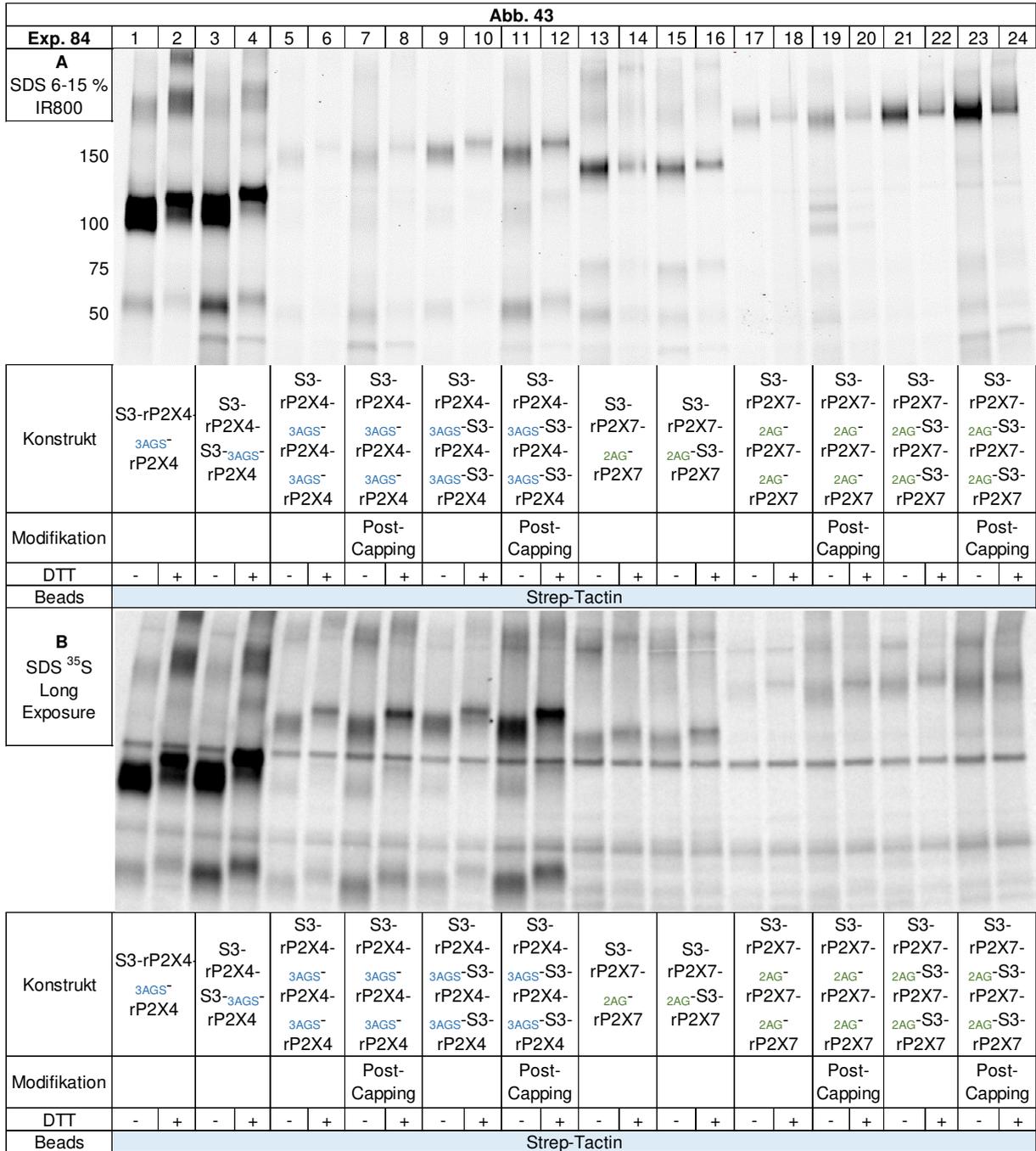


Abb. 43 Plasmamembran- und Gesamtexpression der homomeren rP2X4- und rP2X7-Konkatamere (Exp. 84)

Die cRNA der angegebenen Konstrukte wurde in *X. laevis* Oozyten injiziert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. A Plasmamembranexpression IR800-NHS Fluoreszenz-Scan. Am linken Rand sind die Massen der All-Blue-Marker Proteine angezeigt B Gesamtexpression [³⁵S]-Methionin-Scan. Die Abbildungen wurden mittels BioRad ImageLab und Microsoft Excel erstellt.

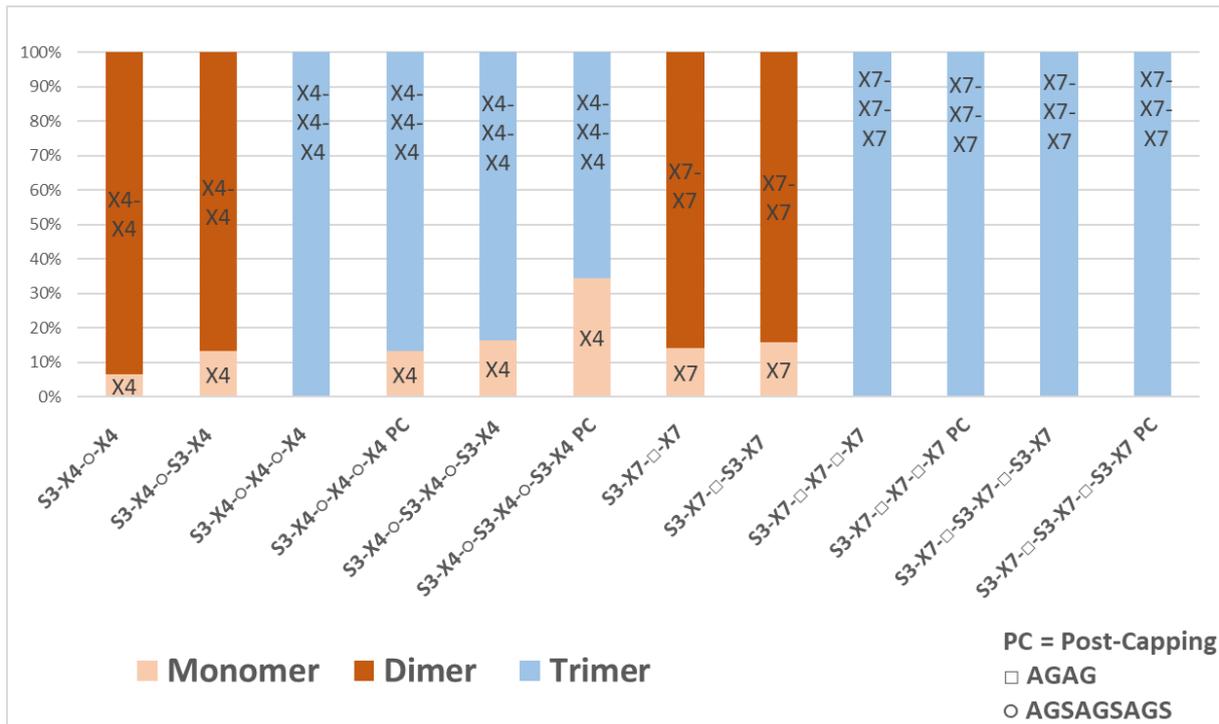


Abb. 44 Quantifizierung der proteolytischen Abbau-Produkte der rP2X7-Konkatamere in der Plasmamembran (Exp. 84)

Dargestellt sind die Verhältnisse der proteolytischen Abbau-Produkte der Konkatamere im reduzierten Zustand. Die hellorangenen Balken stellen die Monomere dar, die dunkelorange Balken die Dimere, die hellblauen Balken die Trimere und die dunkelblauen die Tetramere. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der BioRad ImageLab Software.

4.7 Heteromere Konkatamere

Da die rP2X4-Konkatamere ohnehin schon zur proteolytischen Spaltung neigen und durch das posttranskriptionelle Capping die Abbau-Produkte zunehmen, habe ich beschlossen das kotranskriptionelle Capping bei der Synthese der heteromeren Konkatamere anzuwenden. Des Weiteren sind alle Untereinheiten der aufgeführten homo- und heteromeren Konkatamere mit einem StrepIII-Tag versehen, sodass die dissoziierten Untereinheiten ebenfalls über Strep-Tactin aufgereinigt werden können und um die maximale Signalintensität der exprimierten Proteine im Fluoreszenzscan zu erreichen.

Parallel zu den heteromeren Konkatameren sind die homodimere und -trimere der rP2X4- und rP2X7- Konkatamere sowie der zugehörige Wildtyp abgebildet. Da die Konkatamere der nach drei Tagen aufgearbeiteten Oozyten im Vergleich zu der nach zwei Tagen exprimierten Proteinen eine signifikante Verbesserung der Plasmamembranexpression aufweisen, fand die Aufarbeitung am dritten Tag statt. Um

dennoch eine Überexpression des rP2X4- und rP2X7-Wildtyps zu vermeiden, wurden die entsprechenden cRNAs jeweils 1:30 mit Tris/HCl vor der Injektion verdünnt (Abb. 47, Spuren 1, 2, 23, 24).

4.7.1 Einfluss der Linker auf die Plasmamembranexpression der heteromeren Konkatomere

Wie bereits vermutet, sind kurze Linker für die Stabilität der homomeren Konkatomere besser geeignet. Um dennoch sicher zu gehen, dass das auch für die heteromeren Konkatomere der Fall ist, wurden weitere heteromere Konkatomere mit den langen Linkern AGSAGGSAGGSSGG sowie GGSAGGSSAGGSSGG erstellt. Es wurden die Heteromere bestehend aus zwei aufeinanderfolgenden rP2X4-Untereinheiten mit einer rP2X7-Untereinheit zu Beginn oder am Ende des Leserasters exprimiert (X4-X4-X7 und X7-X4-X4). Durch den langen Linker wird in beiden Fällen die proteolytische Spaltung vermehrt in der Plasmamembran und im Gesamtprotein verursacht (vgl. Abb. 47, Spuren 11,12 mit 13,14 und 15,16 mit 17,18). Demzufolge eignet sich der kurze Linker sowohl für die homomeren als auch für die heteromeren Konkatomere am besten.

4.7.2 Einfluss der Reihenfolge auf die Expression der heteromeren Konkatomere

Wie bereits gezeigt wurde und auch in dem folgenden Experiment erkennbar ist, weist das homotrimere StrepIII-rP2X7-Konkatamer fast keine Abbau-Produkte auf, während das homotrimere StrepIII-rP2X4-Konkatamer deutlich stärker proteolytische Abbau-Produkte aufweist (vgl. Abb. 49 A Spuren 7, 8 mit 19, 20). Besonders auffällig ist, dass die heteromeren Konkatomere bestehend aus zwei rP2X4 und einer rP2X7 nicht nur einen großen Teil an rP2X4-Monomeren aufweisen, sondern auch auf der Höhe des rP2X4-Dimers die Banden detektierbar sind. Für den rP2X7 sind weiterhin keine dem Monomer oder Dimer zugehörige Bande detektierbar (Abb. 49 A, Spuren 7-12). Ebenso bemerkenswert ist, dass das Heteromer aus zwei rP2X4 und einer rP2X7-Untereinheit (X4-X7-X4) die meisten Abbau-Produkte aufweist, während das Heteromer mit umgekehrter Stöchiometrie (X7-X4-X7) am wenigsten bzw. keine Abbau-Produkte aufweist (vgl. Abb. 49 A, Spuren 11, 12 und 15, 16).

Neben der Stöchiometrie scheint auch die Reihenfolge der Untereinheiten einen großen Einfluss auf die Stabilität der Konkamere zu haben. Besteht das heteromere Trimer aus zwei aufeinanderfolgenden rP2X4-Untereinheiten und einer rP2X7-Untereinheit (beispielweise X4-X4-X7 oder X7-X4-X4), so resultiert die proteolytische Spaltung hauptsächlich in rP2X4-Monomere und Dimere (Abb. 47, Spuren 13-18). Noch ungünstiger scheint die Reihenfolge X4-X7-X4 zu sein, wobei die Verhältnisse der Abbauprodukte dem relativ instabilen rP2X4-Trimer ähnelt (Abb. 47, Spuren 19, 20). Auf der anderen Seite zeigt die Reihenfolge X7-X4-X7 fast kein Abbau-Produkte und ähnelt bezüglich der Stabilität dem Trimer X7-X7-X7 (Abb. 49, Spuren 15, 16).

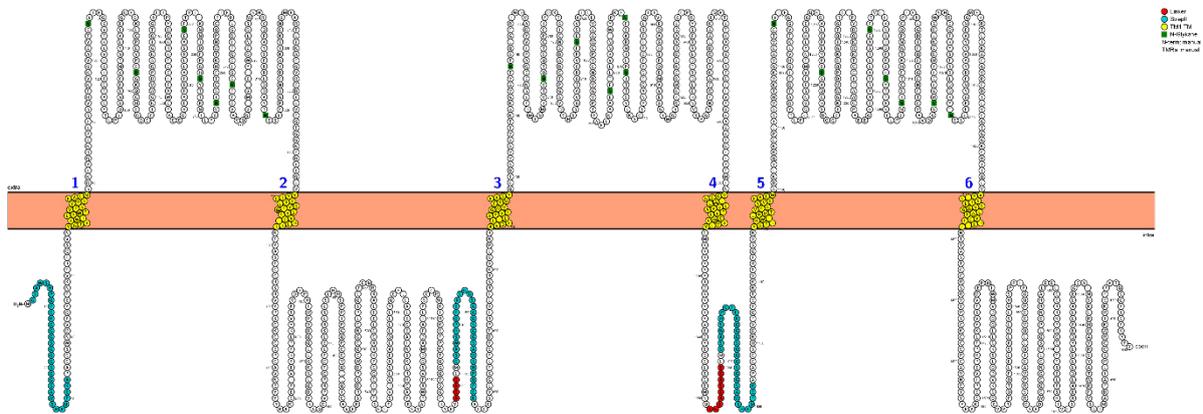


Abb. 45 Topologie des heteromeren rP2X7-rP2X4-rP2X7-Konkatamers

Die rP2X7-Untereinheit ist über den AGAG-Linker kovalent an die rP2X4-Untereinheit geknüpft, welche wiederum über den $(AGS)_3$ -Linker kovalent an eine rP2X7-Untereinheit geknüpft ist. Die N- und C-terminalen Domänen befinden sich intrazellulär. Zwischen den Transmembrandomänen (TM1 bis TM6 gelb) befinden sich die extrazellulären Domänen inklusive der insgesamt 18 N-Glykosylierungsstellen (grüne Vierecke). Intrazellulär befinden sich der StreptIII-Tag (türkis) sowie der AGAG-Linker und $(AGS)_3$ -Linker (rot). Das Topologiemodell wurde mittels der Protter Software (Omasits et al. 2014) erstellt.

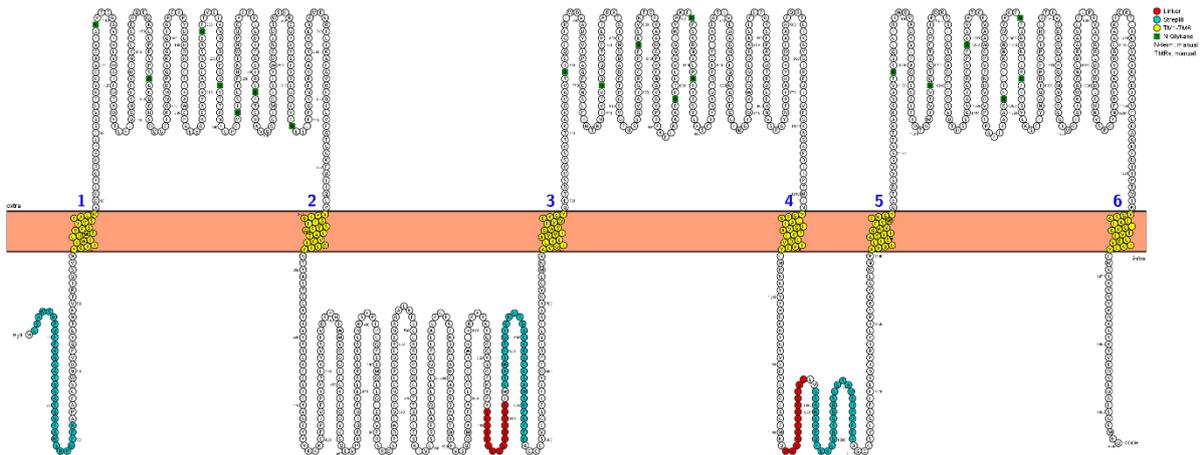


Abb. 46 Topologie des heteromeren rP2X7-rP2X4-rP2X4-Konkatamers

Die rP2X7-Untereinheit ist über den $(GGSGG)_3$ -Linker kovalent an die rP2X4-Untereinheit geknüpft, welche wiederum über den AGSAGGSAGGSGG-Linker kovalent an eine weiteren rP2X4-Untereinheit geknüpft ist. Die N- und C-terminalen Domänen befinden sich intrazellulär. Zwischen den Transmembrandomänen (TM1 bis TM6 gelb) befinden sich die extrazellulären Domänen inklusive der insgesamt 18 N-Glykosylierungsstellen (grüne Vierecke). Intrazellulär befinden sich der StrepIII-Tag (türkis) sowie der $(GGSGG)_3$ -Linker und AGSAGGSAGGSGG-Linker (rot). Das Topologiemodell wurde mittels der Protter Software (Omasits et al. 2014) erstellt.

4.7.3 Einfluss der Protease-Inhibitoren auf die Expression der heteromeren Konkatamere

Da der homomere rP2X4-Trimer und die heteromeren Trimere am stärksten zur proteolytischen Spaltung neigen, wurden mehrere Ansätze unternommen, um dem entgegenzuwirken. So wurde unter anderem ein weiterer Protease-Inhibitor eingesetzt. Der sogenannte Cocktail-Protease-Inhibitor beinhaltet neben den sonst verwendeten Inhibitoren AEBSF, Leupeptin und Pepstain, die weiteren Protease-Inhibitoren Aprotinin (Serinprotease-Inhibitor), Bestatin (Aminopeptidase-Inhibitor) und E-64 (Cysteinprotease-Inhibitor). Bei der Aufarbeitung wurden jeweils zwei Gruppen der unterschiedlich verlinkten trimeren StrepIII-rP2X4-Konkatamere mit dem Cocktail-Inhibitor und den sonst verwendeten Protease-Inhibitoren inkubiert. Vergleicht man die Abbau-Produkte der gleich verlinkten, aber unterschiedlich behandelten Proteine, erkennt man, dass das Verhältnis der dissoziierten Oligomerezustände stark übereinstimmt (vgl. Abb. 47, Spuren 3,4 mit 7,8 sowie 5, 6 mit 9, 10). So zeigen die trimeren rP2X4-Konkatamere mit einem kurzen Linker weniger Abbau-Produkte als die trimeren Konkatamere mit einem langen Linker (Abb. 48). Viel maßgebender für die proteolytische Spaltung scheint somit der Linker zu sein. Wenn die rP2X4-Trimere

über den Linker AGSAGGSAGGSSGG verkettet werden, ist die Expression zwar stärker, aber die prozentualen Verhältnisse der Oligomierzustände zeigen, dass es mehr Monomer und Dimer-Produkte gibt (Abb. 48).

