elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Charakterisierung des humanen $P2X_7$-Rezeptors auf Einzelkanalebene

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät II
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Thomas Riedel
geb. am 31.07.1977 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. F. Markwardt
2. Prof. Dr. J. Balbach
3. Prof. Dr. P. Illes

Halle (Saale), 30. Mai 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013941
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013941]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **2**

1 Einleitung **4**

2 Grundlagen **6**

2.1 Stofftransport zwischen Zelle und Umgebung 6

2.2 Membranpotenziale 7

2.3 Eisenmannsequenz 8

2.4 Der $P2X_7$-Rezeptor 10

2.5 Ionenkanäle als Markov-Systeme 13

3 Materialien und Methoden **16**

3.1 Chemikalien 16

3.2 Lösungen 16

3.3 Herstellung der cRNA für den humanen $P2X_7$-Rezeptor 17

3.4 Präparation der *Xenopus laevis*-Oozyten 18

3.5 Einzelkanalmessungen 19

3.5.1 Messprinzip 19

3.5.2 Patch-Pipetten 19

3.5.3 Messanordung 20

3.5.4 Datenerfassung 22

3.5.5 *Outside-out*-Messungen 23

3.6 Kinetik 25

3.7 Bestimmung der Permeabilität verschiedener Ionen 25

3.8 Auswertung der Daten 26

3.8.1 Amplitudenhistogramme 26

3.8.2 Offen- und Geschlossenzeiten 27

3.8.3 Makro-Patches 28

3.8.4 Umkehrpotenziale 29

4 Ergebnisse **31**

4.1 Komponenten des Stroms durch den $P2X_7$-Kanal 31

4.2 Offen- und Geschlossenzeiten 34

4.3 ATP^{4-}-Abhängigkeit der Kanalkomponente 38

4.4 Spannungsabhängigkeit der Kanaleigenschaften 40

4.5 Kinetik der Aktivierung und Deaktivierung 42

4.6 Modellierung der $P2X_7$-Kinetik 44
4.7 Kanalkinetik in *cell-attached*-Konfiguration einer intakten Oozyte 47
4.8 Permeabilität für verschiedene Moleküle 49
4.9 Einfluss des extrazellulären Kations auf das Schaltverhalten des Einzelkanals 52
4.10 Beeinflussung der makroskopischen Kinetik durch extrazelluläre Kationen 56

5 Diskussion 62
5.1 Unterscheidung der ATP^{4-}-induzierten Stromkomponenten in $P2X_7$-exprimierenden Oozyten 62
5.2 Einzelkanalkinetik 63
5.3 Langandauernde Einzelkanalöffnungen 64
5.4 Kinetikmodel des $P2X_7$-Kanals 65
5.5 Permeationsverhalten einzelner $P2X_7$-Rezeptoren 68
5.6 Einfluss extrazellulärer monovalenter Kationen auf Aktivierung und Deaktivierung von $P2X_7$-Rezeptoren 70
5.7 Physiologische Bedeutung der $Natrium^+$-Bindungsstelle 71

6 Zusammenfassung 73

Abkürzungen und Formelzeichen 74

Literaturverzeichnis 75

Publikationsliste 81

Danksagung 82

Erklärung 83

Curriculum Vitae 84

Gefördert wurde diese Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und dem Roux-Programm der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

1 Einleitung

Adenosintriphosphat (ATP) wird auch als die „Energie des Lebens“ bezeichnet, da es der Energiespeicher ist, welcher von allen Lebewesen für grundlegende Prozesse genutzt wird. Die Spaltung von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) setzt Energie frei, die zum Antrieb endothermer Reaktionen in der Zelle genutzt wird[1].

Aber auch extrazellulär spielen Purine wie Adenosin, ADP und ATP als Botenstoffe in vielen verschiedenen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Dazu zählen Kontraktionen glatter Muskeln, Neurotransmission, Sekretion, Immunreaktionen, Entzündungen, Blutgerinnung, Schmerzauslösung und Modulation der Herzfunktion[2].

Unter normalen Umständen beträgt die intrazelluläre ATP-Konzentration ca. 3 - 5 mM, der extrazelluläre Raum ist dagegen weitgehend frei von ATP [3]. Unter bestimmten Umständen, z.B. wenn Zellen geschädigt oder zerstört werden, tritt das ATP aus. ATP wird außerdem bei Hypoxie und im Rahmen des Entzündungsgeschehens in den Extrazellulärraum sezerniert[4]. Das Vorhandensein von ATP außerhalb der Zelle stellt somit ein wichtiges Alarmsignal für das Immunsystem dar.

Der zu den Purinorezeptoren gehörende $P2X_7$-Rezeptor ist ein Ionenkanal, welcher nach Aktivierung durch extrazelluläres ATP einen Kationenstrom durch die Zellmembran ermöglicht. Er wird hauptsächlich von Zellen des Immunsystems, aber auch von anderen Zelltypen, wie z.B. Drüsenzellen, exprimiert. $P2X_7$-Rezeptoren sind weiterhin an der Übermittlung von Nervensignalen im Hippocampus beteiligt, wo ATP als Botenstoff genutzt wird[5].

Es wird angenommen, dass der $P2X_7$-Rezeptor eine wichtige Rolle als Modulator entzündlicher Prozesse spielt. Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen einer Variante des $P2X_7$-Gens und dem Auftreten von Depressionen und bipolaren affektiven Störungen[6]. Damit ist der $P2X_7$-Rezeptor ein interessanter Angriffspunkt zur Behandlung verschiedener Erkrankungen auf entzündlicher Basis wie z.B. Rheuma oder auch Atemwegserkrankungen wie chronischer Bronchitis[7]. Tatsächlich wurden bereits Studien durchgeführt, in denen eine mögliche blockierende Wirkung verschiedener Substanzen auf den $P2X_7$-Rezeptor geprüft wurde[8,9]. Dies geschah allerdings bisher immer nur indirekt, indem man

beispielsweise die ATP-abhängige Aufnahme von Kalzium oder Fluoreszenzmarkern in $P2X_7$-Rezeptoren exprimierenden Zellen oder $P2X_7$-abhängige Ganzzellströme analysierte[10].

Die biophysikalische Charakteristik des einzelnen $P2X_7$-Kanals ist jedoch noch unklar. Grundlegende Eigenschaften des Kanals wie Leitfähigkeit, Permeabilität für verschiedene Ionen, Schaltkinetik oder Schaltzustände (*modes*) wurden bisher noch nicht untersucht.

Eine Besonderheit, die dem $P2X_7$-Kanal zugeschrieben wird, ist die Fähigkeit zur Ausbildung einer großen unselektiven Pore, durch die Ionen mit einer Grösse von bis zu 900 Da durchströmen können. Eine solche Umwandlung zu einer Pore ist eine einzigartige Eigenschaft, die bisher nur für Kanäle der P2X-Familie beschrieben wurde[11-21]. Auch bei den diesbezüglichen Untersuchungen erfolgte der Nachweis der Pore lediglich indirekt durch die Messung der Permeabilität der gesamten Zellmembran für große Ionen nach der Aktivierung des $P2X_7$-Rezeptors.

Auch zum Mechanismus der $P2X_7$-induzierten Pore existieren bisher keinerlei direkte Untersuchungen. So ist vollkommen unklar, ob es sich dabei um ein langsames Aufweiten der Kanalöffnung, einen zweiten geöffneten Kanalzustand oder einen sekundären, von weiteren Proteinen gebildeten Kanal, handelt.

Im Gegensatz zu den o.g. indirekten Untersuchungsmethoden ist die *patch-clamp*-Technik eine Methode, die eine unmittelbare Beobachtung der Ionenströme einzelner Kanäle und der Verweilzeiten im offenen und geschlossenen Zustand mit sehr hoher zeitlicher Auflösung ermöglicht[22]. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch fremde Ionenströme wird dabei praktisch ausgeschlossen. Daher ist diese Methode am besten geeignet, die physikalischen Eigenschaften eines Ionenkanals zu erforschen.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis des $P2X_7$-Kanals und der zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse der bisherigen indirekten Messungen leisten. Eine mittels *patch-clamp*-Messungen erlangte Kenntnis der Schaltkinetik ermöglicht es, das Verhalten des Kanals zu modellieren. Ein derart erstelltes kinetisches Modell kann als Grundlage für die weitere Erforschung und das Verständnis der Rezeptorfunktion unter verschiedenen biophysikalischen Bedingungen dienen.

2 Grundlagen

2.1 Stofftransport zwischen Zelle und Umgebung

Zellmembranen

Zellmembranen bilden die Abgrenzung des Zytoplasmas der Zelle zur äußeren Umgebung. Diese Membranen sind komplexe Systeme, welche aus einer Vielzahl unterschiedlicher Moleküle aufgebaut sind. Ihr Grundgerüst wird von einer Lipiddoppelschicht gebildet, in die u.a. Proteine und Cholesterol eingelagert sind (Abb. 2.1)[23]. Der Austausch wasserlöslicher Stoffe zwischen intra- und extrazellulärem Raum wird durch die Membran begrenzt. Eine reine Lipiddoppelschicht hat einen spezifischen elektrischen Widerstand von ca. $R = 10^{13}$ Ω•m und stellt damit einen nahezu perfekten Isolator dar[12]. Da jedoch der Stoffaustausch der Zelle sowie die Signalübertragung zwischen den Zellen durch die Membran hindurch erfolgen muss, verfügt die Membran über aktive und passive Transportsysteme zum selektiven Austausch von Substanzen, die nicht frei durch die Lipidmembran diffundieren können.

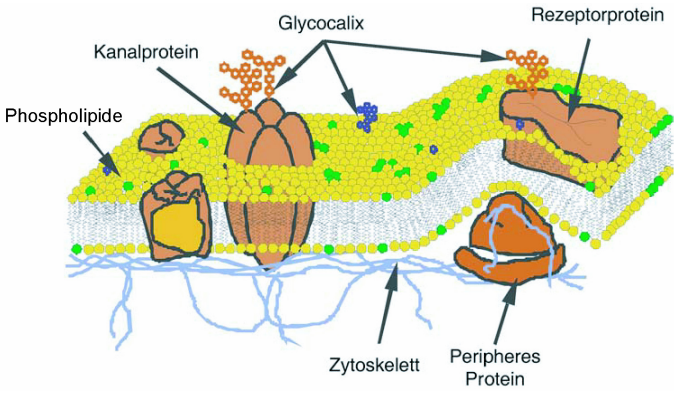


Abb. 2.1 Membranmodell nach Singer und Nicolson[24]

Neben den Transportern zählen Ionenkanäle zu den passiven Transportsystemen, da der Stofftransport entlang des elektrochemischen Gradienten stattfindet. Die Leitfähigkeit eines Kanals für verschiedene Ionen kann sehr unterschiedlich sein (Selektivität). Manche Kanäle wirken außerdem wie ein Gleichrichter, indem sie bevorzugt Ionenströme in eine Richtung zulassen. Das Öffnen der Kanäle wird meist durch externe Einflüsse gesteuert. So werden beispielsweise Natriumkanäle in Nervenzellen durch Depolarisation der Zellmembran aktiviert, andere Kanäle öffnen nach Bindung eines Agonisten (wie der hier untersuchte $P2X_7$-Rezeptor),

sind G-Protein-gekoppelt (z.B. P2Y-Rezeptoren) bzw. reagieren auf Temperaturänderungen oder mechanische Reize[1]. Sogenannte Hintergrundkanäle öffnen und schließen ständig auch ohne eine solche Beeinflussung.

2.2 Membranpotenziale

Lebende Zellen halten ein elektrisches Potenzial aufrecht, indem sie die Ionenkonzentration im Zellinneren und im Extrazellulärraum sowie die Permeabilitäten für Ionen durch die Zellmembran regeln. Daraus ergibt sich ein Gleichgewichtspotenzial Ψ der Membran, welches durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (1) beschrieben werden kann:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{\sum\left[P_{K^+} \cdot c_{K_a^+}\right] + \sum\left[P_{A^-} \cdot c_{A_i^-}\right]}{\sum\left[P_{K^+} \cdot c_{K_i^+}\right] + \sum\left[P_{A^-} \cdot c_{A_a^-}\right]} \tag{1}$$

P: Permeabilität, c: Konzentration der Anionen (A^-) und Kationen (K^+) innen (i) bzw. außen (a)

Die Konzentrationen werden durch entsprechende Ionenpumpen und Transporter aufrecht erhalten. Durch das Öffnen bestimmter Ionenkanäle kann die Permeabilität für einzelne Ionen sehr schnell und reversibel erhöht werden.

Als Umkehrpotenzial E^j der Ionensorte *j* bezeichnet man das Potenzial, bei dem kein Nettoionenstrom dieser Ionensorte durch die Membran stattfindet. Es wird auch Gleichgewichtspotenzial genannt und nach Nernst durch Gl. (2) berechnet.

$$E^j = \frac{R \cdot T}{z^j \cdot F} \cdot \ln \frac{c_o^j}{c_i^j} \tag{2}$$

c: Konzentration des Ions innen bzw. außen; z: Ladung des Ions

Der elektrochemische Gradient, der die Ionen der Sorte j durch die offene Kanalpore treibt, wird quantitativ durch die treibende Kraft E_{tr} beschrieben:

$$E_{tr}^j = \Psi - E^j \tag{3}$$

Die durch den Ionenstrom folgende Änderung des Membranpotenzials stellt einen wichtigen Signalweg auf zellulärer Ebene dar. Membranpotenzialänderungen beeinflussen z.B. die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Ionenkanäle, was zusammen mit der veränderten treibenden Kraft den Ionenstrom durch die Ionenkanäle modifiziert. Ein Beispiel hierfür ist die Nervenleitung: Hierbei wird durch räumlich fortschreitendes Öffnen spannungsaktivierter Na^+-

Kanäle eine Verringerung (Depolarisation) des Membranpotenzials über große Entfernungen schnell fortgeleitet. Die Endstrecke der ionenkanalabhängigen Signale besteht häufig in der Beeinflussung des Schaltverhaltens spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle, was zu einer Veränderung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration führt, die wiederum grundlegende zelluläre Prozesse wie Kontraktion oder Sekretion steuert. So führt die fortgeleitete Membranpotenzialänderung schließlich an den Nervenenden zur Ausschüttung eines Neurotransmitters, der das Signal an die nächste Zelle weitergibt.

2.3 Eisenmannsequenz

Viele Ionenkanäle leiten Ionen selektiv oder haben zumindest Präferenzen für bestimmte Ionen.

Für die fünf monovalenten Kationen Li^+, Na^+, K^+, Rb^+ und Cs^+ existieren theoretisch 5! = 120 mögliche Selektivitätsreihenfolgen, von denen aber nur elf in der Natur auftreten. Diese Selektivität wird durch das Modell von Eisenmann, welches die Energien bei einem Ionenaustausch betrachtet, beschrieben. In der Reaktionsgleichung:

$$A^+(gelöst) + B^+(gebunden) \longleftrightarrow A^+(gebunden) + B^+(gelöst) \tag{4}$$

verläuft die Reaktion von rechts nach links, wenn eine Bindung von A^+ bevorzugt wird. Dies ist dann der Fall, wenn für die Freie Enthalpie gilt:

$$\Delta G_A(gelöst \longrightarrow gebunden) < \Delta G_B(gelöst \longrightarrow gebunden) \tag{5}$$

Die relevanten Freien Enthalpien werden zum einem durch die elektrostatischen Wechselwirkungen U_{El} der positiv geladenen Ionen mit negativ geladenen Abschnitten des Kanals und zum anderem von den Hydratationsenergien der Ionen bestimmt, da die Hydrathülle des permeierenden Ions in der Pore eines Ionenkanals größtenteils abgestreift wird. Besonders in Ionenkanälen mit großem Porendurchmesser kann sich jedoch noch Wasser in der Kanalpore befinden[25]. Eisenmann modellierte die Bindungsstelle vereinfacht als ein kugelförmiges Anion im Vakuum. Daher werden die relativen Dielektrizitätskonstanten im gebundenen Zustand $\varepsilon_1 = 1$ und in Lösung (Wasser) $\varepsilon_2 = 80$ gesetzt. Als Ionenradius r wird der Pauliradius angenommen. Die Änderung der Freien Enthalpie ΔG_{Hy} für die Hydratation ergibt sich dann als[12]:

$$\Delta G_{Hy} = \frac{z^2 q_e^2 N}{8\pi\varepsilon_0 r}\left(\frac{1}{\varepsilon_2} - \frac{1}{\varepsilon_1}\right) \tag{6}$$

ε_0 Dielektrizitätskonstante des Vakuums, z Ladungszahl des Ions, q_e Elementarladung

Die Entropie und Hydratationsenergie für die einzelnen Ionen wurden von Edsall und McKenzie berechnet[26].

Die elektrostatische Bindungsenergie wird nach dem Coulombschen Gesetz berechnet [12]:

$$U_{El} = \frac{z_{Ion} z_{Bindungsstelle} q_e^2 N}{4\pi\varepsilon\varepsilon_0 \left(r_{Ion} + r_{Bindungsstelle}\right)} \tag{7}$$

Im Extremfall eines sehr großen Radius der Bindungsstelle ($r_{Bindungstelle}$) ist der Einfluss der elektrostatischen Anziehung gegenüber der Hydratationsenergie gering. Da Cäsium die kleinste Hydratationsenergie besitzt, wird dieses bevorzugt (Eisenmannsequenz I). Bei einem extrem kleinen Radius der Bindungsstelle hingegen dominiert die elektrostatische Anziehung, daher wird die Bindung von Lithium aufgrund des kleinsten Durchmessers begünstigt (Eisenmannsequenz XI). Für Radien zwischen diesen beiden Extremen ergeben sich die Sequenzen II bis X (s. Tabelle 1). Ist die Bindungsstelle für das Ion unbekannt, so erlaubt die experimentell ermittelte Eisenmannsequenz Rückschlüsse auf den Charakter der Bindung.

	← Bevorzugt					
I	Cs^+	Rb^+	K^+	Na^+	Li^+	Elektrostatische Anziehung: Schwach ↕ Stark
II	Rb^+	Cs^+	K^+	Na^+	Li^+	
III	Rb^+	K^+	Cs^+	Na^+	Li^+	
IV	K^+	Rb^+	Cs^+	Na^+	Li^+	
V	K^+	Rb^+	Na^+	Cs^+	Li^+	
VI	K^+	Na^+	Rb^+	Cs^+	Li^+	
VII	Na^+	K^+	Rb^+	Cs^+	Li^+	
VIII	Na^+	K^+	Rb^+	Li^+	Cs^+	
IX	Na^+	K^+	Li^+	Rb^+	Cs^+	
X	Na^+	Li^+	K^+	Rb^+	Cs^+	
XI	Li^+	Na^+	K^+	Rb^+	Cs^+	

Tabelle 1 Eisenmannsequenzen[12]

2.4 Der $P2X_7$-Rezeptor

Purinorezeptoren

Bereits im Jahre 1929 wurde die Wirkung von ATP auf Herz und Venen durch Szent-Györgyi beschrieben[27]. Die Funktion von ATP als Neurotransmitter konnte dann 1970 durch Burnstock nachgewiesen werden[28].

Heute sind eine ganze Reihe von Rezeptoren bekannt, welche durch extrazelluläre Purine und Pyrimidine aktiviert werden. Diese wurden anhand ihrer Eigenschaften klassifiziert, zum Einen die Adenosin-aktivierten P1-Rezeptoren und zum Anderen die ADP/ATP-aktivierten P2-Rezeptoren, welche weiter in G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren und liganden-aktivierte P2X-Ionenkanäle unterschieden werden[29,30]. Alle Kanäle des P2X-Typs sind unselektive Kationenkanäle, welche durch extrazelluläres ATP aktiviert werden. 1994 wurden die ersten P2X-Rezeptor-codierenden cDNAs isoliert[31] und seitdem sieben Subtypen des P2X-Rezeptors identifiziert.

Bedeutung für den Organismus

Der $P2X_7$-Rezeptor wird vornehmlich auf Zellen des Entzündungs- und Immunsystems exprimiert. ATP wird von verschiedenen Zellen durch Hypoxie, Nekrose, Blutgerinnung oder Zellzerstörung freigesetzt und kann als Alarmsignal für das Immunsystem dienen. Infolge dessen spielt der $P2X_7$-Rezeptor eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen. Beispielsweise wird eine Beteiligung von $P2X_7$-Rezeptoren beim Abtöten intrazellulärer Bakterien und der Freisetzung von Interleukin 1β in Makrophagen angenommen[13]. Selektive $P2X_7$-Blocker könnten daher als entzündungshemmende Mittel eingesetzt werden[8,9]. Potenzielle Antagonisten zeigen unterschiedliche Wirkungen auf $P2X_7$-Rezeptoren verschiedener Spezies oder unter verschiedenen experimentellen Bedingungen[32-35]. Dies könnte zum Teil darin begründet liegen, dass einige dieser Stoffe nicht direkt $P2X_7$-Rezeptoren, sondern weitere Glieder der dem $P2X_7$-Rezeptor nachgeschalteten Signalkaskade hemmen, die wiederum durch unterschiedliche metabolische Zellzustände modifiziert sein könnten.. Deshalb ist das Erstellen eines genauen pharmakologischen Profils nur durch Beobachtung der Effekte direkt am Rezeptor möglich.

Struktur

Der humane $P2X_7$-Rezeptor ist ein Trimer, dessen identische Untereinheiten aus jeweils 595 Aminosäuren aufgebaut sind[31]. Jede Einheit enthält zwei transmembrane Helices, welche durch eine extrazelluläre Schleife verbunden sind. C- und N-Terminus befinden sich im Zellinneren (s. Abb. 2.2). Die genaue räumliche Struktur ist jedoch unbekannt. Im Gegensatz zu $P2X_1$ und $P2X_3$, deren Untereinheiten direkt nach der Synthese zu Trimeren assemblieren, ist im Zellinneren ein hoher Anteil von $P2X_7$-Untereinheiten in Aggregaten undefinierter Stöchiometrie vorhanden[36].

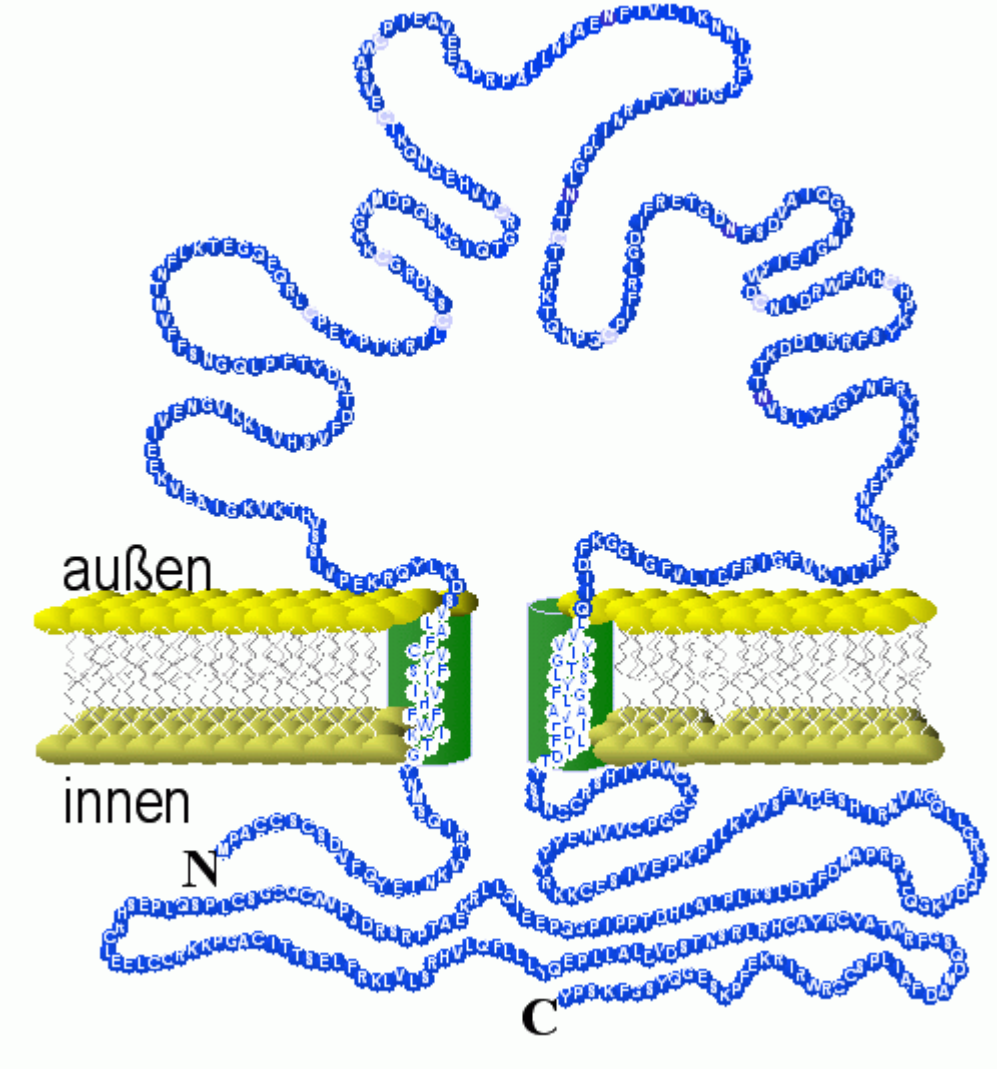


Abb. 2.2 Aminosäuresequenz einer $hP2X_7$-Untereinheit

Stand der Forschung

Der Zeitverlauf der Aktivierung und Deaktivierung des $P2X_7$-abhängigen Ganzzellstroms, welcher an heterolog exprimierten $P2X_7$-Rezeptoren oder $P2X_7$-ähnlichen Rezeptoren gemessen wurde, variiert mit der Tierart, welche für die

Expression eingesetzt wurde, der Agonistenkonzentration, der Dauer der Agonistenapplikation und der Konzentration von divalenten Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} [31]. Es wurden exponentiell aktivierende[37-40], biphasische schnell und langsam aktivierende[15,17,35,41-43], teilweise inaktivierende[43-47] und noch komplizierter aktivierende[20,21] $P2X_7$-Rezeptor-abhängige Ströme beschrieben. Die Aktivierung erfolgt dabei meist in Zeitspannen von weniger als 100 ms. Ähnlich vielfältig wurde die Deaktivierung als einfach exponentiell mit Zeitkonstanten $\tau_c < 1$ s [37-41] oder als nicht exponentiell mit bis zu mehreren Minuten Verzögerung beschrieben [16,17,20,21,44]. Wiederholte Agonistenapplikationen führten zu nahezu konstanten Ganzzellstromamplituden[37,41] oder zu sukzessiv steigenden[18,19,38,41,46] bzw. sinkenden Amplituden[44,46]. Diese Resultate können als aktivierungsbedingte lang anhaltende Konformationsänderungen des Rezeptors, als Aktivierung sekundärer Ionenströme infolge der $P2X_7$-Aktivität[31] oder als unterschiedliche Aktivierung des Rezeptors aufgrund verschiedener ATP-Bindungsstellen interpretiert werden[42].

