

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Liganden-gesteuerte Ionenkanäle .....	1
1.2	Purinerge Rezeptoren .....	3
1.3	P2X-Rezeptoren .....	3
1.3.1	ATP als endogener Ligand für P2X-Rezeptoren.....	3
1.3.2	Struktur der P2X-Rezeptoren.....	4
1.3.3	Lokalisation und physiologische Funktion der P2X-Rezeptoren.....	8
1.3.4	Assemblierung heteromerer P2X-Rezeptoren .....	10
1.4	Pharmakologische Eigenschaften von P2X-Rezeptoren.....	13
1.4.1	Agonisten .....	14
1.4.2	Antagonisten .....	14
1.4.3	Regulation .....	15
1.5	Assemblierung von Membranproteinen.....	17
1.5.1	N-Glykosylierung von Membranproteinen.....	19
1.5.2	Assemblierung und Bildung von Disulfidbrücken von Membranproteinen.....	20
1.6	Heterologe Expressionssysteme für LGICs.....	21
1.6.1	<i>Escherichia coli</i> als heterologes Expressionssystem für LGICs.....	21
1.6.2	<i>Pichia pastoris</i> als heterologes Expressionssystem für LGICs.....	22
1.6.3	<i>Xenopus laevis</i> -Oozyten als heterologes Expressionssystem für LGIC.....	23
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
3.1	Material .....	28
3.1.1	Chemikalien.....	28
3.1.2	Oligonukleotide.....	28
3.1.3	Enzyme .....	28
3.1.4	Wasser .....	28
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	28
3.2.1	Steriltechnik.....	28
3.2.2	Eigenschaften der verwendeten Vektoren .....	29
3.2.3	Transformation in <i>E.coli</i> und Isolierung von Plasmiden .....	29
3.2.4	Phenol/Chloroform-Extraktion zur DNA Reinigung .....	29
3.2.5	Ethanol-Natriumacetat-Präzipitation von Plasmid-DNA.....	30
3.2.6	Gerichtete Mutagenese zur Modifikation der cDNA-Konstrukte .....	30
3.2.7	Ligation und PCR-Amplifikation zum Subklonieren von cDNA.....	30

---

3.2.8	Transiente Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamin .....	32
3.2.9	Fixierung der Zellen .....	32
3.2.10	DNA-Sequenzierung .....	33
3.2.11	Klonierte cDNA-Konstrukte .....	33
<b>3.3</b>	<b>cRNA-Synthese .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4</b>	<b><i>X.laevis</i>-Oozyten als Expressionssystem .....</b>	<b>34</b>
3.4.1	Herkunft und Haltung der Frösche .....	34
3.4.2	Ovarentnahme.....	34
3.4.3	Kollagenase Behandlung der <i>X.laevis</i> -Oozyten.....	35
3.4.4	cRNA-Mikroinjektion in <i>X.laevis</i> -Oozyten .....	35
<b>3.5</b>	<b><i>P.pastoris</i> als Expressionssystem .....</b>	<b>35</b>
3.5.1	Transformation von <i>P.pastoris</i> durch Elektroporation.....	35
3.5.2	Selektion von <i>P.pastoris</i> -Klonen mit mehrfachen Vektorinsertionen .....	36
3.5.3	Heterologe Expression in <i>P.pastoris</i> .....	36
<b>3.6</b>	<b>Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>37</b>
3.6.1	Isolierung der <i>P.pastoris</i> -Zellmembran .....	37
3.6.2	Metabolische Markierung mittels L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin in <i>X.laevis</i> -Oozyten .....	37
3.6.3	Metall-Chelat Affinitätschromatographie .....	38
3.6.4	Strep-Tactin Affinitätschromatographie.....	40
3.6.5	Enzymatische Deglykosylierung .....	40
3.6.6	Markierung von Proteinen durch <sup>125</sup> I-Sulfo-SHPP .....	41
3.6.7	Oberflächenmarkierung durch Cy5-Mono-NHS-Ester .....	42
3.6.8	Chemisches Crosslinken mit DTSSP, DMS und BS <sup>3</sup> .....	42
3.6.9	Limitierte Trypsinolyse .....	43
<b>3.7</b>	<b>Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (PAGE).....</b>	<b>43</b>
3.7.1	Denaturierende SDS-PAGE.....	43
3.7.2	Denaturierende Tricin-SDS-PAGE.....	44
3.7.3	Blaue-Native-PAGE .....	45
3.7.4	PFO-PAGE.....	46
<b>3.8</b>	<b>Detektion der Proteine .....</b>	<b>47</b>
3.8.1	PhosphorImaging .....	47
3.8.2	Typhoon-Fluoreszenz Imaging.....	47
3.8.3	Entfärbung von BN-PAGE Gelen zur Fluoreszenzanalyse.....	48
3.8.4	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie .....	48
3.8.5	Proteinbestimmung durch MALDI-TOF Massenspektroskopie.....	48
3.8.6	Einzelmolekül Fluoreszenzspektroskopie .....	49
3.8.7	Immunodetektion durch Westen-Blot-Analyse .....	49