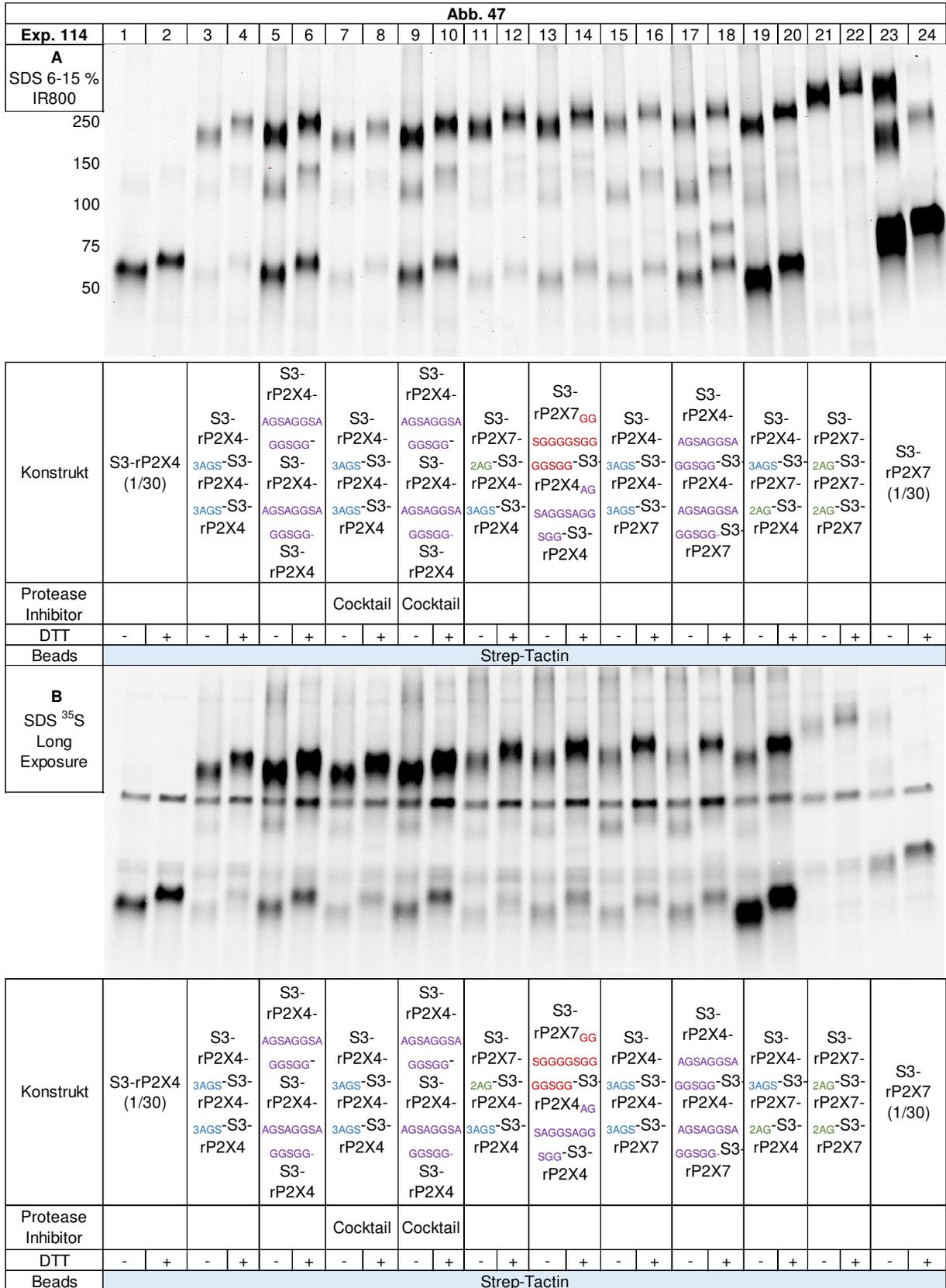


Abb. 47 Plasmamembran- und Gesamtexpression der homomeren und heteromeren rP2X4- und rP2X7-Konkatamere (Exp. 114)

Die cRNA der angegebenen Konstrukte wurde in *X. laevis*-Oozyten injiziert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf **A** Plasmamembranexpression **B** Gesamtexpression.

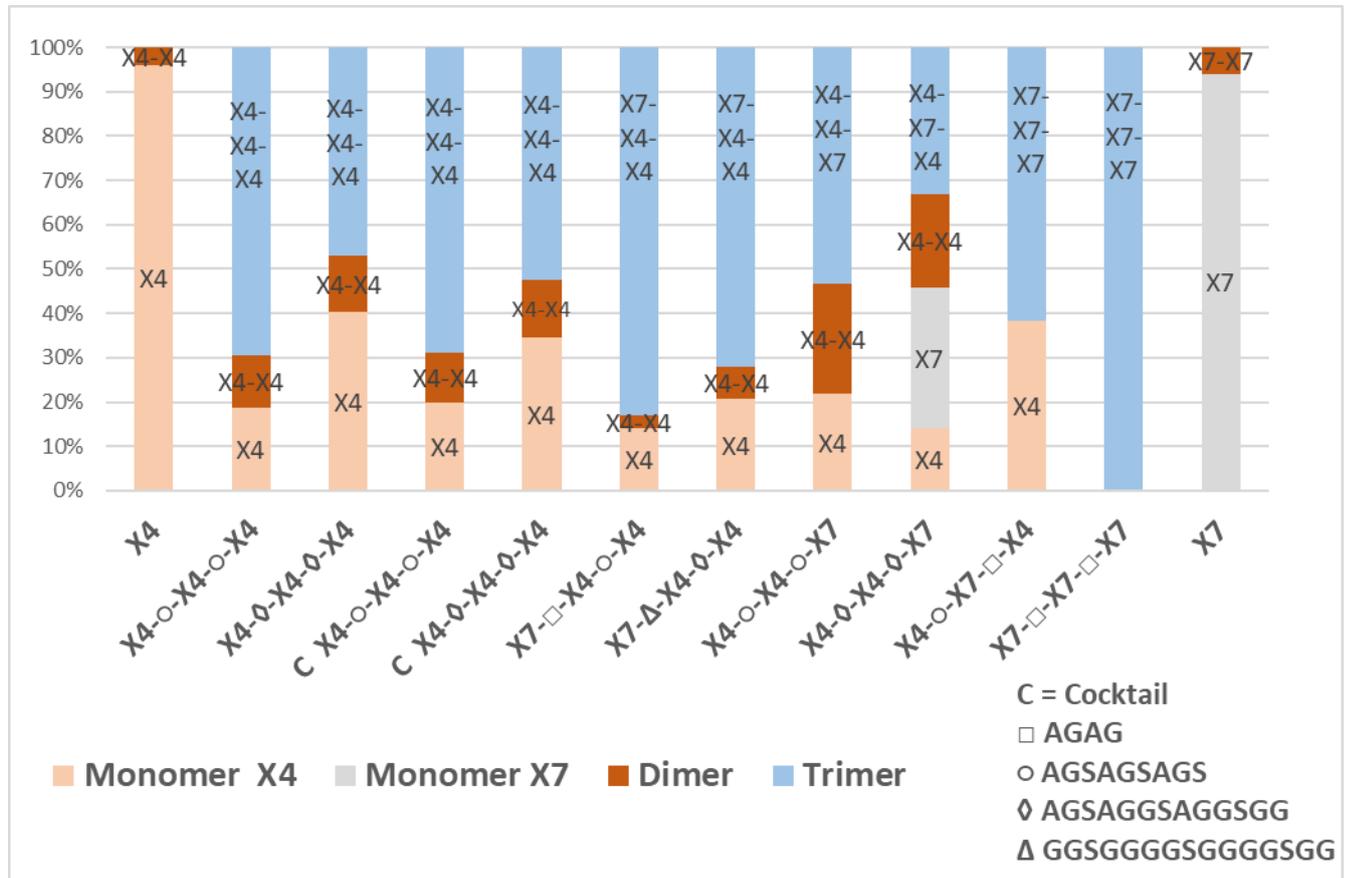


Abb. 48 Quantifizierung der proteolytischen Spaltungsprodukte der rP2X7-Konkatamere in der Plasmamembran (Exp. 114)

Dargestellt sind die Verhältnisse der proteolytischen Spaltungsprodukte der Konkatamere im reduzierten Zustand. Die hellorangenen Balken stellen die Monomere dar, die dunkelorange Balken die Dimere, die hellblauen Balken die Trimere und die dunkelblauen die Tetramere. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der BioRad ImageLab Software.

Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl die homotrimeren rP2X7-Konkatamere als auch die heterotrimeren Konkatamere mit einer Stöchiometrie von 2:1 (X7:X4) insgesamt viel weniger Abbau-Produkte aufweisen als die homotrimeren rP2X4-Konkatamere und die heterotrimeren Konkatamere mit einer Stöchiometrie von 1:2 (X4:X7). Zudem führen die kurzen Linker wie beispielsweise AGAG und (AGS)³ weniger zur proteolytischen Spaltung als die langen Linker AGSAGGSAGGSSGG oder (GGSGG)³.

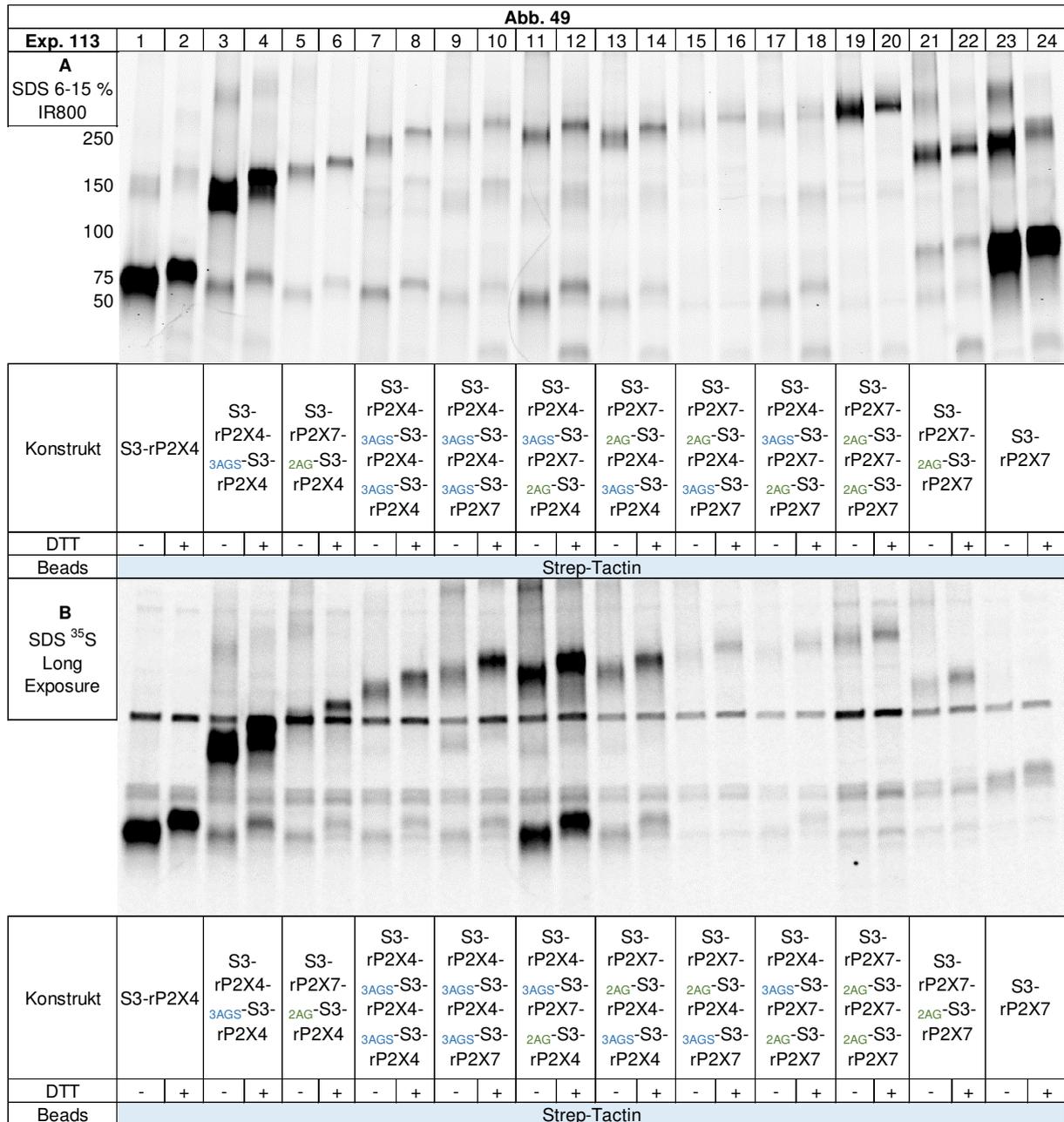


Abb. 49 Plasmamembran- und Gesamtexpression der homomeren und heteromeren rP2X4- und rP2X7-Konkatamere (Exp. 113)

Die cRNA der angegebenen Konstrukte wurde in *X. laevis*-Oozyten injiziert. Die Aufarbeitung und Auftrennung der exprimierten Proteine entspricht dem unter Abb. 18 detailliert beschriebenen Verlauf. **A** Plasmamembranexpression IR800-NHS Fluoreszenz-Scan. Am linken Rand sind die Massen der All-Blue-Marker Proteine angezeigt. **B** Gesamtexpression [³⁵S]-Methionin-Scan.

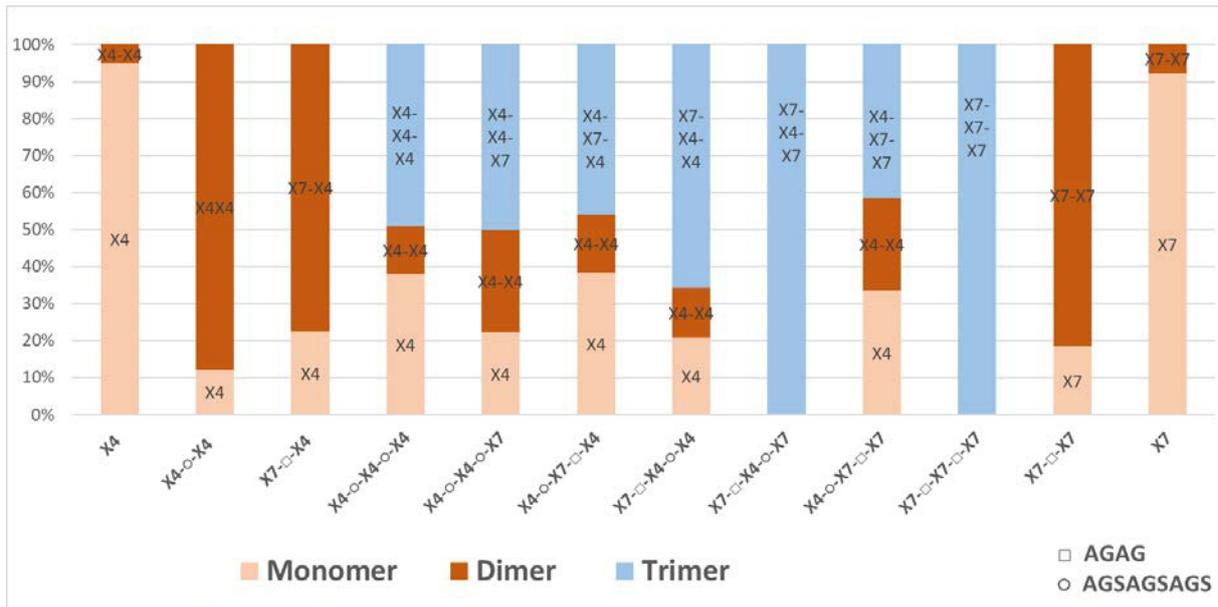


Abb. 50 Quantifizierung der proteolytischen Spaltungs-Produkte der rP2X7-Konkatamere in der Plasmamembran (Exp. 113)

Dargestellt sind die Verhältnisse der proteolytischen Spaltung -Produkte der Konkamate im reduzierten Zustand. Die hellorangenen Balken stellen die Monomere dar, die dunkelorange Balken die Dimere, die hellblauen Balken die Trimere und die dunkelblauen die Tetramere. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der BioRad ImageLab Software.

5 Diskussion

5.1 hP2X7B-Rezeptor

5.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von hP2X7B

Becker et al. konnten in Übereinstimmung mit früheren Studien nachweisen, dass die Trunkierung der C-terminalen Endodomäne stark die Kanalfunktionalität beeinträchtigt. Die Trunkierung der C-terminalen Endodomäne des hP2X7 führte zu reduzierten ATP-induzierten Strömen und zum Verlust seiner biphasischen Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik (Becker et al. 2008; Klapperstück et al. 2001). Der natürlich vorkommenden Spleißvariante hP2X7B und dem C-terminal trunkierten hP2X7A ist gemeinsam, dass sie trotz der fehlenden C-terminalen Endodomäne die Funktion des Rezeptors als ATP-gesteuerter Kanal für kleine Ionen beibehalten. Trotzdem sind die ATP induzierten Ströme des hP2X7B zehnfach größer sind als die des trunkierten hP2X7A¹⁻³⁶⁴-Rezeptors. Ebenso bemerkenswert ist, dass der hP2X7B, auch nach zusätzlicher Trunkierung der C-terminalen Endodomäne um 3 bzw. 6 Aminosäuren, noch immer größere Strömungen macht als der hP2X7A¹⁻³⁴⁶.

Ferner zeigten Studien am P2X7-Rezeptor, dass die Trunkierung der C-terminalen Endodomäne durch Verkürzung der Vollängen-hP2X7-Untereinheit von 595 auf 436 bzw. 408 Aminosäuren in einer verstärkten Plasmamembranexpression und gleichzeitig reduzierten Funktionalität resultiert. Elektrophysiologische Messungen bestätigten, dass nach Koexpression der Konstrukte hP2X7A¹⁻⁴³⁶ bzw. hP2X7A¹⁻⁵⁰⁵ und dem Rest 434-595 der elektrophysiologische Phänotyp des Rezeptors rekonstruiert werden konnte (Becker et al. 2008).

Übereinstimmend mit den biochemischen Ergebnissen von Adinolfi et al. (Adinolfi et al. 2010), konnte ich anhand von Zwei-Elektroden-Messungen nachweisen, dass die Rezeptoren hP2X7A und hP2X7B in der Plasmamembran heterotrimerisieren können. Das gebildete hP2X7A/B-Heterotrimer spiegelt die Kinetik-Eigenschaften beider Homotrimere wider. Je nachdem in welchem cRNA-Verhältnis die beiden Untereinheiten exprimiert wurden, ist der Phänotyp des stärker exprimierten Rezeptors zu erkennen. Wenn hP2X7A die vorherrschende Isoform im hP2X7A/B-Heterotrimer ist (sprich zwei Untereinheiten hP2X7A, eine Untereinheit hP2X7B), dann reagiert das

hP2X7A/B-Heterotrimer auf jede weitere ATP-Applikation mit größer werdenden Stromamplituden.

Während der ATP-Applikation desensibilisiert der hP2X7A/B-Rezeptor nicht (Abb. 11 B). Der hP2X7B-Rezeptor selbst hat dagegen die Eigenschaft bei der ersten ATP-Applikation zu desensibilisieren (Abb. 10 B), wird jedoch bei der Koexpression von den Kinetik-Eigenschaften des hP2X7A-Rezeptors dominiert (Abb. 11 B). Dennoch verstärkt die hP2X7B-Untereinheit durch ihren Einbau in das hP2X7A/B-Heterotrimer die Ionenkanalströme und bewirkt größere Stromamplituden als der homotrimere hP2X7A-Rezeptor (Abb. 14). Ursache hierfür könnte zum einen die erhöhte Affinität des heterotrimeren hP2X7A/B-Rezeptor für ATP sein und zum anderen die größere Offen-Wahrscheinlichkeit des hP2X7A/B-Rezeptors (Adinolfi et al. 2010; Pippel et al. 2017).

Ist die hP2X7B-Untereinheit vorherrschend im hP2X7A/B-Heterotrimer (sprich zwei Untereinheiten hP2X7B und nur eine Untereinheit hP2X7A), so kommt es bei der ersten ATP-Applikation zur relativ schnellen Desensibilisierung des Rezeptors und durch jede weitere ATP-Applikation wird ein Steady-Strom ausgelöst, deren maximal erreichte Stromamplitude signifikant kleiner ist als die der ersten Applikation (Abb. 11A). Die strukturelle Besonderheit der hP2X7B-Untereinheit besteht darin, dass sie wegen der fehlenden Endodomäne keine zytoplasmatische Kappe ausbilden kann und trotzdem desensibilisiert der homotrimere hP2X7-Rezeptor während der zweiten und dritten ATP-Applikation nicht. Im Kontrast dazu verliert der P2X7A-Rezeptor seine nicht-desensibilisierenden Eigenschaften, sobald die C-terminale Endodomäne auf die Länge des P2X7B-Rezeptors trunkiert wird (Abb. 13 B). Die Auflösung der Kristallstruktur konnte zeigen, dass die zytoplasmatische Kappe im Apogeschlossenen und offenen Zustand des P2X7A-Rezeptors vorkommt und dadurch den offenen Kanal stabilisiert und die Konformation des nicht desensibilisierenden Rezeptors festigt (McCarthy et al. 2019). Der hP2X7A-Rezeptor benötigt die C-terminale Endodomäne somit nicht nur für die uneingeschränkte Kanalfunktion, sondern auch um die Desensibilisierung zu verhindern.