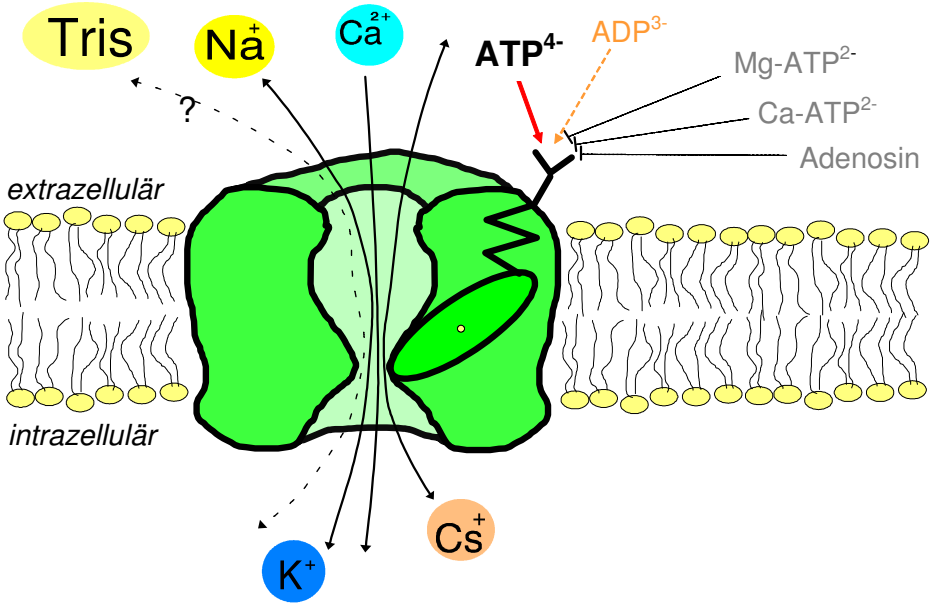


Abb. 2.3 **Schematische Darstellung des $P2X_7$-Kanals** Die Aktivierung erfolgt durch extrazelluläres ATP^{4-}, möglicherweise auch durch ADP^{3-}. Die Kanalpore ist durchlässig für kleine Kationen. Die Permeabilität für größere organische Kationen wurde bisher nicht eindeutig nachgewiesen.

Als minimale ATP-Konzentration, welche zur Aktivierung des Kanals nötig ist, wurden Werte zwischen 1 µM und 100 µM angegeben[31,48]. Die maximale Kanalaktivität wird bei ATP-Konzentrationen im millimolaren Bereich erreicht. Die ATP-Konzentration, welche zur halbmaximalen Aktivierung des $P2X_7$-Rezeptors benötigt wird (EC_{50}), hängt stark von der Konzentration divalenter Kationen wie

Ca^{2+} und Mg^{2+} ab. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass freies ATP^{4-} der Agonist dieses Rezeptors ist[13,31]. Jedoch wurden auch unter Berücksichtigung dessen stark voneinander abweichende EC_{50}-Werte zwischen 3 [44] und 400 µM [41] ATP^{4-} publiziert. Adenosin aktiviert den $P2X_7$-Rezeptor-Kanal nicht, die eventuelle Aktivierung durch ADP^{3-} ist noch ungeklärt[16,37] (Abb. 2.3).

Eine Besonderheit, welche dem $P2X_7$-Kanal zugeschrieben wird, ist die Ausbildung unselektiver Poren, die für Moleküle von bis zu 900 Da durchlässig sind[12,13]. Diese Poren sollen vor allem nach langandauernden oder wiederholten Applikationen hoher ATP^{4-}-Konzentrationen auftreten[49]. In Folge dieser Porenbildung kommt es zu Zellschwellung, Vakuolisierung und schließlich zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose. Obwohl die $P2X_7$-induzierten Poren Gegenstand zahlreicher Arbeiten sind, konnte bisher nicht geklärt werden, ob diese durch den Kanal selbst oder durch sekundär aktivierte Kanäle oder Transporter gebildet werden[11,14-21]. In einer Vielzahl von Experimenten wurde überhaupt keine $P2X_7$-induzierte Porenbildung beobachtet[37,41,44,50].

Die vorhandenen Daten aus Ganzzellstrommessungen sind schwer zu interpretieren und widersprechen sich zum Teil, da der eigentliche Strom des $P2X_7$-Ionenkanals durch eine Vielzahl anderer Effekte überlagert wird. Dazu zählen Ströme, welche in nativen Zellen durch andere Purinorezeptoren induziert werden, unspezifische, d.h. Purinorezeptor-unabhängige ATP-Effekte sowie sekundäre Reaktionen der Zelle auf den Kationeneinstrom, wozu auch die Aktivierung zusätzlicher Ionenkanäle gehört.

Zur Klärung dieser Fragen wurden im Rahmen der Arbeit Untersuchungen zur Kinetik des humanen $P2X_7$-Kanals auf Einzelkanalebene durchgeführt.

2.5 Ionenkanäle als Markov-Systeme

Das Öffnen und Schließen eines ligandengesteuerten Ionenkanals lässt sich als eine Reihe aufeinanderfolgender stochastischer Übergänge betrachten. Diese Zustände unterscheiden sich voneinander z.B. durch die Besetzung der Bindungsstellen oder die Konformation des Proteins. Da die Übergänge zwischen den einzelnen Kanalzuständen nicht davon abhängen, wie der momentane Zustand erreicht wurde, können die Zustandsänderungen, die während der Kanalaktivierung und -deaktivierung stattfinden, als Markov-Prozess betrachtet werden.

Als Markov-Prozess wird eine Verkettung stochastischer Ereignisse bezeichnet. Markov-Prozesse erster Ordnung sind gedächtnislos, d.h. für die weitere Entwicklung des Systems ist nur der momentane Zustand, nicht aber seine Vorgeschichte relevant. Für eine endliche Zustandsmenge $S = \{ s_1,...,s_m \}$ und diskrete Zeiten $t = 0,1,2,...$ lassen sich die Übergangswahrscheinlichkeiten p_{ij} von einem Zustand i in einen anderen Zustand j durch eine Übergangsmatrix beschreiben

$$\left(p_{ij}(t)\right) = \begin{pmatrix} p_{11}(t) & \cdots & p_{1m}(t) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ p_{m1}(t) & \cdots & p_{mm}(t) \end{pmatrix} \tag{8}$$

Die Übergänge in Ionenkanälen finden jedoch nicht nur zu diskreten Zeitpunkten statt, sondern hierbei ist von sprunghaften Zustandsänderungen zu Zeitpunkten $0 < t_1 <...< t_n$ in einer kontinuierlichen Zeit auszugehen. Daher existieren im stetigen Fall für den Zustand zum Zeitpunkt $t_n + k$ ($k > 0$) kontinuierlich viele von k abhängige Übergangsmatrizen $\boldsymbol{P}(k)$. Da im Grenzfall $k \rightarrow 0$ der momentane Zustand erhalten bleibt, geht $\boldsymbol{P}(k)$ in die Einheitsmatrix $\boldsymbol{I}$ über und die Übergangsmatrix $\boldsymbol{P}(k)$ lässt sich als:

$$\boldsymbol{P}(k) = e^{k \cdot \boldsymbol{Q}} \tag{9}$$

mit der Ratekonstantenmatrix $\boldsymbol{Q}$

$$\boldsymbol{Q} = \lim_{k \rightarrow 0, k>0} \frac{\boldsymbol{P}(k) - \boldsymbol{I}}{k} \tag{10}$$

beschreiben.

Aus einem Kanalmodell mit m Zuständen lässt sich die Matrix $\boldsymbol{Q}$ direkt ableiten. Die Elemente außerhalb der Diagonale der Matrix $\boldsymbol{Q}$ entsprechen den Ratekonstanten der Übergänge zwischen den Zuständen (siehe 5.4). Die Diagonalenelemente werden so gewählt, dass die Summe einer Zeile jeweils Null ergibt[51].

$\boldsymbol{P}$ bzw. $\boldsymbol{Q}$ beschreiben das Schaltverhalten des Kanals vollständig. Somit lassen sich daraus Kanaleigenschaften wie Aktivierungszeiten, mittlere Verweilzeiten in den Zuständen und die Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände berechnen. Damit ist es möglich, die Matrixelemente des Modells den experimentellen Ergebnissen anzupassen[22,52].

Der normierte Eigenvektor zum Eigenwert 1 der Übergangsmatrix $\boldsymbol{P}$ liefert die Besetzung der einzelnen Zustände im Gleichgewichtszustand.

Ein spezieller Fall sind verborgene Markov-Prozesse, bei denen einzelne Zustände nicht direkt, sondern nur indirekt über einen weiteren stochastischen Über-

gang beobachtet werden können. Ionenkanäle mit mehreren geschlossenen Zuständen stellen bei Messung des Stromflusses durch den Kanal einen solchen verborgenen Markov-Prozess dar, da die einzelnen geschlossenen Zustände nicht unterscheidbar sind. Beobachtbar ist lediglich der Übergang zwischen einem geschlossenen und einem offenen Zustand. Verschiedene geöffnete Zustände eines Kanals können mit Hilfe der *patch-clamp*-Technik nur dann direkt beobachtet werden, wenn sie sich deutlich in ihrer Ionenleitfähigkeit unterscheiden. Offenzustände gleicher Leitfähigkeit oder verschiedene Geschlossenzustände können jedoch indirekt mit Hilfe eines Verweilzeit-Histogramms identifiziert werden.
Der Zeitverlauf des Stroms in einem Modell mit m Zuständen lässt sich unabhängig davon, wie diese miteinander verbunden sind, als eine Summe von m-1 exponentiell zeitabhängigen Summanden darstellen (Gl. 11)

$$\boldsymbol{I}\left(t\right) = \boldsymbol{I}_{GG} + \sum_{i}^{m} \boldsymbol{A}_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \tag{11}$$

Die Amplituden A_i und die Zeitkonstanten τ lassen sich durch Messung des zeitlichen Verlaufs der Stromstärke im Ungleichgewicht, beispielsweise während der Aktivierung bzw. Deaktivierung des Kanals, experimentell bestimmen[53]. Diese makroskopischen Zeitkonstanten entsprechen den reziproken Eigenwerten der Ratekonstantenmatrix $\boldsymbol{Q}$ und können somit zum Anpassen der Ratekonstanten des Modells herangezogen werden[54]. Die Simulation kann numerisch mit Programmen wie MathLab oder mit speziell für Kanalmodellierung entwickelter Software wie SCALCS bzw. QuB erfolgen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Na_2ATP wurde von Roche (Mannheim) geliefert.

3.2 Lösungen

Die Präparation und Aufbewahrung der *Xenopus laevis*-Oozyten erfolgte in Barth-Lösung (100 mM NaCl, 1 mM KCl, 1mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM Hepes, 1 mM Penicillin, 1 mM Streptomycin) bei pH = 7,4. Zum Lösen der *gap-junctions* (s.u.) wurde Barth-Lösung ohne $CaCl_2$ verwendet.

Die Präparationskammer zum Erstellen des Patches wurde mit Oozyten-Ringer-Lösung (100 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM Hepes, pH = 7,4) durchspült. Die Badlösung, welche die Außenseite des Patches umspülte, bestand aus 100 mM eines monovalenten Kations (wenn nicht anders angegeben: Na^+), 100 mM Cl^-, 0,5 mM $CaCl_2$ sowie 5 mM Hepes bei pH = 7,4.

Der pH-Wert wurde mittels HCl oder je nach Lösung mittels NaOH, KOH, CsOH oder Tris eingestellt.

Die Zusammensetzung der Lösung im U-Rohr entsprach der Badlösung (siehe 3.5.3), jedoch wurden je nach Experiment unterschiedliche ATP^{4-}-Konzentrationen zugesetzt. Da ATP^{4-} mit Ca^{2+} einen Komplex bildet, mussten die absoluten Konzentrationen der beiden Substanzen entsprechend erhöht werden[55]. Die Konzentration des freien Ca^{2+} wurde auf 0,5 mM eingestellt. Die Berechnung erfolgte anhand eines Computerprogramms[56], welches von Dr. R. Schubert, Universität Rostock, zur Verfügung gestellt wurde. Alle ATP^{4-} und Ca^{2+}-Konzentrationsangaben in dieser Arbeit beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf die freien Konzentrationen.

Die jeweiligen absoluten Konzentrationen von Ca^{2+} und ATP^{4-} in den Extrazellulärlösungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

$[ATP^{4-}]$	$[ATP]_{abs}$	$[Ca^{2+}]_{abs}$	Extrazelluläres Kation	$[ATP^{4-}]$	$[ATP]_{abs}$	$[Ca^{2+}]_{abs}$	Extrazelluläres Kation
10	57	34,7	Na^+	10	52,03	34,7	K^+
3	17	10,8	Na^+	3	15,8	10,8	K^+
1	5,7	3,95	Na^+	1	5,3	3,95	K^+
0,3	1,7	1,53	Na^+	0,3	1,6	1,53	K^+
0,1	0,57	0,85	Na^+	0,1	0,53	0,845	K^+
0,03	0,17	0,6	Na^+	0,03	0,16	0,6	K^+
0,01	0,057	0,53	Na^+	0,01	0,053	0,53	K^+
0,003	0,017	0,51	Na^+	0,003	0,016	0,51	K^+
1	5,2	3,95	organisch	0,1	1,3	0,85	Li^+
0,1	0,52	0,85	organisch	0,1	0,5	0,85	Cs^+

Tabelle 2 Freie und absolute Ca^{2+}- und ATP-Konzentrationen (in mM) der extrazellulären Lösung; Die freie Ca^{2+}-Konzentration wurde immer auf 0,5 mM eingestellt

Die Standardinnenlösung enthielt 90 mM Asparaginsäure, 10 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM BAPTA, 10 mM Hepes und 0,5 $MgCl_2$ (pH = 7,2 mittels CsOH oder KOH). Zum Teil kamen auch Innenlösungen mit 100 mM CsCl oder NaCl zum Einsatz. Zur besseren Nachahmung der natürlichen Intrazellulärlösung wurde für einige Experimente ATP-haltige (5 mM ATP^{4-}) Pipettenlösung verwendet. Dabei konnte weder ein Einfluss auf den $P2X_7$-Kanal noch auf die Haltbarkeit des Patches festgestellt werden. Um das Modellsystem möglichst einfach zu halten, wurde daher meist auf ATP in der Pipettenlösung verzichtet.

Es konnte kein deutlicher Einfluss des monovalenten Kations in der Pipettenlösung auf Kinetik und Amplitude des $P2X_7$-Kanals beobachtet werden. Getestet wurden Na^+-, K^+- und Cs^+-haltige Lösungen. Für die ersten Experimente wurde die Cs^+-Innenlösung verwendet, um eventuell vorhandene Kalium-Kanäle zu blockieren. Es wurden jedoch auch mit K^+-Innenlösung keine zusätzlichen Kanäle registriert. Die Kalium-Innenlösung erwies sich außerdem als die am besten geeignete, da hier die höchste Stabilität der Patches erreicht wurde. Aus diesem Grund wurde die Kalium-Innenlösung als Standardinnenlösung für die meisten Experimente verwendet.

3.3 Herstellung der cRNA für den humanen $P2X_7$-Rezeptor

Die zur Injektion in *Xenopus*-Oozyten verwendeten cRNA der $P2X_7$-Rezeptoren wurden vom Labor von Prof. Schmalzing des Pharmakologischen Institutes der Universität Aachen (RWTH Aachen) hergestellt[57]. Die DNA von $P2X_7$-Untereinheiten wurden mittels PCR aus humaner B-lymphozytärer Gesamt-RNA amplifiziert und in den Vektor pNKS2 eingebunden[58]. Für die Herstellung der DNA wurde zunächst die aus bereits publizierten Studien bekannten Sequenzen

des $hP2X_7$ [16,17] mittels PCR amplifiziert und es erfolgte die Ligation der cDNS mit dem Plasmid pNKS2, dem Oozyten-Expressionsvektor[58]. Die cRNA wurden mittels SP6-RNA-Polymerase (Pharmacia) aus linearisierten DNA-Matrizen synthetisiert. Nach der Reinigung durch Sepharose-G50-Chromatographie, Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurden die cRNAs in 5 mM Tris/HCl, pH = 7,2 in Konzentrationen von 0,5 - 1 mg/ml gelöst.

3.4 Präparation der *Xenopus laevis*-Oozyten

Als Modellsystem für die *patch-clamp*-Untersuchungen dienten Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*). Die Frösche wurden von der African Xenopus Facility (Kynsna, Südafrika) bezogen. Die Temperatur in den Becken, in denen die Frösche gehalten wurden, betrug konstant 19 °C. Auch die Präparation und Aufbewahrung der Zellen erfolgte bei dieser Temperatur. Die Frösche wurden in einer 0,2%igen Lösung von 3-Aminobenzoesäureethylester (Tricain, MS-222) narkotisiert, um ihnen ein Teil des Ovars entnehmen zu können. Dieses wurde in kleinere Stücke zerteilt und für ca. 2 Stunden in 10 ml mit Collagenase (1 mg/ml) versetzter Barth-Lösung geschwenkt. Zum Einsatz kamen Collagenasen von Sigma, Serva (Heidelberg) und Biochrom (Typ CLS II 226 U/mg, Biochrom KG, Berlin), wobei sich letztere als die am besten geeignete herausstellte. Anschließend wurde die Collagenaselösung für ca. 10 Minuten durch kalziumfreie Barthlösung ersetzt. Der Kalziummangel löste die *gap junctions* (Zell-Zell-Kanäle) zwischen Oozyte und den umgebenden Follikelepithelzellen. Danach wurden die Oozyten mehrfach mit kalziumhaltiger Barth-Lösung gespült, welche auch zur Aufbewahrung der Oozyten bis zur weiteren Verwendung diente. Für die Experimente wurden nun intakte Oozyten der Entwicklungsstufen V und VI ausgewählt.

Die Injektion der cRNA erfolgte mittels des Mikroinjektionssystems „Nanoject“ (Drummond scientific Co. Broomall, PA, USA). Die pro Zelle injizierte cRNA-Menge von 0,5 – 10 ng richtete sich nach der benötigten Kanaldichte und dem Expressionsverhalten der jeweiligen cRNA.

Vor den *patch-clamp*-Messungen, welche ein bis drei Tage nach der Injektion erfolgten, wurde die Glashaut (*Zona pellucida*) mechanisch mittels Pinzetten entfernt. Um diesen Vorgang zu erleichtern, wurden die Zellen zuvor einige Minu-

ten in durch Zugabe von Saccharose (100 g/l) hyperton eingestellter Barth-Lösung inkubiert und dadurch geschrumpft.

3.5 Einzelkanalmessungen

3.5.1 Messprinzip

Bei der hier angewendeten *voltage-clamp*-Methode wurde das Membranpotenzial künstlich auf einem bestimmten Wert gehalten (Haltepotenzial V_h). Um dies zu erreichen, wurde über einen negativen Rückkopplungsmechanismus ein Kompensationsstrom erzeugt, der dem Strom durch die Membran entgegengesetzt war. Die Messung dieses Kompensationsstromes erlaubte unmittelbare Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit des untersuchten Membranfleckens (Patch, siehe unten).

Für die Einzelkanalmessungen wurde eine kapazitive Rückkopplung (Schema siehe Abb. 3.1) gewählt, da diese Betriebsart sehr schnelle Messungen bei minimalem Rauschen des Verstärkers ermöglicht. Tatsächlich war das intrinsische Rauschen des Verstärkers im Vergleich zum Rauschen, das von der Probe bzw. der Pipette (thermisches Rauschen) verursacht wurde, praktisch zu vernachlässigen.

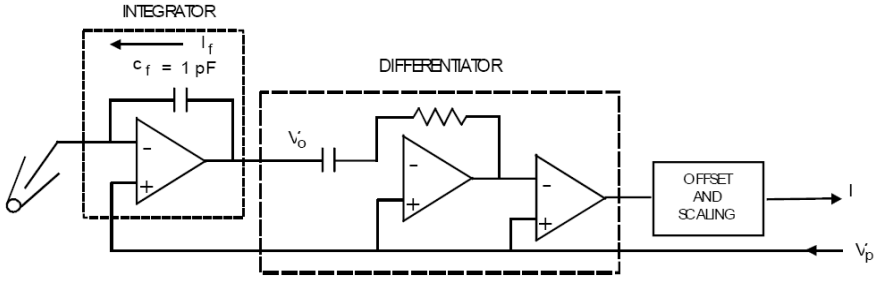


Abb. 3.1 Kapazitive Rückkopplung[59] Der Vorverstärker misst das Integral des Stroms. Anschließend erfolgt eine Differenziation des Signals im Verstärker**.**

3.5.2 Patch-Pipetten

Die benötigten Patch-Pipetten wurden aus Borsilikatglaskapillaren (GB150F-8P 0,86 x 1,50 x 80mm; Science Products, Hofheim) durch zweistufiges Ausziehen mit Hilfe eines Pipettenziehgerätes (Narishige, Tokio, Japan) hergestellt. Zur Verringerung der elektrischen Kapazität der sehr dünnen Pipettenspitze wurde diese mit Sylgard184® (Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) ummantelt. Durch die Ummantelung (*coating*) wurde außerdem das durch Fluktuationen an der Glas-Wasser-Grenzschicht verursachte Rauschen vermindert.

Die Spitze der Pipette wurde unter mikroskopischer Kontrolle über einem glühenden Platindraht poliert, um Verletzungen der Membran beim Aufsetzen der Pipette zu vermeiden und eine dicht schließende Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran zu ermöglichen. Der gemessene Widerstand der verwendeten Pipetten lag zwischen 5 und 10 MΩ, dies entspricht einem Öffnungsdurchmesser im Bereich von etwa einem Mikrometer.

3.5.3 Messanordung

Bei allen Experimenten herrschte eine Raumtemperatur von ca. 22 °C. Um mechanische und elektrische Störungen zu minimieren, befand sich die gesamte Anordnung auf einem schwingungsgedämpften Tisch innerhalb eines Faraday-schen Käfigs.

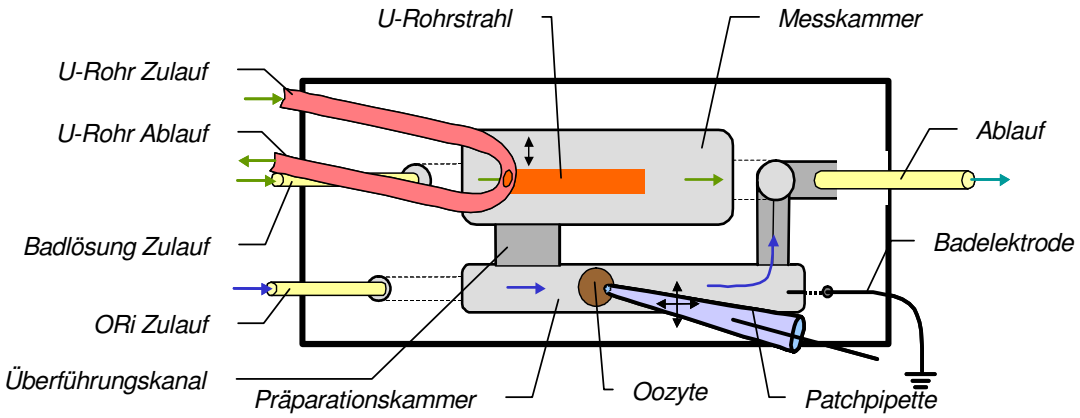


Abb. 3.2 Schematische Darstellung der verwendeten Messkammer

Die Messkammer war auf dem Kreuztisch eines Umkehrdurchlichtmikroskops angeordnet, das über einen angeschlossenen Videomonitor eine optische Kontrolle der Oozytenposition erlaubte. Neben der Messkammer (Abb. 3.2) befand sich eine Präparationskammer, in der die Oozyte aufbewahrt und der Patch erstellt wurde. Dieser wurde ständig von Oozyten-Ringer-Lösung durchspült. Im angrenzenden eigentlichen Messbereich konnten verschiedene Lösungen an einen Patch appliziert werden, ohne die Oozyte zu beeinflussen.

Die mit Innenlösung gefüllten Patch-Pipetten wurden an einen Pipettenhalter montiert, welcher sich direkt am Vorverstärker (CV 201A) des Patch-Clamp-Verstärkers (Axopatch 200A, Axon Instruments, Inc., Foster City, USA) befand. Der elektrische Kontakt wurde über einen chlorierten Silberdraht hergestellt. Die Badlösung wurde ebenfalls mittels chlorierten Silberdraht geerdet und mit dem Verstärker verbunden.

Der Vorverstärker war auf einem Halter befestigt, der über einen hydraulisch gesteuerten Mikromanipulator eine erschütterungsfreie dreidimensionale Positionierung der Pipette von außen ermöglichte.

Schnelle Lösungswechsel wurden durch ein U-Rohr, welches mittels einer computergesteuerten Piezokeramik (P-888.90, Physik Instrumente GmbH, Waldbronn) verschoben werden konnte, ermöglicht. Durch die Kombination von Piezo und U-Rohr konnte sowohl ein Wechsel zwischen Badlösung und U-Rohrlösung am Patch innerhalb einer Millisekunde, als auch die schnelle Bereitstellung verschiedener Lösungen im U-Rohr innerhalb von ca. 10 Sekunden erreicht werden (Abb. 3.3).

