

**Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
(Direktor: Herr Prof. Dr. med. Michael Gekle)

**Funktionelle Bedeutung der C-terminalen Domäne des humanen
P2X7-Rezeptors**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

an der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Daniel Becker
geboren am 10.10.1980 in Halle an der Saale

Betreuer: Prof. Dr. Fritz Markwardt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Fritz Markwardt
ML Universität Halle, JB Institut für Physiologie
2. Prof. Dr. G. Reiser
OvG Universität Magdeburg, Institut für Neurobiochemie

Biographische Beschreibung und Referat

Referat: P2X7-Rezeptoren sind ligandenabhängige unspezifische Kationenkanäle, die durch extrazelluläres ATP geöffnet und vor allem in Zellen des Immunsystems exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte durch getrennte Expression von verkürztem P2X7-Rezeptor und der komplementären C-terminalen Domäne der Frage nachgegangen werden, in welcher Weise der Ionenkanalporen-bildende verkürzte Rezeptoranteil und die komplementäre C-terminale Domäne bei der Steuerung des Schaltverhaltens des P2X7-Rezeptors zusammenwirken, welche Abschnitte des verkürzten Rezeptors und der C-terminalen Domäne für eine Interaktion der beiden Rezeptoranteile wesentlich von Bedeutung sind und ob die C-terminale Domäne des P2X7-Rezeptors auch modulierend auf andere P2X-Rezeptoren wirkt.

Zusammenfassung:

- Es erfolgt eine starke Verringerung der ATP-induzierten Stromamplitude bei Verkürzung des P2X7-Rezeptorproteins im Bereich der Aminosäuren 408-583.
- Die Trunkierung bewirkt eine Aufhebung der linear zunehmenden sowie der schnell exponentiell abnehmenden Rezeptorantwort.
- Stromamplitude und Ionenkanalkinetik sowie die ATP-Konzentrationsabhängigkeit in der Art des Volllängen-Rezeptors werden nach Coexprimierung des trunkierten P2X7-Rezeptors und der komplementären C-terminalen Domäne wiederhergestellt.
- Die Deletion des C-terminalen Endes hat einen dominant negativen Effekt auf die P2X7-Rezeptor-Aktivierung.
- Koexpression von trunkiertem P2X7-Rezeptor und C-terminaler Domäne P2X7 435-595 führt ebenso zu einer stimulatorischen Interaktion bei trunkierten P2X7-Rezeptoren mit einer geringeren Verkürzung als beim P2X7 1-436, nicht jedoch beim stärker verkürzten P2X7 1-408 Rezeptor.
- Es erfolgt keine Wiederherstellung der Volllängen-Rezeptoreigenschaft bei Coexpression mit einer kürzeren C-terminalen Domäne (P2X7 536-595).
- Die C-terminale Domäne des P2X7-Rezeptors hat keine stimulierende Wirkung auf P2X1-, P2X2-, P2X3- und P2X4-Rezeptoren.
- Die Funktion der C-terminalen Domäne kann als die einer P2X7-gekoppelten Ionenkanalmodulierenden Untereinheit aufgefasst werden.

Becker, Daniel, Funktionelle Bedeutung der C-terminalen Domäne des humanen P2X7-Rezeptors, Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 72 Seiten, 2009.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Purinrezeptoren	7
1.2 Die P2Y-Rezeptorfamilie	9
1.3 Die P2X-Rezeptorfamilie	10
1.3.1 Allgemeine Charakteristika	10
1.3.2 Der P2X1-Rezeptor	13
1.3.3 Der P2X2-Rezeptor	14
1.3.4 Der P2X3-Rezeptor	15
1.3.5 Der P2X4-Rezeptor	16
1.3.6 Der P2X7-Rezeptor	17
2 Zielstellung	21
3 Material und Methodik	22
3.1 Material	22
3.2 Methodik	22
3.2.1 RNA-Präparation	22
3.2.2 Behandlung der Oozyten	22
3.2.3 Elektrophysiologie	23
4 Ergebnisse	26
4.1 Kinetik des humanen P2X7-Rezeptors (hP2X7)	26
4.2 Wirkung einer His-Markierung auf die Aktivierung des hP2X7-Rezeptors	27
4.3 Auswirkung verschiedener coexprimierter C-terminaler Domänen auf die Kinetik des trunkierten hP2X7-Rezeptors hP2X7 1-436	28
4.4 Abhängigkeit der Aktivierung trunkierter und coexprimierter hP2X7-Rezeptoren von der ATP-Konzentration	33
4.5 Wirkung der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 sowie des Injektionsvolumens auf die Aktivierung des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595	34
4.6 Dosisabhängigkeit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 auf die Wirkung des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptor	36

4.7	Einfluss des coexprimierten trunkierten Rezeptors hP2X7 1-436 auf die funktionelle Expression des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595	39
4.8	Wirkung verschiedener Trunkierungen auf die Aktivierung des hP2X7-Rezeptors	41
4.9	Beeinflussung anderer hP2X-Rezeptoren durch die C-terminale Domäne hP2X7 435-595 des hP2X7-Rezeptors	42
5	Diskussion	44
6	Zusammenfassung	51
7	Literaturverzeichnis	54
8	Thesen	62
9	Erklärung	65
10	Danksagung	66
11	Publikationen	67
12	Lebenslauf	68

Abkürzungsverzeichnis

2meSATP	-	2-methyl-thio-Adenosintriphosphat
ADP	-	Adenosindiphosphat
AMP	-	Adenosinmonophosphat
Ap5A	-	Diadenosinpentaphosphat
ATP	-	Adenosintriphosphat
ATP ⁴⁻	-	freies Adenosintriphosphat
ATP _γ S	-	Adenosin 5'-(gamma-thio) triphosphat
Ba ²⁺	-	Bariumion
BzATP	-	2'-3' Benzoyl-4-Benzoyl-Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	-	Calciumion
cAMP	-	zyklisches Adenosinmonophosphat
CIP	-	Coimmunopräzipitationsexperimente
CTP	-	Cytidintriphosphat
Cu ²⁺	-	Kupferion
dpi	-	Anzahl der Tage nach Injektion (days post injection)
HEK-293		humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
K ⁺	-	Kaliumion
KCl	-	Kaliumchlorid
KN-62	-	1-[<i>N,O</i> -bis(isoquinolinesulphonyl)- <i>N</i> -methyl- <i>L</i> -tyrosyl]-4-phenylpiperazin
Mg ²⁺	-	Magnesiumion
MgCl	-	Magnesiumchlorid
Mn ²⁺	-	Manganion
Na ²⁺	-	Natriumion
NaCl	-	Natriumchlorid
NF023	-	8,80-(carbonylbis[imino-3,1-phenylen-carbonylimino])bis-1,3,5-naphthalentrisulphonat
NMDG	-	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Glukamin
NO	-	Stickstoffmonoxid
oATP	-	oxidiertes Adenosintriphosphat
PPADS	-	Pyridoxal (phosphat-6-azophenyl-2),4)-disulfonat

PPNDS	-	Pyridoxal-5'-phosphat-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonat)
TNP-ADP	-	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosindiphosphat
TNP-AMP	-	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosinmonophosphat
TNP-ATP	-	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosintri-phosphat
TNP-GTP	-	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Guanosintri-phosphat
UDP	-	Uridindiphosphat
UTP	-	Uridintri-phosphat
Yo-Pro-1	-	fluoreszierende Propidium-Verbindung
Zn ²⁺	-	Zinkion

1 Einleitung

1.1 Purinrezeptoren

Vor nahezu 100 Jahren beobachteten Drury und Szent-Györgyi sowohl bei Menschen als auch bei Tieren die Wirkung von Adenosin und Adenosinmonophosphat (AMP) auf das kardiovaskuläre System sowie auf Darm- und Uterusgewebe. Damit wurde ein Stein ins Rollen gebracht, der in einer weitreichenden Erforschung dieser Phänomene landete. Es stand zur Diskussion, ob Purine (AMP, ADP und ATP) als extrazelluläre Signalstoffe fungieren {Ralevic, 1998 11761 /id}.

Gillespie griff diese These auf und lenkte sein Augenmerk auf die Wirkungsweise und die pharmakologische Potenz von Adenosinderivaten {Gillespie, 1934 16033 /id; Ralevic, 1998 11761 /id}. Er wies nach, dass durch Verringerung der Anzahl der Phosphatreste der vasodilatatorische und blutdrucksenkende Effekt der Adenosinabkömmlinge gesteigert werden kann. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlagen, um mit weiteren Experimenten die genauen Wirkungsmechanismen der Adenosinderivate zu erforschen.

Holtons Forschungsgruppe erbrachte erste Hinweise auf eine Transmitterwirkung von ATP {Holton, 1953 16034 /id; Holton, 1959 16035 /id}, woraufhin sich die Frage stellte, ob Purinrezeptoren nicht nur im Darm- und Uterusgewebe sondern auch im neuronalem System vorhanden sein könnten. Burnstock postulierte rund 10 Jahre später, dass ATP als Neurotransmitter, z.B. im Darmnervensystem fungiert {Burnstock, 1972 16036 /id}. Von diesem Zeitpunkt an versuchte man in einer Vielzahl von Geweben ATP-Rezeptoren nachzuweisen, was in den darauffolgenden Jahren mehrfach gelang. So wurde nach Applikation von Adenosinderivaten Kontraktionen in glatten Muskelzellen, neuronale Aktivitäten sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem, exokrine und endokrine Sekretion, Modulation der Immunantwort und des Entzündungsvorganges, Plättchenaggregation, Schmerzperzeption sowie Beeinflussung kardialer Funktionen beobachtet {Ralevic, 1998 11761 /id}.

In den darauffolgenden Jahren widmete man sich der Frage nach der Quelle dieser extrazellulären Purine. Hierbei konnten zahlreiche Gewebe bzw. Zellen, wie Thrombozyten, Nervenendigungen oder allgemein geschädigte Zellen, als Ursprungsort identifiziert werden.

Ein Beispiel dafür ist die Purinanreicherung des Extrazellulärraums bei myokardialer Hypoxie {Berne, 1963 16037 /id; Gerlach, 1963 16038 /id}. Daraus abgeleitet entstand die These, dass Purine die metabolische Situation eines Gewebes charakterisieren und dort eine reflektorische Wirkung auf die lokale Durchblutungssituation besitzen. Diese Schlussfolgerung wurde durch die Beobachtung gestützt, dass Adenosinderivate, insbesondere ATP, bei Skelettmuskelkontraktionen freigesetzt werden {Boyd, 1968 16039 /id; Forrester, 1969 16040 /id}. Es stellte sich heraus, dass eine Vielzahl von Zellen auf physikalischen Stress ebenso mit einer ATP-Freisetzung reagieren. Weiterhin sezernieren immunologische Zellen ATP bei Antigenkontakt {Di Virgilio, 1995 8858 /id}.

Nachfolgende Arbeiten wandten sich nun vermehrt der Frage zu, wie das Purinsignal seine biologische Umsetzung findet. Die ersten Abhandlungen zu diesem Thema wurden von Sattin und Rall veröffentlicht. Sie wiesen nach, dass Methylxanthin die Adenosin vermittelte Akkumulation von zyklischem AMP (cAMP) in Rattenhirnschnitten blockiert {Sattin, 1970 16041 /id}. Jedoch erst im Jahre 1978 erfuhren die für diesen Effekt verantwortlich gemachten Rezeptoren durch Burnstock eine Begriffsdefinition als „purinerge Rezeptoren“ mit einer Unterteilung in „P1-Purinorezeptoren“, bei denen Adenosin den wirksamsten Agonisten stellt und „P2-Purinorezeptoren“ mit ATP und ADP als wirksamste Aktivatoren. Diese Einteilung beruhte jedoch nicht nur auf der relativen pharmakologischen Potenz der einzelnen Agonisten, sondern insbesondere auch auf der selektiv antagonistischen Wirkung von Methylxanthinen sowie auf der Aktivierung der Adenylatzyklase durch Adenosin und der Stimulation der Prostaglandinsynthese durch ATP und ADP {Burnstock, 1978 16042 /id}.

Die heutige Einteilung der P1-Purinorezeptoren, gebräuchlicherweise als Adenosinrezeptoren bezeichnet, umfasst vier Subtypen: A1, A2A, A2B und A3. Dieser Klassifizierung liegen zum einen die verschiedenen Molekülstrukturen zu Grunde, zum anderen kommt die Verteilung in unterschiedlichen Geweben und das variable pharmakologische Profil zum Tragen. Ihnen gemeinsam ist, dass es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren handelt, die ihre Wirkung über die Hemmung (A1, A3) oder Stimulation (A2A) der Adenylatzyklase sowie über die Aktivierung der Phospholipase C (A1, A2B, A3) entfalten.

Die P2-Purinorezeptoren werden nach heutigem Kenntnisstand in zwei Gruppen unterteilt, die P2X- und die P2Y-Rezeptorfamilie {Ralevic, 1998 11761 /id}.

1.2 Die P2Y-Rezeptorfamilie

Die Gruppe der P2Y-Familie gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren {Abbraccio, 1994 16044 /id}. Die Länge der einzelnen Subtypen variiert zwischen 308 und 377 Aminosäureresten bei einer Masse von 41 bis 53 kDa nach Glykosierung. In ihrer Tertiärstruktur weisen sie als Analoga zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sieben transmembranäre Domänen auf. Bisher wurden acht verschiedene, in Säugern auftretende P2Y-Rezeptoren kloniert. Es handelt sich um die Rezeptoren P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 und 14. Die fehlenden Indizes hatte man Rezeptoren zugeordnet, die sich im Laufe der Zeit als identisch zu anderen P2Y-Rezeptoren erwiesen haben, beziehungsweise heute nicht mehr der Familie der P2Y-Rezeptoren zugehörig sind {Ralevic, 1998 11761 /id}.

Die Effekte der P2Y-Rezeptorfamilie werden überwiegend durch die Aktivierung der Phospholipase C mit konsekutiver IP₃-Bildung hervorgerufen. Der dadurch induzierten Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern kann eine Vielzahl weiterer Signalwege folgen, so zum Beispiel die Aktivierung der Proteinkinase C, der Phospholipase A₂ und der Ca²⁺-abhängigen NO-Synthetase mit nachfolgender Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) {Boyer, 1992 5299 /id; Barnard, 1994 6926 /id}.

Ein weiterer Weg der Signaltransduktion nach Aktivierung von P2Y-Rezeptoren stellt die Beeinflussung der intrazellulären cAMP-Konzentration dar. Diese erst kürzlich entdeckte Art der Signalweiterverarbeitung konnte für die Rezeptoren P2Y6, P2Y11 ([cAMP]-Erhöhung) sowie für die Rezeptoren P2Y12, P2Y13 und P2Y14 ([cAMP]-Verminderung) beobachtet werden {King, 2003 15569 /id}. Des Weiteren stellte man für einige P2Y-Rezeptoren (P2Y2, P2Y4 und P2Y6) die agonistische Wirkung der Pyrimidine UTP bzw. UDP fest. Daher wird im Rahmen der Klassifikation heute bevorzugt von P2-Rezeptoren anstatt von Purinrezeptoren gesprochen {Jacobson, 2000 16127 /id; King, 2003 15569 /id}.

1.3 Die P2X-Rezeptorfamilie

1.3.1 Allgemeine Charakteristika

Bei der P2X-Rezeptorfamilie handelt es sich um ATP-getriggerte Kationenkanäle mit einer sehr kurzen Reaktionszeit von unter 10 ms {Bean, 1992 4024 /id; North, 2002 15192 /id; Nicke, 1998 11450 /id}, die bei Initiierung mit einem selektiven Ionenfluss (Na^+ , K^+ und Ca^{2+}) auf Bindung ihres Agonisten (ATP) reagieren.

Bisher wurde die Existenz von sieben Subtypen durch Klonierung nachgewiesen (P2X1-7), die u.a. in der Länge der Aminosäuresequenzen variieren. So besteht der P2X4-Rezeptor lediglich aus 384 Aminosäuren und stellt damit den kürzesten Rezeptor der P2X-Familie. Der P2X7-Rezeptor hingegen verkörpert mit seinen 595 Aminosäurebausteinen den längsten Vertreter seiner Klasse.

Jeder Rezeptor besitzt zwei hydrophobe Anteile, welche die Plasmamembran durchdringen. Der erste transmembranäre Abschnitt erstreckt sich zwischen den Aminosäuren 26-46, der Zweite zwischen den Aminosäuren 333-356. Der dazwischen befindliche Anteil des Proteins liegt extrazellulär und verkörpert damit den größten Teil des Rezeptors. In diesem zeigen die einzelnen Subtypen eine erstaunliche Homologie. Man geht heute davon aus, dass die ATP-Bindung hier erfolgt. Alle P2X-Rezeptoren besitzen Konsensus-Sequenzen für N-Glykosylierungen, deren Anzahl bei den einzelnen Subtypen variiert {Newbolt, 1998 11483 /id}.

Eine weitere Gemeinsamkeit stellt das Vorhandensein von 10 Cysteinresten in der extrazellulären Domäne dar, die durch Bildung von Disulfidbrücken die Tertiärstruktur festigen. Sowohl das amino- als auch das carboxyterminale Ende liegen intrazellulär, wobei bei letzterem die einzelnen Subtypen die größte Varianz aufzeigen. Die größte Eigenständigkeit innerhalb seiner Familie weist der P2X7-Rezeptor auf. So ist seine C-terminale Domäne bedeutend länger als die der anderen P2X-Rezeptoren.

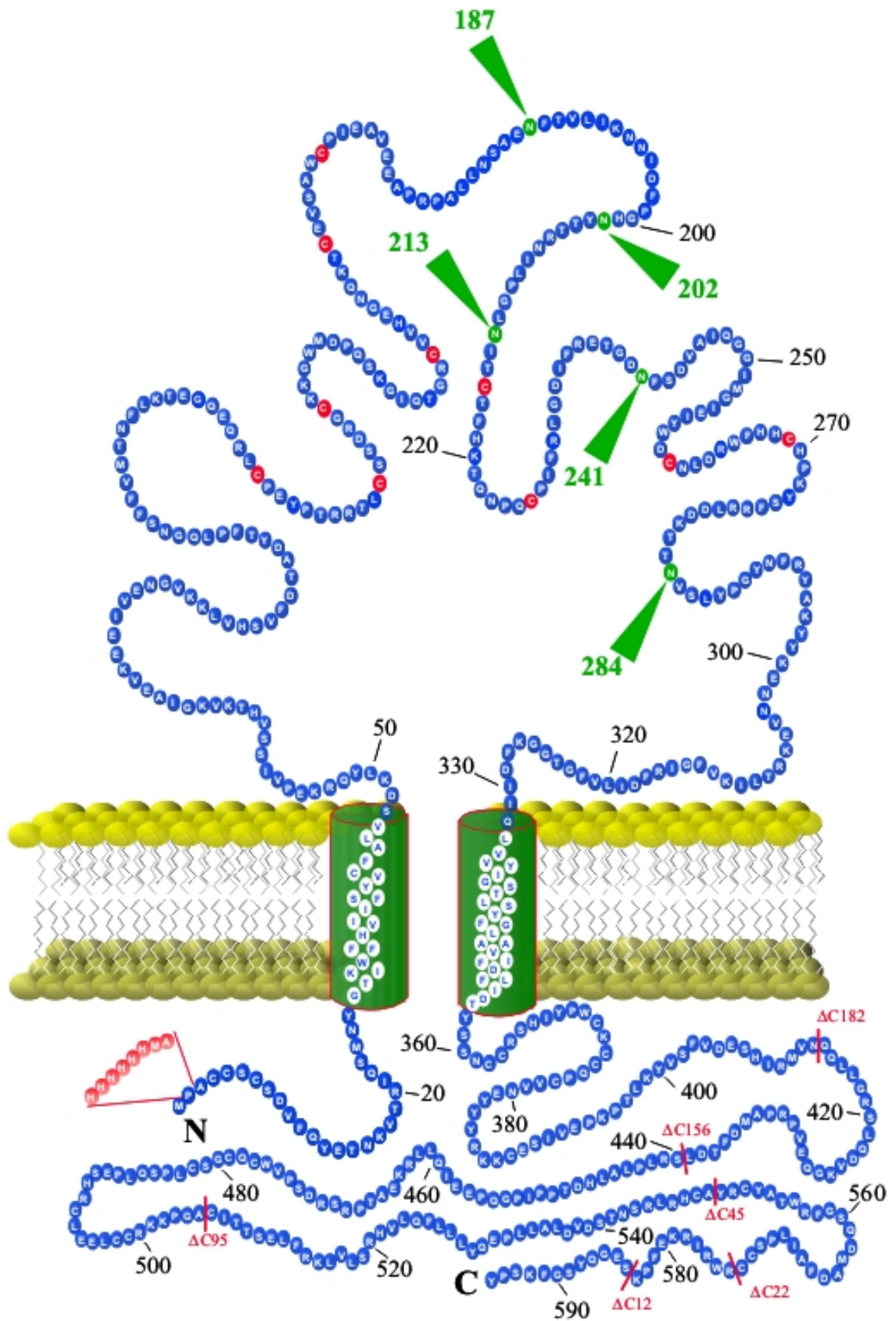


Abb. 1a: Struktur des humanen P2X7-Rezeptors. N-Glykosylierungsstellen sind grün, C-terminale Deletionen sowie der N-terminal eingefügte His-Tag sind rot markiert. Die Zahlen geben die Aminosäure-Nummer an.