Während der trunkierte hP2X7A-Rezeptor ohne die zytoplasmatische Kappe bei allen aufeinanderfolgenden ATP-Applikationen mit nicht-desensibilisierenden Strömen reagiert, zeigt der hP2X7B-Rezeptor nur bei der ersten ATP-Applikation einen

desensibilisierenden Strom und reagiert auf die darauffolgenden Applikationen mit nicht-desensibilisierenden Strömen. Die Ausbildung der zytoplasmatischen Kappe findet bei dem schnell desensibilisierenden P2X3-Rezeptor nur im ATP-gebundenen offenen Zustand statt und im geschlossenen oder im desensibilisierten Zustand wird die zytoplasmatische Kappe entfaltet. Mansoor et al. legen dar, dass schnell desensibilisierende P2X-Subtypen eine weniger stabile Kappe haben, während die Stabilität der zytoplasmatischen Kappe bei langsam desensibilisierenden Subtypen erhöht ist (Mansoor et al. 2016; Kanellopoulos et al. 2021). Da P2X7B ein Desensibilisierungsmuster aufweist, das zuerst dem schnell desensibilisierenden P2X3 und bei wiederholter ATP-Applikation dem nicht-desensibilisierenden P2X7 ähnelt, könnte man vermuten, dass die zytoplasmatische Kappe der P2X7B-Untereinheit nur bei der ersten ATP-Applikation gebildet werden kann und danach nicht mehr. Es bleibt weiterhin die Frage, wie die zytoplasmatische Kappe gebildet werden kann, wenn die C-terminale Endodomäne neun Aminosäuren umfasst. Die Bewertung der Funktion der C-terminalen Endodomäne und die Bildung der zytoplasmatischen Kappe erfordert jedoch eine detaillierte Analyse auf molekularer Ebene.

Adinolfi et al. haben aufgrund der hohen Identität und Ähnlichkeit zwischen P2X7B und P2X4 die Vermutung aufgestellt, dass der P2X7B ursprünglich durch die Duplikation des p2X4-Gens entstanden ist (Adinolfi et al. 2010). Betrachtet man die Kinetik-Eigenschaften des P2X4-Rezeptors, erkennt man dass die ATP-Applikation einen relativ ähnlichen Stromverlauf wie der des P2X7B-Rezeptors auslöst (Schneider et al. 2017). Da die Röntgenkristallstrukturen des P2X4-Rezeptors über einen verkürzten P2X4-Rezeptor erhalten wurden, sind keine Strukturinformationen über die Existenz der zytoplasmatischen Kappe des P2X4-Rezeptors bekannt (Kawate et al. 2009). Um eine klare Aussage treffen zu können, müssten die Röntgenkristallstrukturen der Rezeptoren P2X7B und P2X4 aufgelöst und verglichen werden.

5.1.2 Biochemische Charakterisierung von hP2X7B

Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchung zeigten, dass die Gesamtzellexpression der trunkierten hP2X7A-Varianten etwas stärker ist als die der trunkierten hP2X7B-Varianten bzw. der hP2X7B-Spleißvariante. Die

Plasmamembranexpression ist hingegen deutlich stärker. Dabei fällt auf: Umso länger die C-terminale Endodomäne des hP2X7A ist, desto besser ist die Expression in der Plasmamembran. Smart et al. haben sich auf zwei Abschnitte in der C-terminalen Endodomäne festgelegt, welche den Rezeptortransport und die Plasmamembranexpression regulieren sollen (Smart et al. 2003). Beide Bereiche liegen zwischen den Aminosäureresten 551-582 und sind somit in den von uns exprimierten hP2X7A-Varianten (His-hP2X7A¹⁻³⁴⁶, His-hP2X7A¹⁻³⁵⁵, His-hP2X7A¹⁻³⁶⁴) nicht vorhanden. Dennoch werden die trunkierten hP2X7A-Varianten ab Pos. 355 (His-hP2X7A¹⁻³⁵⁵) gut in der Plasmamembran exprimiert. Daraus lässt sich folgern, dass das der P2X7-Rezeptor auch ohne die C-terminale Endodomäne an der Plasmamembran exprimiert wird, jedoch muss die Aminosäuresequenz bis zur TM2 vollständig vorhanden sein.

Abschließend lässt sich sagen, dass die kleinen Ströme des C-terminal trunkierten hP2X7A auf die starke Verringerung der Kanalfunktion und nicht auf die Plasmamembranexpression zurückzuführen sind (Becker et al. 2008). Durch weitere Studien konnte eine Gruppe an hochkonservierten Resten, welche die ATP-Bindung koordinieren und die ATP-Empfindlichkeit beeinflussen, identifiziert werden. Die koordinierenden Aminosäuren liegen zwischen den Positionen 64 und 311 und sind somit von der Trunkierung der C-terminalen Endodomäne des hP2X7A nicht betroffen. Da die ATP-Empfindlichkeit durch die Trunkierung nicht beeinflusst wird, ist davon auszugehen, dass die verringerte Öffnungswahrscheinlichkeit der Ionenkanäle die Ursache für die verringerten ATP-induzierte Ströme ist. Für den hP2X7A-Rezeptor konnte bereits gezeigt werden, dass die Reste von S339 bis G345 in der TM2 die Offen-Wahrscheinlichkeit stark beeinflussen. Dabei spielt der Rest S342 die entscheidende Rolle als Gate-und Selektivitätsfilter (Pippel et al. 2017). Somit ist es zu erwarten, dass beispielsweise die trunkierte hP2X7A-Variante hP2X7¹⁻³⁴⁶ fast keine Ströme zeigt. Die hP2X7B-Untereinheit umfasst den Bereich der die Offen-Wahrscheinlichkeit des Kanals bestimmt und weist somit trotz verringerter Plasmamembranexpression größere Ströme auf als die trunkierten hP2X7A-Varianten. Die regulierenden Bereiche im hP2X7B-Rezeptor für die Kanalfunktionalität und die Plasmamembranexpression müssen noch genauer identifiziert werden.

5.1.3 Nachweis der Interaktion von hP2X7B und hP2X4

Bei der Untersuchung des hP2X7B-Rezeptors konnten Adinolfi et al. über die bekannte „Köder und Beute“-Methode die Heteromerisierung der Rezeptoren hP2X7A und hP2X7B nachweisen. Die Daten deuteten darauf hin, dass die Rezeptoren in der Plasmamembran mit einer variablen Stöchiometrie von 1:2 oder 2:1 zum Heteromer assemblieren (Adinolfi et al. 2010). Obwohl der P2X7B-Rezeptor lange bekannt ist, wurden noch keine P2X-Heterotrimere mit hP2X7B-Untereinheit beschrieben. (Cheewatrakoolpong et al. 2005). Ich habe daher biochemische Untersuchungen durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner des hP2X7B zu identifizieren. Da über lange Zeit hinweg der P2X4-Rezeptor als einziger möglicher Interaktionspartner des P2X7-Rezeptors betrachtet wurde, kam auch für unsere Untersuchung der P2X4-Rezeptor am ehesten in Frage (Guo et al. 2007; Schneider et al. 2017). Des Weiteren haben die P2X7A und P2X7B-Untereinheiten die höchste Aminosäuresequenzähnlichkeit mit dem P2X4-Rezeptor (Burnstock und Knight 2004). Die Ähnlichkeit zwischen P2X7A und P2X4 bzw. P2X7B und P2X4 wird auf 48,6 bzw. 71 % geschätzt (Adinolfi et al. 2010).

Der Nachweis erfolgte mittels biochemischer Methoden nach der Koexpression beider Rezeptoren. Durch Kombination von Fluoreszenzmarkierung und radioaktiver Markierung konnte ich parallel die Plasmamembran- und Gesamtexpression der möglichen Interaktionspartner analysieren. Wie bereits erwähnt, wird der P2X7B-Rezeptor sehr schwach in der Plasmamembran exprimiert, sodass die Interaktion anhand der Plasmamembranexpression schwer nachweisbar ist. Betrachtet man jedoch die Gesamtexpression, insbesondere den GFP-Fluoreszenzscan, so erkennt man die Banden des hP2X4/7B-Heterotrimers mit den entsprechenden Größen. Basierend auf den BN-PAGE-Analysen der koexprimierten Rezeptoren konnte die Stöchiometrie der interagierenden hP2X4- und hP2X7B-Rezeptoren bestimmt werden. Das hP2X4/7B-Heterotrimer kann sowohl aus einer hP2X4-Untereinheit und zwei hP2X7B-Untereinheiten, als auch aus zwei hP2X4-Untereinheiten und einer hP2X7B-Untereinheit gebildet werden. Ebenso zeigt die Gesamtexpression der radioaktiv markierten Proteine auf identischer Höhe die Banden der heteromeren Trimere. Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse des Experiments, dass die hP2X4- und hP2X7B-Untereinheiten zu einem Heterotrimer koassemblieren.

5.2 P2X7-Rezeptor

5.2.1 Nachweis der Interaktion von hP2X7 und weiteren hP2X-Isoformen

Die verschiedenen P2X-Isoformen können zu Homotrimeren und Heterotrimeren assemblieren. In den vergangenen Jahren konnte bereits die Expression für folgende Heteromere nachgewiesen werden: P2X1/2 (Brown et al. 2002; Aschrafi et al. 2004), P2X1/4 (Nicke et al. 2005), P2X1/5 (Torres et al. 1998b; Haines et al. 1999; Lê et al. 1998), P2X2/3 (Lewis et al. 1995; Liu et al. 2001; Radford et al. 1997), P2X2/5 (Compan et al. 2012), P2X2/6 (King et al. 2000; Barrera et al. 2007) und P2X4/6 (Lê et al. 1998). Die P2X7-Untereinheit ist die einzige Untereinheit aus der P2X-Familie, bei der bis heute kontrovers diskutiert wird, ob er zu Heteromeren assembliert. Neben der P2X4-Untereinheiten, wurden P2X2- und P2X6-Untereinheiten in unserer Arbeitsgruppe als mögliche Interaktionspartner der hP2X7A-Untereinheit identifiziert (Dissertation; Thomas Eisele).

Um die Heteromerisierung von hP2X7 nachzuweisen, habe ich alle hP2X-Isoformen mit hP2X7 koexprimiert und nach dem „Köder und Beute“ Schema analysiert. Die Koisolierung der koexprimierten hP2X-Isoformen ist sowohl in der Gesamtexpression als auch in der Plasmamembran ersichtlich und spricht dafür, dass eine Interaktion zwischen dem hP2X7 und den Isoformen hP2X1-hP2X6 vorliegt. Ob die Untereinheiten zum Heterotrimer assemblieren, welche nicht detektiert werden konnte, oder ob eine andere Art von Wechselwirkung vorliegt, kann jedoch nicht eindeutig gesagt werden.

Ich habe den Fokus auf den biochemischen Nachweis der Interaktion zwischen hP2X4 und hP2X7 gelegt. Die Untereinheiten haben eine hohe Sequenzähnlichkeit und die menschlichen P2X4- und P2X7-Genen weisen eine enge chromosomale Lage auf (Adinolfi et al. 2010; North 2002). Aktuelle Untersuchungen der koexprimierten P2X-Rezeptoren in BV-2-Mikrogliazellen mittels der Ganzzell-Spannungsklemmtechnik zeigen, dass die Untereinheiten unabhängig voneinander aktiviert werden und deuten demzufolge daraufhin, dass keine Heteromere gebildet werden. Des Weiteren wird die funktionelle Interaktion zwischen hP2X4- und hP2X7-Untereinheiten ausgeschlossen (Trang et al. 2020).

Untersuchungen der koexprimierten hP2X4- und hP2X7-Untereinheiten in *X. laevis*-Oozyten mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik haben hingegen gezeigt, dass physikalische und funktionelle Wechselwirkungen zwischen den Subtypen stattfinden. Schneider et al. stellen die Vermutung auf, dass Heteromere existieren, jedoch einer der beiden Untereinheiten den dominanten Phänotypen aufweist, abhängig davon welche Untereinheit zweimal in das Trimer integriert ist, und somit auch der Heteromer-Phänotyp entweder dem hP2X4 oder dem hP2X7 ähnlich ist (Schneider et al. 2017).

Die Charakterisierung der heterotrimeren Banden konnte ich schließlich durch die Koexpression von hP2X4 und den C-terminal trunkierten hP2X7-Rezeptoren hP2X7¹⁻⁴⁰⁸ und hP2X7¹⁻⁴³⁶ erzielen. Aufgrund der Fusionierung der hP2X7-Untereinheiten mit dem GFP-Protein konnten die Heteromere ebenso im GFP-Fluoreszenz-Scan detektiert werden. Die Detektion der heteromeren Intermediärbanden konnte ebenso in der Plasmamembran und im Gesamtprotein erfolgen. Becker (Becker et al. 2008) konnten mittels BN-PAGE-Analysen zeigen, dass die Trunkierung der hP2X7-Untereinheit zwar die Kanalfunktionalität beschränkt, jedoch keinen negativen Einfluss auf die Homotrimerisierung in der Plasmamembran- und Gesamtexpression hat. Ganz im Gegenteil, die trunkierte Variante wird, vielleicht aufgrund von fehlenden regulatorischen Transportmotiven in der C-terminalen Endodomäne (551-582), verstärkt in der Plasmamembran exprimiert (Smart et al. 2003). Des Weiteren wurde mehrfach festgestellt, dass die N- und C-terminale Endodomäne nicht essenziell für die Trimerisierung sind, sondern, dass vielmehr die Ektodomäne wesentlich die Assemblierung bestimmt (Torres et al. 1999; Duckwitz et al. 2006).

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse, dass die C-terminal trunkierte hP2X7 und hP2X4-Untereinheit heterotrimerisieren. Da die entscheidenden Faktoren für die Assemblierung in der Ektodomäne lokalisiert sind, deutet das Ergebnis auf eine mögliche Interaktion von hP2X7 und hP2X4 hin.

5.2.2 Nachweis der Interaktion von rP2X7- und weiteren rP2X-Isoformen

Während die ersten Ko-Immünpräzipitationsstudien an transfizierten HEK-Zellen zu rP2X7 eine Interaktion mit anderen Isoformen ausgeschlossen haben (Torres et al. 1999), deuten aktuellere Studien auf eine Interaktion zwischen rP2X4 und P2X7 hin.

In der Studie von Guo et al. werden biochemische und elektrophysiologische Nachweise für eine Interaktion von rP2X4 und rP2X7 geliefert (Guo et al. 2007). Der biochemische Nachweis erfolgte durch die Koimmunpräzipitation von rP2X4 und rP2X7, wobei die Oberflächenexpression von rP2X4 nach der Koexpression um das zweifache erhöht wurde. Im Gegensatz zu Torres et al. (Guo et al. 2007; Torres et al. 1999) verwendete Guo et al. (Guo et al. 2007) das milde Detergenz DDM anstatt NP40 oder Triton X-100 zur Solubilisierung. Es wurde angenommen, dass die Verwendung des mildereren Detergenzes DDM der entscheidende Punkt für die Identifikation des Heteromes sein könnte.

Darüber hinaus lieferte Guo et al. (Guo et al. 2007) auch funktionelle Beweise für die Interaktion zwischen rP2X4 und rP2X7. Hierzu wurden die nicht-funktionelle mutierte P2X4-Untereinheit mit der wt-P2X7-Untereinheit koexprimiert. Daraus resultierte die Potenzierung von BzATP und ATP-induzierten Strömen, welche laut Guo et al. (Guo et al. 2007) nur durch den mut-P2X4/wt-P2X7-Heteromer ausgelöst werden kann. Weiterhin konnte der funktionellen Phänotyp Eigenschaften aufweisen, welche mit beiden homomeren Rezeptoren übereinstimmten. In der Studie konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob eine Wechselwirkung zwischen den Homomeren vorliegt oder die beiden Rezeptoren zu einem stabilen Heteromer koassemblieren (Schneider et al. 2017). Im darauffolgenden Jahr stellte Nicke (Nicke 2008) BN-PAGE-Daten aus einer Vielzahl von Geweben vor, die sowohl gegen eine Koassemblierung zum Heterotrimer als auch gegen enge Wechselwirkungen zwischen homomeren rP2X4 und rP2X7-Rezeptoren sprechen. Stattdessen stellte sie die Vermutung auf, dass die rP2X-Rezeptoren durch direkte Assoziation oder über andere Proteine miteinander interagieren.

Ich habe in der vorliegenden Arbeit mittels, SDS-PAGE- und BN-PAGE-Analysen geprüft, ob eine Interaktion zwischen rP2X4 und rP2X7 vorliegt und in welcher Stöchiometrie die rP2X4- und rP2X7-Untereinheiten interagieren. Für die Identifizierung des Heteromers verwendeten Guo et al. (Guo et al. 2007) das milde Detergenz DDM. Die Studie von Wittig et al. (Wittig et al. 2006) konnte jedoch zeigen, dass DDM im Vergleich zu Digitonin häufig labile hydrophobe Wechselwirkungen dissoziiert und Digitonin als das mildeste Detergenz gilt, um Proteinkomplexe zu isolieren und so Interaktionen von Proteinen nachzuweisen. In Übereinstimmung mit

der Studie konnte ich anhand von mehreren Versuchen zeigen, dass das Detergenz Digitonin zum Nachweis der Interaktion zwischen rP2X4 und rP2X7 am besten geeignet ist. Neben Digitonin wurden die Detergenzien NG 310 und GDN eingesetzt, welche im Vergleich zu Digitonin nur einen Bruchteil an rP2X7 isolieren bzw. rP2X4 koisolieren konnten. Digitonin diente bereits zum Nachweis der trimeren Strukturen von P2X1 und P2X3-Rezeptoren (Nicke et al. 1998) sowie von Heteromeren wie P2X1/2 (Aschrafi et al. 2004) oder P2X1/4 (Nicke et al. 2005).

Im BN-PAGE-Gel konnte nach der Koexpression von rP2X4 und rP2X7 keine eindeutige Bande, die korrespondierend zu den heteromeren Trimeren ist, detektiert werden. Die Schwierigkeit der Detektion der heteromeren Trimere besteht darin, dass das heteromere Trimer aus zwei rP2X4-Untereinheiten und einer rP2X7-Untereinheit nur ca. 20 kDa größer ist als das homomere rP2X7-Dimer und, dass das heteromere Trimer aus einer rP2X4-Untereinheit und zwei rP2X7-Untereinheiten nur ca. 20 kDa kleiner ist als das homomere rP2X7-Trimer. Jedoch ist die monomere Bande des His-rP2X4-Untereinheit nach der Aufreinigung mittels Strep-Tactin-Chromatographie deutlich zu erkennen, was darauf hindeutet, dass es zu einer Heteromerisierung zwischen den Untereinheiten gekommen ist.

Zusammengenommen bestätigen die Ergebnisse eine Interaktion zwischen P2X4 und P2X7 und stimmen mit den Beobachtungen von Guo et. al (Guo et al. 2007) und Michaela Stolz (s. Dissertation, Michaela Stolz) überein.

5.3 Punktmutationen

5.3.1 Auswirkung der Punktmutationen auf die Proteinexpression von hP2X7

P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die durch die Bindung des natürlichen Liganden ATP aktiviert werden. ATP bindet an mindestens zwei der drei interfacialen P2XR-Bindungsstellen und bewirkt innerhalb von Millisekunden eine Konformationsänderung, wodurch das Gate (die engste Stelle des Kanals) so weit öffnet, dass der Kanal die Kationen Na^+ , K^+ und Ca^{2+} permeieren lässt. Die drei Ligandenbindungsstellen von P2X-purinergen Rezeptoren befinden sich in je einem der drei Interfaces zweier benachbarter Rezeptoruntereinheiten und beinhalten somit jeweils Anteile von zwei Untereinheiten, die man mit (+) und (-) beschreiben kann. Die vier konservierten Aminosäuren sind verteilt auf den beiden Interfaces vorzufinden.