<b>3.9</b>	<b>Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an <i>X.laevis</i>-Oozyten .....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Heterologe Expression in <i>Pichia Pastoris</i> .....</b>	<b>52</b>
4.1.1	Klonierung und Expression der rP2X <sub>1</sub> -Untereinheit in <i>P.pastoris</i> .....	52
4.1.2	Solubilisierung von His-rP2X <sub>1</sub> -Protein aus <i>P. pastoris</i> .....	55
4.1.3	Untersuchung der Glykosylierung von His-rP2X <sub>1</sub> -Untereinheiten aus <i>P.pastoris</i> .....	58
4.1.4	Analyse des Quartärzustandes von His-rP2X <sub>1</sub> -Protein aus <i>P.pastoris</i> .....	59
4.1.5	Analyse des Quartärzustandes des aus <i>P.pastoris</i> -isolierten His-rP2X <sub>1</sub> -Proteins durch chemisches <i>Crosslinking</i> .....	64
4.1.6	Analyse der rP2X <sub>1</sub> -Proteinfaltung durch limitierte Trypsinolyse .....	65
<b>4.2</b>	<b>Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenproteine zur Untersuchung von P2X-Rezeptoren .....</b>	<b>67</b>
4.2.1	Markierung von BSA mit Fluoreszenzfarbstoffen .....	67
4.2.2	Fluoreszenzmarkierung von His-rP2X <sub>1</sub> -Rezeptoren an der Zelloberfläche von <i>X.laevis</i> -Oozyten .....	69
4.2.3	Untersuchung des Glykosylierungszustandes von Plasmamembran-ständigen His-rP2X <sub>1</sub> -Rezeptoren .....	70
4.2.4	Analyse des Quartärzustandes von fluoreszenzmarkiertem BSA mittels CN-PAGE und PFO-PAGE .....	73
4.2.5	Untersuchung des Quartärzustandes von His-rP2X <sub>1</sub> -, His-rP2X <sub>2</sub> - und GlyR $\alpha$ 1-His-Untereinheiten an der Zelloberfläche .....	77
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung der Heteroassemblierung von P2X-Rezeptoren .....</b>	<b>80</b>
4.3.1	Nachweis der Bildung von P2X-Heterotrimeren durch einen spezifischen Protein-Protein-Interaktions-Assay .....	80
4.3.2	Nachweis der Bildung von P2X-Heterotrimeren der rP2X <sub>1</sub> -Untereinheit mittels Strep-Tactin-Interaktions-Assay .....	82
4.3.3	Nachweis der Bildung von P2X-Heterotrimeren der rP2X <sub>2</sub> -Untereinheit mittels Strep-Tactin-Interaktions-Assay .....	86
4.3.4	Nachweis der Bildung von P2X-Heterotrimeren der rP2X <sub>3</sub> -Untereinheit mittels Strep-Tactin-Interaktions-Assay .....	89
4.3.5	Nachweis der Bildung von P2X-Heterotrimeren der rP2X <sub>4</sub> -Untereinheit mittels Strep-Tactin-Interaktions-Assay .....	92
4.3.6	Nachweis der Bildung von P2X-Heterotrimeren der rP2X <sub>5</sub> -Untereinheit mittels Strep-Tactin-Interaktions-Assay .....	94
4.3.7	Nachweis der Bildung von P2X-Heterotrimeren der rP2X <sub>6</sub> -Untereinheit mittels Strep-Tactin-Interaktions-Assay .....	97
4.3.8	Nachweis der Bildung von P2X-Heterotrimeren der rP2X <sub>7</sub> -Untereinheit mittels Strep-Tactin-Interaktions-Assay .....	102

