

**Struktur-Funktionsbeziehungen des
humanen P2X7-Rezeptors
Untersuchungen mittels Cysteinmutagenese
und Patch-clamp-Technik**



Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Anja Pippel

geb. am 13.01.1985 in Merseburg

Gutachter

Prof. Dr. Fritz Markwardt

Prof. Dr. Milton Theodor Stubbs

Prof. Dr. Klaus Benndorf

Verteidigt am 11.02.2016

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung	5
1.1 Adenosintriphosphat.....	5
1.2 Die P2X-Rezeptorfamilie	7
1.2.1 Allgemeine Charakteristika.....	7
1.2.2 P2X7R-Rezeptor	13
1.2.3 Struktur-Funktions-Beziehungen.....	19
1.2.4 Vergleich der Expressionssysteme	23
2 Zielsetzung	26
3 Vorversuche.....	27
3.1 Modifizierung der SH-Seitenketten.....	27
3.2 Auswahl der Mutanten.....	28
4 Material und Methoden	31
4.1 Chemikalien.....	31
4.2 Lösungen.....	31
4.2.1 Kollagenase-Lösung.....	31
4.2.2 Narkose-Lösung	31
4.2.3 Aufbewahrungslösungen.....	31
4.2.4 Badlösungen.....	31
4.2.5 Messlösungen	32
4.2.6 Elektrodenlösung.....	32
4.3 Methoden	32
4.3.1 Präparation der <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	32
4.3.2 cRNA-Injektion.....	35
4.3.3 Elektrophysiologie – Ganzzellanalysen.....	35
4.3.4 Versuchsprotokolle	39
4.3.5 cRNA-Konzentration.....	41
4.3.6 Charakterisierung der Ströme	42

4.3.7	Modell der hP2X7R Struktur.....	43
5	Ergebnisse.....	44
5.1	Negativkontrollen.....	44
5.2	Expressionsraten.....	46
5.3	Sensibilisierung bzw. Desensibilisierung der Konstrukte gegenüber ATP.....	49
5.4	Effekt von MTSEA auf Konstrukte im aktivierten Zustand (offene Kanalpore)....	53
5.4.1	Messung ohne Klemmspannungsmodulation	53
5.4.2	Spannungsabhängigkeit des MTSEA-Effekts	60
5.4.3	Größe- und Ladungseinfluss der MTS-Derivate auf den offenen hP2X7R-Kanal ...	62
5.5	Abhängigkeit der MTS-Effekte vom Kanalzustand.....	65
5.6	Effekt des ungeladenen Hydroxy-benzoyl-Methanthiosulfonat	68
6	Diskussion	69
6.1	Das experimentelle Modell.....	69
6.2	Stimulierende Effekte der MTS-Derivate.....	70
6.3	Position des Selektivitätsfilters	74
6.4	Lokalisation des Kanaltors (<i>Gate</i>)	77
6.5	Rolle der Aminosäuren im zytoplasmatischen und extrazellularen Vestibül	79
7	Zusammenfassung	85
8	Ausblick	88
9	Literaturverzeichnis.....	90
10	Anhang.....	CI
10.1	Genutzte Programme	CI
10.2	Abkürzungsverzeichnis	CII
	Curriculum Vitae.....	CVII
	Danksagung	CIX
	Eidesstattliche Erklärung	CX

1 Einleitung

1.1 Adenosintriphosphat

Adenosintriphosphat (ATP) erfüllt im menschlichen Körper eine Reihe von Funktionen. Es dient als Baustein für Nukleinsäuren (RNA und DNA), aufgrund seiner energiereichen Phosphatanhydrid-Bindungen als Energieträger und um Proteine zu phosphorylieren als Cosubstrat für Kinasen. ATP ist, von Wasser abgesehen, in mehr chemische Reaktionen involviert als jedes andere Molekül auf der Erde (Verkhatsky und Burnstock, 2014).

Die Forschungen der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass ATP auch eine essentielle Rolle bei der interzellularen Kommunikation spielt (Verkhatsky und Burnstock, 2014). Seine Funktion als Signalmolekül ist seit 1929 bekannt (Drury und Szent-Györgyi, 1929). Drury und seine Kollegen fanden heraus, dass die intravenöse Gabe eines Herzmuskelextraktes von Meerschweinchen, in andere Tiere dieser Spezies, zu Brachykardie führte. Durch weitere Untersuchungen fanden sie heraus, dass es sich um ein Derivat des Adenosins handeln muss, Adenylsäure. Bei Verabreichung der reinen Substanz in verschiedene Säugetieren stellte sich immer die gleiche Wirkung ein: je nach Menge kam es zu einem Absinken des arteriellen Blutdrucks, der Sinusrhythmus wurde langsamer bis zur vollständigen Herzblockade (Drury und Szent-Györgyi, 1929). Von Gillespie wurde gezeigt, dass Adenosin und seine Verwandten Auswirkungen auf den Blutdruck haben. Je kürzer der Phosphatteil in einem Adenosinderivat, desto stärker war seine blutdrucksenkende Wirkung (Gillespie, 1934). Diese Entdeckung war der Anfang. Weitere Erkenntnisse über Adenosin und seine Derivate wurden gewonnen. Man entdeckte, dass Adenosinderivate und ihre Rezeptoren sich in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers nachweisen lassen. Darm und Uterus reagieren auf Adenosin (Drury und Szent-Györgyi, 1929), im Nervengewebe wurden ATP-Rezeptoren gefunden (Holton und Holton, 1953; Holton, 1959), ebenso im Darmnervensystem (Burnstock, 1972).

Die Derivate des Adenosins sind in den unterschiedlichen Geweben an vielfältigen Körperfunktionen beteiligt und beeinflussen unter anderem die Drüsenaktivität,

Thrombozytenaggregation, Immunantwort, Herz- und Nervensystemtätigkeit, Kontraktion glatter Muskulatur sowie Darmtätigkeit (Ralevic und Burnstock, 1998).

Die Quelle von Adenosin und seinen Abkömmlingen ist potenziell jede Zelle. Jede Zelle besitzt einen Pool an Adenosinderivaten, der sich auf das Zytoplasma und die Organellen verteilt. Über Enzyme können diese in einander umgewandelt und über die Membranen in andere Zellkompartimente oder den Extrazellularraum (EZR) verteilt werden. Verschiedenste Signale vermitteln dabei die Sekretion. So löst die Kontraktion der Skelettmuskulatur die Abgabe von ATP aus (Boyd und Forrester, 1968; Forrester und Lind, 1969). Der Zelltod (Apoptose und Nekrose), Sauerstoffmangel und Zelldeformationen fördern die Freisetzung von Adenosin, ADP (Adenosindiphosphat) und ATP. Auch bei Antigenbindung an Immunzellen wird ATP in den EZR abgegeben (Di Virgilio, 1995; Verkhratsky und Burnstock, 2014).

Die purinerge Signaltransduktion wird durch vier Rezeptorklassen vermittelt: G-Protein-gekoppelt sind P0-oder Ade-Rezeptoren, die auf Adenin reagieren (Thimm et al., 2013); P1- Rezeptoren, die durch Adenosin aktiviert werden, sowie die P2Y-Rezeptoren für verschiedene Nukleotide (ATP, ADP, UTP (Uraciltriphosphat), UDP (Uracildiphosphat), etc.).

Weiterhin gibt es die ionotropen ATP-abhängigen P2X-Rezeptoren. Dies sind Kationenkanäle, die durch ATP aktiviert werden (Ralevic und Burnstock, 1998).

Die Stimulation der meisten Purinorezeptoren löst einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) aus. Dieser Anstieg kommt G-protein-vermittelt über eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum oder durch einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem EZR durch P2X-Rezeptoren zustande. Des Weiteren ist die Aktivierung von Purinorezeptoren noch mit anderen intrazellulären *second messenger* verknüpft, darunter Stickstoffmonoxid (NO). Stickstoffmonoxid trägt zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie dem Peroxynitradikal (ONOO^-) bei, welches bei Reaktionen mit Superoxidanionen entsteht. ROS entstehen bei einer Vielzahl von Reaktionen, darunter jenen der Atmungskette und können unter anderem das Pflanzenwachstum, abiotischen Stress und die Pathogenabwehr regulieren (Verkhratsky und Burnstock, 2014).

1.2 Die P2X-Rezeptorfamilie

1.2.1 Allgemeine Charakteristika

Die P2X-Rezeptorfamilie besteht aus ATP-gesteuerten Kationenkanälen, die selektiv permeabel für Kationen wie Na^+ , K^+ und Ca^{2+} sind und eine kurze Reaktionszeit von unter 20 ms aufweisen (Bean, 1992; Nicke et al., 1998; North, 2002; Riedel et al., 2007b).

Elektrophysikalische Messungen von 1990 zeigten, dass für das Öffnen von P2X-Kanälen in dorsalen Wurzelganglienneuronen (DRG) mindestens drei ATP-Moleküle nötig sind (Bean et al., 1990). Nachfolgende Einzelkanalanalysen des P2X-Rezeptor-Subtyps 2 (P2X2R) unterstützen diese These (Ding und Sachs, 1999).

Die Bindung von ATP in der Extrazellulardomäne der P2X-Rezeptoren bewirkt eine globale Konformationsänderung und führt dadurch zum Öffnen der Kanalpore, durch die Kationen über die Membran transportiert werden können (Baconguis und Gouaux, 2012; Hattori und Gouaux, 2012).

Bisher sind sieben Subtypen bekannt, P2X1R-P2X7R. Ihre Länge variiert von 379 Aminosäuren (AS) beim P2X6R der Ratte bis zu 599 AS beim P2X7R des afrikanischen Elefanten. Die Proteinsequenz ist anhängig von Subtyp und Spezies, die Topologie ist jedoch sehr ähnlich und hat sich während der Evolution kaum geändert (Kaczmarek-Hájek et al., 2012).

Die Rezeptor-Untereinheiten besitzen alle intrazellulär gelegene N- und C-Termini sowie eine große Extrazellulardomäne (EZD), welche die zwei Transmembrandomänen, deren funktionelle Eigenschaften sehr stark konserviert sind (Verkhatsky und Burnstock, 2014), miteinander verbindet. Alle Vertreter weisen in der EZD 10 Cysteine, die fünf typische Cysteinbrücken ausbilden, welche essentiell zur Stabilität und Ausbildung der Tertiärstruktur beitragen (North, 2002). Abbildung 1.1 zeigt beispielhaft eine Untereinheit des humanen P2X7R-Rezeptors (hP2X7R).

Jeder Subtyp verfügt des Weiteren über Konsensussequenzen für die N-Glycosylierung (Asn-X-Ser/Thr), deren Muster sich zwischen den Subtypen und verschiedenen Spezies unterscheiden (Newbolt et al., 1998; North, 2002).

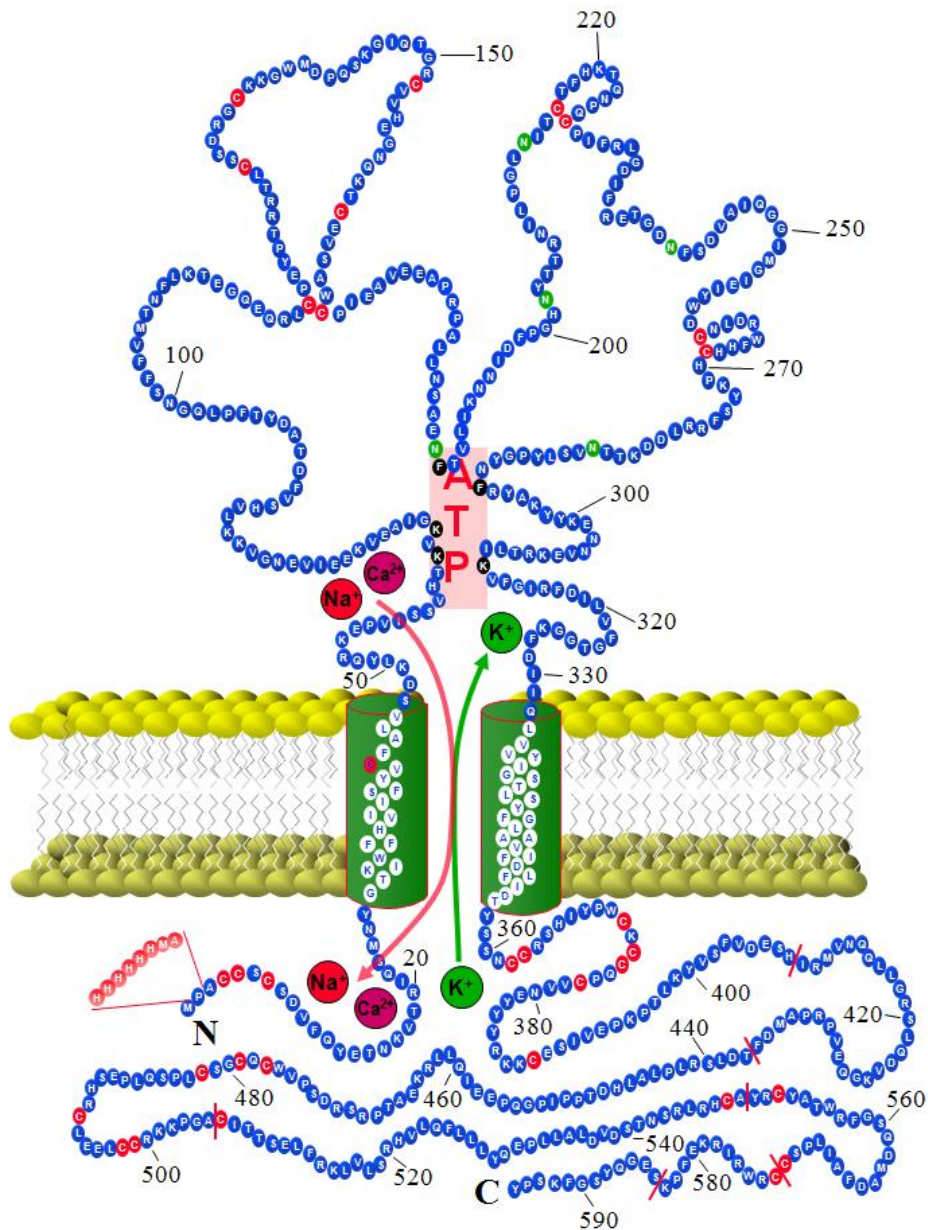


Abb. 1.1: Schematische Topologie eines Monomers des humanen P2X7R.

Darstellung der Aminosäuresequenz und Anordnung einer Untereinheit. Die grünen Zylinder kennzeichnen die Transmembranregionen. Die N- und C-Termini, sowie die ATP-Bindungsstelle sind markiert. Die Präferenz für Kationen und deren Flussrichtung wurden eingezeichnet. Farbcodierung spezieller AS: rot – Cysteine, grün – Asparagine von N-Glycosylierungsstellen, schwarz – für ATP-Bindung relevante Aminosäurereste, rosa – His-Taq.

Die Subtypen weisen untereinander eine Sequenzidentität von 35-54 % auf (Kaczmarek-Hájek et al., 2012), wobei sich die höchste Übereinstimmung bei den Transmembrandomänen und der Extrazellulardomäne zeigt. Die größte Varianz

besteht im C-terminalen Teil. Die C-Termini unterscheiden sich in ihrer Länge, die zwischen 26 AS beim P2X6R und 239 AS beim P2X7R variiert (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). Auf Grund seiner Länge weist der P2X7R die höchsten funktionellen Unterschiede zu den Subtypen P2X1R-P2X6R auf (North, 2002).

Die postulierte Quartärstruktur der trimeren Membranproteine der P2X-Rezeptorfamilie konnte 2009 von Kawate und Kollegen mittels Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden (Kawate et al., 2009). In Abbildung 1.2 ist ein Modell vom hP2X7R dargestellt. Die Sequenz des Rezeptors wurde in die Strukturdaten des verkürzten P2X4R vom Zebrafisch (wie von Kawate *et al.* veröffentlicht) hineingerechnet (s. Abschnitt 4.3.7). In Abbildung 1.3 ist aus den Abbildungen 1.1 und 1.2 der jeweilige Abschnitt separiert worden, der die zweite Transmembrandomäne (TM2) darstellt.

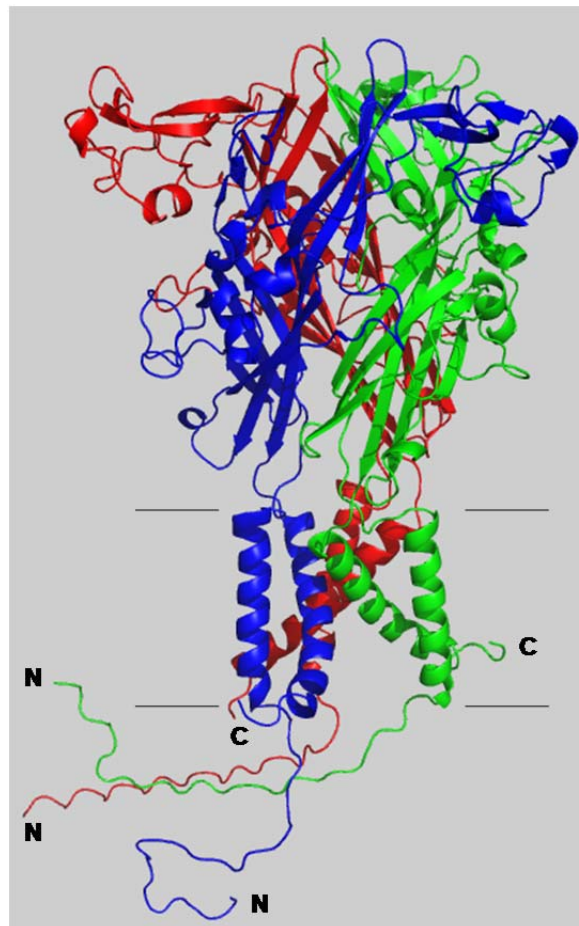


Abb. 1.2: Modell der Quartärstruktur des verkürzten humanen P2X7R.

Jedes Monomer wurde in einer anderen Farbe gehalten. N- und C-Termini sind beschriftet. Die schwarzen Linien skizzieren die ungefähre Lage der Zellmembran. (adaptiert nach den Strukturdaten des P2X4R des Zebrafisches (Kawate et al., 2009)). Dieses Modell hP2X7R- Δ N22- Δ C200 stellt eine verkürzte Aminosäurestruktur dar und reicht von Aminosäure Serin(23) bis Lysin(395). Das Modell wurde von A. Kless (Grünenthal GmbH Aachen) berechnet.

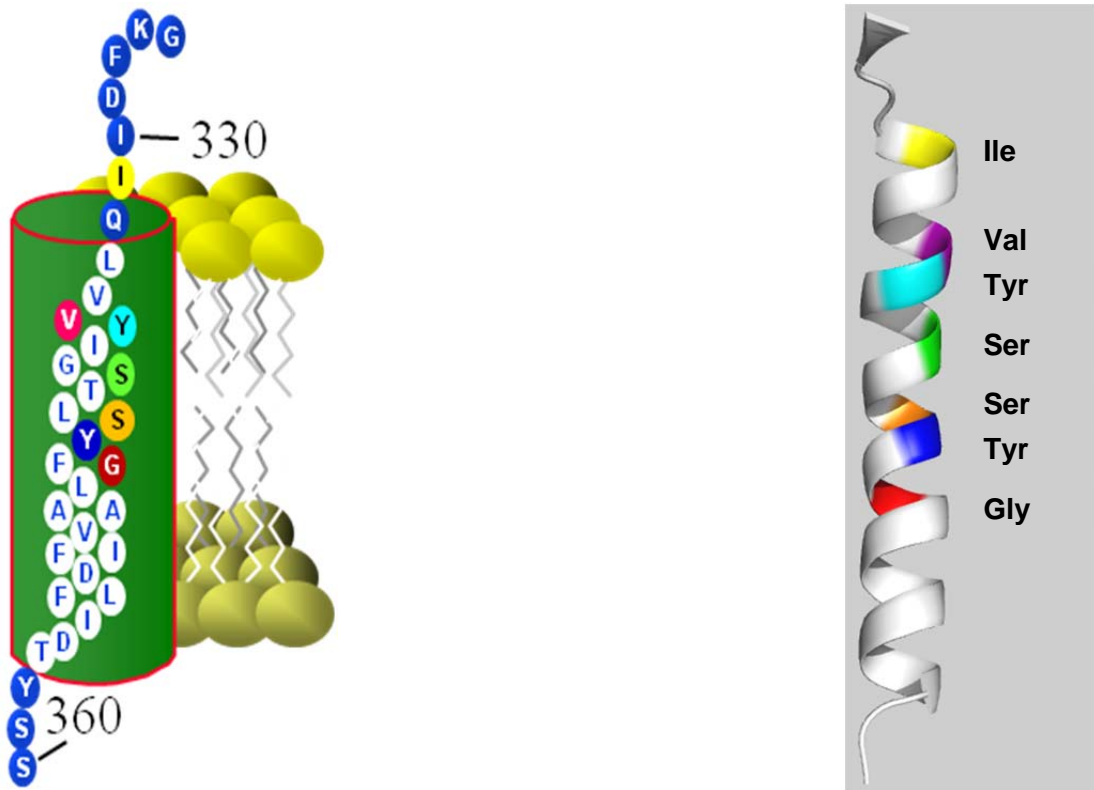


Abb. 1.3: Modell der TM2 des humanen P2X7R.

Schematisches (links) und berrechnetes Modell (rechts) der TM2 des humanen P2X7R in Anlehnung an (Kawate et al., 2009). Die in der Arbeit untersuchten Aminosäuren sind farblich hervorgehoben. Es ist jeweils nur ein Monomer dargestellt. Das rechte Modell reicht von K327 bis zu D352. Das Modell wurde auf Basis des Modells der Abb. 1.2 erstellt.

Trimere der P2X-Rezeptoren bestehen nicht nur als Homomere. Verschiedene Subtypen können zusammen funktionale heteromere Proteine bilden. Mittels Coimmunopräzipitation (CIP) und Strep-Tag-Präzipitation konnte die Existenz verschiedener funktioneller Heterotrimere nachgewiesen werden (Aschrafi et al., 2004; Bobanovic et al., 2002; Brown et al., 2002; Guo et al., 2007; Haines et al., 1999; Jiang et al., 2003; King et al., 2000; Le et al., 1998; Lewis et al., 1995; Marquez-Klaka et al., 2009; Murrell-Lagnado und Qureshi, 2008; Nicke et al., 1998; Nicke et al., 2005; North, 2002; Ormond et al., 2006; Rubio und Soto, 2001; Torres et al., 1999).

Die meisten Daten bezüglich der heteromeren Rezeptoren wurden für die Kombination P2X2R/3R gefunden. Dieses Heterotrimer wies eine Stöchiometrie von einer Untereinheit P2X2R zu zwei Untereinheiten des P2X3R auf (Jiang et al., 2003; Wilkinson et al., 2006). Seine Funktion und Expression wurden in verschiedenen Geweben nachgewiesen (Burnstock, 2008; Burnstock und Kennedy, 2011; Cockayne et al., 2005; Gever et al., 2006).

Überdies wurde für Astrozyten das Vorkommen von P2X1R/5R-Heteromeren indiziert, welches dieselben ATP-abhängigen Ströme sowie die gleiche Kinetik und Pharmakologie wie ein heterolog exprimierter P2X1R/5R besitzt (Lalo et al., 2008).

Strukturelle Ähnlichkeiten der P2X-Rezeptoren bestehen nur mit der Klasse II der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Weitere Homologien herrschen nur innerhalb der Subtypen der P2X-Rezeptorfamilie selbst (North, 2002).

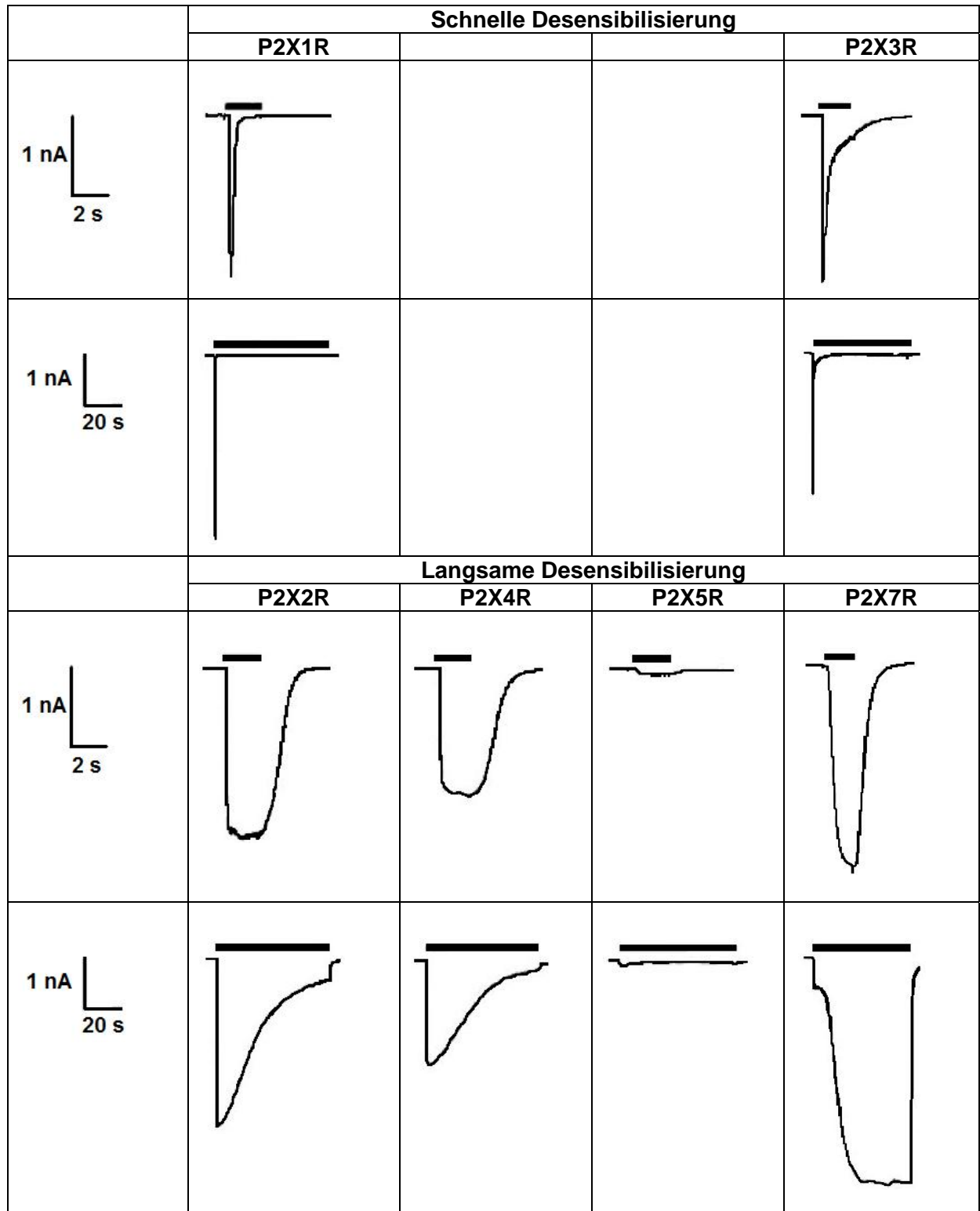
Obwohl die P2X-Rezeptoren in ihrer transmembranären Topologie und mit ihrer trimeren quartären Struktur der ephelialen Natriumkanal-Superfamilie (ENaC, Degenerin) ähneln, bestehen keine signifikanten Ähnlichkeiten zwischen den AS-Sequenzen oder den EZD (Baconguis et al., 2013; Gonzales et al., 2009; Kawate et al., 2009).

Die Ligandenbindung und die damit verbundene Öffnung der Kanalpore der P2X-Rezeptoren bedingt eine Signaltransduktion. Diese beinhaltet initial eine Membrandepolarisation und die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wird durch zwei Reaktionen ausgelöst. Zum einen sind die P2X-Rezeptoren selbst calciumselektiv und vermitteln bei Porenöffnung den Einstrom dieser Ionen in die Zelle. Zum anderen kann die durch den Na^+ -Einstrom hervorgerufene Zellmembrandepolarisation einen Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle der Zellmembran auslösen. Die Signalkaskade beginnt innerhalb weniger Millisekunden, da für deren Initialisierung ausschließlich ATP als Botenstoff nötig ist (Ralevic und Burnstock, 1998).

Die Mitglieder der P2X-Rezeptorfamilie lassen sich bei dauerhafter ATP-Applikation und dem daraus resultierenden Desensibilisierungsverhalten in zwei Gruppen unterteilen. Die Desensibilisierung beschreibt dabei die Abnahme des ATP-abhängigen Stromes über die Zeit während der ATP-Applikation. Zur ersten Gruppe gehören P2X1R und P2X3R; sie desensibilisieren sehr schnell, wodurch die ATP-abhängige Stromantwort nur wenige Sekunden andauert. Zur zweiten Gruppe gehören P2X2R, P2X4R und P2X5R, da diese erst nach mehreren Sekunden desensibilisieren (s. Tab.1.1). Der P2X7R-Rezeptor zeigt keinerlei Desensibilisierungsverhalten.

Tab. 1.1: Desensibilisierung der Homomeren P2XR der Ratte.

HEK293 Zellen wurden mit 1 µg/ml cDNA transfiziert und nach 48 h einer Ganzzellmessung der ATP-induzierten Ströme unterzogen. Es wurden jeweils 30 µM ATP, im Falle des P2X7R 1 mM ATP appliziert. Die ATP-induzierten Ströme wurden nach der ersten ATP-Applikation aufgenommen. Abweichend hiervon wurde im Fall des P2X7R eine zweiminütige Vorapplikation durchgeführt und die nächste Applikation analysiert (North, 2002).



P2X5R, P2X6R und P2X7R weisen einige Besonderheiten auf. Die humane Variante des P2X5R scheint eine „stille“ Spleißvariante darzustellen (North, 2002). Durch Sequenzvergleiche mit dem P2X5R aus der Ratte und dem Huhn, wurde festgestellt, dass beim Menschen das Exon 10 fehlt und das Rezeptorprotein dadurch im Vergleich zu anderen Spezies verkürzt vorkommt (Ralevic und Burnstock, 1998). Die humane Variante wird zwar in vielen Geweben exprimiert und in die Zellmembran eingebaut, sie scheint dort allerdings nur in den seltensten Fällen aktiv zu sein (Kotnis et al., 2010).

Bei der heterologen Expression des homomeren P2X6R-Rezeptors wurde festgestellt, dass sich keine ATP-abhängigen Ströme generieren lassen (North, 2002). Mittels Expressionsstudien wurde eruiert, dass die cRNA zwar translatiert und prozessiert wird, jedoch werden die Proteine nicht in die Membran eingebaut. Es wird vermutet, dass bei diesem P2XR Faltungsprobleme auftreten. Der P2X6R verbleibt vermutlich als Tetramer oder als hochmolekulare Proteinmasse im endoplasmatischen Retikulum, weil er nicht korrekt gefaltet worden ist (Aschrafi et al., 2004). Die postulierten Eigenschaften des P2X6R lassen sich nur durch Verhaltensweisen bei heterologer Koexpression mit anderen Mitgliedern der P2X-Rezeptorfamilie nachweisen.

1.2.2 P2X7R-Rezeptor

1.2.2.1 Allgemeine Charakteristik

Der P2X7R wurde erstmals aus Makrophagen und Gliazellen der Ratte isoliert (Surprenant et al., 1996). Die humane Variante weist eine Länge von 595 Aminosäuren auf und ist somit der längste P2X-Rezeptorsubtyp im Menschen (Ralevic und Burnstock, 1998). Alle P2X7R-Untereinheiten der Säugetiere weisen, mit Ausnahme der Meerschweinchen und des afrikanischen Elefanten (beide 599 AS), 595 Aminosäuren auf. Die Untereinheit des Hundes weist eine Insertion von Asparagin zwischen Position 281 und 282 sowie eine Deletion von Threonin 541 auf. Die P2X7R-Untereinheit des Krallenfrosches besitzt 553 AS, jene des Zebrafisches 596 AS. Die Aminosäuresequenz der menschlichen Variante ist mit der des Affen zu 96 % identisch, gegenüber anderen Säugetieren liegt eine Sequenzidentität von 78-85 % vor. Zu den Varianten des Krallenfrosches

bzw. des Zebrafisches stimmen die AS-Sequenzen nur zu 50-56 % überein (Jiang et al., 2013).

Der natürliche Ligand für den P2X7R ist extrazelluläres ATP ($EC_{50} > 80 \mu\text{M}$). Das ATP-Analogon 2,3-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP) zeigt mit einem EC_{50} von $7 \mu\text{M}$ jedoch eine höhere Affinität. Die Reihenfolge der Agonistenpotenz ist BzATP \gg ATP $>$ 2-Methylthio-ATP $>$ Adenosin-(γ -thio)-triphosphat (ATP- γ -S) \gg Adenosin-Diphosphat (ADP) (North, 2002; Surprenant et al., 1996). Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass ADP am humanen P2X7R unwirksam ist (Riedel et al., 2007a).

Das Antihistaminikum Clemastin ist ein positiver Modulator für den P2X7R (Nörenberg et al., 2011).

1.2.2.2 Biologische Funktionen

Der P2X7R-Rezeptor wird hauptsächlich von Zellen des Immunsystems exprimiert, weshalb für den Rezeptor eine immunologische und entzündungsmodulatorische Funktion postuliert wird. In Mastzellen und Makrophagen werden bei P2X7R-Aktivierung Interleukin-1 β und -18 sezerniert, welche wichtig bei Entzündungsreaktionen sind (Ferrari et al., 1997; Wiley et al., 2011). Fibroblasten geben nach P2X7R-Stimulation Interleukin-6 ab, das die Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten reguliert (Solini et al., 1999). Bei Leukozyten kommt es nach der P2X7R-Aktivierung zu einer Entfernung von L-Selektin von der Zelloberfläche, wodurch der Rezeptor Einfluss auf Leukozytenadhäsion und -migration nimmt (Gu et al., 1998). Zur Beseitigung von intrazellulären Erregern (Mykobakterien, Chlamydien) kommt es in Makrophagen bei Aktivierung des P2X7R zu einer Phospholipase D-abhängigen Fusion von Lysosomen und Endosomen (Coutinho-Silva et al., 2003; Fairbairn et al., 2001; Kusner und Barton, 2001).

P2X7R induziert die Aktivierung von Phospholipase D und A2 (PLD und PLA2) (Alzola et al., 1998; El-Moatassim und Dubyak, 1992; Thomas und Salter, 2010) und somit die Generierung von Lysophosphatidsäure, welche für das *Blebbing* in Osteoblasten mit verantwortlich ist (Panupinthu et al., 2007; Qu und Dubyak, 2009). Wie der P2X7R dieses *Blebbing* genau auslöst, ist allerdings noch nicht geklärt.

In T-Lymphozyten trägt die autokrine ATP-Freisetzung und die damit verbundene P2X7R-Aktivität zur Aktivierung der Zellen und zur Synthese von Interleukin-2 bei (Yip et al., 2009). Die meisten dieser Effekte treten einige Minuten nach der P2X7R-Aktivierung auf (Wiley et al., 2011).

Der P2X7R wird auch in Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert, besonders stark in Mikroglia, aber auch in Astrozyten, Oligodendrozyten und Schwannschen Zellen (Cotrina und Nedergaard, 2009). Seine physiologische Rolle in diesen Gliazellen ist noch nicht geklärt, aber eine Hochregulation des P2X7R in Mikroglia kann zu einer neuronalen Entzündung führen (Deuchars et al., 2001). Die ruhenden Zellen werden wiederum durch die P2X7R-Stimulation aktiviert (Monif et al., 2009)

Der P2X7R kann Knochenbildung und –resorption regulieren, da er sich sowohl in der Zellmembran von Osteoblasten als auch Osteoklasten befindet. In Osteoblasten führt die P2X7R-Aktivierung zur Zelldifferenzierung und Knochenformation (Gangadharan et al., 2014), wogegen die Stimulation des P2X7R in Osteoklasten die Apoptose und Knochenresorption fördert (Burnstock et al., 2013; Burnstock und Verkhratsky, 2010; Grol et al., 2009).

Weitere nachgelagerte Effekte der P2X7R-Aktivierung sind die Aktivierung von Membranmetalloproteasen (Gu et al., 1998), von Caspase-1 (MacKenzie et al., 2001) und von der Caspase-Kaskade, die zum Zelltod führt (Franceschi et al., 1996; MacKenzie et al., 2005).