Jeder P2X-Rezeptor hat drei ATP-Bindungsstellen, welche sich in je einem der drei Interfaces zwischen zwei Untereinheiten befindet. Dadurch besitzt die ATP-Bindungsstelle Anteile von zwei Untereinheiten, welche mit (+) und (-) beschrieben werden. Im (+) -Interface sind die Reste K⁶⁴ und K¹⁹³ (homolog zu K⁶⁷ und K¹⁹⁰ im hP2X4) und im (-) -Interface sind die Reste R²⁹⁴ und K³¹³ (homolog zu R²⁹⁵ und K³¹³ im hP2X4). Auf Basis der vorliegenden Mutagenesestudien an anderen P2X-Rezeptoren wählte ich vier hoch-konservierte basische Aminosäurereste K⁶⁴, K¹⁹³, R²⁹⁴, K³¹¹ aus, die sich zuvor als essentiell für eine hohe ATP-Potenz des hP2X7-Rezeptors erwiesen haben. Frühere Studien am P2X4-Rezeptor konnten zeigen, dass die Reste K⁶⁷ und R²⁹⁵ (homolog zu K⁶⁴ und R²⁹⁴ im hP2X7-Rezeptor), eine wichtige Funktion für die Bindung der Agonisten oder für die nachfolgende Konformationsänderung, die zur Öffnung des Kanals führt, haben (Zemkova et al. 2007). Die weiteren Punktmutationen K¹⁹³A- und K³¹¹A-hP2X7 reagierten ebenfalls kaum auf Bz-ATP und ATP und gehören demzufolge auch zu den essentiellen Aminosäureresten für die ATP-Bindung (Worthington et al. 2002).

In den folgenden Jahren konnte basierend auf der Röntgenkristallstruktur des zfP2X4-Rezeptors im ATP-gebundenen Zustand, die Grenzflächenlage der ATP-Bindungsstelle und die ATP-Orientierung bestätigt werden (Hattori und Gouaux 2012). Aufgrund der positiven Ladung sind die Lysin- und Argininreste für die Bindung des negativ geladenen ATPs durch Koordination der Phosphatgruppen entscheidend (Jiang et al. 2000b; Ennion et al. 2000). In der extrazellulären Schleife der P2X-Rezeptoren gibt es sieben konservierte Lysine. Die vier konservierten Aminosäuren sind verteilt auf den beiden Interfaces vorzufinden. Im (+) -Interface sind die Reste K⁶⁴ und K¹⁹³ (homolog zu K⁶⁷ und K¹⁹⁰ im hP2X4) und im (-) -Interface sind die Reste R²⁹⁴ und K³¹³ (homolog zu R²⁹⁵ und K³¹³ im hP2X4). Das einzige Arginin, das bei Mutationen die ATP-Potenz in allen bisher analysierten P2X-Rezeptoren beeinträchtigt, ist der Rest R²⁹⁴. Dieser Rest ist Teil eines konservierten NFR-Motivs (Asparagin-Phenylalanin-Arginin), das in allen P2X-Rezeptoren vorkommt und an der Agonisten-Bindung beteiligt ist (Roberts und Evans 2007).

Neben den Mutagenese- und Funktionsstudien wurden in den letzten Jahren auch biochemische Untersuchungen der mutierten P2X7-Rezeptoren durchgeführt. Die Untersuchungen von Worthington an transfizierten HEK293-Zellen ergaben, dass die

Mutante K³¹¹A gleich stark in der Zellmembran exprimiert wird wie die Mutante K¹⁹³A und der wt-P2X7. Im Gegensatz zu unseren Experimenten, bei denen IR800-NHS zur Markierung der Plasmamembranproteine eingesetzt wird, verwendete er das Cy3-konjugierte Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper zur Markierung der exprimierten P2X7-Rezeptoren auf der Oberfläche von transfizierten HEK293-Zellen (Worthington et al. 2002).

Die biochemische Bedeutung der jeweiligen Aminosäuren konnte durch SDS-PAGE- und BN-PAGE-Analysen der Einzel- und Doppelmutationen von Lysin und Arginin zu Alanin festgestellt werden. Die SDS-PAGE-Analyse zeigen, dass die beiden Einzelmutationen K⁶⁴A und K³¹¹A in der hP2X7-Untereinheit die Plasmamembranexpression vollständig unterdrücken, während die Einzelmutationen K¹⁹³A und R²⁹⁴A eine verstärkte Plasmamembranexpression hervorrufen. Die Doppelmutationen der basischen Reste desselben Interfaces, K⁶⁴A und K¹⁹³A im (-) -Interface sowie R²⁹⁴A und K³¹¹ im (+) -Interface, resultierten ebenfalls in stark verminderter Plasmamembranexpression. Auffällig ist, dass jeweils eine Mutation der beiden Aminosäurereste im selben Interface ausreichend ist, um die Plasmamembranexpression zu verhindern. So sind die Einzelmutationen K⁶⁴A und K³¹¹A auch bei den Doppelmutanten der ausschlaggebende Faktor für die verringerte Plasmamembranexpression.

Um festzustellen, ob die intrazelluläre Expression ebenso durch die Einzel- oder Doppelmutation beeinträchtigt wird, wurden die Proteine vor der Aufarbeitung metabolisch mit [35S]-Methionin markiert und die SDS-PAGE-Gele quantitativ ausgewertet. Im Vergleich zu der Plasmamembranexpression, wird durch keine der Einzel- oder Doppelmutationen die Gesamtexpression vollständig unterdrückt. Dennoch ist zu erkennen, dass die Einzelmutationen K⁶⁴A- und K³¹¹A- eine verringerte Gesamtexpression zur Folge haben. Die Doppelmutation K⁶⁴A,K¹⁹³A-hP2X7 wird sehr stark exprimiert, deutlich besser als die Doppelmutation R²⁹⁴A,K³¹¹A

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass entweder die Proteine im ER exprimiert sind, aber nicht zur Plasmamembran transportiert werden, oder dass die Transportation der Proteine zur Plasmamembran stattfindet, aber keine ausreichende Fluoreszenzmarkierung möglich ist. Da die reaktive NHS-Estergruppe des Farbstoffs mit der primären Aminogruppe des Lysins im Protein reagiert, sind diese zur Bindung

des Farbstoffs notwendig. Die Aminosäuren Lysin und Arginin sind sich strukturell relativ ähnlich und weisen beide jeweils zwei zugängliche primäre Aminogruppen auf, welche bei der Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff eine Esterbindung eingehen könnten. Aufgrund der Mutationen von Lysin zu Alanin an bestimmten Positionen, könnte die Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff IR800-NHS verhindert worden sein. Um die tatsächliche Ursache herauszufinden, könnte man, parallel zur Fluoreszenzmarkierung mit IR800-NHS, die exprimierten Proteine in der Plasmamembran mit Cy3- oder Cy5-Maleimid markieren und auf einem SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch auftrennen.

Cy3-Maleimid wird in einem Spektralbereich von 570 nm emittiert, während Cy5-Maleimid in einem Spektralbereich von 670 nm emittiert wird. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Fluoreszenzfarbstoffen ist, dass Cy5-Maleimid ausschließlich zur Markierung der Plasmamembranproteine dient und Cy3-Maleimid zur Markierung der intrazellulär exprimierten Proteine eingesetzt werden kann. Das bietet die Möglichkeit die mutierten P2X7-Rezeptoren parallel zu markieren und die exprimierten Proteine gleichzeitig zu detektieren. Entsprechen die detektierten Cy3- und Cy5-Maleimid-Proteinbanden den IR800-NHS und [35S]-Methionin Proteinbanden, bestätigt das Ergebnis die verringerte Plasmamembranexpression aufgrund der Mutation der Lysine und des Arginins.

5.3.2 Auswirkung der Punktmutationen auf die Proteinexpression von rP2X7

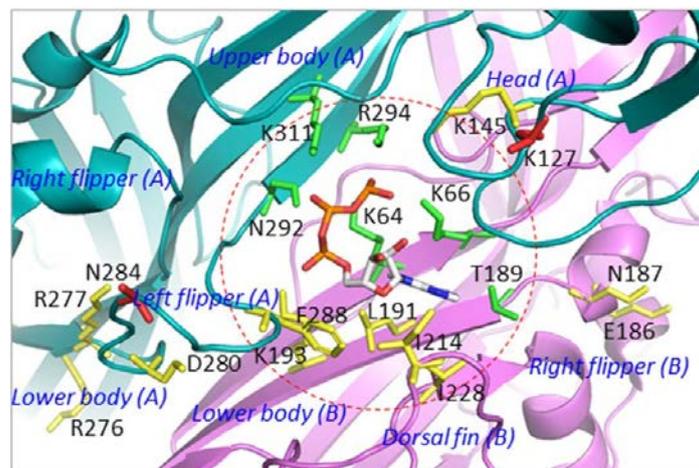


Abb. 51 Extrazelluläre ATP-Bindungstasche zwischen den Untereinheiten (Jiang et al. 2021)

Ansicht der ATP-Bindungstasche. Konservative Reste, die zur Stabilisierung der ATP-Bindungstasche vorgeschlagen werden, sind durch Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Wechselwirkungen erkennbar.

Die funktionelle Untersuchung durch weitere Studien, insbesondere an P2X1-, P2X2- und P2X4-Rezeptoren, identifizierten die konservierten Aminosäuren, welche entscheidend für die Agonisten-Bindung am Rezeptor sind. Die positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin werden in allen bekannten P2X-Sequenzen von Ratte, Mensch, Meerschweinchen und Maus konserviert. Mutationen der Lysine K⁶⁸ und K³⁰⁹ des rP2X1-Rezeptors reduzierten die ATP-Potenz um das 1400-fache. Die ATP-Potenz der Mutanten K⁷⁰R und R²⁹²K/A führte zu einer 20- bzw. 100-fachen Abnahme. Die biochemische Untersuchung der rP2X1-Mutanten ergab, dass die stark verringerte Funktionalität des K⁶⁸A-Mutanten nicht auf eine verringerte Rezeptorexpression zurückzuführen ist, sondern auf eine mögliche Veränderung in der Kinetik der Kanalöffnung (Ennion et al. 2000). Im selben Jahr identifizierten Jiang et al. die Lysine K⁶⁹, K⁷¹, K¹⁹⁹ und K³⁰⁸ des rP2X2-Rezeptors als relevante Aminosäuren für die ATP-Bindung (Jiang et al. 2000b). Die konservierten Aminosäuren sind homolog zu den Resten K⁶⁴, K⁶⁶, R²⁹⁴ und K³¹¹ des rP2X7-Rezeptors.

Die positive geladenen bzw. polaren Reste tragen zur Bindung der α - und γ -Phosphate des ATPs bei. Worthington et al. konnten nachweisen, dass die Entfernung der positiven Ladung, durch Substitution von Lysin zu Alanin an Pos. 193 und 311, die ATP-induzierte Aufnahme von kleinen und großen Kationen verhinderte. Die Mutation der konservativen Reste K¹⁹³ und K³¹¹ führte zum totalen Knockout der Funktion bei den P2X7-Mutanten (Worthington et al. 2002). In den folgenden Jahren konnten weitere Aminosäuren bestimmt werden, die durch Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen die ATP-Bindung stabilisieren. Fast jede Aminosäure (K⁶⁴, K⁶⁶, T¹⁸⁹, N²⁹², R²⁹⁴ und K³¹¹ in rP2X7) ist über die P2X-Subtypen hinweg konserviert (Chataigneau et al. 2013; McCarthy et al. 2019).

Durch die Auflösung der quartären Struktur des rP2X7-Rezeptors im ATP-gebundenen und offenen Zustand, konnten die konservierten Aminosäuren der ATP-Bindungstasche zwischen den Untereinheiten sehr genau festgelegt werden. Die Gesamtstruktur der Transmembran- und extrazellulären Domänen jeder Untereinheit ähneln der Form eines springenden Delfins. Dabei bilden der Kopf, der Oberkörper und der linke Flipper einer Untereinheit, mit dem Unterkörper und der Rückenflosse der benachbarten Untereinheit, die ATP-Bindungstasche. Die ATP-Bindung wird

koordiniert durch K⁶⁴, K⁶⁶ und T¹⁸⁹ im Unterkörper und N²⁹², R²⁹⁴ und K³¹¹ im Oberkörper. Das Lysin an Pos. 64 des rP2X7-Rezeptors entspricht dem Lysin an Pos. 70 des Zebrafisch-P2X4-Rezeptors. Die jeweiligen Lysine befinden sich im Zentrum der drei Phosphatgruppen des ATPs und bilden mit allen Wasserstoffbrückenbindungen. Demzufolge führt die Mutation des Lysins zu Alanin zum Verlust der Rezeptoraktivierung. Die zentrale Lage der Lysine an Pos. 64 und 66 könnte ebenso essenziell für die Fluoreszenzmarkierung mit IR800-NHS sein.

5.4 rP2X7 Konkatomere

5.4.1 Proteinexpression von homomeren rP2X4- und rP2X7-Konkatameren

Konkatamere sind mehrere Untereinheiten, die mit einer definierten Zusammensetzung verknüpft sind. Zur Untersuchung der Stabilität und der Expression der Konkatomere wurden P2X4- und P2X7-Untereinheiten in homo- und heteromeren Anordnung vom Dimer bis zu den Tetrameren aneinander ligiert. Wie bereits Nicke et al. (Nicke et al. 2003) in ihrer Arbeit darlegen konnte, kommt es in den Konkatomeren oft zur proteolytischen Spaltung, sodass Mono- und Dimere als Nebenprodukte entstehen.

Einen großen Einfluss auf die Stabilität und die damit verbundene Entstehung unerwünschter Nebenprodukte haben grundsätzlich Linker, welche die Untereinheiten miteinander verknüpfen (Chen et al. 2013). Die Untersuchung der allgemeinen Eigenschaften von Linkern in natürlichen Proteinen haben ergeben, dass polare geladene oder ungeladene Aminosäuren vermehrt vorkommen. Zwei große Studien, welche unabhängig voneinander durchgeführt wurden, konnten in Übereinstimmung zeigen, dass Prolin, Threonin und Glutamin die bevorzugten Aminosäuren für natürliche Linker waren (Argos 1990; George und Heringa 2002). Insbesondere Glutamin spielte in den letzten Jahrzehnten eine große Rolle für Linker. So wurde der Polyglutamin-Linker u.a. eingesetzt, um die Untereinheiten der Kalium-Kanäle zu Tetrameren zu verknüpfen (Pessia et al. 1996) oder aus den Untereinheiten von P2X2 und P2X3 einen Dimer zu konstruieren (Torres et al. 1998c). Auch Nicke verwendete zur Herstellung der P2X1-Konkatamere eine verschiedene Anzahl an Glutamin-Resten, um die Untereinheiten miteinander zu verknüpfen. Von den drei verwendeten Linkern haben zwei jeweils fünf Glutamin-Reste und einen Hexahistidin-Tag kodiert

und der dritte Linker bestand fast ausschließlich aus Glutamin-Resten. Der Unterschied zwischen den ersten beiden Linkern ist ein endogenes Methionin, das zwischen den Glutamin-Resten und dem Hexahistidin-Tag vorkommt. Ein direkter Vergleich der drei Linker hat ergeben, dass die Deletion des Hexahistidin-Tags und des internen Methionins nicht zur Reduktion der Monomerbildung führt (Nicke et al. 2003).

In der Studie von Argos (Argos 1990) wurden zusätzlich die Aminosäuren Serin und Glycin aufgrund ihrer geringen Größe und großen Flexibilität, als geeignete Aminosäuren für flexible Linker deklariert. Zudem sind beide Aminosäuren in der Lage, die Stabilität der Linker-Struktur im wässrigen Lösungsmittel durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen aufrechtzuerhalten. Daher habe ich anstelle des Glutamins die sterisch kleineren Aminosäuren Alanin, Glycin und Serin in unterschiedlicher Sequenz und Länge als Linker verwendet. Die homotrimeren rP2X7-Konkatamere mit AGAG-Linker zeigten keine proteolytischen Spaltprodukte. Die Plasmamembranexpression und Gesamtexpression zeigt die homotrimeren Konkatamere als eindeutige Bande mit erwartender. Die Verwendung des längeren Linkers (GGSGG)₃ zeigt ebenfalls kaum Abbau-Produkte und eine gute Expression. Der prozentuelle Anteil der Abbau-Produkte beträgt bei dem homotrimeren rP2X7-Konkatamer verlinkt mit AGAG 1 % und mit (GGSGG)₃ 3 %. Es ist möglich, dass die Flexibilität durch die lange C-terminale Endodomäne bereits gegeben ist und deswegen die Länge des Linkers nicht mehr ausschlaggebend.

Im Vergleich zu den rP2X7-Konkatamere weisen die rP2X4-Konkatamere einen deutlich höheren Anteil an Abbau-Produkten auf. Hier ist die Länge der Linkersequenz ein entscheidender Faktor für die Stabilität der Trimere. Der Linker AGSAGSAGS führt kaum zu monomeren und dimeren Abbau-Produkten, während der um vier Aminosäurereste längere Linker AGSAGGSAGGSAGG einen höheren Anteil an Monomeren erzeugt. Auf der anderen Seite ist die Plasmamembran- und Gesamtexpression der homotrimeren rP2X4-Konkatamere mit der langen Linkern deutlich stärker. Insgesamt sind die monomeren Abbau-Produkte der homotrimeren rP2X4-Konkatamere, unabhängig davon, welcher Linker verwendet wurde, in der Gesamtexpression und in der Plasmamembran stärker vorhanden als die dimeren Abbau-Produkte. Nicke et al. (Nicke et al. 2003) hatten in ihrer Studie die Theorie

aufgestellt, dass die Menge an Monomeren den begrenzenden Faktor für den ER-Austritt von Dimeren darstellt, da Monomere und Dimere in ungefähr gleicher stöchiometrischen Menge in der Plasmamembran auftreten. Laut Nicke et al. (Nicke et al. 2003) können Dimere nur mit einem assoziierten Monomer in die Plasmamembran exportiert werden und Trimere sind die einzigen Rezeptorkomplexe, welche das ER-Qualitätskontrollsystem problemlos passieren.

In Übereinstimmung mit Nicke konnte ich zeigen, dass hauptsächlich Monomere als Abbau-Produkte der rP2X4/rP2X7-Konkatamere in der Plasmamembran erzeugt werden. Welche Linker insgesamt besser geeignet sind, ist Ermessenssache, da einerseits zwar weniger Abbau-Produkte beim Einsatz von kurzen Linkern (AGAG oder (AGS)₃) entstehen, andererseits ist die Expressionsausbeute der Konkatamere mit langen Linkern ((GGSGG)₃ oder AGSAGGSAGGSGG) höher. Für unsere funktionellen Untersuchungen zusammen mit Prof. Markwardt in Halle haben wir die kurzen Linker als besser geeignet befunden, da die Stabilität der Konkatamere durch diese höher war.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Stabilität der Konkatamere ist aufgrund der Länge der kodierenden cRNA die vollständige Synthese der cRNA. Die Translationseffizienz der meisten synthetischen RNAs in Eizellen ist bestimmt durch das Capping, die Polyadenylierung und das Spleißen (Drummond et al. 1985). Das Capping erhöht die mRNA-Stabilität und ist an zahlreichen Interaktionen, wie der Translationsinitiierung oder dem intrazellulären Transport beteiligt (Köhler und Hurt 2007; Sonenberg und Hinnebusch 2009). Die Schwierigkeit der Synthese von Konkatameren liegt darin, die langen Transkripte in homogen gekappte RNA umzuwandeln. Für die Synthese wurden zwei verschiedene Ansätze (kotranskriptionelles und posttranskriptionelles Capping) angewendet. Das kotranskriptionelle Capping ist insofern eingeschränkt, da GTP und Cap-Analogon als Initiator nukleotid konkurrieren. Das posttranskriptionelle Capping umgeht das Problem und verspricht die Produktion von mRNAs mit hohen quantitativen Erträgen sowie hoher translationaler Aktivität (Muttach et al. 2017).

Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Gele zeigen in Einklang mit Muttach et al. (Muttach et al. 2017), dass die Plasmamembran- und Gesamtexpression der posttranskriptionell gecappten Konkatamere stärker ist. Dennoch muss auch betont werden, dass gleichzeitig die proteolytische Spaltung und der damit verbundene Anteil an

monomeren Abba-Produkten vermehrt vorkommt. Demzufolge ist die Stabilität der Konkataamere eher durch die kotranskriptionelle Synthese gegeben.

5.4.2 Proteinexpression von heteromeren rP2X4- und rP2X7-Konkatameren

Die heteromeren Konkataamere waren von besonderem Interesse für die Untersuchung der Assemblierung von P2X4- und P2X7-Untereinheiten. Der Einsatz der kurzen Linker hat, wie auch bei den homomeren Konkataameren, seine Vor- und Nachteile gegenüber den langen Linkern. Die vorliegenden Daten bestätigen, dass die kurzen Linker weniger monomere und dimere Abbau-Produkte verursachen und die langen Linker zu einer höheren Expressionsausbeute führen.