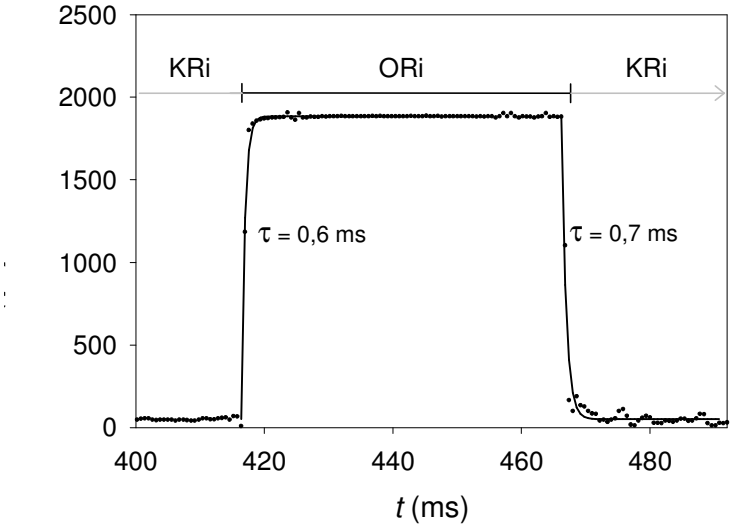


Abb. 3.3 **Demonstration des schnellen Lösungswechsels** Die Geschwindigkeit des Lösungswechsels mittels U-Rohr wurde an einer offenen Patch-Pipette beim Wechsel zwischen KRi und ORi bestimmt. Die Zeitkonstanten lagen bei 0,6 ms für den Ein- und 0,7 ms für den Ausschaltvorgang. Die kürzere Einschaltzeit ist durch die etwas höhere Strömungsgeschwindigkeit im Strahl im Vergleich zur Badlösung begründet

Das U-Rohr bestand aus einer in der Mitte dünn ausgezogenen Glaskapillare, welche U-förmig gebogen war. Durch ein in der Mitte befindliches kleines Loch (Durchmesser ca. 0,1 mm) konnte die Lösung austreten. Über eine Seite der Kapillare wurden die Lösungen zugeführt, die andere Seite fungierte als Ablauf. Die Apparatur war so eingestellt, dass bei geöffnetem Ablaufventil an der Austrittsöffnung des U-Rohrs ein Unterdruck herrschte und somit über den einen Schenkel des U-Rohrs zulaufende U-Rohr-Lösung sowie durch die Öffnung an der U-Rohr-Spitze Badlösung angesaugt wurde. Damit war ein Austausch der Flüssigkeit im Inneren des Rohres in kurzer Zeit möglich, ohne dass die Lösung in die Kammer austrat.

Bei geschlossenem Ablaufventil strömte die Lösung durch das Loch in die Messkammer. Aufgrund der laminaren Strömung bildete sich ein räumlich gut begrenzter Strahl aus[60]. Mit Hilfe des Piezos konnte das U-Rohr nun so positioniert werden, dass der austretende Strahl entweder auf den Patch traf oder daran vorbei floss.

3.5.4 Datenerfassung

Die Erfassung der Daten erfolgte mittels PC über eine A/D-D/A-Wandlerkarte (Lab Master DMA, Scientific Solutions, Inc, Solon, USA). Die verwendete hauseigene Software SP-Multi übernahm neben der Erfassung der Daten auch viele Steuerungsfunktionen, wie das Schalten des Piezos sowie das Anlegen der gewünschten Klemmspannungssequenzen.

In Tabelle 3 sind die verwendeten Programmtypen aufgeführt. Die Haltepotenziale und Zeitspannen wurden gegebenenfalls nach den Erfordernissen des jeweiligen Experimentes angepasst.

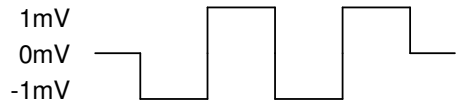
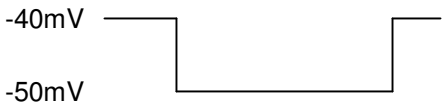
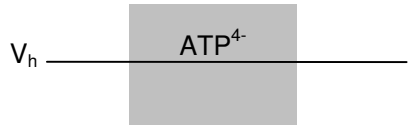
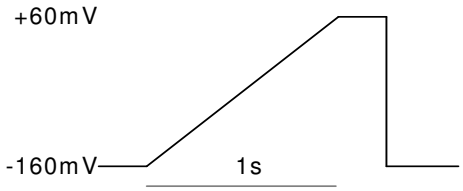
Programm	Bespielsequenz	Verwendung
(A) Rechteckimpuls +1 mV –1 mV		-Messung des Pipettenwiderstandes -Erstellen des Gigaseals
(B) Rechteckimpuls -40 mV –50 mV		-Messung und Kompensation der Pipettenkapazität -Aufreißen des Patches und Überführung in *outside-out*-Konfiguration
(C) Konstantes Haltepotenzial		Zur Bestimmung von: -Öffnungswahrscheinlichkeit -Schaltkinetik -Dauerapplikation oder zeitgesteuerte Applikation (grauer Bereich) bei verschiedenen Haltepotenzialen V_h
(D) Rampe bzw. Sägezahn (Messung während des linearen Anstiegs)		Zur Bestimmung von: -Umkehrpotenzial und Leitfähigkeit *-I-U-*Abhängigkeit

Tabelle 3 Verwendete Stimulationsprogrammtypen

Die Ströme wurden, sofern nicht anders angegeben, mit einer Samplingrate von 5 kHz unter Verwendung des internen 4-Pol-Besselfilters des Verstärkers mit 1 kHz aufgezeichnet.

Die Analyse der Daten erfolgte mittels hauseigenem Programm „Super-patch 2000“, „SP-Analyzer“ (© T. Böhm) sowie „ASCD“ (© G. Droogmans, Katholische Universität Leuven, Belgien).

3.5.5 *Outside-out*-Messungen

Da der in der vorliegenden Arbeit untersuchte $P2X_7$-Rezeptor durch extrazelluläre Agonisten im ms-Bereich aktiviert wird, war ein möglichst schneller Lösungswechsel an der Außenseite der gepatchten Zellmembran notwendig. Dies ist in der *outside-out*-Konfiguration der *patch-clamp*-Technik gewährleistet.

Das gemessene Diffusionspotenzial (nach [61]) an der Pipettenspitze lag bei 3 mV für K^+- bzw. 5 mV für die Cs^+-Pipettenlösung. Das Diffusionspotenzial sowie die Elektrodenpotenziale wurden nach dem Eintauchen der noch offenen Pipette in die Badlösung am Verstärker kompensiert.

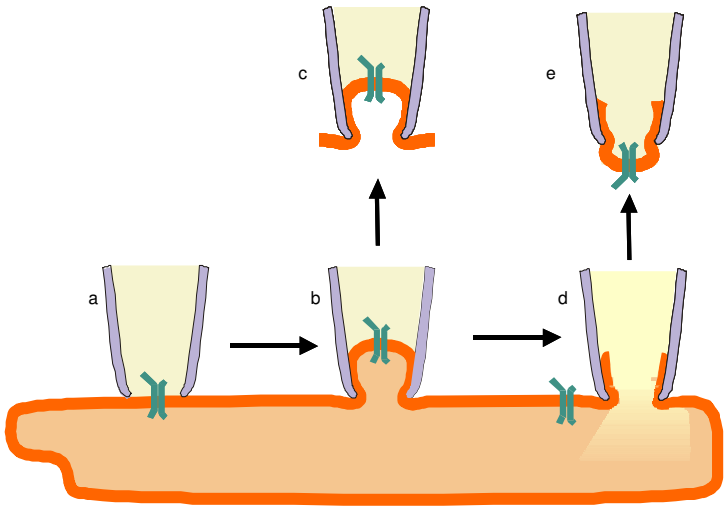


Abb. 3.4: Patch-Konfigurationen (a) Kontakt mit der Zelloberfläche (Seal), (b) durch Unterdruck dichte Verbindung zwischen Membran und Pipette (Gigaseal), (c) Patch aus Zelle herausgerissen (*inside-out*), (d) Patch durch starken Unterdruck geöffnet (Ganzzellkonfiguration), (e) Patch schließt sich beim langsamen Wegziehen in Ca-haltiger Lösung von selbst (*outside-out*)

Im ersten Schritt wurde die Pipette unter optischer und elektrischer Kontrolle (Rechteckimpuls –1 mV +1 mV Tabelle 3 A) an die Zelloberfläche herangeführt. Ein geringer Überdruck im Inneren der Pipette verhinderte dabei das Eindringen

von Badlösung in die Pipette und verringerte außerdem das Risiko von Verschmutzungen der Spitze durch abgelöste Zellbestandteile. Der Kontakt der Pipettenspitze mit der Membran machte sich durch einen Anstieg des Pipettenwiderstandes bemerkbar. Der Überdruck wurde nun durch einen leichten Unterdruck ersetzt, bis sich ein sogenanntes Gigaseal, d.h. eine dichte Verbindung zwischen Pipettenspitze und Zellmembran mit elektrischem Pipettenwiderstand im GΩ-Bereich, ausbildete (*cell attached configuration).*

Nach einer Ruhezeit von ca. 30 Sekunden (um eventuell in die Pipette eingedrungene Extrazellulärlösung durch Diffusion zu verdünnen sowie zur Konsolidierung der Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette) wurde der Patch durch Zerstörung der Membran innerhalb der Pipette mittels starkem Unterdruck oder kurzem Spannungspuls in die Ganzzellkonfiguration (*whole cell configuration*) überführt. Der Erfolg dieses Schrittes konnte durch Messung des Pipettenwiderstandes (Ganzzellwiderstand + Serienwiderstand), welcher typischerweise bei 10 - 30 MΩ lag, überprüft werden (Rechteckimpuls –40 mV -50 mV Tabelle 3 B).

Im letzten Schritt wurde die Pipette vorsichtig von der Membran weggezogen. Dabei schloss sich die anhaftende Membran so, dass sich die Außenseite der Zellmembran an der Außenseite der Pipette befand (*outside-out*-Konfiguration, s. Abb. 3.4). Der Erfolg wurde wiederum durch einen Anstieg des Widerstandes auf über 1 GΩ sichtbar.

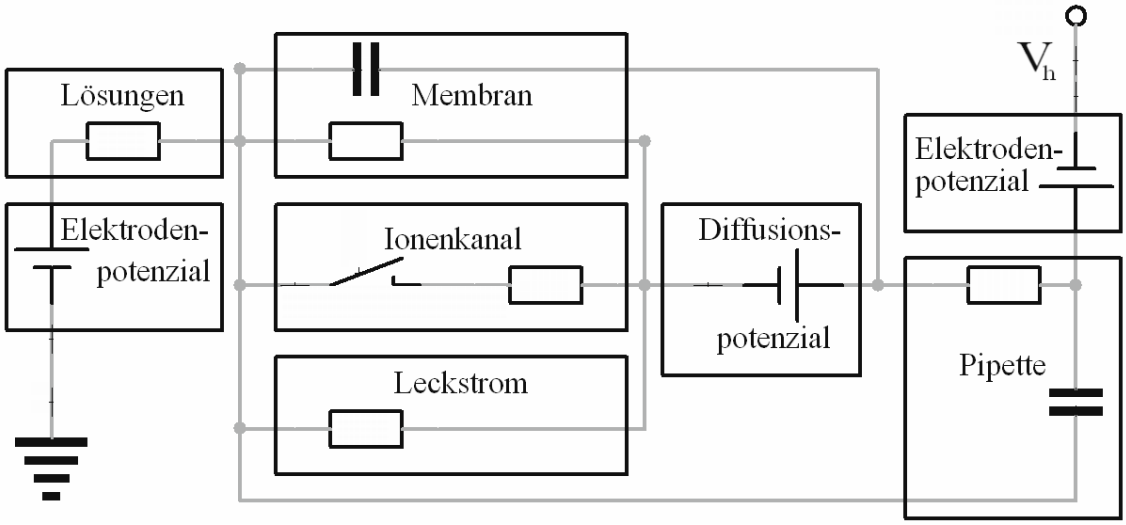


Abb. 3.5 Ersatzschaltbild eines Einzelkanalpatches $R_{Lösung} << R_{Pipette} << R_{Kanal} << R_{Membran}$
Die Potenziale und Kapazitäten wurden am Verstärker kompensiert (Abb. erstellt mit TARGET 3001!V13)

3.6 Kinetik

Die Schaltkinetik des $P2X_7$-Kanals wurde anhand kurzer ATP^{4-}-Applikationen bei konstantem Haltepotenzial untersucht (s. Tabelle 3 C). Dabei wurde ein Spannungsbereich zwischen –160 und +80 mV betrachtet. Die verwendeten ATP^{4-}-Konzentrationen lagen zwischen 0,3 µM und 10 mM. Außerdem wurde der Einfluss verschiedener Kationen durch Austausch des Na^+ auf der extrazellulären bzw. des K^+ auf der intrazellulären Membranseite gegen andere monovalente Kationen untersucht (s. auch 3.7). Aus den gemessenen Daten wurden, wie in Kap. 3.8 beschrieben, die Offenwahrscheinlichkeit, die Kinetik der Aktivierung und Deaktivierung sowie die Verweilzeiten im offenen bzw. geschlossenen Zustand bestimmt.

3.7 Bestimmung der Permeabilität verschiedener Ionen

Zur Größenabschätzung der Kanalpore wurde die Leitfähigkeit des $P2X_7$-Kanals für monovalente Kationen verschiedener Größe untersucht. Zu diesem Zweck wurde Na^+ der extrazellulären Bad- und U-Rohr-Lösung vollständig gegen das zu untersuchende Ion ausgetauscht. Gemessen wurden sowohl Spannungsrampen (s. Tabelle 3) zur Bestimmung der Leitfähigkeit und des Umkehrpotenzials, als auch Ströme bei konstantem Haltepotenzial zur Analyse der Einzelkanalstromamplitude sowie der Schaltkinetik (s. 3.6).

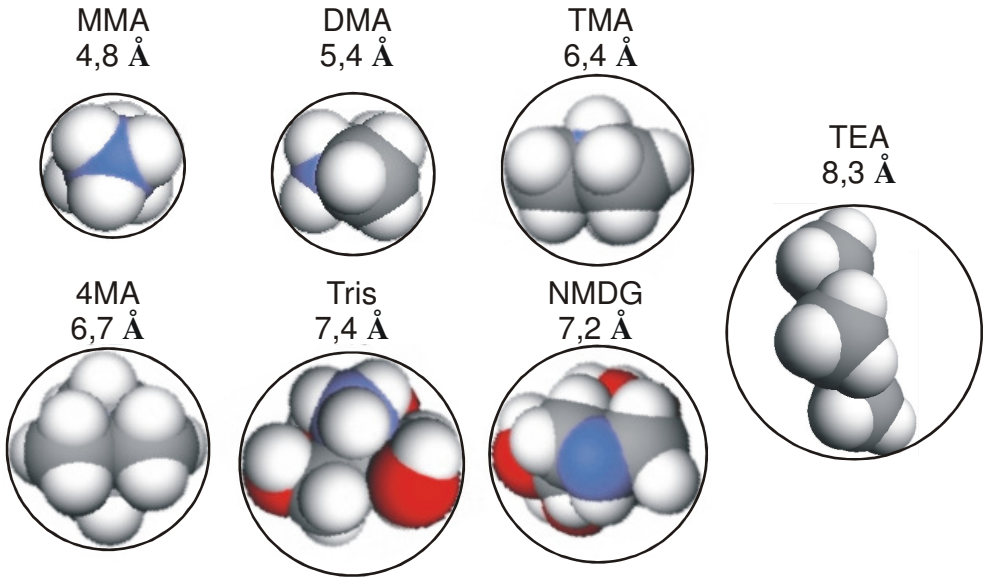


Abb. 3.6 Größenverhältnisse der verwendeten organischen Kationen im CPK Modell jeweils von der kleinsten Querschnittsfläche betrachtet. Mono-Methyl-Ammonium (MMA), Di-Methyl-Ammonium (DMA), Tri-Methyl-Ammonium (TMA), Tetra-Ethyl-Ammonium (TEA) Tetra-Methyl-Ammonium (4MA), Tris, NMDG

Die Durchmesser der anorganischen Ionen wurden publizierten Daten entnommen (Li^+ 0,60 Å; Na^+ 0,95 Å; K^+ 1,33 Å; Cs^+ 1,69 Å)[12]. Die Größe der organischen Ionen wurden mit Hilfe des Programms ArgusLab 4.0.1 (Mark A. Thompson, Planaria Software LLC, Seattle, WA, http://www.arguslab.com) modelliert. Als effektiver Durchmesser wurde der Kreis angenommen, der die zwei kleinsten Dimensionen des Moleküls im CPK-Modell umspannt (Abb. 3.6)

3.8 Auswertung der Daten

3.8.1 Amplitudenhistogramme

Zur Bestimmung der Öffnungswahrscheinlichkeit P_o und der Einzelkanalstromamplitude wurden die gemessenen Ströme in einem Amplitudenhistogramm aufgetragen und die erhaltenen Peaks mittels Gaußkurven approximiert:

$$y = Pe^{-\frac{(i-i_0)^2}{2\omega^2}} \tag{12}$$

Im Falle eines Einzelkanalpatches konnte aus den Parametern direkt die mittlere Einzelkanalamplitude i_0, die Wahrscheinlichkeit des Zustandes P (offen oder geschlossen) und die Halbwertsbreite ω der Verteilung abgelesen werden.

Bei mehreren Kanälen im Patch wurde eine Binomialverteilung der Öffnungszustände angenommen, wobei vorausgesetzt werden musste, dass alle enthaltenen Kanäle die gleichen Eigenschaften bezüglich Einzelkanalstromamplitude und Offenwahrscheinlichkeit aufwiesen. Die Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals P_O wurde dann nach der Binomialgleichung (13) berechnet:

$$P_o = 1 - \sqrt[n]{P(0)} \tag{13}$$

Dabei steht n für die Zahl der aktiven Kanäle und $P(0)$ für die aus dem Amplitudenhistogramm bestimmte Wahrscheinlichkeit, alle Kanäle im geschlossenen Zustand zu finden.

Es wurden nur Registrierungen von Patches mit maximal drei gleichzeitigen Einzelkanalöffnungen bei Applikation von 1 mM ATP^{4-} verwendet. Die hier beobachtete maximale Anzahl überlappender $P2X_7$-Kanalöffnungen wurde als die Anzahl der enthaltenen aktiven Kanäle angenommen, da die Offenwahrscheinlichkeit P_o hier mit ca. 25 % sehr hoch war (s. Abb. 4.12 B). Das von Colqu-

houn[62] beschriebene Modell für die minimal notwendige Beobachtungszeit, um Überlappung von Öffnungen zweier Kanäle im Patch zu erkennen, wurde auf *n* Kanäle erweitert. Die mittlere Offenzeit von *n* gleichzeitig geöffneten Kanälen beträgt demnach:

$$\tau_{no} = P_o^{\,n} \frac{\tau_o}{n} \tag{14}$$

Für die mittlere Zeit zwischen zwei gleichzeitigen Öffnungen aller *n* Kanäle im Patch ergibt sich:

$$\tau_{nc} = \frac{\tau_o}{n}\left(\frac{1}{P_o^{\,n}} - 1\right) \tag{15}$$

Unter der Annahme, dass die Streuung der Verweilzeiten einer symmetrischen Verteilung entspricht, wird nach einer Beobachtungszeit τ_{nc} eine gleichzeitige Öffnung aller Kanäle mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,5 detektiert.
Dementsprechend ergibt sich die Beobachtungszeit *t* um das Vorhandensein weiterer Kanäle (n + 1 oder mehr) im Patch mit der Irrtumswahrscheinlichkeit β auszuschließen:

$$t = \frac{\ln\beta}{\ln\frac{1}{2}}\tau_{nc} = \frac{\ln\beta}{\ln\frac{1}{2}}\frac{\tau_o}{n}\left(\frac{1}{P_o^{\,n}} - 1\right) \tag{16}$$

In der Praxis wurden nur Patches untersucht, bei denen innerhalb von 2 s Applikation von 1 mM ATP nur 3 oder weniger Kanäle gleichzeitig öffneten.

n	τ_{nc} / ms	t / ms
1	15,00	64,83
2	37,50	162,07
3	105,00	453,80
4	318,75	1377,61
5	1023,00	4421,33

Tabelle 4 **Notwendige Beobachtungszeiten *t*** um das Vorhandensein weiterer aktiver Kanäle bei einer für $P2X_7$ typischen mittleren Offenzeit von 5 ms und einer Einzelkanalöffenwahrscheinlichkeit von 0,25 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit β von 0,05 auszuschließen. $\tau_{nc:}$ mittlere Zeit zwischen zwei gleichzeitigen Öffnungen aller *n* Kanäle im Patch

3.8.2 Offen- und Geschlossenzeiten

Die Verweilzeiten des Kanals im offenen oder geschlossenen Zustand (*dwell times*) wurden mit Hilfe idealisierter Daten analysiert. Dazu wurden den Messwerten, die unterhalb eines Schwellenwertes lagen, die Eigenschaft geschlossen (0)

und denen über einem weiteren Schwellenwert die Eigenschaft geöffnet (1) zugewiesen. Für Werte im Hysteresebereich zwischen den beiden Schwellenwerten wurde die vorige Eigenschaft beibehalten, um Rauschartefakte zu verhindern (Abb. 3.6). Zur Bestimmung der mittleren Verweilzeiten wurden die aus der Idealisierung gewonnen Zeiten in ein Histogramm aufgetragen und nach Gleichung (17)[63] angepasst:

$$P(t_{Verweilzeit}) = \sum_i A_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \qquad (17)$$

Auch die zeitliche Entwicklung der Verweilzeiten während des Experimentes ließ sich anhand der idealisierten Daten gut verfolgen. Hierfür wurden die jeweiligen Verweilzeiten über der Ereignisnummer in einem Stabilitätsplot dargestellt. Für die Bestimmung der Verweilzeiten wurden nur Registrierungen von Patches mit genau einem Kanal, d.h. Patches, bei denen keine überlappenden Öffnungen bei einer Konzentration von 1 mM ATP^{4-} auftraten, herangezogen.

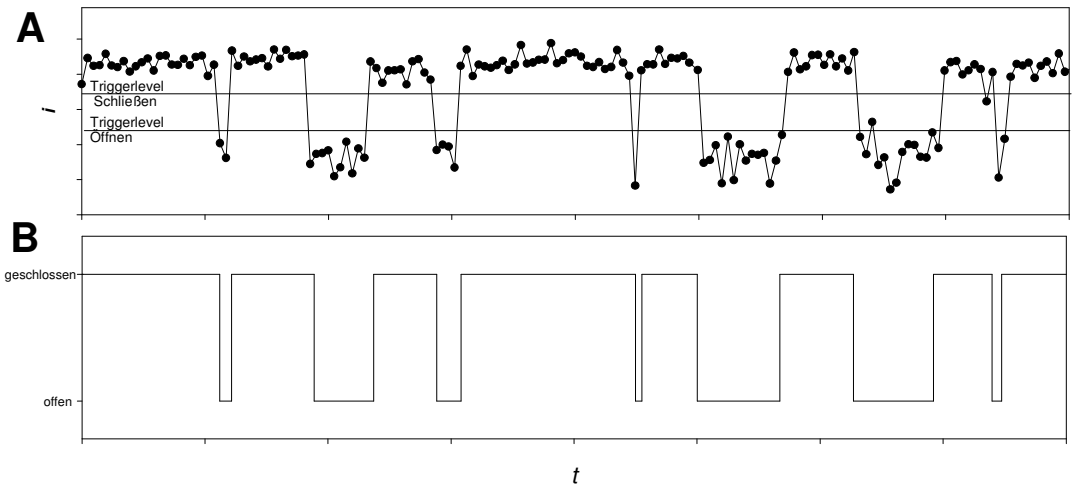


Abb. 3.7 Idealisieren der Daten A) Rohdaten B) Idealisierter Datensatz

3.8.3 Makro-Patches

Patches, die viele Kanäle enthalten, wurden für die Bestimmung des Aktivierungs- (zunehmende Öffnungswahrscheinlichkeit während ATP^{4-}-Applikation) und Deaktivierungsverlaufs (abnehmende Öffnungswahrscheinlichkeit während des Auswaschens von ATP^{4-}) verwendet, da diese Analysen mittels Einzelkanalmessungen sehr aufwändig wären. Waren nur wenige Kanäle im Patch vorhanden, wurden mehrere Zeitverläufe der Kanalaktivierung und -deaktivierung ge-

mittelt. Die Beschreibung der Zeitverläufe erfolgte mittels Exponentialfunktionen (Gl. (22) und (23)).

3.8.4 Umkehrpotenziale

Das Potenzial, bei dem kein Nettoionenstom fließt (Umkehrpotenzial V_U), ist eine experimentell gut zugängliche Größe, welche Rückschlüsse auf das Permeationsverhalten der Zellmembran ermöglicht. In den *patch-clamp*-Konfigurationen *inside-out und outside-out* (Abb. 3.4 c,e) lassen sich die Konzentrationen der permeierenden Ionen auf beiden Seiten der Membran einstellen. Bei Verwendung von jeweils nur einer permeierenden Ionenart auf jeder Seite des Patches, kann das Verhältnis des Permeationsvermögens der beiden Ionensorten P_x/P_y aus dem Umkehrpotenzial Ψerrechnet werden (siehe Gl. (1)).
Für Kationen K_i^+ mit der Konzentration c_i innen und K_a^+ mit der Konzentration c_a auf der Außenseite der Membran gilt:

$$\frac{P_{K_a^+}}{P_{K_i^+}} = \frac{c_i}{c_a} e^{\Delta\Psi\frac{F}{RT}} \tag{18}$$

Die Umkehrpotenziale wurden mit Hilfe des Programms „*SP Analyzer 2000*“ aus den Daten der Spannungsrampenexperimente gewonnen. Hierzu wurde eine Regressionsgerade durch die Abschnitte genau erkennbarer Kanalöffnungen in der Nähe des Umkehrpotenzials gelegt (Abb. 3.8 D). Vorher mussten die „unspezifischen“ Membranströme, die nicht durch den $P2X_7$-Rezeptor flossen, subtrahiert werden. Hierzu wurden Stromregistrierungen, die keine oder wenige Kanalöffnungen aufwiesen, genutzt und der während der Kanalschließungen auftretende unspezifische Strom linear approximiert (Abb. 3.8 B, C).