Die Aktivierung des P2X7R steht in Zusammenhang mit einem K^+ -Ausstrom, welcher die Assemblierung des NALP3-Inflammasoms und die Sekretion von entzündlichen Interleukinen aus Myeloidzellen bewirkt. Langandauernde Aktivierung des P2X7R führt zur Apoptose von Zellen. Der P2X7R führt auch ohne Ligandenbindung einige Funktionen aus, darunter Förderung der Phagozytose fremder Partikel in Abwesenheit von Opsoninen. Der P2X7R und seine nachgelagerten Funktionen scheinen sehr wichtig für die angeborene Immunität zu sein (Wiley et al., 2011).

Der P2X7R ist vermutlich auch für die Regulation der Homöostase in Epithelzellen von Bedeutung. Bei Dysregulation des Rezeptors kann es potenziell zur Tumorbildung kommen (Fu et al., 2009).

Der P2X7R wird ebenfalls in Endothelzellen (Wilson et al., 2007) und exokrinen Drüsen sowie im Pankreas (Novak, 2007) exprimiert. Entzündungsstimuli führen in Endothelzellen zu einer Hochregulation des Purinorezeptors und bei seiner Aktivierung zur Freisetzung von Interleukin-1 β (Wilson et al., 2007). Bei einer Aktivierung des P2X7R im Pankreas wird eine Vielzahl von Effekten ausgelöst, darunter die Sekretion aus den exokrinen Drüsenzellen (Novak, 2007).

1.2.2.3 Charakteristischer Strom

Der Verlauf der ATP-induzierten Stromantwort des humanen P2X7R weist eine Zweiphasenkinetik auf, die sich sowohl während der Aktivierung als auch bei der Deaktivierung nachweisen lässt. Dies deutet auf zwei funktionell unterschiedliche und verschieden affine ATP-Bindungsstellen hin. Es wird vermutet, dass die initiale Bindung des ersten ATP an eine hochaffine Bindungsstelle (K_D im niedrigen mikromolaren Bereich), welche bereits einen kleinen Einzelkanalstrom auslöst, die Affinität der zwei weiteren ATP-Bindungsstellen in den hoch mikromolaren Bereich verschiebt. Die Bindung von je einem weiteren ATP-Molekül an die geringaffinen Bindungsstellen löst dann den maximalen Einzelkanalstrom aus (Klapperstück et al., 2001b; Riedel et al., 2007a).

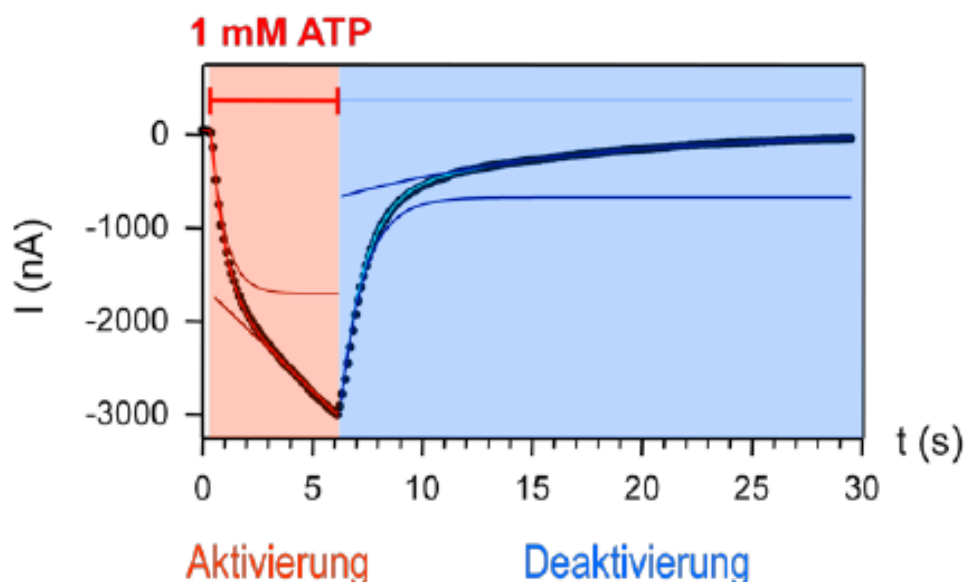


Abb. 1.4: Zweiphasenkinetik des ATP-induzierten Ganzzellstromes des hP2X7R-WT. Die Zeit der ATP-Applikation ist angegeben. Die Messung wurde im Oozyten bei einem Haltepotenzial von -40 mV in calciumfreier Lösung durchgeführt (ORI 002.5). Der gemessene Stromverlauf ist als Aufeinanderfolge schwarzer Punkte dargestellt, die der einzelnen Komponenten der Stromaktivierung und -deaktivierung als farbige Linien. Messungen nach Injektion von 23 nl von 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA-Lösung und zweitägiger Inkubationszeit.

Während der Agonistenapplikation verläuft die Aktivierung von in *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimiertem hP2X7R zunächst exponentiell sättigend, um anschließend in einen linearen Verlauf zu wechseln. Die Ursache für den linear ansteigenden Strom ist bisher ungeklärt. Während der Deaktivierung, bei welcher der Agonist vom Rezeptor dissoziiert, trennt sich der Stromverlauf in eine schnelle und in eine langsame Phase auf (s. Abbildung 1.4; (Klapperstück et al., 2000)).

1.2.2.4 P2X7R-Knock-out

Zurzeit sind zwei verschiedene Varianten von P2X7R-Knock-out-Mäusen verfügbar. Die eine ist die GSK-Linie, generiert durch (Chessell et al., 2005) (s. auch (Sim et al., 2004)) und die andere ist die Pfizer-Linie, generiert durch (Solle et al., 2001). Bei der GSK wurden eine LacZ-Transgen- und eine Neomycinkassette ins Exon 1 eingefügt, bei der Pfizer eine Neomycinkassette in das Exon 13, was dazu führt, dass in beiden Fällen der C-Terminus des P2X7R verkürzt wird. Es gibt allerdings Arbeiten, die zeigen, dass bei Pfizer-Mäusen noch eine Restaktivität des P2X7R existiert (Taylor et al., 2009). Dies scheint damit zusammen zu hängen, dass bestimmte Gewebe einen P2X7R-ähnlichen Rezeptor exprimieren, der ein ähnliches Verhalten wie der P2X7R aufweist. Der ähnliche Rezeptor trägt P2X7R-Epitope, welche von spezifischen P2X7R-Antikörpern erkannt werden (Taylor et al., 2009). Andererseits ist bekannt, dass hP2X7R mit verkürztem C-Terminus über die hochaffine ATP-Bindungsstelle (s. 1.2.2.3) einen kleinen ATP-induzierten Strom vermitteln können (Becker et al., 2008b).

Die Pfizer-KO-Mäuse entwickelten skelettale Abnormitäten. Deshalb wurde postuliert, dass der P2X7R an der Knochenhautbildung und der Knochenbälkchen-Umformung beteiligt ist (Ke et al., 2003). Weitere Studien zeigten, dass bei diesen Mäusen die Sensitivität gegenüber Knochenbelastungen reduziert war, was darauf hindeutet, dass der P2X7R in die Knochenmechanotransduktion involviert ist (Li et al., 2005).

In männlichen Pfizer Mäusen führt die fehlende P2X7R Aktivität zu einer reduzierten Sekretion aus Speicheldrüsen und Pankreas und zu einer erhöhten Sekretion aus Tränendrüsen (Nakamoto et al., 2009; Novak et al., 2010). Daraus wurde geschlossen, dass der P2X7R eine Rolle bei der Sekretionsregulation von exokrinen Drüsen spielt.

Es konnte gezeigt werden, dass durch LPS aktivierte Makrophagen aus P2X7R-defizienten Mäusen nicht in der Lage waren, bei ATP-Behandlung pro-Interleukin-1 β herzustellen und dadurch auch kein reifes IL-1 β sezernieren konnten (Solle et al., 2001).

Die von Glaxo entwickelten P2X7R-*Knock-out*-Mäuse (Chessell et al., 2005) zeigten eine vollständig fehlende Hypersensitivität gegenüber entzündlichen und neuropathischen Schmerzen sowie eine Reduktion der Produktion von reifem IL-1 β . Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei LPS-behandelten Mikroglia aus dem Rückenmark von Ratten beobachtet (Clark et al., 2010). Die Bedeutung des P2X7R bei der Entwicklung von neuropathischen Schmerzen wurde durch Experimente gestützt, die einen Anstieg der P2X7R-Expression in von Patienten mit neuropathischen Schmerzen stammenden verletzten Nerven zeigen konnten (Chessell et al., 2005).

1.2.2.5 Antagonisten

Es sind mehrere Substanzen bekannt, die eine unselektive inhibitorische Wirkung auf den P2X7R ausüben können. Unter diesen befinden sich Suramin, 2,3-Dialdehyd-ATP (oxidiertes ATP, $IC_{50} = 200 \mu\text{M}$) und Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2,4-Disulfonat (PPADS, $IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$) (Hibell et al., 2001). Als erste relativ spezifische Antagonisten für P2X7R wurden KN-62 (Gargett und Wiley, 1997) und Brilliant Blau G ($IC_{50} 2 \mu\text{M}$) (Donnelly-Roberts und Jarvis, 2007) beschrieben. Beide Substanzen blockieren jedoch auch den humanen P2X1R (Seyffert et al., 2004).

Auch viele bivalente Kationen können die Aktivität des P2X7R durch Inhibition und Modulation beeinflussen (Jiang, 2009). In der Reihenfolge ihrer inhibitorischen Wirkung aufgelistet, sind es $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} \sim \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+} \sim \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} = \text{Ba}^{2+} \gg \text{Sr}^{2+}$ (North, 2002). Zu beachten ist hierbei jedoch auch, dass bivalente Kationen am freien ATP^{4-} , dem Agonisten vom P2X7R, binden und somit dessen Konzentration herabsetzen, wodurch ein indirekt hemmender Einfluss auf die P2X7R-Aktivierung entsteht (Klapperstück et al., 2001a; North, 2002).

Selektive Antagonisten für P2X7R wurden kürzlich durch Tocris Bioscience (Ellisville, MO) und Sigma Chemical Co (St. Louis, MO) zugänglich gemacht.

Dazu gehören A-438079, A-740003, AZ10606120 und AZ1164537, welche den humanen P2X7R mit einem IC_{50} von 200, 100, 5 bzw. 20 nM blocken (Donnelly-Roberts und Jarvis, 2007). Zwei dieser Antagonisten, A-438079 und A-740003, führten zu einer verminderten Schmerzwahrnehmung im Rattenmodell für neuropathischen und entzündlichen Schmerz (Donnelly-Roberts und Jarvis, 2007). Diese *in vivo* Resultate unterstützen klinische Studien zu therapeutischen Versuchen mit P2X7R-Antagonisten. Der Antagonist von Pfizer, CE-224535, zeigte keine Wirkung in der klinischen Phase II bei der Behandlung von rheumatischer Arthritis und wird nun auf seine Wirkung gegenüber Schmerzen und Alzheimer untersucht (Duplantier et al., 2011). Der P2X7R-Antagonist GSK1482160 von GlaxoSmithKline hat die klinische Phase I bestanden, d.h. der Wirkstoff zeigte im Menschen die gleichen Eigenschaften hinsichtlich Aufnahme, Verteilung, Ausscheidung und Verträglichkeit wie im präklinischen Tiermodell. Die AstraZeneca-Substanz AZD9056 hat ebenfalls als P2X7R-Antagonist die erste klinische Phase bestanden, zeigte in Phase IIb jedoch keine signifikante Effizienz gegenüber rheumatischer Arthritis. Dadurch wurde postuliert, dass der P2X7R kein wirksames Ziel für die Bekämpfung von rheumatischer Arthritis ist (Keystone et al., 2012). Es wird noch klinisch untersucht, ob der P2X7R eine Komponente bei der Behandlung von Osteoarthritis, chronischen obstruktiven Lungenerkrankungen und Entzündungen darstellt (Guile et al., 2009). In Anlehnung an die chemischen Antagonisten existiert ein Antikörper aus der Maus gegen den humanen P2X7R, der in der Lage ist, die Funktion des humanen P2X7R inklusive des Kationenflusses und der Freisetzung von Interleukin 1 β , zu hemmen (Buell et al., 1998). Bisher wird dieser jedoch ausschließlich in der Grundlagenforschung eingesetzt.

1.2.3 Struktur-Funktions-Beziehungen

Kawate und Kollegen publizierten 2009 eine Röntgen-Kristallstruktur des geschlossenen P2X4R aus dem Zebrafisch und drei Jahre später von Hattori *et al.* eine offene Struktur desselben Rezeptors publiziert (Hattori und Gouaux, 2012; Kawate et al., 2009). Die Aminosäuresequenz des Konstruktes war allerdings an beiden Enden stark trunkiert. Da der P2X7R den längsten C-Terminus von allen Subtypen aufweist, ist es schwierig, die Eigenschaften und Strukturdaten des verkürzten P2X4R vom Zebrafisch auf den P2X7R zu übertragen.

Kawate *et. al.* konnten kristallografisch die postulierte trimere Struktur der P2X-Proteinfamilie am Beispiel des P2X4R aus dem Zebrafisch 2009 bestätigen (Kawate *et al.*, 2009). 2012 gelang es der Gruppe um Hattori, den P2X4R des Zebrafisches in Gegenwart seines Agonisten ATP zu kristallisieren. Dadurch wurden neue Erkenntnisse über die Struktur und die Schaltung nach ATP-Bindung gewonnen (Hattori und Gouaux, 2012).

Jede Untereinheit des Trimers hat Ähnlichkeit mit einem Delphin (Abbildung 1.5), mit den Transmembrandomänen als Schwanzflosse und der Extrazellulardomäne als Körper und Kopf (Hattori und Gouaux, 2012; Kawate *et al.*, 2009).

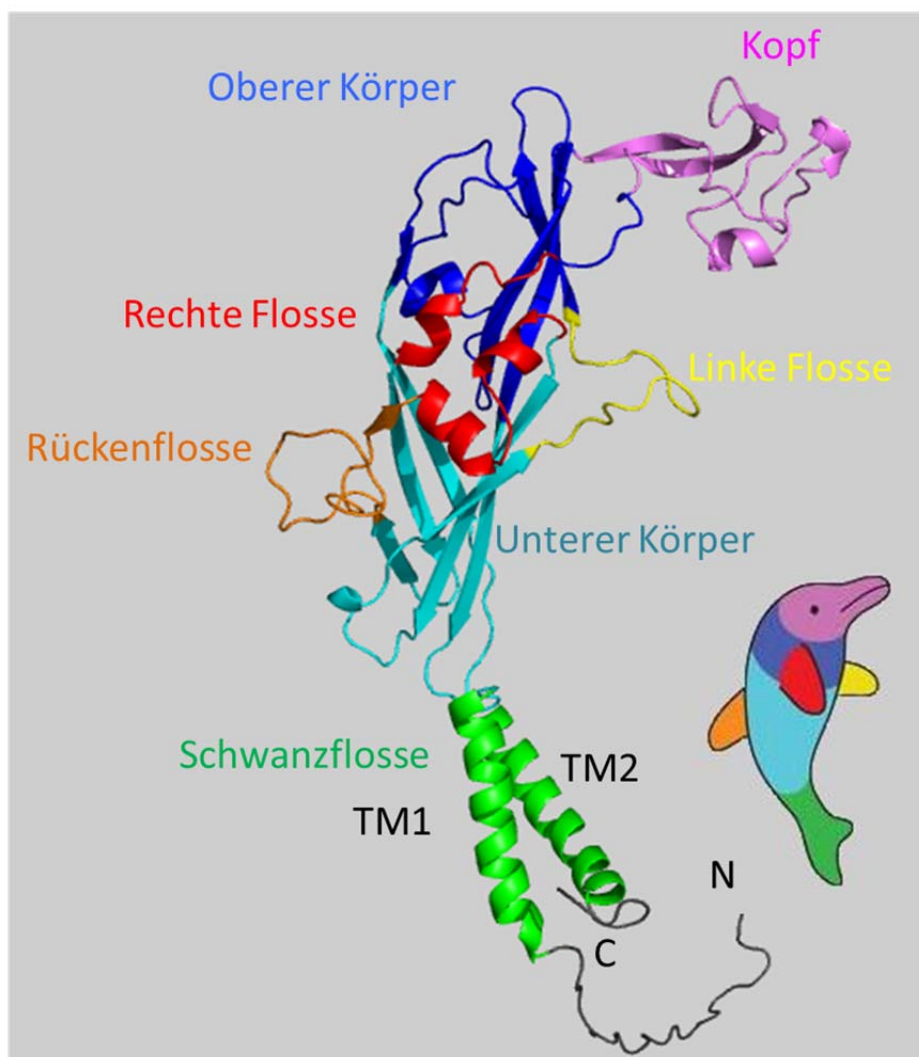


Abb. 1.5: hP2X7R-Monomer mit Delphinstruktur.

Jedes strukturelle Charakteristikum wurde verschieden eingefärbt und bezeichnet. Darstellung eines Monomers des hP2X7R-Modells, in Anlehnung an das Modell von Kawate *et. al.* und Hattori *et. al.* (Hattori und Gouaux, 2012; Kawate *et al.*, 2009). Das Modell wurde auf der Basis des Modells der Abb. 1.2 erstellt und mittels Pymol eingefärbt und dargestellt.

Durch die ATP-Bindung kommt es zu einer Bewegung des Extrazellulärvestibüls und der Transmembrandomäne, wodurch die Transmembranhelices auseinanderdriften und so Platz für die Ionenpore entsteht.

Das ATP-Molekül wird durch hoch konservierte Reste erkannt. Die Adeninbase des ATPs wird über Wasserstoffbrücken mit Lys70 (beim hP2X7R äquivalent zu Lys64) und Thr189 (Thr189 beim hP2X7R) gebunden. Zusätzlich wird das Puringerüst durch hydrophobe Interaktionen mit Leu191 und Ile232 (Leu191 und Ile226 vom hP2X7R) stabilisiert. Die Hydrophobizität dieser Reste ist ebenfalls konserviert. Das Leucin191 des Zebrafisches ist äquivalent zum Leucin186 des P2X4R der Ratte und zum Leu189 des hP2X7R.

Es konnte bewiesen werden, dass drei ATP-Bindungsstellen existieren, wobei eine jeweils durch Interaktion zweier Untereinheiten des Trimers zustande kommt.

Die ATP-Bindungstasche wird durch zwei Untereinheiten gebildet. Arg298 (Arg294 des hP2X7R) und Lys316 (Lys311 des hP2X7R) einer Untereinheit stabilisieren die β -Phosphatgruppe. Asn290 (Ser286 des hP2X7R) und Lys316 (Lys311 des hP2X7R) einer Untereinheit und das Lys72 (Lys66 des hP2X7R) der zweiten erkennen die γ -Phosphatgruppe. Aus diesem Grund haben ADP und AMP (Adenosinmonophosphat) kaum einen Effekt auf die P2XR-Familie, da die Seitenketten der genannten Aminosäuren keine Wechselwirkungen eingehen.

Das extrazelluläre Vestibül, welches sich oberhalb der Transmembrandomänen befindet, ist während der ATP-Bindung weit geöffnet. Über diese Position diffundieren die hydratisierten Ionen in und durch die Kanalpore. Verschiedene Reste der TM2 bilden die Pore. Diese Reste sind beim P2X4R des Zebrafisches Leu340, Ala344, Ala347, Leu351 und Ile355. Die betreffenden Aminosäuren des hP2X7R sind Val335, Ser339, Ser342, Leu346 und Phe350. Die Ionenpore wird durch Ala347 und Leu351 auf einen minimalen Porendurchmesser limitiert, welcher bei ATP-Bindung nur circa 7Å beträgt. Diese Positionen sind beim humanen P2X7R die Aminosäuren Ser339 und Ser342 (s. Abbildung 1.6) (Hattori und Gouaux, 2012). Die Pore des hP2X7R hat bei ATP-Bindung einen Durchmesser von ca. 8,5 Å (Riedel et al., 2007b).

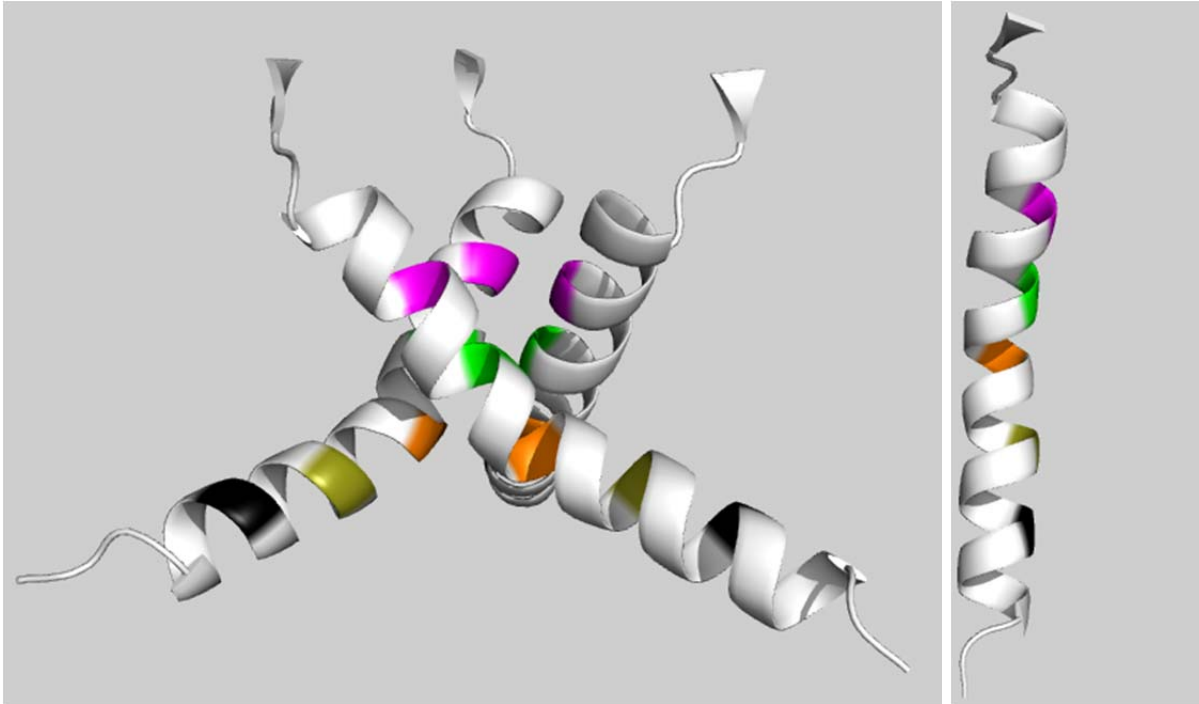


Abb. 1.6: Modell der TM2 des hP2X7R in Abwesenheit von ATP.

Die Abbildung zeigt die TM2-Region des trimeren Proteins (links) sowie eines Monomers (rechts). Das Modell wurde anhand des Modells in Abb. 1.2 erstellt. Die Kennzeichnung der Aminosäuren erfolgte gemäß (Hattori und Gouaux, 2012) und bezeichnet die proximalen Reste der Pore.

Die Aminosäure-Reste der Kanalpore sind ungeladen, was beim Transport von Ionen durch die Membran nicht zu erwarten war, da in spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen negativ geladene Aminosäureseitenketten die Wasserhülle des permeierenden Ions ersetzen (Gouaux und MacKinnon, 2005). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Ionentransport über die Interaktion mit dem Hauptkettencarbonyl-Sauerstoff vonstattengeht (Gouaux und MacKinnon, 2005). Die häufig in der Literatur beschriebene Porendilatation des P2X4R wurde bei einer Behandlung für 5 min mit $10 \mu\text{M}$ ATP beim trunkierten Zebrafisch P2X4R nicht beobachtet (Hattori und Gouaux, 2012).

Der strukturelle Übergang der Ionen aus dem EZR in die TM-Region kommt durch die ATP-Bindung zustande. Die ATP-Bindung führt zu starken strukturellen Veränderungen, die sich von der Kopfregion über den Körper bis zur TM-Region hinunter ziehen. Durch Bindung des Agonisten bewegen sich die α -Helices der TM1 und TM2 von der zentralen Achse weg und die Kanalpore öffnet sich mit einer irisähnlichen Bewegung. Beim Übergang vom geschlossenen in den offenen Zustand des Proteins und umgekehrt, verändern sich die intra- und interzellularen

Interaktionen zwischen den TM-Helices sehr stark. Der geschlossene Zustand wird durch Interaktionen zwischen Leu340, Leu346 und Ala347 (äquivalent zu Val335, Leu341 und Ser342 des hP2X7R) stabilisiert. Beim Übergang in den offenen Kanalzustand werden diese Interaktionen aufgebrochen sowie zwischen Leu346 und Ile355 (gleichbedeutend zu Leu341 und Phe350 des hP2X7R) neue geknüpft. In der TM2 gibt es einen Knick, ausgelöst durch Gly350 (entspricht Gly345 des hP2X7R), welches als *Gating*-Scharnier zu dienen scheint.

Nach den röntgenkristallographischen Daten des geschlossenen, verkürzten P2X4R des Zebrafisches, wird die *Gate*-Region des Rezeptors auf der extrazellularen Seite durch die Aminosäuren Leu 340 und Asn 341 flankiert. Die entsprechenden Positionen des hP2X7R sind Val335 und Tyr336. Die hydrophobe Seitenkette des Leucins (entsprechend des Valins) verschließt die Pore von außen. Auf der zytoplasmatischen Seite wird die *Gate*-Region durch Leu346 und Ala347 begrenzt. Im hP2X7R sind diese Leu341 und Ser342. Die engste Position im geschlossenen Zustand und damit das Zentrum bildet Ala344 bzw. Ser339 im menschlichen P2X7R. Die *Gate*-Region ist flankiert durch hydrophobe Reste und erstreckt sich über zwei Windungen der α -Helices (Kawate et al., 2009).

1.2.4 Vergleich der Expressionssysteme

Klapperstück *et. al.* untersuchten 2000 das Verhalten des humanen P2X7R, einerseits nativ in den Zellen des Immunsystems (B-Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Fibroblasten) exprimiert und andererseits bei heterologer Expression in Oozyten des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) mit dem Subtyp aus der Ratte (Klapperstück et al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass es - im Gegensatz zu nativer Expression - bei heterologer Expression nicht zur Ausbildung der häufig beschriebenen großen unselektiven Pore kam. Des Weiteren zeigte der in Oozyten exprimierte hP2X7R in der Kinetik der Kanalaktivierung eine lineare Stromkomponente, die in nativ exprimierten Rezeptorproteinen nicht beobachtet wurde (s. 1.2.2.3, Abb. 1.4) (Bretschneider et al., 1995; Klapperstück et al., 2000).

Es wurde festgestellt, dass der nativ exprimierte Rezeptor bei längeren ATP-Applikationen in der Lage war, Moleküle bis 900 Da transportieren zu können (Di Virgilio, 1995). Dies gilt nicht für die Variante aus B-Zellen. Diese ist nur für

Moleküle bis zu einer Größe von 400 Da durchlässig (Wiley et al., 1993), während der Rattensubtyp YO-Pro1 (629 Da) durchlies (Surprenant et al., 1996).

Bei der heterologen Expression vom humanen P2X7R in Krallenfroschoozyten zeigten sich zwei unterschiedlich affine ATP-Bindungsstellen. Die hochaffine wird bei 4 μ M ATP und die niedrigaffine bei 200 μ M freiem ATP aktiviert. Dadurch kommt es zu einem biphasischen Aktivierungs- und Deaktivierungsverlauf des hP2X7R (s. 1.2.2.3) (Klapperstück et al., 2001a; Klapperstück et al., 2001b).

Der stromauslösende Effekt der hochaffinen ATP-Bindungsstelle scheint im P2X7R aus Ratte nicht zu existieren. Trunkierungen der C-terminalen 156 Aminosäuren des hP2X7R lassen die Effekte der niedrigaffinen Bindungsstelle, d.h. den biphasischen Verlauf der Aktivierung und Deaktivierung, verschwinden (Klapperstück et al., 2001a; Klapperstück et al., 2001b). Das Anbringen einer Hexahistidylgruppierung am N-terminalen Ende führt zu einer Verminderung des linearen Anteils der Aktivierungskinetik und des schnell deaktivierenden Anteils der ATP-Bindung (Klapperstück et al., 2001a). Beide Anteile resultieren aus der Funktion der niedrigaffinen ATP-Bindungsstelle. Somit führen auch terminale Modifikationen der Sequenz des hP2X7R zu gravierenden Veränderungen innerhalb der Kinetik der Rezeptoraktivierung und -deaktivierung.

Bei Kawate *et al.* und Hattori *et al.* war die C-terminale Region des zfp2X4R so weit wie möglich trunkiert. Beim zfp2X4R hatte das keine Auswirkungen auf die ATP-induzierten Ströme (Hattori und Gouaux, 2012; Kawate et al., 2009).

Bei einer heterologen Expression vom P2X7R der Ratte in Oozyten des Krallenfrosches zeigten sich ähnliche Eigenschaften wie bei der nativen Rezeptorform aus Makrophagen und Lymphozyten. Im Gegensatz zu HEK293-Zellen, war die Applikation von Bz-ATP nicht in der Lage, eine YO-Pro1-Aufnahme in die Zellen zu unterstützen. Somit nimmt das Expressionssystem Einfluss auf die Eigenschaften des Subtyps (Petrou et al., 1997).

In unserer Arbeitsgruppe wurde weder während dieser Arbeit noch bei vorherigen Untersuchungen eine Porenbildung des hP2X7R bei einer heterologen Expression in Oozyten oder HEK293 oder bei Untersuchungen an nativen Lymphozyten beobachtet. Jedoch zeigte sich beim P2X7R der Ratte eine Porenbildung durch die Verwendung von Benzoyl-ATP. Dies wurde in einer Konzentration von 3 μ M für 20 s auf HEK293-Zellen appliziert und führte zur Porenbildung und der

Aufnahme großer Moleküle. Bei einer Applikation von 30 μ M Benzoyl-ATP für 30 s kam es zum sofortigen Zelltod (Virginio et al., 1999a).

Wie bereits ausgeführt, weisen nicht nur verschiedene P2XR-Subtypen untereinander starke funktionelle Unterschiede auf, sondern auch gleiche P2XR-Subtypen verschiedener Spezies und sogar derselbe Subtyp einer Spezies bei Expression in verschiedenen Zellen. Selbst minimale Veränderungen am Konstrukt können eine weitreichende Veränderung im Schalt- oder Stromverhalten bei ATP-Bindung auslösen.

Die Befunde von Kawate und Hattori (Hattori und Gouaux, 2012; Kawate et al., 2009) sowie die bisherigen Struktur-Funktions-Untersuchungen an P2X2R (Browne et al., 2010b; Dellal und Hume, 2012; Hausmann et al., 2013; Liang et al., 2013; Roberts et al., 2008; Stelmashenko et al., 2014; Yan et al., 2013) und P2X4R (Hattori und Gouaux, 2012; Roberts et al., 2008; Zemkova et al., 2007; Zhang et al., 2014) lassen sich also somit nicht direkt auf den humanen P2X7R übertragen.

Zum besseren Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen des humanen P2X7R ist der Nachweis von Struktur-Funktions-Beziehungen essentiell.

2 Zielsetzung

Es gab bereits mehrere Versuche, die AS zu ermitteln, die am Schaltverhalten und der Ionenselektivität der P2X-Rezeptorfamilie beteiligt sind (Egan et al., 1998; Jelinkova et al., 2008; Jiang et al., 2001; Li et al., 2008; Li et al., 2004; Migita et al., 2001; Nakazawa et al., 1998; Rassendren et al., 1997; Silberberg et al., 2005; Yan et al., 2006).

In vorangegangenen Experimenten wurden in die zweite Transmembrandomäne (TM2) des humanen P2X7R gezielt Punktmutationen gegen Cystein eingeführt (eine AS wurde gegen Cystein ausgetauscht) und auf ihr Verhalten gegenüber des WTs (Wildtyps) und MTSEA untersucht. Die ausgewählten AS-Positionen zeigten ein ausgeprägtes Verhalten gegenüber dem kleinen Methanthiosulfonatderivat und hatten eine veränderte ATP-induzierte Stromantwort zur Folge. Die genutzten Konstrukte wurden zwecks Identifizierung des Ionenfilters sowie des *Gates* auf ihre Modifizierbarkeit mit anderen Cysteininteraktionspartnern und die damit potenziell einhergehende Modulierung der Ionenströme untersucht. Diese Struktur-Funktionsbeziehungen sollten weitere Aufschlüsse über die Bedeutung der Transmembrandomäne zwei des humanen P2X7R liefern.

3 Vorversuche

3.1 Modifizierung der SH-Seitenketten

Durch den Austausch einer Aminosäure in der Proteinsequenz gegen Cystein wird eine freie Cysteinseitenkette (SH-Rest) pro Monomer in das System eingeführt. Mit diesem SH-Rest können verschiedene Stoffe, darunter Methanthiosulfonate (MTS) und deren Derivate, kovalente Konjugate bilden. Grundlage der Konjugation ist die Ausbildung einer Disulfidbrücke. Die verwendeten MTS-Reagenzien besitzen ebenfalls eine Disulfidbindung. Diese wird gebrochen und der MTS-Rest bindet an die Cysteinseitenkette. Der MTS-Grundkörper verbleibt in Lösung und wird ausgewaschen.

Durch das Einbringen von Ladungen oder unter Verwendung großer MTS-Derivate lassen sich funktionelle Veränderungen im Kanalprotein auslösen, die sich mit elektrophysiologischen Methoden nachweisen lassen (Akabas et al., 1994; Stauffer und Karlin, 1994).

Auf diesem Wege lässt sich auch abschätzen, wo sich das eingebrachte Cystein (gezielte Punktmutation in der AS-Sequenz des hP2X7R) innerhalb der dreidimensionalen Proteinstruktur befindet und welche funktionelle Bedeutung diese Position besitzt. Da in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten die MTS-Derivate immer extrazellulär appliziert wurden, lassen sich aus den möglichen funktionellen Effekten folgende Schlussfolgerungen für den P2X7R ableiten:

Tritt ohne Applikation des Agonisten ATP durch Zugabe des MTS-Reagenz ein funktioneller Effekt (Veränderung des Ionenstroms) ein, so befindet sich die Cysteinseitenkette oberhalb des Kanaltors (*Gate-Region*) und ragt im geschlossenen Zustand in die Kanalpore oder hat anderweitig im extrazellulären Teil des Proteins Kontakt zum Extrazellulärraum.

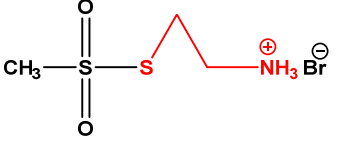
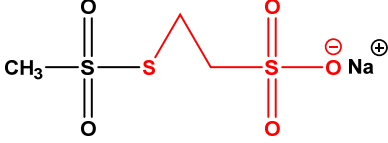
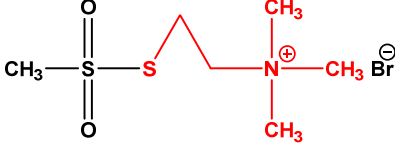
Tritt ein funktioneller Effekt des MTS-Derivates nur unter Anwesenheit von ATP ein, so ragt die Seitenkette entweder nur im offenen Zustand in die Pore oder die ursprüngliche Aminosäure befindet sich unterhalb des *Gates*.

In Tabelle 3.1 sind die drei für diese Arbeit verwendeten geladenen MTS-Substanzen aufgeführt. (Egan et al. 1998). Der rot markierte Teil der Strukturformeln bindet an den kovalent Schwefel der Cysteinseitenkette.

In Abbildung 3.1 ist zusätzlich die Strukturformel der ungeladenen MTS-Substanz 4-Hydroxy-benzoyl-methyl-thiosulfonat gezeigt, die ebenfalls für die Arbeit genutzt worden ist.

Tab. 3.1: Geladene Methanthiosulfonatderivate.

Die Strukturformeln wurden mittels ChemDraw Prime erstellt.

MTSEA 2-Aminoethyl-methyl-thiosulfonat-hydrobromid	MTSES Natrium-(2-sulfonatoethyl)-methyl-thiosulfonat	MTSET [2-(Trimethylammonium)-ethyl] methyl-thiosulfonat-bromid
		

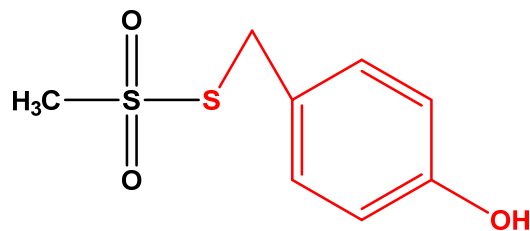


Abb. 3.1: Strukturformel des Tyr-MTS-Reagenz.

Struktur von 4-Hydroxy-benzoyl-methylthiosulfonat. Die Strukturformel wurde mittels ChemDraw Prime erstellt.