Alle Genprodukte formen bei heterologer Expression sowohl in Säugerzellen als auch in *Xenopus*-Oozyten homomere Rezeptoren, die unterschiedliche Wirkungen und pharmakologische Profile aufweisen. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass einzelne Proteine noch keinen Rezeptor darstellen. Dieser entsteht erst durch die Zusammenlagerung der Untereinheiten als Folge der Quartärstrukturausbildung. So scheint am wahrscheinlichsten, dass sich ein Rezeptor aus 3 Untereinheiten formiert {North, 2002 15192 /id; Nicke, 1998 11450 /id}.

Untersuchungen der P2X-abhängigen ATP-Antwort haben jedoch gezeigt, dass in vielfältigen Geweben neben homo-oligomeren Rezeptorstrukturen, so zum Beispiel ein P2X1-Rezeptor aus 3 P2X1-Untereinheiten, auch Hetero-Oligomere auftreten können, wie der P2X2/3-Rezeptor, der wahrscheinlich aus einer P2X2- und zwei P2X3-Untereinheiten besteht {Wilkinson, 2006 17601 /id}. Gestützt wird diese Hypothese durch Coimmunopräzipitationsexperimente (CIP) {Torres, 1999 12167 /id}, die für bestimmte P2X-Rezeptorsubtypen Hetero-Oligomerisierung festgestellt haben, jedoch ohne die Mitwirkung des P2X7-Proteins. Allerdings zeigen neuere Experimente eine mögliche Zusammenlagerung von P2X7- und P2X4-Untereinheiten {Guo, 2007 18265 /id}.

Die Signaltransduktion der Rezeptoren wird hauptsächlich durch die Depolarisation der Zellmembran sowie durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) getragen. Letztere erfolgt über zwei Wege; zum einen sind P2X-Rezeptorkanäle selbst Ca^{2+} -permeabel und zum anderen findet ein Ca^{2+} -Einwärtsstrom, soweit exprimiert, über die Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle auf Grund der Depolarisation durch den P2X-Rezeptor abhängigen Na^+ -Einstrom statt. Letztgenannter Ca^{2+} -Einstrom umfaßt in der Regel den größten Anteil der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung. Da hierfür insgesamt keine weiteren Botenstoffe notwendig sind, erfolgt dieser Signalweg in sehr kurzer Zeit (ms) {Ralevic, 1998 11761 /id}.

Kationen können die Aktivierung der P2X-Rezeptoren modulieren. Dies geschieht entweder über die Bindung des Agonisten oder über ihre allosterischen Eigenschaften direkt am Kanalprotein. So besitzt Mg^{2+} die Fähigkeit, ATP^{4-} als Chelatkomplex zu binden und beeinflusst damit die P2X7-Rezeptorantwort negativ. Im Gegensatz dazu wirkt sich Zn^{2+} potenzierend auf die Aktivierung von P2X2 und P2X4 Rezeptoren aus. Beim P2X7-Rezeptor ruft Zn^{2+} dagegen eine Suppression der ATP-abhängige Stromamplitude hervor {Cloues, 1993 6025 /id}.

Eine weitere Einflussgröße auf den Aktivierungsgrad der P2X-Rezeptoren stellt der pH-Wert dar. So wird im basischen Milieu eine Steigerung der Stromamplitude des P2X7-Rezeptors, im sauren eine Verringerung beobachtet {Ralevic, 1998 11761 /id}. Extrazelluläre Na⁺-Ionen verringern allosterisch die Öffnungswahrscheinlichkeit von hP2X7-Rezeptoren {Riedel, 2007 17965 /id}.

Nimmt man die Desensibilisierung, d.h. die Abnahme der Stromantwort der P2X-Rezeptoren unter dauerhafter ATP-Applikation als Grundlage für eine Einteilung, ergeben sich zwei Gruppen: 1. sehr schnell desensibilisierende (im Bereich einiger hundert Millisekunden) und 2. langsam beziehungsweise gar nicht desensibilisierende Rezeptoren. Zur ersten Gruppe werden P2X1- und P2X3-Rezeptoren gezählt. Die zweite Gruppe beinhaltet die Rezeptoren P2X2, P2X4, P2X5 und P2X7. Alleinige Expression von P2X6 führt zu keinem ATP-induzierbarem Strom.

Der Mechanismus der schnellen Desensibilisierung von P2X-Rezeptoren ist noch unverstanden {North, 2002 15192 /id}. Experimente belegen jedoch die Bedeutung der hydrophoben Domänen des Rezeptorproteins, da bei deren Transfer auf einen langsam desensibilisierenden Rezeptor ein schnell desensibilisierender Kanal geschaffen werden kann {Werner, 1996 10312 /id}.

1.3.2 Der P2X1-Rezeptor

Die ersten P2X1-Rezeptoren wurden aus dem Vas deferens der Ratte und der Harnblase von Maus und Mensch kloniert. Er ist der aus der P2X-Familie am häufigsten auftretende Rezeptor in glatter Muskulatur. Weitere Expressionsorte sind die Lamina muscularis kleinerer Arterien und Arteriolen, Thrombozyten sowie in geringer Konzentration das Lungen- und Milzgewebe {Valera, 1994 7665 /id; Buell, 1996 9479 /id; Buell, 1996 9824 /id; Burnstock, 2008 18810 /id}. Andere Versuche zeigten auch ein Vorkommen in Ganglienzellen des Hinterhorns, des Ganglion trigeminale sowie des Ganglion coeliacum {Buell, 1996 9479 /id}.

Das Rezeptorprotein besteht aus 399 Aminosäuren {Valera, 1994 7665 /id}. Als bekannte Agonisten dienen ihm ATP und 2-methyl-thio-Adenosintriphosphat (2meSATP). Als Bindungsstellen fungieren zwei Aminosäuresequenzen mit einer Länge von jeweils 34 Aminosäuren {Evans, 1995 9810 /id}.

Der homomere P2X1-Rezeptor bildet einen Kationen-selektiven Kanal mit leichter Präferenz für Na^+ - gegenüber K^+ -Ionen aus. Daneben findet sich nur eine geringe Leitfähigkeit für größere organische Verbindungen {Evans, 1996 10273 /id}.

Die Regenerationszeit bei Rückkehr aus der Desensitivierung ist lang und beträgt für das Erhalten von gleichen Stromstärken bei wiederholter ATP-Applikation ca. 15 Minuten {Seyffert, 2004 16389 /id; Hülsmann, 2003 15570 /id; North, 2002 15192 /id; Klapperstück, 2000 12823 /id}.

1.3.3 Der P2X2-Rezeptor

Die erste Isolierung von cDNA des P2X2-Rezeptors erfolgte aus Nebennierengewebe der Ratte {Ralevic, 1998 11761 /id}. Die humane RNA wurde zuerst aus Zellen der Hypophyse gewonnen {Brake, 1994 7666 /id}.

Weitere Expressionsorte fanden sich in Neuronen des Gehirns, in Herzmuskelzellen, in Darmepithelien, in Lymphozyten sowie in sensorischen Neuronen, hier jedoch häufig in heteromerer Form zusammen mit dem P2X3-Rezeptorprotein.

Der P2X2-Rezeptor zeigt den typischen strukturellen Aufbau, der allen Kanalproteinen der P2X-Familie gemein ist. Sein carboxyterminales Ende ist mit 118 Aminosäuren das zweitlängste der P2X-Rezeptorfamilie.

Von Joseph Simon sind vier Spleißvarianten dieses Rezeptors beschrieben worden, die sich in der Länge des carboxyterminalen Endes unterscheiden: P2X2a, der das native Protein darstellt, P2X2b, welcher erheblich schneller desensitiviert als das Original sowie P2X2c und P2X2d, die keine funktionstüchtigen Kanäle ausbilden {Brändle, 1997 10451 /id; Simon, 1997 10790 /id}.

Es ist kein Agonist bekannt, der selektiv an den P2X2-Rezeptor bindet. Die wirkungsvollsten Aktivatoren sind ATP, Adenosin 5'-(gamma-thio) triphosphat ($\text{ATP}\gamma\text{S}$) und 2meSATP. Eine ATP-Wirkung wird durch Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen verstärkt {North, 2002 15192 /id}. Im Gegensatz zum P2X1-Rezeptor findet sich keine oder nur eine geringe Desensibilisierung.

Durch zahlreiche Versuche etablierte sich ein Modell für die Rezeptoraktivierungskinetik. In diesem wird angenommen, dass drei Moleküle ATP zur Aktivierung benötigt werden. Die Bindungsschritte erfolgen chronologisch und beeinflussen sich gegenseitig positiv.

Die Deaktivierung verläuft dann retrograd nach dem selben Schema {North, 2002 15192 /id; Ding, 1999 12371 /id; Ralevic, 1998 11761 /id}.

Eine negative Beeinflussung der Aktivierung des P2X2-Rezeptors wurde für die zweiwertigen Kationen Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} und Ba^{2+} im extrazellulären Kompartiment beobachtet. Die Vorstellung ist, dass diese Ionen mit dem Rezeptor eine Bindung eingehen und ihn dadurch allosterisch beeinflussen {Ding, 1999 12859 /id}.

1.3.4 Der P2X3-Rezeptor

Die erste isolierte cDNA des P2X3-Rezeptors wurde aus Hinterhornanglienzellen des Rückenmarks der Ratte gewonnen {Chen, 1995 8783 /id}.

Beim Menschen findet man ihn ebenso wie den P2X2-Rezeptor in sensorischen Neuronen, sympathischen und parasympathischen Ganglien, spinalen Neuronen und Neuronen des Gehirns. In diesen Geweben treten die beiden P2X-Rezeptortypen P2X2 und P2X3 gehäuft als Heteromere auf {Lewis, 1995 8784 /id}. Diese Art der Rezeptorformation wird mit Lern- und Alterungsprozessen von Neuronen in Zusammenhang gebracht, da die homologe Form des Rezeptors erst mit zunehmendem Alter des Organismus dem heterologen Kanal weicht {Ralevic, 1998 11761 /id}.

Der P2X3 ist ein schnell desensibilisierender Rezeptor (weniger als 100 ms). Seine Aktivierung erfolgt mittels ATP sowie Diadenosinpentaphosphat (Ap5A).

Vergleicht man die Gruppe der Antagonisten des P2X3 mit denen des P2X1-Rezeptors, so zeigen sich viele Gemeinsamkeiten. Die unselektiven Blocker Suramin und Pyridoxal (phosphat-6-azophenyl-2),4)-disulfonat (PPADS) sowie die selektiven Antagonisten Pyridoxal-5'-phosphat-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonat) (PPNDS), 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-ATP und seine Derivate TNP-GTP, TNP-ADP und TNP-AMP bewirken auch hier eine Verminderung des rezeptorabhängigen Ionenstroms. Lediglich der Blocker NF023 (8,80-(carbonylbis[imino-3,1-phenylen-carbonylimino])bis-1,3,5-naphthalentrisulphonat) zeigt einen stärkeren antagonistischen Effekt als gegenüber des P2X1-Rezeptors {Virginio, 1998 11561 /id}.

Eine weitere Gemeinsamkeit zum P2X1-Rezeptor ist die Notwendigkeit eines größeren Zeitintervalls (15 min) zwischen zwei Applikationen eines Agonisten, um eine reproduzierbare Rezeptor-Stromantwort zu erzielen. Durch eine Anhebung des extrazellulären Calciumspiegels kann jedoch dieses Intervall deutlich verkleinert werden {Cook, 1998 11887 /id}.

1.3.5 Der P2X4-Rezeptor

Die erste isolierte cDNA des P2X4-Rezeptors stammte aus Zellen cerebraler Ganglien und Inselzellen des Pankreas der Ratte. Die ersten menschlichen klonierten Kanalproteine wurden ebenfalls aus Pankreasinseln sowie aus Ganglien des Hippocampus gewonnen. Nach und nach wurden weitere Expressionsorte identifiziert. So lassen sich P2X4-Rezeptoren im Gehirn, im Rückenmark, in Ganglien des Halses, im Bronchialepithel sowie in Speicheldrüsen nachweisen {Buell, 1996 9479 /id; Buell, 1996 10139 /id; Garcia-Guzman, 1997 10331 /id; Garcia-Guzman, 1996 9721 /id}.

Der P2X4-Rezeptor besitzt im Vergleich zu anderen Mitgliedern der P2X-Familie ein sehr kurzes carboxyterminales Ende, welches insgesamt nur 28 Aminosäuren umfasst. Im nativen Gewebe tritt er gehäuft als Heteromer mit P2X5- und P2X6-Rezeptorproteinen auf.

Seine größte Aktivierung erfährt der Kanal durch die Applikation von 2meSATP. Des Weiteren induzieren ATP, Cytidintriphosphat (CTP) einen Rezeptor-abhängigen Ionenstrom. Ivermectin potenziert die Wirkung der Agonisten.

Die unselektiven Antagonisten PPADS und Suramin wirken hier artuntypisch, da lediglich eine geringe Blockierung des P2X4-Rezeptors festgestellt werden konnte. Man geht davon aus, dass das Fehlen des Lysins an Stelle 246 für diesen Effekt verantwortlich ist {Seguela, 1996 9475 /id; Garcia-Guzman, 1997 10331 /id}.

Bei kurzer Applikation von ATP bildet der P2X4-Rezeptor einen Kationen-selektiven Kanal aus, der eine hohe Ca^{2+} -Leitfähigkeit aufweist, welche rund 8% des Gesamtstromes nach Aktivierung des Rezeptors trägt {Garcia-Guzman, 1997 10331 /id; North, 2002 15192 /id}.

Eine schnelle Desensibilisierungskomponente konnte beim P2X4-Rezeptor nicht ermittelt werden. Es wird jedoch ein reversibler „rundown“ bei länger wählender Applikation des Agonisten beobachtet. Hierbei kommt es zu einer deutlichen Permeabilitätszunahme für organische Verbindungen {Khakh, 1999 12213 /id; Khakh, 1999 12396 /id; Virginio, 1999 12212 /id}. Extrazelluläre Zn^{2+} -Ionen potenzieren den P2X4-abhängigen Ionenstrom {Garcia-Guzman, 1997 10331 /id; Seguela, 1996 9475 /id}.

1.3.6 Der P2X7-Rezeptor

Die erste Klonierung eines P2X7-Kanalproteins erfolgte im Jahre 1996 aus Makrophagen und Ganglienzellen der Ratte {Surprenant, 1996 9478 /id}. Die nachfolgende Gewinnung der humanen Variante fand ein Jahr später statt {Rassendren, 1997 10407 /id}. In den sich daran anschließenden Versuchsreihen wurden weitere Expressionsorte identifiziert. Hierunter finden sich hämatopoetische Zellen, Gliazellen der Retina {Pannicke, 2000 13492 /id}, Hepatozyten, Speicheldrüsen {Ralevic, 1998 11761 /id}, glatte Gefäßmuskelzellen sowie Fibroblasten {Solini, 1999 12142 /id}.

Obwohl die Bedeutung des P2X7-Rezeptors noch nicht abschließend geklärt werden konnte, zeigen die bisher durchgeführten Experimente eine Vielzahl von Eigenschaften auf, die auf eine immunmodulatorische Funktion hinweisen. Seine Fähigkeit eine unselektive Pore zu induzieren, die nachfolgend zu Vakuolisierung, Zellschwellung und zum Zelltod führen kann, weist ihm eine Rolle bei Nekrosen und Apoptosevorgängen zu {Ralevic, 1998 11761 /id; Dubyak, 1993 6310 /id}. Weitere durch den P2X7-Rezeptor getriggerte Prozesse sind die Fusion von Makrophagen zu polynukleären Riesenzellen {Chiozzi, 1997 13399 /id}, die Freisetzung von Interleukin-1 β aus Mastzellen und aus Makrophagen {Ferrari, 1997 10728 /id} sowie die Freisetzung von Interleukin-6 aus Fibroblasten {Solini, 1999 12142 /id}.

Der P2X7-Rezeptor besteht aus 595 Aminosäuren und ist damit der längste Vertreter seiner Familie, weil sein carboxyterminales Ende mit 240 Aminosäuren deutlich länger ist, als das der anderen P2X-Rezeptoren.

Der P2X7-Rezeptor wird, wie für die Familie typisch, durch ATP aktiviert. Jedoch stellt es nicht den stärksten Agonisten dar (s.u.).

Die Stromentwicklung zeigt vier charakteristische Differenzen zu anderen P2X-Rezeptoren:

- Die aktivierende ATP-Konzentration muss die Dosis von 100 μ M überschreiten {North, 2002 15192 /id}. In Experimenten der Forschungsgruppe um Herrn Prof. Markwardt ergab sich für den Agonisten ATP⁴⁻ jedoch K_D -Werte zwischen 45 und 80 μ M {Klapperstück, 2001 14815 /id}.

- 2'-3'-Benzoyl-4-Benzoyl-ATP (BzATP) besitzt eine 10-30 mal größere Potenz als ATP, wobei es keine reine Selektivität zum P2X7-Rezeptor aufweist, da durch BzATP auch eine Aktivierung des P2X1-Rezeptors erfolgen kann {North, 2002 15192 /id}.
- Die zweiwertigen Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} zeigen eine ausgeprägtere antagonistische Wirkung auf das Kanalprotein als bei anderen Vertretern der Familie. Beide Ionen neigen zu einer Chelatbildung mit dem nativen Agonisten ATP^{4-} und führen so zu einer Konzentrationsverringern am Angriffsort {Klapperstück, 2001 14026 /id; Surprenant, 1996 9478 /id}.
- Bei wiederholter Applikation von ATP verändert sich das zeitliche Schaltverhalten und die Amplitude des P2X7-abhängigen Stromes deutlich {Tatham, 1990 6518 /id; Cockcroft, 1980 15974 /id}, d.h. durch wiederholte ATP-Applikation verlangsamt sich die Abschaltungskinetik des Stroms (Deaktivierung) {Nix, 2000 13282 /id; Hibell, 2000 13281 /id; Rassendren, 1997 10407 /id; Surprenant, 1996 9478 /id}.

Bei Aktivierung des P2X7-Rezeptors kommt es zur Ausbildung eines selektiven Ionenkanals, der zu einer schnellen Depolarisation der Zelle führt. Der Kanal weist sowohl bei Aktivierung als auch bei Deaktivierung eine Zweiphasenkinetik auf, welche die Vermutung aufkommen lässt, dass das Kanalprotein zwei ATP-Bindungsstellen besitzt {Klapperstück, 2001 14815 /id}.

Nach kurzer ATP-Applikation wird der induzierte Ionenstrom kaum durch organische Kationen wie N-Methyl-D-Glukamin (NMDG^+) getragen. Die ATP-induzierte NMDG^+ -Leitfähigkeit steigert sich jedoch zunehmend bei wiederholter oder anhaltender ATP-Gabe {Chessell, 2001 14694 /id; Virginio, 1999 12680 /id; Surprenant, 1996 9478 /id}.

Setzt man die Agonistengabe fort, bildet der Rezeptor eine nicht-selektive Kanalpore aus und die Membran wird auch für Moleküle bis zu einer Größe von 900 Da, wie z.B. große Farbmoleküle (Yo-Pro-1), permeabel. In Lymphozyten erfährt die Pore keine so große Ausdehnung, sie wird nach Wiley {Wiley, 1993 6116 /id} nur für Ethidium⁺ oder kleinere Moleküle bzw. Ionen permeabel und nimmt demzufolge eine Größenordnung von maximal 200–300 Da an. Ob dieser Beobachtung eine Dilatation der Kanalpore oder eine Rekrutierung eines weiteren ionenleitenden Proteins zu Grunde liegt, ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt {North, 2002 15192 /id}.