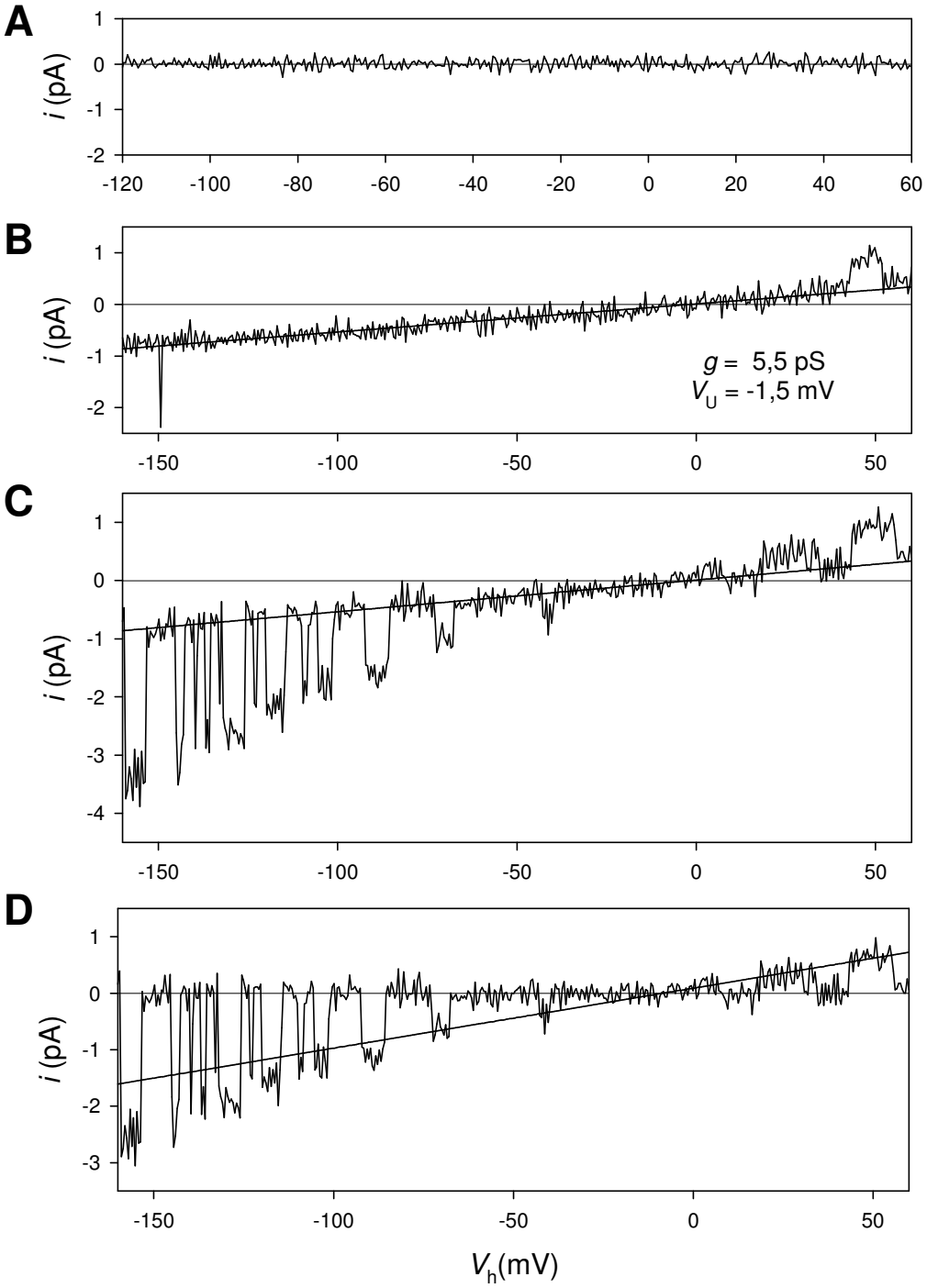


Abb. 3.8 Beispiele für Spannungsrampen (A) vor ATP^{4-}-Applikation (B) unspezifische Komponente (C) unspezifische und Kanalkomponente (D) Registrierung nach Abzug der unspezifischen Komponente; Alle Registrierungen stammen vom gleichen Patch.

4 Ergebnisse

4.1 Komponenten des Stroms durch den $P2X_7$-Kanal

Im Einzelkanalexperiment zeigte sich, dass der durch ATP induzierte Ionenstrom aus mehreren Stromkomponenten zusammengesetzt war, welche sich hinsichtlich ihrer Kinetik, Amplitude und ihres Rauschverhaltens unterschieden.

In Abb. 4.1. A ist das Verhalten des Patches in Na^+-haltiger Oozytenringerlösung vor, während und nach der Applikation von 0,3 mM ATP^{4-} dargestellt. Die Einzelkanalöffnungen begannen kurz nach dem Start der ATP^{4-}-Applikation und endeten sofort nach dem Auswaschen. Gut zu erkennen ist, dass neben den eigentlichen Einwärtsströmen von ca. 1,3 pA durch die Kanalöffnungen (Abb. 4.1. B, C) eine weitere Komponente mit exponentiellem Ein- bzw. Ausschaltverhalten überlagert war.

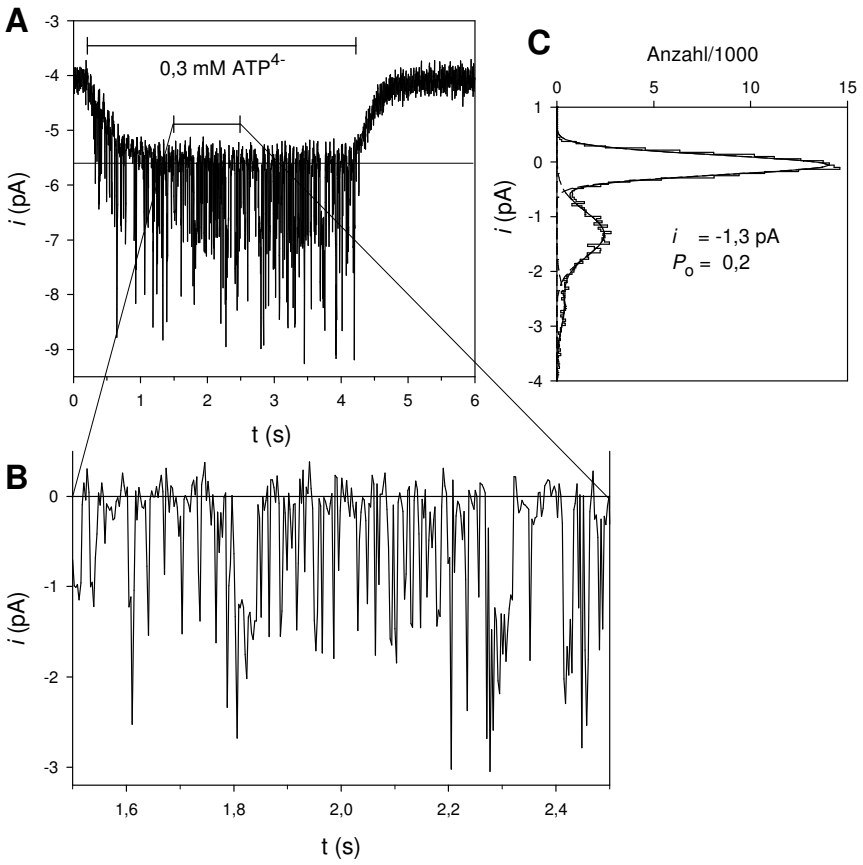


Abb. 4.1 Stromkomponenten eines *outside-out*-patches bei Applikation von 0,3 mM ATP, V_h = -120 mV, 1 Tag nach Injektion der cRNA, Bad: Na-ORI, Pipette Cs-Innenlösung (A): Gesamtstrom; (B): Einzelkanalströme aus (A) nach Abzug der unspezifischen Komponente; (C) Amplitudenhistogramm der Einzelkanalströme aus (A) (1,3 bis 4,2 s)

Diese „glatte“ Komponente stellte eine $P2X_7$-unspezifische Reaktion des Patches auf ATP^{4-} dar, welche auch bei $P2X_7$-freien Kontrolloozyten (H_20 bzw. keine Injektion) bzw. bei der Applikation von ADP^{3-}, UTP^{4-} oder GTP^{4-} beobachtet wurde (Abb. 4.2).

Für die weitere Betrachtung des Einzelkanalstroms wurde diese unspezifische Komponente nach Gleichung (19) und (20) gefittet und vom Gesamtstrom abgezogen.

$$i_{\text{act}}(t) = i_{\text{act},\infty} \cdot \left(1 - \mathrm{e}^{-\frac{t - t_{\text{del,act}}}{\tau_{\text{act}}}}\right) + s \cdot \left(t - t_{\text{del,act}}\right) + i_0 \tag{19}$$

$$i_{\text{deact}}(t) = i_{\text{deact}} \cdot \mathrm{e}^{-\frac{t - t_{\text{del,deact}}}{\tau_{\text{deact}}}} + i_0 \tag{20}$$

Dabei ist $t_{del,act}$ bzw. $t_{del,deact}$ jene Zeit, ab der eine Reaktion auf das Ein- bzw. Auswaschen von ATP erfolgt, $i_{act,\infty}$ die maximale Amplitude, welche sich nach langer Applikation einstellt, τ_{act} bzw. τ_{deact} die Aktivierungs- bzw. Deaktivierungszeitkonstante, s der Anstieg der linearen Komponente und i_0 der ATP^{4-}-unabhängige Strom vor bzw. nach ATP^{4-}-Applikation.

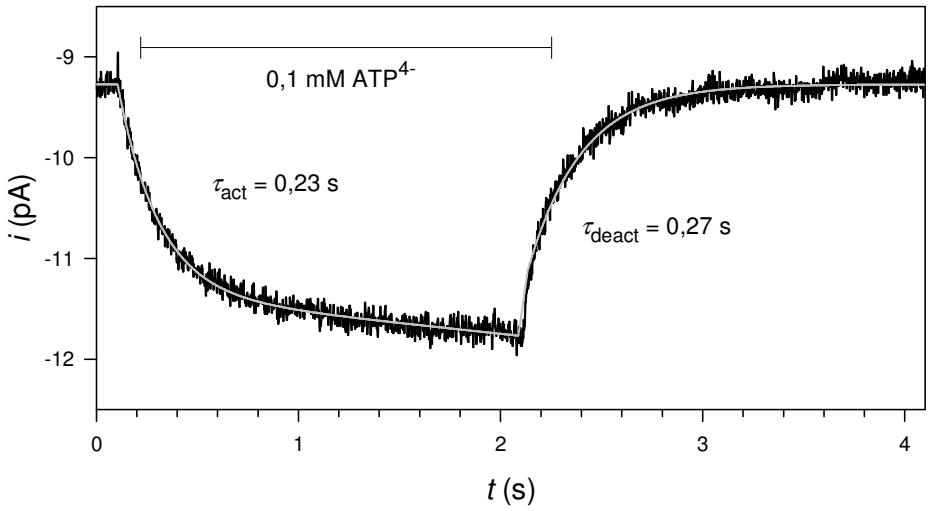


Abb. 4.2 Zeitverlauf der $P2X_7$-unabhängigen ATP-aktivierten Stromkomponente. Die Zeitverläufe der Aktivierung und Deaktivierung wurden nach Formel (19) bzw. (20) angenähert (graue Linie); V_h = -120 mV; Cs^+-Pipettenlösung

Insbesondere bei Registrierungen mit mehreren überlagerten Kanälen oder bei Ganzzellmessungen ist die Unterscheidung von unspezifischer und Kanalkomponente schwierig. Daher wurde die Kinetik der unspezifischen $P2X_7$-unabhängigen Komponente eingehender untersucht.

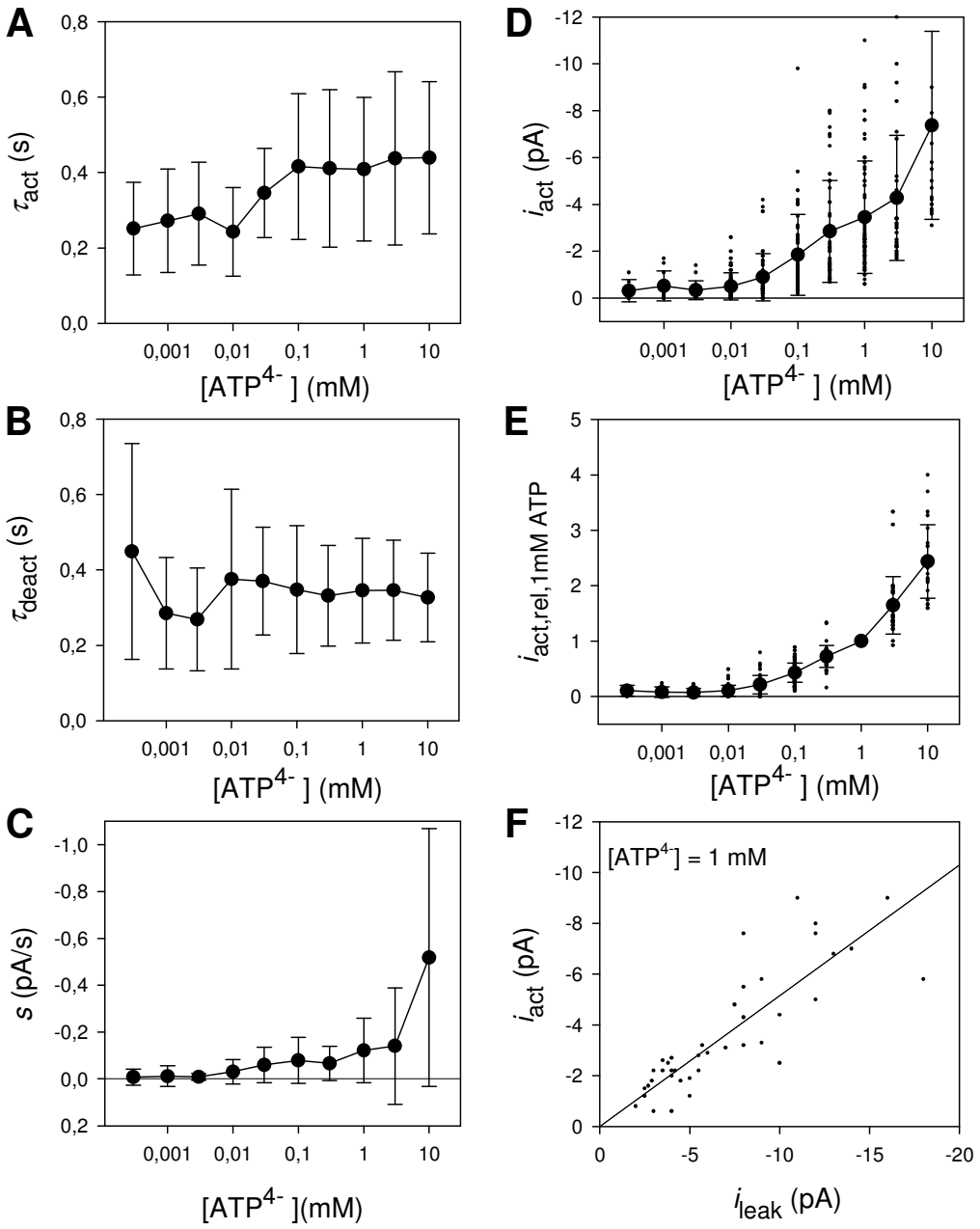


Abb. 4.3 Charakterisierung der P2X$_7$-unspezifischen Komponente. Einfluss der ATP^{4-}-Konzentration auf (A): Aktivierungszeit; (B): Deaktivierungszeit; (C) Anstieg der linear aktivierenden Komponente (D): Stromamplitude; (E): wie (D), jedoch auf 1mM ATP normiert; (F): Amplitude der unspezifischen Komponente während Applikation von 1 mM ATP^{4-} in Bezug zum Leckstrom vor der ATP-Applikation; V_h = -120 mV; N = 5 bis 20 Patches von unterschiedlichen Oozyten; Cs^+-Pipettenlösung

Die Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung von 200 ms bis 500 ms wiesen keine signifikante Abhängigkeit von der ATP^{4-}-Konzentration auf (Abb. 4.3 A, B). Sowohl der linear ansteigende Strom (Abb. 4.3 C), als auch der exponentiell ansteigende Strom wurden mit wachsender ATP-Konzentration größer und zeigten im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,3 bis 10 mM keine Sättigung (Abb. 4.3 D). Jedoch schwankte der Effekt zwischen Registrierungen

von unterschiedlichen Patches stark. Diese starke Variabilität wurde durch eine lineare Abhängigkeit der Amplitude vom Leckstrom des Patches vor der Applikation verursacht (Abb. 4.3 F). Die auf eine Konzentration von 1 mM ATP^{4-} normierte Darstellung (Abb. 4.3 E) zeigt daher eine deutlich geringere Streuung als die absoluten Stromamplituden (Abb. 4.3 D). Die unspezifische Komponente stellt also eine ATP-abhängige Verstärkung des Leckstroms dar, welche auch in wasser- bzw. nichtinjizierten Kontrolloozyten auftrat.

4.2 Offen- und Geschlossenzeiten

Die Einzelkanalanalyse des $P2X_7$-Kanals zeigte zwei Arten von Kanalöffnungen, welche sich hinsichtlich ihrer mittleren Öffnungszeiten unterschieden. Diese im Folgenden als kurze bzw. lange Öffnungen bezeichneten Schaltmodi wurden getrennt voneinander analysiert. Außerdem wurden gelegentlich, vor allem bei hohen ATP^{4-}-Konzentrationen und positiven Haltepotenzialen, ultrakurze Öffnungen (~1 ms), welche mit einem hohen Rauschen des Stroms und häufig mit einer Zerstörung des Patches einhergingen, registriert. Diese wurden als Rauschartefakte infolge der Destabilisation des Patches und nicht als Kanalöffnungen angesehen.

Die mittlere Offen- und Geschlossenzeit und damit auch die Offenwahrscheinlichkeit der kurzen Öffnungen des $P2X_7$-Kanals änderte sich auch nach langandauernder oder wiederholter Applikation hoher ATP^{4-}-Konzentrationen nicht (sofern nicht lange Öffnungen auftraten). Exemplarisch ist in Abb. 4.4 ein Stabilitätsplot eines Einzelkanalpatches während einer 50 s dauernden Applikation von 0,3 mM ATP^{4-} dargestellt.

In einigen Patches wurden deutlich längere Kanalöffnungen (τ_o ca. 20 ms) als die hauptsächlich auftretenden im Mittel ca. 5 ms langen Öffnungen beobachtet (Statistik Abb. 4.12). Aufgrund dieser verlängerten Offenzeiten bei unveränderten Geschlossenzeiten erhöhte sich auch die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Die Häufigkeit dieser langen Öffnungen stieg mit steigender ATP^{4-}-Konzentration (Abb. 4.5) und mit längerer oder wiederholter ATP^{4-}-Applikation. (Abb. 4.6 A)

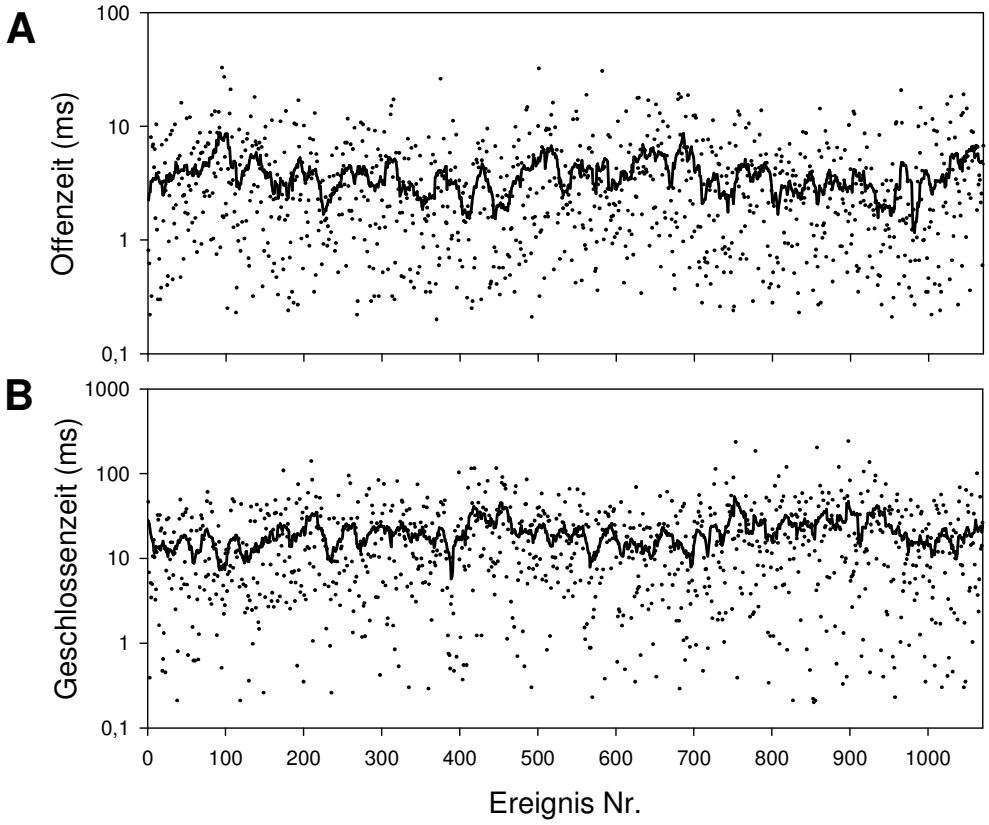


Abb. 4.4 Stabilität der Offen- und Geschlossenzeiten. Typischer Stabilitätsplot eines Patches ohne lange Öffnungen (gleicher Patch wie Abb. 4.8). Schwarze Linie: Gleitender Durchschnitt über 15 Punkte. ([ATP^{4-}] = 0,3 mM)

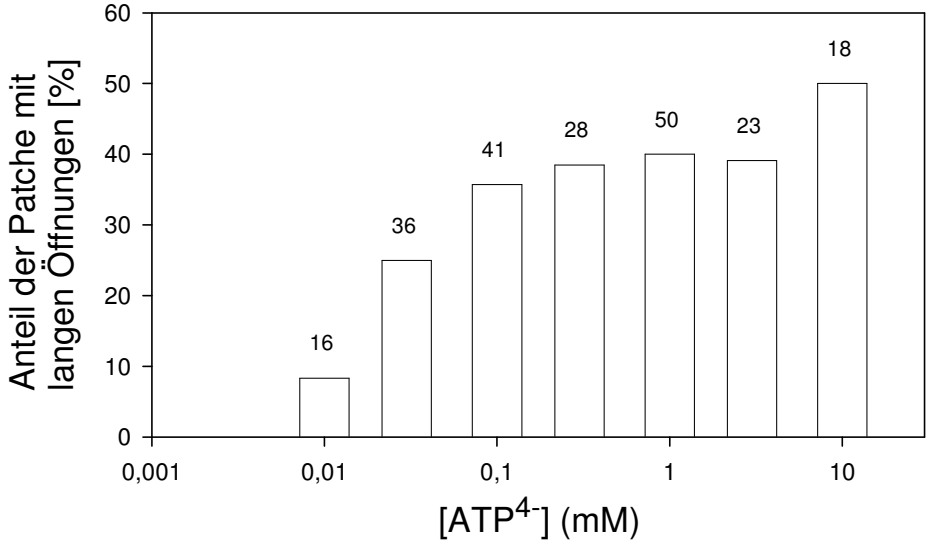


Abb. 4.5 Auftreten langer Kanalöffnungen in Abhängigkeit von der ATP^{4-}-Konzentration N = 16 - 50 Patches (Zahlen über den Säulen) von 10 bis 35 verschiedenen Oozyten.

In Einzelkanal-*patches* wurde nie eine Überlagerung von kurzen und langen Öffnungen beobachtet.

Abb. 4.6 B zeigt Beispielrampen, welche nur kurze (oben) oder lange (Mitte) Kanalöffnungen aufwiesen. Nach dem Austausch von Na^+ gegen $Tris^+$ in der Außenlösung konnte auch bei vorher vorhandenen langen Öffnungen keine Einzelkanalaktivität mehr festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die langen Kanalöffnungen nicht mit einer deutlichen Zunahme der Leitfähigkeit der Kanalpore für große organische Kationen einhergeht, wie es für die $P2X_7$-abhängigen großen Poren beschrieben wurde[31].

Die statistische Auswertung eines Patches mit kurzen und langen Öffnungen (Abb. 4.7 A) ließ eine leicht erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit während der langen Öffnungen erkennen (Abb. 4.7 B, C). Weiterhin sind bei Patches mit langen Öffnungen 3 Offenzeitkomponenten mit $\tau_{o,0}$ = 1,6 ms der ultrakurzen, $\tau_{o,1}$ = 5,7 ms der kurzen und $\tau_{o,2}$ = 24 ms der langen Öffnungen zu erkennen (Abb. 4.7 D). Patches ohne lange Öffnungen wiesen dagegen nur die beiden kleineren mittleren Offenzeitkomponenten auf. In allen Fällen wurden jedoch nur zwei Geschlossenzeitkomponenten beobachtet (Abb. 4.7 E).