Eine viel größere Rolle für die Stabilität der heteromeren Trimere spielt jedoch die Anordnung der Untereinheiten. In allen Experimenten ist zu erkennen, dass bei den homotrimeren rP2X4-Konkatameren durch proteolytische Spaltung mehr monomere Abbau-Produkte entstehen als bei den homotrimeren rP2X7-Konkatameren. Das homotrimere rP2X7-Konkatamer zeigt im Vergleich zu dem homotrimeren rP2X4-Konkatamer kaum Abbau-Produkte. Interessanterweise ist diese Beobachtung auch auf die heteromeren Konkataamere übertragbar. Unabhängig von der Anordnung und der Stöchiometrie entspricht die Masse der Abbau-Produkte dem homomeren rP2X4-Monomer oder Dimer.

Es ist dennoch zu erwähnen, dass die Anordnung und die Stöchiometrie der heteromeren Konkataamere zu einem prozentualen Anstieg der Abbau-Produkte führt, sobald die Anzahl der rP2X4-Untereinheiten überwiegt. So zeigt das heterotrimere Konkatamer mit der Anordnung X7-X4-X7 beispielsweise keine Abbau-Produkte. Die umgekehrte Anordnung des heterotrimeren Konkatamers (X4-X7-X4) verursacht wiederum einen prozentual hohen Anteil (~ 40%) an rP2X4-Untereinheiten in der Gesamtexpression und in der Plasmamembran als Abbau-Produkte. Die Translation des heterotrimeren Konkatamers (X7-X-4-X7) erfolgt ohne Abbrüche und die Stabilität entspricht dem eines homomeren rP2X7-Konkatamers. Der Grund für die weitaus höhere Stabilität des homomeren rP2X7-Konkatamers und des heteromeren Konkatamers mit zwei rP2X7 und einer rP2X4-Untereinheit könnte die räumliche Anordnung der Polypeptid-Ketten sein.

Anhand der Topologie ist zu erkennen, dass zwischen den rP2X4-Untereinheiten nur eine sehr kurze Aminosäuresequenz vorhanden ist, während die Aminosäuresequenz zwischen den rP2X7-Untereinheiten aufgrund der langen C-terminalen Domäne deutlich länger ist. Es ist gut möglich, dass der lange Abschnitt zwischen den Untereinheiten, die räumlich Anordnung der Polypeptid-Ketten begünstigt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die eingesetzten Linker und die Anordnung der Untereinheiten bei heterotrimeren Konkameren entscheidend sind für die Stabilität der Konkamere und die Expressionsausbeute.

6 Zusammenfassung

P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die durch den natürlichen Liganden ATP aktiviert werden können. Die P2X-Isoformen, mit Ausnahme von P2X6, assemblieren zu funktionellen homotrimeren Rezeptoren. Die Heteromerisierung konnte für alle P2X-Subtypen, bis auf P2X7, erfolgreich nachgewiesen werden. Innerhalb der P2X-Familie hat der P2X7-Rezeptor aufgrund der langen C-terminalen Endodomäne besonderes Interesse erlangt. Eine Vielzahl der Eigenschaften des P2X7-Rezeptors werden der C-terminalen Endodomäne zugeschrieben.

Das übergeordnete Ziel meiner Arbeit war die Untersuchung der Interaktion von P2X7 und P2X4. Zur Identifikation von potenziellen Interaktionspartnern habe ich den P2X7-Rezeptor von Mensch und Ratten mit den weiteren P2X-Isoformen koexprimiert und nach dem Köder- und Beute-System proteinchemisch aufgereinigt und mittels SDS-PAGE und BN-PAGE analysiert. Ich konnte mehrere P2X-Untereinheiten koinzidentieren, jedoch nicht als heterotrimere Rezeptoren. Eine Heterotrimerisierung von hP2X7 und hP2X4 konnte ich allerdings durch Koexpression der C-terminal truncierten hP2X7-Untereinheit (hP2X7¹⁻⁴⁰⁸ bzw. hP2X7¹⁻⁴³⁶) mit der hP2X4-Untereinheit nachweisen. Die Ergebnisse deuten somit daraufhin, dass die hP2X7A-Untereinheit ebenso mit der hP2X4-Untereinheit zu einem Heterotrimer assemblieren würde, da die entscheidende Assemblierungsdomäne in der Ektodomäne liegt.

Zur Erstellung der homomeren und heteromeren Konkatomere wurde die rP2X4- und rP2X7-Untereinheiten in definierter Zusammensetzung aneinander ligiert. Es wurde biochemisch mittels SDS-PAGE untersucht welchen Einfluss die Linker, die Anordnung der Untereinheiten und die Protease-Inhibitoren auf die Expression der Konkatomere haben. Die Untersuchung zeigte, dass lange Linker für eine starke Expression und kurze Linker für eine verringerte Erzeugung von Abbau-Produkten am besten geeignet sind. Unabhängig von den verwendeten Linkern oder Protease-Inhibitoren entstehen bei den homotrimeren rP2X7-Konkatameren deutlich weniger Abbau-Produkte als bei den homotrimeren rP2X4-Konkatameren.

Ein letztes Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der desensibilisierenden Spleißvariante hP2X7B. Die unterschiedliche Kinetik und der Einfluss der Länge der C-terminalen Endodomäne auf die Kinetik-Eigenschaften der beiden hP2X7-Varianten wurde dargestellt. Um einen direkten Vergleich zu erzielen wurde die C-terminale

Endodomäne der hP2X7A-Untereinheit um die abweichende Aminosäuresequenz gekürzt und die unterschiedliche Expression der beiden hP2X7-Varianten biochemisch mittels SDS-PAGE und BN-PAGE sowie elektrophysiologisch mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme charakterisiert. Die Desensibilisierung der hP2X7B-Untereinheit bei der ersten ATP-Applikation spricht für die Bildung der zytoplasmatischen Kappe, trotz einer C-terminalen Endodomäne bestehend aus neun Aminosäuren.

Zusammengenommen wurde die Heteromerisierung der beiden Untereinheiten P2X4 und P2X7 biochemisch nachgewiesen und homomere P2X4- und P2X7-Konkatamere sowie P2X7B biochemisch verifiziert.

7 Literaturverzeichnis

Abbracchio, Maria P.; Burnstock, Geoffrey; Boeynaems, Jean-Marie; Barnard, Eric A.; Boyer, José L.; Kennedy, Charles et al. (2006): International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. In: *Pharmacological reviews* 58 (3), S. 281–341. DOI: 10.1124/pr.58.3.3.

Adinolfi, Elena; Cirillo, Maria; Woltersdorf, Ronja; Falzoni, Simonetta; Chiozzi, Paola; Pellegatti, Patrizia et al. (2010): Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (9), S. 3393–3404. DOI: 10.1096/fj.09-153601.

Amstrup, Jan; Novak, Ivana (2003): P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. In: *The Biochemical journal* 374 (Pt 1), S. 51–61. DOI: 10.1042/BJ20030585.

Argos, Patrick (1990): An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. In: *Journal of molecular biology* 211 (4), S. 943–958. DOI: 10.1016/0022-2836(90)90085-Z.

Aschrafi, Armaz; Sadtler, Sven; Niculescu, Cristina; Rettinger, Jürgen; Schmalzing, Günther (2004): Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. In: *Journal of molecular biology* 342 (1), S. 333–343. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.06.092.

Balázs, Bernadett; Dankó, Tamás; Kovács, Gergely; Köles, László; Hediger, Matthias A.; Zsembery, Akos (2013): Investigation of the inhibitory effects of the benzodiazepine derivative, 5-BDBD on P2X4 purinergic receptors by two complementary methods. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 32 (1), S. 11–24. DOI: 10.1159/000350119.

Barrera, Nelson P.; Henderson, Robert M.; Murrell-Lagnado, Ruth D.; Edwardson, J. Michael (2007): The stoichiometry of P2X2/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. In: *Biophysical journal* 93 (2), S. 505–512. DOI: 10.1529/biophysj.106.101048.

Baumann, S. W.; Baur, R.; Sigel, E. (2001): Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (39), S. 36275–36280. DOI: 10.1074/jbc.M105240200.

Baxter, Andrew; Bent, Janice; Bowers, Keith; Braddock, Martin; Brough, Steve; Fagura, Malbinder et al. (2003): Hit-to-Lead studies: the discovery of potent adamantane amide P2X7 receptor antagonists. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 13 (22), S. 4047–4050. DOI: 10.1016/j.bmcl.2003.08.034.

Becker, Daniel; Woltersdorf, Ronja; Boldt, Wolfgang; Schmitz, Stephan; Braam, Ursula; Schmalzing, Günther; Markwardt, Fritz (2008): The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (37), S. 25725–25734. DOI: 10.1074/jbc.M803855200.

Bocquet, Nicolas; Nury, Hugues; Baaden, Marc; Le Poupon, Chantal; Changeux, Jean-Pierre; Delarue, Marc; Corringer, Pierre-Jean (2009): X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. In: *Nature* 457 (7225), S. 111–114. DOI: 10.1038/nature07462.

- Boldt, Wolfgang; Klapperstück, Manuela; Büttner, Cora; Sadtler, Sven; Schmalzing, Günther; Markwardt, Fritz (2003): Glu496Ala polymorphism of human P2X7 receptor does not affect its electrophysiological phenotype. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 284 (3), C749-56. DOI: 10.1152/ajpcell.00042.2002.
- Borrmann, Thomas; Abdelrahman, Aliaa; Volpini, Rosaria; Lambertucci, Catia; Alksnis, Edgars; Gorzalka, Simone et al. (2009): Structure-activity relationships of adenine and deazaadenine derivatives as ligands for adenine receptors, a new purinergic receptor family. In: *Journal of medicinal chemistry* 52 (19), S. 5974–5989. DOI: 10.1021/jm9006356.
- Boué-Grabot, E.; Archambault, V.; Séguéla, P. (2000): A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (14), S. 10190–10195. DOI: 10.1074/jbc.275.14.10190.
- Brown, Sean G.; Townsend-Nicholson, Andrea; Jacobson, Kenneth A.; Burnstock, Geoffrey; King, Brian F. (2002): Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300 (2), S. 673–680. DOI: 10.1124/jpet.300.2.673.
- Buell, G. N.; Talabot, F.; Gos, A.; Lorenz, J.; Lai, E.; Morris, M. A.; Antonarakis, S. E. (1998): Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. In: *Receptors & channels* 5 (6), S. 347–354.
- Burnstock, G.; Cocks, T.; Crowe, R.; Kasakov, L. (1978): Purinergic innervation of the guinea-pig urinary bladder. In: *British journal of pharmacology* 63 (1), S. 125–138. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1978.tb07782.x.
- Burnstock, Geoffrey; Knight, Gillian E. (2004): Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. In: Bd. 240: Elsevier (International Review of Cytology), S. 31–304.
- Chataigneau, Thierry; Lemoine, Damien; Grutter, Thomas (2013): Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 7, S. 273. DOI: 10.3389/fncel.2013.00273.
- Chaumont, Séverine; Jiang, Lin-Hua; Penna, Aubin; North, R. Alan; Rassendren, Francois (2004): Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (28), S. 29628–29638. DOI: 10.1074/jbc.M403940200.
- Cheewatrakoolpong, Boonlert; Gilchrest, Helen; Anthes, John C.; Greenfeder, Scott (2005): Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. In: *Biochemical and biophysical research communications* 332 (1), S. 17–27. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.04.087.
- Chen, Xiaoying; Zaro, Jennica L.; Shen, Wei-Chiang (2013): Fusion protein linkers: property, design and functionality. In: *Advanced drug delivery reviews* 65 (10), S. 1357–1369. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.039.
- Chessell, I.P.; Simon, J.; Hibell, A.D.; Michel, A.D.; Barnard, E.A.; Humphrey, P.P.A (1998): Cloning and functional characterisation of the mouse P2X 7 receptor. In: *FEBS Letters* 439 (1-2), S. 26–30. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01332-5.
- Clyne, J. Dylan; Wang, Lin-Fang; Hume, Richard I. (2002): Mutational Analysis of the Conserved Cysteines of the Rat P2X 2 Purinoceptor. In: *J. Neurosci.* 22 (10), S. 3873–3880. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-10-03873.2002.

- Coddou, Claudio; Yan, Zonghe; Obsil, Tomas; Huidobro-Toro, J. Pablo; Stojilkovic, Stanko S. (2011): Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. In: *Pharmacological reviews* 63 (3), S. 641–683. DOI: 10.1124/pr.110.003129.
- Compan, Vincent; Ulmann, Lauriane; Stelmashenko, Olga; Chemin, Jean; Chaumont, Séverine; Rassendren, Francois (2012): P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. In: *J. Neurosci.* 32 (12), S. 4284–4296. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6332-11.2012.
- Corringer, Pierre-Jean; Poitevin, Frédéric; Prevost, Marie S.; Sauguet, Ludovic; Delarue, Marc; Changeux, Jean-Pierre (2012): Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain. In: *Structure (London, England : 1993)* 20 (6), S. 941–956. DOI: 10.1016/j.str.2012.05.003.
- Costa-Junior, Helio Miranda; Sarmiento Vieira, Flávia; Coutinho-Silva, Robson (2011): C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. In: *Purinergic signalling* 7 (1), S. 7–19. DOI: 10.1007/s11302-011-9215-1.
- Craigie, Eilidh; Birch, Rebecca E.; Unwin, Robert J.; Wildman, Scott S. (2013): The relationship between P2X4 and P2X7: a physiologically important interaction? In: *Frontiers in physiology* 4, S. 216. DOI: 10.3389/fphys.2013.00216.
- Dani, John A.; Mayer, Mark L. (1995): Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. In: *Current Opinion in Neurobiology* 5 (3), S. 310–317. DOI: 10.1016/0959-4388(95)80043-3.
- Denlinger, L. C.; Fisette, P. L.; Sommer, J. A.; Watters, J. J.; Prabhu, U.; Dubyak, G. R. et al. (2001): Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (4), S. 1871–1876. DOI: 10.4049/jimmunol.167.4.1871.
- Di Virgilio, Francesco; Dal Ben, Diego; Sarti, Alba Clara; Giuliani, Anna Lisa; Falzoni, Simonetta (2017): The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. In: *Immunity* 47 (1), S. 15–31. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.06.020.
- Drummond, D. R.; Armstrong, J.; Colman, A. (1985): The effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNAs in *Xenopus* oocytes. In: *Nucleic Acids Research* 13 (20), S. 7375–7394.
- Duckwitz, Wiebke; Hausmann, Ralf; Aschrafi, Armaz; Schmalzing, Günther (2006): P2X5 subunit assembly requires scaffolding by the second transmembrane domain and a conserved aspartate. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (51), S. 39561–39572. DOI: 10.1074/jbc.M606113200.
- Dumont, J. N. (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. In: *Journal of morphology* 136 (2), S. 153–179. DOI: 10.1002/jmor.1051360203.
- Dunn, P. M.; Blakeley, A. G. (1988): Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. In: *British journal of pharmacology* 93 (2), S. 243–245. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb11427.x.
- Eickhorst, Angela N.; Berson, Amy; Cockayne, Debra; Lester, Henry A.; Khakh, Baljit S. (2002): Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. In: *The Journal of general physiology* 120 (2), S. 119–131. DOI: 10.1085/jgp.20028535.

- Ennion, S.; Hagan, S.; Evans, R. J. (2000): The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (38), S. 29361–29367. DOI: 10.1074/jbc.M003637200.
- Ennion, Steven J.; Evans, Richard J. (2002): 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. In: *Molecular pharmacology* 61 (2), S. 303–311. DOI: 10.1124/mol.61.2.303.
- Estrov, Z.; Talpaz, M. (1996): Role of interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) in leukemia. In: *Cytokines and molecular therapy* 2 (1), S. 1–11.
- Feng, Ying-Hong; Li, Xin; Wang, Liqin; Zhou, Lingying; Gorodeski, George I. (2006): A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (25), S. 17228–17237. DOI: 10.1074/jbc.M602999200.
- Ferrari, Davide; Pizzirani, Cinzia; Adinolfi, Elena; Lemoli, Roberto M.; Curti, Antonio; Idzko, Marco et al. (2006): The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (7), S. 3877–3883. DOI: 10.4049/jimmunol.176.7.3877.
- Franklin, Cindy; Braam, Ursula; Eisele, Thomas; Schmalzing, Günther; Hausmann, Ralf (2007): Lack of evidence for direct phosphorylation of recombinantly expressed P2X2 and P2X3 receptors by protein kinase C. In: *Purinergic signalling* 3 (4), S. 377–388. DOI: 10.1007/s11302-007-9067-x.
- George, Richard A.; Heringa, Jaap (2002): An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. In: *Protein engineering* 15 (11), S. 871–879. DOI: 10.1093/Protein/15.11.871.
- Gever, Joel R.; Cockayne, Debra A.; Dillon, Michael P.; Burnstock, Geoffrey; Ford, Anthony P. D. W. (2006): Pharmacology of P2X channels. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452 (5), S. 513–537. DOI: 10.1007/s00424-006-0070-9.
- Gonnord, P.; Delarasse, C.; Auger, R.; Benihoud, K.; Prigent, M.; Cuif, M. H. et al. (2009): Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (3), S. 795–805. DOI: 10.1096/fj.08-114637.
- Guo, Chang; Masin, Marianela; Qureshi, Omar S.; Murrell-Lagnado, Ruth D. (2007): Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. In: *Molecular pharmacology* 72 (6), S. 1447–1456. DOI: 10.1124/mol.107.035980.
- Haines, W. R.; Torres, G. E.; Voigt, M. M.; Egan, T. M. (1999): Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms. In: *Molecular pharmacology* 56 (4), S. 720–727.
- Hattori, Motoyuki; Gouaux, Eric (2012): Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. In: *Nature* 485 (7397), S. 207–212. DOI: 10.1038/nature11010.
- Hausmann, Ralf; Bahrenberg, Gregor; Kuhlmann, Daniel; Schumacher, Michaela; Braam, Ursula; Bieler, Dagmar et al. (2014): A hydrophobic residue in position 15 of the rP2X3 receptor slows desensitization and reveals properties beneficial for pharmacological analysis and high-throughput screening. In: *Neuropharmacology* 79, S. 603–615. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.010.

- Hausmann, Ralf; Kless, Achim; Schmalzing, Gunther (2015): Key sites for P2X receptor function and multimerization: overview of mutagenesis studies on a structural basis. In: *Current medicinal chemistry* 22 (7), S. 799–818. DOI: 10.2174/0929867322666141128163215.
- Hausmann, Ralf; Rettinger, Jürgen; Gerevich, Zoltan; Meis, Sabine; Kassack, Matthias U.; Illes, Peter et al. (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. In: *Molecular pharmacology* 69 (6), S. 2058–2067. DOI: 10.1124/mol.106.022665.
- Hernandez-Olmos, Victor; Abdelrahman, Aliaa; El-Tayeb, Ali; Freudendahl, Diana; Weinhausen, Stephanie; Müller, Christa E. (2012): N-substituted phenoxazine and acridone derivatives: structure-activity relationships of potent P2X4 receptor antagonists. In: *Journal of medicinal chemistry* 55 (22), S. 9576–9588. DOI: 10.1021/jm300845v.
- Hilf, Ricarda J. C.; Dutzler, Raimund (2008): X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. In: *Nature* 452 (7185), S. 375–379. DOI: 10.1038/nature06717.
- Hollmann, M.; Heinemann, S. (1994): Cloned glutamate receptors. In: *Annual review of neuroscience* 17, S. 31–108. DOI: 10.1146/annurev.ne.17.030194.000335.
- Honore, Prisca; Donnelly-Roberts, Diana; Namovic, Marian T.; Hsieh, Gin; Zhu, Chang Z.; Mikusa, Joe P. et al. (2006): A-740003 N-(1-((cyanoimino)(5-quinolinylamino) methylamino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide, a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319 (3), S. 1376–1385. DOI: 10.1124/jpet.106.111559.
- Illes, Peter; Müller, Christa E.; Jacobson, Kenneth A.; Grutter, Thomas; Nicke, Annette; Fountain, Samuel J. et al. (2020): Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. In: *British journal of pharmacology* 178 (3), S. 489–514. DOI: 10.1111/bph.15299.
- Jiang, L. H.; Mackenzie, A. B.; North, R. A.; Surprenant, A. (2000a): Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. In: *Molecular pharmacology* 58 (1), S. 82–88.
- Jiang, L. H.; Rassendren, F.; Surprenant, A.; North, R. A. (2000b): Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (44), S. 34190–34196. DOI: 10.1074/jbc.M005481200.
- Jiang, Lin-Hua; Caseley, Emily A.; Muench, Steve P.; Roger, Sébastien (2021): Structural basis for the functional properties of the P2X7 receptor for extracellular ATP. In: *Purinergic signalling* 17 (3), S. 331–344. DOI: 10.1007/s11302-021-09790-x.
- Jindrichova, Marie; Kuzyk, Pavlo; Li, Shuo; Stojilkovic, Stanko S.; Zemkova, Hana (2012): Conserved ectodomain cysteines are essential for rat P2X7 receptor trafficking. In: *Purinergic signalling* 8 (2), S. 317–325. DOI: 10.1007/s11302-012-9291-x.
- Kanellopoulos, Jean M.; Almeida-da-Silva, Cássio Luiz Coutinho; Rützel Boudinot, Sirje; Ojcius, David M. (2021): Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An Immunological Perspective. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 645834. DOI: 10.3389/fimmu.2021.645834.
- Karasawa, Akira; Kawate, Toshimitsu (2016): Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.22153.