3.2 Auswahl der Mutanten

Die Arbeitshypothese bezüglich des hP2X7R war, dass die durch Punktmutation eingeführten Cystein-Seitenketten durch die damit ermöglichte Modifizierung mittels MTS-Reagenzien einen Einfluss auf die ATP-abhängige Stromantwort haben sollten. So wurde in vorherigen Screening-Versuchen (Markwardt et al., 2014) das Verhalten von Cystein-substituierten Aminosäuren der TM2 untersucht. Dazu wurde generell getestet, wie sich die ATP-induzierte Reaktion der Mutante im Vergleich zum WT verhält und daraus abgeleitet, ob sich die mutierte Cysteinseitenkette generell modifizieren lässt.

Für das Screening der Mutanten wurden verschiedene Lösungen in einer spezifischen Reihenfolge über die hP2X7R-Konstrukt-exprimierende Oozyte geleitet. In Abbildung 3.2 ist die Reihenfolge durch die Indizes a-d dargestellt.

Für den Grundwert der ATP-abhängigen Stromantwort wurde zuerst 1 mM ATP für 6 s appliziert (a). Nach Auswaschen des ATP und nach 3 min Rezeptor-Relaxation wurde 0,5 mM MTSEA für 6 s appliziert (b). Dem folgte eine zweite ATP-Gabe (c), um zu testen, ob MTSEA eine Wirkung auf die im geschlossenen Rezeptorzustand (rote Balken) befindlichen Cysteinmutanten hatte. Abschließend wurden wiederum nach 3 min Inkubation gemeinsam 1 mM ATP und 0,5 mM MTSEA appliziert (d), um die Modifizierung der Cystein-Seitenketten durch MTSEA zu verifizieren, während sich die Kanalpore durch ATP im geöffnetem Zustand befindet.

Für die Vorversuche wurde zunächst MTSEA benutzt, ein relativ kleines MTS-Derivat, das eine positive Ladung trägt (s. Tabelle 3.1). Unter Ausbildung einer Disulfidbrücke lässt sich diese Ladung in die TM2 des hP2X7R einführen. Durch das Einbringen einer positiven Ladung in die Ionenkanalpore sollte der Ionenstrom behindert werden (Gouaux und MacKinnon, 2005). Die Vorversuche zeigten allerdings, dass dies nur bei der P2X7R-Mutante S342C auftrat (s. Abb. 3.2).

Basierend auf diesen Vorversuchen wurden die Cysteinmutanten ausgewählt, die eine ausgeprägte Reaktion auf MTSEA aufwiesen. Diese sind der der Abbildung 3.2 blau hervorgehoben und werden im Ergebnis- und Diskussionsteil näher betrachtet. Es wurden auch andere Mutanten untersucht, bei denen sich eine Reaktion auf MTSEA andeutete (K327C, D329C, I330C, L333C, L346C, F353C, D356C, T357C). Hier zeigte sich jedoch, dass die Verminderung der Stromamplituden nicht durch MTSEA-Applikation, sondern durch die wiederholte ATP-Applikation selbst hervorgerufen wurde (siehe Abb. 5.7). Das heißt, diese Konstrukte zeigten ein gewisses desensibilisierendes Verhalten. Hierauf wird in dieser Arbeit allerdings nicht weiter eingegangen.

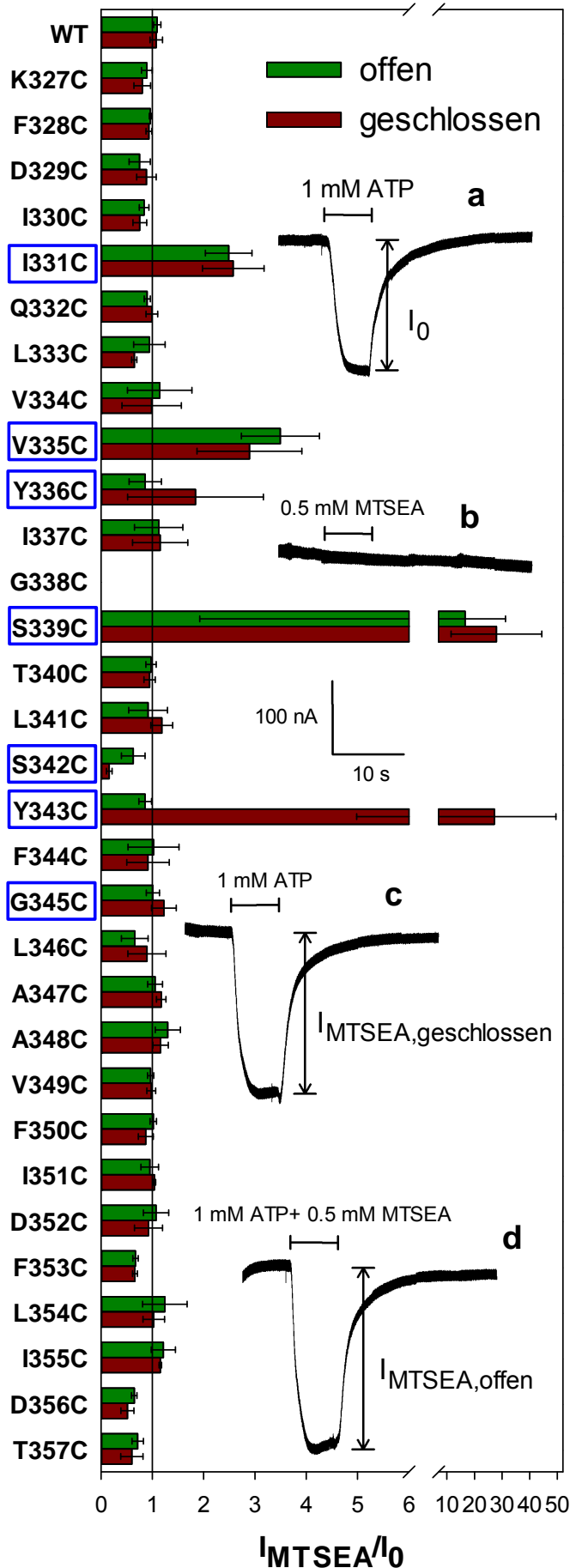


Abb. 3.2: Effekt von MTSEA auf hP2X7R-Cysteinmutanten.

Übersicht über die Effekte von MTSEA auf His⁶-getagte Cystein-Mutanten der TM2 von hP2X7R, die heterolog in Xenopus-Oozyten exprimiert wurden. hP2X7R-abhängige Ströme wurden nach 6 s Applikation von 1 mM ATP bzw. 0,5 mM MTSEA bei einem Haltepotenzial von -40 mV gemessen. Daten wurden größtenteils durch Tanemasa Rahn zur Verfügung gestellt und notfalls durch eigene Messungen ergänzt.

I_0 – Stromamplitude der ersten ATP-Applikation,

geschlossen – Stromamplituden durch ATP nach der Applikation von MTSEA ohne ATP (Verhältnis von (c) zu (a)).

offen – Stromamplituden durch gleichzeitige Applikation von ATP und MTSEA (Verhältnis von (d) zu (a)).

Die Amplituden der ATP-induzierten Ströme nach Applikation von oder gleichzeitiger Applikation mit MTSEA wurden auf I_0 normiert. N = 6-13 Oozyten.

Blau – Konstrukte, die in der Arbeit näher betrachtet werden.

(a) Erste ATP Applikation.

(b) Nach 3 min Wartezeit, Applikation von MTSEA.

(c) Zweite ATP Applikation.

(d) Gemeinsame Applikation von ATP und MTSEA.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Sigma Aldrich (Deisenhofen) verwendet. Natrium-ATP wurde von Roche (Mannheim) bezogen. Die geladenen MTS-Derivate stammten von Anatrace Affymetrics (Maumee, OH, USA). Das ungeladene Hydroxy-benzoyl-MTS stammt von Toronto Chemicals (Toronto, Canada).

4.2 Lösungen

Für die Herstellung der Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet.

4.2.1 Kollagenase-Lösung

15 mg Kollagenase auf 10 ml Barth-Medium 1'Ca (s. 4.2.3)

4.2.2 Narkose-Lösung

0,2 % Tricain-Lösung mit 4,3 mM HEPES und pH 7,4

4.2.3 Aufbewahrungslösungen

Barth-Medium 0'Ca: 84 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 7,5 mM Tris, 2,4 mM NaHCO₃, 0,82 mM MgSO₄, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, pH 7,4

Bart-Medium 1'Ca: 84 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 7,5 mM Tris, 2,4 mM NaHCO₃, 0,82 mM MgSO₄, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, pH 7,4

Die Lösungen wurden nach der Herstellung steril filtriert und bei 19 °C aufbewahrt.

4.2.4 Badlösungen

ORi 112.5: 100 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4

ORi 002.5: 100 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM HEPES, pH 7,4

Aus diesen Basislösungen wurden die einzelnen Messlösungen aus Punkt 4.2.5 hergestellt.

4.2.5 Messlösungen

ORi 002.5: s.o.

ORi 002.5 1'ATP: 100 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM Flufenaminsäure, 1 mM ATP, 5 mM Hepes, pH 7.4

Die oben genannte Lösung mit ATP konnten für die einzelnen Experimente noch verdünnt werden, so dass Lösungen mit niedrigerer ATP-Konzentration hergestellt wurden, wenn es die Versuchsdurchführung erforderte. In allen Lösungen wurde je nach Bedarf eine der vier MTS-Derivate gelöst und deren Verhalten auf die jeweiligen hP2X7R-Konstrukte untersucht.

4.2.6 Elektrodenlösung

Die Mikroelektroden für die Ganzzell-Strommessungen wurden mit 3 M KCl-Lösung befüllt.

4.3 Methoden

Die Synthese der genutzten cRNA, die Bestimmung der Expressionsraten (Ergebnisse Punkt 5.2, Abb. 5.3 - 5.5, Tabelle 5.1), sowie sämtliche Fluoreszenzdaten in An- und Abwesenheit von ATP (Abbildung 5.5) wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Günter Schmalzing (RWTH Aachen) durchgeführt.

In Tabelle 4.4 sind die genutzten Konstrukte und ihre Originalkonzentration aufgeführt. Die cRNA wurde nach Synthese und nach dem Versand bei -80 °C gelagert.

4.3.1 Präparation der *Xenopus laevis*-Oozyten

Als Expressionssystem für cRNA vom humanen P2X7R dienten Oozyten vom afrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*). Die Frösche wurden von Xenopus Express (Vernassal, Frankreich) bezogen. Die Tiere wurden bei einer Beckentemperatur von 19 °C gehalten, dies gilt auch für die entnommenen Eizellen während der Präparation und Aufbewahrung.

Zur teilweisen Entnahme des Ovars, wurden die Frösche mit einer 0,2 %igen Tricain-Lösung narkotisiert. Die Bauchhaut und die Muskelschicht wurden mittels Schere eingeschnitten, ein Teil des Ovars wurde zwischen den abdominalen Organen mit Hilfe einer Pinzette gegriffen und durch die Operationswunde gezogen. Ein kleiner Abschnitt des Ovars wurde abgetrennt und dann in eine Glaspetrischale überführt. Dieser Ovarteil wurde mittels Pinzetten klein gezupft, um die Oberfläche für die kurz danach zugegebene Kollagenase-Lösung zu erhöhen. Die Oozyten wurden nach der Kollagenasezugabe für 4-6 Stunden schüttelnd im Inkubator bei 19 °C aufbewahrt. Die Zeit richtete sich nach Oozytenmenge, Ovardichte und Anzahl der Operationen am jeweiligen Frosch.



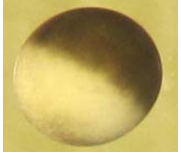



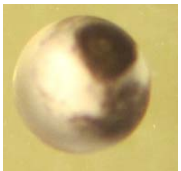
Nach erfolgter Organentnahme wurde die Wunde mit selbst-verdauenden Fäden vernäht. Mit einer Rundnadel wurden vom Bauchraum her die Fäden zuerst durch den von den inneren Organen mittels Pinzette abgehobenen Bauchmuskel gezogen. Danach wurde kurz neben dem Wundrand mit der Nadel in die Lederhaut eingestochen und der Faden ebenfalls durchgezogen und mit Doppelschlingen verknotet. Die Prozedur des Vernähens wurde an vier Stellen des Wundrandes durchgeführt. Nach dem Vernähen wurde der Frosch kurz unter fließendem Wasser abgespült und in ein kleines Aufwachbecken gesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass der Kopf nicht unter die Oberfläche der enthaltenen Meersalzlösung (0,5 %) geriet, um ein Ertrinken zu verhindern. Das Becken wurde mit einem Tuch abgedeckt und der Frosch bis zum Aufwachen nicht weiter gestört. Nach dem Aufwachen wurde er für einige Tage in ein Quarantänebecken gesetzt. Nach 3-4 Tagen war die Wunde äußerlich gut verheilt.

Nach Beendigung der Inkubation mit Kollagenase wurden die Zellen in ein steriles Greinerröhrchen überführt und mit 10 ml Barth-Medium 0'Ca versetzt. Der Überstand wurde nach kurzem Schwenken abgesaugt. Diese Prozedur wurde mehrfach wiederholt. Nach dem ersten Spülen wurden 25 ml Barth-Medium 0'Ca zugegeben und bei Raumtemperatur (RT) für 10 min inkubiert. Durch das Fehlen von Ca^{2+} in der Barth-Lösung wurden die Zell-Zell-Kontakte (*gap junctions*) zwischen den Oozyten und dem umgebenen Follikelgewebe gelöst.

Nach diesen 10 min wurden die Oozyten mit Barth-Medium 1'Ca-Lösung mehrfach gespült und abschließend in dieser Lösung bis zur weiteren Verwendung bei 19 °C

aufbewahrt. Verwendet wurden für die heterologe Expression nur Zellen der Stadien IV und V (s. Tabelle 4.1).

Tab. 4.1: Entwicklungsstadien der Oozyten vom *Xenopus laevis* (Dumont 1972).
Bilder wurden selbst aufgenommen und mit Irfan View bearbeitet.

Stadium	Durchmesser [μm]	Merkmale	Bild
I	35-300	Blass, transparentes Zytoplasma	
II	300-400	Trüb weißlich	
III	400-500	Beginnende Pigmentierung, graubraun	
IV	500-1000	Polarität (animaler Pol braun, vegetativer hell)	
V	1000-1200	Vegetativer Pol mehr grau, weißes Band zwischen den Hemisphären	
VI	1200-1300	Pigmentarme Zone auf animaler Hemisphäre	
apoptotisch	500-1200	Keine Poltrennung, marmoriert, kann in allen Zellstadien auftreten	

4.3.2 cRNA-Injektion

Die cRNA wurde vor der Injektion mit RNase-freiem deionisiertem Wasser auf die in Tabelle 4.4 angegebenen Konzentrationen verdünnt.

Die Injektion der Volumina von 23 nl in die einzelnen Oozyten erfolgte mittels einer an einem Mikromanipulator angeschlossenen Mikroinjektionsspritze. Die cRNA wurde direkt zwischen die Hemisphären gespritzt.

Die Zellen wurden anschließend für zwei Tage bei 19 °C inkubiert.

4.3.3 Elektrophysiologie – Ganzzellanalysen

Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten bei Raumtemperatur per Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme zwei Tage nach Oozytenentnahme und cRNA-Injektion.

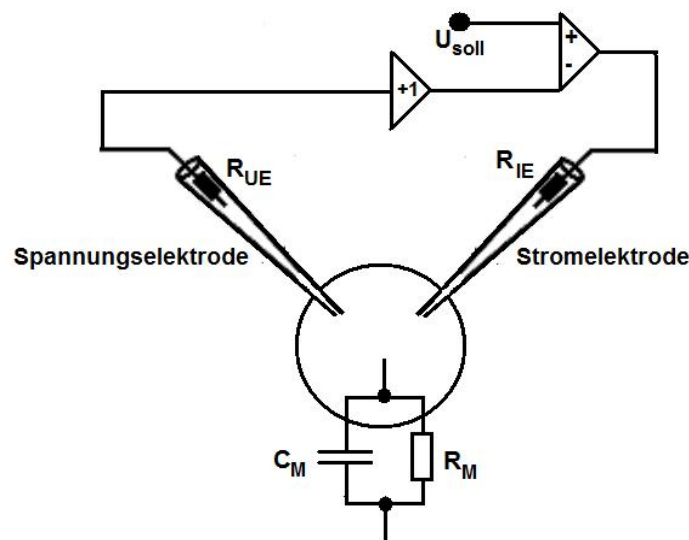


Abb. 4.1: Schema der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme.

Über eine Spannungselektrode wird die Membranspannung mit der eingestellten Sollspannung verglichen und mittels einer Stromelektrode werden Differenzen kompensiert. Nach Abbildung 3.11A aus (Sherman-Gold, R., 93).

Zur Messung wurden Silber-/Silberchlorid-Elektroden verwendet. Diese wurden in aus Borosilicatglas gefertigte Kapillaren, die mit 3 M KCl-Lösung gefüllt wurden, gesteckt. Die Widerstände der Kapillaren (= Spannungs- und Stromelektrode in Abb. 4.1 und 4.4) lagen zwischen 1.0 und 1.6 M Ω . Durch einen Oozyten-Spannungsklemmverstärker (OC-725A, Hamdon, USA) wurden die Zellen auf die gewünschte Spannung geklemmt und alle gemessenen Ströme wurden verstärkt.

Die Rohdaten wurden mit der Software Superpatch-2000 aufgenommen und analysiert.

Die Lösungen durchflossen eine 0,1 ml fassende Kammer mit einer Volumenstromstärke von ca. 0,75 $\mu\text{l/s}$. Die erforderlichen schnellen Lösungswechsel wurden durch zwei computergesteuerte Magnetventile erreicht, die ein U-Rohrsystem steuerten (Bretschneider und Markwardt, 1999). Beim Lösungswechsel wurde eine Einwaschzeit von 1270 ± 70 ms und eine Auswaschzeit von 1770 ± 170 ms erreicht (Klapperstück et al., 2000).

Der Abgleich der Elektrodenpotenziale erfolgte in der oben genannten ORI 112.5-Lösung vor dem Einstechen der Mikroelektroden, das Messen dann in den calcium- und magnesiumfreien Messlösungen (ORI 002.5). Es wurde ein Haltepotenzial von -40 mV festgesetzt, bei dem die meisten Strommessungen erfolgten (Änderungen werden gesondert erwähnt).

Ein Schema der verwendeten Apparatur und des U-Rohrsystems ist in den Abbildungen 4.2 und 4.3 zu finden.

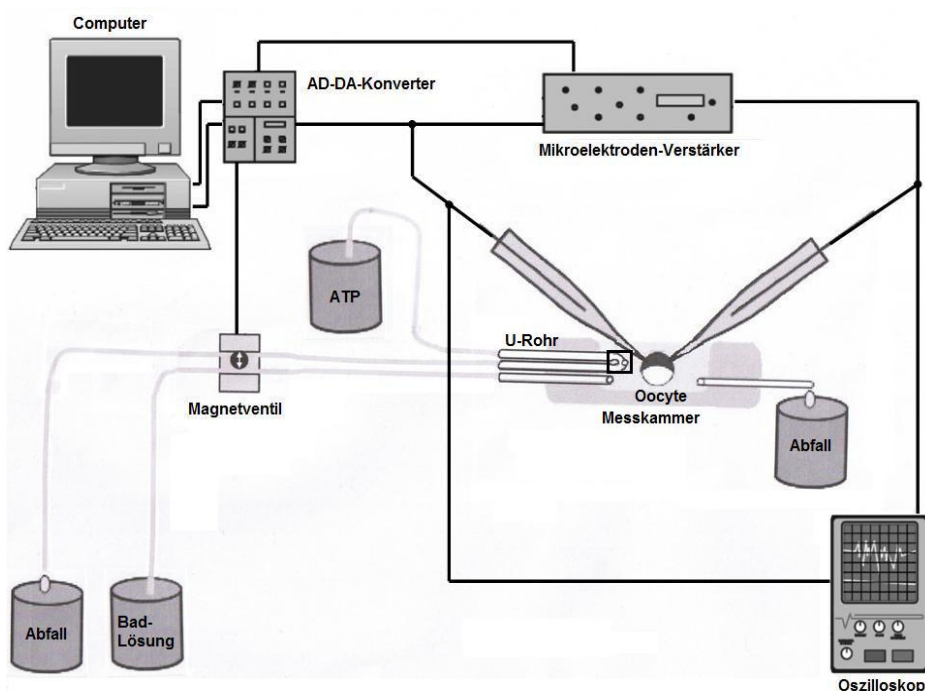


Abb. 4.2: Schema Messplatz.

Via Mikroelektroden-Verstärker und AD-DA-Konverter werden Kommando-Spannungssignale vom Rechner auf die Elektroden und Stromsignale von den Elektroden auf den Rechner übertragen; sie lassen sich zeitgleich durch das Oszilloskop verfolgen. Die Magnetventile lassen sich computergesteuert umschalten und somit das U-Rohr (schwarzer Rahmen, s. Abb. 4.3) zu definierten Zeitpunkten öffnen und schließen. Nach Abbildung 1b aus (Becker 2008a) adaptiert.

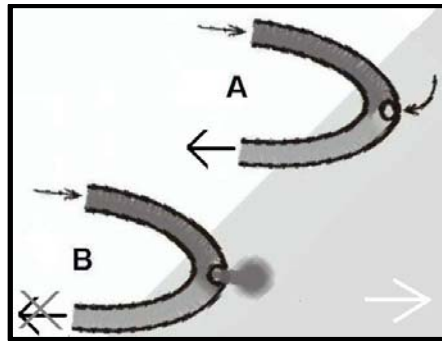


Abb. 4.3: Schema U-Rohrsystem.

Vergrößerung des schwarzen Rahmens aus Abb. 4.2.

A: Abfluss des U-Rohrs ist offen.

Auf Grund des Unterdrucks an der U-Rohröffnung und der Oberflächenspannung wässriger Lösungen fließt aus der Öffnung des U-Rohrs keine Lösung in die Messkammer, Badlösungen werden ebenso wie die U-Rohrlösung durch die linke Pumpe (schwarzer Pfeil) abgesaugt.

B: U-Rohr-Abfluss ist geschlossen. Auf Grund der fehlenden Saugleistung von links fließt jetzt die Messlösung aus dem U-Rohr in die Messkammer, über die Oozyte und wird durch die rechte Pumpe (weißer Pfeil) abgesaugt.

Der Wechsel der beiden Zustände wird durch computergesteuerte Magnetventile erreicht. Nach Abbildung 1 aus (Bretschneider und Markwardt, 1999) adaptiert.

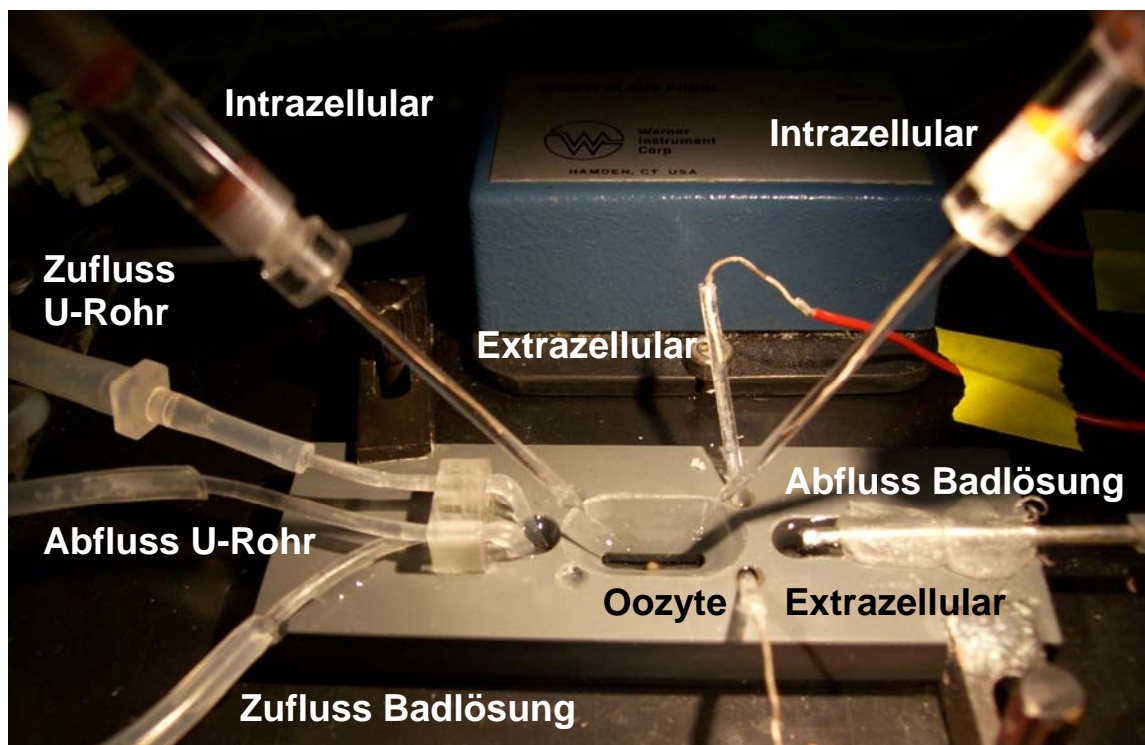


Abb. 4.4: Messkammer und Elektrodenverteilung bei TEVC.

Bei der TEVC werden vier Elektroden genutzt. Die linke Intrazellularelektrode entspricht der Spannungselektrode und die rechte Elektrode der Stromelektrode. Das Bild wurde selbst aufgenommen und mittels Irfan View und Microsoft Paint bearbeitet.

Für die Herstellung der ATP-Lösungen wurden Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Lösungen (ORi 002.5) verwendet, um eine durch bivalente Kationen hervorgerufene Komplexbildung mit ATP^{4-} zu vermeiden. Durch zweifach positiv geladene Ionen wird freies ATP^{4-} gebunden und steht somit für die Aktivierung des hP2X7R nicht mehr zur Verfügung (Di Virgilio, 1995; Markwardt et al., 1997). Durch den Ausschluss von Ca^{2+} und Mg^{2+} konnte bei den Messungen von einer freien ATP^{4-} -Konzentration von 1 mM in der ORi 002.5 1'ATP-Lösung ausgegangen werden, die dann je nach Bedarf noch auf 0.1 oder 0.01 mM verdünnt wurde. Allerdings führt die Entfernung von bivalenten Kationen aus der Lösung zu einem Leckstrom, der durch 0,1 mM Flufenaminsäure gehemmt wurde (Weber et al., 1995).

Für die Ermittlung der Rezeptoraktivität wurde der ATP-induzierte Strom $I_{\text{act,ATP}}$ als Differenz zwischen dem Strom am Ende der ATP^{4-} -Applikation und dem vor der Applikation vorherrschenden Haltestrom (Leckstrom) gemessen (s. Punkt 4.3.6, Abb. 4.5).

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels des Programms SP_Analyzer. Zur Überführung der Daten in Microsoft Excel wurde das Programm Lotus (Lotus Development Corporation, Cambridge, USA) genutzt.

Zur weiteren Auswertung wurde Microsoft Excel herangezogen; die graphische Darstellung der Ergebnisse und Stromverläufe sowie die Approximation der Stromzeitverläufe erfolgte mittels Sigmaplot (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

Die gemittelten Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler aufgeführt bzw. dargestellt.

Die statistische Signifikanz bei Differenzen von Mittelwerten wurde nach Varianzanalyse (ANOVA) durch paarweise multiplen T-Test mittels Sigmastat (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) untersucht. Die Signifikanzschwelle wurde bei $P < 0,05$ festgelegt.

4.3.4 Versuchsprotokolle

Es kamen zwei verschiedene Protokolle zum Einsatz. Zum einen wurde die Wirkung von MTS-Derivaten in Anwesenheit von ATP getestet (Protokoll A, offener Zustand, Tabelle 4.2) und zum anderen erfolgte die Messung der Ganzzellströme, wenn zwischen zwei ATP-Applikationen MTSEA appliziert wurde, ohne den Kanal dabei zu öffnen (Protokoll B, geschlossener Zustand, Tabelle 4.3).

Auf diese Weise konnte einerseits getestet werden, ob die SH-Seitenketten sich während der Öffnungsphase in der Pore befinden und damit zugänglich waren und andererseits, ob sich die Cysteinseitenkette ohne Anwesenheit von ATP (d.h. ohne Öffnen der Kanalpore) modifizieren ließ.

Beim Protokoll A wurden verschiedene Klemmspannungen (Haltepotenzial V_h) bei Applikation von MTSEA auf die Zellen verwendet: -80 mV, -40 mV, -20 mV, +20 mV. Auf diese Weise war es möglich, zu testen, ob eine Spannungsabhängigkeit der Seitenkettenmodifizierung mit MTSEA vorlag und damit, ob sich die modifizierte Aminosäure im elektrischen Feld der Zellmembran befand.

Diese Versuchsanordnung bei $V_h = -40$ mV wurde ebenfalls mit MTSET durchgeführt, das ebenfalls einen positiven Rest an die SH-Seitenkette anbaut, welcher allerdings größer als bei MTSEA ist. So konnte getestet werden, ob die Größe des einzubauenden Restes Einfluss auf die Kanalaktivität ausübt.

Mit dem negativ geladenen MTS-Derivat MTSES wurden ebenfalls Experimente in dieser Versuchsanordnung bei $V_h = -40$ mV und +20 mV durchgeführt.

Für Messungen nach dem Protokoll A (s. Tabelle 4.2) wurden über die Oozyte verschiedene ATP-haltige Lösungen nacheinander ohne Unterbrechung geleitet. Beim Protokoll B lagen zwischen jeder ATP-Applikation Zeiträume, in denen nur Ori 002.5 über die Zelle floss, weiterhin als Zwischenlauf bezeichnet. Diese Lösung floss auch beim Start und zum Ende der Messung über die Zelle als Vor- bzw. Nachlauf. Die jeweilige Konzentration an ATP und MTS sind bei den Ergebnissen gesondert aufgeführt.

Tab. 4.2: Lösungswechsel bei Applikation von MTSEA im offenen Kanalzustand.

Protokoll A	Lösung	Dauer bis Lösungswechsel
Vorlauf	ORi 002.5	18s
1. Applikation	ORi 002.5 ATP	18s
2. Applikation	ORi 002.5 ATP + MTS	18s
3. Applikation	ORi 002.5 ATP	18s
Nachlauf	ORi 002.5	60s

Tab. 4.3: Lösungswechsel bei Applikation von MTSEA im geschlossenen Zustand.

Protokoll B	Lösung	Dauer der Applikation
Vorlauf	ORI 002.5	18s
1. Applikation	ORi 002.5 ATP	6s
Zwischenlauf	ORI 002.5	45s
2. Applikation	ORi 002.5 MTSEA	6s
Zwischenlauf	ORI 002.5	45s
usw. 3. – 6. Applikation	ORi 002.5 ATP	6s
Zwischenlauf	ORI 002.5	45s
7. Applikation	ORi 002.5 ATP	6s
Nachlauf	ORI 002.5	18s

Die unter Punkt 3.2 ausgewählten Konstrukte wurden nach den oben genannten Versuchsprotokollen untersucht.

4.3.5 cRNA-Konzentration

Wie in Tabelle 4.4 ersichtlich ist, besitzen alle verwendeten cRNA-Lösungen verschiedene Konzentrationen. Um eine Überexpression und damit zu große Ströme zu vermeiden, wurden die cRNA-Konzentrationen so eingestellt, dass bei einer verwendeten ATP-Konzentration von 0.1 mM Ströme mit einer Amplitude von etwa 100 – 500 nA induziert wurden. Bei vier Konstrukten wurde von diesem Schema abgewichen. hP2X7R-Y336C, -S339C und -G345C zeigten eine so schwache Reaktion auf ATP-Applikation, dass die cRNA unverdünnt injiziert und die Versuche mit 1 mM ATP durchgeführt wurden. Das Konstrukt hP2X7R-Y343C war anscheinend bei Verwendung von 0.1 mM ATP bereits maximal aktiviert und wurde deshalb durch MTSEA kaum weiter stimuliert. Um eine gute Expression, aber messbare Ströme gewährleisten zu können, wurden die Experimente daher mit 0,01 mM ATP durchgeführt.

Tab. 4.4: Verwendete Konstrukte.

Konstrukt	Ausgangskonzentration [µg/µl]	Verdünnung	injizierte Menge [µg]	C _{ATP} [mM]	C _{MTSEA/T/S} [mM]
his-hP2X7R-WT	0,6	1:10	1,38	0,1	0,5
his-hP2X7R-I331C	0,52	1:100	0,1196	0,1	0,025
his-hP2X7R-V335C	0,58	1:300	0,045	0,1	0,025
his-hP2X7R-Y336C	0,72	1:1	16,56	1	0,5
his-hP2X7R-S339C	0,58	1:25	0,53	1	0,025
his-hP2X7R-S342C	0,57	1:10	1,31	0,1	0,025
his-hP2X7R-Y343C	0,6	1:10	1,38	0,01	0,1
his-hP2X7R-G345C	0,5	1:1	11,5	0,1	0,5

4.3.6 Charakterisierung der Ströme

Für die Charakterisierung der ATP-induzierten Ströme wurden entweder der absolute Natriumstrom ($I_{\text{act,ATP}}$) (bei Untersuchung der Wirkung der MTS-Applikation im geschlossenen Kanalzustand, s. Abb. 4.5) oder gesamte Stromverläufe exportiert (s. Abb. 5.10 – 5.16), welche dann mittels Sigmaplot approximiert wurden.

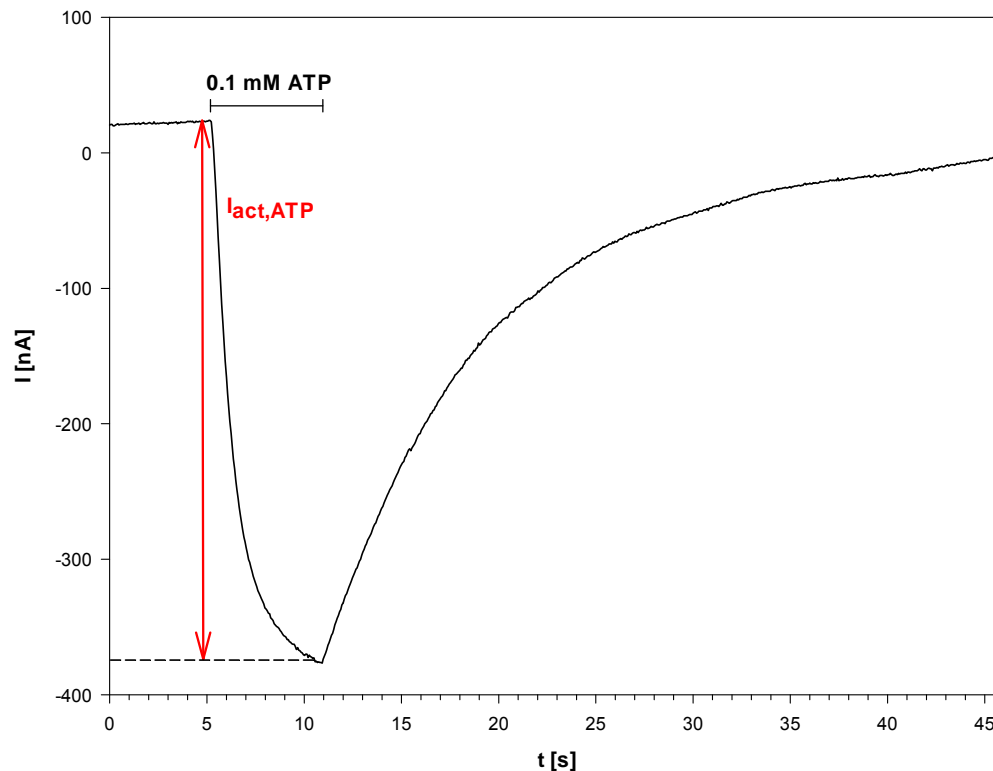


Abb.4.5: Lage der Messpunkte bei 6 s ATP-Applikation.

Beispielstrom des his-hP2X7R-WT in ORI 002.5. Die Zeit der ATP^{4-} -Applikation (6 s) ist angegeben. Die Messung wurde bei einem Haltepotenzial von -40 mV in calcium- und magnesiumfreier Lösung durchgeführt (ORI 002.5). Der Stromverlauf ist als schwarze Linie dargestellt. Messungen nach Injektion von 23 nl RNA-Lösung und zweitägiger Inkubationszeit.

4.3.7 Modell der hP2X7R Struktur

Die für diese Arbeit genutzten Strukturmodelle des hP2X7R wurden durch Dr. Achim Kless (Grünenthal GmbH, Aachen) generiert.

Die Homologie-Modelle des offenen und des geschlossenen humanen P2X7R wurden mittels Standard-Modelltechniken, die in MOE2012.10 (Molecular Operating Environment 2012, CCG, Montreal, Canada) implementiert sind, generiert. Dazu wurden die Kristallstrukturen des P2X4R des Zebrafisches als Vorlage genutzt (PDB Codes: 4DW0, 4DW1) (Hattori und Gouaux, 2012; Kawate et al., 2009). Die Sequenz des hP2X7R wurde von der UniProtKB-Datenbank (ID Q99572) abgerufen. Sequenz-Alignments zwischen den Vorlagen und der Modellsequenz wurden mittels der BLOSUM62-Substitutionsmatrix durchgeführt und durch die 10 bekannten konservierten extrazellulären Cysteinreste beschränkt.