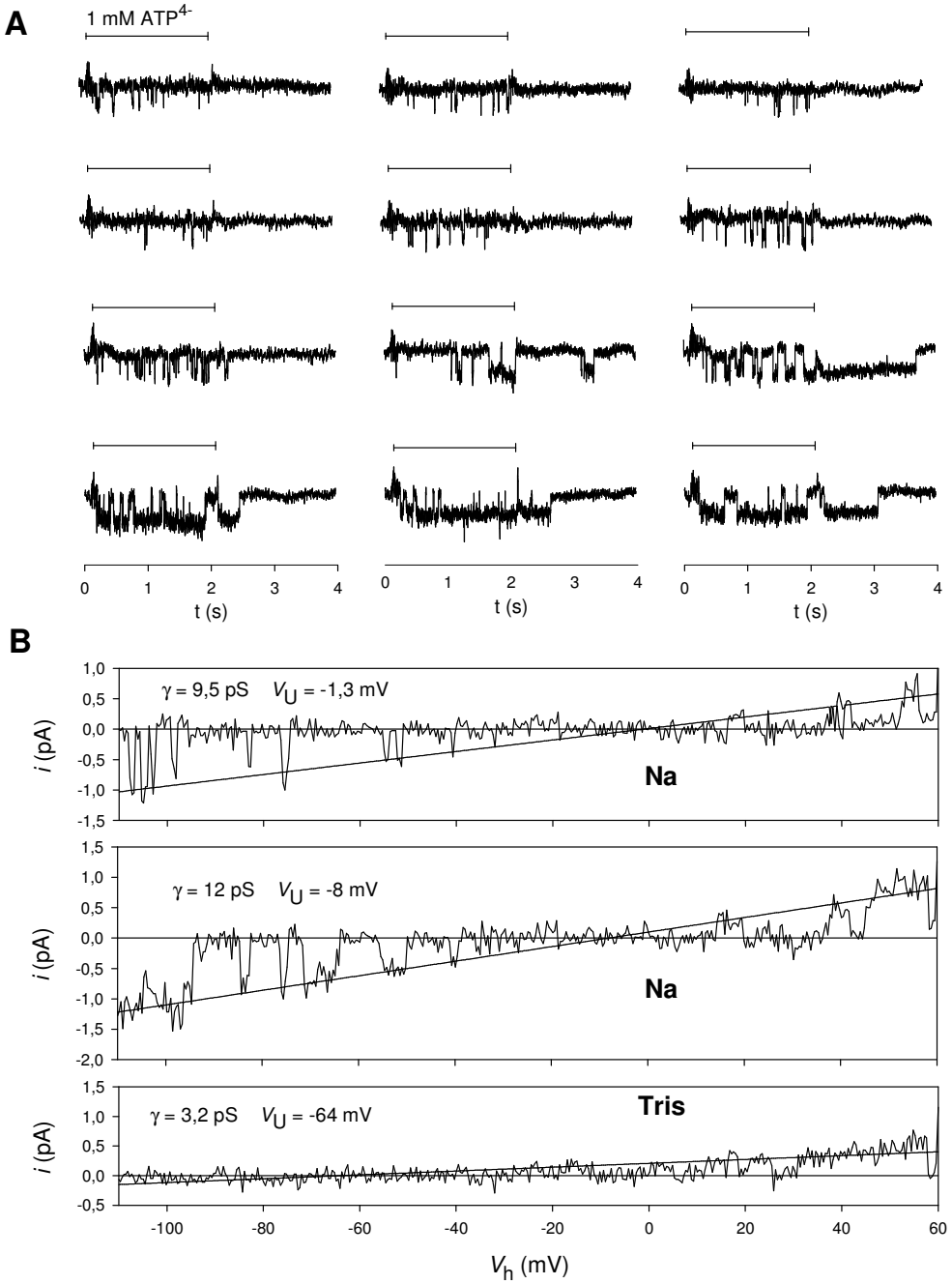


Abb. 4.6 Langandauernde Kanalöffnungen (A) Beispiele wiederholter 1 mM ATP^{4-}-Applikation mit zunehmend häufiger auftretenden langen Kanalöffnungen. V_h = -120 mV, K^+-Pipettenlösung (B) Spannungsrampen (-120 bis +60 mV) an einem Einzelkanalpatch, 1 mM ATP^{4-}. Oben und Mitte: Typische Beispiele mit kurzen und langen Öffnungen. Unten: Nach dem Austausch des extrazellulären Na^+ gegen $Tris^+$ sind keine einwärtsgerichteten Einzelkanalströme mehr erkennbar (20 s 1 mM ATP^{4-}). Die Leitfähigkeiten γ und die Umkehrpotenziale V_U wurden durch lineare Regression der Spannungsabhängigkeit der offenen Kanäle bestimmt.

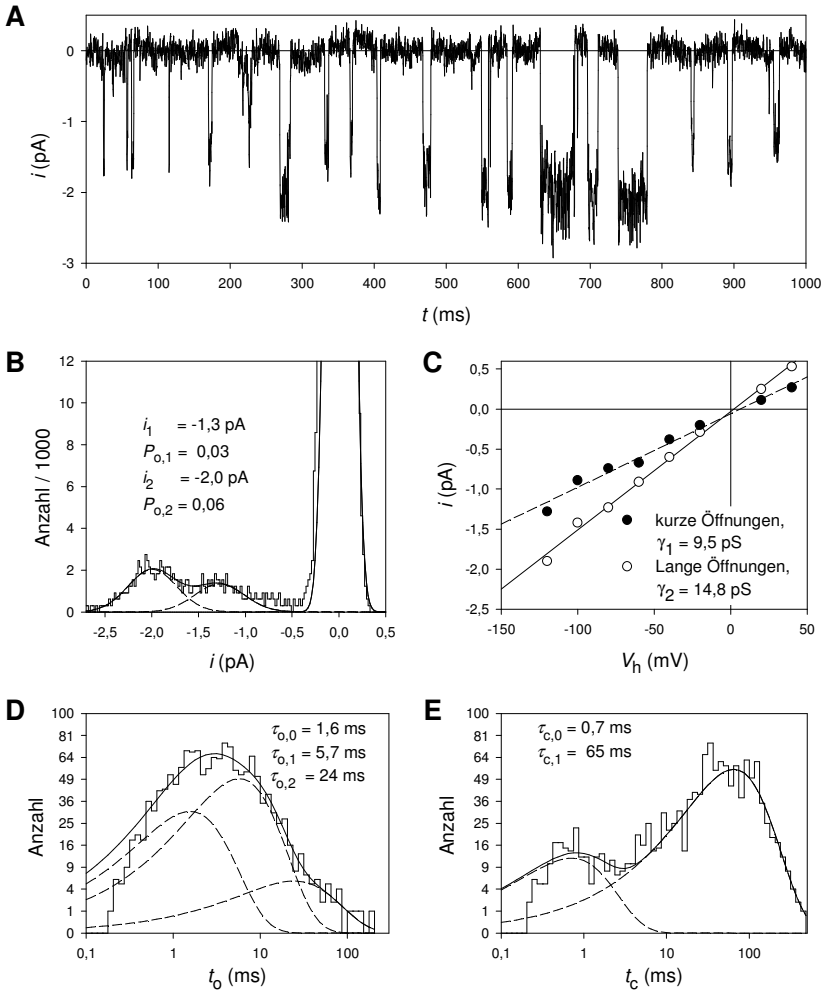


Abb. 4.7 Statistik der kurzen und langen Öffnungen (A) Ausschnitt einer Registrierung mit kurzen und langen Öffnungen (B) Amplitudenhistogramm (C) Spannungsabhängigkeit der Einzelkanalamplituden ermittelt aus den Amplitudenhistogrammen. Die Regressionsgeraden wurden im Bereich von –100 bis +40 mV angepasst ($r > 0,98$). (D) Offen- und (E) Geschlossenzeithistogramme Schwellwert: -0,65 pA. Die durchgezogene Linie ist die Summe von 2 bzw. 3 angepassten Exponentialfunktionen (unterbrochene Linien) V_h = -120 mV, [ATP^{4-}] = 0,1 mM K^+-Pipettenlösung Alle Daten wurden vom gleichen Patch erhoben.

4.3 ATP^{4-}-Abhängigkeit der Kanalkomponente

In Abb. 4.8 ist ein Beispiel des Schaltverhaltens des $P2X_7$-Kanals in einem Patch, welcher nur kurze Kanalöffnungen zeigte, dargestellt. Die Kanalöffnungen traten ab einer minimalen ATP^{4-}-Konzentration von 10 µM auf. Die Offenwahrscheinlichkeit stieg mit zunehmender ATP^{4-}-Konzentration und erreichte bei 1 mM nahezu die Sättigung (Abb. 4.12 B). Die Einzelkanalstromamplituden waren unabhängig von der ATP^{4-}-Konzentration - wie die zugehörigen Amplitudenhistogramme belegen (Abb. 4.8 B). Auch nach langandauernder ATP^{4-}-Applikation konnte keine signifikante Erhöhung der Einzelkanalstromstärke, welche auf eine Aufweitung der Kanalpore deuten würde, beobachtet werden.

Bei hohen ATP^{4-}-Konzentrationen trat jedoch ein verstärktes Rauschen des geschlossenen Stromlevels auf (vgl. ATP^{4-}-Abhängigkeit von σ in Abb. 4.8 B). Die naheliegendste Erklärung hierfür ist eine Destabilisation des Patches durch hohe ATP^{4-}-Konzentrationen.

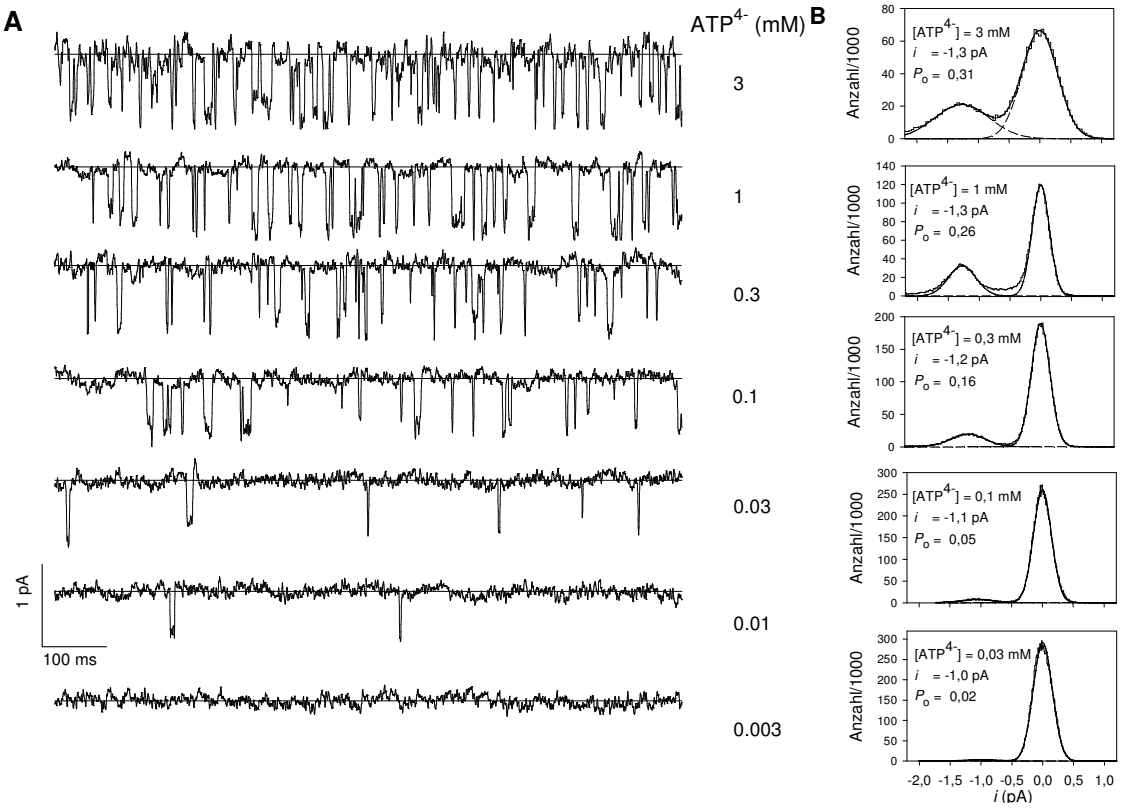


Abb. 4.8 Beispiel für die $[ATP^{4-}]$-Abhängigkeit des $P2X_7$-Kanals (A): Konzentrationsabhängige Einzelkanalströme, die geraden Linien entsprechen dem geschlossenen Niveau nach Abzug der unspezifischen Komponente (B): zugehörige Amplitudenhistogramme. V_h = -120 mV, K^+-Pipettenlösung

Eine Zusammenfassung der ATP^{4-}-Abhängigkeit der $P2X_7$-Kanals findet sich in Abb. 4.12. Die Einzelkanalamplituden (Abb. 4.12 A) und die mittleren Offenzeiten (Abb. 4.12 C) waren ATP^{4-}-unabhängig. Die Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit mit Erhöhung von $[ATP^{4-}]$ (Abb. 4.12 B) wurde durch eine Verkürzung der mittleren Geschlossenzeiten (Abb. 4.12 D) und damit durch ein häufigeres Öffnen des Kanals bewirkt.

Die Offenwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der ATP^{4-}-Konzentration wurde nach Gl. 21 angenähert.

$$P_o([\mathrm{ATP}^{4-}]) = \frac{P_{o,\infty}}{\left(1+\frac{10^{-\log K_d}}{[\mathrm{ATP}^{4-}]}\right)^n} \qquad (21)$$

Dabei ist $P_{o,\infty}$ die maximale mögliche Offenwahrscheinlichkeit bei ATP^{4-}-Konzentrationen, welche die Agonisten-Bindungsstelle sättigen und K_d die scheinbare ATP^{4-}-Bindungskonstante.

4.4 Spannungsabhängigkeit der Kanaleigenschaften

Der $P2X_7$-Kanal war für kleine anorganische Kationen in beide Richtungen durchlässig (Abb. 4.9 A). Das Umkehrpotenzial lag bei etwa gleichen intra- und extrazellulären Konzentrationen von kleinen monovalenten Kationen bei etwa 0 mV. Allerdings war eine leichte Einwärtsgleichrichtung der Einzelkanalstromamplitude zu verzeichnen (Abb. 4.9 A, Abb. 4.10). Bei negativen Haltepotenzialen war keine signifikante Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von der angelegten Spannung zu erkennen. Beim Übergang zu positiven Haltepotenzialen und damit auch einer Stromrichtungsumkehr, erhöhte sich die mittlere Offenzeit signifikant und damit auch die Offenwahrscheinlichkeit auf etwa das Dreifache. Die mittlere Geschlossenzeit hingegen blieb unverändert (Abb. 4.9, Abb. 4.10). Mögliche Erklärungen hierfür sind das Verdrängen des Na^+, das durch Binden im Außenbereich des Kanals seine Schließung fördert, an der Kanalaußenseite durch die ausströmenden Kationen der Innenlösung (siehe Kap. 4.9) oder die Lokalisation der Na^+-Bindungsstelle im elektrischen Feld der Zellmembran (s. 4.10, Abb. 4.27 B). Da positive Membranpotenziale unter physiologischen Bedingungen nicht auftreten, wurde dieser Effekt jedoch nicht weiter untersucht.

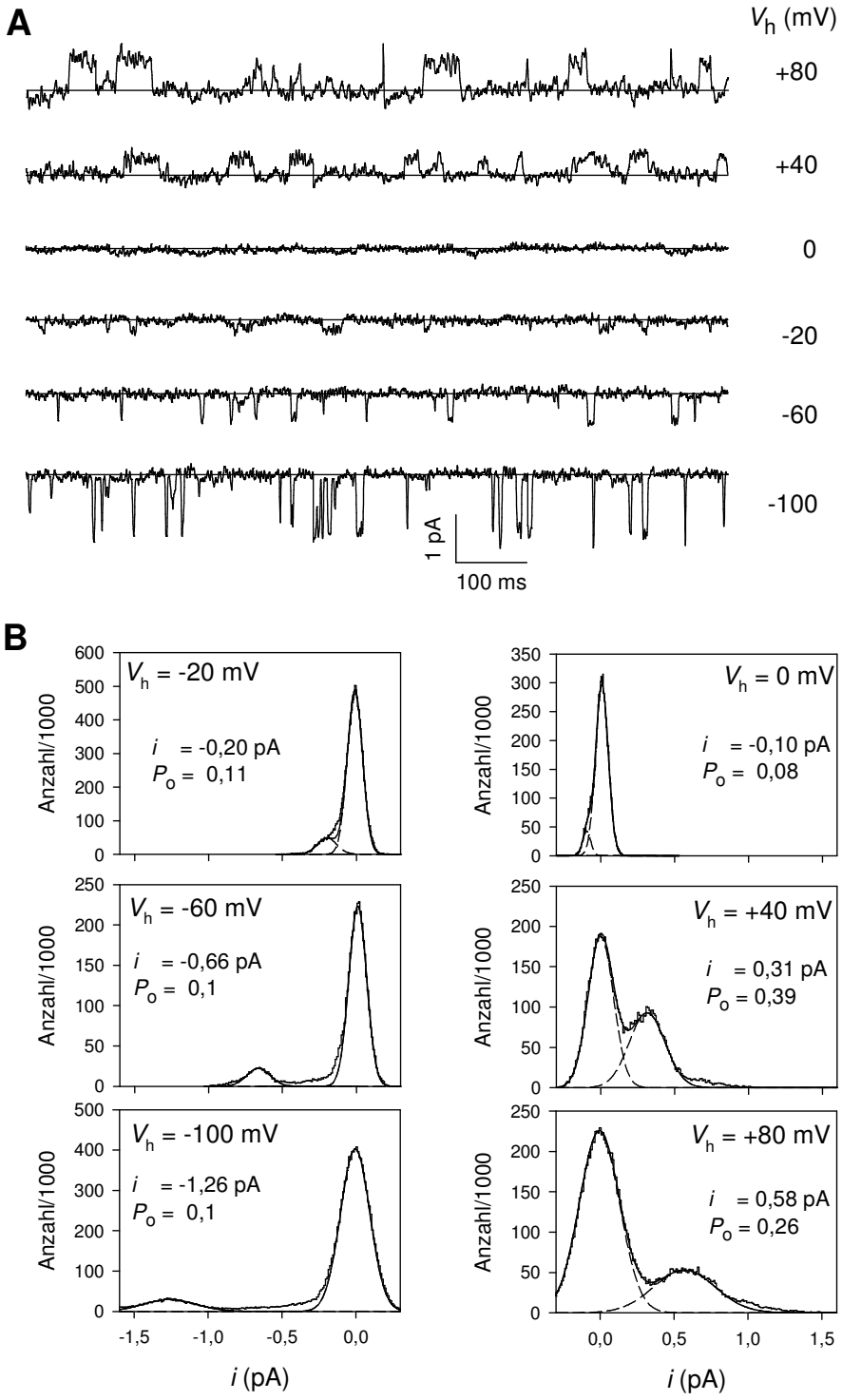


Abb. 4.9 Spannungsabhängigkeit der Stromamplitude und der Offenwahrscheinlichkeit (A) Ausschnitte aus Beispielregistrierungen eines Patches mit unterschiedlichen Haltepotenzialen V_h (B) zugehörige Amplitudenhistogramme mit angepassten Gaußkurven; $[ATP^{4-}] = 0{,}1$ mM

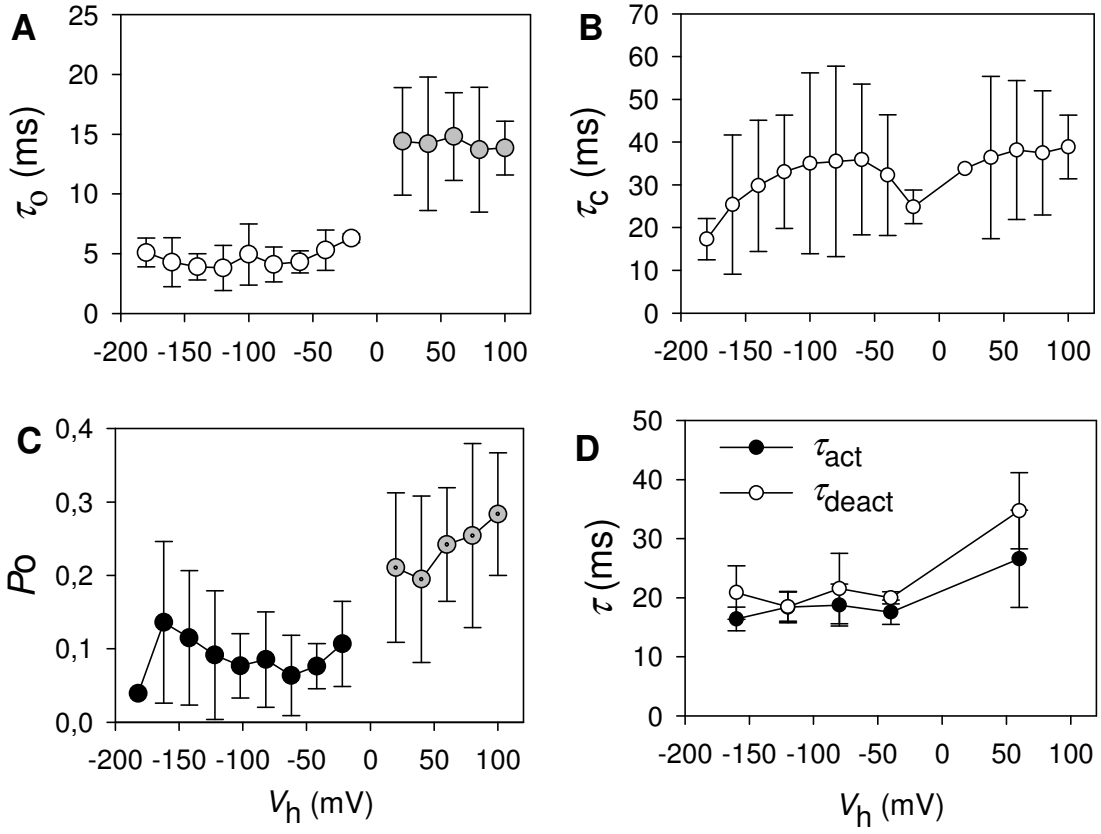


Abb. 4.10 Spannungsabhängige Kinetik der Ströme durch den P2X$_7$-Kanal. Mittlere Offen- τ_o (A), Geschlossenzeiten τ_c (B), Offenwahrscheinlichkeiten P_o (C) und Aktivierungs- bzw. Deaktivierungszeiten τ (D). N = 1 - 15 [ATP^{4-}] = 0,1 mM

4.5 Kinetik der Aktivierung und Deaktivierung

Die Kinetiken der Aktivierung bzw. Deaktivierung wurden unter Verwendung eines sehr schnellen Lösungswechselsystems, welches das Ein- bzw. Auswaschen innerhalb einer Millisekunde erlaubte, untersucht (siehe Kap. 3.5.3). Zur Aufnahme der globalen Zeitverläufe der P2X$_7$-Rezeptor-induzierten Ströme bei bestimmten ATP^{4-}-Konzentrationen wurden sowohl Multikanalpatches als auch gemittelte Ströme verschiedener Einzelkanalpatches oder Mittel mehrerer ATP^{4-}-Applikationen des gleichen Einzelkanalpatches verwendet. Da langandauernde, langsam deaktivierende Öffnungen in Na^+-Oozytenringerlösung nur unregelmäßig auftraten, wurden nur Patches ohne solche Öffnungen analysiert. Abb. 4.11 zeigt ein typisches Beispiel eines solchen Multikanalpatches. Die Aktivierung wurde nach Gl. (22) angepasst:

$$i_{act}(t) = i_{act,\infty,1} \cdot \left(1 - e^{-\frac{t - t_{del,act}}{\tau_{act,1}}}\right) + i_{act,\infty,2} \cdot \left(1 - e^{-\frac{t - t_{del,act}}{\tau_{act,2}}}\right) + s \cdot \left(t - t_{del,act}\right) + i_0 \qquad (22)$$

Darin sind $i_{act,\infty,1}$ und $i_{act,\infty,2}$ die Amplituden der Gleichgewichtsströme nach unendlich langer ATP^{4-}-Applikation und $\tau_{act,1}$ und $\tau_{act,2}$ die Aktivierungszeitkonstanten der langsam und der schnell aktivierenden Stromkomponenten. *s*, $t_{del,act}$ und i_0 haben die gleiche Bedeutung wie in (19). Der Zeitverlauf der Deaktivierung nach dem schnellen Auswaschen des ATP^{4-} wurde gemäß Gl. (23) angenähert:

$$i_{\text{deact}}(t) = i_{\text{deact},1} \cdot \mathrm{e}^{-\frac{t-t_{\text{del,deact}}}{\tau_{\text{deact},1}}} + i_{\text{deact},2} \cdot \mathrm{e}^{-\frac{t-t_{\text{del,deact}}}{\tau_{\text{deact},2}}} + i_0 \qquad (23)$$

i_0 und $t_{del,deact}$ entsprechen den Symbolen in (20), $i_{deact,\infty,1}$ und $i_{deact,\infty,2}$ sind die Anfangsamplituden und $\tau_{deact,1}$ und $\tau_{deact,2}$ die Zeitkonstanten der langsamen bzw. schnellen Deaktivierung. Die schnell aktivierenden und deaktivierenden Komponenten (Index 2) beschreiben das Verhalten der $P2X_7$-abhängigen Einzelkanalereignisse. Die langsam aktivierenden und deaktivierenden Ströme (Index 1) hatten Zeitkonstanten $\tau_{act,1}$ und $\tau_{deact,1}$ von etwa 300 ms und stellen die Aktivierung und Deaktivierung der unspezifischen Komponente dar (Kap. 4.1).

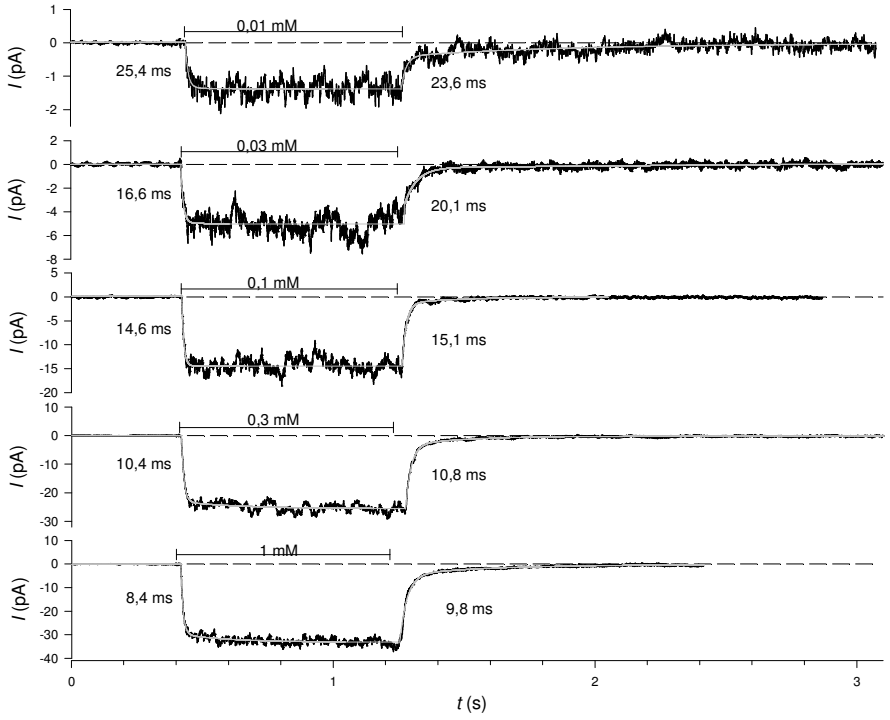


Abb. 4.11 Beispiele für die ATP^{4-}-Abhängigkeit der Aktivierung und Deaktivierung des Stroms. Es wurden jeweils die Ströme 3 - 12 wiederholter ATP^{4-}-Applikationen gemittelt (schwarze Linie). Die nach Gl. (22) und (23) angepassten Kurven sind grau gezeichnet. Die daraus ermittelten Zeitkonstanten sind jeweils neben den Kurven dargestellt. K^+-Pipettenlösung, V_h = -120 mV

Aufgrund ihrer ATP-Abhängigkeit (Abb. 4.3 C, D) wird die unspezifische Komponente allerdings erst bei hohen ATP^{4-}-Konzentrationen relevant, wie es bei

einem Vergleich der Ströme für 0,1 und 1 mM ATP^{4-} (Abb. 4.11) zu erkennen ist.