- Karasawa, Akira; Michalski, Kevin; Mikhelzon, Polina; Kawate, Toshimitsu (2017): The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.31186.
- Kawate, Toshimitsu; Michel, Jennifer Carlisle; Birdsong, William T.; Gouaux, Eric (2009): Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. In: *Nature* 460 (7255), S. 592–598. DOI: 10.1038/nature08198.
- Khakh, B. S. (2001): Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. In: *Nature reviews. Neuroscience* 2 (3), S. 165–174. DOI: 10.1038/35058521.
- Khakh, Baljit S.; Egan, Terrance M. (2005): Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (7), S. 6118–6129. DOI: 10.1074/jbc.M411324200.
- Khakh, Baljit S.; North, R. Alan (2006): P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. In: *Nature* 442 (7102), S. 527–532. DOI: 10.1038/nature04886.
- King, B. F.; Townsend-Nicholson, A.; Wildman, S. S.; Thomas, T.; Spyer, K. M.; Burnstock, G. (2000): Coexpression of Rat P2X 2 and P2X 6 Subunits in *Xenopus* Oocytes. In: *J. Neurosci.* 20 (13), S. 4871–4877. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-13-04871.2000.
- Klapperstück, M.; Büttner, C.; Schmalzing, G.; Markwardt, F. (2001): Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor. In: *The Journal of physiology* 534 (Pt 1), S. 25–35. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.00025.x.
- Köhler, Alwin; Hurt, Ed (2007): Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (10), S. 761–773. DOI: 10.1038/nrm2255.
- Kügelgen, Ivar von; Schiedel, Anke C.; Hoffmann, Kristina; Alsdorf, Bernt B. A.; Abdelrahman, Aliaa; Müller, Christa E. (2008): Cloning and functional expression of a novel Gi protein-coupled receptor for adenine from mouse brain. In: *Molecular pharmacology* 73 (2), S. 469–477. DOI: 10.1124/mol.107.037069.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lambrecht, Günter; Friebe, Thomas; Grimm, Ulrike; Windscheif, Ursula; Bungardt, Edwin; Hildebrandt, Caren et al. (1992): PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. In: *European Journal of Pharmacology* 217 (2-3), S. 217–219. DOI: 10.1016/0014-2999(92)90877-7.
- Lê, Khanh-Tuoc; Babinski, Kazimierz; Séguéla, Philippe (1998): Central P2X 4 and P2X 6 Channel Subunits Coassemble into a Novel Heteromeric ATP Receptor. In: *J. Neurosci.* 18 (18), S. 7152–7159. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-18-07152.1998.
- Lewis, C.; Neidhart, S.; Holy, C.; North, R. A.; Buell, G.; Surprenant, A. (1995): Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. In: *Nature* 377 (6548), S. 432–435. DOI: 10.1038/377432a0.
- Li, Mufeng; Kawate, Toshimitsu; Silberberg, Shai D.; Swartz, Kenton J. (2010): Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. In: *Nature communications* 1, S. 44. DOI: 10.1038/ncomms1048.
- Liu, M.; King, B. F.; Dunn, P. M.; Rong, W.; Townsend-Nicholson, A.; Burnstock, G. (2001): Coexpression of P2X(3) and P2X(2) receptor subunits in varying amounts generates heterogeneous populations of P2X receptors that evoke a spectrum of agonist responses

comparable to that seen in sensory neurons. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 296 (3), S. 1043–1050.

Ma, Weiyuan; Korngreen, Alon; Weil, Simy; Cohen, Enbal Ben-Tal; Priel, Avi; Kuzin, Liubov; Silberberg, Shai D. (2006): Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. In: *The Journal of physiology* 571 (Pt 3), S. 503–517. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.103408.

Mansoor, Steven E.; Lü, Wei; Oosterheert, Wout; Shekhar, Mrinal; Tajkhorshid, Emad; Gouaux, Eric (2016): X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action. In: *Nature* 538 (7623), S. 66–71. DOI: 10.1038/nature19367.

Marquez-Klaka, Benjamin; Rettinger, Jürgen; Bhargava, Yogesh; Eisele, Thomas; Nicke, Annette (2007): Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. In: *J. Neurosci.* 27 (6), S. 1456–1466. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3105-06.2007.

Martínez-Cuesta, María Ángeles; Blanch-Ruiz, María Amparo; Ortega-Luna, Raquel; Sánchez-López, Ainhoa; Álvarez, Ángeles (2020): Structural and Functional Basis for Understanding the Biological Significance of P2X7 Receptor. In: *International journal of molecular sciences* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228454.

McCarthy, Alanna E.; Yoshioka, Craig; Mansoor, Steven E. (2019): Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization. In: *Cell* 179 (3), 659–670.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2019.09.017.

Mehta, V. B.; Hart, J.; Wewers, M. D. (2001): ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (6), S. 3820–3826. DOI: 10.1074/jbc.M006814200.

Müller, Christa E. (2015): Medicinal chemistry of P2X receptors: allosteric modulators. In: *Current medicinal chemistry* 22 (7), S. 929–941. DOI: 10.2174/0929867322666141210155610.

Muttach, Fabian; Muthmann, Nils; Rentmeister, Andrea (2017): Synthetic mRNA capping. In: *Beilstein journal of organic chemistry* 13, S. 2819–2832. DOI: 10.3762/bjoc.13.274.

Nicke, A.; Bäumer, H. G.; 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. In: *The EMBO journal* 17 (11), S. 3016–3028. DOI: 10.1093/emboj/17.11.3016.

Nicke, Annette (2008): Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. In: *Biochemical and biophysical research communications* 377 (3), S. 803–808. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.10.042.

Nicke, Annette; Kerschensteiner, Daniel; Soto, Florentina (2005): Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. In: *Journal of neurochemistry* 92 (4), S. 925–933. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02939.x.

Nicke, Annette; Kuan, Yung-Hui; Masin, Mariana; Rettinger, Jürgen; Marquez-Klaka, Benjamin; Bender, Olaf et al. (2009): A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (38), S. 25813–25822. DOI: 10.1074/jbc.M109.033134.

- Nicke, Annette; Rettinger, Jürgen; Schmalzing, Günther (2003): Monomeric and dimeric byproducts are the principal functional elements of higher order P2X1 concatamers. In: *Molecular pharmacology* 63 (1), S. 243–252. DOI: 10.1124/mol.63.1.243.
- Nin-Hill, Alba; Mueller, Nicolas Pierre Friedrich; Molteni, Carla; Rovira, Carme; Alfonso-Prieto, Mercedes (2021): Photopharmacology of Ion Channels through the Light of the Computational Microscope. In: *International journal of molecular sciences* 22 (21). DOI: 10.3390/ijms222112072.
- North, R. Alan (2002): Molecular physiology of P2X receptors. In: *Physiological reviews* 82 (4), S. 1013–1067. DOI: 10.1152/physrev.00015.2002.
- Omasits, Ulrich; Ahrens, Christian H.; Müller, Sebastian; Wollscheid, Bernd (2014): Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (6), S. 884–886. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt607.
- Pelegriñ, Pablo; Surprenant, Annmarie (2006): Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. In: *The EMBO journal* 25 (21), S. 5071–5082. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601378.
- Pessia, M.; Tucker, S. J.; Lee, K.; Bond, C. T.; Adelman, J. P. (1996): Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K⁺ channels. In: *The EMBO journal* 15 (12), S. 2980–2987.
- Pippel, Anja; Stolz, Michaela; Woltersdorf, Ronja; Kless, Achim; Schmalzing, Günther; Markwardt, Fritz (2017): Localization of the gate and selectivity filter of the full-length P2X7 receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (11), E2156–E2165. DOI: 10.1073/pnas.1610414114.
- Priel, Avi; Silberberg, Shai D. (2004): Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. In: *The Journal of general physiology* 123 (3), S. 281–293. DOI: 10.1085/jgp.200308986.
- Radford, Kathryn M.; Virginio, Caterina; Surprenant, Annmarie; North, R. Alan; Kawashima, Eric (1997): Baculovirus Expression Provides Direct Evidence for Heteromeric Assembly of P2X 2 and P2X 3 Receptors. In: *J. Neurosci.* 17 (17), S. 6529–6533. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-17-06529.1997.
- Ralevic, V.; Burnstock, G. (1998): Receptors for purines and pyrimidines. In: *Pharmacological reviews* 50 (3), S. 413–492.
- Rassendren, F.; Buell, G. N.; Virginio, C.; Collo, G.; North, R. A.; Surprenant, A. (1997): The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (9), S. 5482–5486. DOI: 10.1074/jbc.272.9.5482.
- Recourt, Kasper; van der Aart, Jasper; Jacobs, Gabriel; Kam, Marieke de; Drevets, Wayne; van Nueten, Luc et al. (2020): Characterisation of the pharmacodynamic effects of the P2X7 receptor antagonist JNJ-54175446 using an oral dexamphetamine challenge model in healthy males in a randomised, double-blind, placebo-controlled, multiple ascending dose trial. In: *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* 34 (9), S. 1030–1042. DOI: 10.1177/0269881120914206.
- Rettinger, J.; Aschrafi, A.; Schmalzing, G. (2000): Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (43), S. 33542–33547. DOI: 10.1074/jbc.M002918200.

- Rettinger, Jürgen; Braun, Kirsten; Hochmann, Henrike; Kassack, Matthias U.; Ullmann, Heiko; Nickel, Peter et al. (2005): Profiling at recombinant homomeric and heteromeric rat P2X receptors identifies the suramin analogue NF449 as a highly potent P2X1 receptor antagonist. In: *Neuropharmacology* 48 (3), S. 461–468. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.11.003.
- Rettinger, Jürgen; Schmalzing, Günther (2004): Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P2X1 receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (8), S. 6426–6433. DOI: 10.1074/jbc.M306987200.
- Riedel, T.; Schmalzing, G.; Markwardt, F. (2007): Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X7 receptor-operated single-channel currents. In: *Biophysical journal* 93 (3), S. 846–858. DOI: 10.1529/biophysj.106.103614.
- Roberts, Jonathan A.; Evans, Richard J. (2007): Cysteine substitution mutants give structural insight and identify ATP binding and activation sites at P2X receptors. In: *J. Neurosci.* 27 (15), S. 4072–4082. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2310-06.2007.
- Roger, Sébastien; Mei, Zhu-Zhong; Baldwin, Jocelyn M.; Dong, Li; Bradley, Helen; Baldwin, Stephen A. et al. (2010): Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. In: *Journal of psychiatric research* 44 (6), S. 347–355. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2009.10.005.
- Rokic, M. B.; Tvrdoňová, V.; Vávra, V.; Jindřichová, M.; Obšil, T.; Stojilkovic, S. S.; Zemková, H. (2010): Roles of conserved ectodomain cysteines of the rat P2X4 purinoreceptor in agonist binding and channel gating. In: *Physiological research* 59 (6), S. 927–935. DOI: 10.33549/physiolres.931979.
- Royle, Stephen J.; Bobanović, Laura K.; Murrell-Lagnado, Ruth D. (2002): Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (38), S. 35378–35385. DOI: 10.1074/jbc.M204844200.
- Schägger, Hermann; Jagow, Gebhard von (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. In: *Analytical Biochemistry* 199 (2), S. 223–231. DOI: 10.1016/0003-2697(91)90094-a.
- Schmidt, Thomas G. M.; Skerra, Arne (2007): The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. In: *Nature protocols* 2 (6), S. 1528–1535. DOI: 10.1038/nprot.2007.209.
- Schneider, Markus; Prudic, Kirsten; Pippel, Anja; Klapperstück, Manuela; Braam, Ursula; Müller, Christa E. et al. (2017): Interaction of Purinergic P2X4 and P2X7 Receptor Subunits. In: *Frontiers in pharmacology* 8, S. 860. DOI: 10.3389/fphar.2017.00860.
- Skarratt, Kristen K.; Fuller, Stephen J.; Sluyter, Ronald; Dao-Ung, Lan-Phuong; Gu, Ben J.; Wiley, James S. (2005): A 5' intronic splice site polymorphism leads to a null allele of the P2X7 gene in 1-2% of the Caucasian population. In: *FEBS Letters* 579 (12), S. 2675–2678. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.03.091.
- Sluyter, Ronald (2017): The P2X7 Receptor. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1051, S. 17–53. DOI: 10.1007/5584_2017_59.
- Smart, Megan L.; Gu, Ben; Panchal, Rekha G.; Wiley, James; Cromer, Brett; Williams, David A.; Petrou, Steven (2003): P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (10), S. 8853–8860. DOI: 10.1074/jbc.M211094200.

- Sobolevsky, Alexander I.; Rosconi, Michael P.; Gouaux, Eric (2009): X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. In: *Nature* 462 (7274), S. 745–756. DOI: 10.1038/nature08624.
- Sonenberg, Nahum; Hinnebusch, Alan G. (2009): Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. In: *Cell* 136 (4), S. 731–745. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.042.
- Stoop, R.; Surprenant, A.; North, R. A. (1997): Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. In: *Journal of neurophysiology* 78 (4), S. 1837–1840. DOI: 10.1152/jn.1997.78.4.1837.
- Surprenant, A.; Rassendren, F.; Kawashima, E.; North, R. A.; Buell, G. (1996): The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). In: *Science (New York, N.Y.)* 272 (5262), S. 735–738. DOI: 10.1126/science.272.5262.735.
- Torres, G. E.; Egan, T. M.; Voigt, M. M. (1998a): N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. In: *Biochemistry* 37 (42), S. 14845–14851. DOI: 10.1021/bi981209g.
- Torres, G. E.; Egan, T. M.; Voigt, M. M. (1999): Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (10), S. 6653–6659. DOI: 10.1074/jbc.274.10.6653.
- Torres, G. E.; Haines, W. R.; Egan, T. M.; Voigt, M. M. (1998b): Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. In: *Molecular pharmacology* 54 (6), S. 989–993. DOI: 10.1124/mol.54.6.989.
- Torres, Gonzalo E.; Egan, Terrance M.; Voigt, Mark M. (1998c): Topological analysis of the ATP-gated ionotropic P2X 2 receptor subunit. In: *FEBS Letters* 425 (1), S. 19–23. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00179-3.
- Trang, Mira; Schmalzing, Günther; Müller, Christa E.; Markwardt, Fritz (2020): Dissection of P2X4 and P2X7 Receptor Current Components in BV-2 Microglia. In: *International journal of molecular sciences* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228489.
- Virginio, C.; Robertson, G.; Surprenant, A.; North, R. A. (1998): Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. In: *Molecular pharmacology* 53 (6), S. 969–973.
- Weber, W. M.; Liebold, K. M.; Reifarth, F. W.; Uhr, U.; Clauss, W. (1995): Influence of extracellular Ca²⁺ on endogenous Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 429 (6), S. 820–824. DOI: 10.1007/BF00374806.
- Wittig, Ilka; Braun, Hans-Peter; Schägger, Hermann (2006): Blue native PAGE. In: *Nature protocols* 1 (1), S. 418–428. DOI: 10.1038/nprot.2006.62.
- Worthington, R. A.; Smart, M. L.; Gu, B. J.; Williams, D. A.; Petrou, S.; Wiley, J. S.; Barden, J. A. (2002): Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X 7 receptor function. In: *FEBS Letters* 512 (1-3), S. 43–46. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)03311-7.
- Zemkova, Hana; Yan, Zonghe; Liang, Zhaodong; Jelinkova, Irena; Tomic, Melanija; Stojilkovic, Stanko S. (2007): Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions. In: *Journal of neurochemistry* 102 (4), S. 1139–1150. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04616.x.

8 Anhang

8.1 Verwendete cDNA-Konstrukte

Konstrukt nummer	Gene	Ausgangskonstrukt	Modifikation	Methode
K-7299	rP2X7 _{-His} -AGAG-rP2X7	K-7297 ► K-7298	Insertion	Ligation
K-7300	rP2X7 _{-His} -AGAG-rP2X7 _{-His} -AGAG-rP2X7	K-7298 ► K-7299	Insertion	Ligation
K-8141	S ⁴² C-rP2X7 _{-His}	K-7194	S ⁴² C	QC
K-8142	F ⁴³ C-rP2X7 _{-His}	K-7194	F ⁴³ C	QC
K-8143	A ⁴⁴ C-rP2X7 _{-His}	K-7194	A ⁴⁴ C	QC
K-8241	His-N ⁷⁵ Q-rP2X4	K-4283	N ⁷⁵ Q	QC
K-8242	His-N ^{75,110} Q-rP2X4	K-8241	N ¹¹⁰ Q	QC
K-8243	His-N ^{75,110,153} Q-rP2X4	K-8242	N ¹⁵³ Q	QC
K-8244	His-N ^{75,110,153,184} Q-rP2X4	K-8243	N ¹⁸⁴ Q	QC
K-8245	His-N ^{75,110,153,184,199} Q-rP2X4	K-8244	N ¹⁹⁹ Q	QC
K-8319	N ¹⁸⁷ Q-hP2X7 _{-His}	K-2312 (vorhanden)	N ¹⁸⁷ Q	QC
K-8320	N ²⁰² Q-hP2X7 _{-His}	K-2312 (vorhanden)	N ²⁰² Q	QC
K-8321	N ²¹³ Q-hP2X7 _{-His}	K-2312 (vorhanden)	N ²¹³ Q	QC
K-8322	N ²⁴¹ Q-hP2X7 _{-His}	K-2312 (vorhanden)	N ²⁴¹ Q	QC
K-8323	N ²⁸⁴ Q-hP2X7 _{-His}	K-2312 (vorhanden)	N ²⁸⁴ Q	QC
K-8324	N ^{187,202} Q-hP2X7 _{-His}	K-8319	N ²⁰² Q	QC
K-8325	N ^{187,202,213} Q-hP2X7 _{-His}	K-8324	N ²¹³ Q	QC
K-8326	N ^{187,202,213,241} Q-hP2X7 _{-His}	K-8325	N ²⁴¹ Q	QC
K-8327	N ^{187,202,213,241,284} Q-hP2X7 _{-His}	K-8326	N ²⁸⁴ Q	QC
K-8328	rP2X7 _{-His} -S2	K-8111	His	QC
K-8329	rP2X7 _{-S2}	K-3936	StrepII	MP-QC
K-8342	TLKYV ³⁹⁷⁻⁴⁰¹ AAAAA-hP2X7 _{-His} -S2	K-3065 (vorhanden)	TLKYV ³⁹⁷⁻⁴⁰¹ AAAAA	QC
K-8343	SFVDE ⁴⁰²⁻⁴⁰⁶ AAAAA-hP2X7 _{-His} -S2	K-3065 (vorhanden)	SFVDE ⁴⁰²⁻⁴⁰⁶ AAAAA	QC
K-8344	SHIRM ⁴⁰⁷⁻⁴¹¹ AAAAA-hP2X7 _{-His} -S2	K-3065 (vorhanden)	SHIRM ⁴⁰⁷⁻⁴¹¹ AAAAA	QC
K-8345	VNQQQL ⁴¹²⁻⁴¹⁶ AAAAA-hP2X7 _{-His} -S2	K-3065 (vorhanden)	VNQQQL ⁴¹²⁻⁴¹⁶ AAAAA	QC