Patch-clamp-Untersuchungen an einzelnen humanen P2X7-Rezeptor-Kanälen fanden auch bei langdauernder ATP-Applikation keinen Hinweis auf eine Porendilatation {Riedel, 2007 17448 /id; Riedel, 2007 17965 /id}. Die Fähigkeit der dilatativen Ausdehnung des Kanals kann durch Abtrennung der letzten 177 Aminosäuren des Rezeptors gehemmt werden {Surprenant, 1996 9478 /id}. Die Aktivierung eines selektiven Kationenkanals kann dennoch aufrecht erhalten werden. In Versuchen mit dem Ratten-P2X7-Rezeptor wies dieser eine stärkere Porenbildung als seine menschliche Variante auf. Eine daraufhin angefertigte Chimäre aus menschlichem Rezeptor ohne C-terminales Ende und einem Ratten-P2X7-C-Terminus ergab annähernd die porenbildenden Eigenschaften des Ratten-P2X7-Rezeptors {Rassendren, 1997 10407 /id}. Weiterhin unterscheidet sich der rattenspezifische P2X7-Rezeptor von seinem humanen Gegenstück in seinem wesentlich geringeren Bedarf an Agonistenkonzentration für seine Aktivierung sowie im zeitlichen Verlauf der Deaktivierung {Rassendren, 1997 10407 /id}. Die Bedeutung der C-terminalen Domäne des P2X7-Rezeptors wird weiterhin dadurch unterstrichen, dass über eine Wechselwirkung mit dem epithelialen Membranprotein EMP 2 eine Blasenbildung der Zellmembran induziert werden kann {Wilson, 2002 15191 /id}.

P2X7-Rezeptoren zeigen in der Regel keine Desensitivierung, wobei einige artspezifische Unterschiede beobachtet worden sind {Smart, 2003 15463 /id}. Die auf die Ionenkanalöffnung folgende Signaltransduktion, die u.a. der Initiierung weiterer Pathomechanismen dient, erfolgt über verschiedene Wege und ist auch von der Rezeptor exprimierenden Zelllinie abhängig. Wesentlich von Bedeutung ist hierbei die Aktivierung von Proteinkinasen und Phospholipasen {Denlinger, 2001 14636 /id; Aga, 2004 15968 /id}.

Die Antagonisten des P2X7-Rezeptors teilt man in vier große Gruppen ein. Die Erste beinhaltet verschiedene anorganische Ionen, wie zum Beispiel Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} und Protonen {Virginio, 1997 12880 /id}. Dies stellt eine weitere Besonderheit des Rezeptors gegenüber den anderen Vertretern seiner Familie dar, da bei diesen die Ionen Zn^{2+} und Cu^{2+} in der Regel zu einer Verstärkung der Stromamplitude führen. In der zweiten Gruppe befinden sich typische Blocker der P2X-Familie wie PPADS und Suramin {Klapperstück, 2000 12823 /id}. Des Weiteren gehören hierzu Brilliant Blue G, mit einer sehr potenten und hochselektiven Blockierung von P2X7-Rezeptoren sowie oxidiertes ATP (oATP), welches eine irreversible antagonistische Wirkung auf den Rezeptor besitzt {Jiang, 2000 13387 /id}.

Die dritte Gruppe umfasst die größeren organischen Kationen. Die beiden wichtigsten Vertreter sind Calmidazolium und KN-62 (1-[*N,O*-bis(isoquinolinesulphonyl)-*N*-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin), welche auch selektive Antagonisten der Calcium/Calmidulin-abhängigen Proteinkinase II sind {Gargett, 1997 10524 /id}. In der letzten Gruppe befindet sich 17- β -Estradiol. Andere Geschlechtshormone, wie Progesteron oder 17- α -Estradiol, zeigen hingegen keine Effekte {Cario-Toumaniantz, 1998 11459 /id}.

Inzwischen sind weitere mehr oder weniger selektive Antagonisten für den P2X7-Rezeptor entwickelt worden, deren Zielstellung eine spätere Anwendung in einer antientzündlichen Therapie ist {Romagnoli, 2008 18679 /id}.

2 Zielstellung

Eine Vielzahl von Experimenten zeigen die große Bedeutung der besonders langen C-terminalen Domäne für die Eigenschaften des P2X7-Rezeptors {North, 2002 15192 /id; Wilson, 2002 15191 /id; Virginio, 1999 12212 /id; Ralevic, 1998 11761 /id; Rassendren, 1997 10407 /id; Virginio, 1999 12680 /id}. Trunkierte P2X7-Rezeptoren (ohne C-terminale Domäne) können zwar noch ATP-induzierte Ströme vermitteln, sind aber im Gegensatz zum nativen P2X7-Rezeptor nicht mehr in der Lage, Poren für große organische Ionen zu bilden {Surprenant, 1996 9478 /id; Rassendren, 1997 10407 /id} oder mit bestimmten epithelialen Membranproteinen in Wechselwirkung zu treten {Wilson, 2002 15191 /id}. Durch getrennte Expression des trunkierten P2X7-Rezeptors und der C-terminalen Domäne sollte der Frage nachgegangen werden, ob die durch Trunkierung veränderten elektrophysiologischen Eigenschaften wieder in die des Volllängenproteins zurückgeführt werden kann; also ob die C-terminale Domäne als modulierende Untereinheit des trunkierten P2X7-Rezeptors fungiert. Solche modulierenden Untereinheiten sind für andere Ionenkanäle, wie z.B. den langsamen verzögerten Auswärtsgerichteter K^+ -Kanal bekannt {Busch, 1997 10362 /id}. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Abschnitte des trunkierten Rezeptors und der C-terminalen Domäne für eine Interaktion der beiden Rezeptoranteile wesentlich von Bedeutung sind und ob die C-terminale Domäne des P2X7-Rezeptors auch modulierend auf andere P2X-Rezeptoren mit natürlicherweise kürzerem C-terminalem Ende wirkt.

3 Material und Methodik

3.1 Material

Soweit nicht anders beschrieben, stammen die verwendeten Materialien von der Firma Sigma (Deisenhofen). Zur Expression der verschiedenen Rezeptorvarianten wurden *Xenopus*-Oozyten verwendet. Die hierzu benötigten Tiere sind von der African Xenopus Facility (Knysna, Republic of South Africa) bezogen worden.

3.2 Methodik

3.2.1 RNA-Präparation

Die zur Injektion in *Xenopus*-Oozyten verwendeten cRNA der P2X-Rezeptoren wurden von der Gruppe um Herrn Prof. G. Schmalzing (RWTH Aachen) hergestellt {Klapperstück, 1999 13459 /id}. Die cDNA der humanen P2X1-, P2X2-, P2X3-, P2X4- und P2X7-Untereinheiten (hP2X1, hP2X2, hP2X3, hP2X4 und hP2X7) wurden mittels PCR aus humaner B-lymphozytärer Gesamt-DNA amplifiziert und in den Vektor pNKS2 einligiert {Gloor, 1995 13299 /id}. Die cRNA wurden mittels SP6-RNA-Polymerase (Pharmacia) aus linearisierten DNA-Matrizen synthetisiert. Nach der Reinigung durch Sepharose-G50-Chromatographie, Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurden die cRNA in 5mMTris/HCl, pH 7,2, in Konzentrationen von 0.4 - 1 mg/ml gelöst.

3.2.2 Behandlung der Oozyten

Zur Operation der Frösche erfolgte eine Anästhesie mittels einer wässrigen Lösung versetzt mit 2 g/l Tricain (Lösung a, Tab. 1). Über einen kleinen Schnitt im Unterleib wurden Teile des Ovars entfernt und über Nacht mit Kollagenase behandelt (Lösung b), um eine Separation der Oozyten vom umgebenden Bindegewebe und den ihnen anheftenden Follikelzellen zu erreichen. Am nächsten Morgen erfolgte durch mehrfaches Resuspendieren und Dekantieren mit Ringer-Lösung ein Auswaschen der Kollagenase. Anschließend mussten die Oozyten 10 min lang in Ca²⁺-freier Ringer-Lösung inkubiert werden (Lösung c), um noch anhaftende Follikelzellen abzulösen. Im nun folgenden Schritt fand durch wiederholtes Resuspendieren und

Dekantieren ein Auswaschen der zugefügten Lösungen statt. Die nun aufbereiteten Oozyten wurden in mit Ringer-Lösung (Lösung d) gefüllten Petri-Schalen aufbewahrt. Zwei bis drei Tage vor den jeweiligen Messreihen erfolgte die Injektion der cRNA. Dazu musste eine Selektion der behandelten Oozyten nach ihrem Reifegrad und ihrem Allgemeinzustand durchgeführt werden. Injektionen erhielten nur *Xenopus*-Zellen mit Reifegrad V oder VI. Soweit nicht anders angegeben, wurden jeweils 20 nl equimolarer Mengen der cRNA (1 - 0.05 µg/µl) injiziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in einer mit Antibiotika versetzten Oozyten-Ringer-Lösung (Lösung e) bei 19 °C.

3.2.3 Elektrophysiologie

Alle Messungen wurden bei einer Raumtemperatur von ca. 21 °C mit der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklammer-Technik durchgeführt. Die zur Messung notwendigen Kapillaren wurden aus Borosilikat-Glas gefertigt und mit einer 3 M KCl-Lösung befüllt. Bei der Auswahl der Elektroden musste auf einen geeigneten Widerstand von 0.9 bis 1.5 MΩ geachtet werden. Ein Oozyten-Spannungsklemmverstärker (OC-725C) der Firma Hamdon, USA, verstärkte die zu erwartenden Ströme. Die so erzielten Daten wurden mittels einer im Institut entwickelten Software aufgezeichnet und analysiert. Die für die Messungen unabdingbar schnellen und reproduzierbaren Lösungswechsel wurden durch mehrere Computer-gesteuerte Magnetventile erreicht, die ein modifiziertes U-Rohr-System kontrollieren {Bretschneider, 1999 11904 /id}. Die Einwaschzeit betrug 1210 ± 70 ms bei einer Auswaschzeit von 1770 ± 170 ms {Klapperstück, 2000 13303 /id}. Ein mit Saugpumpen versehenes Auffangsystem erzielte den konstanten Lösungsmittelstrom durch die Badkammer von ca. 75 µl/s. Das Abgleichen der Elektroden und das Messen des Membranpotenzials erfolgte in einer Oozyten-Ringer-Lösung (Lösung f). Die daraufhin induzierten ATP-abhängigen Ströme wurden bei einem Haltepotenzial von -40 mV gemessen.

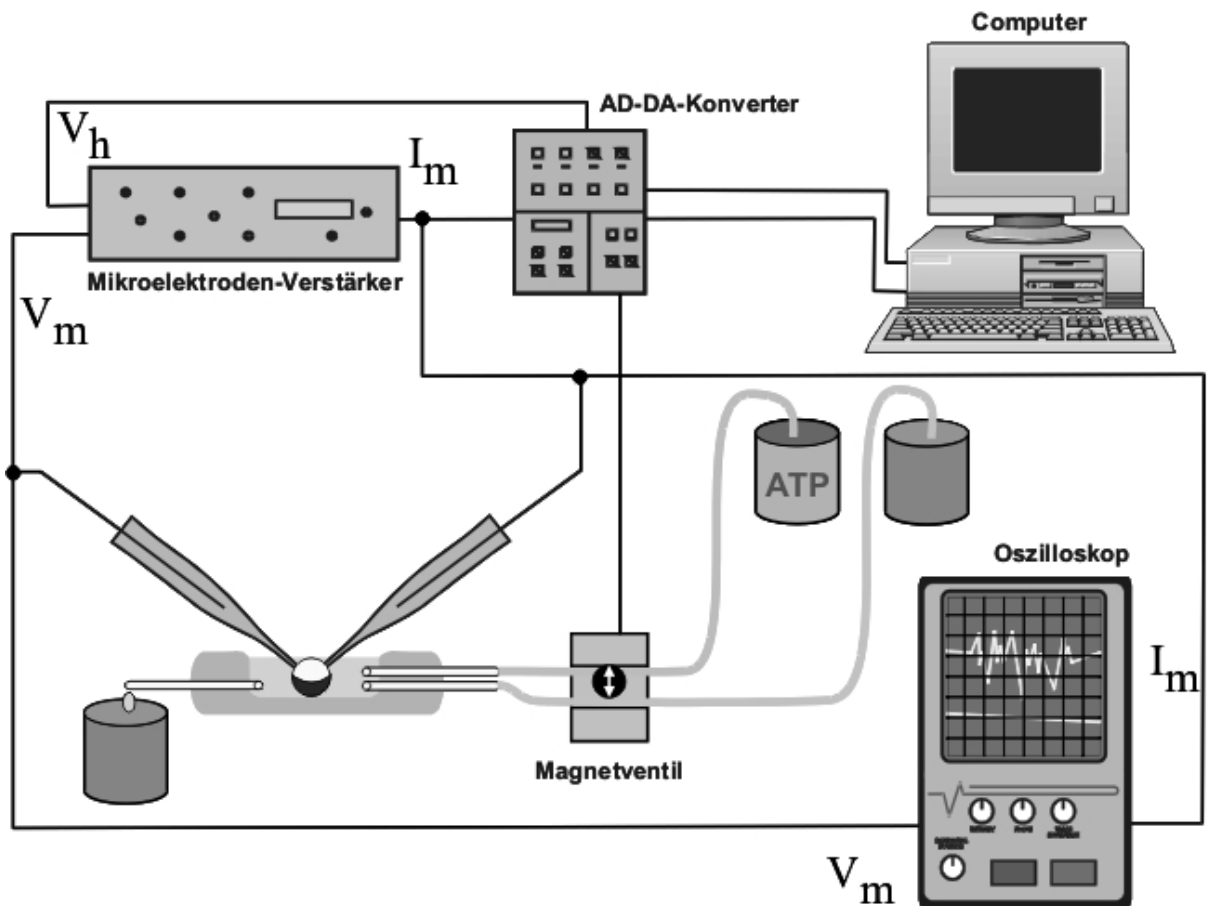


Abb. 1b: Schema des Mikroelektroden-Messplatzes. V_h Haltepotenzial, V_m Membranpotenzial, I_m Membranstrom

Um ein Verfälschen der Ergebnisse durch Calcium-induzierte Ströme zu vermeiden, kam eine Ca^{2+} -freie Lösung (Lösung g) zur Anwendung. Des Weiteren wurde auf den Zusatz von Mg^{2+} verzichtet, da sich die durch Mg^{2+} hervorgerufene Komplexbildung auf das Erreichen der benötigten Konzentration des wirksamen Agonisten, dem freien ATP^{4-} , am P2X7-Rezeptor negativ auswirkt {Markwardt, 1997 10333 /id; Di Virgilio, 1995 8858 /id}.

Der durch diese Maßnahmen induzierte Leckstrom konnte durch die Hinzugabe von 0,1 mM Flufenaminsäure unterdrückt werden {Weber, 1995 10381 /id}. Jedoch ist dabei zu beachten, dass Flufenaminsäure die ATP-induzierten Ströme der Rezeptoren hP2X1 und hP2X7 um die Faktoren $1,58 \pm 0,17$ bzw. $1,25 \pm 0,14$ erhöht ({Klapperstück, 2000 13303 /id} sowie nicht publizierte Daten des Labors Markwardt). Die Messung der P2X-abhängigen Ströme erfolgte, sofern nicht anders angegeben, zwei Tage nach cRNA-Injektion (days post injection, 2 dpi).

Als Maß für die Rezeptoraktivierung wurde entweder der durch 1 mM ATP erzeugte Gipfelstrom (I_{peak} für hP2X1, hP2X3 und hP2X4) beziehungsweise der Strom I_{act} nach 6 s andauernder Applikation von 1 mM ATP (hP2X2 und hP2X7), jeweils abzüglich des vor der Applikation ermittelten Haltestromes ausgemessen. Die An- und Abschaltungskinetik des hP2X7-Rezeptors wurde quantifiziert, indem die aktivierenden und deaktivierenden Stromzeitverläufe nichtlinear approximiert wurden (Sigmaplot, SPSS, Chicago, USA). Die Auswertung und graphische Umsetzung der ermittelten Daten erfolgte durch die Programme Lotus (Lotus Development Corporation, Cambridge, USA) und Sigmaplot. Die gemittelten Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben beziehungsweise dargestellt. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz bei Differenzen von Mittelwerten wurde der multiple t-Test herangezogen. Das hierzu verwendete Programm war Sigmastat (SPSS). Es wurde eine Signifikanzschwelle von $P < 0.05$ festgelegt.

	a	b	c	d	e	f	g
NaCl		100	100	100	100	100	100
KCl		1	1	1	1	2,5	2,5
MgCl₂		1	1	1	1	1	
CaCl₂		1		1	1	1	
HEPES	5	5	5	5	5	5	5
Flufenaminsäure							0,1
Penicillin (U/ml)					10000		
Streptomycin (mg/ml)					10		
Kollagenase(mg/ml)		1,5					
Tricain (g/l)	2						

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen. Alle Lösungen wurden auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Kinetik des humanen P2X7-Rezeptors (hP2X7)

Die Analyse der An- und Abschaltungskinetik des hP2X7-Rezeptors ist in Abb. 2 anhand eines typischen Stromverlaufes mit Aktivierung und Deaktivierung dargestellt. Der aktivierende Teil des ATP-induzierten hP2X7-abhängigen Stromes zeigt zwei Komponenten: eine exponentiell zunehmende Komponente $I_{act,exp}$ sowie eine linear ansteigende Komponente $I_{act,lin}$. Er wurde entsprechend nachfolgender Gleichung approximiert:

Gleichung 1
$$I_{act}(t) = I_{act,\infty} \cdot (1 - e^{-R_{act} \cdot t}) + slope_{act} \cdot t + I_0$$

Dabei ist $I_{act,\infty}$ die Amplitude des exponentiell aktivierenden Stromes ($I_{act,exp}$) bei theoretisch unendlich langer ATP-Applikation, R_{act} die Ratekonstante der exponentiellen Aktivierung, $slope_{act}$ der Anstieg der linear zunehmenden Komponente der Aktivierung ($I_{act,lin}$) und I_0 der Haltestrom vor ATP-Applikation.

Die Deaktivierung des hP2X7-Rezeptors nach Wegnahme des ATP erfolgt ebenfalls biphasisch, d.h. in Form einer schnell ($I_{deact,fast}$) und einer langsam ($I_{deact,slow}$) deaktivierenden Komponente. Der deaktivierende Teil der hP2X7-abhängigen Ströme wurde dementsprechend durch:

Gleichung 2
$$I_{deact}(t) = I_{deact,1} \cdot e^{-R_{deact,1} \cdot t} + I_{deact,2} \cdot e^{-R_{deact,2} \cdot t} + I_0$$

angenähert.

Hier bezeichnet $I_{deact,1}$ die Amplitude der schnellen Deaktivierung, $I_{deact,2}$ die Amplitude der langsamen Deaktivierung, $R_{deact,1}$ die Ratekonstante der schnellen und $R_{deact,2}$ die Ratekonstante der langsamen Deaktivierung. Hierbei gilt $I_{deact} = I_{deact,1} + I_{deact,2}$. I_0 besitzt die gleiche Bedeutung wie in Gl. 1.

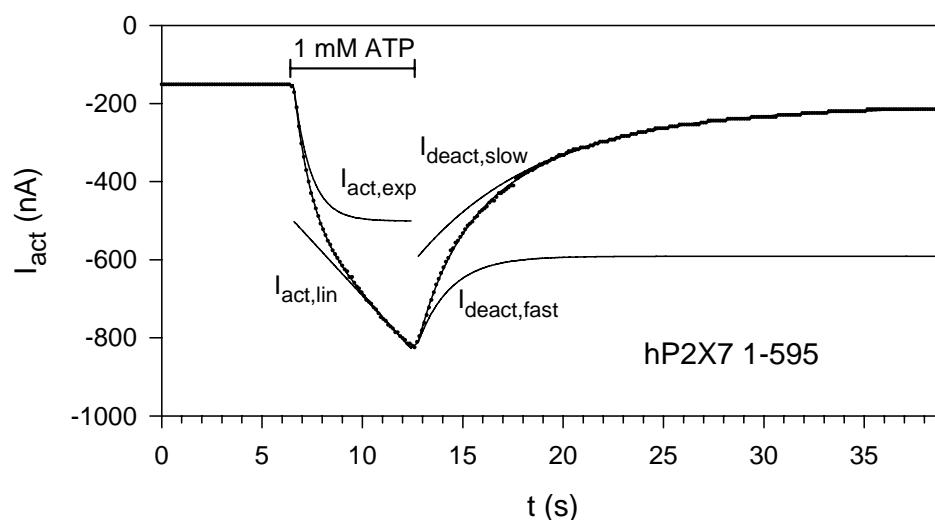


Abb. 2: Beispielstrom des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595. Die Zeit der ATP⁴⁻-Applikation ist angegeben. Die Messung wurde bei einem Haltepotenzial von -40 mV in calciumfreier Lösung durchgeführt (Lösung g, Tabelle 1). Die Messwerte sind als Punkte dargestellt, die Approximation entsprechend Gl. 1 und 2 sowie die der einzelnen Komponenten der Stromaktivierung und -deaktivierung als durchgezogene Linien. Weitere Erläuterungen, siehe Text.