Die Abhängigkeiten der schnell aktivierenden und deaktivierenden Stromkomponente, welche die Einzelkanalaktivität widerspiegelt, von der ATP^{4-}-Konzentration, wurden genauer betrachtet (Abb. 4.13). Der Zeitverlauf des deaktivierenden Stroms war unabhängig von der ATP^{4-}-Konzentration (Abb. 4.13 B). Überraschenderweise wurde die Aktivierung durch Erhöhungen der ATP^{4-}-Konzentration nur wenig beschleunigt (Abb. 4.11, Abb. 4.13 A). Wäre die Bindung des ATP^{4-} der geschwindigkeitslimitierende Schritt bei der Kanalöffnung, sollte die Aktivierungsrate proportional zur ATP^{4-}-Konzentration ansteigen. Jedoch verursachte eine 300-fache ATP^{4-}-Konzentration nicht einmal eine Verdopplung der Aktivierungsrate ($R_{act} = 1 / \tau_{act,2}$) von 1/24 ms auf 1/14 ms (Abb. 4.13 A). Dies legt nahe, dass die Aktivierungskinetik des $P2X_7$-Kanals kaum durch die ATP^{4-}-Bindung, sondern wesentlich durch eine nachfolgende Konformationsänderung bestimmt wird.

4.6 Modellierung der $P2X_7$-Kinetik

Ein Modell der Öffnungskinetik des $P2X_7$-Rezeptors sollte sowohl das mikroskopische Verhalten (Verweilzeiten, d.h. Offen- und Geschlossenzeiten) als auch die Aktivierung und Deaktivierung $P2X_7$-induzierter makroskopischer Ströme beschreiben. Das einfachste kinetische Modell eines ligandengesteuerten Kanals besteht nur aus einem geschlossenen C (*closed*) und einem offenen Zustand O (*open*). Um der geringen Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierungsgeschwindigkeit von der ATP^{4-}-Konzentration Rechnung zu tragen, wurde das Modell zunächst um einen geschlossenen Zustand erweitert[64]. Dieses Modell enthält somit zwei unterschiedliche Vorgänge der Aktivierung von $P2X_7$: Die Bindung des Agonisten und die anschließende Öffnung des Kanals.

$$C_1 \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}\cdot[ATP^{4-}]}{\rightleftarrows}} C_2 \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\rightleftarrows}} O \qquad (24)$$

Darin sind k_{+1} und k_{-1} die Raten der ATP^{4-}-Bindung bzw. Dissoziation und β und α die Ratekonstanten der Kanalöffnung und des Schließens. Folgende Parameter wurden festgesetzt: $\alpha = 200\ s^{-1}$, um eine mittlere Offenzeit von 5 ms zu erhalten (Abb. 4.12 C), da $\tau_o = 1/\alpha$. Weiterhin wurde $\beta = 66\ s^{-1}$ gewählt, um eine maximale Offenwahrscheinlichkeit von 0,25 zu modellieren (Abb. 4.12 B) (für unendlich

große [ATP^{4-}] gilt $P_{o,max} = \beta/(\alpha+\beta)$). Schließlich wurden $k_{-1} = 50\ s^{-1}$ und $k_{+1} = 167\ mM^{-1}s^{-1}$ gewählt, um die mittlere Geschlossenzeit von 15 ms für große [ATP^{4-}] und eine Konzentration halbmaximaler Aktivierung (EC_{50}) von 0,3 mM zu simulieren.

Die Anwendbarkeit dieses Modells auf die vorhandenen Daten wurde mit Hilfe des Programms SCALCS geprüft. Dieses C-C-O Modell zeigte eine gute Übereinstimmung mit den Verweilzeiten, der Offenwahrscheinlichkeit und dem Aktivierungszeitverlauf. Jedoch war es mit diesem Modell nicht möglich die Deaktivierungszeitkonstante korrekt wiederzugeben. Aus diesem Grund wurde das Modell um einen weiteren geschlossenen Zustand mit einer weiteren ATP^{4-}-Bindungsstelle ergänzt. Für die beiden ATP^{4-}-Bindungsschritte wurden identische Raten angenommen (d.h. beide Bindungsstellen besaßen die gleiche Affinität zu ATP^{4-}). Es ergibt sich also ein Modell mit geschlossenen Zuständen ohne gebundenen Liganden (C_1), mit einem (C_2) bzw. zwei (C_3) gebundenen ATP^{4-} und einem offenen Zustand (O). Dabei ist es gleich, welche der beiden Bindungsstellen zuerst besetzt wird.

Die Ratekonstante k_{+1} in diesem Modell beträgt 320 $mM^{-1}s^{-1}$ alle anderen Ratekonstanten blieben unverändert.

$$C_1 \underset{k_{-1}}{\overset{2\cdot k_{+1}\cdot[ATP^{4-}]}{\rightleftarrows}} C_2 \underset{2\cdot k_{-1}}{\overset{k_{+1}\cdot[ATP^{4-}]}{\rightleftarrows}} C_3 \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\rightleftarrows}} O \qquad (25)$$

Daraus ergibt sich die folgende Ratekonstantenmatrix Q (26):

$$Q = \begin{pmatrix} -2k_{+1}[\mathrm{ATP}^{4-}] & 2k_{+1}[\mathrm{ATP}^{4-}] & 0 & 0 \\ k_{-1} & -k_{-1}-k_{+1}[\mathrm{ATP}^{4-}] & k_{+1}[\mathrm{ATP}^{4-}] & 0 \\ 0 & 2k_{-1} & -2k_{-1}-\beta & \beta \\ 0 & 0 & \alpha & -\alpha \end{pmatrix}$$

$$= \begin{pmatrix} -720[\mathrm{ATP}^{4-}] & 720[\mathrm{ATP}^{4-}] & 0 & 0 \\ 50 & -50-360[\mathrm{ATP}^{4-}] & 360[\mathrm{ATP}^{4-}] & 0 \\ 0 & 100 & -166 & 66 \\ 0 & 0 & 200 & -200 \end{pmatrix} \qquad (26)$$

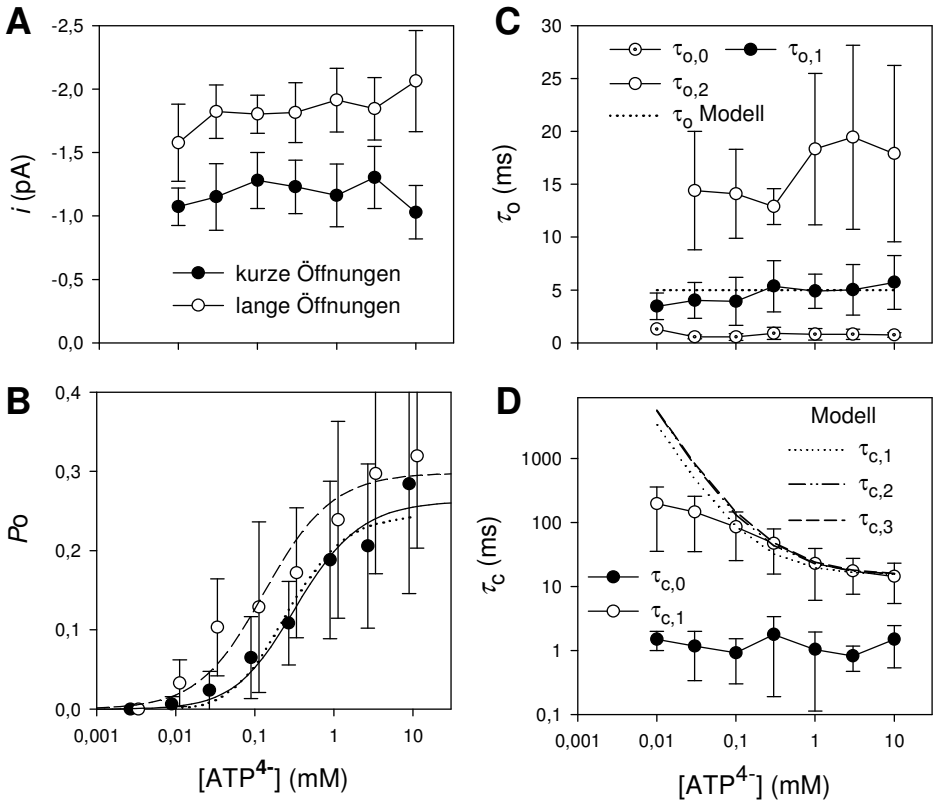


Abb. 4.12 [ATP^{4-}] Abhängigkeit der kurzen und langen Kanalöffnungen (A) Einzelkanalamplitude (B) Offenwahrscheinlichkeit angepasst nach Gl. **21** (C) mittlere Offenzeiten (0: ultrakurz, 1: kurz, 2: lang). (D) mittlere Geschlossenzeiten. Alle mittleren Offenzeiten und die kurzen Geschlossenzeiten sind unabhängig von der ATP^{4-}-Konzentration; Die Vorhersagen des C-C-C-O Modells sind als gepunktete Linien dargestellt; $N = 3$ - 18 von 3 – 13 Oozyten; K^+-Pipettenlösung; $V_h = -120$ mV

Die gepunkteten Kurven in Abb. 4.12 und Abb. 4.13 wurden unter Verwendung der angepassten Kinetikparameter des C-C-C-O Modells errechnet (SCALCS). Das Modell lieferte drei verschiedene Geschlossenzeiten (Abb. 4.12 D), welche allerdings so nah beieinander lagen, dass sie aufgrund der Streuung der Daten im Verweilzeit-Histogramm nicht zu trennen waren. Außerdem wurden drei Zeitkonstanten für die makroskopische Aktivierung und Deaktivierung vorhergesagt. Dabei war jedoch je eine Zeitkonstante so dominant, dass eine Näherung mit einer einfachen Exponentialgleichung eine ausreichend gute Näherung darstellte (s. Abb. 4.13 C). Die übrigen Zeitkonstanten bewirkten eine Verzögerung, die unterhalb der Auflösungsgrenze der verwendeten Messanordnung lag.

$$P_{\mathrm{o,act,model}}(t) = P_{\mathrm{o},\infty} \cdot \left(1 - \mathrm{e}^{\frac{t - t_{\mathrm{del,act}}}{\tau_{\mathrm{act,2,model}}}} \right) \qquad (27)$$

$$P_{\mathrm{o,deact,model}}(t) = P_{\mathrm{o},\infty} \cdot \mathrm{e}^{-\frac{t-t_{\mathrm{del,deact}}}{\tau_{\mathrm{deact,2,model}}}} \tag{28}$$

Darin sind $P_{O,\infty,model}$ die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals nach unendlich langer ATP^{4-}-Applikation und $\tau_{act,2,model}$ und $\tau_{deact,2,model}$ die Zeitkonstanten der schnellen Aktivierung bzw. Deaktivierung der P2X$_7$-Rezeptor abhängigen Ströme. Abb. 4.13 C zeigt, dass sich auf diese vereinfachte Weise die vom C-C-C-O-Modell vorausgesagten triexponentiellen Zeitverläufe der Aktivierung und Deaktivierung sehr gut beschreiben lassen. Die ATP^{4-}-Abhängigkeit dieser Zeitkonstanten ist in (Abb. 4.13 A,B) dargestellt.

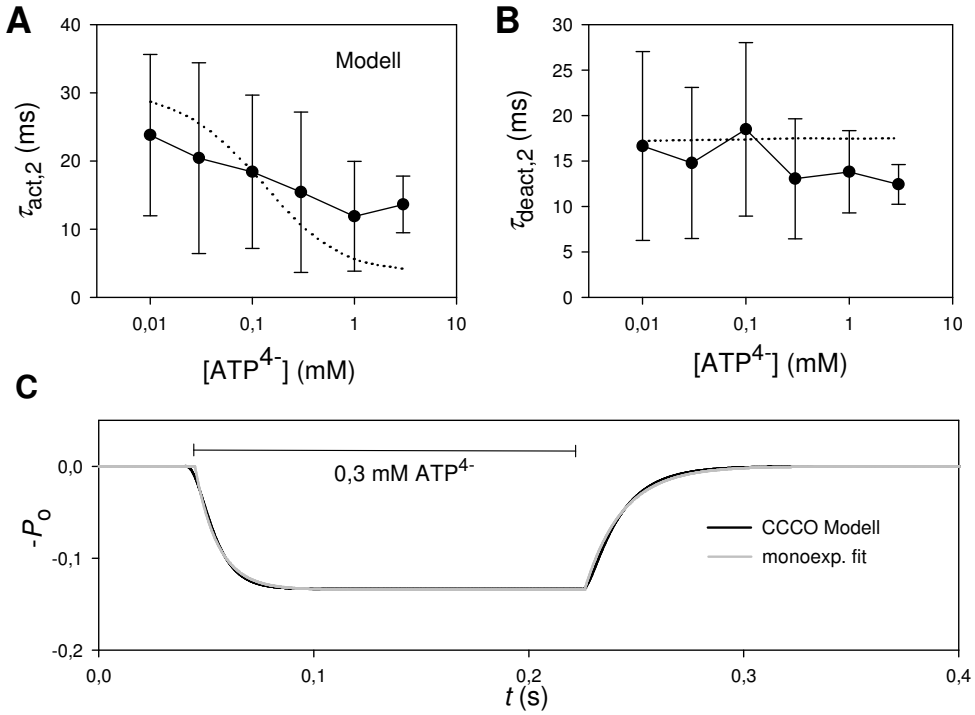


Abb. 4.13 Abhängigkeit der Aktivierung und Deaktivierung von der ATP^{4-}-Konzentration (A) und (B) Aktivierungs- und Deaktivierungszeiten. schwarz: experimentelle Daten; gepunktet: Vorhersagen des Modells. (C) Offenwahrscheinlichkeiten eines P2X$_7$-Kanals für 0,3 mM ATP^{4-}

4.7 Kanalkinetik in *cell-attached*-Konfiguration einer intakten Oozyte

Durch die *outside-out*-Konfiguration wurde die natürliche Intrazellularlösung durch die Pipettenlösung ersetzt. Um den Effekt des Auswaschens intrazellulärer Moleküle auf die Funktion des P2X$_7$-Rezeptors zu untersuchen, wurden ATP^{4-}-induzierte Ströme in P2X$_7$- exprimierenden *Xenopus*-Oozyten in der *cell-attached*-Konfiguration aufgenommen. Dazu wurde die Patchpipette mit der 0,1 bzw. 0,3 mM ATP-haltigen Ringerlösung gefüllt, die sonst durch das U-Rohr appliziert wurde. Die Patchpipette wurde so auf die Oozyte aufgesetzt, dass sich

ein *Gigaseal* ausbildete, ohne die Zelle zu verletzen (Abb. 3.4 B). Da es bei dieser Methode nicht möglich ist, in der extrazellulären Lösung ATP^{4-} ein- oder auszuwaschen, wurden die von $P2X_7$-Rezeptoren verursachten Ströme anhand ihrer charakteristischen Einzelkanaleigenschaften identifiziert.

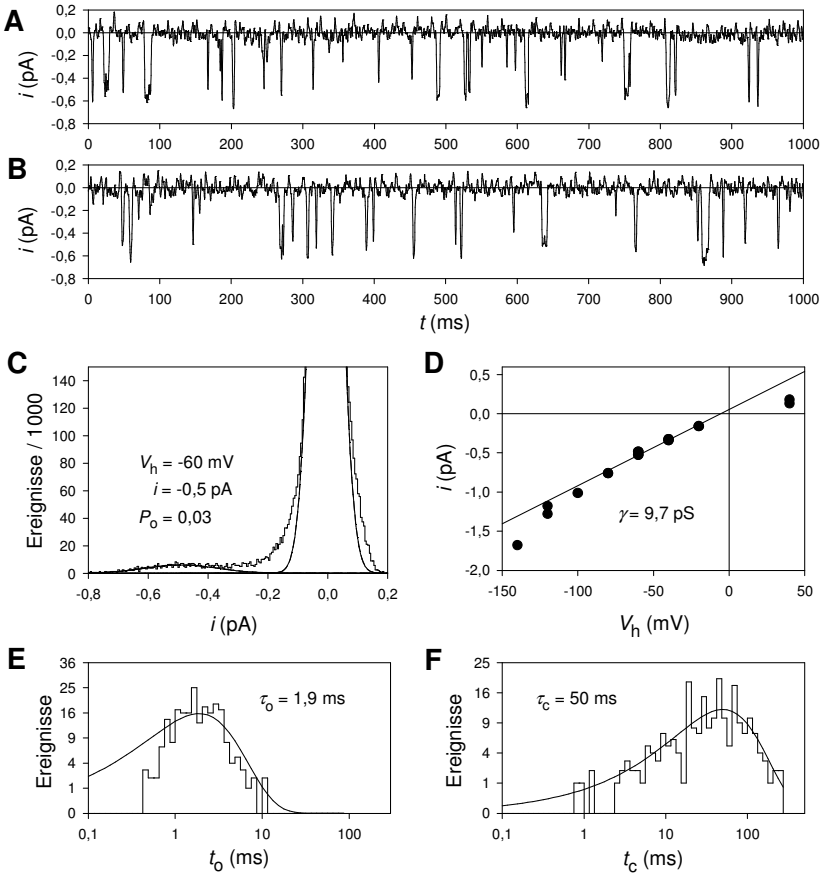


Abb. 4.14 Verhalten $P2X_7$-induzierter Ströme in einer intakten Oozyte in *cell-attached*-Konfiguration Als Pipettenlösung wurde die sonst über das U-Rohr applizierte Lösung (ORi 0,5 mM Ca^{2+}) mit 0,1 mM ATP^{4-} verwendet. Die Beispiele wurden (A) 3 und (B) 10 Minuten nach Ausbildung des *gigaseals* aufgenommen. V_h = -60 mV (C) Stromamplitudenhistogramm (10 min < t < 10,5 min) (D) *I-U*-Abhängigkeit des Einzelkanalstromes. (E, F) Offen- bzw. Geschlossenzeithistogramm (10 min < t < 10,5 min)

In Abb. 4.14 ist ein typisches Beispiel einer solchen Aufnahme abgebildet. Das Fehlen überlappender Kanalöffnungen deutet darauf hin, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit nur ein aktiver Kanal im Patch enthalten war (siehe 3.8). Die gemessenen Werte für Leitfähigkeit, Verweilzeiten, Offen- und Geschlossenwahrscheinlichkeit (Abb. 4.12 C, D) lagen innerhalb der Standardabweichung der entsprechenden *outside-out*-Experimente. Die Charakteristik der Einzelkanalöffnungen änderte sich über die gesamten 20 Minuten, in denen der Patch intakt blieb, nicht. Aus den insgesamt 5 *cell-attached*-Patches mit 0,1 mM ATP^{4-} wurden Offen- und Geschlossenzeiten von 3,9 ± 2,3 ms bzw. 44 ± 12 ms bestimmt,

die nicht signifikant von den gemessenen Werten bei 0,1 mM ATP^{4-} in der *outside-out*-Konfiguration (Abb. 4.12 C,D) abwichen.

4.8 Permeabilität für verschiedene Moleküle

Zur Bestimmung der Permeationscharakteristik des $P2X_7$-Rezeptors wurden Ströme durch *outside-out*-Patches in Extrazellulärlösungen mit 0,1 und 1 mM ATP^{4-} und verschiedenen monovalenten Kationen gemessen.

Dies geschah zunächst anhand von Spannungsrampen im Bereich von -160 bis +60 mV. Die in Abb. 4.15 dargestellten Beispielregistrierungen lassen die Abnahme der Einzelkanalleitfähigkeit und die Verschiebung des Umkehrpotenzials durch große Kationen direkt erkennen.

Die größte Einzelkanalleitfähigkeit wurde bei Na^+ mit ca. 11 pS beobachtet. Für größere Ionen war eine tendenzielle Abnahme der Einzelkanalleitfähigkeit mit steigendem Durchmesser zu verzeichnen (Abb. 4.16, Abb. 4.17). Eine Ausnahme stellt das Lithiumion dar. Trotz seines kleineren Durchmessers ist die Leitfähigkeit für Li^+ nur etwa halb so hoch wie die der Natriumionen. Das größte betrachtete Ion war Tetraethylammonium$^+$ (TEA^+), da sich zum einen die TEA^+-abhängigen Ströme nahe der Auflösungsgrenze bewegten und zum anderen die Applikation des noch größeren Kations Tetrabutylammonium$^+$ (TBA^+) zu einer raschen Zerstörung des Patches innerhalb von ca. 10 Sekunden führte.

Eine Vergrößerung der Ionendurchmesser über 4 Å führte zu einer sukzessiven Verschiebung des Umkehrpotenzials zu negativeren Werten (Abb. 4.15, Abb. 4.18).

Eine Extrapolation der Einzelkanalleitfähigkeit auf $\gamma = 0$ ergab einen Kanalporendurchmesser von 8,5 Å (Abb. 4.17).

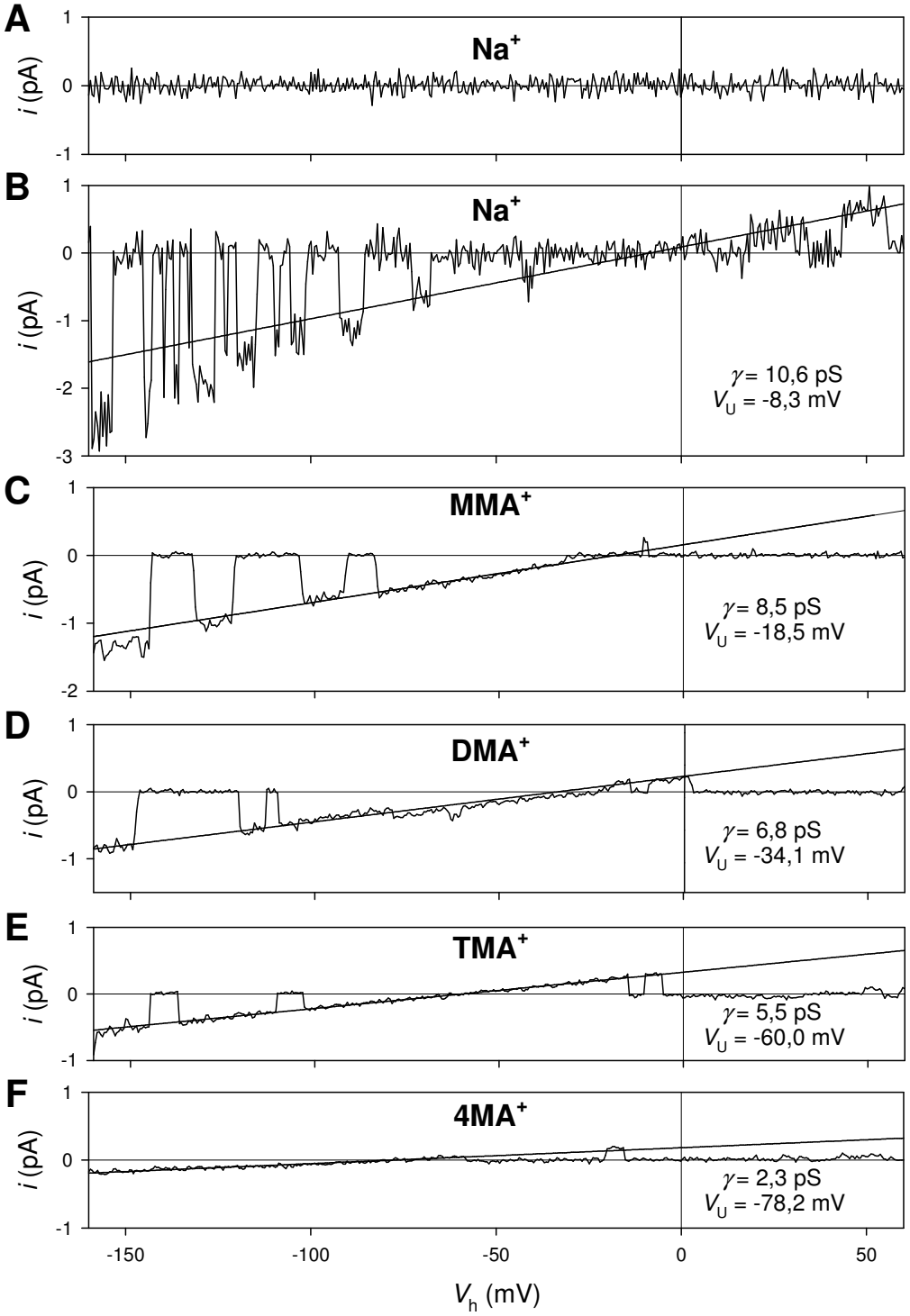


Abb. 4.15 P2X$_7$-abhängige Ströme in verschiedenen extrazellulären Lösungen Beispielregistrierungen für Spannungsrampen von –160 bis +60 mV innerhalb 1 s. (A) vor, (B) bis (F) während der Applikation von 1 mM ATP^{4-}. Die Geraden repräsentieren die lineare Regression des Stroms durch den geöffneten Kanal im Bereich von ±50 mV um das Umkehrpotenzial V_U. Extrazellulärlösung: XORi 0,5 mM Ca^{2+}; (X = Kation wie in Abb. angegeben) Cs^+-Pipettenlösung; Filter 1000 Hz (A, B) bzw. 100 Hz (C - F)

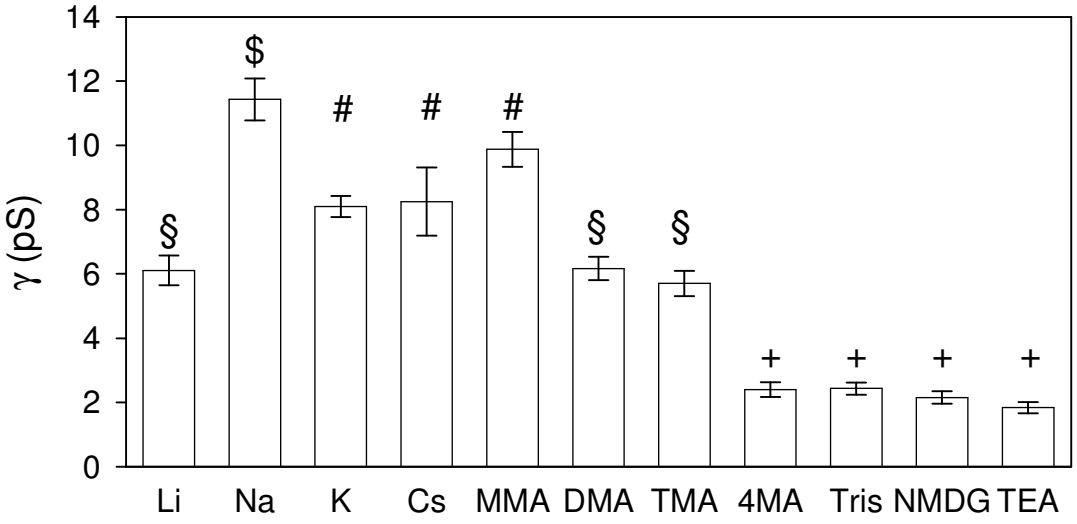


Abb. 4.16 Einzelkanalleitfähigkeiten für die untersuchten Ionen V_h = -140mV, [ATP^{4-}] = 0,1 mM, N = 3 bis 15; unterschiedliche Symbole bezeichnen signifikant verschiedene Stromamplituden.