K-8346	LGRSL ⁴¹⁷⁻⁴²¹ AAAAA-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	LGRSL ⁴¹⁷⁻⁴²¹ AAAAA	QC
K-8347	QDVKG ⁴²²⁻⁴²⁶ AAAAA-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	QDVKG ⁴²²⁻⁴²⁶ AAAAA	QC
K-8348	QEVPR ⁴²⁷⁻⁴³¹ AAAAA-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	QEVPR ⁴²⁷⁻⁴³¹ AAAAA	QC
K-8349	PAMDF ⁴³²⁻⁴³⁶ AAAAA-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	PAMDF ⁴³²⁻⁴³⁶ AAAAA	QC
K-8373	C ⁴⁷⁷ A-hP2X7 ⁴³⁴⁻⁵⁹⁵ -S2	K-3162 (vorhanden)	C ⁴⁷⁷ A	QC
K-8374	C ⁴⁷⁹ A-hP2X7 ⁴³⁴⁻⁵⁹⁵ -S2	K-3162 (vorhanden)	C ⁴⁷⁹ A	QC
K-8375	C ⁴⁸² A-hP2X7 ⁴³⁴⁻⁵⁹⁵ -S2	K-3162 (vorhanden)	C ⁴⁸² A	QC
K-8386	R ⁵⁷⁸ A,K ⁵⁷⁹ A-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	R ⁵⁷⁸ A,K ⁵⁷⁹ A	QC
K-8387	hP2X7 ⁴³⁴⁻⁵⁹⁵ -His-S2	K-3162 (vorhanden)	His	QC
K-8412	hP2X7 ² .AatII	K-2270 (vorhanden)	+ 2.AatII	QC
K-8413	hP2X7 ⁴¹¹⁻⁵⁹⁵	K-8412		OT-Rel.
K-8418	hP2X7 ² .AatII	K-2270 (vorhanden)	+ 2.AatII	QC
K-8419	hP2X7 ³⁸⁰⁻⁵⁹⁵	K-8418		OT-Rel.
K-8420	Y ³⁴³ A-hP2X7	K-2270 (vorhanden)	Y ³⁴³ A	QC
K-8421	G ³⁴⁵ A-hP2X7	K-2270 (vorhanden)	G ³⁴⁵ A	QC
K-8422	S ³⁴² A,Y ³⁴³ A-hP2X7	K-2270 (vorhanden)	S ³⁴² A,Y ³⁴³ A	QC
K-8423	Y ³⁴³ A,G ³⁴⁵ A-hP2X7	K-2270 (vorhanden)	Y ³⁴³ A,G ³⁴⁵ A	QC
K-8424	S ³³⁹ A-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	S ³³⁹ A	QC
K-8425	S ³³⁹ A,S ³⁴² A-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	S ³³⁹ A,S ³⁴² A	QC
K-8426	Y ³⁴³ A-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	Y ³⁴³ A	QC
K-8427	G ³⁴⁵ A-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	G ³⁴⁵ A	QC
K-8428	S ³⁴² A,Y ³⁴³ A-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	S ³⁴² A,Y ³⁴³ A	QC
K-8429	Y ³⁴³ A,G ³⁴⁵ A-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	Y ³⁴³ A,G ³⁴⁵ A	QC
K-8430	D ¹⁹⁷ A,S ³³⁹ H-hP2X7	K-5371(vorhanden)	D ¹⁹⁷ A,S ³³⁹ H	QC
K-8431	D ¹⁹⁷ A,S ³⁴² H-hP2X7	K-5371(vorhanden)	D ¹⁹⁷ A,S ³⁴² H	QC
K-8443	R ⁵⁷⁸ E,K ⁵⁷⁹ E-hP2X7	K-2270 (vorhanden)	R ⁵⁷⁸ E,K ⁵⁷⁹ E	QC
K-8444	R ⁵⁷⁸ E,K ⁵⁷⁹ E-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	R ⁵⁷⁸ E,K ⁵⁷⁹ E	QC
K-8500	G ³⁴⁵ A-hP2X7	K-2270 (vorhanden)	G ³⁴⁵ A	QC
K-8501	S ³³⁹ A,S ³⁴² A,Y ³⁴³ A-hP2X7	K-8153 (vorhanden)	S ³⁴² A,Y ³⁴³ A	QC
K-8502	S ³⁴² A,Y ³⁴³ A,G ³⁴⁵ A-hP2X7	K-7437 (vorhanden)	Y ³⁴³ A,G ³⁴⁵ A	QC

K-8503	S ³³⁹ A,S ³⁴² A,Y ³⁴³ A,G ³⁴⁵ A-hP2X7	K-8502	S ³³⁹ A	QC
K-8504	Y ³⁴³ A,G ³⁴⁵ A-hP2X7	K-2270 (vorhanden)	Y ³⁴³ A	QC
K-8530	Y ⁴⁰ A-hP2X7	K-2270 (vorhanden)	Y ⁴⁰ A	QC
K-8531	Y ⁴⁰ A-hP2X7 _{-His-Strep2}	K-3065 (vorhanden)	Y ⁴⁰ A	QC
K-8548	G ³³⁸ F-hP2X7	K-8191 (vorhanden)	G ³³⁸ F	QC
K-8549	G ³³⁸ Y-hP2X7	K-8191 (vorhanden)	G ³³⁸ Y	QC
K-8550	G ³³⁸ W-hP2X7	K-2270 (vorhanden)	G ³³⁸ W	QC
K-8551	G ³³⁸ I-hP2X7	K-8191 (vorhanden)	G ³³⁸ I	QC
K-8574	His-H ²⁴¹ A-rP2X4	K-4283 (vorhanden)	H ²⁴¹ A	QC
K-8575	His-E ²⁴⁹ K-rP2X4	K-7688 (vorhanden)	E ²⁴⁹ K	QC
K-8653	¹²⁵ sfGFP-hP2X7B	K-4356 (vorhanden)	¹²⁵ sfGFP	MP-QC
K-8654	¹²⁵ sfGFP-hP2X7A	K-2270 (vorhanden)	¹²⁵ sfGFP	MP-QC
K-8665	Y ²⁶ H-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	Y ²⁶ H	QC
K-8666	G ²⁷ H-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	G ²⁷ H	QC
K-8667	T ²⁸ H-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	T ²⁸ H	QC
K-8668	I ²⁹ H-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	I ²⁹ H	QC
K-8669	K ³⁰ H-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	K ³⁰ H	QC
K-8670	W ³¹ H-hP2X7 _{-His-S2}	K-3065 (vorhanden)	W ³¹ H	QC
K-8675	S ³ -hP2X7B	K-4356 (vorhanden)	Strep3	MP-QC
K-8739	hP2X2	K-8013 (vorhanden)	His	QC
K-8742	His-hP2X4-S ³	K-7948 (vorhanden)	Strep3	MP-QC
K-8752	rP2X7 _{-His-S3}	K-8329	His	QC
K-8793	His-hASIC1a-S ³	K-6129 (vorhanden)	Strep3	MP-QC
K-8794	S ³ -hASIC1a	K-5824 (vorhanden)	Strep3	MP-QC
K-8795	His-S ³ -hASIC1a	K-8794	His	QC
K-8796	His-hP2X1-S ³	K-8004 (vorhanden)	Strep3	MP-QC
K-8797	His-hP2X2-S ³	K-8983	Strep3	MP-QC
K-8798	His-hP2X3-S ³	K-4329 (vorhanden)	Strep3	MP-QC
K-8799	His-hP2X5 ^{FL,LL} -S ³	K-2034 (vorhanden)	Strep3	MP-QC
K-8800	His-hP2X6-S ³	K-7847 (vorhanden)	Strep3	MP-QC
K-8825	HindIIIrP2X4	K-4282 (vorhanden)	+1.HindIII	QC
K-8826	HindIIIrP2X4-interne BspHI	K-8825	-3.BspHI	QC
K-8827	HindIIIrP2X4 ^{3AGS} -BspHI	K-8826	+3.BspHI	QC
K-8828	HindIIIHis-rP2X4 ^{3AGS} -BspHI	K-8827	His	QC

K-8833	rP2X4-rP2X4	K-8827 ► 8826	Insertion	Ligation
K-8834	His-rP2X4-rP2X4-rP2X4	K-8828 ► 8833	Insertion	Ligation
K-8835	HindIII-S3_rP2X4 ³ AGS,BspHI	K-8827	Strep3	MP-QC
K-8836	HindIII,NcoI-S3_rP2X7- His ^{AGAG} ,BspHI	K-7298 (vorhanden)	Strep3	MP-QC
K-8846	HindIII_rP2X7	K-3936 (vorhanden)	+1.HindIII	QC
K-8847	HindIII,NcoI_rP2X7	K-8846	+1.NcoI	QC
K-8848	HindIII,NcoI_rP2X7 ^{AGAG} ,BspHI	K-8847	+3.BspHI	QC
K-8849	rP2X7 ^{AGAG} -Dimer	K-8848 ► K-8847	Insertion	Ligation
K-8850	rP2X7 ^{AGAG} -Trimer	K-8848 ► K-8849	Insertion	Ligation
K-8851	HindIII_hP2X7	K-2538	+1.HindIII	QC
K-8852	HindIII,NcoI_hP2X7	K-8851	+1.NcoI	QC
K-8853	HindIII,NcoI_hP2X7 ^{AGAG} ,BspHI	K-8852	+3.BspHI	QC
K-8854	hP2X7 ^{AGAG} -hP2X7	K-8853 ► K-8852	Insertion	Ligation
K-8855	hP2X7 ^{AGAG} -hP2X7 ^{AGAG} - hP2X7	K-8853 ► K-8854	Insertion	Ligation
K-8863	sfGFP-hP2X7A	K-2270 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC
K-8864	sfGFP-hP2X7B	K-4356 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC
K-8865	MCPQLAGAGS_hP2X6 ^{full-length} ΔQVGTDLs	K-7861 (vorhanden)	MCPQLAG AGS	QC
K-8866	His-hP2X6 ^{full-length} ΔQVGTDLs	K-8865	His	QC
K-8867	His-hP2X6- ^{S3-full-length} ΔQVGTDLs	K-8866	Strep3	MP-QC
K-8868	HindIII,NcoI S3_hP2X7 ^{AGAG} ,BspHI	K-8853	Strep3	MP-QC
K-8869	S3-hP2X7 ^{AGAG} -Trimer	K-8868 ► K-8854	Insertion	Ligation
K-8870	hP2X7 ¹⁻⁴⁰⁸ -sfGFP	K-3165 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC
K-8871	hP2X7 ¹⁻⁴⁰⁸ -sfGFP_His	K-8870	sfGFP	MP-QC
K-8872	sfGFP-hP2X7 ¹⁻⁴⁰⁸	K-3165 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC
K-8873	sfGFP-hP2X7 ¹⁻⁴⁰⁸ _His	K-3166 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC
K-8874	esfGFP-hP2X7 ¹⁻⁴⁰⁸ _His	K-3166 (vorhanden)	esfGFP	MP-QC
K-8875	hP2X7 ¹⁻⁴³⁶ -sfGFP	K-5574 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC
K-8876	hP2X7 ¹⁻⁴³⁶ -sfGFP_His	K-8875	His	QC
K-8877	sfGFP-hP2X7 ¹⁻⁴³⁶	K-5574 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC
K-8878	sfGFP-hP2X7 ¹⁻⁴³⁶ -His	K-8877	His	QC
K-8879	sfGFP-hP2X7 ¹⁻⁵⁰⁵ -His	K-3064 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC

K-8880	esfGFP-hP2X7 ¹⁻⁵⁰⁵ -His	K-3064 (vorhanden)	esfGFP	MP-QC
K-8882	His- ¹²² sfGFP-hP2X4	K-7948 (vorhanden)	¹²² sfGFP	MP-QC
K-8883	His-hP2X4-sfGFP	K-7948 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC
K-8884	sfGFP-hP2X7A-His	K-8863	His	QC
K-8889	His-mGFP-hP2X1	K-8004 (vorhanden)	mGFP	MP-QC
K-8890	His-sfGFP-hP2X1	K-8004 (vorhanden)	sfGFP	MP-QC
K-8891	His-hP2X1-mGFP	K-8004 (vorhanden)	mGFP	MP-QC
K-8894	rP2X4 _{3AGS} rP2X4 _{3AGS} rP2X4	K-8827 ► K-8833	Insertion	Ligation
K-8895	^{S3} rP2X4 _{3AGS} ^{S3} rP2X4 _{3AGS} ^{S3} rP2X4	K-8835 ► K-8833	Insertion	Ligation
K-8896	HindIIIHis-rP2X4-interne BspHI	K-8826	His	QC
K-8897	(His) ₂ -rP2X4-Dimer	K-8828 ► K-8896	Insertion	Ligation
K-8898	(His) ₃ -rP2X4-Trimer	K-8828 ► K-8897	Insertion	Ligation
K-8899	hTRPA1 ^{TGA}	K-7120 ► K-4641	pIRES-GFP	MP-QC
K-8900	hTRPV2 ^{TGA}	K-7133 ► K-4641	pIRES-GFP	MP-QC
K-8901	hTRPV3 ^{TGA}	K-7122 ► K-4641	pIRES-GFP	MP-QC
K-8929	^{S3} rP2X7 ^{His} rP2X7 ^{His} rP2X7 ^{His}	K-8836 ► K-7299	Insertion	Ligation
K-8930	^{S3} rP2X7 ^{His} rP2X7-rP2X7	K-8836 ► K-8849	Insertion	Ligation
K-8931	His-hVDAC1- ^{S3} -TGA	K-8774	Strep3	MP-QC
K-8932	His-hVDAC2- ^{S3} TGA	K-8776	Strep3	MP-QC
K-8933	His-hVDAC3- ^{S3} TGA	K-8777	Strep3	MP-QC
K-8937	^{S3} rP2X7 ^{His} -rP2X4-rP2X4	K-8836 ► K-8833	Insertion	Ligation
K-8942	^{S3} rP2X4 _{AGS} AGSAGSAGSfP2X7 _{AGAG} rP2X7	K-8835 ► K-8849	Insertion	Ligation
K-8943	His-rP2X4-rP2X7-rP2X7	K-8828 ► K-8849	Insertion	Ligation
K-8944	rP2X4-rP2X7-rP2X7	K-8827 ► K-8849	Insertion	Ligation
K-8945	rP2X7-rP2X4-rP2X4	K-8848 ► K-8833	Insertion	Ligation
K-8946	rP2X4-rP2X7	K-8827 ► K-8847	Insertion	Ligation
K-8947	^{S3} rP2X4 _{3AGS} rP2X4 _{3AGS} rP2X7	K-8835 ► K-8946	Insertion	Ligation
K-8948	His-rP2X4 _{3AGS} fP2X4 _{3AGS} rP2X7	K-8828 ► K-8946	Insertion	Ligation
K-8949	^{S3} rP2X7 ^{His} -rP2X4-rP2X7-	K-8836 ► K-8946	Insertion	Ligation
K-8950	rP2X7-His-rP2X4-rP2X7-	K-7298 ► K-8946	Insertion	Ligation
K-8951	rP2X7-rP2X4-Heterodimer	K-8848 ► K-8826	Insertion	Ligation

K-8952	S ₃ rP2X4 ^{3AGS} rP2X7 ^{AGAG} rP2X4	K-8835 ► K-8951	Insertion	Ligation
K-8953	His _r P2X4-rP2X7-rP2X4-	K-8828 ► K-8951	Insertion	Ligation
K-8954	S ₃ rP2X7 ^{His} -rP2X7-rP2X4-	K-8836 ► K-8951	Insertion	Ligation
K-8955	rP2X7 ^{-His} -rP2X7-rP2X4-	K-7298 ► K-8951	Insertion	Ligation
K-8956	HindIIIhP2X7-His	K-2312 (vorhanden)	+1.HindIII	QC
K-8957	HindIII,.NcoIhP2X7-His	K-8956	+1.NcoI	QC
K-8958	HindIII,NcoIhP2X7 ^{AGAG} ,BspHI-His	K-8957	+3.BspHI	QC
K-8972	S ₃ rP2X4 ^{AGSAGSAGS} rP2X7	K-8835 ► K-8847	Insertion	Ligation
K-8973	His-rP2X4-rP2X7	K-8828 ► K-8847	Insertion	Ligation
K-8974	S ₃ rP2X7 ^{His} -rP2X4	K-8836 ► K-8826	Insertion	Ligation
K-8975	rP2X7 ^{-His} -rP2X	K-7298 ► K-8826	Insertion	Ligation
K-8983	His-hP2X2	K-8739 (vorhanden)	His	QC
K-8991	HindIII,NcoI S ₃ -rP2X7	K-8847	Strep3	MP-QC
K-8992	S ₃ -rP2X4 ^{AGAG} rP2X4	K-8835 ► K-8826	Insertion	Ligation
K-8993	S ₃ rP2X4 ^{AGSAGSAGS} S ₃ rP2X4 ^{3AG} s	K-8835 ► K-8835	Insertion	Ligation
K-8994	Strep ³ rP2X7 ^{AGAG} -rP2X7	K-9002 ► K-8847	Insertion	Ligation
K-8995	S ₃ rP2X7 ^{AGAG} S ₃ rP2X7	K-9002 ► K-8991	Insertion	Ligation
K-8996	S ₃ rP2X4 ^{3AGS} S ₃ rP2X7	K-8835 ► K-8991	Insertion	Ligation
K-8997	S ₃ rP2X7 ^{AGAG} S ₃ rP2X4 ^{3AGS}	K-9002 ► K-8835	Insertion	Ligation
K-8998	S ₃ rP2X4 ^{3AGS} rP2X4 ^{3AGS} rP2X4 -Trimer	K-8835 ► K-8833	Insertion	Ligation
K-8999	S ₃ rP2X4 ^{3AGS} S ₃ rP2X4 ^{3AGS} S ₃ rP2X4 ^{3AGS}	K-8835 ► K-8993	Insertion	Ligation
K-9000	S ₃ rP2X7 ^{AGAG} rP2X7 ^{AGAG} rP2X 7-Trimer ^v	K-9002 ► K-8849	Insertion	Ligation
K-9001	S ₃ rP2X7 ^{AGAG} S ₃ rP2X7 ^{AGAG} S ₃ r P2X7-Trimer	K-9002 ► K-8995	Insertion	Ligation
K-9002	HindIII,NcoI.S ₃ rP2X7 ^{AGAG} BspHI	K-8991	<u>Strep3</u>	MP-QC
K-9003	His-K ⁶⁷ A,K ¹⁹⁰ A-hP2X4	K-7952	K ¹⁹⁰ A	QC
K-9004	His-R ²⁹⁵ A,K ³¹³ A-hP2X4	K-7954	K ³¹³ A	QC
K-9005	K ⁶⁴ A,K ¹⁹³ A-hP2X7	K-7932	K ⁶⁴ A	QC
K-9006	R ²⁹⁴ A,K ³¹¹ A-hP2X7	K-7934	R ²⁹⁴ A	QC
K-9007	P ⁴⁵¹ L-mP2X7	K-4220	P ⁴⁵¹ L	QC