Der lange intrazellulär gelegene C-Terminus wurde ab Position I355 entfernt, da auch die zfP2X4R-Modelle C-terminal verkürzt waren. Das initiale Homologie-Modell wurde aus 250 generierten Modellen ausgewählt. Es zeigte die beste Wertung im Bezug auf die elektrostatische Solvatisierungsenergie, die durch Verwendung einer generalisierten Born/Volumen Integral Methode berechnet wurde (Labute, 2008). Zur abschließenden Protonierung diente der Protonate3D Algorithmus (Labute, 2009). Das endgültige Homologiemodell wurde mittels Amber99 force field (Summa und Levitt, 2007) optimiert. Die Energieminimierung wurde bei einem RMSD < 0,1 Å beendet. Die allumfassende strukturelle Qualität des finalen Modells wurde mittels Ramachandran-Plot überprüft.

Die auf diese Weise erstellten Modelldaten vom humanen P2X7R wurden mit der Software PyMol (Version 1.3, Schrodinger LLC) eingelesen, gefärbt und dargestellt.

5 Ergebnisse

Alle für die Ganzzellmessungen verwendeten Konstrukte waren am N-Terminus mit einer Hexahistidylsequenz versehen. Dies wird in der folgenden Ergebnisdarstellung nicht weiter erwähnt. Die Ergebnisse von Punkt 5.2 mit den Abbildungen 5.3-5.5 wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Günter Schmalzing (RWTH-Aachen) angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Alle Messungen wurden unter Standardbedingungen (Haltepotenzial von -40 mV, Injektion von 23 nl cRNA bei zweitägiger Inkubationszeit der Oozyten) durchgeführt. Die Konzentrationen von ATP und der MTS-Derivate sowie die Anzahl der Oozyten sind in den Abbildungen bzw. den zugehörigen Legenden angegeben. Bei Balkendiagrammen wurden Mittelwerte \pm Standardfehler aufgetragen. Abweichungen von diesen Bedingungen werden gesondert erwähnt.

5.1 Negativkontrollen

Zur Überprüfung, ob die gemessenen Ströme durch die ATP-Applikationen zustande kamen, wurden verschiedene Negativkontrollen durchgeführt und mit dem Verhalten des hP2X7R-WTs verglichen.

In Abb. 5.1 sind die Stromverläufe für den WT und die drei Negativkontrollen keine Injektion (NK Nichts), Injektion von Mineralöl (NK Öl) und Injektion von Wasser (NK Wasser) zusammengefasst. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass bei den Negativkontrollen keine spezifisch aus einer ATP-Applikation resultierenden Stromveränderungen aufgetreten waren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass alle Stromausschläge während einer ATP-Applikation beim WT und den betreffenden Konstrukten auf die Ligandenbindung und den damit verbundenen Ionenfluss zurückzuführen sind. Eine Zusammenfassung der durch ATP verursachten Natriumströme findet sich in Abbildung 5.2.

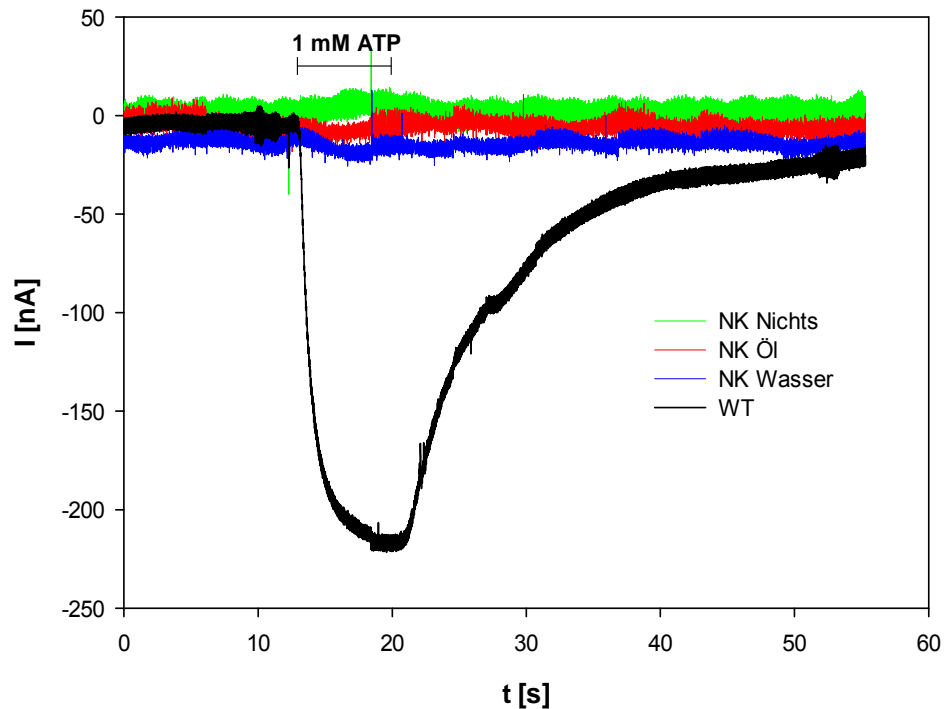


Abb. 5.1: ATP-induzierte Stromverläufe von hP2X7R-WT und Negativkontrollen.

Die Zeit der ATP^{4-} -Applikation betrug 6 s. Die Messung erfolgte unter Standardbedingungen nach Injektion von 23 μl entsprechender Lösungen bzw. 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA-Lösung und nach zweitägiger Inkubation. Für die Negativkontrollen wurden den Zellen nichts, Mineralöl bzw. RNase-freies Wasser injiziert. Die Messdaten sind als farbige Linien aufgeführt.

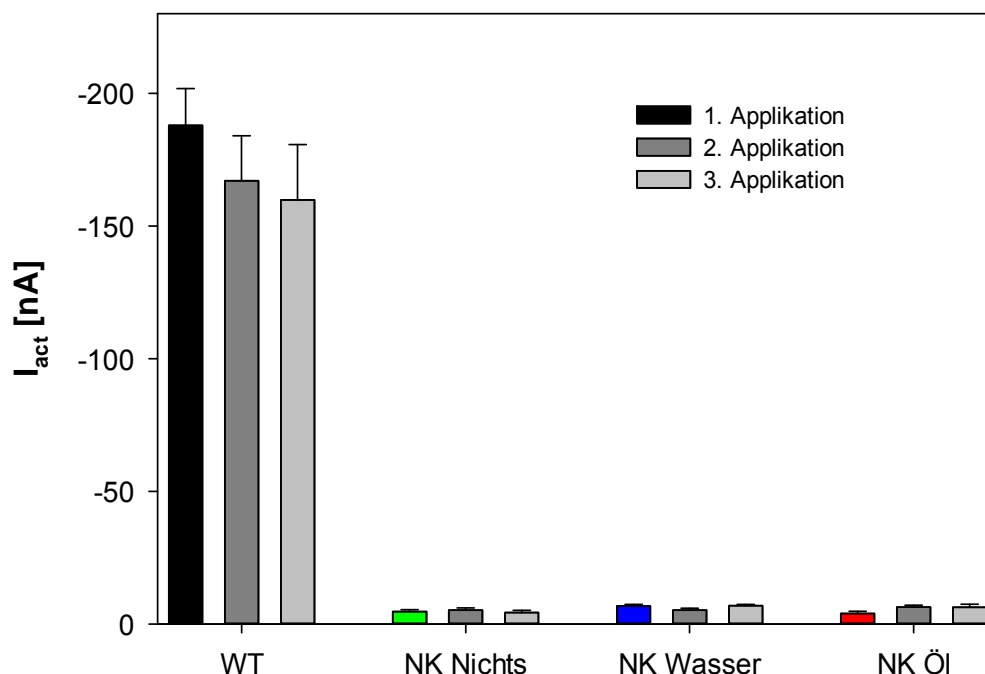


Abb. 5.2: Mehrfachaktivierung von hP2X7R-WT und Negativkontrollen.

Die ATP-induzierten Stromamplituden (I_{act} , s. Abb. 4.5) wurden für drei aufeinander folgende Applikationen gemessen. Jede Applikation von 1 mM ATP dauerte 6 s, dazwischen lagen jeweils 2 min Pause. Die erste Applikation ist analog zur farblichen Kennzeichnung aus Abbildung 5.1 farblich dargestellt. $N = 6-42$ Oozyten.

5.2 Expressionsraten

In Abbildung 5.3 ist die Gesamtzellexpression für die im Detail untersuchten Mutanten im Vergleich zum WT dargestellt. Aufgrund des geringen Unterschiedes zwischen der Gesamtzellexpression der einzelnen Konstrukte kann geschlossen werden, dass die verschiedenen cRNAs gut translatiert und prozessiert wurden.

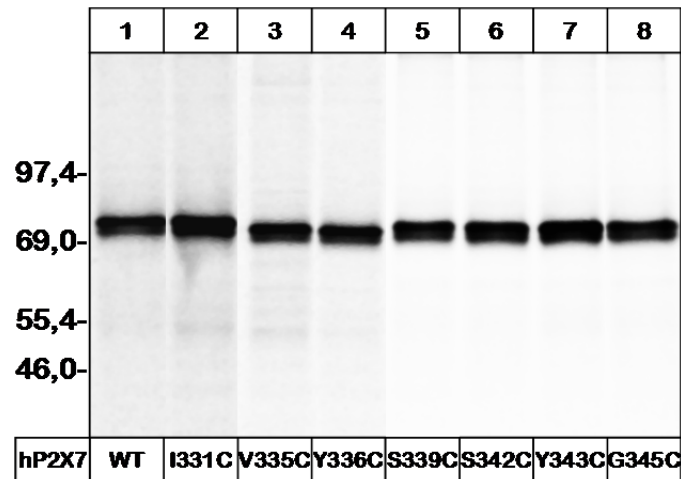


Abb. 5.3: Gesamtexpression verschiedener hP2X7R-Konstrukte.

Die Proteinbanden stammen aus verschiedenen Gelen und wurden für dieses Bild digital assembliert. Für die Bestimmung der Gesamtexpression wurde L-[³⁵S]-Methionin verwendet. Die Lage der Bande eines Monomers des jeweiligen hP2X7R-Konstruktes ist mit 75 kDa angegeben. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Michaela Stolz (RTWH Aachen) zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 5.4 sind die Resultate der Oberflächenexpressionsprüfung dargestellt, die Rückschlüsse auf den Proteineinbau in die Zellmembran zulassen. Hier (s. auch Tab. 5.1) ist ersichtlich, dass die Konstrukte S339C, Y343C und G345C schlechter als der WT in der Zellmembran eingebaut wurden.

In Tabelle 5.1 wurden die Statistiken der Oberflächenexponiertheit und der ATP-induzierten Ströme der einzelnen Konstrukte, normiert auf die Werte des WT-Konstruktes, zusammengefasst. Die mit einem Sternchen versehenen Konstrukte wiesen eine Oberflächenexponiertheit bzw. einen ATP-abhängigen Strom auf, die/der signifikant vom WT-Niveau abwich. Beim Vergleich der Oberflächenexpression mit den ATP-induzierten Strömen ist ersichtlich, dass keine Korrelation zwischen den beiden Messwerten besteht. So war beispielsweise die Oberflächenexpression für das Konstrukte hP2X7R-Y343C deutlich niedriger als für den WT, während die ATP-induzierte Stromantwort über dem WT-Niveau lag. Wie spätere Messungen zeigten, lag die Ursache hierfür an

der unterschiedlichen Offenwahrscheinlichkeit der Ionenkanäle der einzelnen Konstrukte.

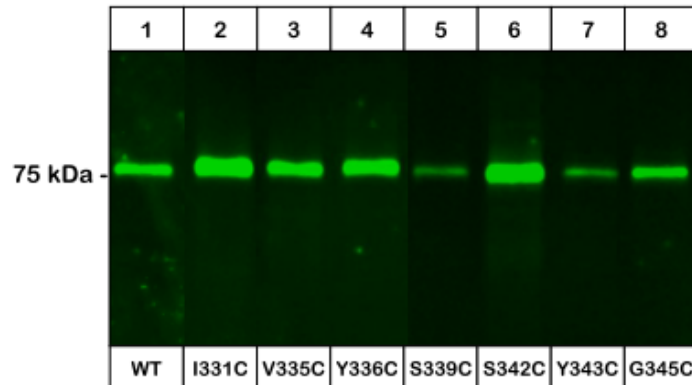


Abb.5.4: Oberflächenexpression verschiedener hP2X7R-Konstrukte.

Die Proteinbanden stammen aus verschiedenen Gelen und wurden für dieses Bild digital assembliert. Für die Bestimmung der Oberflächenexpression wurde fluoreszierender Cy5-Mono-NHS-Ester verwendet. Die Lage der Bande eines Monomers des jeweiligen hP2X7R-Konstruktes ist mit 75 kDa angegeben. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Michaela Stolz (RTWH Aachen) zur Verfügung gestellt.

Tab.5.1: Vergleich Fluoreszenzsignal von Zelloberfläche und Ganzzellstrom.

* - signifikante Abweichung vom WT-Niveau ($P < 0,05$)

Konstrukt	$\frac{\text{Fluoreszenzsignal}_{\text{Konstrukt}}}{\text{Fluoreszenzsignal}_{\text{Wildtyp}}}$	$\frac{\text{ATPsignal}_{\text{Konstrukt}}}{\text{ATPsignal}_{\text{Wildtyp}}}$
hP2X7R-WT	1	1
hP2X7R-I331C	1.31	4.319 *
hP2X7R-V335C	1.51 *	5.499 *
hP2X7R-Y336C	1.11	0.001 *
hP2X7R-S339C	0.75 *	0.039 *
hP2X7R-S342C	1.21	0.238 *
hP2X7R-Y343C	0.47 *	1.214 *
hP2X7R-G345C	0.78	0.0018 *

In Abbildung 5.5 wurden die Fluoreszenzsignale von Cy5-Monomaleimid für die einzelnen Konstrukte in An- und Abwesenheit von ATP auf das Signal vom WT normiert dargestellt. Dadurch lassen sich Rückschlüsse über die Zugänglichkeit der freien Cysteinseitenketten ziehen. Der Farbstoff interagiert mit der Thiolgruppierung der Mutanten, ist allerdings nicht in der Lage, die Membran zu passieren. Die sieben näher untersuchten Konstrukte sind blau umrandet.

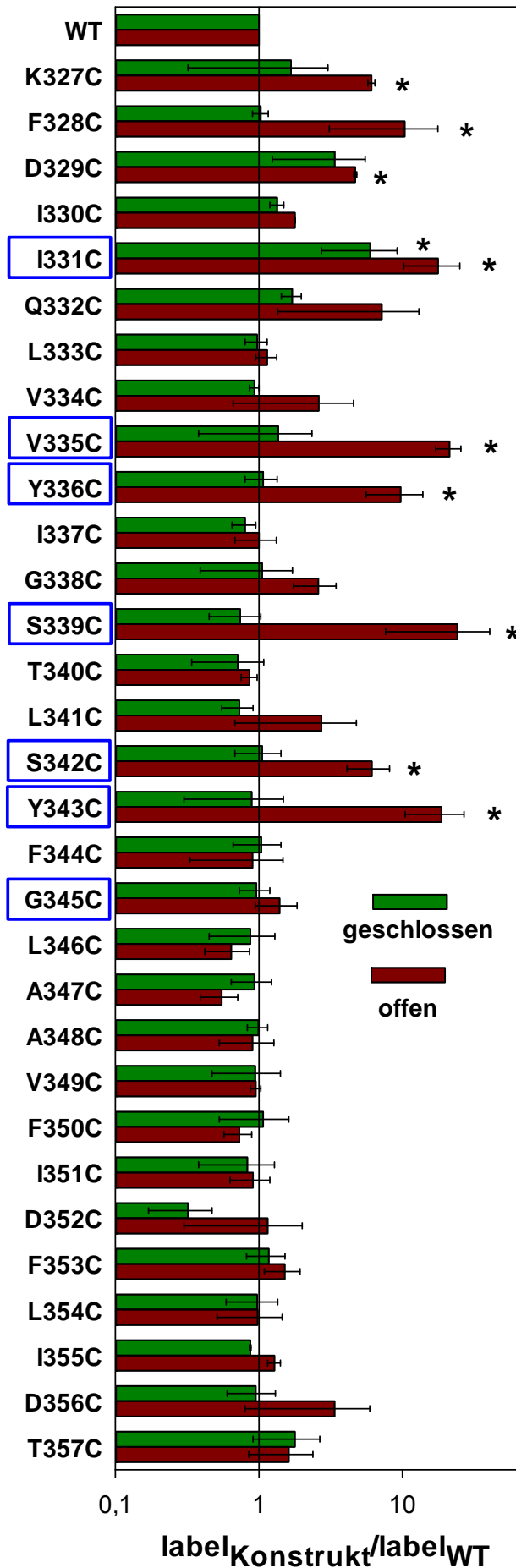


Abb. 5.5: Zugänglichkeit der SH-Seitenketten der TM2-Konstrukte in Ab- und Anwesenheit von ATP.

Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5-Monomaleimid angefärbt, aufgereinigt und mittels SDS-Page aufgetrennt. Die Signale wurden mittels Typhoon-Fluoreszenzimaging detektiert und ihre quantitative Fluoreszenz bestimmt. Die Daten wurden auf das WT-Niveau normiert.

* - signifikante Abweichung vom WT-Niveau ($P < 0,05$). $N = 3-8$ Oozyten. Die Rohdaten wurden freundlicherweise von Michaela Stolz (RTWH Aachen) zur Verfügung gestellt. Die sieben in dieser Arbeit besonders untersuchten Mutanten sind blau markiert.

Aus Abbildung 5.5 kann abgeleitet werden, dass sich die Zugänglichkeit des Cy5-Monomaleimid-Farbstoffes durch die Verwendung von ATP bei einigen Konstrukten deutlich erhöhte. Dazu gehören sechs der sieben hier untersuchten Konstrukte und zusätzlich noch drei Konstrukte mit den im oberen Bereich der TM2 gelegenen Mutationen K327C, F328C und D329C.

5.3 Sensibilisierung bzw. Desensibilisierung der Konstrukte gegenüber ATP

Zwecks Prüfung, ob etwaige Stromänderungen durch ATP-Applikationen (z.B. ATP-abhängige Sensibilisierung oder Desensibilisierung) oder durch die verwendeten Modifikatoren (MTS-Reagenzien) zustande kamen, wurden Mehrfachapplikationen mit ATP an den einzelnen Konstrukten durchgeführt. Dabei wurde getestet, wie sich mehrmalige ATP-Gaben ohne MTS-Reagenz auf die Stromantworten auswirkten. In Abbildung 5.6 sind die relativen Ströme in Relation zur ersten ATP-Applikation gesetzt. Erkennbar ist, dass nur bei zwei Konstrukten Mehrfachapplikationen mit ATP zu einer signifikanten Veränderung führten. Bei der Variante S339C sank und bei der Variante G345C stieg der ATP-induzierte Strom signifikant. Auf die Mehrfachapplikationen wird im Abschnitt 5.5 noch einmal näher eingegangen.

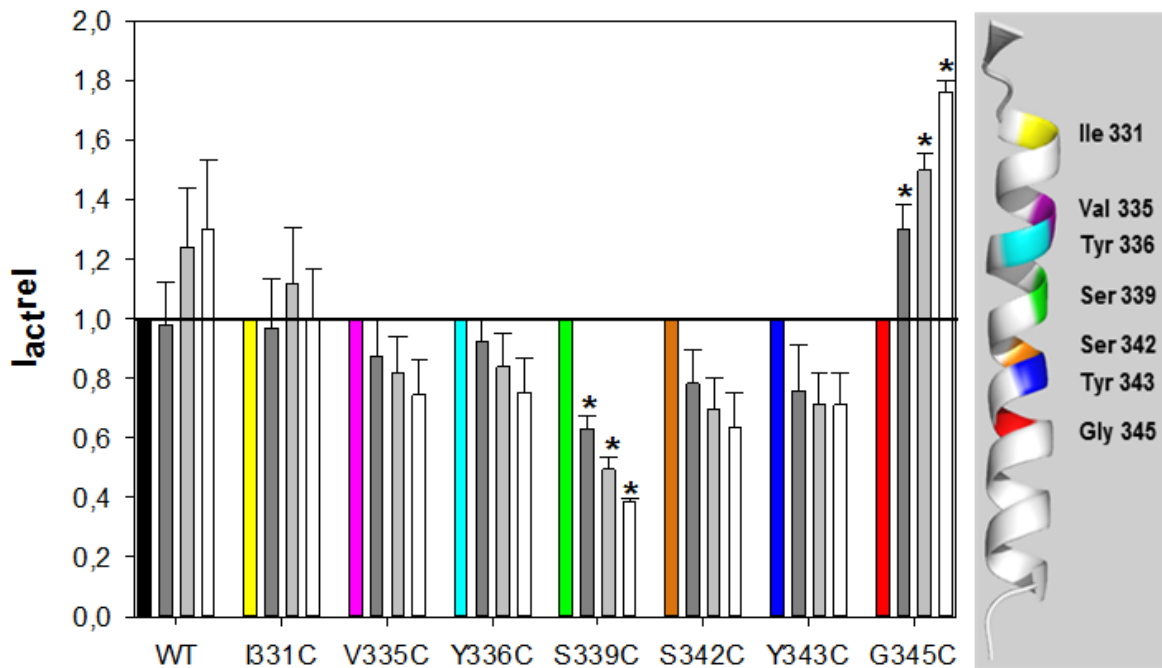


Abb. 5.6: Mehrfachaktivierung von WT und Mutanten.

Die ATP-induzierten Stromamplituden (I_{act} , s. Abb. 4.5) wurden auf die Amplituden der ersten ATP-Applikation normiert. Jede Applikation von 0,1 mM ATP dauerte 6 s und dazwischen lagen jeweils 2 min Pause. Erste Applikation in bunt, äquivalent zur farblichen Position in der Helix rechts. N = 5-20 Oozyten. * - signifikant verschieden zur 1. Applikation ($P < 0,05$). Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Es wurden auch andere Konstrukte untersucht. In Abbildung 5.7 sind diese mit ihrem Verhalten bei mehrfacher ATP-Applikation aufgeführt. Für jedes Konstrukt wurde auf die erste Applikation normiert. Bei einigen Positionen hat ATP bei mehrmaliger Gabe signifikante Änderungen im Natriumstrom zur Folge. Allerdings ließen sich diese Konstrukte an ihren freien SH-Seitenketten mittels MTSEA nicht modifizieren (s. Abb. 3.2). Sie wurden daher nicht im Detail untersucht.

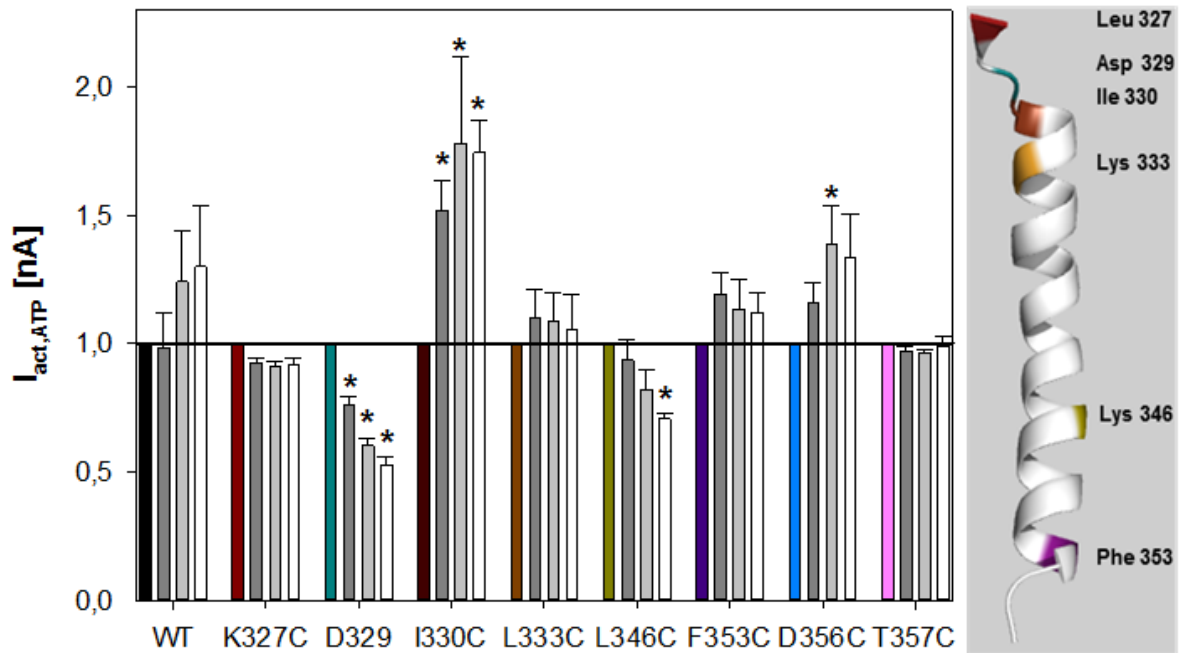


Abb. 5.7: Mehrfachaktivierung von WT und Mutanten.

Die ATP-induzierten Stromamplituden (I_{act} , s. Abb. 4.5) wurden auf die Amplituden der ersten ATP-Applikation normiert. Jede Applikation von 0.1 mM ATP dauerte 6 s lang und dazwischen lagen jeweils 2 min Pause. Erste Applikation in bunt, äquivalent zur farblichen Position in der Helix rechts, D356C und T357C gehören nicht mehr zum nebenstehenden Modell. N = 6-25 Oozyten. * - signifikant verschieden zur 1. Applikation ($P < 0,05$). Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Mehrfachapplikationen haben nicht nur potenziell einen Einfluss auf die Größe des ATP-induzierten Stromes, sondern auch auf die Kinetik des Stromverlaufes (Geschwindigkeit der Kanalöffnung und seines Schließens). MTS-Derivate können ebenfalls Einfluss auf das Schaltverhalten ausüben. In Abbildung 5.8 ist beispielhaft der Einfluss von MTSEA auf die Aktivierungskinetik des hP2X7R-V335C dargestellt. Es wurden nacheinander ATP allein, ATP zusammen mit MTSEA und ATP wieder allein appliziert. Dabei überlagerten sich die ATP-induzierte und die MTSEA-induzierte Kanalkinetik.

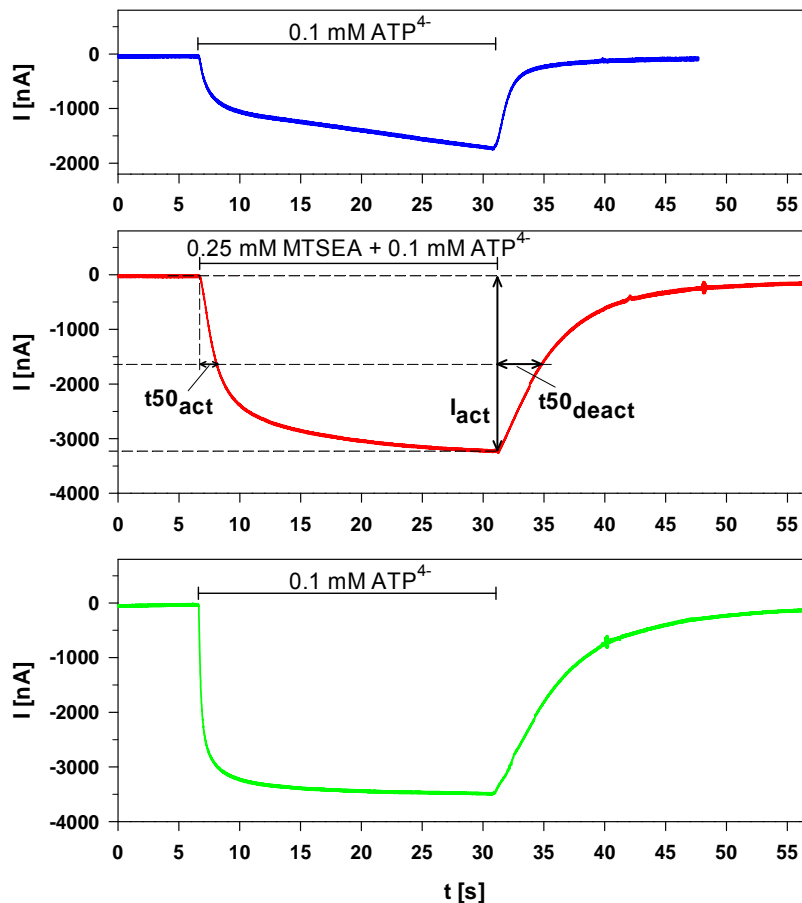


Abb. 5.8: Effekt von MTSEA auf die hP2X7R-V335C-abhängigen Stromverlauf .

In Farbe der ATP-abhängige Stromverlauf gegen die Zeit. blau – 1. ATP-Applikation, rot – 2. ATP-Applikation zusammen mit MTSEA, grün – 3. ATP-Applikation. Die Messung der halbmaximalen Aktivierungszeit ($t_{50_{act}}$) und Deaktivierungszeit ($t_{50_{deact}}$) sind dargestellt. Zeit und Konzentration der Applikationslösungen ist angegeben.

In Abbildung 5.9 ist die Statistik für die einzelnen kinetischen Größen der ATP-abhängigen Stromaktivierung bei den aufeinanderfolgenden ATP-Applikationen aufgeführt. Es ist ersichtlich, dass die Gabe von MTSEA zusammen mit ATP eine sofortige Vergrößerung der Zeitkonstante der Deaktivierung zur Folge hatte, da das Schließen der Kanäle nach Auswaschen von ATP deutlich verlangsamt war. Dieser Effekt bleibt auch nach Auswaschen des MTSEA bestehen, weist also auf eine kovalente Modifikation der Kanalproteine durch MTSEA hin. Der zweite MTSEA-assoziierte Effekt wurde erst nach seiner Applikation ersichtlich, da es die Aktivierungszeit folgender ATP-induzierter Ströme signifikant verkürzte. Auch dieser Effekt blieb bestehen, wenn das MTSEA ausgewaschen worden war.

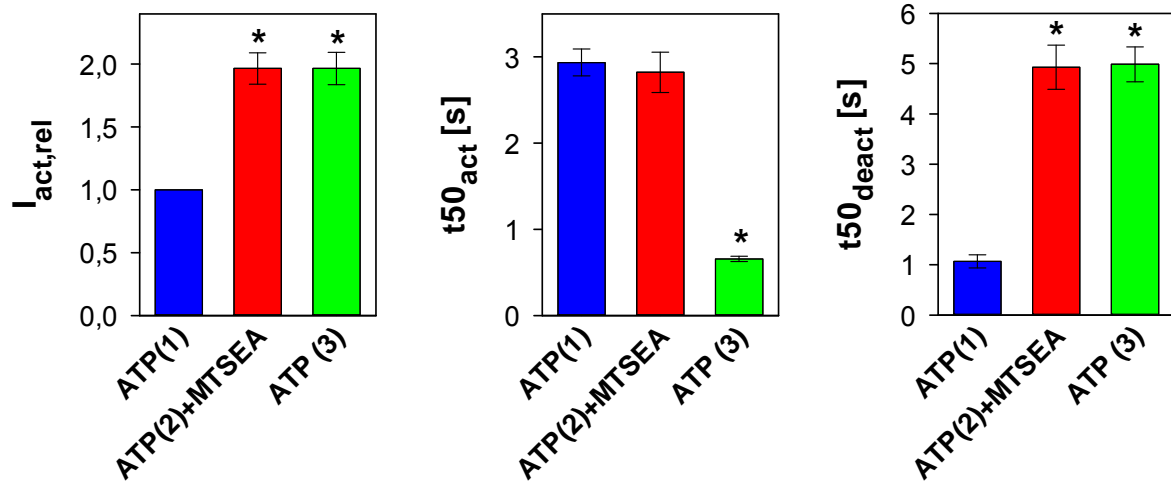


Abb. 5.9: Statistik zum MTSEA-Effekt auf den hP2X7R-V335C-abhängigen Stromverlauf.

Die Messergebnisse wurden jeweils auf die Ergebnisse der ersten ATP-Applikation normiert. Beschriftungen und Farben entsprechen den farbigen Applikationen aus Abb. 5.8. N = 7-15 Oozyten. * - signifikant verschieden zur 1. Applikation (P < 0,05).

Aus dem zeitlichen Verlauf der ATP-abhängigen Stromantwort in Anwesenheit und nach MTSEA-Applikation ist erkennbar, dass MTSEA komplexe Einflüsse auf die Kinetik des V335C ausübte. Für die weiteren Untersuchungen der MTSEA-Effekte wurden die Ionenkanäle durch ATP-Gabe voraktiviert. In Abschnitt 5.4 wurde der Stromverlauf für die sieben näher untersuchten Konstrukte, der durch MTSEA bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP erzeugt wurde, eingehend dargelegt (s. auch Abbildung 5.10 – 5.16).

5.4 Effekt von MTSEA auf Konstrukte im aktivierten Zustand (offene Kanalpore)

5.4.1 Messung ohne Klemmspannungsmodulation

Eine Mehrfachapplikation von ATP selbst führte zu Veränderungen der ATP-induzierten Ströme. Die Applikation von MTSEA veränderte die Kinetik dieser Ströme zusätzlich im ausgeprägten Maße. Daher wurden die weiteren Versuche so durchgeführt, dass zunächst das hP2X7R-Konstrukt durch ATP-Applikation aktiviert wurde und parallel hierzu zusätzlich MTSEA in die Badlösung gegeben wurde. Auf diese Weise konnte die Kinetik des MTSEA-Effekts weitgehend isoliert dargestellt werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen das Verhalten der ausgewählten hP2X7R-Konstrukte unter Verwendung des Versuchsprotokolls A (siehe Tab. 4.2), bei dem ATP und MTSEA gleichzeitig appliziert wurden, um die Modifizierbarkeit der SH-Seitenkette im geöffneten Zustand der P2X7R-abhängigen Kanalpore zu überprüfen.

In Abbildung 5.10 ist der Stromverlauf des hP2X7R-I331C-Konstruktes aufgeführt. Es ist zu sehen, dass die Applikation von MTSEA den Einwärtsstrom vergrößerte. Dieser Effekt konnte durch Auswaschen von MTSEA nicht rückgängig gemacht werden, war also irreversibel, was auf eine kovalente Modifikation hindeutet. Der ATP-abhängige Einwärtsstrom wurde erst durch Auswaschen des ATP abgeschaltet. Die Ratekonstante R gibt an, wie schnell der Einwärtsstrom durch MTSEA-Applikation vergrößert wurde und ist ein Maß für die Modifizierungsgeschwindigkeit der freien Cysteinseitenketten durch MTS-Reagenzien. In die Ratekonstante gehen die Zeitverläufe des Einwaschens von MTSEA, der Modifikation der Seitenkettenreste durch MTSEA sowie die darauffolgende Veränderung des Schaltverhaltens des hP2X7R-I331C-Konstruktes ein. Da das Einwaschen in etwa 1.3 s abgeschlossen war (s. 4.3.3), scheint dieser Schritt nicht geschwindigkeitsbestimmend zu sein.

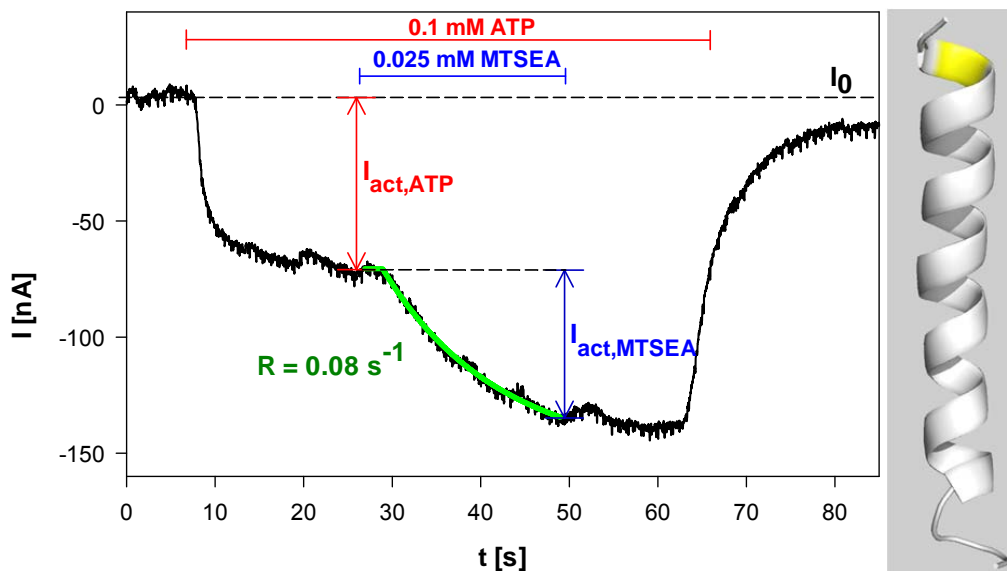


Abb. 5.10: Effekt von MTSEA auf hP2X7R-I331C.