4.2 Wirkung einer His-Markierung auf die Aktivierung des hP2X7-Rezeptors

Für die weitere Untersuchung des hP2X7-Rezeptors wurde von der Forschungsgruppe um Herrn Prof. Schmalzing ein Rezeptorprotein mit einer His-Markierung versehen. Hierbei handelt es sich um 6 Histidine, die am Anfang der N-terminalen Domäne des Rezeptorproteins eingebracht worden sind (s. Abb. 1a). Damit war es nun möglich, die hP2X7-Rezeptoren mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden, Germany) aufzureinigen. Um nun die Wirkungsweise dieses modifizierten Rezeptors (his-hP2X7 1-595) zu ermitteln, wurde sein ATP-induzierter Strom mit dem des Volllängen-Rezeptors (hP2X7 1-595) verglichen. Die daraus resultierenden Messergebnisse sind in Abb. 3 zusammengefasst worden. Es fand sich eine deutliche Verringerung der Stromamplituden des His-markierten hP2X7-Rezeptors im Vergleich zum Volllängen-hP2X7-Rezeptor.

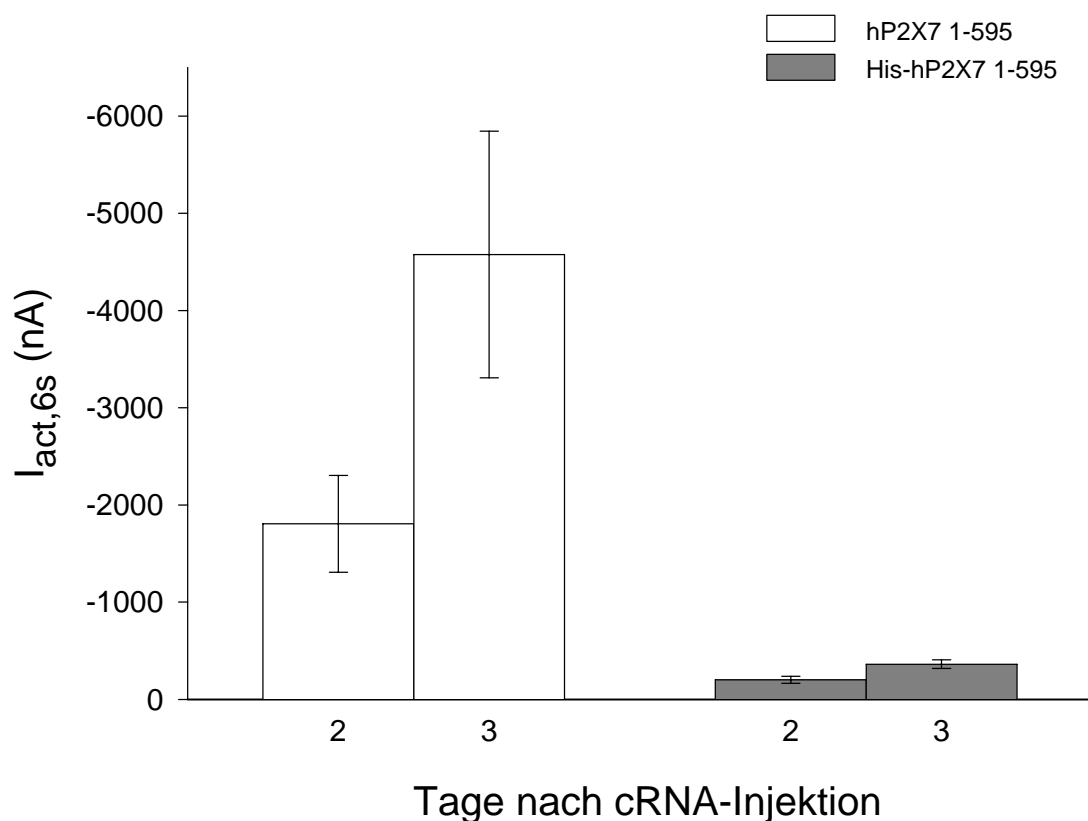


Abb. 3: Vergleich der ATP-induzierten Ströme der Rezeptoren His-hP2X7 und Volllängen-Rezeptor hP2X7 1-595. Die Messung der Ströme erfolgte nach 6 s Applikation von 1 mM ATP (N = 18). Alle Mittelwerte sind signifikant voneinander verschieden. hP2X7 1-595 stellt den Volllängen-Rezeptor dar, His-hP2X7 1-595 den Hexahistidyl-markierten Rezeptor.

4.3 Auswirkung verschiedener coexprimierter C-terminaler Domänen auf die Kinetik des trunkierten hP2X7-Rezeptors hP2X7 1-436

Mittels molekularbiologischer Verfahren wurde die cRNA für einen hP2X7-Rezeptor hergestellt, dem die C-terminale Domäne um 159 Aminosäuren verkürzt worden war (hP2X7 1-436). Bei anschließender Applikation von ATP zeigte sich im Vergleich zum Volllängen-Rezeptor hP2X7 1-595 eine sehr starke Verminderung der Stromamplitude (s. Abb. 4). Im nächsten Schritt wurden zusammen mit der cRNA für den trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptor die cRNA für verschiedene C-terminale Domänen coexprimiert. Hierbei kamen die C-terminalen Domänen hP2X7 435-595, hP2X7 536-595 und hP2X7 ECFP 435-595 zum Einsatz.

Die ersten beiden Varianten stellen unterschiedlich lange Formen der ursprünglichen carboxyterminalen Domäne dar, wobei hP2X7 435-595 die lange Form der nativen C-terminalen Domäne widerspiegelt und den trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436 vollständig komplettiert (wobei erwähnt werden sollte, dass sich der trunkierte Rezeptor hP2X7 1-436 und der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 bei den Aminosäuren 435 sowie 436 überlappen), hingegen hP2X7 536-595 eine verkürzte Form des C-terminalen Endes repräsentiert.

Bei der C-terminalen Domäne hP2X7 ECFP 435-595 wurde das Protein mit einem „enhanced cyan fluorescent protein“ am N-terminalen Ende versehen, um in späteren Experimenten die Expression in der Zellmembran sowie seine Anlagerung an das Rezeptorprotein optisch nachzuweisen. Alle C-terminalen Domänen waren zusätzlich an ihrem N-terminalen Ende mit einem Hexahistidyl-Tag (His-Tag) versehen. Abb. 4 zeigt beispielhaft die sich daraus ergebenden Effekte auf die An- und Abschaltkinetik des hP2X7-Rezeptors bei Applikation von 1 mM ATP.

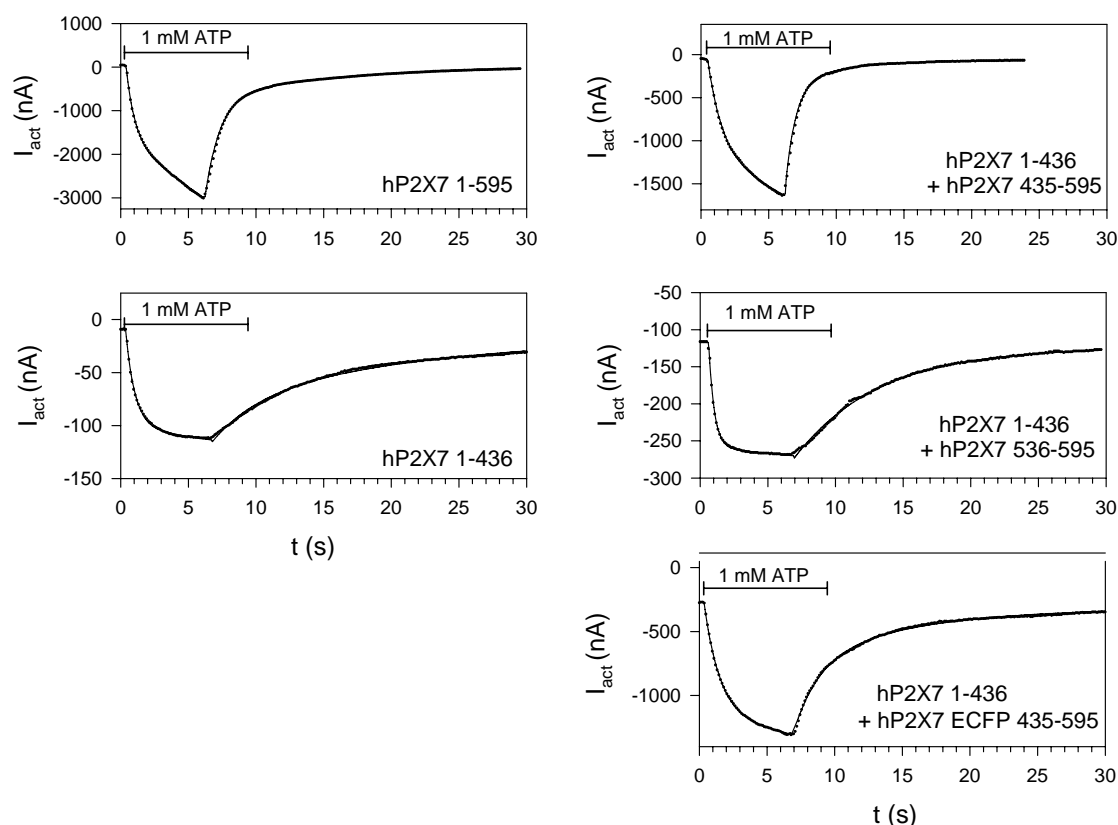


Abb. 4: Einfluss verschiedener C-terminaler Domänen auf den Zeitverlauf der hP2X7-abhängigen Ströme. Die Messwerte sind als Punkte dargestellt. Die Approximation entsprechend Gleichung 1 und 2 sind als durchgezogene Linien gezeigt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

In Abb. 5 wurden die Amplituden der ATP-abhängigen Ströme für den trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436 sowie seinen Kombinationen mit den o.g. C-terminalen Domänen dem Volllängen-Rezeptor hP2X7 1-595 gegenübergestellt.

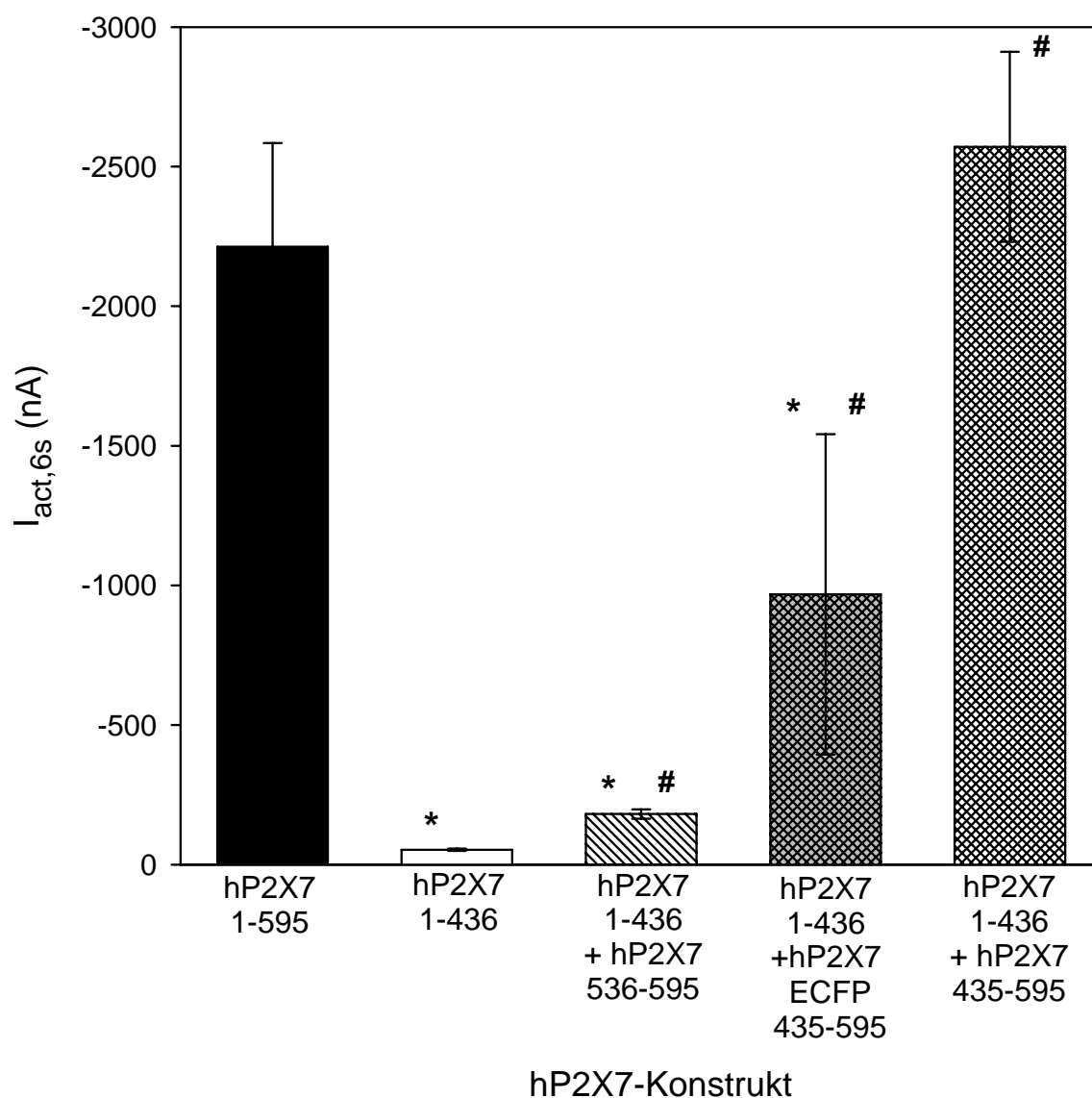


Abb. 5: Effekte verschiedener C-terminaler Domänen auf die ATP-abhängige Stromantwort des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors. Es wurde der ATP-induzierte Strom nach 6 s ATP-Applikation gemessen. Messungen nach zweitägiger Inkubationszeit von N = 8–20 Oozyten. * - signifikante Differenz zum Volllängen-Rezeptor hP2X7 1-595, # - signifikante Differenz zum trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436.

Abb. 6 zeigt das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Komponenten von Aktivierung und Deaktivierung (s. auch Abb. 2) in Abhängigkeit von der Expression des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors in Kombination mit verschiedenen C-terminalen Domänen. Als Vergleich dient auch hier die ATP-abhängige Rezeptorantwort des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595. Es zeigt sich, dass die Anschließkinetik (Aktivierung) des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors allein sowie in seiner Kombination mit der kurzen C-terminalen Domäne hP2X7 536-595 durch eine monoexponentielle Komponente dominiert wird. Bei der Aktivierung des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595 sowie des coexprimierten trunkierten Rezeptors hP2X7 1-436 plus der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 wird zusätzlich eine linear aktivierende Komponente deutlich (s. Abb. 6B). Ähnliches gilt für die Abschaltkinetik (Deaktivierung), die für den trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436 allein langsam monoexponentiell verläuft. Bei Coexpression mit der kurzen und langen C-terminalen Domäne (hP2X7 536-595 sowie hP2X7 435-595) kommt hingegen noch eine schnell deaktivierende Komponente hinzu, die allerdings bei Coexpression mit der kurzen C-terminalen Domäne klein ausfällt (s. Abb. 6D).

Dies bedeutet, dass durch Coexpression der kurzen C-terminalen Domäne hP2X7 536-595 die Stromamplitude im Vergleich zum trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436 gering vergrößert, die Stromkinetik jedoch nur unwesentlich verändert wird. Die Coexpression des trunkierten Rezeptors hP2X7 1-436 mit der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 dagegen stellt sowohl die Stromamplitude als auch die Stromkinetik des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595 wieder her. Die Effekte der EGFP-markierten C-terminalen Domäne liegen in etwa zwischen den Effekten des kurzen und des langen C-terminalen Endes.

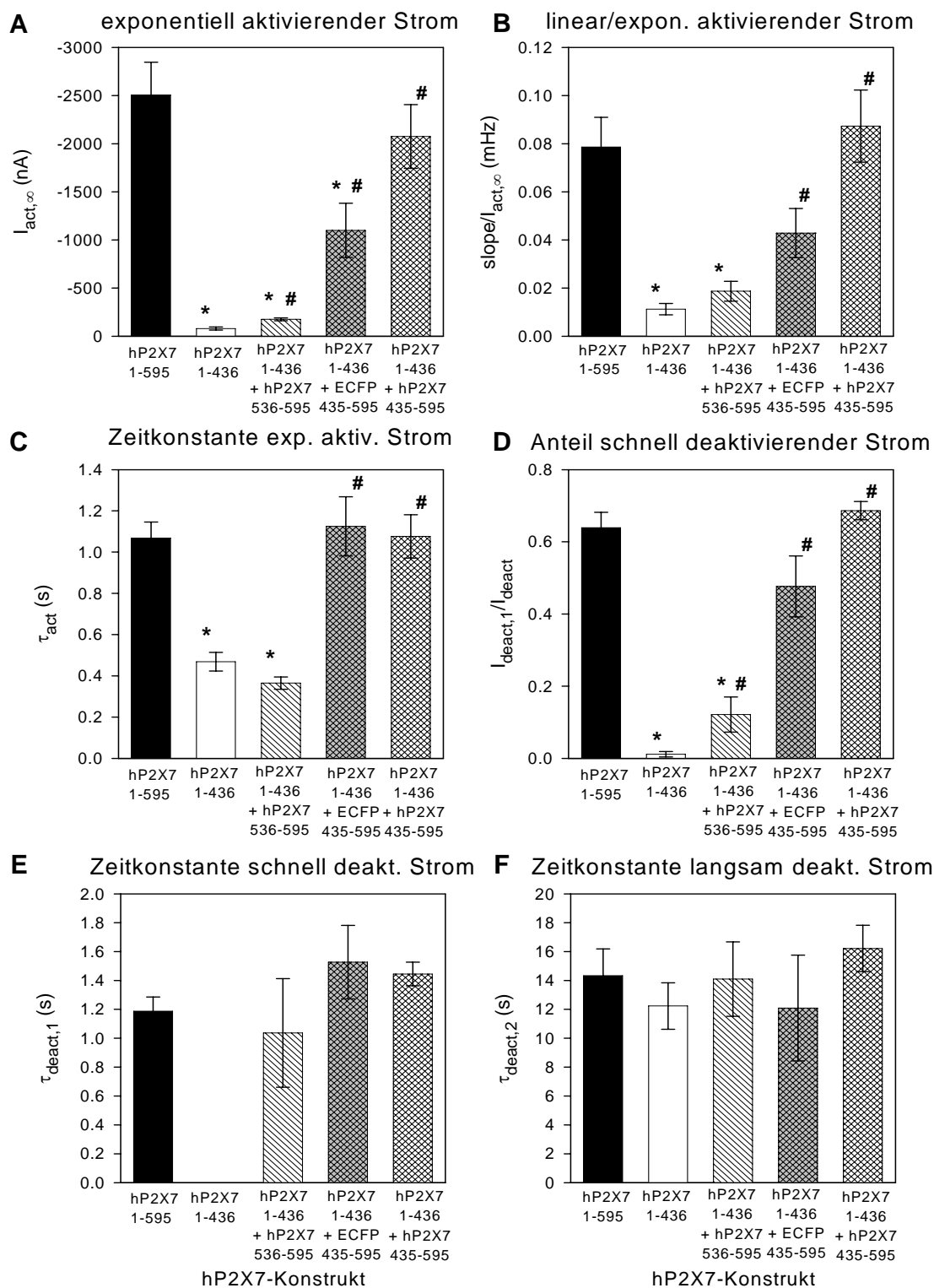


Abb. 6: Statistik über die einzelnen Komponenten der ATP-abhängigen Rezeptorantwort bei Coexpression verschiedener C-terminaler Domänen mit dem trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436. Die Parameter (s. Abb. 2) wurden entsprechend der Gleichung 1 und 2 bestimmt. N = 8–20 Oozyten. * - signifikante Differenz zum Volllängen-Rezeptor hP2X7 1-595, # - signifikante Differenz zum hP2X7 1-436. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.4 Abhängigkeit der Aktivierung trunkierter und coexprimierter hP2X7-Rezeptoren von der ATP-Konzentration

Nachfolgend wurde die ATP-abhängige Wirkung des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors bei Coexpression mit der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 untersucht. Als Vergleich dienten die Dosisabhängigkeiten des Vollängen-Rezeptors hP2X7 1-595 sowie des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors. Die durch 6 s ATP-Applikation induzierten Ströme wurden auf die Stromantwort bei 1 mM ATP normiert ($I_{\text{rel[ATP]}}$) und mittels folgendem Modell approximiert:

Gleichung 3

$$I_{\text{rel[ATP]}} = \frac{I([\text{ATP}])}{I_{\text{ImMATP}}} = \frac{I_{\text{rel,max,1}}}{\left(1 + \frac{K_{D1}}{[\text{ATP}]}\right)^2} + \frac{I_{\text{rel,max,2}}}{\left(1 + \frac{K_{D2}}{[\text{ATP}]}\right)^2}$$

Diese Funktion geht von einer hochaffinen sowie einer niedrigaffinen Bindungsstelle für die Aktivierung von hP2X7-Rezeptoren mit den scheinbaren Dissoziationskonstanten K_{D1} und K_{D2} aus, was mit vorangegangenen Messungen übereinstimmt {Klapperstück, 2001 14026 /id}. Hierbei ist [ATP] die jeweils applizierte ATP-Konzentration, $I_{\text{rel,max,1}}$ die erste und $I_{\text{rel,max,2}}$ die zweite maximale relative Stromstärke bei theoretisch unendlich hoher Konzentration des Agonisten an den jeweiligen Bindungsstellen. K_{D1} und K_{D2} sind die ATP-Konzentrationen, die jeweils eine halbmaximale Aktivierung der entsprechenden Bindungsstellen erreichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 zusammengefasst. Die Exponenten 2 im Nenner ergaben signifikant höhere Korrelationen des Modells mit den Messwerten als Exponenten 1, 3 oder 4. Es zeigt sich, dass beim trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptor der Effekt der niedrigaffinen Bindungsstelle bei Aktivierung ausbleibt.