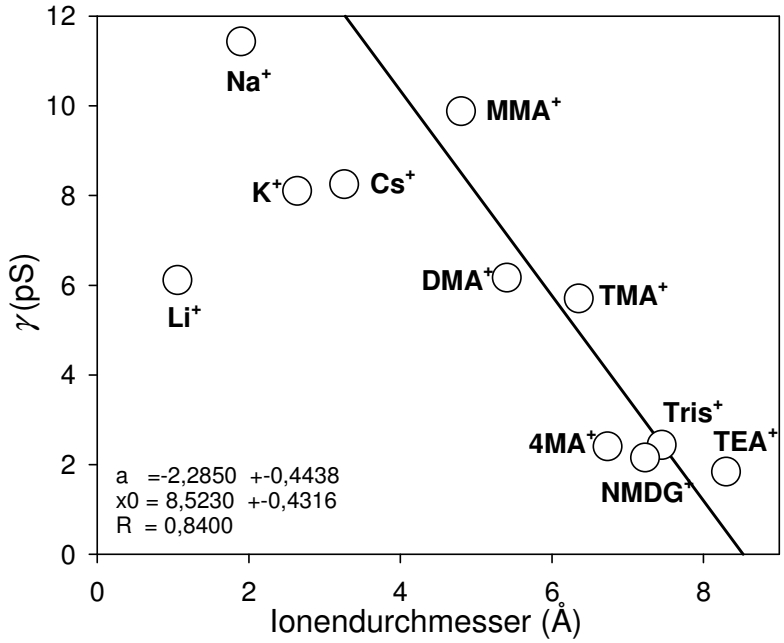


Abb. 4.17 Einzelkanalleitfähigkeit in Abhängigkeit des effektiven Ionendurchmessers Die durchgezogene Linie entspricht der Regressionsgeraden (MMA bis TEA), welche zur Extrapolation des Porendurchmessers verwendet wurde.

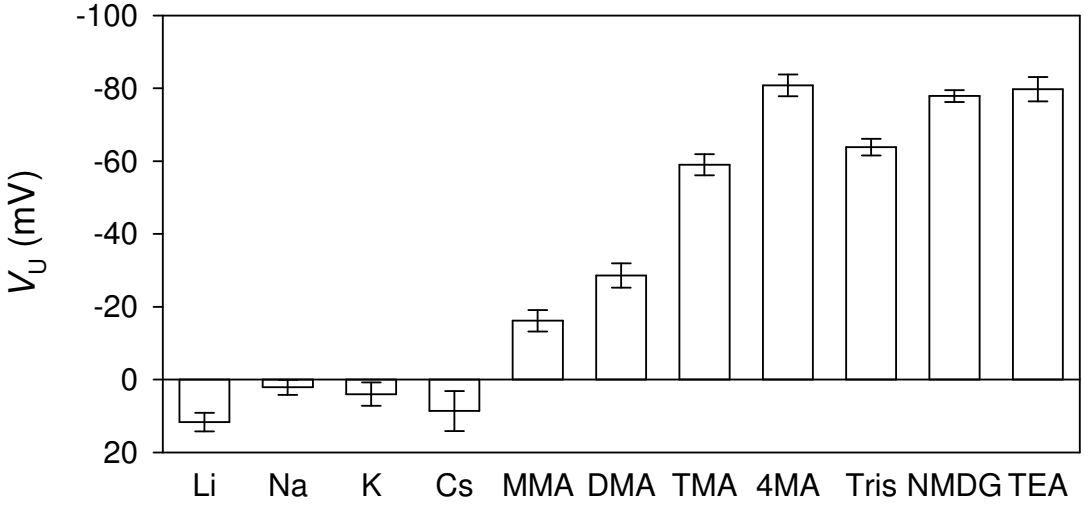


Abb. 4.18 **Einfluss des extrazellulären Kations auf das Umkehrpotenzial** Die Bestimmung des Umkehrpotenzials erfolgte wie in Abb. 4.15 gezeigt (Mittelwerte ± SEM, $N = 3$ bis 15)

4.9 Einfluss des extrazellulären Kations auf das Schaltverhalten des Einzelkanals

Abb. 4.19 zeigt typische Beispiele ATP^{4-}-induzierter Einzelkanalströme in Badlösungen mit verschiedenen monovalenten Kationen bei konstantem Haltepotenzial. Unabhängig von der veränderten Stromamplitude war eine drastische Verlängerung der Offenzeiten zu beobachten, wenn Na^+ durch ein anderes monovalentes Kation ersetzt wurde.

Zur genaueren Betrachtung dieses Effektes wurden die mittleren Offen- und Geschlossenzeiten des Kanals ausgewertet (Abb. 4.21, Abb. 4.22). Die Offenwahrscheinlichkeit, die Einzelkanalleitfähigkeit und das Umkehrpotenzial änderten sich bei keinen der verwendeten extrazellulären Kationen *t* während ATP^{4-}-Applikation von mehr als 30 s Dauer. Beispielhaft sind in Abb. 4.19 Registrierungen direkt am Beginn der ATP^{4-}-Applikation (0,1 mM) und 30 s danach für 100 mM $NMDG^+$-haltige Badlösung dargestellt.

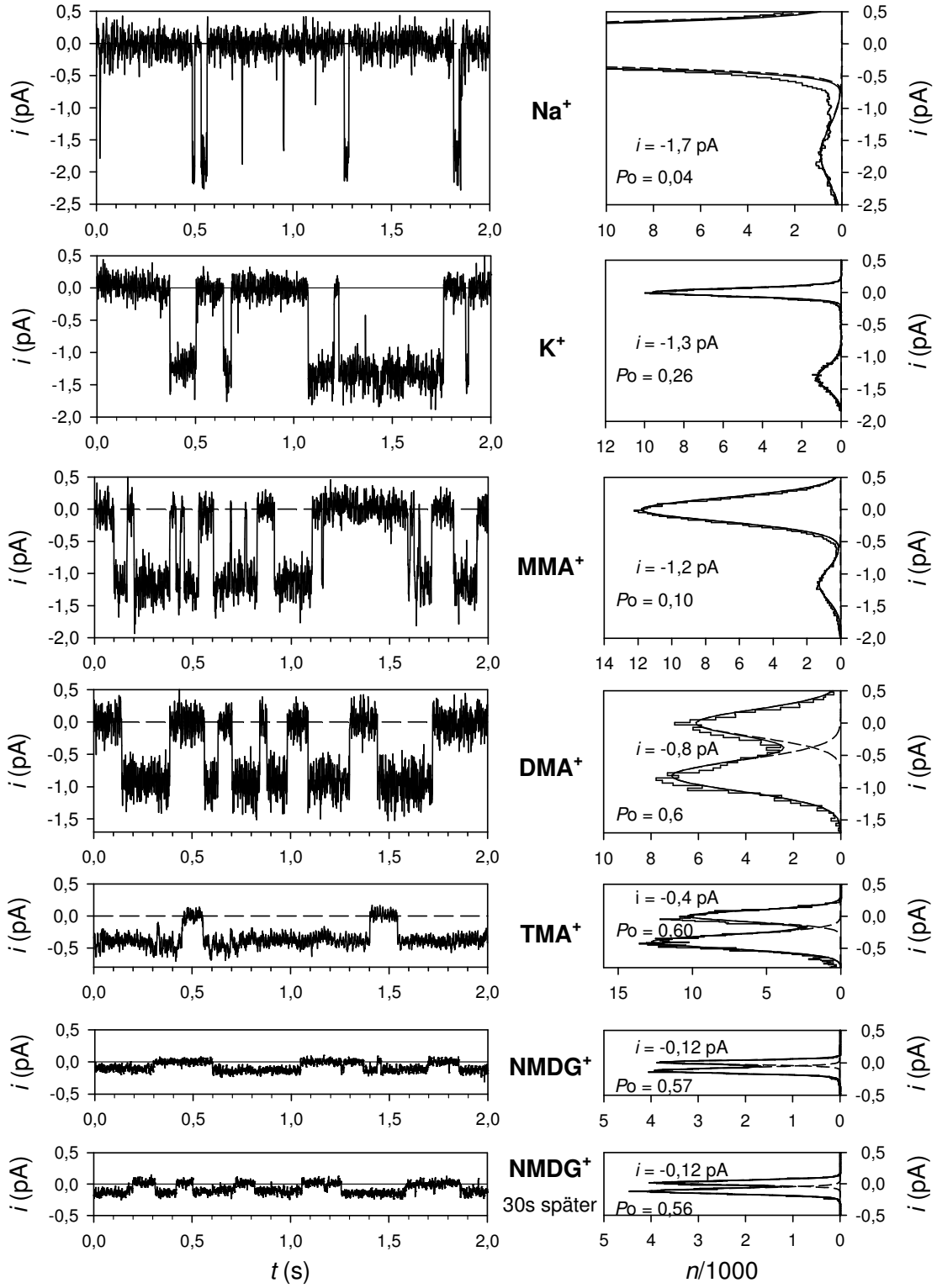


Abb. 4.19 Einzelkanalregistrierungen in Abhängigkeit der Extrazellulärlösung (nach Abzug der Leck- und unspezifischen Komponenten) V_h = -140 mV, [ATP^{4-}] = 0,1 mM, Filter: 1 kHz (Na^+, K^+, MMA^+, DMA^+), 300 Hz (TMA^+) bzw. 100 Hz $NMDG^+$; links: Beispielmessungen, rechts: zugehöriges Amplitudenhistogramm

In Abb. 4.23 sind Beispiele für die Kanaloffen- und Geschlossenzeiten für Badlösungen mit 0,3 und 100 mM Na^+ abgebildet, als Austauschion wurde K^+ verwendet. In Lösungen, welche Na^+ und K^+ enthielten, wurden sowohl kurze als auch lange Kanalöffnungen beobachtet. Die statistische Auswertung zeigt, dass die Verlängerung der Offenzeiten τ_o dabei unabhängig von der ATP^{4-}-Konzentration ist (Abb. 4.26 C). Auch die Einzelkanalleitfähigkeit wurde, wie schon bei der Na^+-Außenlösung, nicht von der ATP^{4-}-Konzentration beeinflusst (Abb. 4.26 A). Die Offenwahrscheinlichkeit stieg jedoch bei allen Kationen (exemplarisch für Na^+ in Abb. 4.12 B und K^+ in Abb. 4.26 B) mit steigender ATP^{4-}-Konzentration.

Im einfachsten Fall und entsprechend des verwendeten Modells (25) besitzen alle Bindungsstellen die gleiche ATP^{4-}-Affinität und es besteht keine Interaktion zwischen ihnen. Die ATP^{4-}-Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit in Na^+-freier Lösung kann dann wie in Na^+-haltigen Extrazellulärlösung nach Gleichung 20 angenähert werden. Die Approximation für K^+-haltige Extrazellulärlösung ergab einen Hillkoeffizienten n von $1{,}6 \pm 0{,}2$, welcher sich nicht signifikant von dem in natriumhaltiger Lösung unterschied. Die maximale Offenwahrscheinlichkeit $P_{o,\infty}$ von $0{,}86 \pm 0{,}01$ und der $\log K_d$ von $-4{,}36 \pm 0{,}09$ unterschieden sich jedoch deutlich von denen in Na^+-Extrazellulärlösung (Abb. 4.12 B).

Die ATP^{4-}-abhängige Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit wurde auch in diesem Fall durch eine ATP^{4-}-abhängige Verkürzung der mittleren Geschlossenzeiten τ_c bedingt (Abb. 4.22, Abb. 4.26 C). Die mittleren Geschlossenzeiten entsprachen denen in Na^+-haltiger Lösung. Für die Messungen in K^+-haltigen Lösungen wurden längere Traces verwendet, welche zu einer scheinbaren Verlängerung der Geschlossenzeiten führen können, da die Tracelänge die maximal mögliche gemessene Verweilzeit begrenzt. Diese Anpassung der Tracelänge war zur Erfassung der deutlich längeren Offenzeiten notwendig.

Der Austausch des Na^+ gegen andere monovalente Kationen reduzierte die Einzelkanalleitfähigkeit, wenn große Ionen verwendet wurden. (Abb. 4.16). Während bei Na^+-haltiger Außenlösung vorwiegend kurze Kanalöffnungen von etwa 5 ms beobachtet wurden, stiegen die Offenzeiten bei Austausch von Na^+ gegen andere monovalente Kationen drastisch bis auf 260 ms für $Tris^+$ an.

Die Geschlossenzeiten dagegen wurden vom extrazellulären Kation nicht signifikant beeinflusst. Nur bei Cs^+ wurde keine signifikante Erhöhung der Offenwahr-

scheinlichkeit (Abb. 4.20) beobachtet, da hier neben der Verlängerung der Offenzeiten (Abb. 4.21) auch eine Verlängerung der Geschlossenzeiten (Abb. 4.22) auftrat.

Aufgrund dieser Daten ist die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des $P2X_7$-Rezeptors in Na^+-freien Extrazellulärlösungen auf eine verlängerte Offenzeit, nicht aber auf eine Änderung der Geschlossenzeiten zurückzuführen.

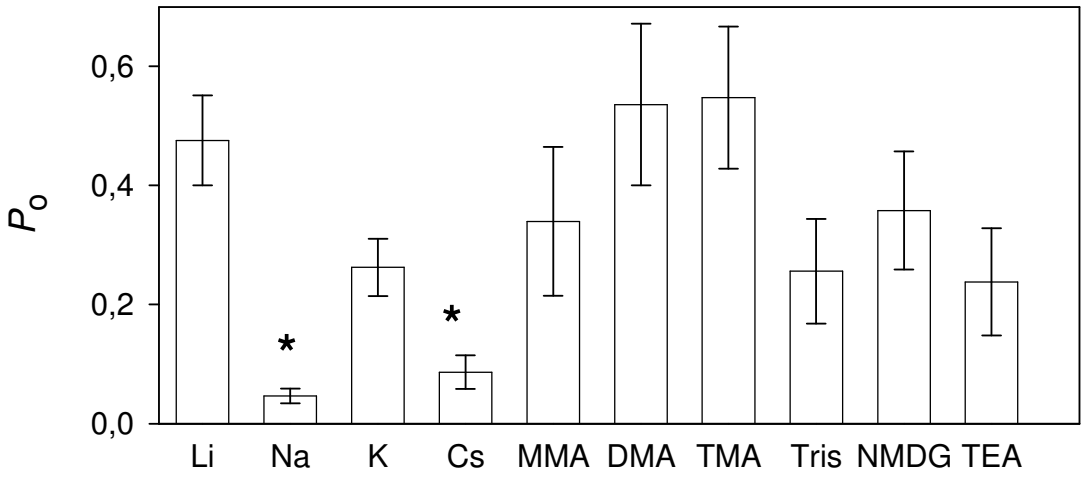


Abb. 4.20 Offenwahrscheinlichkeit des $P2X_7$-Kanals in Abhängigkeit vom extrazellulären Kation V_h = -140mV, $[ATP^{4-}]$ = 0,1 mM

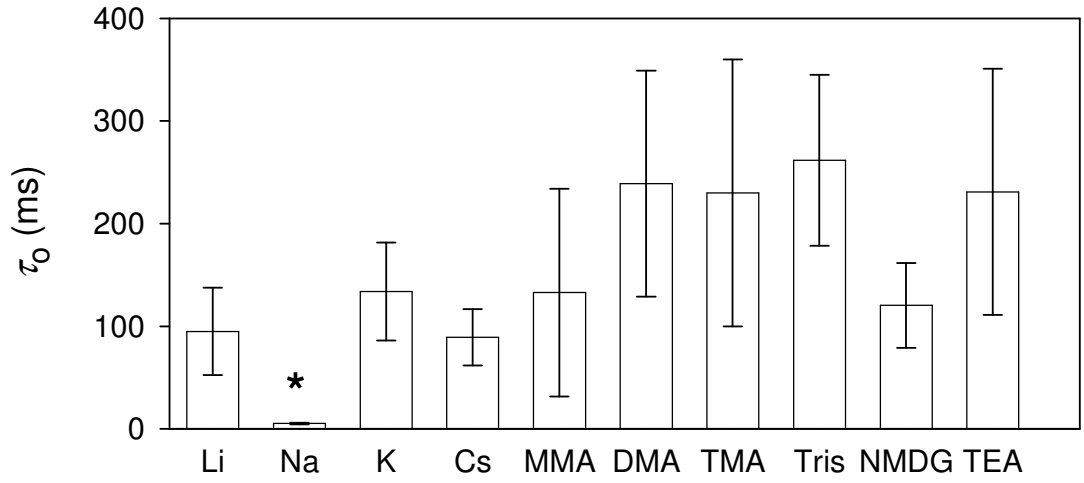


Abb. 4.21 Mittlere Offenzeiten des $P2X_7$-Kanals in Abhängigkeit vom extrazellulären Kation V_h = -140 mV, $[ATP^{4-}]$ = 0,1 mM

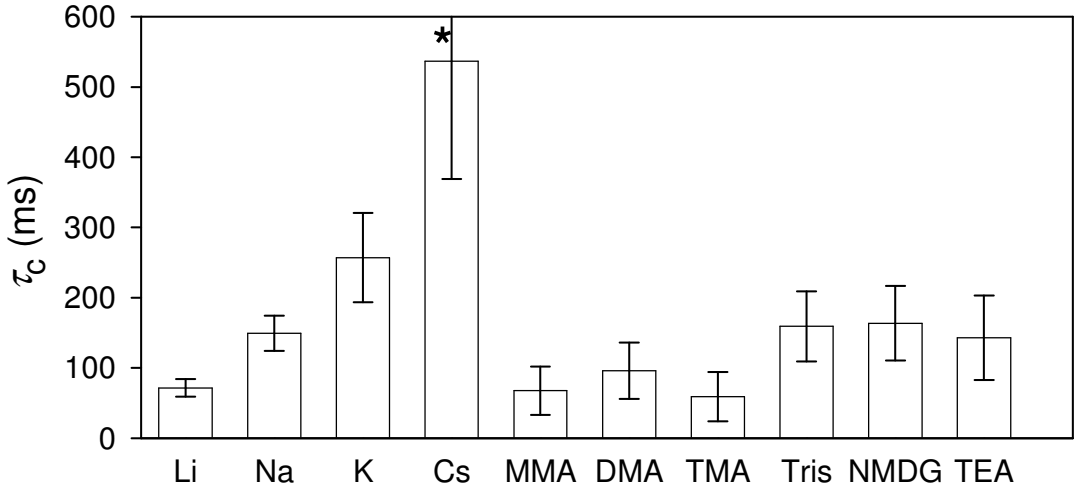


Abb. 4.22 Mittlere Geschlossenzeiten des P2X$_7$-Kanals in Abhängigkeit vom extrazellulären Kation V_h = -140 mV, [ATP^{4-}] = 0,1 mM

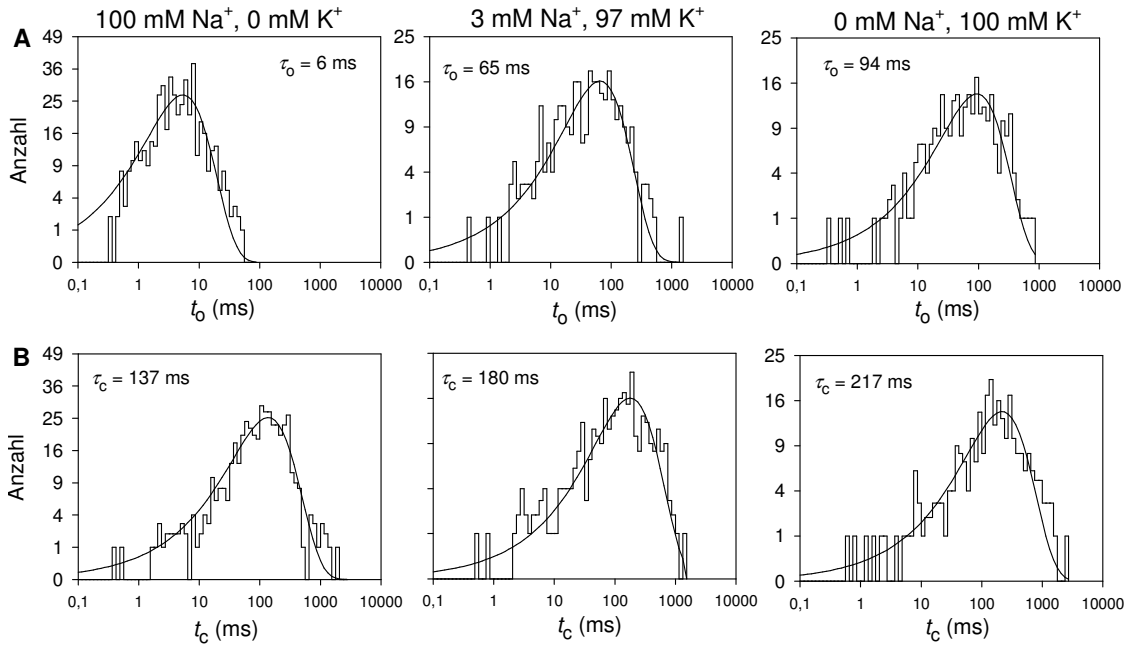


Abb. 4.23 Einfluss der extrazellulären Na$^+$-Konzentration auf die P2X$_7$-Kinetik (Einzelkanalpatch) (A) Offenzeithistogramm, (B) Geschlossenzeithistogramm Na$^+$ wurde schrittweise durch K$^+$ ersetzt. Alle Beispiele stammen vom gleichen Patch. V_h = -120 mV, [ATP^{4-}] = 0,1 mM, K$^+$-Pipettenlösung

4.10 Beeinflussung der makroskopischen Kinetik durch extrazelluläre Kationen

Wird ATP^{4-} appliziert, traten unabhängig vom Vorhandensein von Na$^+$ P2X$_7$-abhängige Kanalöffnungen auf (Abb. 4.24 A,B). Beim anschließenden Auswaschen zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Kanalkinetik. Während beim Ausspülen mit Na$^+$-haltiger Badlösung die Kanalaktivität sofort stoppte,

öffnete und schloss der Kanal beim Ausspülen mit Na^+-freier Badlösung z. T. noch über mehrere Sekunden (Abb. 4.24 B). Dies geschah unabhängig vom Na^+-Gehalt der Lösung während der ATP^{4-}-Applikation.

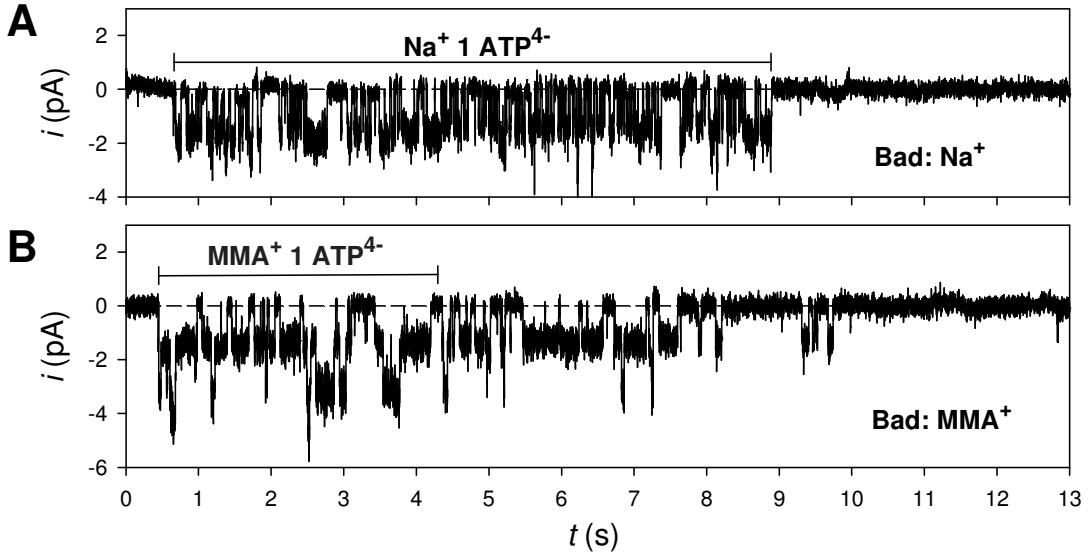


Abb. 4.24 Einfluss des extrazellulären Kations auf Kanalöffnungen während und nach der Applikation von 1 mM ATP^{4-} Gut zu erkennen ist das unterschiedliche Verhalten der Einzelkanäle bei der Deaktivierung in (A) Na^+- und (B) MMA^+-haltiger Außenlösung. Beide Beispielregistrierungen sind vom gleichen Patch.