Die linke Abbildung zeigt den Stromverlauf des hP2X7R-I331C-Konstruktes, die rechte ein Modell der TM2, bei der die Position der mutierten AS 331 farblich markiert wurde. Die Zeiten der ATP⁴⁻-und MTSEA-Applikation sind angegeben. Die Messung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Der Stromverlauf ist als schwarze Linie dargestellt. Die grüne Linie stellt die monoexponentielle Approximation des Zeitverlaufs der Strommodifikation durch MTSEA gemäß Gleichung 5.1 dar. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

In Gleichung 5.1 ist die monoexponentielle Approximation des Zeitverlaufs des MTSEA-induzierten Stroms I_{MTS} angeführt.

Gleichung 5.1:
$$I_{MTS} = I_0 + I_{act,ATP} + I_{act,MTS} \cdot (1 - e^{-R \cdot t})$$

Hierbei ist $I_{act,ATP}$ der Membranstrom kurz vor MTS-Applikation und wurde durch die ATP-Applikation ausgelöst. I_0 ist der Haltestrom vor ATP-Applikation (Leckstrom). Die Amplitude des MTS-induzierten Stroms wurde nach 18 s dauernder MTS-Applikation gemessen ($I_{act,MTS}$), falls nicht anders angegeben. Die Ratekonstante R gibt an, wie schnell die Modifizierung der SH-Seitenketten mittels MTS-Reagenzien vorstättengeht.

Auch bei dem Konstrukt hP2X7R-V335C konnte MTSEA die ATP-gesteuerte Stromantwort steigern (Abbildung 5.11). Der MTSEA-Effekt war auch hier irreversibel.

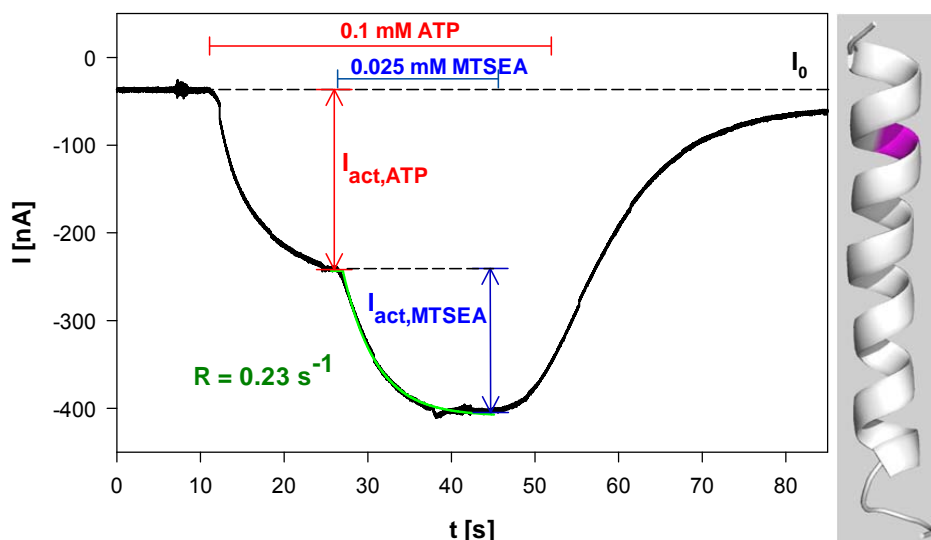


Abb. 5.11: Effekt von MTSEA auf hP2X7R-V335C.

Die linke Abbildung zeigt den Stromverlauf des hP2X7R-V335C-Konstruktes, die rechte ein Modell der TM2 bei dem die Position der mutierten AS 335 farblich markiert wurde. Die Zeit der ATP⁴⁻- und der MTSEA-Applikation sind angegeben. Die Messung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Der Stromverlauf ist als schwarze Linie dargestellt. Die grüne Linie stellt die monoexponentielle Approximation des Zeitverlaufs der Strommodifikation durch MTSEA gemäß Gleichung 5.1 dar. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Auch beim Konstrukt hP2X7R-Y336C vergrößerte MTSEA die Stromamplitude. Allerdings trat die Vergrößerung des Einwärtsstroms sehr viel langsamer ein, als bei den anderen analysierten Konstrukten. Die Modifikation war so langsam, dass die Dauer bis zum Abschluss der exponentiellen Zusatzaktivierung die

Zellmembranstabilität der ATP-stimulierten Oozyten deutlich überstieg. Der Stromverlauf wurde deshalb hier anstelle anhand der Ratekonstanten linear mittels Anstieg s approximiert (s. Abb. 5.12 und Gleichung 5.2).

Gleichung 5.2:
$$I(t) = s * (t - t_0) + I_0$$

Um deutliche Effekte zu erhalten, mussten bei diesem Konstrukt 0,5 mmol/l MTSEA verwendet werden. Wie aus Abb. 5.12 ersichtlich ist, führte diese MTSEA-Applikation zu einer schnellen reversiblen Verringerung des Einwärtsstroms, die kurz nach Auswaschen von MTSEA wieder aufgehoben wurde. Dieser reversible MTSEA-Effekt kann evtl. durch eine Blockade der Ionenkanalpore durch das relativ große MTSEA^+ -Ion hervorgerufen werden und wurde bei der Berechnung des durch MTSEA bedingten langsamen irreversiblen Effekts ($I_{\text{act,MTSEA}}$) berücksichtigt. Außerdem wurde hier der ATP-induzierte Strom durch eine Summe aus exponentiell sättigendem ($I_{\text{act,exp}}$) und linear ansteigendem Strom (s) approximiert (s. Gleichung 5.3) (Klapperstück et al., 2001a).

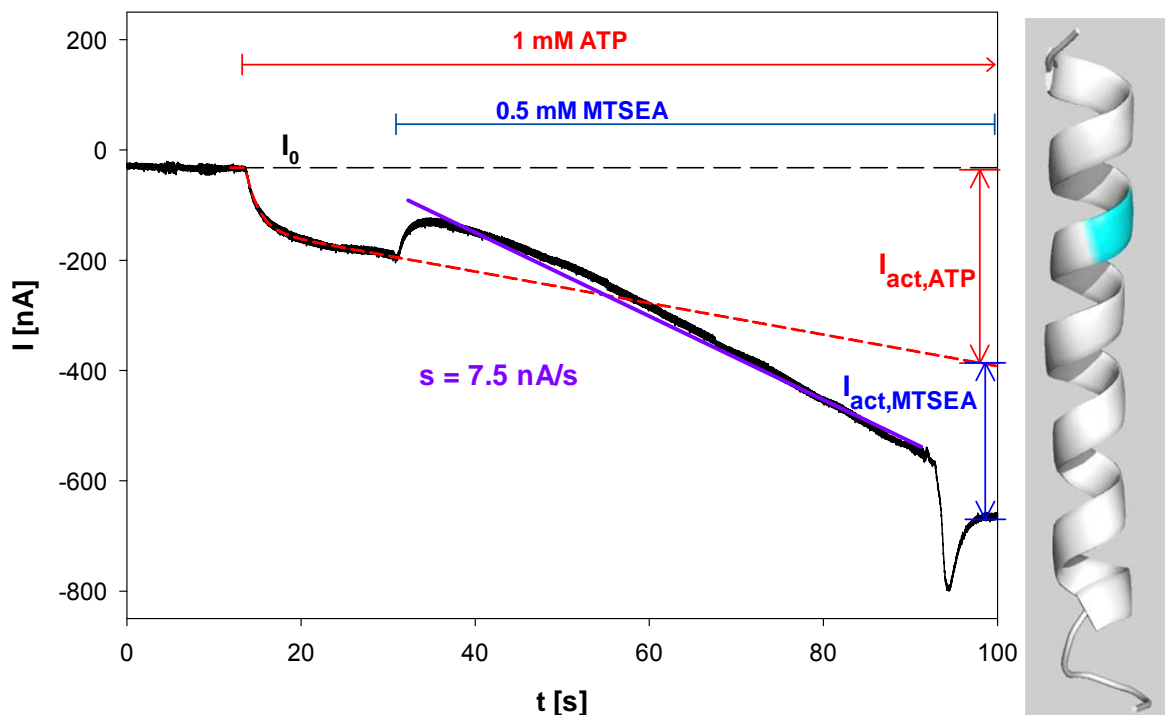


Abb. 5.12: Effekt von MTSEA auf hP2X7R-Y336C.

Die linke Abbildung zeigt den Stromverlauf des hP2X7R-Y336C-Konstruktes, die rechte ein Modell der TM2 bei der die Position der mutierten AS 336 farblich markiert wurde. Die Zeiten der ATP^4 - und der MTSEA-Applikation sind angegeben. Die Messung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Der Stromverlauf ist als schwarze Linie dargestellt. Die lila Linie stellt die lineare Approximation des Zeitverlaufs der Strommodifikation durch MTSEA dar. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Gleichung 5.3:
$$I_{ATP}(t) = I_{act,exp} \cdot (1 - e^{-R \cdot t}) + s \cdot t + I_0$$

Diese Approximation wurde auf den Zeitpunkt der Messung des MTSEA-induzierten Stroms extrapoliert (s. gestrichelte rote Linie in Abb. 5.12) und die so errechnete Stromamplitude I_{ATP} von der gemessenen Stromamplitude nach 60 s MTSEA-Applikation (I_{MTSEA}) subtrahiert, um den MTSEA-induzierten Strom ($I_{act.MTSEA}$) zu erhalten.

Das Konstrukt hP2X7R-S339C wies ebenfalls eine Stimulation des ATP-induzierten Einwärtsstroms durch MTSEA auf (Abbildung 5.13). Der Strom wurde durch das Applizieren ebenfalls irreversibel vergrößert. Auch nach mehreren Minuten des Auswaschens von ATP wurde der Ausgangsstrom (Leckstrom, I_0) nicht wieder erreicht. Vermutlich wurde aufgrund der MTSEA-Modifikation der Kanal nach Auswaschen des ATP nur sehr langsam geschlossen, bzw. der geschlossene Zustand wurde destabilisiert.

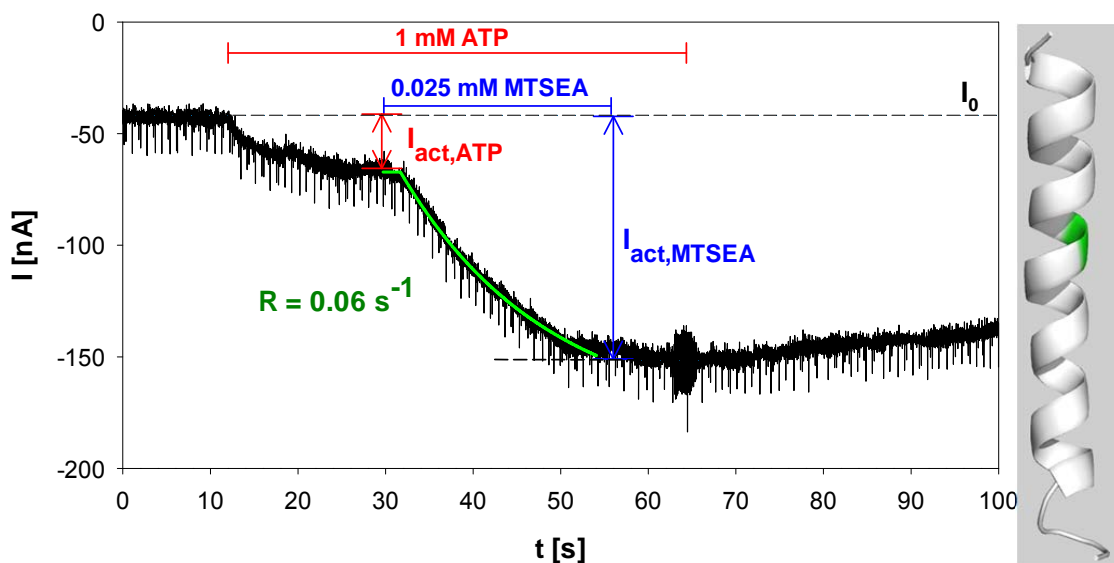


Abb. 5.13: Effekt von MTSEA auf hP2X7R-S339C.

Die linke Abbildung zeigt den Stromverlauf des hP2X7R-S339C-Konstruktes, die rechte ein Modell der TM2 bei der die Position der mutierten AS 339 farblich markiert wurde. Die Zeiten der ATP⁴⁻- und der MTSEA-Applikation sind angegeben. Die Messung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Der Stromverlauf ist als schwarze Linie dargestellt. Die grüne Linie stellt die monoexponentielle Approximation des Zeitverlaufs der Strommodifikation durch MTSEA gemäß Gleichung 5.1 dar. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Die Kanalproteine des Typs hP2X7R-S342C wiesen ein von den anderen Mutanten abweichendes Verhalten auf. MTSEA hatte bei diesem Konstrukt eine hemmende Wirkung, d.h. der ATP-induzierte Strom wurde bei gemeinsamer

Applikation mit MTSEA vermindert. (Abbildung 5.14). In Gleichung 5.4 ist die monoexponentielle Approximation des Zeitverlaufs des MTSEA-blockierten Stroms $I_{MTS,block}$ aufgeführt.

Gleichung 5.4:
$$I_{MTS,block} = I_{act,ATP} - I_{block,MTSEA} \cdot (1 - e^{-R \cdot t})$$

Hierbei stellt $I_{block,MTSEA}$ die maximale MTSEA-blockierte Stromamplitude nach theoretisch unendlich langer MTSEA-Applikation dar. Die übrigen Symbole entsprechen denen der Gleichung 5.1.

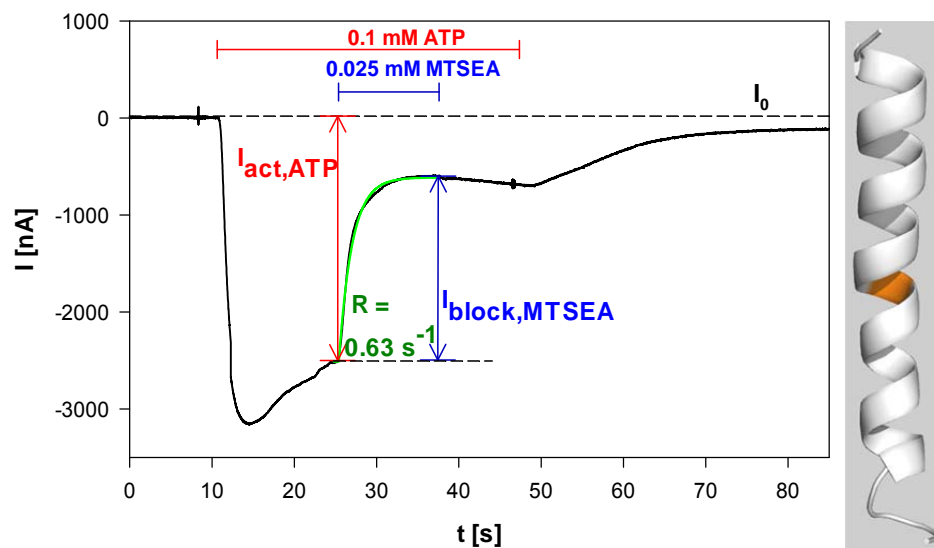


Abb. 5.14: Effekt von MTSEA auf hP2X7R-S342C.

Die linke Abbildung zeigt den Stromverlauf des hP2X7R-S342C-Konstruktes, die rechte ein Modell der TM2 bei der die Position der mutierten AS 342 farblich markiert wurde. Die Zeiten der ATP⁴⁻- und der MTSEA-Applikation sind angegeben. Die Messung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Der Stromverlauf ist als schwarze Linie dargestellt. Die grüne Linie stellt die monoexponentielle Approximation des Zeitverlaufs der Strommodifikation durch MTSEA gemäß Gleichung 5.2 dar. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Ein weiteres Konstrukt, hP2X7R-Y343C, wurde wiederum in Anwesenheit des Agonisten ATP durch MTSEA stimuliert (s. Abb. 5.15).

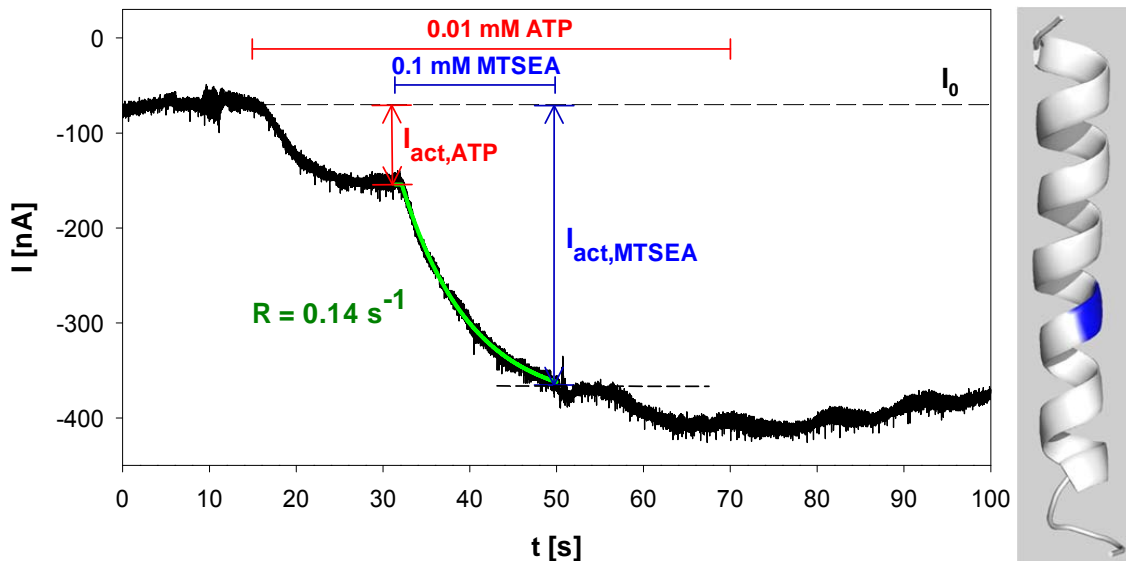


Abb. 5.15: Effekt von MTSEA auf hP2X7R-Y343C.

Die linke Abbildung zeigt den Stromverlauf des hP2X7R-Y343C-Konstruktes, die rechte ein Modell der TM2 wo die Position der mutierten AS 343 farblich markiert wurde. Die Zeiten der ATP⁴⁻- und der MTSEA-Applikation sind angegeben. Die Messung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Der Stromverlauf ist als schwarze Linie dargestellt. Die grüne Linie stellt die monoexponentielle Approximation des Zeitverlaufs der Strommodifikation durch MTSEA gemäß Gleichung 5.1 dar. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Der hP2X7R-G345C als letztes untersuchtes Konstrukt wies erneut eine stromsteigernde Reaktion bei der Verwendung von MTSEA in Kombination mit ATP auf. Hier war die Reaktion sehr langsam und der stimulierende MTSEA-Effekt deshalb nur nach langer Applikation zu verzeichnen. Auch hier verursachte, vermutlich wegen der hohen verwendeten Konzentration, MTSEA eine reversible Vergrößerung der ATP-induzierten Stromantwort. Wegen der notwendigen langdauernden Applikation von MTSEA wurde der Zeitverlauf der ATP-induzierten Stromantwort wieder durch Gleichung 5.4 approximiert und bis zum Ende der MTSEA-Applikation extrapoliert (s. auch Abb. 5.12). Dieser Stromwert wurde vom Gesamtstrom zum gleichen Zeitpunkt subtrahiert (s. Abb. 5.16).

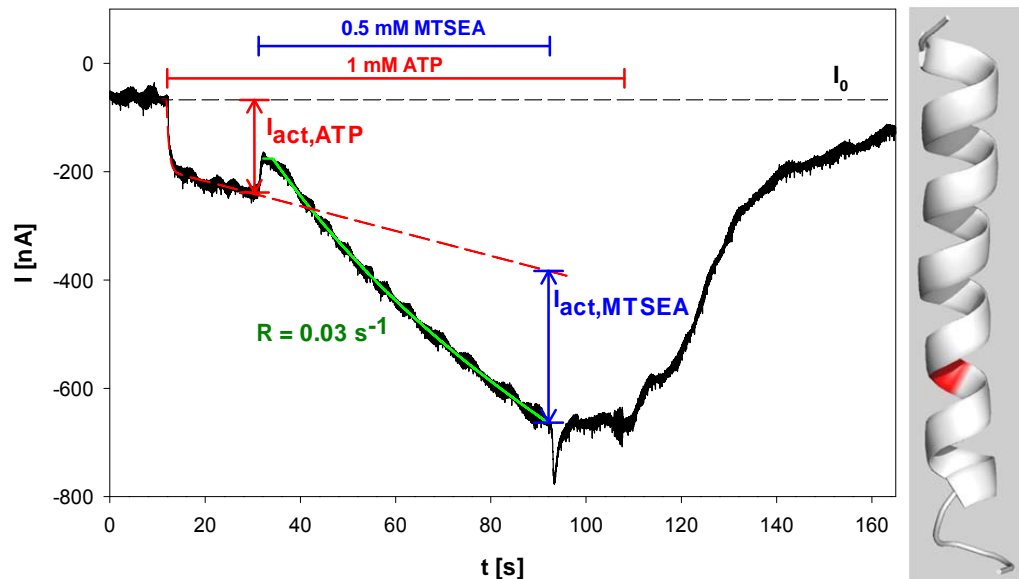


Abb. 5.16: Effekt von MTSEA auf hP2X7R-G345C.

Die linke Abbildung zeigt den Stromverlauf des hP2X7R-G345C-Konstruktes, die rechte ein Modell der TM2 wo die Position der mutierten AS 345 farblich markiert wurde. Die Zeiten der ATP⁴⁻- und der MTSEA-Applikation sind angegeben. Die Messung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Der Stromverlauf ist als schwarze Linie dargestellt. Die grüne Linie stellt die monoexponentielle Approximation des Zeitverlaufs der Strommodifikation durch MTSEA gemäß Gleichung 5.1 dar. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

5.4.2 Spannungsabhängigkeit des MTSEA-Effekts

Für die Konstrukte wurden ihr Verhalten in Bezug auf MTSEA nicht nur bei einer Klemmspannung von -40 mV, sondern auch bei -20 mV, -80 mV und +20 mV bestimmt. Auf die Weise wurde getestet, ob die Modifizierung durch MTSEA eine Spannungsabhängigkeit aufweist. Da MTSEA positiv geladen ist und die TM2 durch die Zellmembran mit ihrer negativen Zellmembranspannung tritt, war eine Spannungsabhängigkeit der SH-Gruppen-Modifizierung durch MTSEA zu erwarten. In der Abbildung 5.17 sind die relativen Ratekonstanten der einzelnen Konstrukte normiert auf -40 mV in Abhängigkeit zur Klemmspannung grafisch dargestellt. In Abb. 5.18 ist die lineare Spannungsabhängigkeit der MTSEA-Modifizierung normiert auf -40 mV für die einzelnen Konstrukte dargestellt.

In Gleichung 5.5 ist die lineare Approximation für die lineare Abhängigkeit der relativen Ratekonstanten vom Membranpotenzial aufgeführt.

Gleichung 5.5:
$$R_{rel}(V_m) = \frac{R(V_m)}{R(-40\text{ mV})} = R_{rel}(-40\text{ mV}) \cdot sR_{rel} \cdot V_m$$

Lediglich für das Konstrukt P2X7R-Y336C wurde anstelle von R der Anstieg s verwendet.

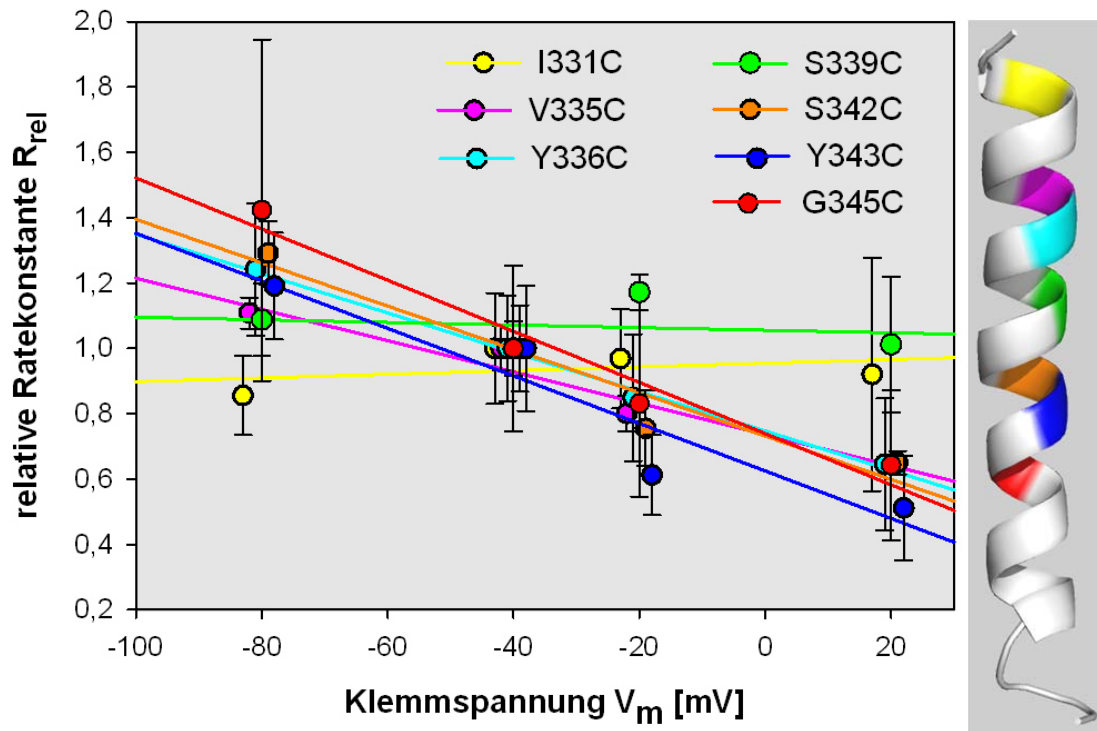


Abb.5.17: Klemmspannungsabhängigkeit relativer Ratekonstante des MTSEA-Effekts.

Die Ratekonstanten wurden auf die Ratekonstante bei einer Klemmspannung von -40 mV normiert und gegen die Klemmspannung bei +20, -20, -40 und -80 mV aufgetragen. Die Abhängigkeit der relativen Ratekonstanten vom Membranpotenzial wurde linear nach der Gleichung 5.5 approximiert. Die einzelnen Konstrukte sind farblich markiert. N = 4-17 Oozyten. Die Farbe der Säulen auf der linken Seite entspricht der farblichen Markierung der Position der mutierten Aminosäure auf dem TM2-Helixmodell auf der rechten Seite. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

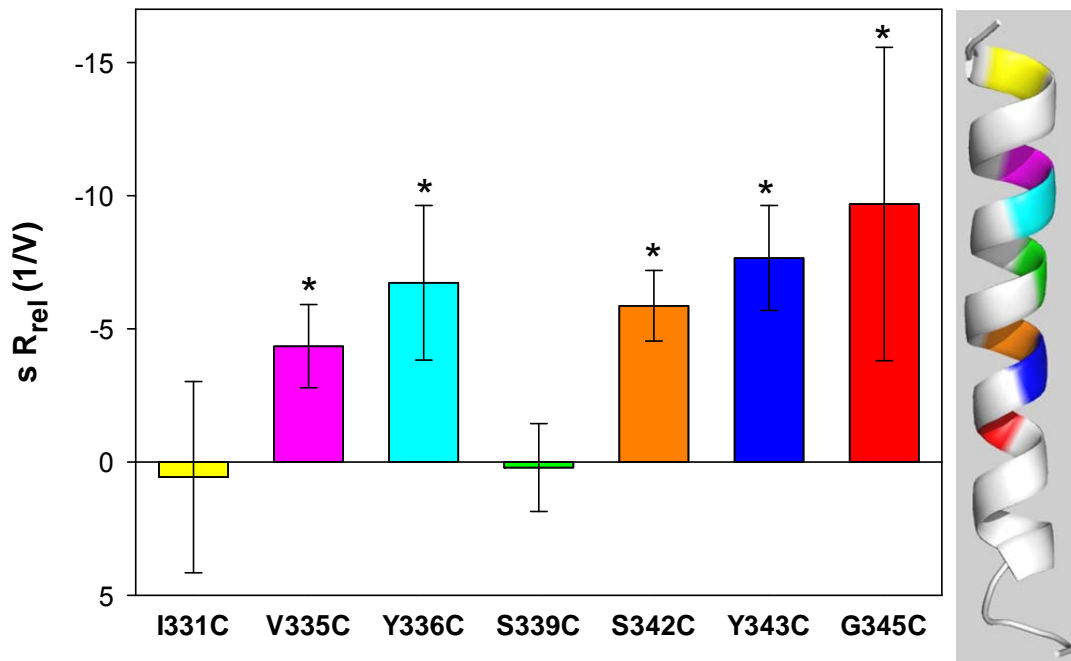


Abb.5.18: Steilheit der Abhängigkeit der Ratekonstanten des MTSEA-Effekts von der Membranspannung für die untersuchten TM2 Konstrukte.

Die Berechnung von $s R_{el}$ erfolgte nach Gleichung 5.5. Die einzelnen Konstrukte sind farblich markiert. $N = 5-12$. Die Position der einzelnen Aminosäuren passt farblich zu dem TM2-Helixmodell auf der rechten Seite. Signifikant von 0 verschiedene Werte sind mit * markiert. Das Modell wurde auf der Basis des Modells der Abb. 1.2 erstellt.

5.4.3 Größe- und Ladungseinfluss der MTS-Derivate auf den offenen hP2X7R-Kanal

Es wurden auch noch andere MTS-Derivate verwendet; MTSET mit einem großen positiven Rest und MTSES mit einem negativen Rest. Dies sollte dazu dienen, festzustellen, ob die Modifizierungsrate der Cysteinseitenketten von der Ladung oder der Größe des Restes der MTS-Derivate abhängig ist.

In Abbildung 5.19 sind die Effekte der MTS-Derivate MTSET und MTSES auf die ATP-abhängige Stromantwort in Relation zum MTSEA-Effekt für das jeweilige Konstrukt grafisch dargestellt. In der Abbildung 5.20 ist der Effekt auf die Modifizierungsrate R durch MTSET in Relation auf die Modifizierungsrate von MTSEA grafisch dargestellt.

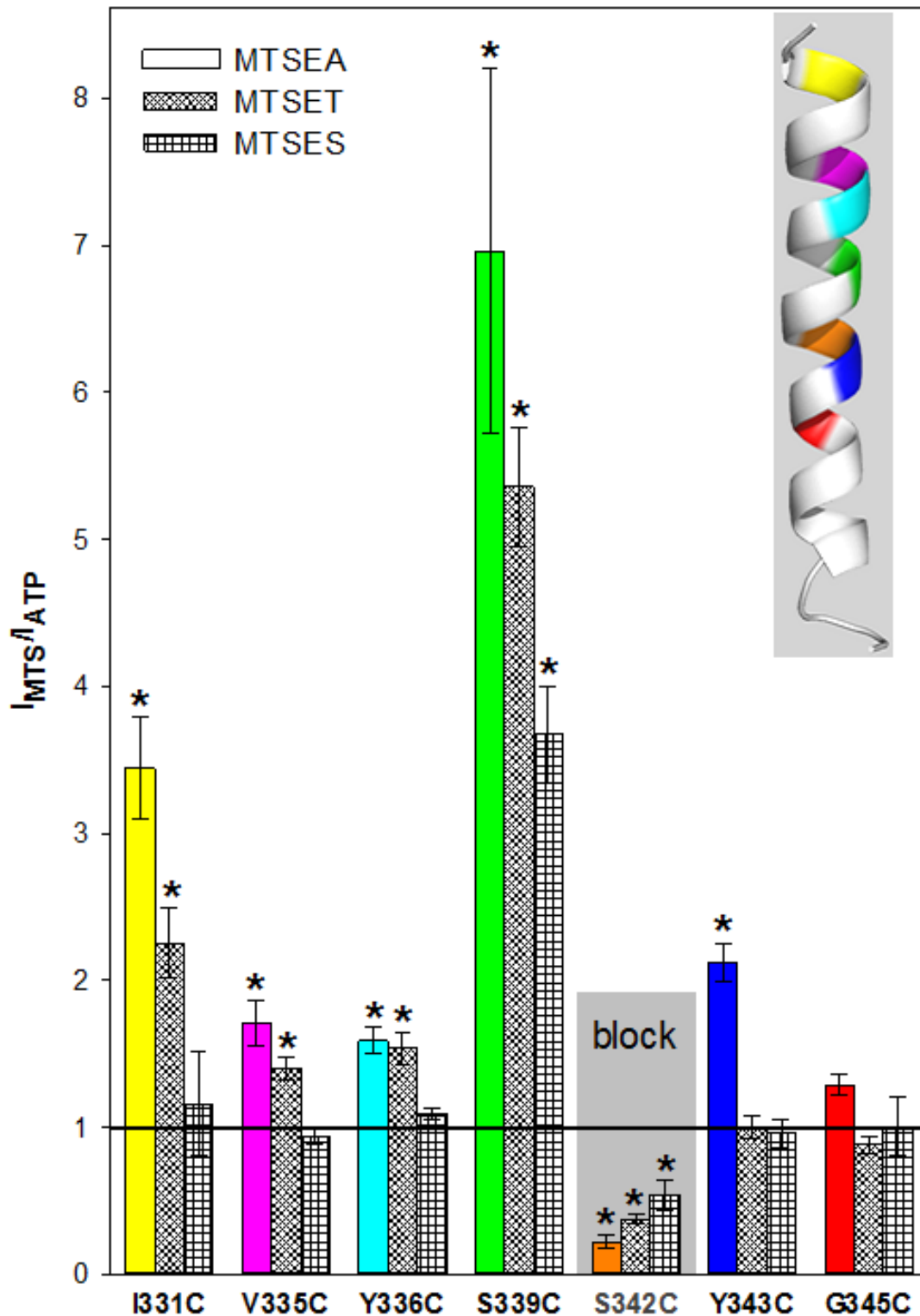


Abb. 5.19: Relativer Effekt von MTS-Reagenzien auf die ATP-abhängige Stromreaktion.

Die ATP- und MTS-induzierten Ströme wurden wie in Abbildung 5.10-5.16 gemessen und miteinander verglichen. Die Effekte von MTSEA und MTSET wurden bei einem Haltepotenzial von -40mV, das von MTSES bei +20mV gemessen um eine inwärts gerichtete Membranpotenzial-abhängige Kraft für alle drei getesteten Reagenzien zu gewährleisten. Ein relativer Effekt von 1 indiziert einen fehlenden Einfluss des MTS-Derivats. * - signifikanter Unterschied zu 1. N = 6-12 Oozyten. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

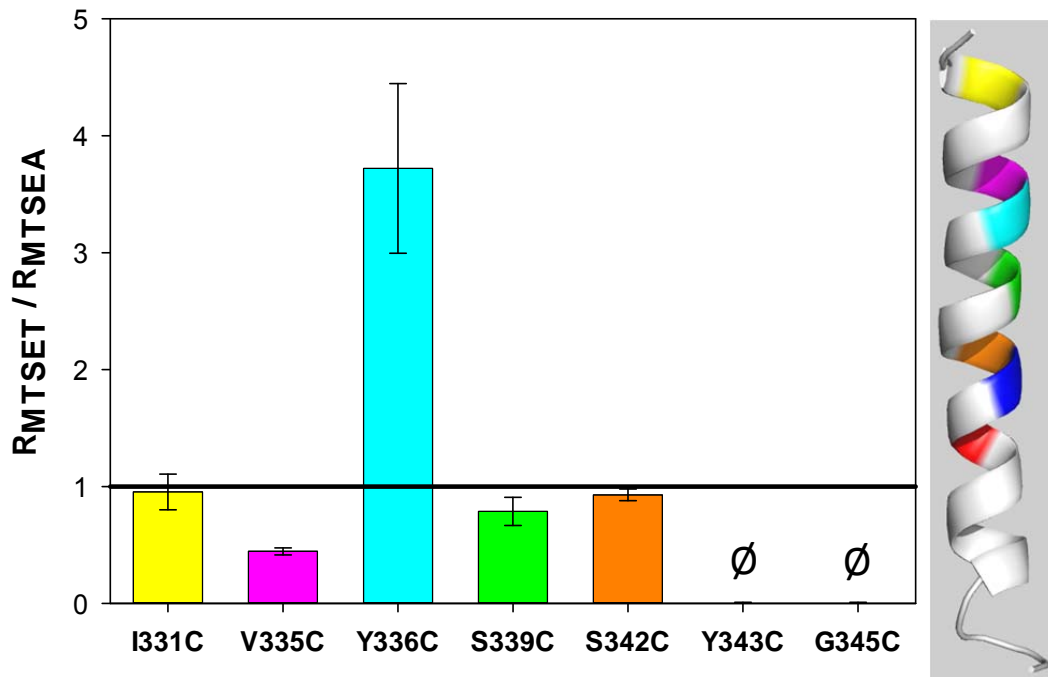


Abb. 5.20: Relative Seitenkettenmodifikationsrate von MTSET bei -40mV.