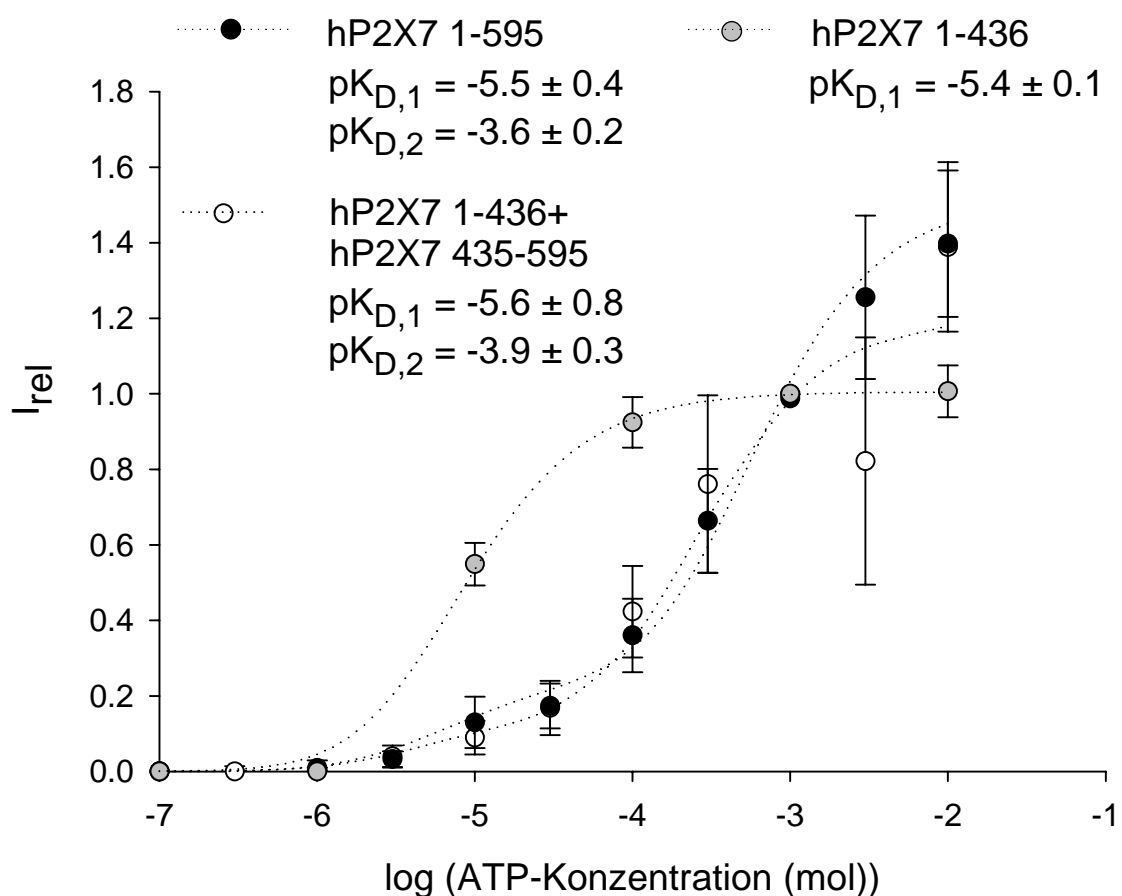


Abb. 7: Vergleich der ATP-Konzentrations-Wirkungsbeziehungen des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595, des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors sowie des coexprimierten trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors und der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595. Es wurde der ATP-induzierte Strom nach 6 s ATP-Applikation gemessen und auf den Strom bei Applikation von 1 mM ATP normiert. Die Approximationen wurden mittels Gl. 3 vorgenommen. N = 10 Oozyten.

4.5 Wirkung der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 sowie des Injektionsvolumens auf die Aktivierung des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595

Nach der experimentellen Untersuchung der Wirkung einer Coexpression der C-terminalen Domäne auf die ATP-abhängigen Rezeptorantwort des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors stellte sich die Frage, inwiefern dies auch auf den Volllängen-Rezeptor zu übertragen ist. Hierzu wurde zum Selbigen die lange C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 coexprimiert.

Abb. 8 zeigt eine typische ATP-abhängige Rezeptorantwort von coexprimierten Oozyten nach zweitägiger Inkubation. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Veränderung der Rezeptorkinetik (s. auch Abb. 2 und 4).

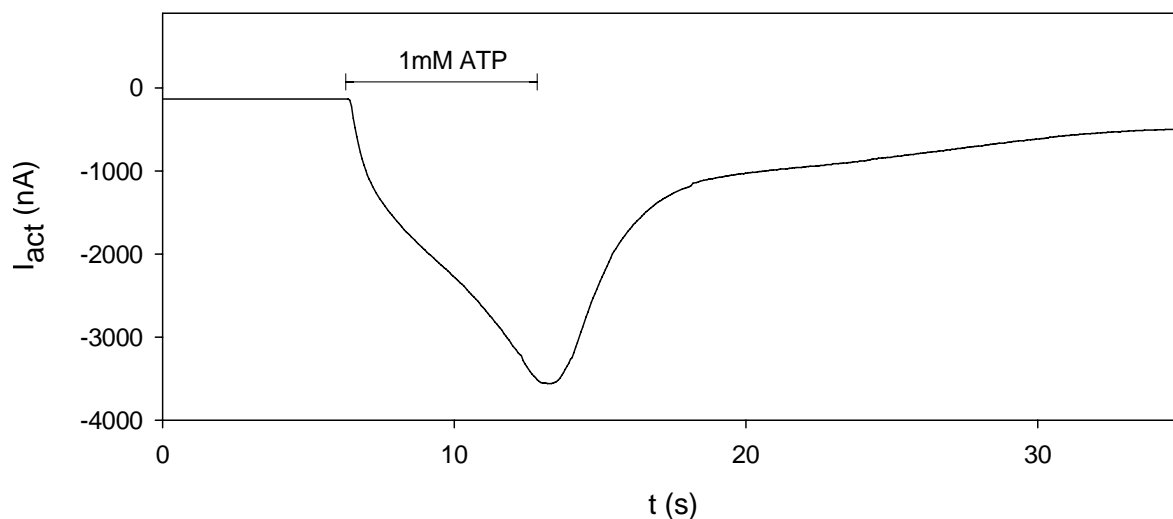


Abb. 8: Repräsentative ATP-abhängige Rezeptorantwort des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595 nach Coexpression mit der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595.

In Abb. 9 wurden die Ergebnisse der coexprimierten Oozyten denjenigen gegenübergestellt, die nur den nativen Rezeptor exprimiert hatten. Es zeigt sich keine signifikante Erhöhung der ATP-induzierten Stromamplitude durch die Coexpression von C-terminaler Domäne und Volllängen-Rezeptor.

Da die Coexpression mit Erhöhung des Applikationsvolumens einhergeht, wurde zusätzlich der Effekt einer alleinigen Verdoppelung des Injektionsvolumens auf die Aktivierung des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595 sowie des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors untersucht. Hier ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Erhöhungen der ATP-abhängigen Stromantwort.

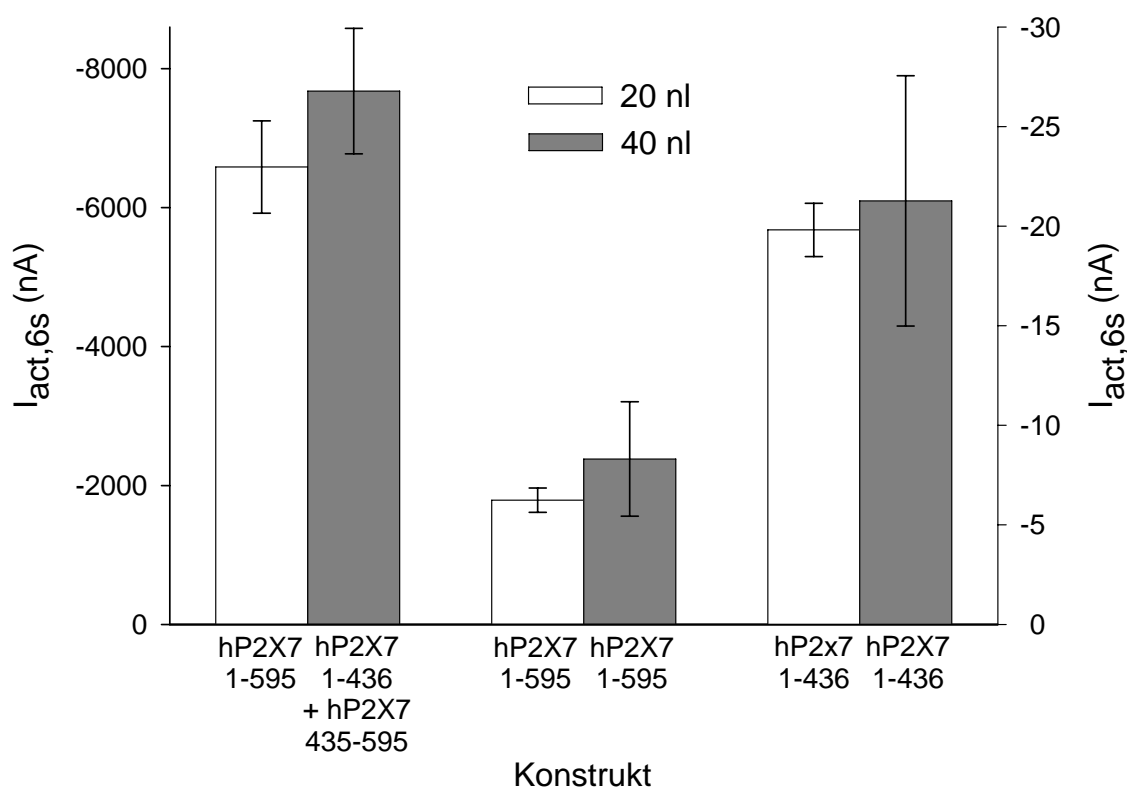


Abb. 9: Einfluss des Injektionsvolumens auf die funktionelle Expression des Vollängen-Rezeptors hP2X7 1-595 mit und ohne Expression des langen C-terminalen Endes. Messung der Ströme erfolgte nach 6 s Applikation von 1 mM ATP. N = 15. Die Balkenpaare entstammen Messungen aus 2-4 verschiedenen Oozytenpräparationen. Die rechte Ordinate gilt für den trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436. Die Amplitudendifferenz des Vollängen-Rezeptors sowie der Coexpression von hP2X7 1-436 mit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 gegenüber dem Balkenpaar des Vollängen-Rezeptors bei unterschiedlichem Injektionsvolumen ergibt sich aus der Verwendung unterschiedlicher Oozytenpräparationen.

4.6 Dosisabhängigkeit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 auf die Wirkung des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptor

Nachdem die Wirkung der Coexpressierung untersucht worden war, wurde das Augenmerk auf die dosisabhängige Wirkung der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 gelegt. Hierzu wurde die cRNA des trunkierten Rezeptors hP2X7 1-436 jeweils mit einer unterschiedlichen Menge an cRNA der C-terminalen Domäne

hP2X7 435-595 coexprimiert und mit der ATP-induzierten Rezeptorantwort des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595 verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 zusammengefasst.

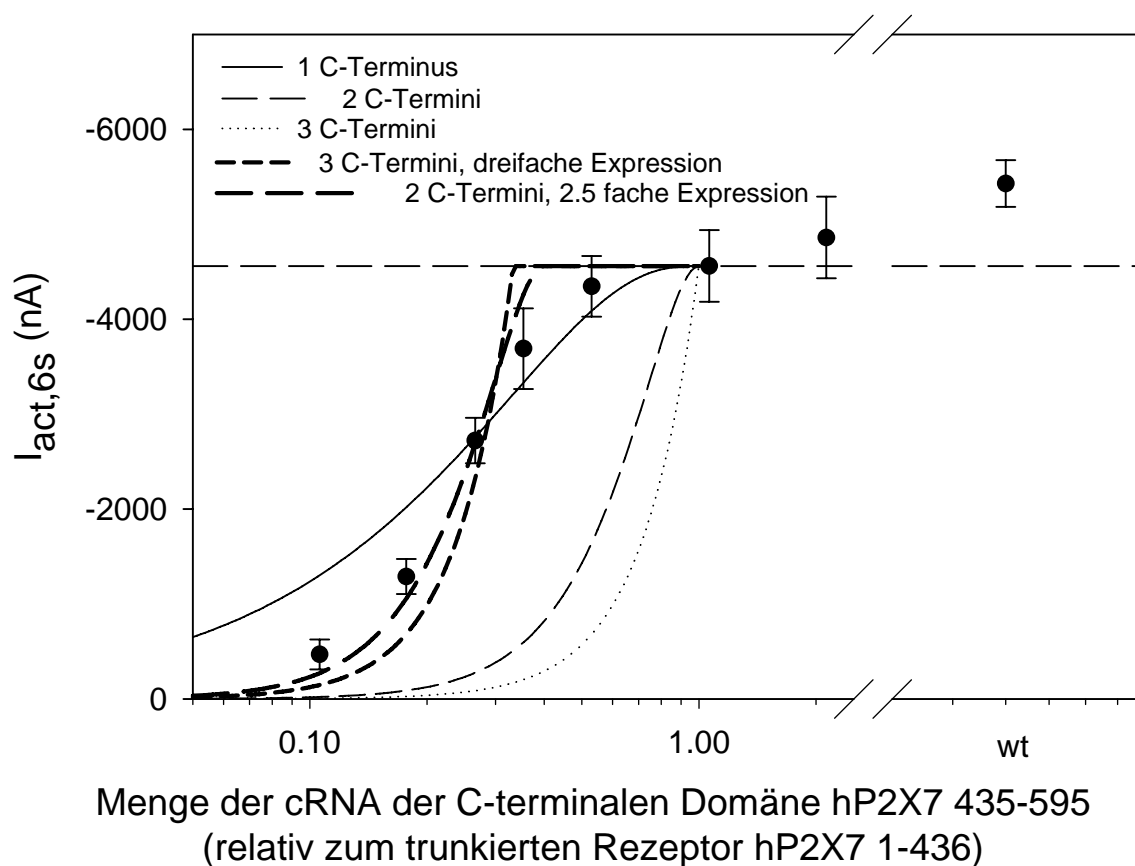


Abb. 10: Abhängigkeit der funktionellen Expression von coexprimierten trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptoren und langen C-terminalen Domänen hP2X7 435-595 von der Menge der injizierten cRNA der C-terminalen Domäne. Dargestellt ist die Abhängigkeit des ATP-induzierten Stromes $I_{act,6s}$ vom Konzentrationsverhältnis der coinjizierten cRNA für die C-terminale Domäne hP2X7 435-595 und den trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436. Die dünnen Linien repräsentieren Modelle eines Rezeptors hP2X7 1-436 mit 3 Untereinheiten, bei denen mindestens ein, zwei oder drei C-terminale Domänen hP2X7 435-595 für die Stimulation der funktionellen Expression notwendig sind. Die dicken Linien entsprechen Modellen, von mindestens 3 notwendigen C-terminalen Domänen bei 3-facher Expression bzw. von mindestens 2 notwendigen C-terminalen Domänen bei 2,5-facher Expression der C-terminalen Domäne im Verhältnis zur Expression des trunkierten Rezeptors. Die Messung der Ströme erfolgte nach 6 s Applikation von 1 mM ATP. N = 4-12. Die Messungen entstammen 3 Oozytenpräparationen.

Aus den Daten der Abb. 10 wurde versucht, Hinweise auf die Anzahl der notwendigen C-terminalen Domänen für die Stimulation der trunkierten Rezeptoren zu ermitteln. Die Daten wurden dazu mittels eines Modells approximiert, das von folgenden Voraussetzungen ausgeht:

1. Drei Untereinheiten bilden einen funktionsfähigen Rezeptor bzw. Ionenkanal (dies ist inzwischen für P2X1 und P2X3 {Nicke, 1998 11450 /id} sowie P2X2 {Stoop, 1999 12745 /id} und P2X2/P2X3 {Jiang, 2003 15718 /id} sehr wahrscheinlich, allerdings gibt es für den P2X7-Rezeptor diesbezüglich noch keine Klarheit, eine trimere Struktur erscheint aber möglich {Kim, 2001 14384 /id}).
2. Der Strom durch den trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436 wurde vernachlässigt (dies erscheint anhand der Ergebnisse der Abb. 5 gerechtfertigt).
3. Die Wahrscheinlichkeit, dass trunkierter Rezeptor und C-terminale Domäne interagieren, entspricht dem Mengensverhältnis C-terminale Domäne/trunkierter Rezeptor, wie auf der Abszisse der Abb. 10 angegeben.
4. Rezeptoren mit Untereinheiten ohne C-terminale Domäne werden nicht, Rezeptoren mit 3 Untereinheiten, die C-terminale Domäne besitzen, werden voll stimuliert, d.h. haben einen gleichgroßen Strom wie der native Rezeptor (erscheint durch Abb. 6 gerechtfertigt), Rezeptoren mit 1 oder 2 trunkierten Untereinheiten mit gebundener C-terminaler Domäne werden nicht oder voll stimuliert (Alles-oder-nichts-Prinzip der Stimulation der trunkierten Rezeptoren durch die C-terminale Domäne)
5. Die Expression der trunkierten Rezeptoren sowie der C-terminalen Domänen beeinflussen sich nicht gegenseitig

Mittels Binomialverteilung lässt sich dann die relative Stromgröße (im Vergleich zum nativen Rezeptor) berechnen. Bei Annahme einer gleichstarken Expression von trunkiertem Rezeptor und C-terminaler Domäne (d.h. Rezeptorexpression in Abhängigkeit von der cRNA-Konzentration) würde kein Modell (d.h. 1, 2 oder 3 C-terminale Domänen notwendig für volle Rezeptorstimulation) die Abhängigkeit der Stimulation von der C-terminalen-cRNA-Menge erklären (s. dünne Linien in Abb. 10). Eine bessere Übereinstimmung wurde bei Modellen gefunden, die eine stärkere Expression der C-terminalen Domäne im Vergleich zum trunkierten Rezeptor voraussetzen.