K-9014	S ³ -hP2X7B-GASGAS	K-8675	GASGAS	QC
K-9015	S ³ -hP2X7B-HHH	K-8675	HHH	QC
K-9016	S ³ -hP2X7B-EYMPME	K-8675	EYMPME	QC
K-9017	H ¹⁵⁵ Y,R ²⁷⁰ H-hP2X7	K-8762 ^{QC}	pIRES-GFP	MP-QC
K-9018	S ³ -hP2X7A	K-2270 (vorhanden)	<u>Strep3</u>	MP-QC
K-9023	His-Strep3-hP2X7B	K-8675	His	QC
K-9024	K ⁶⁴ A,K ¹⁹³ A-hP2X7- ^{His}	K-7937 (vorhanden)	K ⁶⁴ A	QC
K-9025	R ²⁹⁴ A,K ³¹¹ A-hP2X7- ^{His}	K-7939 (vorhanden)	R ²⁹⁴ A	QC
K-9026	K ⁶⁴ A,K ¹⁹³ A-hP2X7	K-9005		
K-9027	HindIII,NcoI Strep3- rP2X7 ^{GGSGGSGGS} ,BspHI	K-9002	³ XGGS	QC
K-9028	S ³ -rP2X7 ^{SGGGGSSGGGS} _S ³ - rP2X7	K-9027 ► K-8991	Insertion	Ligation
K-9033	HiBiT-hP2X7- ^{His} -S ³	K-5675	HiBiT	QC
K-9058	S ³ -K ⁶⁴ A-rP2X7	K-8991	K ⁶⁴ A	QC
K-9059	S ³ -K ¹⁹³ A-rP2X7	K-8991	K ¹⁹³ A	QC
K-9060	S ³ -R ²⁹⁴ A-rP2X7	K-8991	R ²⁹⁴ A	QC
K-9061	S ³ -K ³¹¹ A-rP2X7	K-8991	K ³¹¹ A	QC
K-9062	S ³ -K ⁶⁴ A,K ¹⁹³ A-rP2X7	K-9058	K ¹⁹³ A	QC
K-9063	S ³ -R ²⁹⁴ A,K ³¹¹ A-rP2X7	K-9060	K ³¹¹ A	QC
K-9064	His-K ⁶⁷ A-rP2X4	K-4283 (vorhanden)	K ⁶⁷ A	QC
K-9065	His-K ¹⁹⁰ A-rP2X4	K-4283 (vorhanden)	K ¹⁹⁰ A	QC
K-9066	His-R ²⁹⁵ A-rP2X4	K-4283 (vorhanden)	R ²⁹⁵ A	QC
K-9067	His-K ³¹³ A-rP2X4	K-4283 (vorhanden)	K ³¹³ A	QC
K-9068	His-K ⁶⁷ A,K ¹⁹⁰ A-rP2X4	K-9064	K ¹⁹⁰ A	QC
K-9069	His-R ²⁹⁵ A,K ³¹³ A-rP2X4	K-9067	R ²⁹⁵ A	QC
K-9070	HindIII,NcoI S ³ -rP2X4	K-8825	<u>Strep3</u>	MP-QC
K-9071	S ³ rP2X7 ^{AGAG} S ³ rP2X4	K-9002 ► K-9070	Insertion	Ligation
K-9078	S ³ rP2X7 ^{AGAG} S ³ rP2X7 ^{AGAG} S ³ r P2X4	K-9002 ► K-9071	Insertion	Ligation
K-9079	S ³ rP2X4 ^{3AGS} S ³ rP2X4	K-8835 ► K-9070	Insertion	Ligation
K-9080	S ³ rP2X4 ^{3AGS} S ³ rP2X4 ^{3AGS} S ³ rP 2X4	K-8835 ► K-9079	Insertion	Ligation
K-9081	S ³ rP2X7 ^{2SGGGGS} S ³ rP2X7 ^{2SGG} GGS S ³ rP2X7	K-9027 ► K-9028	Insertion	Ligation

K-9082	Strep3rP2X7 ² SGGGGS_ Strep3rP2X7 ² SGGGGS_ Strep3rP2X7 ² SGGGGS_ Strep3rP2X7	K-9027 ► K-9081	Insertion	Ligation
K-9083	S ³ rP2X4 _{3AGS} S ³ rP2X7 _{AGAG} S ³ rP2X4	K-8835 ► K-9071	Insertion	Ligation
K-9084	S ³ rP2X4 _{3AGS} S ³ rP2X4 _{3AGS} S ³ rP2X7	K-8835 ► K-9996	Insertion	Ligation
K-9085	S ³ rP2X4 _{3AGS} S ³ rP2X7 _{AGAG} S ³ rP2X7	K-8835 ► K-8995	Insertion	Ligation
K-9086	S ³ rP2X7 _{AGAG} S ³ rP2X4 _{3AGS} S ³ rP 2X4	K-9002 ► K-9079	Insertion	Ligation
K-9087	S ³ rP2X7 _{AGAG} S ³ -rP2X4 _{3AGS} S ³ - rP2X7	K-9002 ► K-8996	Insertion	Ligation
K-9110	S ³ -N ²⁹² A-rP2X7	K-8991	N ²⁹² A	QC
K-9111	S ³ -K ⁶⁶ A-rP2X7	K-8991	K ⁶⁶ A	QC
K-9112	S ³ -T ¹⁸⁹ A-rP2X7	K-8991	T ¹⁸⁹ A	QC
K-9113	HindIII-S ³ -rP2X4 ^{GGSGGGSGGS} ,BspHI	K-8835	GGSGGGSGGS	QC
K-9130	S ³ -K ⁶⁶ A,T ¹⁸⁹ A-rP2X7	K-9111	T ¹⁸⁹ A	QC
K-9131	HindIII-S ³ -rP2X4 AGSAGGGGSAAGGGGG, BspHI	K-8835	AGSAGGGGSAAGG GGG	QC
K-9149	C ³⁷⁷ A-hP2X7-His-S ³		C ³⁷⁷ A	QC
K-9150	C ³⁸⁸ A-hP2X7-His- S ³		C ³⁸⁸ A	QC
K-9151	S ³ rP2X4 _{AGSAGGGGSAAGGGGG} rP2 X4	K-9131 ► K-8826	Insertion	Ligation
K-9152	S ³ rP2X4 _{AGSAGGGGSAAGGGGG} S ³ rP 2X4	K-9131 ► K-9070	Insertion	Ligation
K-9153	S ³ rP2X4 _{AGSAGGGGSAAGGGGG} S ³ rP 2X7	K-9131 ► K-8991	Insertion	Ligation
K-9170	S ³ rP2X4 _{AGSAGGGGSAAGGGGG} rP2 X7	K-9131 ► K-8847	Insertion	Ligation
K-9197	S ³ rP2X4 _{AGSAGGGGSAAGGGGG} S ³ rP 2X4 _{AGSAGGGGSAAGGGGG} rP2X4	K-9131 ► K-9151	Insertion	Ligation

K-9198	$S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGG} S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGG} S^3rP2X4$	K-9131 ► K-9152	Insertion	Ligation
K-9199	$S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGG} S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGG} S^3rP2X7$	K-9131 ► K-9153	Insertion	Ligation
K-9200	$S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGG} S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGGrP2X7}$	K-9131 ► K-9170	Insertion	Ligation
K-9202	$S^3rP2X7_{GGSGGSGGS} S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGGrP2X4}$	K-9027 ► K-9151	Insertion	Ligation
K-9203	$S^3rP2X7_{GGSGGSGGS} S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGG} S^3rP2X4$	K-9027 ► K-9152	Insertion	Ligation
K-9204	$S^3rP2X7_{GGSGGSGGS} S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGG} S^3rP2X7$	K-9027 ► K-9153	Insertion	Ligation
K-9205	$S^3rP2X7_{GGSGGSGGS} S^3rP2X4_{AGSAGGGSAGGSGG} rP2X7$	K-9027 ► K-9170	Insertion	Ligation
K-9206	HindIII-NcoI K ⁶⁷ A-rP2X4	K-8826	K ⁶⁷ A	QC
K-9207	R ²⁹⁵ A-rP2X4	K-8826	R ²⁹⁵ A	QC
K-9208	S ³ -K ⁶⁷ A-rP2X4	K-9070	K ⁶⁷ A	QC
K-9209	S ³ -R ²⁹⁵ A-rP2X4	K-9070	R ²⁹⁵ A	QC
K-9210	K ⁶⁴ A-rP2X7	K-8848	K ⁶⁴ A	QC
K-9211	R ²⁹⁴ A-rP2X7	K-8848	R ²⁹⁴ A	QC
K-9213	C ³⁷⁷ A-hP2X7-pcDNA5	K-3903	pcDNA5.1	QC
K-9214	C ³⁸⁸ A-hP2X7-pcDNA5	K-3903	pcDNA5.1	QC
K-9233	S ²¹⁹ V-TEV (Tobacco etch virus)	K-7995	pNKS-GW	MP-QC
K-9234	KozakHis ₈ -S ²¹⁹ V-TEV	K-9233	KozakHis ₈	QC
K-9235	HindIII, NcoI-S ³ -rP2X7 GGSGGGGS ^{ENLYFQ} GGGSGG ^{BspHI}	K-9027	ENLYFQ	QC
K-9236	$S^3rP2X7_{GGSGGGGS} ENLYFQ_{GGGGS} GG S^3rP2X7_{GGSGGGGS} ENLYFQ_{GGG} GSGG^{BspHI}$	K-9235 ► K-9235	Insertion	Ligation
K-9237	$S^3rP2X7_{GGSGGGGS} ENLYFQ_{GGGGS} GG S^3rP2X7_{GGSGGGGS} ENLYFQ_{GGG} GSGG S^3rP2X7$	K-9236 ► K-8991	Insertion	Ligation

K-9238	K ⁶⁷ A-rP2X4 ^{AGSAGSAGS-BspHI}	K-8827	K ⁶⁷ A	QC
K-9239	S3-K ⁶⁷ A-rP2X4 AGSAGGSAGGGSGG,BspHI	K-9131	K ⁶⁷ A	QC
K-9240	S3-K ⁶⁴ A- rP2X7 ^{GGSGGSGGS,BspHI}	K-9027	K ⁶⁴ A	QC
K-9241	TriLink ^{sfGFP-hP2X7A}	K-8863	TriLink	QC
K-9242	TriLink _{S3} rP2X7 ^{2GGGGS_} S3rP2X7 ^{2GGGGS_S3rP2X7}	K-9081	TriLink	QC
K-9245	S3-K ⁶⁴ A-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3- rP2X7	K-9240 ► K-8991	Insertion	Ligation
K-9246	S3-K ⁶⁴ A-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3- K ⁶⁴ A-rP2X7	K-9240 ► K-9058	Insertion	Ligation
K-9247	S3-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3-K ⁶⁴ A- rP2X7	K-9027 ► K-9058	Insertion	Ligation
K-9250	S3-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3-K ⁶⁴ A- rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3-rP2X7	K-9027 ► K-9245	Insertion	Ligation
K-9251	S3-K ⁶⁴ A-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3- K ⁶⁴ A-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3- K ⁶⁴ A-rP2X7	K-9240 ► K-9246	Insertion	Ligation
K-9252	S3-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3- rP2X7 GGSGGSGGS ^{S3-K⁶⁴A-rP2X7}	K-9027 ► K-9247	Insertion	Ligation
K-9253	S3-K ⁶⁴ A-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3- rP2X7 GGSGGSGGS ^{S3-rP2X7}	K-9240 ► K-9028	Insertion	Ligation
K-9254	S3-K ⁶⁴ A-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3- K ⁶⁴ A-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3- rP2X7	K-9240 ► K-9245	Insertion	Ligation
K-9255	S3-K ⁶⁴ A-rP2X7 ^{GGSGGSGGS} S3- rP2X7 GGSGGSGGS ^{S3-K⁶⁴A-rP2X7}	K-9240 ► K-9247	Insertion	Ligation
K-9257	His-hASIC2a-S3	K-6126	Strep3	MP-QC
K-9275	Kozak ^{His₈-S²¹⁹V-TEV-sfGFP}	K-9234	sfGFP	MP-QC

K-9326	S3-rP2X7 ^{GSSGSSGSSGSS} S3-K ⁶⁴ A- rP2X7 ^{GSSGSSGSSGSS} S3-K ⁶⁴ A- rP2X7	K-9027□K-9246	Insertion	Ligation
K-9364	rP2X4-S3	K-4282	Strep3	MP-QC
K-9365	hP2X4-S3	K-0894	Strep3	MP-QC
K-9366	hP2X7-S3	K-2270	Strep3	MP-QC
K-9373	SpyCatcher _{-GSSGS} -rP2X4-S3	K-9364	SpyCatcher _GSSGS	MP-QC
K-9374	SpyCatcher _{-GSSGS} -hP2X7- S3	K-9366	SpyCatcher _GSSGS	MP-QC

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Röntgenkristallstruktur je eines Mitgliedes von den drei LGIC-Superfamilien

Abb. 2 Röntgenkristallstruktur des zfP2X4 im geschlossenen und offenen Zustand

Abb. 3 Topologie und Hauptmerkmale von einer P2X-Rezeptor-Untereinheit

Abb. 4 Desensibilisierung der P2X-Rezeptoren der Ratte im Vergleich bei kurzer und langer ATP-Applikation

Abb. 5 Cartoon-Darstellung Apo-geschlossenen Struktur des pdP2X7

Abb. 6 Röntgenkristallstruktur der rP2X7-Untereinheit und des rP2X7-Rezeptors

Abb. 7 Schematische Darstellung, wie P2X4 und P2X7 interagieren können

Abb. 8 Topologie der hP2X7B-Untereinheit

Abb. 9 Topologie der vollständigen P2X7A-Untereinheit und der beiden trunkierten Varianten hP2X7A¹⁻³⁶⁴ und hP2X7A¹⁻³⁴⁶ ab der TM2

Abb. 10 Elektrophysiologische Charakterisierung der hP2X7A- und hP2X7B-Rezeptoren

Abb. 11 Koexpression von hP2X7A und hP2X7B in *X. laevis*-Oozyten

Abb. 12 Einfluss der Länge der C-terminalen Endodomäne auf die hP2X7B-Rezeptorfunktion

Abb. 13 Einfluss der Länge der C-terminalen Endodomäne auf die hP2X7A-Rezeptorfunktion

Abb. 14 Stromamplituden induziert durch drei aufeinander folgenden ATP-Applikationen

Abb. 15 Der Effekt von verschiedenen Tags bzw. Trunkierungen an den hP2X7A- und hP2X7B-Varianten

Abb. 16 Alignment der Aminosäuresequenzen der elektrophysiologisch und/oder biochemisch untersuchten hP2X7A- und hP2X7B-Konstrukte

Abb. 17 Quantifizierung der Gesamt -und Plasmamembranexpression der hP2X7A- und hP2X7B-Varianten

Abb. 18 Plasmamembran- und Gesamtexpression der hP2X7A- und hP2X7B-Konstrukte (Exp. 55, Lena)

Abb. 19 Interaktion von His-hP2X7B und His-hP2X4-StrepIII bzw. His-hP2X4-StrepIII-GFP

Abb. 20 Interaktion von His-hP2X7B und His-hP2X4-StrepIII bzw. His-hP2X4-StrepIII-GFP

Abb. 21 Interaktion von rP2X7-His-StrepII und His-rP2X4

Abb. 22 Vergleich verschiedener nicht-ionischer Detergenzien zur Isolierung von rP2X4 und rP2X7-Rezeptoren (Exp. 33)

Abb. 23 Quantitativer Vergleich der Detergenzien

Abb. 24 SDS-PAGE-Analyse der Interaktion von rP2X7-His-StrepII mit anderen His-rP2X-Isoformen

Abb. 25 SDS-PAGE-Analyse der Interaktion von rP2X7-His-StrepIII mit anderen His-rP2X-Isoformen in der Plasmamembran

Abb. 26 BN-PAGE-Analyse der Interaktion von rP2X7-His-StrepIII und His-rP2X-Isoformen in der Plasmamembran

Abb. 27 SDS-PAGE-Analyse der Interaktion von hP2X7-His-StrepIII und His-hP2X-Isoformen

Abb. 28 SDS-PAGE-Analyse der Interaktion von hP2X7-His-StrepIII mit His-hP2X-Isoformen in der Plasmamembran

Abb. 29 Analyse der Interaktion von hP2X7-His-StrepIII mit His-hP2X-Isoformen in der Plasmamembran mittels BN-PAGE

Abb. 30 Interaktion von trunkierten hP2X7-Varianten mit His-hP2X1-StrepIII und His-hP2X4-StrepIII

Abb. 31 BN-PAGE-Analyse der Interaktion von C-terminal trunkierten hP2X7-GFP-Untereinheiten mit His-hP2X1-StrepIII und His-hP2X4-StrepIII (Exp.63)

Abb. 32 Plasmamembran- und Gesamtexpression der hP2X7-Mutanten (Exp. 71, Lena + 86, Sanaria)

Abb. 33 Quantifizierung der Gesamt- und Plasmamembranexpression der hP2X7-Mutanten

Abb. 34 Plasmamembran- und Gesamtexpression der hP2X7-Mutanten (Exp. 71, Lena + 86, Sanaria)

Abb. 35 Plasmamembran- und Gesamtexpression der rP2X7-Mutanten

Abb. 36 Quantifizierung der Gesamt- und Plasmamembranexpression der hP2X7-Mutanten

Abb. 37 Topologie des homomeren rP2X7-Konkatomers mit dem AGAG-Linker

Abb. 38 Topologie der Linker und StrepIII-Sequenz der rP2X7-Untereinheit

Abb.39 Topologie des homomeren rP2X4-Konkatomers mit dem (AGS)₃-Linker

Abb.40 Topologie der Linker und StrepIII-Sequenz der rP2X4-Untereinheit

Abb. 41 Plasmamembran- und Gesamtexpression der homomeren rP2X7-Konkatomere

Abb. 42 Quantifizierung der Abbau-Produkte der rP2X7-Konkatomere in der Plasmamembran

Abb. 43 Plasmamembran- und Gesamtexpression der homomeren rP2X4- und rP2X7-Konkatomere

Abb. 44 Quantifizierung der proteolytischen Abbau-Produkte der rP2X7-Konkatomere in der Plasmamembran

Abb. 45 Topologie des heteromeren rP2X7-rP2X4-rP2X7-Konkatomers

Abb. 46 Topologie des heteromeren rP2X7-rP2X4-rP2X4-Konkatamers

Abb. 47 Plasmamembran- und Gesamtexpression der homomeren und heteromeren rP2X4- und rP2X7-Konkatamere

Abb. 48 Quantifizierung der proteolytischen Spaltungs-Produkte der rP2X7-Konkatamere in der Plasmamembran

Abb. 49 Plasmamembran- und Gesamtexpression der homomeren und heteromeren rP2X4- und rP2X7-Konkatamere

Abb. 50 Quantifizierung der proteolytischen Spaltungs-Produkte der rP2X7-Konkatamere in der Plasmamembran

Abb. 51 Extrazelluläre ATP-Bindungsstasche zwischen den Untereinheiten

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verwendete Chemikalien

Tab. 2 Puffer für die Inkubation der *X. laevis*-Oozyten

Tab. 3 Puffer für die Agarosegele

Tab. 4 Puffer zur Proteinaufreinigung aus *X. laevis*-Oozyten

Tab. 5 Puffer für die BN- und SDS-PAGE

Tab. 6 Ansatz einer QC-PCR

Tab. 7 PCR-Programm für die QC Site-Directed Mutagenese

Tab. 8 Zusammensetzung von SDS-PAGE

Tab. 9 Zusammensetzung von BN-PAGE

Tab. 10 Die errechneten molekularen Massen der zu homo- und heteromeren Dimeren und Trimeren interagierenden P2X4- und P2X7B-Untereinheiten.

Tab. 11 Die errechneten molekularen Massen der zu homo- und heteromeren Dimeren und Trimeren interagierenden P2X4- und P2X7-Untereinheiten.

Tab. 12 Die errechneten molekularen Massen der zu homo- und heteromeren Dimeren und Trimeren interagierenden P2X7- und den weiteren P2X-Untereinheiten.

Tab. 13 Die errechneten molekularen Massen der homomeren und heteromeren rP2X7- und rP2X-Isoformen.

Tab. 14 Die errechneten molekularen Massen der mit hP2X7 zu homo- und heteromeren Dimeren und Trimeren interagierenden hP2X1- und hP2X4-Untereinheiten.

8.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Schmalzing für die besondere Unterstützung und die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank für die exzellente Betreuung, die produktiven Diskussionen und die gute Zusammenarbeit. Ich schätze deinen Einsatz und deine Hilfsbereitschaft der letzten Jahre sehr.

Auch gilt mein Dank Prof. Dr. Müller für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die Betreuung während der Masterarbeit.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Fritz Markwardt vom Julius-Bernstein-Institut in Halle und seinem Mitarbeiter Malte Berthold für die regelmäßigen interessanten Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Ebenso möchte ich mich bei dem gesamten Team des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der RTWH Aachen bedanken. Insbesondere bei Ralf Hausmann, Silvia Detro-Dassen, Lena Hauswirth, Anke Dyopchai, Linda Krüger und Vera Weiß, die mir bei Fragen stets hilfreich zur Seite standen. Zudem bedanke ich mich bei meinen Kollegen und Freunden Gerrit Wilms, Sabrina Yamoune, Alison Wieseahn und Marco Pappenfuss für die schöne gemeinsame Zeit.

Ein sehr großer Dank gilt meinen Eltern für die fortlaufende Unterstützung während des Studiums. Zuletzt danke ich dem Rest meiner Familie und meinen Freunden für

Ihren Glauben in mich und meine Fähigkeiten sowie für die Ablenkung während des Studiums.