Die Modifizierungsrate der freien Cysteinseitenketten durch MTSET während der ATP-abhängigen Reaktion wurde zur mittleren Modifizierungsrate durch MTSEA für die einzelnen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt. N = 5-10 Oozyten. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Wie aus den Abbildungen 5.19 und 5.20 ersichtlich ist, hatte MTSET auf die Konstrukte I331C, V335C, Y336C, S339C und S342C einen ähnlichen Effekt wie MTSEA. Das Derivat stimulierte (bzw. bei hP2X7R-S342C blockierte) die einzelnen Konstrukte; die hervorgerufene Reaktion war im Vergleich zu MTSEA in den meisten Fällen reduziert. Auf Y343C und G345C hatte MTSET keinen Effekt. Das anionische MTSES (s. Abb. 5.19) hatte nur auf die Konstrukte S339C und S342C einen Effekt.

Bei der Betrachtung der Auswirkungen von MTSET (Abbildung 5.20) auf die Modifizierungsrate ist ersichtlich, dass nur bei Y336C die Modifizierung durch MTSET schneller vonstattenging als bei der Verwendung von MTSEA.

Die drei MTS-Konstrukte unterscheiden sich somit in ihrer Fähigkeit und Geschwindigkeit, den ATP-induzierten Strom zu beeinflussen.

5.5 Abhängigkeit der MTS-Effekte vom Kanalzustand

Im vorherigen Abschnitt wurde der Effekt von MTS-Reagenzien auf die offene Ionenkanalpore untersucht. In diesem Abschnitt wurde die Wirkung dieser SH-Gruppen-Modifikatoren auf den geschlossenen Ionenkanal analysiert. Dabei sollte analysiert werden, ob die MTS-Wirkung abhängig vom Zustand des hP2X7R ist. Hieraus lassen sich möglicherweise Schlussfolgerungen auf die Lokalisation des *Gates*, des Tores, ziehen, das die Ionenkanalpore ATP-abhängig öffnet und schließt.

In Abbildung 5.21 ist ein Beispiel für den Effekt der Gabe von MTSEA in Abwesenheit von ATP dargestellt. Der Wechsel zwischen Applikation von ATP und MTSEA wurde mehrmals wiederholt. Auf die Weise wurde überprüft, mit welcher Reaktionsgeschwindigkeit MTSEA auch ohne eine Kanalöffnung die entsprechende Seitenkette modifizieren kann.

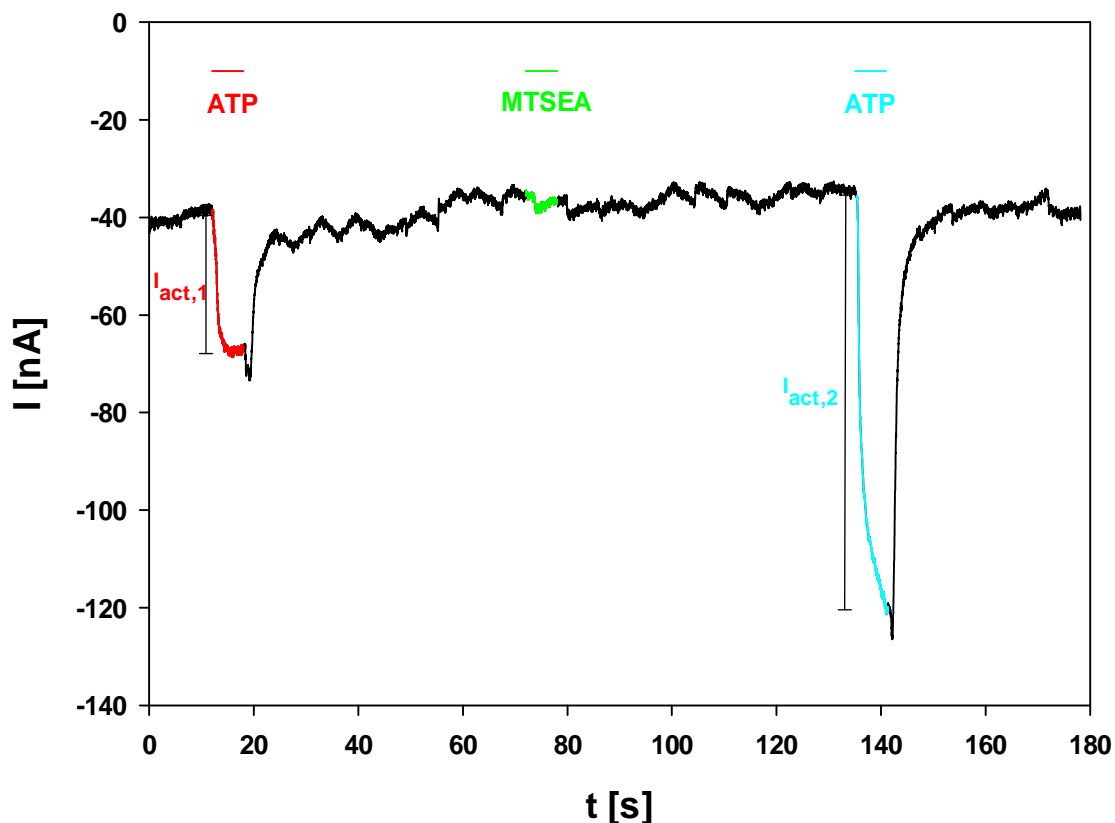


Abb. 5.21: Wirkung von MTSEA auf hP2X7R-I331C im geschlossenen Zustand.

Die Anwendungsdauer und die Konzentration der Applikationslösung sind angegeben. Die Messung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

Ob es zu einer Modifizierung kam, ließ sich aus einem Vergleich der Amplituden der konsekutiven ATP-induzierten Ströme herauslesen. Im obigen Beispiel (Abbildung 5.21) ist der Stromverlauf während der ersten ATP-Applikation in Rot dargestellt. Die entsprechende Stromamplitude wurde als Grundwert ($I_{act,1}$) definiert. Die Stromamplitude der zweiten ATP-Applikation (in Cyan, $I_{act,2}$) wurde zu diesem Grundwert in Beziehung gesetzt. Wichen die Stromamplituden der MTSEA nachfolgenden ATP-Applikationen signifikant vom Grundwert ab, wies dies darauf hin, dass MTSEA auch ohne Anwesenheit von ATP, also auf den geschlossenen Ionenkanal eine Wirkung ausübte.

Die Stromamplituden wurden auf die Amplituden der ersten ATP-Applikation normiert, um unterschiedliche injizierte cRNA-Mengen, Expressionen und verwendete Konzentrationen an ATP und MTSEA bei den verschiedenen Konstrukten zu kompensieren. In Abbildung 5.22 ist das relative Verhalten der jeweiligen Konstruktes inklusive des hP2X7R-WTs bei 6 s dauernder ATP-Gabe im Wechsel mit 6 s dauernder MTSEA-Applikation im Vergleich zur MTSEA-Gabe bei geöffnetem Kanalzustand dargestellt.

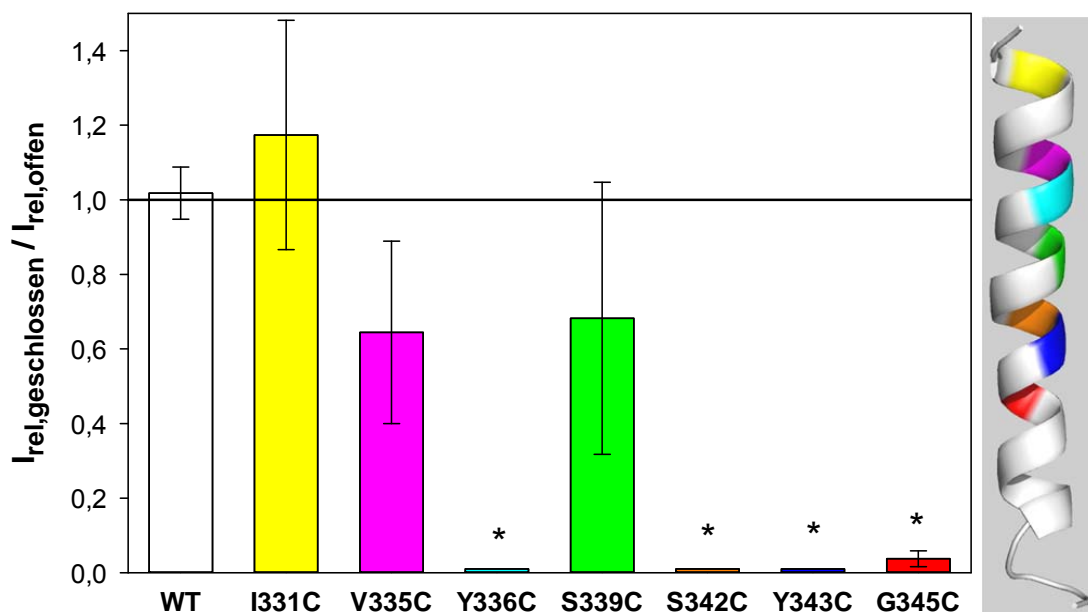


Abb. 5.22: Abhängigkeit des MTSEA-Effekts vom Öffnungszustand der Kanalpore. Messung im geschlossen Zustand wie in Abb. 5.20. Die Stromamplitude der vierten ATP-Applikation wurde zur ersten in Beziehung gesetzt und so $I_{rel,geschlossen}$ berechnet. Diese relativen Amplituden wurden auf die Werte für den geöffneten Zustand (s. Abb. 5.17) normiert. N = 6-14 Oozyten. Signifikant von 1 verschiedene Werte sind mit * markiert. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Die Konstrukte S342C, Y343C und G345C zeigten keine signifikanten Effekte der MTSEA-Applikation bei geschlossenem Kanal. Der geringe stimulierende Effekt von MTSEA beim Konstrukt G345C kann auf eine intrinsische ATP-induzierte Potenzierung zurückgeführt werden (s. Abb. 5.6). Daraus kann geschlossen werden, dass bei diesen Konstrukten MTSEA in Abwesenheit von ATP keine Wirkung zeigt. Die Y336C Mutante zeigte im geschlossenen Zustand auch keine Reaktion auf MTSEA. Hier scheint sich die modifizierbare Seitenkette im geschlossenen Zustand nicht in der Kanalpore zu befinden und ist deswegen für MTSEA nicht erreichbar.

In Abbildung 5.23 sind die Ratekonstanten für die untersuchten Konstrukte zusammengefasst. Weil die drei bereits erwähnten Konstrukte S342C, Y343C und G345C keine Reaktion auf MTSEA im geschlossenen Zustand aufwiesen, wurde bei ihnen die Ratekonstante gleich Null gesetzt (gekennzeichnet mit #).

Bei den Konstrukten I331C, V335C, S339C gab es keinen Unterschied der Ratekonstanten in An- und Abwesenheit von ATP. Die Cysteinseitenketten ließen sich offenbar in beiden Zuständen sehr gut durch MTSEA modifizieren.

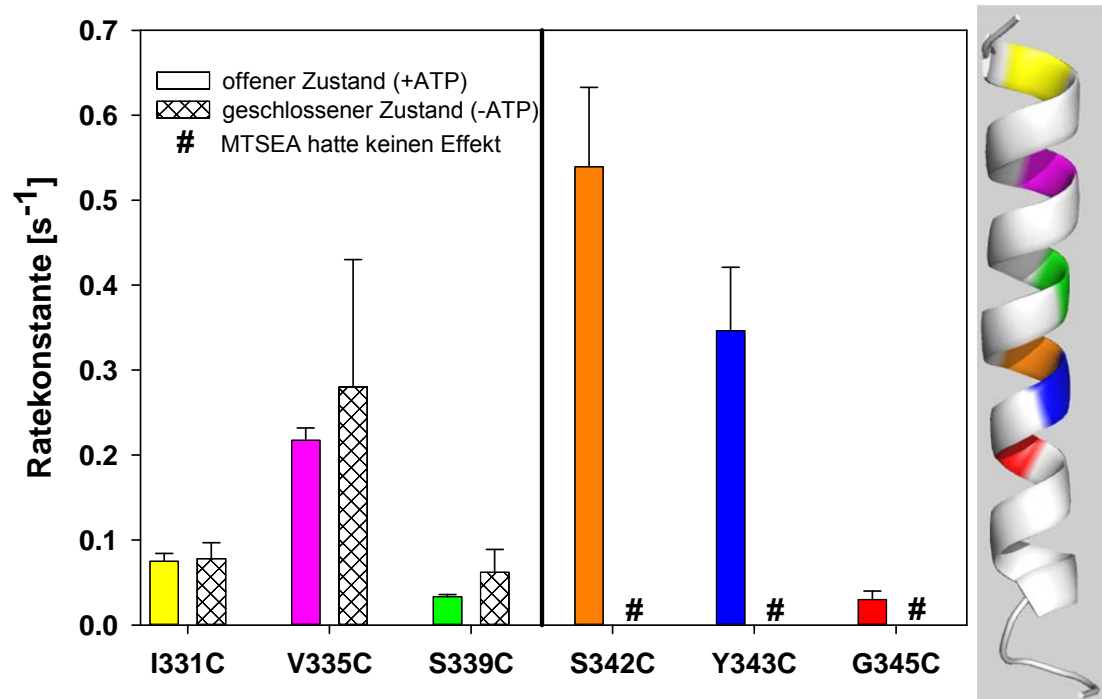


Abb. 5.23: Vergleich der Ratekonstanten der MTSEA-induzierten Modifikation in An- und Abwesenheit von ATP.

Für die untersuchten Konstrukte wurde die Modifizierungsratekonstante durch MTSEA in An- und Abwesenheit von ATP für das jeweilige Konstrukt verglichen. N 6-12 Oozyten. Das Modell wurde auf der Basis des Modells der Abb. 1.2 erstellt.

5.6 Effekt des ungeladenen Hydroxy-benzoyl-Methanthiosulfonat

Die bisher vorgestellten MTS-Verbindungen wiesen alle eine Ladung auf. Zur Überprüfung, ob ungeladene Methanthiosulfonate ebenfalls Effekte auf die Cysteinkonstrukte ausüben können, wurde das ungeladene Hydroxy-benzoyl-Methanthiosulfonat (HB-MTS) getestet. Die Versuche verliefen analog zum Protokoll A, bei dem die Zelle zuerst mit ATP allein, anschließend gemeinsam mit dem jeweiligen MTS-Reagenz umspült wurde.

Der einzige beobachtete Effekt war die Hemmung des Konstrukts hP2X7R-S342C (s. Abb. 5.24).

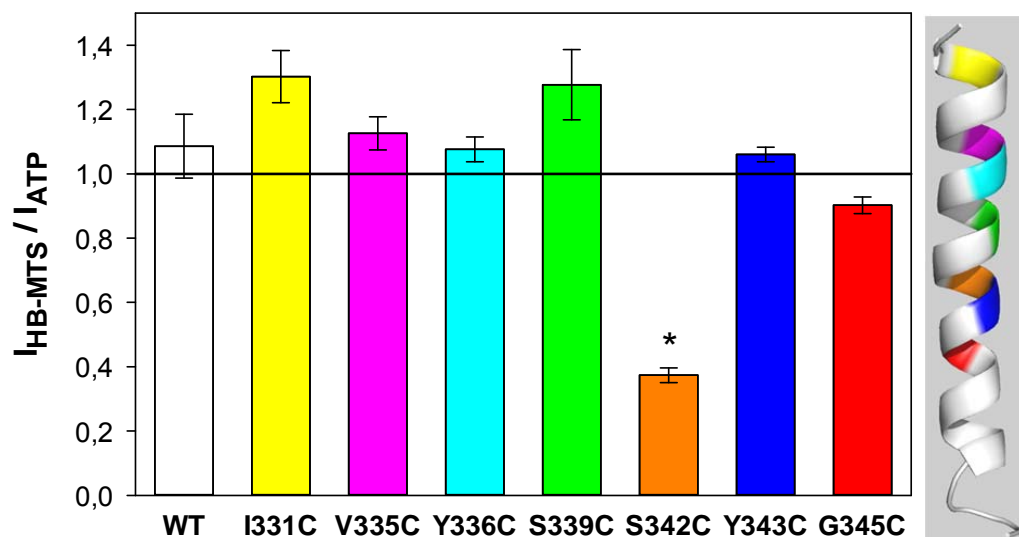


Abb. 5.24: Effekt von HB-MTS auf die hP2X7R-Konstrukte.

Für die untersuchten Konstrukte wurde die Modifizierungsratekonstante durch MTSEA in Anwesenheit von ATP für das jeweilige Konstrukt verglichen. N = 6 - 8 Oozyten. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

6 Diskussion

6.1 Das experimentelle Modell

Im Laufe der Jahre wurden die meisten Cysteinmutagenese-Scanning-Experimente am P2X2R-Rezeptor aus Ratte (rP2X2R) durchgeführt, um die Rolle der TM2 der P2X-Rezeptorfamilie zu eruieren (Browne et al., 2010b). Es wurde vor allem der Effekt von cysteinmodifizierenden Reagenzien, wie MTS-Derivaten (Egan et al., 1998; Kawate et al., 2011; Rassendren et al., 1997), Silber- (Li et al., 2008) und Cadmiumionen (Kracun et al., 2010; Li et al., 2010) getestet. Der Nachteil dieser Protokolle ist, dass der P2X2R ein desensibilisierender Rezeptor ist und der Ionenkanal während längerer ATP-Applikation schließt. Eine MTS-induzierte Stromabnahme könnte also auch aufgrund der Beschleunigung der Desensibilisierung ohne Effekte auf die Kanalpore auftreten (North, 2002). Der P2X7R dagegen desensibilisiert auch bei längerer ATP-Applikation nachweislich nicht (Klapperstück et al., 2000; North, 2002; Riedel et al., 2007a).

Der P2X7R besitzt angeblich die Fähigkeit, bei längerer Agonistengabe große Poren zu bilden, allerdings ist der Ursprung dieser Pore unbekannt (Browne et al., 2013a). Während der Messungen für diese Arbeit wurde die Bildung einer solchen großen Pore, wie auch bei vorherigen Messungen, an hP2X7R-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten nicht beobachtet (Klapperstück et al., 2000; Riedel et al., 2007a). Diese Untersuchungen legen nahe, dass die unter bestimmten experimentellen Voraussetzungen beobachtete Porenbildung nicht durch den P2X7R selbst, sondern durch P2X7R-abhängige Aktivierung anderer porenbildender Proteine zustande kommt.

Durch die Verwendung von Cy5-Monomaleimid in Kombination mit den Strommessungen konnte nicht nur überprüft werden, ob die entsprechende eingeführte Cysteinseitenkette in An- und/oder Abwesenheit von ATP zugänglich ist, sondern auch, ob dies zu funktionellen Effekten führt. So sind zum Beispiel die Konstrukte hP2X7R-K327C, -F328C, -D329C, -I330C und -Q332C zugänglich für extrazellulär gegebenes Cy5-Monomaleimid in Anwesenheit von ATP (vgl. Abb. 5.5); aber Applikationen mit MTSEA haben auf diese Konstrukte keinen funktionellen Effekt (vgl. Abb. 3.2 und 5.5). Bei P2X4R aus Ratte wurde die Aminosäure D331 als wichtig für die hohe Ca^{2+} -Permeation identifiziert (Samways

und Egan, 2007). Diese Position entspricht der D329 beim humanen P2X7R. Ob sie trotz der fehlenden Effekte von MTSEA auf den hP2X7R-D329C-abhängigen Strom dieselbe Relevanz hat, sollte näher untersucht werden.

Die Cysteinmutationen verursachen in Bezug auf die Funktionalität des hP2X7R nur kleine Effekte. Somit scheint keine einzelne Aminosäure essentiell wichtig für die Funktion des hP2X7R zu sein. Stattdessen bedingen mehrere Aminosäuren der TM2 gemeinschaftlich die hP2X7R-Kanalfunktion. Die relative funktionelle Expression, gemessen anhand der Stromamplitude der Cysteinmutantenkonstrukte verglichen mit dem des WTs, variiert bei den meisten Konstrukten um weniger als \pm eine Größenordnung. Ausgenommen sind die hP2X7R-Konstrukte I331C und V335C. Diese werden durch die Applikation von MTSEA stimuliert und haben verglichen mit dem WT schon vor der MTS-Applikation einen erhöhten mittleren Einzelkanalstrom, insofern die relative Oberflächenexposition und die mittleren ATP-induzierten Ströme mitbetrachtet werden (s. Tab. 5.1). Später durchgeführte Einzelkanalmessungen zeigten, dass hierfür eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit verantwortlich ist (Markwardt et al., 2014).

6.2 Stimulierende Effekte der MTS-Derivate

Die meisten Erkenntnisse der Struktur-Funktionsbeziehungen der TM2 der P2X-Rezeptoren wurden am P2X2R aus Ratte (rP2X2R) gewonnen. Effekte von Mutationen an der TM2 auf Ganzzellströme (Egan et al., 1998; Khakh und Egan, 2005; Kracun et al., 2010; Li et al., 2008; Li et al., 2010; Li et al., 2004; Rassendren et al., 1997), auf Einzelkanalströme (Browne et al., 2010a; Cao et al., 2009; Nakazawa et al., 1998) und auf die Calciumleitfähigkeit (Browne et al., 2010b) wurden untersucht.

Die beobachteten Effekte auf den ATP-induzierten Ganzzellstrom bei den hP2X7R-Konstrukten I331C, V335C, Y336C, S339C, Y343C und G345C bei Applikation von positiv geladenen MTS-Reagenzien wurden nicht durch die Bildung einer großen Pore ausgelöst, sondern durch einen Schalteffekt, wobei die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals durch MTSEA-Applikation stieg. Dies wurde bei nachfolgenden Einzelkanalanalysen bestätigt (Markwardt et al., 2014) (Pippel et al., in Arbeit).

An den äquivalenten Positionen des rP2X2R und rP2X4R wurden stimulierende und hemmende Effekte von MTS-Reagenzien, Ag^+ oder Cd^{2+} auf die cysteinmutierten Konstrukte inklusive Zunahme der Leckströme in Abwesenheit des Agonisten beobachtet.

So wurde zum Beispiel an der Position I328C des rP2X2R (äquivalent zu I331C des hP2X7R) durch Silberionen und MTS-Reagenzien der Strom verringert (Egan et al., 1998; Li et al., 2008; Rassendren et al., 1997). Zusätzlich induzierten verschiedene MTS-Derivate einen Agonisten-unabhängigen Strom, der auch nach Auswaschen der MTS-Derivate anhielt (Li et al., 2008; Rassendren et al., 1997; Rothwell et al., 2013). Positiv geladene photoisomerisierbare Maleimidderivate (Konformationsänderung durch Licht induzierbar) (Lemoine et al., 2013) sowie hydrophobe MTS-Reagenzien (Rothwell et al., 2013) konnten den rP2X2R-I328C direkt ATP-unabhängig öffnen. Es wird vermutet, dass diese Effekte am rP2X2R mit der Beeinflussung der Interaktion von I328 durch V48 der TM1 zusammenhängen (Jiang et al., 2001; Lemoine et al., 2013; Rothwell et al., 2013). Solche ATP-unabhängigen Effekte wurden an den hier getesteten Konstrukten nicht beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die stimulierenden Effekte am hP2X7R infolge der Stabilisierung der geöffneten und weniger durch die Destabilisierung der geschlossenen Kanalkonformation zustande kommen. Applikationen des hydrophoben Hydroxy-benzoyl-MTS haben bei den hier untersuchten Mutanten des hP2X7R keinen stimulierenden Effekt auf die Kanalöffnung. Somit herrschen zwischen den verschiedenen P2X-Rezeptoren feine Subtyp-abhängige Unterschiede, die sich auf die Struktur und die Funktion auswirken.

Auf den ATP-induzierten Strom der hP2X7R-V335C-Äquivalente I332C des P2X2R aus Ratte haben Silber- und Cadmiumionen einen hemmenden Effekt (Kracun et al., 2010; Li et al., 2008), wohingegen MTSET einen stimulierenden Effekt ausübt und einen Agonist-unabhängigen Leckstrom induziert (Li et al., 2008). Andere Studien dagegen zeigten, dass weder Ag^+ noch MTS-Reagenzien einen Effekt auf I332C haben (Egan et al., 1998; Rassendren et al., 1997). Die V335T-Mutation des P2X7R der Maus (mP2X7R), exprimiert in HEK-Zellen, führte zu einer gesteigerten Farbstoffaufnahme und Membran-*Blebbing* sowie einem

verstärkten Absterben der Zellen (Sun et al., 2013). Der detaillierte Mechanismus ist allerdings noch nicht geklärt.

Beim mP2X7R führten Mutationen von Tyrosin-336 zu Threonin zu einer verminderten Porenbildung, gemessen an der Fluoreszenzfarbstoffaufnahme während der Messung (Sun et al., 2013). Verschiedene Mutationen der äquivalenten N333-Position des rP2X2R führten zu ATP-unabhängigem, spontanen Kanalschalten. Die Mutation zu Alanin führte zu verstärkter Porenbildung (Virginio et al., 1999b). Inwieweit hierbei die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals zugenommen hatte, bleibt unklar.

Bei dem zu S339C äquivalenten Konstrukt T336C des rP2X7R wurden blockierende Effekte durch Silberionen, MTS-Reagenzien und Cadmiumionen (Egan et al., 1998; Kracun et al., 2010; Li et al., 2008; Rassendren et al., 1997). Zusätzlich führte eine Mutation an der betreffenden Position zu Tyrosin beim rP2X2R zu Veränderungen des Permeationsverhaltens der Kanäle (Migita et al., 2001). Allerdings wurden an dieser Aminosäure ebenfalls stimulierende Effekte wie die Induktion von Leckströmen oder eine erhöhte Einzelkanalöffnungswahrscheinlichkeit beobachtet (Cao et al., 2009; Rassendren et al., 1997).

Das Konstrukt S340C des rP2X2R (gleichbedeutend zur Y343C im hP2X7R) zeigte nur sehr kleine Ströme (Egan et al., 1998; Rassendren et al., 1997). Ein kleiner (nicht signifikanter) stimulierender Effekt von MTSEA wurde ebenfalls beobachtet (Rassendren et al., 1997). Eine Y343L-Mutation beim mP2X7R führte zu einer reduzierten Porenformation (Sun et al., 2013).

Beim Konstrukt G342C des rP2X2R (dem entspricht G345C des hP2X7R) wurden stromverstärkende Wirkungen von Ag^+ , MTSEA oder Cd^{2+} demonstriert (Egan et al., 1998; Kracun et al., 2010; Rassendren et al., 1997). Beim G345C-Konstrukt des rP2X7R führte MTSEA zu einer partiellen Blockade in der porenerweiterten Phase (Browne et al., 2013b). Mutationen an den korrespondierenden Aminosäuren bei rP2X4R von Glycin zu Lysin führten zu abnehmenden Strömen durch die nicht erweiterte Kanalpore, gleichzeitig förderten diese Mutationen jedoch die Porenbildung (Khakh et al., 1999).

So wurden einerseits stromreduzierende Effekte von Silber- und Cadmiumionen oder positiv geladenen MTS-Derivaten an rP2X2R-Konstrukten gefunden, die äquivalent zu den hP2X7R-Konstrukten I331C, V335C, Y336C und S339C waren. Der grundlegende Mechanismus wurde nicht beschrieben, aber die hemmenden Effekte sind - vermutlich infolge einer mehr oder weniger kompletten Blockade des Permeationsweges - verursacht worden. Auf der anderen Seite wurden auch stimulierende Effekte durch Manipulationen an rP2X2R-Konstrukten, die äquivalent zu hP2X7R-I331C, -V335C, -Y336C, -S339C und -G345C waren, gefunden. Diese wurden möglicherweise durch Schalteffekte hervorgerufen (Egan et al., 1998; Khakh et al., 1999; Kracun et al., 2010; Li et al., 2008; Li et al., 2010; Li et al., 2004; Rassendren et al., 1997). Diese unterschiedlichen Effekte an den P2X2R- bzw. P2X7R-Konstrukten könnten möglicherweise aufgrund einer kleineren P2X2R- Kanalpore auftreten. Solch eine kleinere Pore gäbe den MTS-Effekten auf die Permeation ein größeres Gewicht als der Effekt auf die Kanalschaltung. Des Weiteren könnten komplexe Effekte der Cysteinmodifikation größere Bedeutung für das Schaltverhalten des rP2X2R beigemessen werden, weil der rP2X2R desensibilisiert (Kracun et al., 2010). Beispielsweise könnte ein durch eine Cysteinmodifikation herbeigeführtes beschleunigtes agonisteninduziertes Öffnen des P2X2R infolge einer gleichzeitig beschleunigten Desensibilisierung maskiert werden.

Das einzige Konstrukt, welches durch cysteinmodifizierende Reagenzien immer einen abnehmenden Strom zeigte, ist das Konstrukt T339C des rP2X2R, äquivalent zur S342C des hP2X7R (Egan et al., 1998; Li et al., 2008). Die entsprechende Aminosäure ist womöglich an oder in der Nähe der Engstelle der Kanalpore lokalisiert. Vermutlich wird bei diesem Konstrukt der Ionenfluss durch das Einbringen einer positiven Ladung in den Ionenkanal gehemmt.

Um den Effekt eines Austausches von TM2-Aminosäuren gegen das ungeladene voluminöse Tyrosin nachzuahmen, wurde Hydroxy-benzoyl-MTS verwendet (s. Abb. 3.1). Allerdings war der einzige beobachtete Effekt die Hemmung des S342C-Konstruktes (s. Abb. 5.23). Dies zeigt auf, dass die Ladung der MTS-Derivate für stimulierende Effekte eine essenzielle Rolle spielt. Die Größe des eingebrachten Restes scheint allerdings eher unbedeutend zu sein. Der inhibitorische Effekt auf hP2X7R-S342C wird vermutlich sowohl durch die Größe

des MTS-Restes als auch durch seine Ladung ausgelöst, da MTSEA stärker wirkt als MTSES und Hydroxy-benzoyl-MTS.

Die Ratekonstanten für den MTSEA-Effekt in An- und Abwesenheit von ATP waren für die hP2X7R-Konstrukte I331C, V335C und S339C (s. Abbildung 5.22) annähernd gleich. Des Weiteren waren auch die MTSEA-Effekte auf die ATP-induzierten Ströme unabhängig vom Öffnungszustand der Kanalpore (s. Abbildung 5.21). Dies impliziert, dass die *Gate*-Region C-terminal („unterhalb“) von S339 liegt (s. auch 6.4). Der mangelnde MTSEA-Effekt am geschlossenen Ionenkanal-Konstrukt mit der N-terminal („oberhalb“) von S339 gelegenen Mutation Y336C kann nicht mit dieser vermuteten Position des Gates erklärt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass Y336C in der ungeöffneten Kanalkonformation nicht für MTSEA zugänglich ist. Dies könnte durch die Drehung der TM2-Region während des *Gatings*, wie sie für den P2X4R des Zebrafisches beschrieben worden ist (Hattori und Gouaux, 2012), bedingt sein. Demzufolge würde das Cystein an der Position 336 im geschlossenen Kanal zwar oberhalb des Gates liegen, aber aus der Ionenkanalpore herausgedreht werden, wenn ATP nicht gebunden hat.

6.3 Position des Selektivitätsfilters

Um die Position des Selektivitätsfilters zu bestimmen, wurden verschiedene MTS-Reagenzien benutzt, das sterisch kleine positiv geladene MTSEA, das voluminöse positiv geladene MTSET und das negativ geladene MTSES. C-terminal, also in Richtung der cytoplasmatischen Seite, bis zu Position 342 haben wenigstens zwei der Reagenzien Wirkung gegenüber den jeweiligen Konstrukten gezeigt. Unterhalb der Position 342, angefangen mit der Rezeptorvariante Y343C, zeigte nur noch MTSEA eine Wirkung. Von anderen Gruppen wurde die Vermutung geäußert, dass MTSEA die Lipidmembran durchqueren kann (Holmgren et al., 1996) und nicht durch die Ionenkanalpore permeieren muss. Demzufolge sollen mittels MTSEA keine Schlussfolgerungen bezüglich der Lokalisation des Ionenkanaltores gezogen werden können. Aus folgenden Gründen kann aber geschlossen werden, dass der MTSEA-Effekt auf die Konstrukte Y343C und die G345C nicht durch eine Permeation durch die Lipidphase ausgelöst wird, sondern eher durch die Durchquerung der hP2X7R-Kanalpore. Der effektive maximale Durchmesser von MTSEA und MTSET ist ähnlich der des Monoethylammoniums bzw. des Tetraethylammoniums. Letztere besitzen in der

P2X7R-Kanalpore eine relative Leitfähigkeit bezogen auf Na^+ -Ionen von 90% bzw. 20% (s. Abb. 6.1 und Tabelle 6.1) (Riedel et al., 2007b). Die Pore an sich weist einen Durchmesser von ca. 8,5 Å auf (Riedel et al., 2007b). Deshalb kann MTSEA sicherlich mit Leichtigkeit den hP2X7R-Ionenkanal durchqueren, während die Permeation von MTSET deutlich vermindert sein sollte. Bei Permeation durch die Lipidphase sollten aber auch geschlossene P2X7R-Kanäle modifiziert werden. Des Weiteren übt MTSEA auf die Konstrukte S342C, Y343C und G345C einen Einfluss auf den offenen, jedoch nicht auf den geschlossenen P2X7R-Ionenkanal aus. Es existiert noch keine eindeutige Erklärung für die Diskrepanz zwischen früheren Beobachtungen an Lipidvesikeln und Membranpatches (Holmgren et al., 1996) und den hier gezeigten Effekten an Oozyten. Aber das große Volumen/Oberflächenverhältnis und die vermutlich hohe intrazelluläre reduzierende Kapazität der *Xenopus laevis*-Oozyten, welche kovalente Modifizierungen von SH-Seitenketten schnell dissoziieren dürften, könnten eine Erklärung liefern.

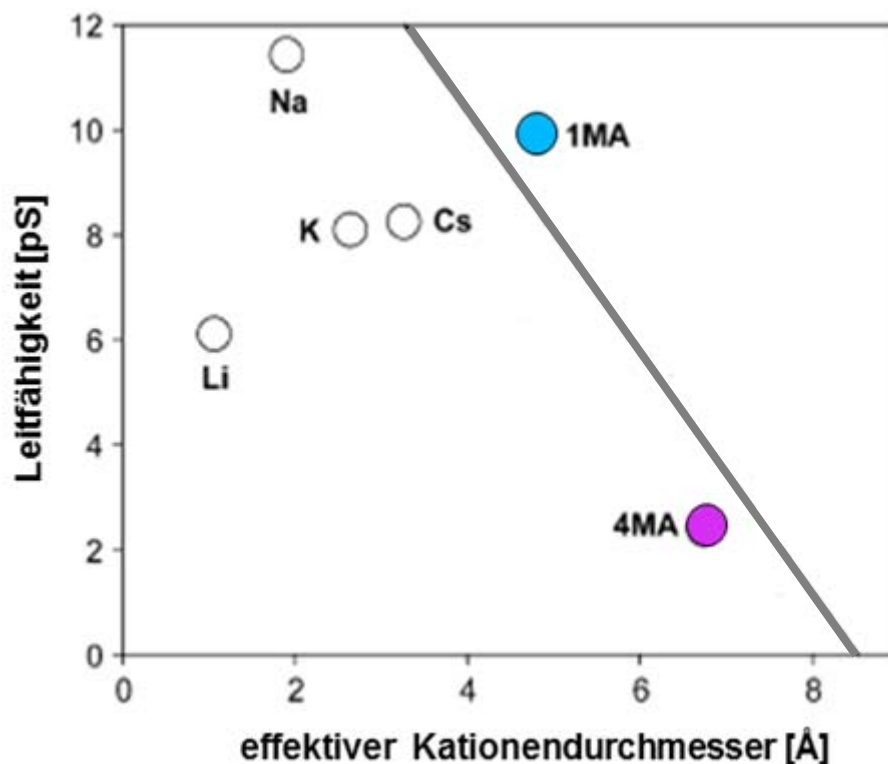
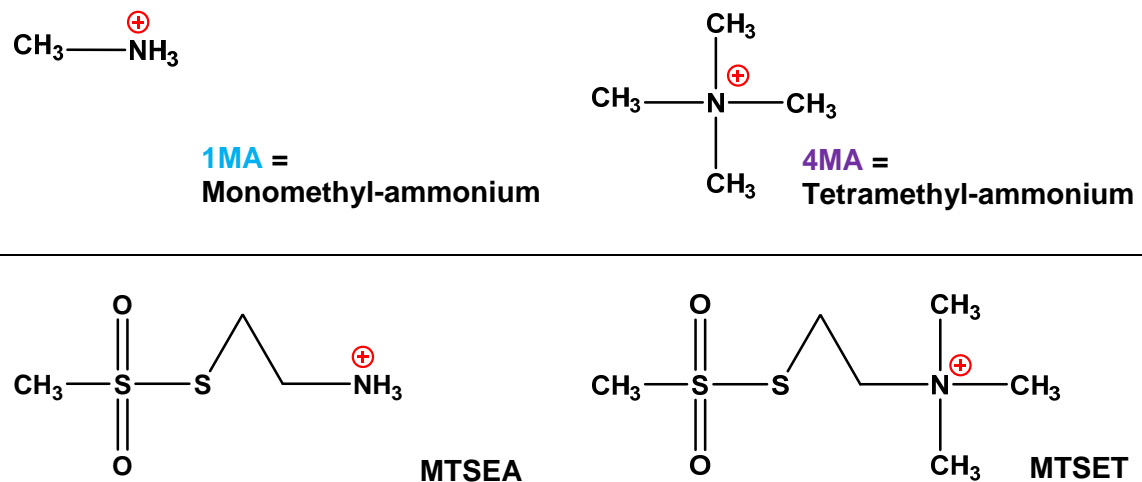


Abb. 6.1: Leitfähigkeit des hP2X7R-Einzelkanals in Abhängigkeit vom Kationendurchmesser.