4.7 Einfluss des coexprimierten trunkierten Rezeptors hP2X7 1-436 auf die funktionelle Expression des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595

Durch die Coexpression von trunkiertem hP2X7 1-436 Rezeptor beziehungsweise hP2X7 1-413 Rezeptor und dem Volllängen-Rezeptor hP2X7 1-595 wurde versucht, einen weiteren Aufschluss über die Interaktion von hP2X7-Untereinheiten mit und ohne C-terminaler Domäne hP2X7 435-595 zu bekommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

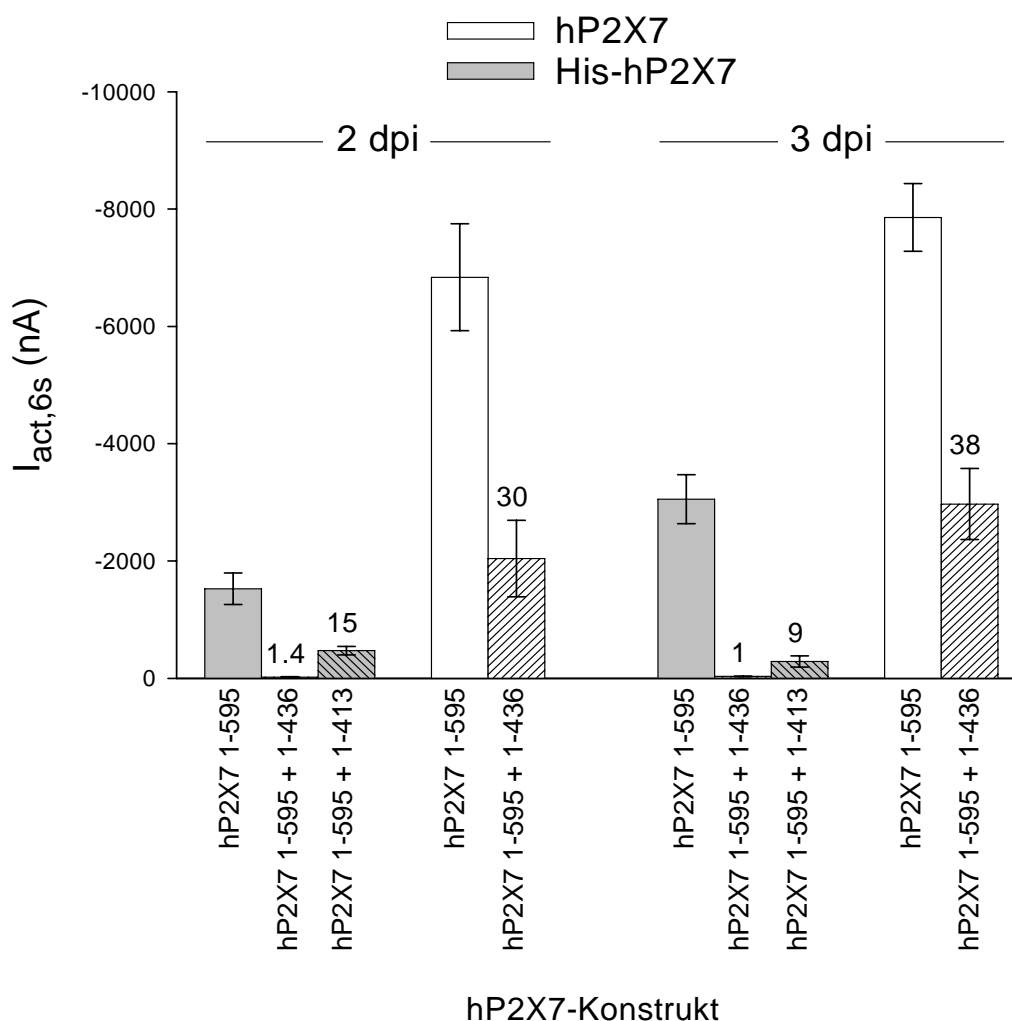


Abb. 11: Einfluss coexprimierter trunkierter hP2X7-Rezeptoren auf die funktionelle Expression des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595. Es wurden jeweils equimolare Mengen der cRNA für die verschiedenen hP2X7-Konstrukte, wie auf der Abszisse angegeben, injiziert. Die Zahlen über den Balken geben den prozentualen Anteil des aktivierenden Stromes im Vergleich zum Volllängen-Rezeptor (hP2X7 1-595) an. Mittelwerte entstammen 4-12 Oozyten einer Oozytenpräparation.

Die Abb. 11 verdeutlicht, dass die Hexahistidyl-Markierung am N-terminalen Ende des hP2X7-Rezeptors (His-Tag, s. auch Abb. 3) den ATP-induzierten Strom deutlich verringert. Weiterhin liegen die ATP-abhängigen Ströme der coexprimierten Konstrukte deutlich unter denen der alleinigen Volllängen-Rezeptor-Konstrukte (His-markiert oder nicht). Dies weist darauf hin, dass die trunkierten Rezeptoren hP2X7 1-436 und hP2X7 1-413, die selbst einen deutlich kleineren ATP-abhängigen Strom generieren als der Volllängen-Rezeptor (s. Abb. 5 und 12), mit den Volllängen-Untereinheiten interagieren und einen stark hemmenden Effekt auf ihn ausüben. Mittelt man die prozentualen Anteile des Stromes bei Coexpression im Vergleich zu den alleinigen Volllängen-Rezeptoren unter den verschiedenen in Abb. 11 gezeigten Versuchsbedingungen, kommt man auf einen Wert von $15,6 \pm 6,2$ %.

Nimmt man eine gleichstarke Expression von Volllängen-Rezeptor hP2X7 1-595 und trunkierten Rezeptoren an, liegt die Wahrscheinlichkeit, beim „Herausfischen“ einer einzelnen beliebigen hP2X7-Untereinheit aus der Zellmembran eine Volllängen-Untereinheit zu finden, bei 50 %. Vernachlässigt man weiterhin die kleinen durch die trunkierten Rezeptoren generierten Ströme und setzt gleichzeitig voraus, dass insgesamt drei Volllängen- und/oder trunkierte hP2X7-Untereinheiten stochastisch miteinander interagieren (d.h. die Trunkierung würde die prinzipielle Trimerstruktur der hP2X7-Rezeptoren nicht beeinflussen), so ergibt sich nach Binominalverteilung ein Prozentsatz von $0,5^3 = 12,5$ % an hP2X7-Rezeptoren die ausschließlich aus Volllängen-Untereinheiten bestehen. Der Prozentsatz an Trimeren, die aus keiner oder nur einer trunkierten Untereinheit bestehen ergibt sich aus $0,5^3 + 3 \cdot 0,5 \cdot 0,5^2 = 50$ % und der Prozentsatz an Trimeren mit 0, 1 oder 2 trunkierten Untereinheiten berechnet sich analog dazu (87,5 %). Die gemessenen verbleibenden Stromamplituden nach Coexpression mit trunkierten hP2X7-Rezeptoren von rund 16 % sprechen also am ehesten dafür, dass dieser Strom ausschließlich durch hP2X7-Rezeptoren mit drei Volllängen-Untereinheiten generiert wird. Demzufolge unterstützen die Ergebnisse der Abb. 11 die Vermutung aus der Analyse der Abb. 10, dass ein funktionstüchtiger hP2X7-Rezeptor keine trunkierte Untereinheit beinhalten darf, d.h. eine Trunkierung einen dominant negativen Effekt auf die P2X7-Rezeptorfunktion als Ionenkanal ausübt.

4.8 Wirkung verschiedener Trunkierungen auf die Aktivierung des hP2X7-Rezeptors

Nachdem die Trunkierung an Stelle 159 des carboxyterminalen Endes untersucht worden war (hP2X7 1-436), wurden weitere trunkierte Rezeptoren (hP2X7 1-583, hP2X7 1-572, hP2X7 1-549, hP2X7 1-505 und hP2X7 1-408) hergestellt. Jede dieser Rezeptorvarianten lag mit His-Markierung vor und wurde daher ebenfalls mit einem His-markierten Volllängen-Rezeptor hP2X7 1-595 verglichen. Im analogen Vorgehen zu der Versuchsreihe um den trunkierten Rezeptor hP2X7 1-436 wurden die cRNA der trunkierten Rezeptoren und die der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 coinjiziert. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Abb. 12 zusammenfassend dargestellt. Es zeigt sich, dass bei allen trunkierten hP2X7-Rezeptoren eine Vergrößerung der Stromantwort durch Coinjektion mit der cRNA der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 zustande kommt. Eine Ausnahme bildet lediglich der hP2X7 1-408 Rezeptor, bei dem durch Coinjektion mit C-terminalen-cRNA keine verstärkte Rezeptoraktivierung erreicht wird.

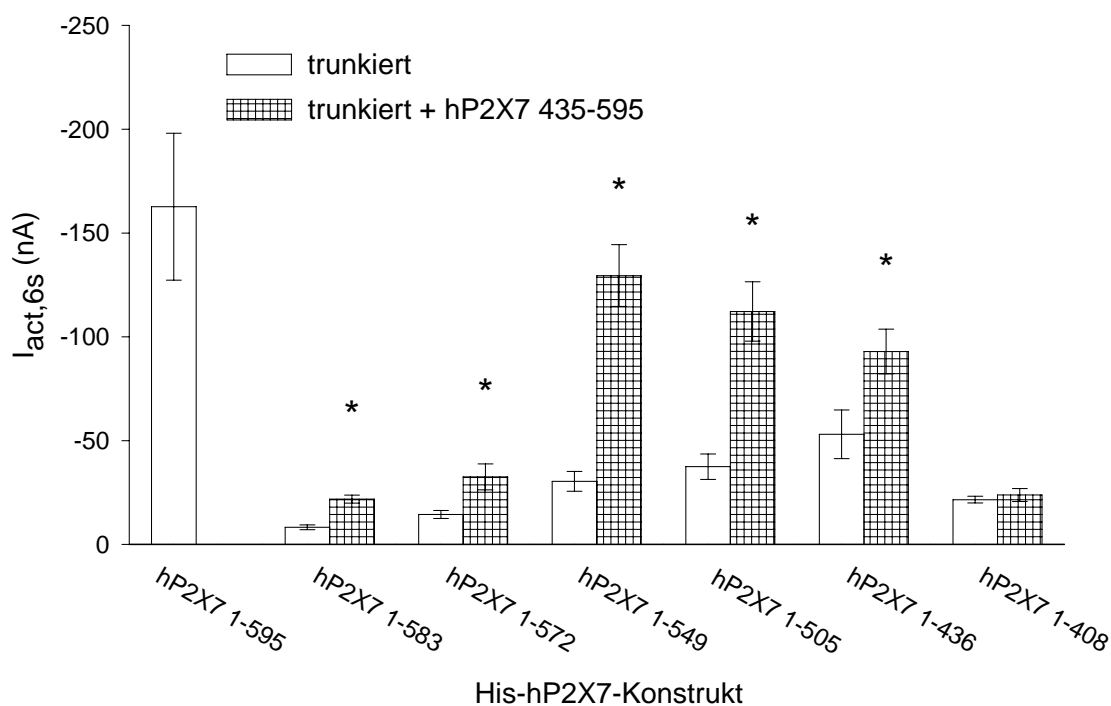


Abb. 12: Aktivierung trunkierter hP2X7-Rezeptoren durch Coexpression mit der langen C-terminalen Domäne in Abhängigkeit vom Trunkierungsgrad. * signifikante Vergrößerung durch Coexpression mit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 im Vergleich zum trunkierten Rezeptor allein. N = 6–16 Oozyten aus 2 Präparationen. Messungen am 3. Tag nach cRNA-Injektion führen zu analogen Ergebnissen.

4.9 Beeinflussung anderer hP2X-Rezeptoren durch die C-terminale Domäne hP2X7 435-595 des hP2X7-Rezeptors

In den folgenden Experimenten sollte die Hypothese geprüft werden, ob die C-terminale Domäne hP2X7 435-595 des hP2X7-Rezeptors auch die Kinetik anderer hP2X-Rezeptoren, die kein langes C-terminales Ende besitzen, beeinflussen kann.

Wie die Abb. 13 jedoch zeigt, ergeben sich keine signifikanten Veränderungen der An- und Abschaltkinetik bzw. des Desensitivierungsverhaltens der hP2X-Rezeptoren 1-4 bei Coexpression mit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 des hP2X7-Rezeptors. Ebenso sind die Amplituden der ATP-induzierten Ströme nicht signifikant verändert (Abb. 14).

Abb. 13: Einfluss der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 des hP2X7-Rezeptors auf hP2X1-4-abhängige Ströme. Die Zeit der Applikation von 1 mM ATP ist angegeben.

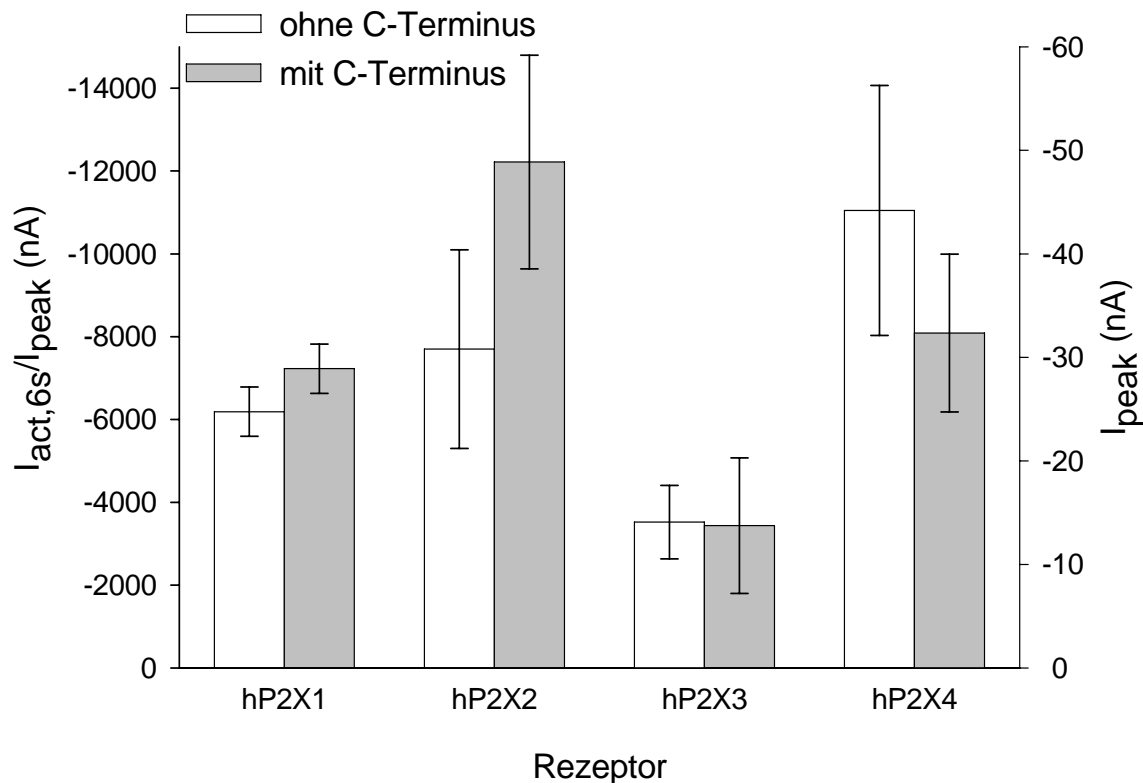


Abb. 14: Wirkung der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 auf die Amplituden ATP-induzierter hP2X1–4-Rezeptor-abhängiger Ströme. Die Messungen erfolgten 2 Tage (für hP2X1 und hP2X2, linke Ordinate) bzw. 3 Tage (für hP2X3 und hP2X4, rechte Ordinate) nach Injektion der entsprechenden cRNA allein oder nach Coexpression mit der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 des hP2X7-Rezeptors. N = 5–14 Oozyten aus 7 verschiedenen Präparationen. I_{peak} entspricht der maximalen ATP-abhängigen Rezeptorantwort.

5 Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die getrennte Expression, d.h. Injektion zweier verschiedener cRNA eines trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors und der komplementären C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 zu ATP-abhängigen Strömen führt, die vom Volllängen-hP2X7-Rezeptor-Strom praktisch nicht zu unterscheiden sind (Abb. 4 - 6). Dies bedeutet einerseits, dass die beiden Rezeptorteile auf der Zellmembran

zusammenfinden und zumindest hinsichtlich der elektrophysiologischen Eigenschaften dann einen voll funktionsfähigen hP2X7-Rezeptor bilden.

Andererseits weist dies darauf hin, dass die Faltung beider Rezeptorteile für die erfolgreiche funktionelle Expression des Volllängen-Rezeptors offensichtlich auch getrennt erfolgen kann, was wiederum gegen eine intensive räumliche Verflechtung beider Rezeptorproteinteile spricht.

Des Weiteren scheinen die Peptidbindungen im Bereich der Aminosäuren 436 (Ende des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors) und 435 (Anfang der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595) für die Kanalfunktion nicht wesentlich von Bedeutung zu sein, da sich trunkierter Rezeptor und die C-terminale Domäne bei den Aminosäuren 435 sowie 436 überlappen und hinzukommend der His-Tag am N-terminalen Ende der C-terminalen Domäne den Zusammenbau beider Rezeptorteile nicht entscheidend behindert. Selbst bei der Einführung eines größeren räumlichen Störfaktors, eines EGFP-Proteins, wird eine Interaktion beider Proteinteile nicht übermäßig gestört, abzulesen an der Stimulation des ATP-abhängigen Stromes bei Coexpression.

Es scheint also, als ob die C-terminale Domäne quasi als Ionenkanalmodulierende Untereinheit des hP2X7-Rezeptors aufgefasst werden kann, wie es für verschiedene Ionenkanäle {Gurnett, 1996 10162 /id}, so z.B. für den langsamen verzögerten Auswärtsgerichteter K^+ -Kanal {Busch, 1997 10362 /id}, den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal {Lory, 1992 5269 /id} oder den Ca^{2+} -abhängigen maxi- K^+ -Kanal {Dworetzky, 1996 9709 /id} bereits beschrieben worden ist.

Der auffälligste Effekt einer Coexpression von trunkiertem hP2X7 1-436 Rezeptor und C-terminaler Domäne hP2X7 435-595 ist die Erhöhung der ATP-abhängigen Stromamplitude auf annähernd das Niveau des Volllängen-Rezeptors. Dies kann durch eine Stimulation der Expression des trunkierten Rezeptors, die Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der Ionenkanäle oder die Vergrößerung des Ionenkanalstroms durch die einzelnen Ionenkanäle erfolgen. Diese Frage kann jedoch mit dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Weiterhin geben Daten der Proteinexpression auf Zellmembranebene sowie Einzelkanalmessungen Aufschlüsse dahingehend, dass die Trunkierung die Proteinexpression nicht abschwächt. Dies bedeutet, dass die Stromvergrößerung durch

Coexpression der C-terminalen Domäne durch einen Effekt auf die Kanalkinetik oder das Schaltverhalten zustande kommt {Becker, 2008 18819 /id}.

Die Injektion eines größeren Volumens gelöster cRNA bei Coinjektion kann als unspezifische Stimulation der Expression von Vollängen- oder trunziertem hP2X7 1-436 Rezeptor jedenfalls ausgeschlossen werden (Abb. 9). Sicher ist jedoch, dass die C-terminale Domäne hP2X7 435-595 die An- und Abschaltkinetik des trunzierten Rezeptors hP2X7 1-436 beeinflusst. So besitzt der trunzierte Rezeptor hP2X7 1-436 keine linear aktivierende und keine schnell deaktivierende Stromkomponente, wie sie beim Vollängen-hP2X7-Rezeptor zu finden sind. Beide Komponenten treten durch die Coinjektion der cRNA der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 wieder auf (Abb. 4 und 6).

Ähnliche Effekte werden bei der ATP-Konzentrations-Wirkungskurve gefunden. Nach Trunkierung (hP2X7 1-436) geht der Effekt einer funktionell niedrigaffinen Bindungsstelle auf die Kanalaktivierung verloren, welcher bei Vervollständigung des Kanalproteins mit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 wieder in Erscheinung tritt (Abb. 7). Der durch die Trunkierung verursachte Verlust eines Teils des exponentiell aktivierenden, des linear aktivierenden und des schnell deaktivierenden Stromes, die von einer niedrigaffinen ATP-Bindungsstelle abhängen, ist bereits analysiert worden {Klapperstück, 2001 14026 /id}. Dies bedeutet aber auch, dass die C-terminale Domäne des hP2X7-Rezeptors nicht nur wie in der Literatur beschrieben {Rassendren, 1997 10407 /id; Surprenant, 1996 9478 /id} für die Porenbildung verantwortlich ist, sondern auch die Aktivierung der Ionenkanaleigenschaften des hP2X7-Rezeptors maßgeblich beeinflusst. Auf diese Tatsache hinzuweisen ist wichtig, da zum Teil immer noch davon ausgegangen wird, dass die Trunkierung die Ionenkanaleigenschaften des P2X7-Rezeptors unbeeinflusst lässt {Smart, 2003 15463 /id}. Allerdings scheint auch das N-terminale Ende für die ATP-abhängige Ionenkanalaktivierung von Bedeutung zu sein, denn das Einfügen eines Hexahistidyl-Tags am Anfang der N-terminalen Domäne reduziert die ATP-abhängige Stromantwort deutlich (s. Abb. 3) und verändert zusätzlich die Ionenkanalkinetik dergestalt, dass der Effekt der niedrigaffinen ATP-Bindungsstelle zwar nicht verschwindet, wie bei einer Trunkierung ab Aminosäure 436, dieser jedoch deutlich abgeschwächt wird {Klapperstück, 2001 14026 /id}. Das Ausmaß der Trunkierung beeinflusst die Stromminderung gegenüber dem Vollängen-Rezeptor hP2X7 1-595. So

weisen die „mittleren“ Trunkierungen hP2X7 1-436 und hP2X7 1-505 die größten Stromamplituden auf und werden auch am stärksten durch Coexpression mit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 stimuliert (Abb. 12).

Aus den vorliegenden Untersuchungen kann weiterhin geschlossen werden, dass eine Überlappung von gleichen Proteinabschnitten, wie sie bei der Coexpression von hP2X7 1-583, 1-572, 1-549, 1-505 und 1-436 mit der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 vorkommt, die Stimulation des ATP-abhängigen Stromes nicht wesentlich beeinflusst.