<b>4.4</b>	<b>Untersuchung des P2X<sub>1+6</sub>-Heteromers .....</b>	<b>105</b>
4.4.1	Heteroassemblierung von His-rP2X <sub>1</sub> -StrepII und His-rP2X <sub>6</sub> -Untereinheiten .....	105
4.4.2	Glykosylierungszustand der His-rP2X <sub>6</sub> -Untereinheit im rP2X <sub>1+6</sub> -Rezeptorkomplex .....	107
4.4.3	Elektrophysiologische Charakterisierung von P2X <sub>1+6</sub> -Rezeptoren .....	108
<b>4.5</b>	<b>Untersuchung der Rezeptorstöchiometrie von rP2X<sub>1+2</sub> Heteromeren .....</b>	<b>110</b>
4.5.1	Heteroassemblierung von rP2X <sub>1+2</sub> Komplexen .....	110
4.5.2	Fluoreszenz-BN-PAGE zur Untersuchung der rP2X <sub>1+2</sub> Rezeptorstöchiometrie .....	113
4.5.3	Quantifizierung der interagierenden P2X-Untereinheit an der Oberfläche zur Untersuchung der Rezeptorstöchiometrie .....	116
4.5.4	Einzelmolekülspektroskopie an P2X <sub>1+2</sub> - und P2X <sub>2+3</sub> -Komplexen .....	120
4.5.5	Subzelluläre Verteilung koexprimierter rP2X <sub>1</sub> - und rP2X <sub>2</sub> -Untereinheiten in CHO-K1-Zellen .. .....	130
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>135</b>
<b>5.1</b>	<b>Strukturelle Betrachtungen von P2X-Rezeptoren .....</b>	<b>135</b>
5.1.1	Heterologe Expression der His-rP2X <sub>1</sub> -Untereinheit in <i>P.pastoris</i> .....	135
5.1.2	N-Glykosylierungsstatus und Assemblierungsverhalten in <i>P.pastoris</i> exprimierter His-rP2X <sub>1</sub> - Untereinheiten .....	137
5.1.3	Einfluss von Phospholipiden auf die Quartärstruktur der His-rP2X <sub>1</sub> -Untereinheit in <i>P.pastoris</i> .....	138
5.1.4	Faltung der His-rP2X <sub>1</sub> -Untereinheit.....	139
<b>5.2</b>	<b>Validierung der Fluoreszenzmarkierung der Zelloberfläche als geeignete Methode zur Untersuchung der Oberflächenexpression und Quartärstruktur von P2X-Rezeptoren ...</b>	<b>140</b>
5.2.1	Fluoreszenzmarkierung im Vergleich zu anderen Methoden der Oberflächenmarkierung	140
5.2.2	Fluoreszenzmarkierung als geeignete Methode zur Untersuchung der Oberflächenexpression von P2X-Rezeptoren.....	140
5.2.3	Entfärbung von BN-PAGE-Gelen zur Untersuchung der Quartärstruktur von fluoreszenzmarkierten Plasmamembran-ständigen P2X-Rezeptoren.....	141
<b>5.3</b>	<b>Heteroassemblierung von P2X-Rezeptorsubtypen .....</b>	<b>142</b>
5.3.1	Strep-Tactin Chromatographie als Protein-Protein Interaktions Assay .....	142
5.3.2	Nachweis bereits bekannter heteromerer P2X-Rezeptoren .....	144
5.3.3	Identifizierung neuer heteromerer P2X-Rezeptoren .....	150
<b>5.4</b>	<b>rP2X<sub>1+2</sub>-Rezeptorstöchiometrie .....</b>	<b>152</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>157</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>159</b>

---

<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>178</b>
8.1	Klonierte cDNA-Konstrukte .....	178
8.2	Abkürzungsverzeichnis .....	183
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>186</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>188</b>