Der effektive Durchmesser der hP2X7R-Pore ist 8,5 Å. Mono- und Tetramethyl-ammoniumionen (1MA und 4MA) können die Pore noch durchqueren. Abbildung aus (Riedel et al., 2007b) übernommen und adaptiert.

Tab. 6.1: Vergleich von Ammonium- und MTS-Derivaten.
Die Strukturformeln wurden mittels ChemDraw Prime erstellt.



Die fehlende Wirkung von MTSET und MTSES auf Cysteinmutanten C-terminal von Position 342 weist darauf hin, dass das „obere“ Ende des Selektivitätsfilters zwischen S342 und Y343 beginnt. Ein scheinbarer Widerspruch dafür ist, dass Y343C durch Sulfo-Cy5-Monomaleimid markiert wird (s. Abb. 5.5). Eine mögliche Erklärung dafür bietet das langgestreckte Molekül des Fluoreszenzfarbstoffes selbst. Die Maleimidgruppe, welche an die freie Seitenkette des Cysteins in den Varianten bindet, könnte durch die geöffnete Kanalpore gelangen und an die SH-Gruppe binden. Der negativ geladene Sulfatrest dagegen könnte dabei extrazellulär verbleiben, d.h. müsste hierbei nicht durch den Selektionsfilter treten.

Aus Abbildung 5.5 ist ersichtlich, dass sich die Zugänglichkeit des Cy5-Monomaleimid-Farbstoffes bei einigen Konstrukten durch die Applikation von ATP deutlich erhöht. Durch die ATP-Bindung innerhalb des Proteins kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Drehung der Cysteinseitenketten in die Kanalpore verursacht, wodurch das Cy5-Monomaleimid besser an diese Seitenketten binden kann. Andere eingefügte Cysteine binden auch in der Gegenwart von ATP kein Cy5-Monomaleimid. Sie ragen deshalb vermutlich auch bei geöffnetem Kanal nicht in die Pore oder sie liegen unterhalb der Gateregion (s. 6.4).

Einzig beim Konstrukt hP2X7R-S342C bewirkten die verwendeten MTS-Substanzen einen verminderten ATP-abhängigen Strom. Dies bestätigt die Hypothese, dass sich Serin 342 an der engsten Stelle der Ionenkanalpore, in dem

auch der Selektionsfilter lokalisiert ist, befindet (Khakh und North, 2012). Mutanten der TM2 des rP2X2R, bei denen T339 und S340 gegen Tyrosin ausgetauscht wurden, zeigen eine veränderte Kationenpermeabilität (Migita et al., 2001). Dies führt zu der Annahme, dass beim rP2X2R die engste Position durch T339 und S340, die äquivalent zur S342 und Y343 bei hP2X7R sind, gebildet wird. Des Weiteren führt eine Mutation von T339 zu Lysin in einer, zwei oder gar drei Untereinheiten des Trimers zu einem deutlichen Anstieg der Anionenpermeabilität und reduziert die Einzelkanalleitfähigkeit (Browne et al., 2010a). Im Modell des P2X4R-Rezeptors des Zebrafisches (zfP2X4R) wird die engste Stelle der Ionenkanalpore zwischen Alanin 347 und Leucin 351 postuliert (Hattori und Gouaux, 2012). Dies entspricht dem Bereich S342 bis L346 beim hP2X7R. Offensichtlich sind die Regionen des Selektionsfilters bei den drei Subtypen rP2X2R, zfP2X4R und hP2X7R nicht sehr unterschiedlich. Um zu ermitteln, wie weit der Selektivitätsfilter in die cytoplasmatische Seite reicht, sind weitere Experimente nötig. Später durchgeführte Einzelkanalexperimente in der Arbeitsgruppe von Prof. Markwardt ((Markwardt et al., 2014), Pippel et al., in Arbeit) weisen darauf hin, dass der Selektivitätsfilter N-terminal zu G345 endet.

Kationenkanäle tragen eigentlich negative Ladungen in der Kanalporenwand (Gouaux und MacKinnon, 2005). Die AS-Seitenketten der Porenwand der P2X-Rezeptoren sind jedoch nicht negativ geladen. Deshalb kann vermutet werden, dass auch Carbonyl-Gruppen des α -Helix-Rückgrates zur Kationenselektivität des hP2X7R beitragen. Andererseits sind Serine in spezifischen Kationenkanälen wie Amilorid-sensitiven epithelialen Na^+ -Kanälen und Ionenkanälen, die durch extrazelluläre Protonen geöffnet werden, Bestandteile der Porenwand des Selektivitätsfilters. Hierbei assoziieren Kationen wahrscheinlich an den polarisierten Hydroxyl-Sauerstoff (Dudev und Lim, 2014). Inwieweit dies bei P2X-Rezeptoren der Fall ist, sollte ebenfalls eingehender untersucht werden.

6.4 Lokalisation des Kanaltors (*Gate*)

MTSEA hat auf hP2X7R-Cysteinmutanten oberhalb von S339C sowohl im offenen (Anwesenheit von ATP) als auch im geschlossenen Zustand (Abwesenheit von ATP) eine Wirkung. Für Cysteinkonstrukte, die sich weiter in C-terminaler Richtung befinden, ist für einen funktionellen MTSEA-Effekt eine Kanalöffnung erforderlich.

Verglichen mit MTSEA hat MTSET auf das geschlossene S339C-Konstrukt nur einen sehr langsamen Effekt, selbst wenn mit 0,5 mM das Zwanzigfache an MTSET verwendet wird. Des Weiteren ist Sulfo-Cy5-Monomaleimid nicht in der Lage, an unter der Position S339C befindliche Cysteinseitenketten der Mutanten im geschlossenen Zustand zu binden (Abbildung 5.4). Dies zeigt insgesamt, dass sich das *Gate* unterhalb von S339 befinden muss, aber der *Gate*-Prozess die Porenregion an der Stelle S339 verengt, so dass MTSEA sehr leicht zugreifen kann, aber die Reaktion von MTSET behindert wird und das negativ geladene Maleimid im geschlossenen Kanalzustand gar nicht bis zur S339C gelangt. Cy5-Maleimid bindet im geschlossenen Zustand auch nicht an V335C. Möglicherweise verursacht das Kanalschließen auch hier eine geringe Konstriktion der Pore, die das Binden des relativ großen Cy5-Maleimid, jedoch nicht das Binden der kleineren geladenen MTS-Reagenzien verhindert. Wie weit das *Gate* C-terminal reicht, kann mit den Ganzzellexperimenten nicht beantwortet werden. Neuere Einzelkanalexperimente mit zytoplasmatisch appliziertem MTSET ((Markwardt et al., 2014), Pippel *et al.*, in Arbeit) weisen darauf hin, dass das *Gate* C-terminal zwischen Y343 und G345 endet.

Um die *Gate*-Region im rP2X2R zu lokalisieren, wurden im Rahmen von Ganzzellmessungen Silber- und Cadmiumionen sowie verschiedene MTS-Reagenzien genutzt, um Cysteinmutanten der TM2 zu modifizieren. Für rP2X2R wurden verschiedene mögliche *Gate*-Bereiche postuliert: C-terminal von I328 (I331 bei hP2X7R) (Egan et al., 1998), zwischen L338 und D349 (entsprechen L341 und D352 beim hP2X7R) (Rassendren et al., 1997), zwischen T336 und V343 (S339 und L346 beim hP2X7R) (Li et al., 2008) und zwischen T336 und T339 (S339 und S342 beim hP2X7R) (Kracun et al., 2010). Die Struktur des zfP2X4R im geschlossenen Zustand offenbart die *Gate*-Region zwischen N341 und A347 (dies entspricht Y336 und S342 beim hP2X7R) (Kawate et al., 2009). Abweichungen in den vorgeschlagenen *Gate*-Regionen können durch die Verwendung verschiedener Subtypen oder unterschiedliche MTS-Reagenzien zustande kommen (Browne et al., 2010b).

6.5 Rolle der Aminosäuren im zytoplasmatischen und extrazellulären Vestibül

Die Aminosäuren A348 und D352 liegen im vermuteten zytoplasmatischen Vestibül (direkt unterhalb der Ionenkanalpore) der P2X-Rezeptoren, sofern das zfp2X4R-Modell (Kawate et al., 2009) auch auf den hP2X7R zutrifft. Die entsprechenden Cysteinmutanten rufen nur 10 % oder weniger des ATP-induzierten Natriumstromes des WTs hervor (s. Abb. 6.2 und 6.3).

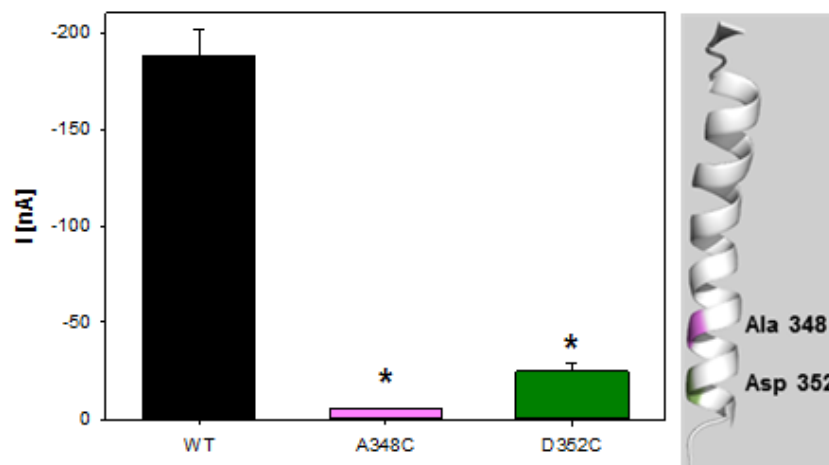


Abb. 6.2: Vergleich der aktivierenden Ströme vom hP2X7R-WT und zwei Mutanten. Die ATP-induzierten Stromamplituden (I_{act} , s. Abb. 4.5) wurden für die drei Konstrukte gemessen. Jede Applikation von 1 mM ATP dauerte 6 s. Messung unter Standardbedingungen. Erste Applikation in bunt, äquivalent zur farblichen Position in der Helix rechts. N = 6-42 Oozyten. * - signifikant verschieden zum WT. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

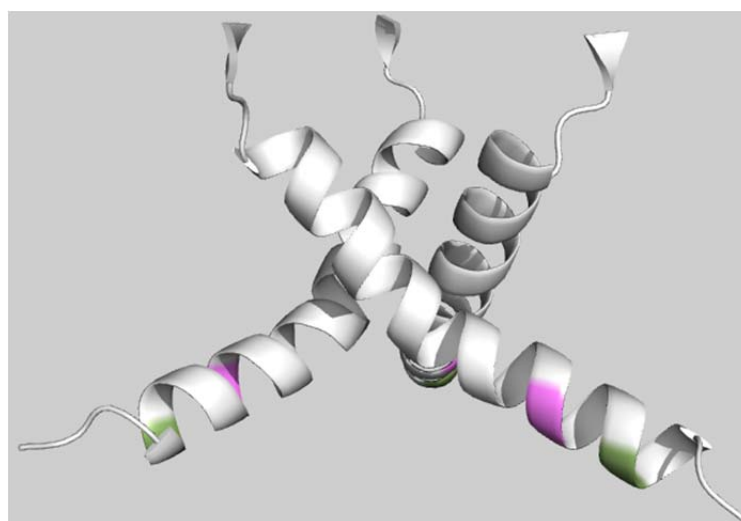


Abb. 6.3: Modell der TM2 des geschlossenen hP2X7R-Ionenkanals als Trimer . Struktur von K327 bis I355. Violett – A348, dunkelgrün – D352. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Es wurde vermutet, dass diese Aminosäuren in das Schaltverhalten des rP2X2R (Egan et al., 1998; Kracun et al., 2010; Li et al., 2008; Rassendren et al., 1997) und in die Porendilatation des rP2X7R (Browne et al., 2013b) involviert sind. Für den nicht porenbildenden hP2X7R wurden keine Effekte durch lange Applikationen von MTSEA (1 mM für 20 s) oder Silberionen (1 μ M für 12 s, (Pippel, A., 09)) auf diese Konstrukte detektiert. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass das zytoplasmatische Vestibül des hP2X7R unterhalb der Engstelle der TM2-Domänen der drei Untereinheiten sterisch weniger restriktiv ist, als beim P2X2R. Bei letzterem wird außerdem angenommen, dass sich diese Engstelle während der Kanalöffnung weiter verengt (Li et al., 2010). Bei einem weiten Vestibül würde die Bindung von MTS-Derivaten keine funktionellen Konsequenzen hervorrufen, weil potentiell genügend Platz zwischen den drei Monomeren vorhanden wäre. Solch ein Effekt ist beim hP2X7R vermutlich auch im extrazellulären Vestibül zu finden, wo eine MTS-Modifikation der Konstrukte K327C, F328C und D329C zu keinen funktionellen Effekten führt (s. Abb. 3.2). Aufgrund der Cy5-Maleimidmarkierung dieser Konstrukte (s. Abb. 5.5.) ist auch eine kovalente Modifikation durch MTSEA zu vermuten. Eine Änderung der Eigenschaften nach MTS-Modifikation ist somit nur bei den Cysteinmutanten zu beobachten, die sich weiter unten im engen Bereich der Ionenkanalpore befinden (I331C-G345C).

Unter Verwendung der Röntgenkristallstrukturdaten des geschlossenen und des offenen verkürzten zfP2X4R wurde durch Sequenz-*Alignment* und Homologie-Modellierung ein Modell des humanen P2X7R generiert (Markwardt et al., 2014) (s. Abb. 1.2 und Abschnitt 4.3.7).

In Abbildung 6.4 ist links die geschlossene Struktur der drei TM2 dargestellt. Auf der rechten Seite ist eine TM2 mit den untersuchten farblich markierten Seitenkettenresten und deren Benennung dargestellt.

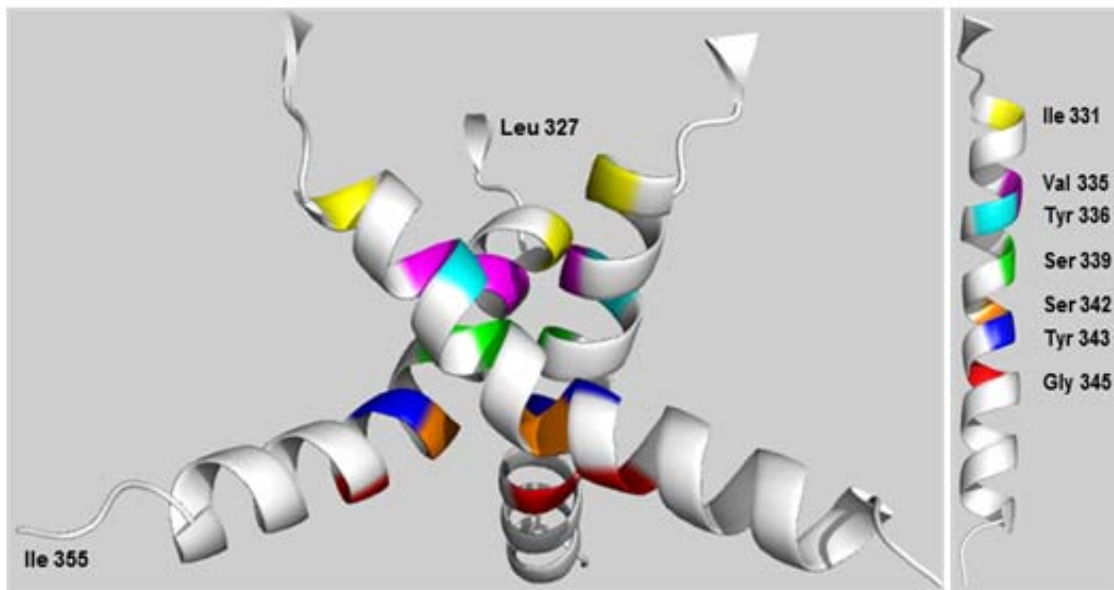


Abb. 6.4: Modell der TM2 des geschlossenen hP2X7R-Ionenkanals als Trimer (links) und als Monomer (rechts).

Struktur von K327 bis I355.

gelb – I331, pink – V335, cyan – Y336, grün – S339, orange – S342, blau – Y343, rot – G345. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Die Aminosäuren S342, Y343 und G345 können im geschlossenen Kanalzustand durch MTS-Reagenzien nicht modifiziert werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich die Position S339 als die engste Stelle in der Kanalpore darstellt, wenn kein ATP gebunden hat.

In Abbildung 6.5 ist links die räumliche Anordnung der drei TM2 des offenen hP2X7R-Kanals entsprechend des o.g. Modells dargestellt. Auf der rechten Seite ist eine TM2 mit den untersuchten farblich markierten Seitenkettenresten und deren Benennung dargestellt.

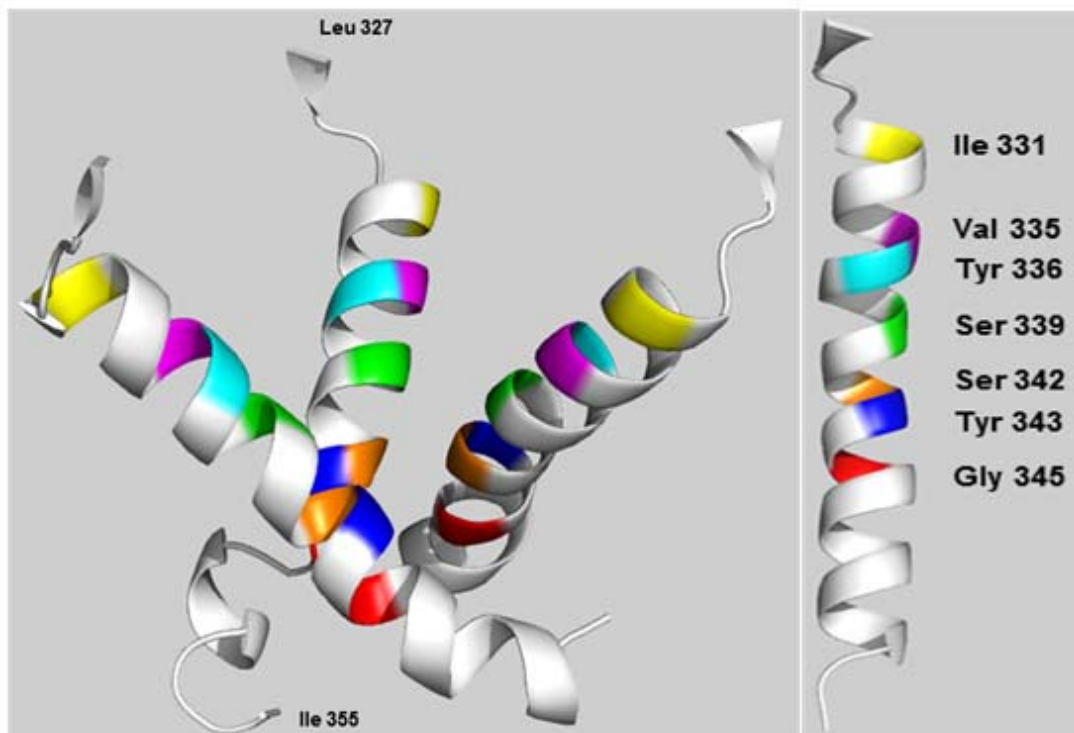


Abb. 6.5: Modell der TM2 des offenen hP2X7R-Ionenkanals als Trimer (links) und als Monomer (rechts).

Struktur von K327 bis D356.

gelb – I331, pink – V335, cyan – Y336, grün – S339, orange – S342, blau – Y343, rot – G345. Adaptation des ursprünglichen Modells A. Kless (Grünenthal GmbH Aachen). Als Grundlage diente das Modell des offenen zP2X4R (Hattori und Gouaux, 2012).

Wie zu sehen ist, ist die engste Stelle im offenen Kanalzustand des Ionenkanals die Position der Aminosäure S342 (orange). Dies liefert eine Erklärung, warum MTSET und MTSES unterhalb dieser Position keine Wirkung mehr zeigen, auch wenn sie zusammen mit ATP gegeben werden, um den Kanal zu öffnen. MTSET ist räumlich zu anspruchsvoll, während MTSES durch die negative Ladung stärker diskriminiert wird. Beide Substanzen gelangen somit nicht durch die Pore und können tiefer gelegene Seitenkettenreste nicht modifizieren. Für MTSEA jedoch scheint die Pore groß genug zu sein. Darum lassen sich bei gemeinsamer Gabe von MTSEA und ATP tiefer gelegene Seitenkettenreste noch modifizieren.

In Abbildung 6.6 sind die beiden engsten Positionen im geschlossenen und offenen Zustand von oben (Blick aus dem Extrazellularraum in die Zelle) dargestellt.

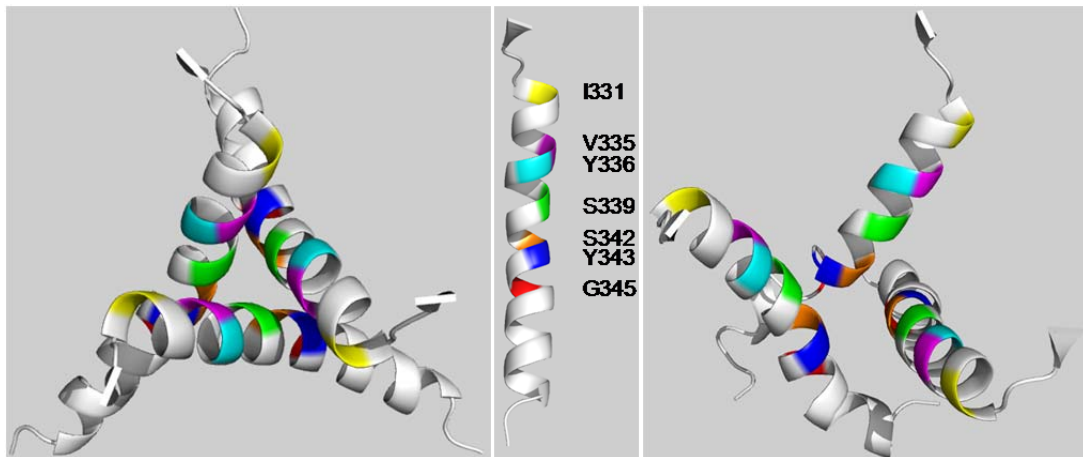


Abb. 6.6: Modell der TM2 des geschlossenen hP2X7R-Ionenkanals als Trimer (links), als Monomer (Mitte) und des offenen hP2X7R-Ionenkanals als Trimer (rechts).

Struktur von K327 bis I355.

gelb – I331, pink – V335, cyan – Y336, grün – S339, orange – S342, blau – Y343, rot – G345. Die Modelle wurden anhand der von A. Kless (Grünenthal) berechneten Modelle erstellt.

Die in dieser Arbeit näher betrachteten Cysteinmutanten sind in Abbildung 6.7. noch einmal zusammengefasst. Diejenigen Konstrukte, die sich mittels MTS-Reagenzien in An- und Abwesenheit von ATP modifizieren und durch Cy5-Monomaleimid markieren ließen, sind unterstrichen. Diese Positionen sind schon während der Abwesenheit von ATP in die Kanalpore gedreht, bzw. sind durch die ATP-Bindung und der damit verbundenen Konformationsänderung für SH-Bindungspartner frei zugänglich. Die anderen Positionen sind entweder nicht in die Kanalpore exponiert (Lysin 333), befinden sich im oberen Vestibül (Leucin 327, Asparagin 329 und Isoleucin 330) oder liegen im unteren Vestibül (Lysin 346, Phenylalanin 353, Asparagin 356 und Threonin 357). Dadurch sind sie entweder nicht modifizierbar oder ihre Modifikation hat keine Auswirkungen auf den ATP-induzierten Natriumstrom.

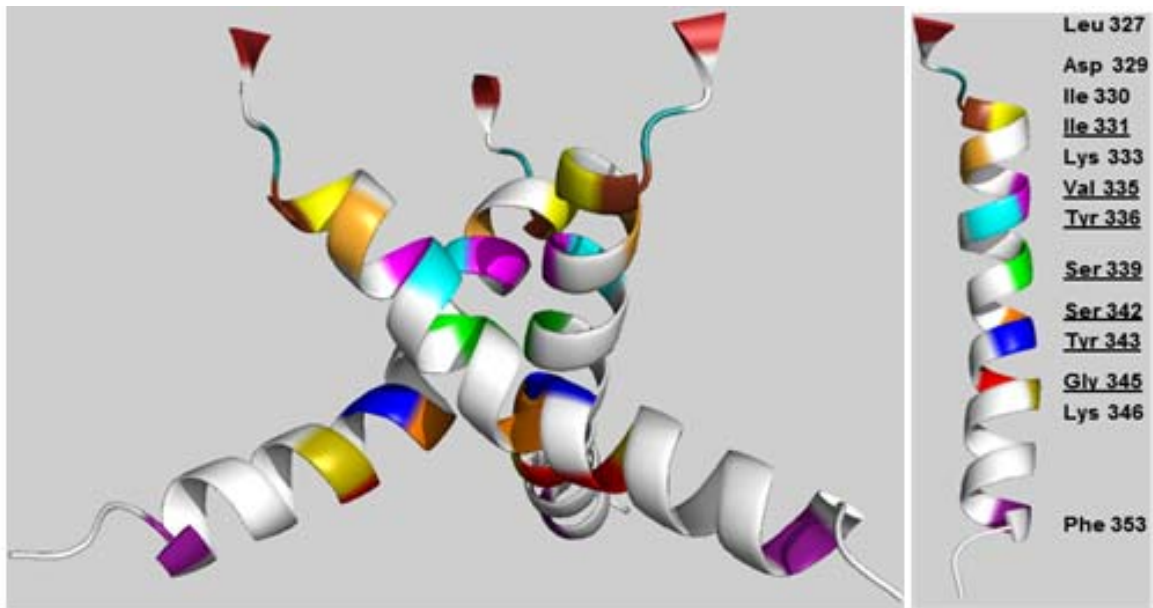


Abb. 6.7: Modell der TM2 des geschlossenen hP2X7R-Ionenkanals als Trimer (links) und als Monomer (rechts).

Die Cysteinmutanten an den unterstrichenen Aminosäurepositionen waren mit Hilfe von MTS-Reagenzien modifizierbar und mittels Cy5-Monomaleimid markierbar. Als Grundlage des Modells diente das energetisch minimierte Homologie-Modell des hP2X7R (s. Abb. 1.2).

Die Positionen der modifizierbaren Aminosäuremutanten innerhalb der Kanalpore, die Position des *Gates* C-terminal zu S339 sowie die Position des Selektivitätsfilters C-terminal zu S342 können somit durch das Modell des hP2X7R erklärt werden.

7 Zusammenfassung

Der humane P2X7-Rezeptor gehört zur Familie der ATP-gesteuerten P2XR. Er ist ein homotrimerer Kationenkanal mit einer Präferenz für Natrium-, Kalium- und Calciumionen. Wie alle Vertreter dieser Familie weist er intrazellulär gelegene N- und C-Termini, zwei Membrandomänen und eine große Extrazellulärdomäne mit der Ligandenbindungsstelle auf. Der hP2X7R wird vorrangig in Zellen des Immunsystems exprimiert, wodurch er eine Rolle bei immun- und entzündungsmodulatorischen Funktionen spielt.

Durch den Austausch von Aminosäuren der zweiten Transmembranregion gegen Cystein lässt sich mittels kovalenter Cysteinmodifikation die funktionelle Bedeutung dieser Positionen näher bestimmen. Zur Modifikation dienten Methanthiosulfonate (MTS-Derivate).

In der Gesamtzellexpression der untersuchten Konstrukte gab es keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor. Alle Konstrukte wurden somit gut translatiert und prozessiert. In der Oberflächenexponiertheit der einzelnen Rezeptormutanten gab es hingegen starke Abweichungen vom Wildtyp-Niveau, die allerdings nicht mit Unterschieden in den ATP-induzierten Natriumströmen korrelierten. Es existiert kein direkter Zusammenhang zwischen der Oberflächenexpression und den Kanalströmen.

Bei den sechs Konstrukten I331C, V335C, Y336C, S339C, Y343C und G345C führte die kovalente Modifikation unter Verwendung des MTS-Derivats MTSEA zu einer Vergrößerung des ATP-induzierten Stromes. Später durchgeführte Einzelkanalmessungen deuteten hierbei auf einen Schalteffekt mit erhöhter Offenwahrscheinlichkeit hin.

Dass die kovalenten Cysteinmodifikationen einen Effekt auf das Schaltverhalten des P2X7R-Kanals haben, zeigte sich an der Beschleunigung der Aktivierung und der Verlangsamung der Deaktivierung durch MTSEA-Modifikation beim Konstrukt V335C.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Konstrukten hatte MTSEA nur auf das Konstrukt S342C einen hemmenden Effekt. Während der Applikation von ATP

kam es zuerst zum Öffnen, danach zum Verschließen der Kanalpore (Desensibilisierung). Die Koapplikation von ATP und MTSEA führte zu einem sehr schnellen irreversiblen Verschließen der Kanalpore. Dies ist wahrscheinlich auf eine Blockierung der hier gelegenen Engstelle der Kanalpore zurückzuführen.

Die Geschwindigkeit (Ratekonstante) der Seitenkettenmodifikation mittels des positiv geladenen MTS-Derivats MTSEA war bei den Konstrukten I331C und S339C nicht von der angelegten Klemmspannung abhängig. Bei den Konstrukten V335C, Y336C, S342C, Y343C und G345C beschleunigte sich die Modifikationsgeschwindigkeit, wenn die Klemmspannung zunehmend negativ wurde. Das negativere intrazelluläre Membranpotenzial verstärkte offensichtlich das Anfluten der MTSEA-Ionen zum eingeführten Cystein.

Während MTSET mit seinem großen positiven Rest einen ähnlich stimulierenden (bei der S342C einen ähnlichen blockierenden) Effekt auslöste, wie MTSEA, zeigte MTSES mit seinem negativen Rest nur einen Effekt auf die beiden Rezeptorvarianten S339C und S342C.

Bei gleichzeitiger Gabe von ATP mit Methanthiosulfonaten erreichte nur das kleine MTSEA die tiefer gelegenen Positionen Y343C und G345C, dagegen gelangten die großen MTSET- und MTSES-Substanzen nicht dorthin. Die S342C-Variante verfügte über die letzte Position, bei der alle drei MTS-Derivate eine Wirkung im offenen Kanalzustand zeigten. Die Aminosäure 342 stellte somit eine erste Engstelle für den einwärtsgerichteten Ionenstrom dar, welche den Durchtritt von MTSET und MTSES behinderte. Dies lässt sich auch anhand des mittels Sequenz-*Alignment* und Homologie-Modellierung ausgehend von P2X4R aus dem Zebrafisch generierten P2X7R-Modells im offenen Kanalzustand erklären.

Wenn MTSEA und ATP getrennt voneinander appliziert wurden und das MTS-Derivat somit auf die geschlossene Kanalpore wirkt, ließen sich die Konstrukte I331C, V335C und S339C mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei MTSEA-Wirkung auf den offenen Ionenkanal modifizieren. Bei den tiefer gelegenen Konstrukten S342C, Y343C und G345C ließ sich kein MTSEA-Effekt bei getrennter Applikation von MTSEA und ATP bestimmen. Diese Konstrukte waren also im geschlossenen Zustand der Kanalpore für MTSEA nicht erreichbar. Das lässt vermuten, dass sich die *Gate*-Region, die Engstelle des geschlossenen

Kanals, unter der AS S339 befindet, da sich diese mutierte Position in beiden Zuständen des Kanals modifizieren ließ, daruntergelegene Positionen jedoch nicht. Eben dieses Verhalten spricht dafür, dass die Aminosäure S339 das extrazelluläre Ende des Kanal-Gates darstellt. Dies lässt sich ebenfalls im Modell des geschlossenen hP2X7R-Kanals zeigen. Dass das Y336C-Konstrukt nicht im geschlossenen Zustand durch MTSEA verändert wurde, kann daran liegen, dass die extrazellulär zu S339 gelegene Seitenkette 336 bei geschlossenem Kanal nicht in die Pore hineinragt und damit nicht zugänglich ist, was ebenso mit dem Modell des offenen hP2X7R-Kanals korreliert.

Es existieren keine negativ geladenen Seitenketten in der Kanalpore des hP2X7R. Die Kationenselektivität könnte durch die polaren, lokal negativ geladenen Serine S339 und S342, oder durch die Carbonylgruppen des α -Helix-Rückgrates hervorgerufen werden.

Ungeladene MTS-Derivate wie Hydroxy-benzoyl-MTS hatten nur auf das Konstrukt S342C eine Wirkung. Dahingegen konnte das kleine MTSEA alle betrachteten sieben Konstrukte modifizieren. Die beiden großen Reste des MTSES und MTSET, die unterschiedliche Ladungen tragen, konnten entweder nur wenige Cysteinmutanten modifizieren oder ihr Effekt ist deutlich kleiner als bei MTSEA-Applikation. Es scheint für die funktionellen Effekte von Cysteinmodifikationen bedeutend zu sein, wie groß der eingeführte Rest ist und welche Ladung er trägt.

Die Position des Gates C-terminal zu S339 sowie die Position des Selektivitätsfilters C-terminal zu S342 lassen sich an Hand des Modelles des hP2X7R erklären.

8 Ausblick

Wie schon in der Diskussion angesprochen, hat die Position D331 im rP2X4R eine besondere Bedeutung für die Calcium-Permeabilität. Ob die äquivalente Position D329 des hP2X7R die gleiche Bedeutung aufweist, sollte untersucht werden. Hierzu wären detaillierte Messungen der Ca^{2+} -Permeabilität notwendig (Egan und Khakh, 2004; Liang et al., 2015).

In wie weit sich der Selektivitätsfilter von der Position S342 in Richtung Zytoplasma ausweitet, sollte ebenfalls untersucht werden. Ob die Position G345 sowohl das Ende des *Gates* als auch vom Selektivitätsfilter darstellt und ob nicht noch tiefer liegende Aminosäuren wie L346, A347 und A348 involviert sind, bedarf auch weiterer Untersuchungen. Diese können mittels intrazellulärer Applikationen der MTS-Derivate in der Ganzzell- oder Einzelkanaltechnik erfolgen.

Der Carbonylsauerstoff und die Aminogruppe der Peptidbindung des Proteinrückgrates sind für Wasserstoffbrückenbindungen und die damit verbundenen stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren bei der durch ATP-Bindung ausgelösten Konformationsänderung mit verantwortlich. Welchen Einfluss es auf den Ionenstrom und die Stabilität des hP2X7R hätte, wenn diese Wechselwirkungen wegfallen, könnte durch ein ähnliches Experiment wie bei Matulef *et. al.* untersucht werden. In dieser Arbeit wurden bei inaktivierenden K^+ -Kanälen (KcsA aus *Streptomyces lividans*) essentielle gegen unnatürliche Aminosäuren ausgetauscht, so dass keine Amidbindung, sondern eine Esterbindung zwischen den Aminosäuren ausgebildet wurde (Matulef et al., 2013). Die eingeführten Punktmutationen innerhalb des Selektionsfilters hatten Einfluss auf die Ionenbindung und führten zur Inaktivierung der betreffenden Konstrukte. Dies resultierte daraus, dass die fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen zu einer räumlichen Verschiebung der Aminosäureseitenketten und zu veränderten Wechselwirkungen zwischen diesen führten (Matulef et al., 2013). Carbonyl-Sauerstoffe (in der Nähe von S342) könnten auch beim hP2X7R-Kanal direkt an der Kationenbindung während der Permeation beteiligt sein.