Dagegen sind für die stimulierende Eigenschaft die Aminosäuren 440-535 der C-terminalen Domäne von Bedeutung, da die kurze C-terminale Domäne hP2X7 536-595 zwar noch eine Erhöhung der Stromamplitude des trunkierten hP2X7-Rezeptors (hP2X7 1-436) bewirkt (die allerdings deutlich geringer ausfällt als bei der Coexpression der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595), aber die Kanalkinetik des trunkierten Rezeptors kaum noch beeinflusst (Abb. 4 und 6).

Noch wichtiger für eine Stimulation des trunkierten Rezeptors durch die C-terminale Domäne hP2X7 435-595 scheinen die Aminosäuren 409-434 zu sein. Diese fehlen nämlich bei der Kombination des trunkierten Rezeptors hP2X7 1-408 und der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595, bei der keine stimulatorische Wirkung festgestellt werden konnte (Abb. 12). Neue Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Prof. Schmalzing deuten inzwischen darauf hin, dass die unterschiedlichen Trunkierungen die Zellmembranexpression nicht vermindern, d.h. die Trunkierungen und die Coexpression also vorrangig die Einzelkanaleigenschaften beeinflussen (s.o., G. Schmalzing, persönliche Mitteilung und {Becker, 2008 18819 /id}).

Der Einfluss einer zunehmenden Verkürzung des hP2X7-Rezeptors vom C-terminalen Ende aus auf die Expression des Rezeptors ist auch am Ratten-Homolog (rP2X7) untersucht worden. Es wurden hier Verkürzungen ab Aminosäure 361 bis Aminosäure 582 analysiert {Smart, 2003 15463 /id}. Dabei wurde nicht nur der Einfluss auf die Ionenströme von in *Xenopus*-Oozyten exprimierten rP2X7-Rezeptoren, sondern auch auf die Agonisten-induzierte Ethidium⁺-Aufnahme, ein Maß für die Porenbildung, sowie die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in rP2X7-transfizierten HEK-293-Zellen untersucht. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede in der verkürzungsabhängigen Beeinflussung von Ionenstrom und Ca²⁺-Erhöhung einerseits und Porenbildung andererseits. Während die Porenbildung bei Verkürzungen zwischen Aminosäure 361 und 581 ausblieb, waren durch Applikation

von 1 mM ATP deutliche Ionenströme und Ca^{2+} -Erhöhungen für rP2X7-Rezeptoren mit Verkürzungen zwischen den Aminosäuren 380 und 540 auszulösen, jedoch nicht für stärkere oder geringere Deletionen.

Die größten Ströme und Ca^{2+} -Erhöhungen wurden bei den Deletionen zwischen Aminosäure 400 bis 500 gefunden. Bei den von uns untersuchten hP2X7-Rezeptoren traten dagegen die größten Ströme bei den Konstrukten hP2X7 1-505 und hP2X7 1-549 auf. Beim Ratten-Homolog wurden für rP2X7 1-570 und rP2X7 1-580 praktisch keine Expression, Ionenkanalaktivität oder Porenbildung gemessen. Rezeptoren mit den Aminosäuren 1-581 oder länger bildeten diese Eigenschaften dagegen voll aus. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass im Bereich der Aminosäuren 550-580 eine Retentionsdomäne existiert, die eine Rezeptorexpression verhindert, wenn keine zusätzliche Expressionsdomäne im Bereich der Aminosäuren 581-582 existiert, welche die Wirkung der Retentionsdomäne hemmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für den humanen P2X7-Rezeptor jedoch Befunde erhoben, die nicht zu diesem Modell passen. Für den hP2X7 1-572 wurden deutliche, wenn auch kleine Ströme gemessen. Der trunkierte Rezeptor hP2X7 1-583 weist ebenfalls deutliche, wenn auch noch kleinere Ionenstromamplituden auf. Dies deutet auf erhebliche Artunterschiede beim Einfluss der C-terminalen Domäne auf die Kanalkinetik hin, worauf auch schon in anderen Arbeiten hingewiesen wurde {Hibell, 2000 13281 /id; Chessell, 1998 11894 /id; Rassendren, 1997 10407 /id}. Eine ATP-abhängige Porenbildung in *Xenopus*-Oozyten lässt sich allerdings weder durch den Ratten- noch durch den Mensch-P2X7-Rezeptor auslösen {Klapperstück, 2000 13303 /id; Petrou, 1997 10739 /id}.

Die Abhängigkeit der durch hP2X7-Rezeptoren hervorgerufenen Ionenströme von der Konzentration der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 spricht für einen spezifischen Effekt. Mit Hilfe der Coexpression von Vollängen-Rezeptor hP2X7 1-595 bzw. trunkiertem Rezeptor (hP2X7 1-436) mit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 (Abb. 10 und 11) sollte versucht werden, Hinweise darauf zu bekommen, wie viele C-terminale Domänen notwendig sind, um eine Stimulation des trunkierten Rezeptors zu erhalten. Das verwendete Modell kann aufgrund einiger experimentell nicht gesicherter Annahmen hierzu nur Hinweise geben. Hiernach würde die steile Abhängigkeit der Rezeptorstimulation von der Expression der C-terminalen Domäne für die Notwendigkeit von zwei oder drei C-terminalen Domänen für eine Stimulation der trunkierten Rezeptoren sprechen. Es legt die Vermutung nahe, dass, falls

hP2X7-Rezeptoren wie andere P2X-Rezeptoren aus Trimeren bestehen, alle drei Untereinheiten vollständige C-terminale Domänen besitzen müssen, um einen voll funktionsfähigen Ionenkanal zu bilden.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass nur eine C-terminale Domäne für die Stimulation notwendig ist. Dies würde die in Abb. 10 dargestellten Messungen bei höheren Konzentrationen der cRNA der C-terminale Domäne recht gut erklären. Bei niedrigen Konzentrationen der cRNA für die C-terminale Domäne versagt dieses Modell jedoch. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass bei niedrigen Konzentrationen der C-terminalen Domäne (cRNA-Verhältnis der C-terminalen Domäne/trunkierter Rezeptor < 0,3) nicht mehr alle C-terminale Domänen einen trunkierten Rezeptor „finden“.

Gestützt wird die Hypothese, in der alle Rezeptoruntereinheiten eine C-terminaler Domänen für die volle Funktionsfähigkeit des hP2X7-Rezeptor-Kanals benötigen, durch die Ergebnisse der Versuche der Coexpression der Vollängen- und trunkierten hP2X7-Untereinheiten, die zeigen, dass trunkierte hP2X7-Rezeptor-Untereinheiten einen dominant-negativen Effekt auf die Funktion des Vollängen-hP2X7-Rezeptors ausüben. Dies spricht dafür, dass die C-terminalen Domänen einen unabdingbaren Teil des Ionenkanals darstellen und nicht nur die Expression ionenkanalformender Proteinteile und die Porenbildung fördern.

Diese These wird ebenfalls dadurch unterstrichen, dass trunkierte Rezeptoren nicht nur eine verringerte Ionenstromamplitude, sondern auch eine stark veränderte An- und Abschaltkinetik (Abb. 6) sowie ATP-Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Abb. 7) aufweisen. Einzelkanaluntersuchungen haben außerdem gezeigt, dass eine Trunkierung zum Verschwinden klar messbarer Einzelkanalströme führt. Sattdessen ist nach ATP-Applikation ein vergrößertes Stromrauschen zu messen, dass wahrscheinlich durch das schnellere Schalten von trunkierten P2X7-Ionenkanälen zustande kommt und mit den verfügbaren Messmethoden nicht mehr aufgelöst werden kann. Nach Coexpression der langen C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 treten wieder normale Einzelkanalströme auf {Becker, 2008 18819 /id}. Auch dies spricht für einen funktionellen Effekt der C-terminalen Domäne auf die Ionenkanaltätigkeit.

Die Untersuchungen zur Wechselwirkung der C-terminalen Domäne des hP2X7-Rezeptors mit anderen Vertretern der hP2X-Familie, die keine lange C-terminale Domäne haben, zeigen keine Stimulation dieser Rezeptoren durch die C-terminale Domäne hP2X7 435-595. Dies spricht dafür, dass die C-terminale Domäne zwar auf artfremde trunkierte P2X7-Rezeptoren Einfluss nehmen kann, wie die schon

erwähnte Chimäre aus humanem verkürzten Rezeptor und Ratten-P2X7-C-Terminus zeigte {Rassendren, 1997 10407 /id}, diese Wechselwirkung bleibt allerdings auf den trunkeierten P2X7-Rezeptor beschränkt (Abb. 13 und 14).

Auf welche Weise die C-terminale Domäne hP2X7 435-595 mit dem trunkeierten hP2X7 1-436 Rezeptor wechselwirkt bleibt noch offen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die C-terminale Domäne nicht nur sehr eng mit der Porenbildung durch den P2X7-Rezeptor verknüpft ist, sondern auch die Kanalkinetik stark beeinflusst.

Dies spricht dafür, dass die C-terminale Domäne nicht als cytoplasmatisches „Anhängsel“ des P2X7-Rezeptors aufgefasst werden kann, sondern dass dieser Proteinteil eng mit den Ionenkanalporen- und Aktivierungstor-bildenden Teilen des P2X7-Rezeptors, die wahrscheinlich in Membrannähe liegen, assoziiert ist.

Ein weiterer Hinweis auf eine enge räumliche Assoziation von trunkeiertem hP2X7-Rezeptor und C-terminaler Domäne bildet deren mögliche Membraninsertionssequenz (Aminosäuren 510-530) {North, 2002 15192 /id; Denlinger, 2001 14636 /id}. Für eine Interaktion möglicher lipophiler Anteile der C-terminalen Domäne mit der Zellmembran spricht, dass bei Coexpression mit dem trunkeierten Rezeptor hP2X7 1-436 bereits relativ geringe Mengen an cRNA der C-terminalen Domäne einen stimulatorischen Einfluss auf die hP2X7-abhängige Stromantwort auslösen (Abb. 10). Dies weist darauf hin, dass die isolierte C-terminale Domäne Zellmembran-assoziiert und nicht als zytosolisches Protein exprimiert wird. Dies könnte bedeuten, dass bereits die isolierte C-terminale Domäne mittels lipophiler Anteile in die Zellmembran verankert wird. Untersuchungen der subzellulären Expressionslokalisation mittels fluoreszenzmarkierter C-terminaler Domänen und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie könnte hierüber weiteren Aufschluss geben.

Die Erforschung der trunkeierten Rezeptoren ist nicht nur von biophysikalischem Interesse. Es wurde bereits eine native Spleißvariante des hP2X7-Rezeptors entdeckt, die eine Verkürzung um 248 AS vom carboxyterminalen Ende aus aufweist und mit dem Volllängen-Rezeptor coexprimiert wird. Die coexprimierten hP2X7-Spleißvarianten, konnten einen Ca^{2+} -getragenen Einwärtsstrom generieren. Eine quantitative Messung der Membranexpression wurde jedoch in dieser Studie nicht durchgeführt {Cheewatrakoolpong, 2005 16708 /id}. An Hand unserer Arbeit könnte dies so interpretiert werden, dass die durch Mutation entstanden Spleißvariante durch Heterotrimerisation mit dem Volllängen-Rezeptor dessen Funktion hemmt.

6 Zusammenfassung

1. Der P2X7-Rezeptor (P2X7) ist ein ATP-abhängiger Kationenkanal, der vor allem von Zellen des Immunsystems exprimiert wird und dort immun- und entzündungsmodulatorische Funktionen hat. Das Protein umfasst 595 Aminosäuren mit denen es zweimal die Zellmembran durchquert. Die ATP-Bindungsstellen liegen extrazellulär. Das Hauptunterscheidungsmerkmal zu anderen Vertretern seiner Familie stellt die für P2X7-Rezeptoren typische lange intrazellulär gelegene C-terminale Domäne (AS 358-595) dar. Sie ist für verschiedene Funktionen des P2X7-Rezeptors bedeutsam, so zum Beispiel für die Größe des durch ATP auszulösenden Stromes, für die Rezeptorkinetik sowie für die Ausbildung der Porenfunktion bei langandauernder ATP-Applikation.
2. Es wurde die Bedeutung der C-terminalen Domäne des humanen P2X7-Rezeptors (hP2X7) für die funktionelle Expression und die Kinetik der P2X-Ionenkanalaktivierung und -deaktivierung untersucht.
3. Hierzu wurden verschiedene C-terminal trunke hP2X7-Rezeptoren und C-terminale Domänen in *Xenopus*-Oozyten coexprimiert und ihre Funktion mittels schneller ATP-Applikation analysiert. Die Strommessung erfolgte mittels 2-Mikroelektroden-Spannungsklammertechnik.
4. Eine Verkürzung des hP2X7-Rezeptorproteins im Bereich der Aminosäuren 408-583 führt im Vergleich zum Vollängen-Rezeptor hP2X7 1-595 zu einer deutlichen Stromverringerng. Dabei führen Verkürzungen ab Aminosäure 549 oder 505 noch zu den größten ATP abhängigen Strömen.
5. Alle untersuchten Verkürzungen führen nicht nur zu einer kleinen ATP-abhängigen Stromantwort, sondern auch zu einer veränderten Ionenkanalkinetik. Im Vergleich zum Vollängen-hP2X7-Rezeptor verschwindet bei der Aktivierung des trunke Receptors hP2X7 1-436 eine zeitabhängig linear zunehmende und bei der Deaktivierung eine exponentiell abnehmende Stromkomponente.

6. Die ATP-Konzentrations-Wirkungsbeziehung des Volllängen-hP2X7-Rezeptors wird am besten durch die Summe zweier Hill-Funktionen beschrieben. Zur Beschreibung der ATP-Konzentrations-Wirkungsbeziehung des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors ist eine einfache Hill-Funktion ausreichend. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass der Volllängen-hP2X7-Rezeptor zwei funktionell verschiedene, d.h. hoch- und niedrigaffine Aktivierungsstellen besitzt, an denen sich ATP anlagern kann. Durch die Trunkierung wird die Wirkung der niedrigaffinen funktionellen ATP-Bindungsstelle aufgehoben.
7. Die Coexprimierung des trunkierten hP2X7-Rezeptors hP2X7 1-436 und einer C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 führt zur vollständigen Wiederherstellung von Stromamplitude und Ionenkanalkinetik sowie ATP-Konzentrationsabhängigkeit in der Art des Volllängen-Rezeptors hP2X7 1-595.
8. Der stimulatorische Effekt der C-terminalen Domäne ist von der Konzentration der injizierten c-RNA abhängig, wird jedoch vom injizierten Volumen nicht beeinflusst, was für einen spezifischen Effekt der C-terminalen Domäne spricht.
9. Die Messergebnisse von Coexprimierungen des trunkierten hP2X7-Rezeptors mit der C-terminalen Domäne oder dem Volllängen-Rezeptor weisen auf eine Struktur von hP2X7-Rezeptoren aus drei Untereinheiten hin, bei denen bereits eine trunkierte Untereinheit eine erhebliche Funktionsbeeinträchtigung des Ionenkanals bewirkt.
10. Die C-terminale Domäne hP2X7 435-595 stimuliert auch die funktionelle Aktivierung von Proteinen mit einer geringeren Verkürzung als der hP2X7 1-436-Rezeptor, nicht jedoch den stärker verkürzten hP2X7 1-408-Rezeptor. Dies lässt darauf schließen, dass die Aminosäuren 409-434 wesentlich für die Interaktion des verkürzten Rezeptors und der C-terminalen Domäne sind. Überlappende Anteile von verkürztem Rezeptor und C-terminaler Domäne verhindern den stimulatorischen Effekt der C-terminalen Domäne jedoch nicht.

11. Eine kürzere C-terminale Domäne hP2X7 536-595 stimuliert zwar noch in geringem Maße den ATP-abhängigen Strom des verkürzten Rezeptors hP2X7 1-436, stellt aber die Ionenkanalkinetik des Volllängen-Rezeptors nicht vollständig wieder her. Demzufolge sind auch die Aminosäuren 437-535 für die Ionenkanalkinetik von entscheidender Bedeutung.
12. hP2X1, hP2X2, hP2X3 und hP2X4-Rezeptoren mit natürlicherweise kürzerer C-terminaler Domäne werden durch die C-terminale Domäne des hP2X7-Rezeptors nicht beeinflusst. Dies spricht für eine spezifische Wechselwirkung der C-terminalen Domäne mit dem trunkierten hP2X7 Rezeptor.
13. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die C-terminale Domäne des hP2X7-Rezeptors nicht nur sehr eng mit der Porenbildung durch den P2X7-Rezeptor verknüpft ist, sondern auch die Kanalkinetik stark beeinflusst. Dies spricht dafür, dass die C-terminale Domäne nicht als cytoplasmatisches „Anhängsel“ des P2X7-Rezeptors aufgefasst werden kann, sondern dass dieser Proteinteil eng mit den Ionenkanalporen- und Aktivierungstor-bildenden Teilen des P2X7-Rezeptors assoziiert ist. Andererseits kann die Proteinfaltung des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors und seiner C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 getrennt erfolgen, was gegen eine intensive räumliche Verflechtung beider Proteinteile spricht.
14. Die Funktion der C-terminalen Domäne kann als die einer P2X7-gekoppelten Ionenkanalmodulierenden Untereinheit aufgefasst werden. Solche modulierenden Untereinheiten sind auch für andere Ionenkanäle bekannt.

7 Literaturverzeichnis

1. Abbracchio, M. P. and G. Burnstock. "Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors?" Pharmacol. Ther. 64 (1994): 445-75.
2. Aga, M. et al. "Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF-kB signaling pathways in murine RAW 264.7 macrophages." American Journal of Physiology 286.4 (2004): C923-C930.
3. Barnard, E. A., G. Burnstock, and T. E. Webb. "G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides - a new receptor family." Trends in Pharmacological Sciences 15.3 (1994): 67-70.
4. Bean, B. P. "Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels." Trends in Pharmacological Sciences 13.3 (1992): 87-90.
5. Becker, D. et al. "The P2X₇ carboxyl tail is a regulatory module of P2X₇ receptor channel activity." Journal of Biological Chemistry (2008).
6. Berne, R. M. "Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow." American Journal of Physiology 204 (1963): H317-H322.
7. Boyd, I. A. and T. Forrester. "The release of adenosine triphosphate from frog skeletal muscle in vitro." Journal of Physiology (London) 199 (1968): 115-35.
8. Boyer, J. L., G. L. Waldo, and T. K. Harden. "bg-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C." Journal of Biological Chemistry 267.35 (1992): 25451-56.
9. Brake, A. J., M. J. Wagenbach, and D. Julius. "New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor." Nature (London) 371.6497 (1994): 519-23.
10. Brändle, U. et al. "Desensitization of the P2X₂ receptor controlled by alternative splicing." FEBS Letters 404.2 (1997): 294-98.
11. Bretschneider, F. and F. Markwardt. "Drug-dependent ion channel gating by application of concentration jumps using U-tube technique." Methods in Enzymology 294 (1999): 180-89.
12. Buell, G., G. Collo, and F. Rassendren. "P2X receptors: An emerging channel family." European Journal of Neuroscience 8.10 (1996): 2221-28.

13. Buell, G. et al. "An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain." EMBO Journal 15.1 (1996): 55-62.
14. Buell, G. et al. "P2X₁ receptor activation in HL60 cells." Blood 87.7 (1996): 2659-64.
15. Burnstock, G. "Purinergetic nerves." Pharmacological Reviews 24 (1972): 509-81.
16. Burnstock, G. "A Basis for Distinguishing Two Types of Purinergetic Receptor." Ed. L. Bolis and R. W. Straub. Raven Press ed. New York: 1978. 107-18.
17. Busch, A. E. and H. Suessbrich. "Role of the I_{SK} protein in the I_{minK} channel complex." Trends in Pharmacological Sciences 18.1 (1997): 26-29.
18. Cario-Toumaniantz, C. et al. "Non-genomic inhibition of human P2X₇ purinoceptor by 17 b-oestradiol." Journal of Physiology (London) 508.3 (1998): 659-66.
19. Cheewatrakoolpong, B. et al. "Identification and characterization of splice variants of the human P2X₇ ATP channel." Biochemical and Biophysical Research Communication 332.1 (2005): 17-27.
20. Chen, C. C. et al. "A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons." Nature (London) 377.6548 (1995): 428-31.
21. Chessell, I. P. et al. "Dynamics of P2X₇ receptor pore dilation: Pharmacological and functional consequences." Drug Development Research 53.2-3 (2001): 60-65.
22. Chessell, I. P. et al. "Cloning and functional characterisation of the mouse P2X₇ receptor." FEBS Letters 439.1 (1998): 26-30.
23. Chiozzi, P. et al. "Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X₇ receptor." J.Cell Biol. 138.3 (1997): 697-706.
24. Cloues, R., S. Jones, and D. A. Brown. "Zn²⁺ potentiates ATP-activated currents in rat sympathetic neurons." Pflügers Archiv 424.2 (1993): 152-58.
25. Cockcroft, S. and B. D. Gomperts. "The ATP⁴⁻ receptor of rat mast cells." Biochemical Journal 188.3 (1980): 789-98.