Des Weiteren werden bei der Öffnung der Kanalpore durch ATP bestehende Wechselwirkungen zwischen den TM2-Regionen der einzelnen Monomere untereinander und zur TM1 aufgebrochen und neu geknüpft. Welche Verantwortung die Transmembrandomänen 1 bei der Kanalöffnung tragen, sollte ebenfalls näher untersucht werden. So wurde gezeigt, dass es bei den zfP2X4R zwischen mehreren Untereinheiten und innerhalb einer Untereinheit des trimeren Proteins zu stabilisierenden Interaktionen kommt. Beispielsweise existiert eine Wechselwirkung zwischen L351, I355 und W358 (gleichbedeutend mit L346, F350 und F353 des hP2X7R) der einen TM2 mit den Positionen L346, A347 und V354 (entspricht L341, S342 und V349) einer anderen TM2 des zfP2X4R (Heymann et al., 2013a). Auch kommt es zu einer essentiellen Interaktion zwischen Y45 der TM1 einer Untereinheit und L340 der TM2 einer benachbarten Untereinheit des zfP2X4R (entsprechen den Positionen Y39 und V335 des hP2X7R) (Heymann et al., 2013b). Ob dies an den äquivalenten Positionen der humanen P2X7R-Variante ebenfalls so ist, sollte näher untersucht werden. Dazu bieten sich Cysteindoppelmutanten an den betreffenden Positionen an. Sind beide Seitenketten in passender Nähe, so sollte die Ausbildung einer Disulfidbrücke ihre Interaktion bestätigen. Mittels DTT oder TCEP lassen sich diese Disulfidbrücken aufspalten und mittels H_2O_2 wieder regenerieren. Die Veränderung der Bindungsverhältnisse sollte sich in TEVC Messungen nachweisen lassen.

Bei Untersuchungen an Cysteindoppelmutanten des rP2X2R in HEK-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Positionen P62C/H192C, S65C/S190C und V48C/I328C eine Drehung von der geschlossenen in die offene Konformation verhindern (äquivalent zu I58/D197, S61/N195 und A44/I331 des hP2X7R). Durch Applikation von DTT ließen sich die forcierten Cysteinbrücken aufspalten und die ATP-induzierten Natriumströme stiegen an (Stelmashenko et al., 2014). Auch bei der Doppelmutante H33C/S345C des rP2X2R (gleichzusetzen mit K30 und A348 des hP2X7R) war durch eine Gabe von DTT der Strom deutlich größer und konnte nach einer Gabe von H_2O_2 zurück auf das ursprüngliche Grundniveau gesetzt werden. Eine Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Positionen scheint ebenfalls die Konformationsänderung zwischen geschlossenem und offenem Kanalzustand zu erschweren (Liang et al., 2013). Ob dies auch bei den äquivalenten Positionen des hP2X7R zutreffen würde, sollte zusätzlich eruiert werden.

9 Literaturverzeichnis

- Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P, Karlin A (1994) Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the α subunit. *Neuron* 13:919-927.
- Alzola E, Perezetxebarria A, Kabre E, Fogarty DJ, Metioui M, Chaib N, Macarulla JM, Matute C, Dehaye JP, Marino A (1998) Activation by P2X₇ agonists of two phospholipases A₂ (PLA₂) in ductal cells of rat submandibular gland - coupling of the calcium-independent PLA₂ with kallikrein secretion. *J Biol Chem* 273:30208-30217.
- Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J, Schmalzing G (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X₂ and heteromeric P2X₁₊₂ receptor subtypes. *J Mol Biol* 342:333-343.
- Baconguis I, Gouaux E (2012) Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature* 489:400-405.
- Baconguis I, Hattori M, Gouaux E (2013) Unanticipated parallels in architecture and mechanism between ATP-gated P2X receptors and acid sensing ion channels. *Curr Opin Struct Biol* 23:277-284.
- Bean BP (1992) Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 13:87-90.
- Bean BP, Williams CA, Ceelen PW (1990) ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: current-voltage relation and single-channel behaviour. *J Neurosci* 10:11-19.
- Becker D. (2008a) Funktionelle Bedeutung der C-terminalen Domäne des humanen P2X₇-Rezeptors. In Doktorarbeit, Halle (Saale)
- Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, Markwardt F (2008b) The P2X₇ carboxyl tail is a regulatory module of P2X₇ receptor channel activity. *J Biol Chem* 283:25725-25734.
- Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD (2002) P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 22:4814-4824.
- Boyd IA, Forrester T (1968) The release of adenosine triphosphate from frog skeletal muscle in vitro. *J Physiol (Lond)* 199:115-135.
- Bretschneider F, Klapperstück M, Löhn M, Markwardt F (1995) Nonselective cationic currents elicited by extracellular ATP in human B-lymphocytes. *Pflügers Arch* 429:691-698.
- Bretschneider F, Markwardt F (1999) Drug-dependent ion channel gating by application of concentration jumps using U-tube technique. *Methods Enzymol* 294:180-189.
- Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF (2002) Heteromultimeric P2X_{1/2} receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* 300:673-680.
- Browne LE, Cao L, Broomhead HE, Bragg L, Wilkinson WJ, North RA (2010a) P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. *Nat Neurosci* 14:17-18.

- Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA (2013a) P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J Neurosci* 33:3557-3566.
- Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA (2013b) P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J Neurosci* 33:3557-3566.
- Browne LE, Jiang LH, North RA (2010b) New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends Pharmacol Sci* (5):229-37.
- Buell G, Chessell IP, Michel AD, Colo G, Salazzo M, Herren S, Gretener D, Grahames C, Kaur R, Kosco-Vilbois MH, Humphrey PPA (1998) Blockade of human P2X₇ receptor function with a monoclonal antibody. *Blood* 92:3521-3528.
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509-581.
- Burnstock G (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7:575-590.
- Burnstock G, Arnett TR, Orriss IR (2013) Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal* 9:541-572.
- Burnstock G, Kennedy C (2011) P2X receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 61:333-372.
- Burnstock G, Verkhratsky A (2010) Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* 1:e9.
- Cao L, Broomhead HE, Young MT, North RA (2009) Polar residues in the second transmembrane domain of the rat P2X₂ receptor that affect spontaneous gating, unitary conductance, and rectification. *J Neurosci* 29:14257-14264.
- Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CBA, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN (2005) Disruption of the P2X₇ purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114:386-396.
- Clark AK, Staniland AA, Marchand F, Kaan TK, McMahon SB, Malcangio M (2010) P2X₇-dependent release of interleukin-1 β and nociception in the spinal cord following lipopolysaccharide. *J Neurosci* 30:573-582.
- Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong WF, Hamilton SG, Knight GE, Ruan HZ, Ma B, Yip P, Nunn P, McMahon SB, Burnstock G, Ford APDW (2005) P2X₂ knockout mice and P2X₂/P2X₃ double knockout mice reveal a role for the P2X₂ receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol (Lond)* 567:621-639.
- Cotrina ML, Nedergaard M (2009) Physiological and pathological functions of P2X₇ receptor in the spinal cord. *Purinergic Signal* (2):223-32.
- Coutinho-Silva R, Stahl L, Raymond MN, Jungas T, Verbeke P, Burnstock G, Darville T, Ojcius DM (2003) Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X₇R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* 19:403-412.
- Dellal SS, Hume RI (2012) Covalent modification of mutant rat P2X₂ receptors with a thiol-reactive fluorophore allows channel activation by zinc or acidic pH without ATP. *PLoS ONE* 7:e47147.

- Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J (2001) Neuronal P2X₇ receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 21:7143-7152.
- Di Virgilio F (1995) The P2Z purinoceptor: An intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 16:524-528.
- Ding SH, Sachs F (1999) Single channel properties of P2X₂ purinoceptors. *J Gen Physiol* 113:695-719.
- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF (2007) Discovery of P2X₇ receptor-selective antagonists offers new insights into P2X₇ receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 151:571-579.
- Drury AN, Szent-Györgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon mammalian heart. *J Physiol (Lond)* 68:213-237.
- Dudev T, Lim C (2014) Ion selectivity strategies of sodium channel selectivity filters. *Acc Chem Res* 47:3580-3587.
- Duplantier AJ, Dombroski MA, Subramanyam C, Beaulieu AM, Chang SP, Gabel CA, Jordan C, Kalgutkar AS, Kraus KG, Labasi JM, Mussari C, Perregaux DG, Shepard R, Taylor TJ, Trevena KA, Whitney-Pickett C, Yoon K (2011) Optimization of the physicochemical and pharmacokinetic attributes in a 6-azauracil series of P2X₇ receptor antagonists leading to the discovery of the clinical candidate CE-224,535. *Bioorg Med Chem Lett* 21:3708-3711.
- Egan TM, Haines WR, Voigt MM (1998) A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X₂ receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J Neurosci* 18:2350-2359.
- Egan TM, Khakh BS (2004) Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci* 24:3413-3420.
- EI-Moatassim C, Dubyak GR (1992) A novel pathway for the activation of phospholipase-D by P_{2Z} Purinergic Receptors in BAC1.2F5 Macrophages. *J Biol Chem* 267:23664-23673.
- Fairbairn IP, Stober CB, Kumararatne DS, Lammas DA (2001) ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X₇-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J Immunol* 167:3300-3307.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dalsusino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F (1997) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 159:1451-1458.
- Forrester T, Lind AR (1969) Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during and after sustained contractions. *J Physiol (Lond)* 204:347-364.
- Franceschi C, Abbracchio MP, Barbieri D, Ceruti S, Ferrari D, Iliou JP, Rounds S, Schubert P, Schulze-Lohoff E, Rassendren FA, Staub M, Volonte C, Wakade AR, Burnstock G (1996) Purines and cell death. *Drug Dev Res* 39:442-449.

- Fu W, McCormick T, Qi X, Luo L, Zhou L, Li X, Wang BC, Gibbons HE, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI (2009) Activation of P2X₇-mediated apoptosis Inhibits DMBA/TPA-induced formation of skin papillomas and cancer in mice. *BMC Cancer* 9:114.
- Gangadharan V, Nohe A, Caplan J, Czymmek K, Duncan RL (2014) Caveolin-1 regulates P2X₇ receptor signaling in osteoblasts. *Am J Physiol* 308:C41-C50.
- Gargett CE, Wiley JS (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 120:1483-1490.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford APDW (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflügers Arch* 452:513-537.
- Gillespie JH (1934) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol (Lond)* 80:345-349.
- Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E (2009) Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* 460:599-604.
- Gouaux E, MacKinnon R (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310:1461-1465.
- Grol MW, Panupinthu N, Korcok J, Sims SM, Dixon SJ (2009) Expression, signaling, and function of P2X₇ receptors in bone. *Purinergic Signal* 5:205-221.
- Gu B, Bendall LJ, Wiley JS (1998) Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* 92:946-951.
- Guile SD, Alcaraz L, Birkinshaw TN, Bowers KC, Ebden MR, Furber M, Stocks MJ (2009) Antagonists of the P2X₇ receptor. From lead identification to drug development. *J Med Chem* 52:3123-3141.
- Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD (2007) Evidence for functional P2X₄/P2X₇ heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 72:1447-1456.
- Haines WR, Torres GE, Voigt MM, Egan TM (1999) Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X₁ and P2X₅ isoforms. *Mol Pharmacol* 56:720-727.
- Hattori M, Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485:207-212.
- Hausmann R, Gunther J, Kless A, Kuhlmann D, Kassack MU, Bahrenberg G, Markwardt F, Schmalzing G (2013) Salt bridge switching from Arg290/Glu167 to Arg290/ATP promotes the closed-to-open transition of the P2X₂ receptor. *Mol Pharmacol* 83:73-84.
- Heymann G, Dai J, Li M, Silberberg SD, Zhou HX, Swartz KJ (2013a) Inter- and intrasubunit interactions between transmembrane helices in the open state of P2X receptor channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E4045-E4054.
- Heymann G, Dai J, Li M, Silberberg SD, Zhou HX, Swartz KJ (2013b) Inter- and intrasubunit interactions between transmembrane helices in the open state of P2X receptor channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E4045-E4054.

- Hibell AD, Thompson KM, Xing M, Humphrey PPA, Michel AD (2001) Complexities of measuring antagonist potency at P2X₇ receptor orthologs. *J Pharmacol Exp Ther* 296:947-957.
- Holmgren M, Liu Y, Xu Y, Yellen G (1996) On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology. *Neuropharmacology* 35:797-804.
- Holton FA, Holton P (1953) The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol (Lond)* 119:50P-51P.
- Holton P (1959) The liberation of ATP on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol (Lond)* 145:494-504.
- Jelinkova I, Vavra V, Jindrichova M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, Stojilkovic SS (2008) Identification of P2X₄ receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflügers Arch* 456:939-950.
- Jiang LH (2009) Inhibition of P2X₇ receptors by divalent cations: old action and new insight. *Eur Biophys J* 38:339-346.
- Jiang LH, Baldwin JM, Roger S, Baldwin SA (2013) Insights into the molecular mechanisms underlying mammalian P2X₇ receptor functions and contributions in diseases, revealed by structural modeling and single nucleotide polymorphisms. *Front Pharmacol* 4:1-17.
- Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo XN, Surprenant A, North RA (2003) Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 23:8903-8910.
- Jiang LH, Rassendren F, Spelta V, Surprenant A, North RA (2001) Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X₂ receptor. *J Biol Chem* 276:14902-14908.
- Kaczmarek-Hájek K, Lőrinczi E, Hausmann R, Nicke A (2012) Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal* 8:375-417.
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state. *Nature* 460:592-598.
- Kawate T, Robertson JL, Li M, Silberberg SD, Swartz KJ (2011) Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *J Gen Physiol* 137:579-590.
- Ke HZ, Qi H, Weidema AF, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford DT, Grasser WA, Paralkar VM, Li M, Audoly LP, Gabel CA, Jee WSS, Dixon SJ, Sims SM, Thompson DD (2003) Deletion of the P2X₇ nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol* 17:1356-1367.
- Keystone EC, Wang MM, Layton M, Hollis S, McInnes IB (2012) Clinical evaluation of the efficacy of the P2X₇ purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann Rheum Dis* 71:1630-1635.
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci* 2:322-330.

- Khakh BS, Egan TM (2005) Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X₂ channel permeability dynamics. *J Biol Chem* 280:6118-6129.
- Khakh BS, North RA (2012) Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76:51-69.
- King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G (2000) Coexpression of rat P2X₂ and P2X₆ subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 20:4871-4877.
- Klapperstück M, Büttner C, Böhm T, Schmalzing G, Markwardt F (2000) Characteristics of P2X₇ receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1467:444-456.
- Klapperstück M, Büttner C, Schmalzing G, Markwardt F (2001a) Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X₇ receptor. *J Physiol (Lond)* 534:25-35.
- Klapperstück M, Schmalzing G, Markwardt F (2001b) Characteristics of binding sites for ATP⁴⁻ at the human P2X₇ receptor. *Drug Dev Res* 53:77-82.
- Kotnis S, Bingham B, Vasilyev DV, Miller SW, Bai Y, Yeola S, Chanda PK, Bowlby MR, Kaftan EJ, Samad TA, Whiteside GT (2010) Genetic and functional analysis of human P2X₅ reveals a distinct pattern of exon 10 polymorphism with predominant expression of the nonfunctional receptor isoform. *Mol Pharmacol* 77:953-960.
- Kracun S, Chaptal V, Abramson J, Khakh BS (2010) Gated access to the pore of a P2X Receptor: Structural implications for closed-open transitions. *J Biol Chem* 285:10110-10121.
- Kusner DJ, Barton JA (2001) ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent *Mycobacterium tuberculosis* via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion. *J Immunol* 167:3308-3315.
- Labute P (2008) The generalized Born/volume integral implicit solvent model: estimation of the free energy of hydration using London dispersion instead of atomic surface area. *J Comput Chem* 29:1693-1698.
- Labute P (2009) Protonate3D: assignment of ionization states and hydrogen coordinates to macromolecular structures. *Proteins* 75:187-205.
- Lalo U, Pankratov Y, Wichert SP, Rossner MJ, North RA, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2008) P2X₁ and P2X₅ subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 28:5473-5480.
- Le KT, Babinski K, Seguela P (1998) Central P2X₄ and P2X₆ channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 18:7152-7159.
- Lemoine D, Habermacher C, Martz A, Mery PF, Bouquier N, Diverchy F, Taly A, Rassendren F, Specht A, Grutter T (2013) Optical control of an ion channel gate. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:20813-20818.
- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995) Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377:432-435.

- Li JL, Liu DW, Ke HZ, Duncan RL, Turner CH (2005) The P2X₇ nucleotide receptor mediates skeletal mechanotransduction. *J Biol Chem* 280:42952-42959.
- Li M, Chang TH, Silberberg SD, Swartz KJ (2008) Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 11:883-887.
- Li M, Kawate T, Silberberg SD, Swartz KJ (2010) Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. *Nat Commun* 1:DOI: 10.1038/ncomms1048.
- Li ZY, Migita K, Samways DSK, Voigt MM, Egan TM (2004) Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X₂ receptor. *J Neurosci* 24:7378-7386.
- Liang X, Samways DS, Wolf K, Bowles EA, Richards JP, Bruno J, Dutertre S, DiPaolo RJ, Egan TM (2015) Quantifying Ca²⁺ current and permeability in ATP-gated P2X₇ receptors. *J Biol Chem* 290:7930-7942.
- Liang X, Xu H, Li C, Yin S, Xu T, Liu J, Li Z (2013) Functional identification of close proximity amino acid side chains within the transmembrane-spanning helices of the P2X₂ receptor. *PLoS ONE* 8:e70629.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A (2001) Rapid secretion of interleukin-1 beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15:825-835.
- MacKenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A (2005) Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X₇ receptors. *J Biol Chem* 280:33968-33976.
- Markwardt F, Löhn M, Böhm T, Klapperstück M (1997) Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *J Physiol (Lond)* 498:143-151.
- Markwardt F, Pippel A, Stolz M, Rahn T, Schmalzing G (2014) Function of the second transmembrane domain of the human P2X₇ receptor. *Biophys J* 106:154a.
- Marquez-Klaka B, Rettinger J, Nicke A (2009) Inter-subunit disulfide cross-linking in homomeric and heteromeric P2X receptors. *Eur Biophys J* 38:329-338.
- Matulef K, Komarov AG, Costantino CA, Valiyaveetil FI (2013) Using protein backbone mutagenesis to dissect the link between ion occupancy and C-type inactivation in K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:17886-17891.
- Migita K, Haines WR, Voigt MM, Egan TM (2001) Polar residues of the second transmembrane domain influence cation permeability of the ATP-gated P2X₂ receptor. *J Biol Chem* 276:30934-30941.
- Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA (2009) The P2X₇ receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X₇R pore. *J Neurosci* 29:3781-3791.
- Murrell-Lagnado RD, Qureshi OS (2008) Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors. *Mol Membr Biol* 25:321-331.
- Nakamoto T, Brown DA, Catalan MA, Gonzalez-Begne M, Romanenko VG, Melvin JE (2009) Purinergic P2X₇ receptors mediate ATP-induced saliva secretion by the mouse submandibular gland. *J Biol Chem* 284:4815-4822.

- Nakazawa K, Inoue K, Ohno Y (1998) An asparagine residue regulating conductance through P2X₂ receptor/channels. *Eur J Pharmacol* 347:141-144.
- Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F (1998) Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273:15177-15182.
- Nicke A, Bäumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: A novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17:3016-3028.
- Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F (2005) Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X₁ and P2X₄ subunits. *J Neurochem* 92:925-933.
- Nörenberg W, Hempel C, Urban N, Sobottka H, Illes P, Schaefer M (2011) Clemastine potentiates the human P2X₇ receptor by sensitizing it to lower ATP concentrations. *J Biol Chem* 286:11067-11081.
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.
- Novak I (2007) Purinergic receptors in the endocrine and exocrine pancreas. *J Physiol (Lond)* 588:3615-3627.
- Novak I, Jans IM, Wohlfahrt L (2010) Effect of P2X₇ receptor knockout on exocrine secretion of pancreas, salivary glands and lacrimal glands. *J Physiol (Lond)* 588:3615-3627.
- Ormond SJ, Barrera NP, Qureshi OS, Henderson RM, Edwardson JM, Murrell-Lagnado RD (2006) An uncharged region within the N terminus of the P2X₆ receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol* 69:1692-1700.
- Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ (2007) P2X₇ nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 282:3403-3412.
- Petrou S, Ugur M, Drummond RM, Singer JJ, Walsh JV (1997) P2X₇ purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. *FEBS Lett* 411:339-345.
- Pippel, A. (2009) Struktur-Funktionsbeziehungen des humanen P2X₇-Rezeptors - Untersuchungen mittels Cysteinmutagenese und Patch-Clamp-Technik. In: *Diplomarbeit*, Halle (Saale).
- Qu Y, Dubyak GR (2009) P2X₇ receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal* 5:163-173.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA, Surprenant A (1997) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J* 16:3446-3454.
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F (2007a) Kinetics of P2X₇ receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 92:2377-2391.

- Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F (2007b) Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X₇ receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 93:846-858.
- Roberts JA, Digby HR, Kara M, El Ajouz S, Sutcliffe MJ, Evans RJ (2008) Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X₂ and P2X₄ receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors. *J Biol Chem* 283:20126-20136.
- Rothwell SW, Stansfeld PJ, Bragg L, Verkhatsky A, North RA (2013) Direct gating of ATP-activated ion channels (P2X₂ receptors) by lipophilic attachment at the outer end of the second transmembrane domain. *J Biol Chem* 289:618-626.
- Rubio ME, Soto F (2001) Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21:641-653.
- Samways DSK, Egan TM (2007) Acidic amino acids impart enhanced Ca²⁺ permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. *J Gen Physiol* 129:245-256.
- Seyffert C, Schmalzing G, Markwardt F (2004) Dissecting individual current components of co-expressed human P2X₁ and P2X₇ receptors. *Curr Top Med Chem* 4:1719-1730.
- Sherman-Gold, R. (1993) *The Axon guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques*. Axon Instruments, Inc. Molecular Devices.
- Silberberg SD, Chang TH, Swartz KJ (2005) Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X₄ receptor channels. *J Gen Physiol* 125:347-359.
- Sim JA, Young MT, Sung HY, North RA, Surprenant A (2004) Reanalysis of P2X₇ receptor expression in rodent brain. *J Neurosci* 24:6307-6314.
- Solini A, Chiozzi P, Morelli A, Fellin R, Di Virgilio F (1999) Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X₇ receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *J Cell Sci* 112:297-305.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. *J Biol Chem* 276:125-132.
- Stauffer DA, Karlin A (1994) Electrostatic potential of the acetylcholine binding sites in the nicotinic receptor probed by reactions of binding-site cysteines with charged methanethiosulfonates. *Biochemistry* 33:6840-6849.
- Stelmashenko O, Compan V, Browne LE, North RA (2014) Ectodomain movements of an ATP-gated ion channel (P2X₂ receptor) probed by disulfide locking. *J Biol Chem* 289:9909-9917.
- Summa CM, Levitt M (2007) Near-native structure refinement using in vacuo energy minimization. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3177-3182.
- Sun C, Heid ME, Keyel PA, Salter RD (2013) The second transmembrane domain of P2X₇ contributes to dilated pore formation. *PLoS ONE* 8:e61886.

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P_{2Z} receptor for extracellular ATP identified as a P_{2X} receptor (P2X₇). *Science* 272:735-738.

Taylor SR, Gonzalez-Begne M, Sojka DK, Richardson JC, Sheardown SA, Harrison SM, Pusey CD, Tam FW, Elliott JI (2009) Lymphocytes from P2X7-deficient mice exhibit enhanced P2X7 responses. *J Leukoc Biol* 85:978-986.

Thimm D, Knospe M, Abdelrahman A, Moutinho M, Alsdorf BB, von Kügelgen I, Schiedel AC, Müller CE (2013) Characterization of new G protein-coupled adenine receptors in mouse and hamster. *Purinergic Signal* 9:415-426.

Thomas LM, Salter RD (2010) Activation of macrophages by P2X7-induced microvesicles from myeloid cells is mediated by phospholipids and is partially dependent on TLR4. *J Immunol* 185:3740-3749.

Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits - Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274:6653-6659.

Verkhatsky A, Burnstock G (2014) Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *Bioessays* 36:697-705.

Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A (1999a) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X₇ receptor. *J Physiol (Lond)* 519:335-346.

Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999b) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2:315-321.

Weber WM, Liebold KM, Reifarth FW, Clauss W (1995) The Ca²⁺-induced leak current in *Xenopus* oocytes is indeed mediated through a Cl⁻ channel. *J Membr Biol* 148:263-275.

Wiley JS, Chen R, Jamieson GP (1993) The ATP⁴⁻ receptor-operated channel (P_{2Z} class) of human lymphocytes allows Ba²⁺ and ethidium⁺ uptake: inhibition of fluxes by suramin. *Arch Biochem Biophys* 305:54-60.

Wiley JS, Sluyter R, Gu BJ, Stokes L, Fuller SJ (2011) The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens* 78:321-332.

Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, North RA (2006) Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X_{2/3} receptor. *Mol Pharmacol* 70:1159-1163.

Wilson HL, Varcoe RW, Stokes L, Holland KL, Francis SE, Dower SK, Surprenant A, Crossman DC (2007) P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells. *Br J Pharmacol* 151:115-127.

Yan D, Zhu Y, Walsh T, Xie D, Yuan H, Sirmaci A, Fujikawa T, Wong AC, Loh TL, Du L, Grati M, Vljakovic SM, Blanton S, Ryan AF, Chen ZY, Thorne PR, Kachar B, Tekin M, Zhao HB, Housley GD, King MC, Liu XZ (2013) Mutation of the ATP-gated P2X2 receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2228-2233.

Yan ZH, Liang ZD, Obsil T, Stojilkovic SS (2006) Participation of the Lys³¹³-Ile³³³ sequence of the purinergic P2X₄ receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. *J Biol Chem* 281:32649-32659.

Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, Junger WG (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X₇ receptors. *FASEB J* 23:1685-1693.

Zemkova H, Yan Z, Liang Z, Jelinkova I, Tomic M, Stojilkovic SS (2007) Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X₄ receptor functions. *J Neurochem* 102:1139-1150.

Zhang L, Xu H, Jie Y, Gao C, Chen W, Yin S, Samways DS, Li Z (2014) Involvement of ectodomain Leu 214 in ATP binding and channel desensitization of the P2X₄ receptor. *Biochemistry* 53:3012-3019.

10 Anhang

10.1 Genutze Programme

- ChemDraw Prime: Version 15.0.0.016, ©PerkinElmer Informatics, Inc.
- Irfan View: Anzeige- und Bearbeitungsprogramm für Bilder von Irfan Skiljan (Freeware) <http://www.irfanview.net/>
- Lotus1-2-3: von Lotus Software, Programm um ausgemessene Daten in Excel zu überführen, vom Institut zur Verfügung gestellt
- Microsoft Excel: Tabellen- und Kalkulationsprogramm, Windows Software
- Microsoft Paint: Bearbeitungsprogramm für Bilder, Windows Software
- Microsoft Word: Textverarbeitungsprogramm, Windows Software
- Pymol: The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.3, Freeware, Schrodinger LLC. <http://www.pymol.org>
- SigmaPlot: Systat Software Inc., San Jose, California, USA, Grafikprogramm, vom Institut zur Verfügung gestellt
- SigmaStat: Systat Software Inc., San Jose, California, USA, Grafikprogramm, vom Institut zur Verfügung gestellt
- SP_Analyzer: Autor Dr. Thomas Böhm, Programm zur Datenauswertung, vom Institut zur Verfügung gestellt
- Superpatch-2000: Autor Dr. Thomas Böhm, Programm zur Registrierung der Messdaten

10.2 Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Calciumkonzentration
1MA	Monomethyl-ammonium
4MA	Tetramethyl-ammonium
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ag^+	Silberionen
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
AS-Sequenz	Aminosäuresequenz
ATP	Adenosintriphosphat
ATP^{4-}	freies Adenosintriphosphat
ATP- γ -S	Adenosin-(γ -thio)-triphosphat
Ba^{2+}	Bariumionen
BzATP	3'-O-Benzoyl-4-benzoyl-adenosin-5'-triphosphat
Ca^{2+}	Calciumionen
$CaCl_2$	Calciumchlorid
Cd^{2+}	Cadmiumionen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure

CIP	Coimmunopräzipitation
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
Cu^{2+}	Kupferionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Dorsales Wurzelganglienneuron (<i>dorsale root ganglien</i>)
DTT	Dithiothreitol
EC_{50}	mittlere effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird
EZD	Extrazellulardomäne
EZR	Extrazellularraum
H^+	Protonen
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HB-MTS	4-Hydroxy-benzoyl-methanthiosulfonat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I_0	Haltestrom, Leckstrom
I_{act}	innerhalb von 6 s ATP^{4-} -Applikation aktivierender Strom
$I_{\text{act}, 1}$	Grundwert, der erste durch ATP induzierte Natriumstrom
$I_{\text{act}, 2}$	der zweite durch ATP induzierte Natriumstrom
$I_{\text{act}, \text{exp}}$	Exponentieller Strom, schnelle Komponente der ATP-aktivierenden Stromantwort

$I_{act, MTS}$	verstärkter ATP-induzierter Strom. Diese Verstärkung tritt durch die Beimischung von MTS-Reagenzien in die Applikationlösung auf.
$I_{act, MTSEA}$	verstärkter ATP-induzierter Strom. Diese Verstärkung tritt durch die Beimischung von MTSEA in die Applikationlösung auf.
$I_{act, ATP}$	Membranstrom kurz vor MTS-Applikation
$I_{block, MTSEA}$	Maximale MTSEA blockierende Stromkomponente. Diese Hemmung tritt durch die Beimischung von MTSEA in die Applikationlösung auf.
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration
$I_{MTS, block}$	gehemmter ATP-induzierter Strom. Diese Hemmung tritt durch die Beimischung von MTS-Reagenzien in die Applikationlösung auf.
K^+	Kaliumionen
KCl	Kaliumchlorid
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KN-62	1-[N,O-Bis(isoquinolinsulphonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin
KO	<i>Knock-out</i>
Mg^{2+}	Magnesiumionen
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MTS	Methanthiosulfonat
MTSEA	2-Aminoethyl-methyl-thiosulfonyl-hydrobromid

MTSES	Natrium-(2-sulfonatoethyl)-methyl-thiosulfonat
MTSET	[2-(Trimethylammonium)-ethyl- methyl-thiosulfonyl-bromid
N	Anzahl der Messwerte
Na ⁺	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NK	Negativkontrolle
NO	Stickstoffmonoxid
ORI	Oozyten-Ringer-Lösung
P2X1R-7R	P2X1-7-Rezeptor
PEN/STREP	1:1 Mischung der Antibiotika Penicillin und Streptomycin
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2'-4'-disulfonat
R	Ratekonstante
RMSD	Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (<i>root-mean-square deviation</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Linear ansteigender Strom

SDS	Natriumdodecylsulfat_(<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sr ²⁺	Strontiumionen
Tab	Tabelle
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (<i>Two-Electrode Voltage-Clamp</i>)
TM1	Transmembranregion 1
TM2	Transmembranregion 2
TM-Region	Transmembranregion
Tricain	Ethyl-3-aminobenzoyl-methansulfonat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
V _h	Haltespannung
WT	WT
Zn ²⁺	Zinkionen
τ	Zeitkonstante

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Pippel

Vorname: Anja

Geburtstag –u. ort: 13.01.1985 in Merseburg

Anschrift: Jacobstraße 24, 06110 Halle (Saale)

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Geschlecht: weiblich

Beruflicher Werdegang und Schulausbildung

Seit April 2014: Roux-Projekt im Julius-Bernstein Institut für Physiologie der MLU Halle-Wittenberg unter Prof. Dr. Fritz Markwardt

11.10 – 03.14: Promotionsarbeit im Julius-Bernstein Institut für Physiologie der MLU Halle-Wittenberg unter Prof. Dr. Fritz Markwardt

11.09 – 11.10: Roux-Projekt im Julius-Bernstein Institut für Physiologie der MLU Halle-Wittenberg unter Dr. Manuela Klapperstück

10.08 – 10.09: Diplomarbeit im Julius-Bernstein Institut für Physiologie der MLU Halle-Wittenberg unter Prof. Dr. Fritz Markwardt

10.04 – 10.09: Studium der Biochemie/Biotechnologie an der MLU Halle-Wittenberg

05.96 – 06.04 Kooperative Gesamtschule „Wilhelm von Humboldt“ Halle/Saale

09.95 – 04.96 Friedensgymnasium Halle/Saale

09.91 – 08.95 Grundschule G. – F. – Hertzberg

Wissenschaftliches Engagement

Vorträge

2013 - 92nd Annual Meeting of the German Physiological Society in Heidelberg

2012 - Forschergruppentreffen in Aachen

Posterpräsentationen

2015 - 94th Annual Meeting of the German Physiological Society in Magdeburg

2014 - Purines 2014 - Nucleotides, nucleosides and nucleobases – International Conference on Signalling, Drugs and Targets in Bonn

2014 - 93rd Annual Meeting of the German Physiological Society in Mainz

2013 - 5th Joint Italian-German Purine Club Meeting in Rimini (Italien)

2012 - 91st Annual Meeting of the German Physiological Society in Dresden

2011 - 4th Joint Italian-German Purine Club Meeting in Bonn

2011 - 90th Annual Meeting of the German Physiological Society in Regensburg

Praktika und Weiterbildungen

2014 – ibidi Workshop “Chemotaxis Assays and Video Microscopy”

2010 – Weiterbildungsveranstaltung „Tierschutz / Versuchstierkunde“

2009 – TKA-Fachschulung „Rein- und Reinstwasseraufbereitung im Labor“

2009 – Weiterbildungsveranstaltung „Vorschriftsmäßiges Autoklavieren und Wasseraufbereitung im Labor“

Soziales Engagement

05.05 – 09.09 Mitglied im FSR der Biochemie/Biotechnologie

WS 2006/07: Seminarleitung “Organische Chemie für Drittsemester“ mit einem Arbeitsaufwand von 32h

Preise/Auszeichnungen

Posteraward: 5th Joint Italian-German Purine Club Meeting, Rimini. September 18-21, 2013

Publikationsliste

Pippel, A.; Beßler, B.; Klapperstück, M.; Markwardt, F. (2015): Inhibition of antigen receptor-dependent Ca²⁺ signals and NF-AT activation by P2X7R receptors in human B lymphocytes . Cell Calcium 57:275-289

In Arbeit:

Markwardt, F.; Pippel, A.; Stolz, M.; Rahn, T.; Schmalzing, G. (2015): Function of the second transmembrane domain of the human P2X7R receptor

Danksagung

Vorrangig bedanke ich bei meinem Doktorvater, Prof. Markwardt, für seine langjährige Betreuung und die Chance an seiner Seite zu forschen.

Prof. Stubbs danke ich für seine Bereitschaft als mein interner Betreuer für diese Dissertation zu fungieren.

Ich danke Dr. Klapperstück für ihre Unterstützung während meiner Arbeit und das gute Arbeitsklima.

Monika Schmidt danke ich für die Zuarbeit, das Vorbereiten der Zellen und Lösungen und ihre offenen Ohren.

Achim Kless danke ich für die Anfertigung der Modelle des humanen P2X7-Rezeptors und das ich die Modelle verwenden durfte.

Tanemasa Rahn danke ich für die Freigabe seiner Daten um sie für meine eigene Arbeit nutzen zu dürfen.

Michaela Stolz danke ich für die Anfertigung der Expressionsdaten und die Herstellung der cRNA-Konstrukte.

Prof. Schmalzing danke ich für die gemeinsame kooperative Forschung auf dem Gebiet der Purinorezeptoren.

Ich danke meinen Eltern von ganzem Herzen für ihre Geduld, ihre Unterstützung und das Gefühl diese Arbeit nicht nur für mich geschrieben zu haben.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden, die diese Arbeit nicht nur gelesen und korrigiert haben, sondern die immer mit einem regen Interesse meinen Geschichten und Problemen gelauscht haben, denen mein Forschungsfeld nie langweilig wurde.

Und ich danke allen, die mich immer wieder gefragt haben, wie weit ich denn sei, einfach nur um endlich sagen zu können, ich bin fertig.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht. Ferner habe ich mich selbst noch um keinen Doktorgrad beworben.

Ort, Datum

Unterschrift - Anja Pippel