26. Cook, S. P., K. D. Rodland, and E. W. McCleskey. "A memory for extracellular Ca^{2+} by speeding recovery of P2X receptors from desensitization." Journal of Neuroscience 18.22 (1998): 9238-44.
27. Denlinger, L. C. et al. "The nucleotide receptor P2X₇ contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide." Journal of Immunology 167.4 (2001): 1871-76.
28. Di Virgilio, F. "The P2Z purinoceptor: An intriguing role in immunity, inflammation and cell death." Immunology Today 16.11 (1995): 524-28.
29. Ding, S. and F. Sachs. "Ion permeation and block of P2X₂ purinoceptors: single channel recordings." J.Membr.Biol. 172.3 (1999): 215-23.
30. Ding, S. H. and F. Sachs. "Single channel properties of P2X₂ purinoceptors." Journal of General Physiology 113.5 (1999): 695-719.
31. Dubyak, G. R. and C. El-Moatassim. "Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides." American Journal of Physiology 265.31 (1993): 577-606.
32. Dworetzky, S. I. et al. "Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlob subunit coexpression: Changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation." Journal of Neuroscience 16.15 (1996): 4543-50.
33. Evans, R. J. et al. "Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors)." Molecular Pharmacology 48.2 (1995): 178-83.
34. Evans, R. J. et al. "Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells." Journal of Physiology (London) 497.2 (1996): 413-22.
35. Ferrari, D. et al. "Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages." Journal of Immunology 159.3 (1997): 1451-58.
36. Forrester, T. and A. R. Lind. "Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during and after sustained contractions." Journal of Physiology (London) 204 (1969): 347-64.

37. Garcia-Guzman, M. et al. "Characterization of recombinant human P2X₄ receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue." Molecular Pharmacology 51.1 (1997): 109-18.
38. Garcia-Guzman, M. et al. "Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor." FEBS Letters 388.2 (1996): 123-27.
39. Gargett, C. E. and J. S. Wiley. "The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes." British Journal of Pharmacology 120.8 (1997): 1483-90.
40. Gerlach, E., B. Deuticke, and R. H. Dreisbach. "Der Nukleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Coronardurchblutung." Naturwissenschaften 50 (1963): 228-29.
41. Gillespie, J. H. "The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid." Journal of Physiology (London) 80 (1934): 345-49.
42. Gloor, S., O. Pongs, and G. Schmalzing. "A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in *Xenopus laevis* oocytes." Gene 160.2 (1995): 213-17.
43. Guo, C. et al. "Evidence for functional P2X₄/P2X₇ heteromeric receptors." Molecular Pharmacology 72.6 (2007): 1447-56.
44. Gurnett, C. A. and K. P. Campbell. "Transmembrane auxiliary subunits of voltage-dependent ion channels." Journal of Biological Chemistry 271.45 (1996): 27975-78.
45. Hibell, A. D. et al. "Apparent species differences in the kinetic properties of P2X₇ receptors." British Journal of Pharmacology 130.1 (2000): 167-73.
46. Holton, F. A. and P. Holton. "The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings." Journal of Physiology (London) 119 (1953): 50P-1P.
47. Holton, P. "The liberation of ATP on antidromic stimulation of sensory nerves." Journal of Physiology (London) 145 (1959): 494-504.
48. Hülsmann, M. et al. "NF449, a novel picomolar potency antagonist at human P2X₁ receptors." European Journal of Pharmacology 470.1-2 (2003): 1-7.

49. Jacobson, K. A., B. F. King, and G. Burnstock. "Pharmacological characterization of P2 (nucleotide) receptors." Celltransmissions 16.3 (2000): 3-16.
50. Jiang, L. H. et al. "Subunit arrangement in P2X receptors." Journal of Neuroscience 23.26 (2003): 8903-10.
51. Jiang, L. H. et al. "Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X₇ receptors." Molecular Pharmacology 58.1 (2000): 82-88.
52. Khakh, B. S. et al. "Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds." Nature Neuroscience 2.4 (1999): 322-50.
53. Khakh, B. S. et al. "Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds." Nature Neuroscience 2.4 (1999): 322-30.
54. Kim, M. et al. "Differential assembly of rat purinergic P2X₇ receptor in immune cells of the brain and periphery." Journal of Biological Chemistry 276.26 (2001): 23262-67.
55. King, B. F. and A. Townsend-Nicholson. "Nucleotide and nucleoside receptors." Toctris Reviews 23 (2003): 1-11.
56. Klapperstück, M. et al. "Characteristics of P2X₇ receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes." Biochimica et Biophysica Acta 1467.2 (2000): 444-56.
57. Klapperstück, M. et al. "Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X₁ and P2X₇ receptors." European Journal of Pharmacology 387.3 (2000): 245-52.
58. Klapperstück, M. et al. "Human B lymphocytes express P2X₁, P2X₄ and P2X₇ purinoceptors." Biophysical Journal 76 (1999): A338.
59. Klapperstück, M. et al. "Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X₇ receptor." Journal of Physiology (London) 534.1 (2001): 25-35.
60. Klapperstück, M., G. Schmalzing, and F. Markwardt. "Characteristics of binding sites for ATP⁴⁻ at the human P2X₇ receptor." Drug Development Research 53.2-3 (2001): 77-82.

61. Lewis, C. et al. "Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons." Nature (London) 377.6548 (1995): 432-35.
62. Lory, P., G. Varadi, and A. Schwartz. "The b subunit controls the gating and dihydropyridine sensitivity of the skeletal muscle Ca²⁺ channel." Biophysical Journal 63.5 (1992): 1421-24.
63. Markwardt, F. et al. "Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes." Journal of Physiology (London) 498.1 (1997): 143-51.
64. Newbolt, A. et al. "Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor)." Journal of Biological Chemistry 273.24 (1998): 15177-82.
65. Nicke, A. et al. "P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: A novel structural motif of ligand-gated ion channels." EMBO Journal 17.11 (1998): 3016-28.
66. Nix, M. and W. Stoffel. "Perturbation of membrane microdomains reduces mitogenic signaling and increases susceptibility to apoptosis after T cell receptor stimulation." Cell Death Differentiation 7.5 (2000): 413-24.
67. North, R. A. "Molecular physiology of P2X receptors." Physiological Reviews 82.4 (2002): 1013-67.
68. Pannicke, T. et al. "P2X₇ receptors in Müller glial cells from the human retina." Journal of Neuroscience 20.16 (2000): 5965-72.
69. Petrou, S. et al. "P2X₇ purinoceptor expression in Xenopus oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype." FEBS Letters 411.2 (1997): 339-45.
70. Ralevic, V. and G. Burnstock. "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacological Reviews 50.3 (1998): 413-92.
71. Rassendren, F. et al. "The permeabilizing ATP receptor, P2X₇ - Cloning and expression of a human cDNA." Journal of Biological Chemistry 272.9 (1997): 5482-86.
72. Riedel, T. et al. "Kinetics of P2X₇ receptor-operated single channels currents." Biophysical Journal 92.7 (2007): 2377-91.
73. Riedel, T., G. Schmalzing, and F. Markwardt. "Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X₇ receptor-

- operated single channels currents." Biophysical Journal 93.3 (2007): 846-58.
74. Romagnoli, R. et al. "The P2X₇ receptor as a therapeutic target." Expert Opin.Ther.Targets 12.5 (2008): 647-61.
75. Sattin, A. and T. W. Rall. "The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate content of guinea pig cerebral cortex slices." Molecular Pharmacology 6 (1970): 13-23.
76. Seguela, P. et al. "A novel neuronal P2X ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain." Journal of Neuroscience 16.2 (1996): 448-55.
77. Seyffert, C., G. Schmalzing, and F. Markwardt. "Dissecting individual current components of co-expressed human P2X₁ and P2X₇ receptors." Curr.Top.Med Chem. 4.16 (2004): 1719-30.
78. Simon, J. et al. "Localization and functional expression of splice variants of the P2X₂ receptor." Molecular Pharmacology 52.2 (1997): 237-48.
79. Smart, M. L. et al. "P2X₇ receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region." Journal of Biological Chemistry 278.10 (2003): 8853-60.
80. Solini, A. et al. "Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X₇ receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release." J.Cell Sci. 112.3 (1999): 297-305.
81. Stoop, R. et al. "Contribution of individual subunits to the multimeric P2X₂ receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C." Molecular Pharmacology 56 (1999): 973-81.
82. Surprenant, A. et al. "The cytolytic P_{2Z} receptor for extracellular ATP identified as a P_{2X} receptor (P2X₇)." Science 272 (1996): 735-38.
83. Tatham, P. E. R. and M. Lindau. "ATP-induced pore formation in the plasma membrane of rat peritoneal mast cells." Journal of General Physiology 95 (1990): 459-76.
84. Torres, G. E., T. M. Egan, and M. M. Voigt. "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits - Specificities exist with regard to possible partners." Journal of Biological Chemistry 274.10 (1999): 6653-59.

85. Valera, S. et al. "A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP." Nature (London) 371.6497 (1994): 516-19.
86. Virginio, C. et al. "Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor." Neuropharmacology 36.9 (1997): 1285-94.
87. Virginio, C. et al. "Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X₇ receptor." Journal of Physiology (London) 519 (1999): 335-46.
88. Virginio, C. et al. "Pore dilation of neuronal P2X receptor channels." Nature Neuroscience 2.4 (1999): 315-21.
89. Virginio, C., R. A. North, and A. Surprenant. "Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X₂ and P2X₃ receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones." Journal of Physiology (London) 510.1 (1998): 27-35.
90. Weber, W. M. et al. "Influence of extracellular Ca²⁺ on endogenous Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes." Pflügers Archiv 429.6 (1995): 820-24.
91. Werner, P. et al. "Domains of P2X receptors involved in desensitization." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93.26 (1996): 15485-90.
92. Wiley, J. S., R. Chen, and G. P. Jamieson. "The ATP⁴⁻ receptor-operated channel (P₂Z class) of human lymphocytes allows Ba²⁺ and ethidium⁺ uptake: inhibition of fluxes by suramin." Archives of Biochemistry and Biophysics 305.1 (1993): 54-60.
93. Wilkinson, W. J. et al. "Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X_{2/3} receptor." Molecular Pharmacology 70.4 (2006): 1159-63.
94. Wilson, H. L. et al. "Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X₇ receptor C terminus." Journal of Biological Chemistry 277.37 (2002): 34017-23.

8 Thesen

1. Purinerge P2X7-Rezeptoren stellen ligandengesteuerte Ionenkanäle dar, die durch extrazelluläres ATP aktiviert und von einer Vielzahl nativer Zellen, vor allem aber Zellen des Immunsystems, exprimiert werden. Aus ihrer Primärstruktur (595 Aminosäuren (AS)) wird gefolgert, dass sich sowohl das N- als auch das C-terminale Ende der P2X7-Untereinheit intrazellulär befindet. Das Protein durchquert zweimal die Zellmembran wobei die ATP-Bindung extrazellulär zwischen den beiden transmembranären Domänen (AS 26-46 und AS 333-356) erfolgt. Das Verhalten des Rezeptors gegenüber ATP-Applikation ist hierbei von der Existenz der für P2X7-Rezeptoren typischen langen C-terminalen Domäne (AS 358-595) abhängig.
2. Es wurde die Bedeutung der C-terminalen Domäne des humanen P2X7-Rezeptors (hP2X7) für die funktionelle Expression und die Kinetik der P2X-Ionenkanalaktivierung und -deaktivierung untersucht.
3. Hierzu wurden verschiedene C-terminal trunkierte hP2X7-Rezeptoren und C-terminale Domänen (hP2X7 435-595) in *Xenopus*-Oozyten coexprimiert und ihre Funktion mittels schneller ATP-Applikation analysiert. Die Strommessung erfolgt mittels 2-Mikroelektroden-Spannungsklammertechnik.
4. Nach Expression eines trunkierten Kanalproteins mit fehlender C-terminaler Domäne (hP2X7 1-436) wird nach Stimulation mit dem nativen Agonisten ATP ein funktioneller Verlust der niedrigaffinen Bindungsstelle für ATP mit Veränderung der Ionenkanal- und -abschaltkinetik deutlich.
5. Für die Modulierung der ATP-induzierten Rezeptorantwort ist nicht nur die C-terminale Domäne von entscheidender Bedeutung sondern auch das N-terminale Ende. Das Einfügen eines Hexahistidyl-Markers am N-terminalen Ende des Proteins hat eine deutliche Verkleinerung des Ionenkanalstromes zur Folge.

6. Bei detaillierter Untersuchung des ATP-vermittelten Ionenstromes nach Coexpression eines trunkierten hP2X7-Rezeptors (AS 1-436) sowie deren zugehöriger C-terminaler Domäne (AS 435-595) ergeben sich Werte, die vom Vollängen-Rezeptor nicht zu unterscheiden sind. Wird die Trunkierung kürzer gewählt, so dass sich eine vermehrte Überlappung mit der C-terminalen Domäne ergibt, so erfolgt bei Coexpression mit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 ebenfalls eine Stimulierung des ATP-abhängigen Stromes. Der stärker trunkierte hP2X7-Rezeptor (hP2X7 1-408) erfährt durch Coexpression mit der C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 keine verstärkte Aktivierung. Dies weist auf eine entscheidende Bedeutung der AS 409-434 für die Funktion des hP2X7-Rezeptors hin.
7. Eine kürzere C-terminale Domäne (hP2X7 537-595), welche den trunkierten hP2X7-Rezeptor (hP2X7 1-436) nicht vollständig komplementiert, stimuliert zwar noch in geringem Maße den ATP abhängigen Strom des verkürzten hP2X7 1-436 Rezeptors, stellt aber nicht die Ionenkanalkinetik des Vollängen-Rezeptors her. Demzufolge sind auch die AS 437-536 für die Ionenkanalkinetik von entscheidender Bedeutung
8. Wird vorausgesetzt, dass der hP2X7-Rezeptor ebenso wie andere Mitglieder seiner Familie Trimere aus identischen Untereinheiten bildet um einen funktionstüchtigen Kanal zu generieren, dann weisen Coexpressionen von trunkiertem Rezeptor und Vollängen-Rezeptor bzw. C-terminaler Domäne darauf hin, dass alle drei Rezeptoruntereinheiten eine C-terminale Domäne benötigen, um eine dem Vollängen-Rezeptor adäquate ATP-Reaktion zu zeigen.
9. Die C-terminale Domäne des hP2X7-Rezeptors kann die ATP-induzierte Stromantwort anderer Vertreter der P2X-Rezeptorfamilie, die keine lange C-terminale Domäne aufweisen, nicht beeinflussen.

10. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die C-terminale Domäne des hP2X7-Rezeptors nicht nur sehr eng mit der Porenbildung durch den hP2X7-Rezeptor verknüpft ist, sondern auch die Kanalkinetik stark beeinflusst. Dies spricht dafür, dass die C-terminale Domäne nicht als cytoplasmatisches „Anhängsel“ des P2X7-Rezeptors aufgefasst werden kann, sondern dass dieser Proteinteil eng mit den Ionenkanalkinetik-bestimmenden, Poren- und Aktivierungstor-bildenden Teilen des P2X7-Rezeptors assoziiert ist. Andererseits kann die Proteinfaltung des trunkierten hP2X7 1-436 Rezeptors und seiner C-terminalen Domäne hP2X7 435-595 getrennt erfolgen, was gegen eine intensive räumliche Verflechtung beider Proteinteile spricht.

11. Die Funktion der C-terminalen Domäne kann als die einer hP2X7-gekoppelten ionenkanalmodulierenden Untereinheit aufgefasst werden. Solche modulierenden Untereinheiten sind auch für andere Ionenkanäle bekannt.

9 Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung der Arbeit habe ich keine fremden Unterstützungsleistungen erhalten. Keine weiteren Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar Geldwerte für Leistungen erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde als Dissertation vorgelegt.“

Daniel Becker

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu aller erst bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. F. Markwardt. Sein beständiges Interesse, seine Motivationsfähigkeit mir gegenüber und seine Diskussionsfreudigkeit haben diese Arbeit entscheidend geprägt. Ich konnte von ihm während der letzten Jahre viel lernen. Nicht nur seine fachlichen Beiträge, sondern auch seine Fähigkeit auf nicht fachliche Belange einzugehen, geleiteten mich durch die Höhen und Tiefen des Laboralltages. Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. F. Markwardt, die mir stets mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Durch viele Tricks und Kniffe aus dem Fundus ihrer langjährigen Berufs- und Laborerfahrung konnten zahlreiche Probleme gelöst werden.

Nicht unerwähnt darf die Hilfe der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. G. Schmalzing bleiben, der bei der Erörterung molekularbiologischer Probleme mir eine große Hilfe war. Des Weiteren möchte ich meinen Eltern danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Eine Großzahl von Problemen konnte mit ihrer Hilfe in zahlreichen Stunden der Diskussion geklärt werden.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die für meine ab und an aufgetretenen Missmutsäußerungen stets ein offenes Ohr hatten und mit denen ich über Aufbau und Struktur dieser Arbeit viel diskutieren durfte.

Abschließend sei den vielen Unerwähnten gedankt, die mir zwar kleine, aber nicht weniger wichtige Dienste geleistet haben.

11 Publikationen

1. Role of the C-terminal domain in the function of human P2X₇ receptors.
D Becker, G Schmalzing and F Markwardt
Acta Physiol. 186 S1 (2006), 129 (A)
(87. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft zusammen mit der Federation of European Physiological Societies, München, 26. - 29.3.2006)

2. The carboxyl tail of the P2X₇ receptor is a regulatory module of its ion channel activity
D. Becker, R. Woltersdorf, W. Boldt, S. Schmitz, U. Braam, G. Schmalzing and F. Markwardt
Acta Physiol. 192 (2008), S 663, 185 (A)
(89. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft , Köln, 2. - 5.3.2008)

3. The carboxyl tail of the P2X₇ receptor is a regulatory module of its ion channel activity - Electrophysiological evidence
D Becker, R Woltersdorf, G Schmalzing and F Markwardt
Purinergic Signal. 2 (2008) S1, 112 (A)
(Meeting Purines 2008, Kopenhagen, Dänemark, 29.6. - 2.7.2008)

4. The P2X₇ carboxyl tail is a regulatory module of P2X₇ receptor channel activity
D. Becker, R. Woltersdorf, W. Boldt, S. Schmitz, U. Braam, G. Schmalzing and F. Markwardt
J. Biol. Chem. (2008), <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M803855200>

- 3 Poster (incl. Abstracts (A) auf Nationalen und Internationalen Kongressen sowie eine Originalarbeit in Peer-reviewed Journal als Erstautor:

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

- Geboren am 10.10.1980
- Geburtsort: Halle an der Saale
- Staatsangehörigkeit: Deutsch
- Familienstand: ledig

Schulbildung

- 1987 – 1990 Besuch der Grundschule in Dessau
- 1990 – 1999 Besuch des Fürst-Franz-Gymnasiums Dessau

Bundeswehr

- 1999 Eintritt in die Bundeswehr, Sanitätsregiment Hildesheim
- 2000 Übernahme in die Offizierslauf des Sanitätsdienstes,
Absolvierung der Offiziersprüfung,
- 2002 Beförderung zum Leutnant
- 2006 Beförderung zum Stabsarzt
Bundeswehrkrankenhaus Hamburg
Abt. Orthopädie/Unfallchirurgie
- 2007 Bundeswehrkrankenhaus Hamburg,
Abt. Anästhesie

Universitäre Ausbildung

- 2000 Beginn des Medizinstudiums an der
Martin-Luther-Universität
- 2001 Pflegepraktikum im Bundeswehrkrankenhaus Leipzig,
chirurgische Abteilung II
- 2002 Beständenes Physikum
- 2003 Beständenes erstes Staatsexamen,
Famulatur im Bundeswehrkrankenhaus Berlin/Charité,
Abteilung Radiologie,
Famulatur im Bundeswehrkrankenhaus Leipzig,
Abteilung Chirurgie

- 2004 Famulatur im Bundeswehrkrankenhaus Koblenz,
Abteilung Orthopädie,
Famulatur Bundeswehrstandort Sigmaringen,
Außenstelle Kuelsheim
- 2005 Bestandenes zweites Staatsexamen
- 2005 – 2006 PJ-Ausbildung
Abt. Allgemeinchirurgie – Uniklinikum Halle
Abt. Radiologie – Uniklinikum Halle
Abt. Innere Medizin – Uniklinikum Halle
(Rheumatologie)
- 2002 – 2008 Arbeit mit Unterbrechung an meiner Promotion