Für die genauere Untersuchung des Schaltverhaltens unter Na^+-Mangel wurde K^+ als Austauschion gewählt. Die Wirkung des Austausches des extrazellulären Na^+ gegen K^+ wurde anhand makroskopischer Ströme von Multikanalpatches bzw. bei Patches mit wenigen Kanälen durch Mittelung der Antworten mehrerer ATP^{4-}-Applikationen untersucht. Die Zeitverläufe der Aktivierung wurden nach Gleichung (22) und die der Deaktivierung nach dem Auswaschen des ATP^{4-} entsprechend Gleichung (23) angenähert.

Die Amplitude der unspezifischen Komponente, deren Aktivierungs- und Deaktivierungskonstante bei ca. 300 ms lag (s. Kap. 4.1), war mit wenigen pA im Allgemeinen klein im Vergleich zu Kanalkomponente, (Abb 4.25 A und C) (s. Kap 4.5).

Die Beispiele der Multikanalpatches in Abb. 4.25 zeigen, dass das Ersetzen von Na^+ durch K^+ sowohl die Aktivierung als auch die Deaktivierung des Kanals verzögerte. Die unspezifische Komponente spielte nur in (A) eine wesentliche Rolle, da nur hier sowohl die Kanalkomponente klein als auch die Kanal-Deaktivierung schnell war.

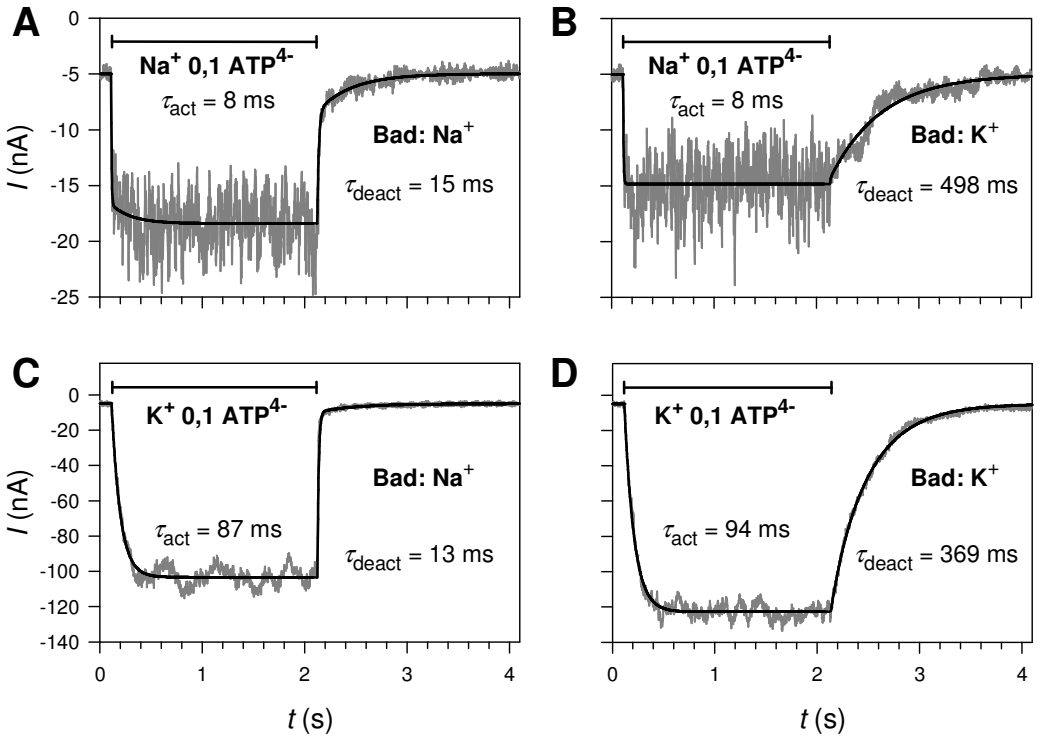


Abb. 4.25 Aktivierungs- und Deaktivierungszeiten in Na^+-haltiger und Na^+-freier (K^+-haltiger) Außenlösung grau: Gemittelte Kurven von je zwei Registrierungen eines Multikanalpatches; schwarz: Anpassung nach **(22)** und **(23)**

Die statistische und quantitative Auswertung ist in Abb. 4.27 dargestellt. Es zeigte sich, dass der schrittweise Austausch von Na^+ gegen K^+ die mittlere Einzelkanalamplitude nicht signifikant änderte (Abb. 4.27 A). Zu beachten ist, dass, obwohl die Einzelkanalleitfähigkeit des $P2X_7$-Rezeptors (i) für andere Ionen als Na^+ zum Teil deutlich geringer ist, in natriumfreier Lösung in Folge der höheren Offenwahrscheinlichkeit dennoch größere Ganzzellströme (I_{Zelle}) auftreten können, da:

$$I_{Zelle}\left(\mathrm{Ion},\left[\mathrm{ATP}^{4-}\right]\right) = i\left(\mathrm{Ion}\right)\cdot N_{P2X_7}\cdot P_o\left(\mathrm{Ion},\left[\mathrm{ATP}^{4-}\right]\right) \qquad (29)$$

i(Ion): Einzelkanalstromstärke; N_{P2X7}: Anzahl der $P2X_7$-Kanäle; P_o: Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals

Zum Ausgleich der variierenden Expression des Kanals wurden die durch $P2X_7$-Rezeptoren induzierten makroskopischen Multikanalströme $I([Na])$, welche durch 0,1 mM ATP^{4-} in Badlösungen verschiedener Na^+-Konzentrationen verursacht wurden, auf den Strom $I([0])$, welcher in einer Na^+-freien Lösung mit 100 mM K^+ floss, normiert. Die Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 4.27 C) wurde durch Gleichung (30) angenähert:

$$I_{rel}(\mathrm{Na}^+) = \frac{I([\mathrm{Na}])}{I([0])} = \frac{1 - I_{rel,min}}{1 + \left(\frac{10^{-\log EC_{50}}}{[\mathrm{Na}^+]} \right)^{\mathrm{n}}} + I_{rel,min} \qquad (30)$$

Darin ist $I_{rel,\,min}$ der minimale relative durch $P2X_7$-Rezeptoren verursachte Strom, welcher in 100 mM Na^+-Lösung ohne K^+ auftrat, EC_{50} (in mM) ist die Konzentration der halbmaximalen Na^+-abhängigen Stromaktivierung. Bei einem Haltepotenzial von V_h = -120 mV wurde ein log(EC_{50}) von (–2,24 ± 0,03) und ein Hill-Koeffizient n von 1,2 ± 0,1 ermittelt. Der Effekt des Na^+ wurde auf Spannungsabhängigkeit überprüft. Für ein Haltepotenzial von V_h = -50 mV wurde ein signifikant abweichender log(EC_{50}) von -1,94 ± 0,06 ermittelt. Der Hill-Koeffizient n blieb mit 1,1 ± 0,2 jedoch vom Haltepotenzial unbeeinflusst.

Ebenso waren die mittleren Offenzeiten τ_o (Abb. 4.27 C) und die Zeitkonstanten der Aktivierung der ATP^{4-}-abhängigen Summenströme (Abb. 4.27 E) stark von der extrazellulären Na^+-Konzentration abhängig. Diese Abhängigkeit wurde mittels Gleichung (31) angenähert:

$$\tau(Na^+) = \frac{\tau_{max} - \tau_{min}}{1 + \left(\frac{10^{-\log EC_{50}}}{[\mathrm{Na}^+]} \right)^{\mathrm{n}}} + \tau_{min} \qquad (31)$$

Sowohl die logEC_{50} Werte mit (–2,24 ± 0,02) mM als auch die Koeffizienten (-1,2 ± 0,1 für τ_o bzw. 1,3 ± 0,2 für τ_{act}) waren nicht signifikant verschieden von denen in Na^+-haltiger Lösung.

Die mittleren Geschlossenzeiten zwischen den Kanalöffnungen wurden von der extrazellulären Na^+-Konzentration nicht beeinflusst (Abb. 4.27 D). Der Deaktivierungszeitverlauf verlangsamte sich jedoch signifikant, wenn während des Auswaschens des ATP^{4-} K^+-haltige, statt Na^+-haltiger Badlösung verwendet wurde (Abb. 4.27 F).

Diese verlangsamte Deaktivierung des Kanals lässt sich im C-C-C-O Modell (25) durch eine natriumabhängige Reduktion der Ratekonstante α, welche den Übergang von O nach C_3, beschreibt simulieren. Die Simulationsergebnisse für α = 1,9 mM^{-1} s^{-1}*[Na^+]+8 s^{-1} sind in Abb. 4.26 B-D und Abb. 4.27 B-E den experimentellen Befunden gegenübergestellt. Der zusätzliche Term 8 s^{-1} trägt der Tatsache Rechnung, dass der Kanal auch in vollkommen Na^+-freier Umgebung in der Lage ist zu schließen.

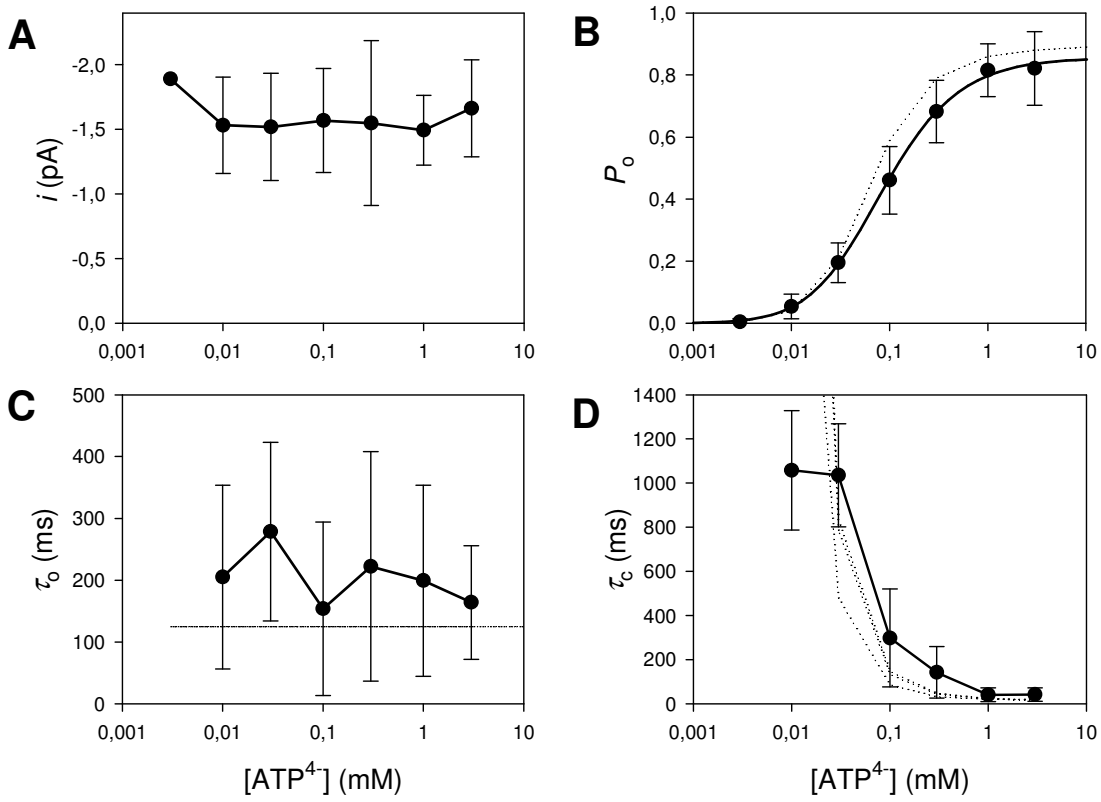


Abb. 4.26 [ATP^{4-}]-abhängiges Verhalten einzelner $P2X_7$-Kanäle in natriumfreier K^+-Lösung (A) Einzelkanalamplitude, (B) Offenwahrscheinlichkeit angepasst nach Gl. (21), (C) mittlere Offenzeit, (D) mittlere Geschlossenzeit ; $N = 3$ bis 6, K^+-Pipettenlösung,, V_h = -120 mV. Die gepunkteten Linien geben die Vorhersagen des in Kap.4.6 beschriebenen Modells mit angepasstem α an. Auch dieses modifizierte Modell liefert 3 Geschlossenzeitkonstanten τ_c die experimentell nicht zu trennen sind.

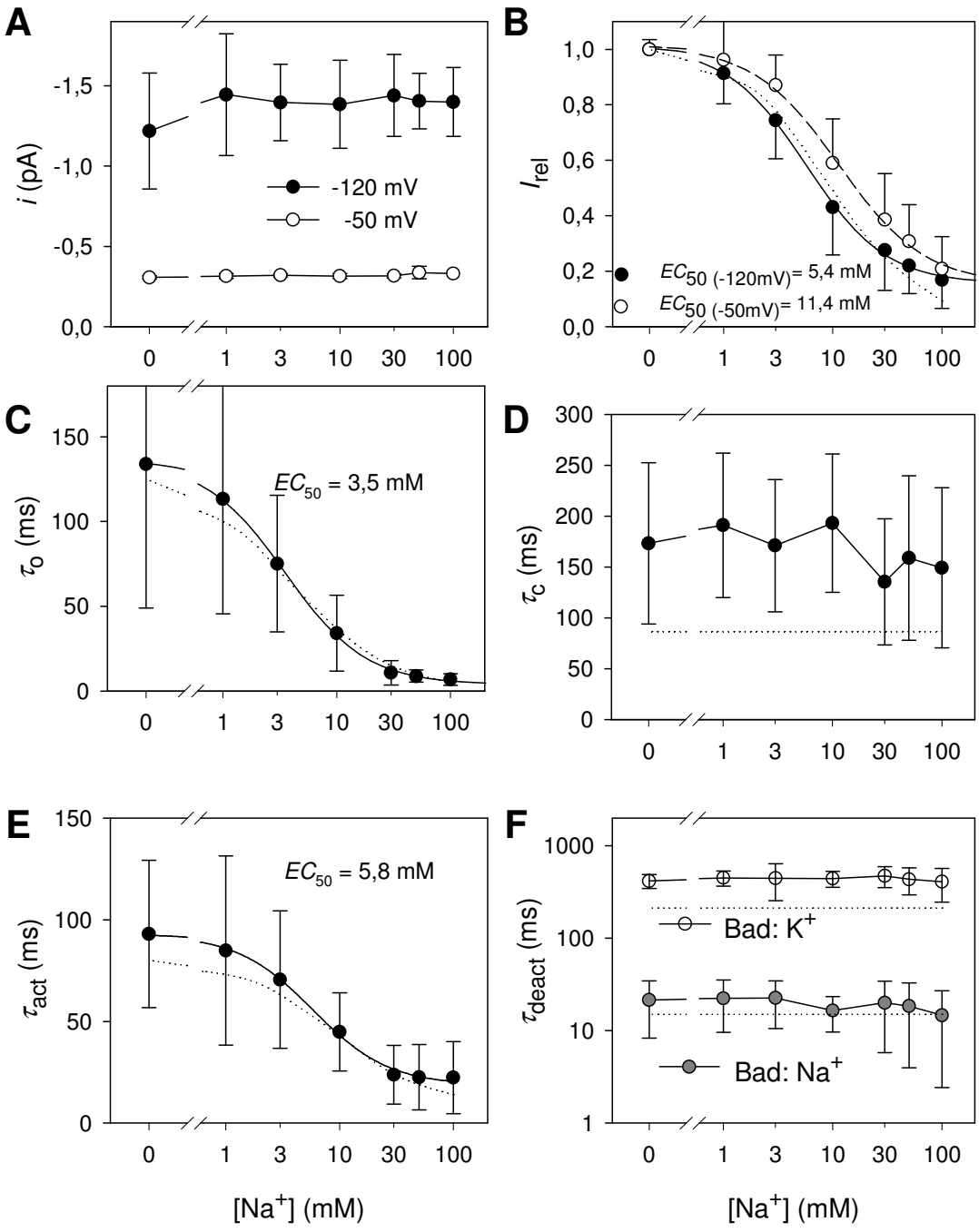


Abb. 4.27 Abhängigkeit der P2X$_7$-Kanaläle von der extrazellulären Na^+-Konzentration Die Gesamtkonzentration [Na^+] + [K^+] der 0,1 mM ATP^{4-}-Lösung wurde konstant auf 100 mM eingestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurde der Patch auf V_h = -120 mV geklemmt. Die Badlösungen in (A - E) enthielten entweder 100 mM Na^+ oder K^+, was jedoch keinen Einfluss auf den Patch während der ATP^{4-}-Applikation hatte. Die Messung der Einzelkanaldaten begann 1 s nach Beginn der ATP^{4-}-Applikation. (A) Einzelkanalamplitude. (B) Relative Offenwahrscheinlichkeit (gemittelter Strom über 1 s, bezogen auf Na^+-freie Lösung) nach Gleichung (30) (C, D) Mittlere Offen- und Geschlossenzeiten (kurze und lange Öffnungen). (E, F) Einfluss von [Na^+] auf die Aktivierungs- Gl. (22) bzw. Deaktivierungszeitkonstanten Gl. (23) Die Vorhersagen des Modells sind jeweils gepunktet dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Unterscheidung der ATP^{4-}-induzierten Stromkomponenten in $P2X_7$-exprimierenden Oozyten

Die hier beschriebenen Einzelkanalströme waren die einzigen Einzelkanalereignisse, die schnell und wiederholt durch ATP^{4-} aktiviert werden konnten. Zusammen mit der Tatsache, dass diese Einzelkanalöffnungen nur in Membranpatches $P2X_7$-Rezeptoren exprimierender Oozyten auftraten, wurde gewährleistet, dass es sich um Ströme durch den $P2X_7$-Kanal und nicht um sekundäre $P2X_7$-induzierte Effekte handelte. Andere Kanalöffnungen erfolgten selten und wurden vom Ein- oder Auswaschen des ATP^{4-} nicht beeinflusst.

In den vorliegenden Experimenten wurde neben den eigentlichen Einzelkanalströmen noch eine zweite „glatte" Stromkomponente, welche keine erkennbaren Einzelkanalöffnungen aufwies, beobachtet (Abb. 4.2, Abb. 4.3). Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine unspezifische Wirkung der negativ geladenen Purine auf die Leckstromleitfähigkeit des Patches, da sie

a) unabhängig von der Expression der $P2X_7$-Rezeptoren ist,
b) keine Sättigung bei hohen ATP^{4-}-Konzentrationen zeigt,
c) einen [ATP^{4-}]-unabhängigen Zeitverlauf aufweist,
d) auch durch 1 mM ADP^{3-}, UTP^{4-} und GTP^{4-} induziert wird, welche keine $P2X_7$-Einzelkanäle aktivieren,
e) proportional zum Leckstrom vor der ATP^{4-}-Applikation ansteigt.

Eine derartige Verschiebung des Haltestroms durch ATP^{4-} wurde auch schon bei Messungen an nativ in humanen B-Lymphozyten vorkommenden P2Z-Rezeptoreinzelkanälen beobachtet[65]. (Beim P2Z-Rezeptor handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um den $P2X_7$-Rezeptor.) Diese unspezifische Komponente muss bei der Analyse quasimakroskopischer Ströme von Multikanalpatches oder gemittelter Einzelkanalströme, bei denen die Einzelkanalöffnungen schwer zu identifizieren sind, in die Betrachtungen einbezogen werden. Zwar wurden im Rahmen dieser Arbeit solche Messungen zur Analyse der makroskopischen Kinetik der $P2X_7$-verursachten Ströme verwendet. Allerdings konnte diese Komponente in unseren Versuchen leicht anhand ihrer relativ langsamen Aktivierung und Deaktivierung von den durch $P2X_7$-Rezeptoren verursachten Strömen abgegrenzt werden. Bei Ganzzellexperimenten jedoch, bei denen nur ein langsamer

Lösungswechsel möglich ist, kann diese „glatte“ Stromkomponente durchaus zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen. Bei einem Patch mit einem Sealwiderstand von 12 GΩ beträgt der Leckstrom bei –120 mV 10 pA (bei angenommener linearer *U-I*-Beziehung) (Abb. 4.3 F). Die Applikation von 1 mM ATP^{4-} führt in diesem Beispiel zu einem zusätzlichen Strom von ca. 5 pA, was einen erheblichen Beitrag zum Gesamtstrom liefern kann, insbesondere, wenn nur wenige $P2X_7$-Rezeptoren vorhanden sind.

5.2 Einzelkanalkinetik

Im Gegensatz zu den meisten Ganzzellexperimenten zur Aktivierung $P2X_7$-Rezeptor induzierter Ströme[16,17,20,21,41,43-45,47,66] zeigen die $P2X_7$-Einzelkanalströme relativ einfache schnelle Aktivierungs- und Deaktivierungszeitverläufe. Abgesehen vom wesentlich langsameren Austausch der extrazellulären Lösung bei Ganzzellexperimenten im Vergleich zu den hier gezeigten *patch-clamp*-Messungen kommen verschiedene weitere Erklärungen für diese Diskrepanz in Betracht. Möglicherweise wird die Funktion des $P2X_7$-Rezeptors durch intrazelluläre Einflüsse, wie z.B. sekundäre Botenstoffe oder Kinasen, beeinflusst. Dies entfällt bei *outside-out*-Experimenten, da diese Zellbestandteile anders als bei den Ganzzellexperimenten ausgewaschen werden. Dagegen spricht jedoch, dass im Rahmen dieser Arbeit bei *cell-attached*- und *outside-out*-Messungen keine Unterschiede in der Kinetik festgestellt wurden. Da in der *cell-attached*-Konfiguration die Zelle intakt bleibt, kann das Auswaschen intrazellulärer Zellbestandteile die Veränderungen der Kinetik nicht erklären. Eine zweite mögliche Deutung sind zusätzliche Ionenleitfähigkeiten. Da $P2X_7$-Kanäle auch für Kalziumionen durchlässig sind, könnte der Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration in der Zelle derartige Leitfähigkeiten aktivieren. Bei den *outside-out*-Experimenten wurde die freie Ca^{2+}-Konzentration in der Pipettenlösung durch EGTA und BAPTA gepuffert. Tatsächlich lieferten Ganzzellexperimente mit starker Ca^{2+}-Pufferung an humanen B-Lymphozyten[37] und Experimente mit reduzierter extrazellulärer Ca^{2+}-Konzentration[19,40,41] einfache Zeitverläufe der $P2X_7$-Rezeptor induzierten Ströme. Außerdem zeigt ein Vergleich zwischen $P2X_7$-Strömen in Ganzzell- und *cell-attached*-Experimenten, dass Ca^{2+} als sekundärer intrazellulärer Botenstoff bei der $P2X_7$-induzierten Porenformation wirkt[67]. Auch scheinen artspezifische Unterschiede eine wichtige Rolle zu spielen, denn beispielsweise

wurden für $P2X_7$-Rezeptoren der Ratte[16,21,44,45,47] kompliziertere Zeitverläufe als für menschliche $P2X_7$-Rezeptoren[17,37,41] publiziert.

Der anhand der Einzelkanalaktivierung ermittelte EC_{50} Wert von ca. 0,3 mM freiem ATP^{4-} stimmt gut mit den entsprechenden Werten aus Ganzzellexperimenten nativer oder rekombinanter $P2X_7$ (P2Z)-Rezeptoren der Maus[19,40,66], der Agakröte[38] und des Menschen[37,41] überein. Im Gegensatz dazu scheint der Ratten-$P2X_7$-Rezeptor schon durch wesentlich geringere ATP^{4-}-Konzentrationen mit EC_{50} Werten von 3 bis 30 µM aktiviert zu werden[16,44].

Durch Zweielektroden-Spannungsklemmen-Experimente an $P2X_7$-Rezeptoren exprimierenden *Xenopus*-Oozyten konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor aktivierende ATP^{4-}-Bindungsstellen mit hoher und niedriger ATP^{4-}-Affinität besitzt[42]. Auf Einzelkanalebene entspricht die Bindungsstelle, welche zur Kanalöffnung führt, der niedrigaffinen Bindungsstelle mit einem EC_{50} von 0,3 mM. Der Effekt der Aktivierung der hochaffinen Bindungsstelle (EC_{50} von ca. 0,03 mM) scheint im Einzelkanalexperiment eine Erhöhung des Stromrauschens zu sein (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt muss noch weiter untersucht werden.

5.3 Langandauernde Einzelkanalöffnungen

In Ganzzellexperimenten wurde häufig eine verzögerte Deaktivierung des $P2X_7$-Rezeptor verursachten Stroms nach wiederholter oder langer Applikation hoher ATP^{4-}-Konzentrationen beobachtet[16,17,20,21]. Das Auftreten solcher langsam deaktivierender Ströme wurde meistens von einem Verlust der Porenselektivität für kleine anorganische Kationen begleitet. Dies zeigte sich in einem zeitabhängigen Anstieg der Permeabilität für große Kationen wie $Tris^+$ und $NMDG^+$. Dieses Phänomen wurde als eine Aufweitung der Kanalpore von anfänglich 7 Å auf bis zu 40 Å interpretiert[49].

Entsprechende Protokolle mit langandauernden ATP^{4-}-Applikationen führten bei den hier gezeigten *patch-clamp*-Messungen zu einer weiteren Einzelkanalkomponente mit längeren Einzelkanalöffnungen (>9 ms) und einer langsameren Deaktivierung, welche mit der Porenvergrößerung in Zusammenhang stehen könnte. Jedoch konnte in Lösungen, in denen Na^+ durch $Tris^+$ ersetzt wurde, auch nach langer ATP^{4-}-Einwirkung keine erhöhte Leitfähigkeit für $Tris^+$ festgestellt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Porenerweiterung des $P2X_7$-Rezeptors, welche bei makroskopischen Strömen beobachtet wurde[13,49], auf Ein-

zelkanalebene nicht existiert. Dies bedeutet, dass die Permeabilitätserhöhungen wahrscheinlich nicht direkt auf den $P2X_7$-Kanal, sondern eher auf sekundäre Effekte, also Aktivierung anderer Ionenkanäle oder elektrogener Transporter zurückzuführen sind.

Abrupte Änderungen der Offenzeiten, wie sie hier im Rahmen des Auftretens der langandauernden Öffnungen beobachtet wurden, und/oder der Geschlossenzeiten unter konstanten experimentellen Bedingungen, sind charakteristisch für viele Ionenkanäle, wie z.B. nikotinerge Azetylcholin-Rezeptoren[68] und NMDA-Rezeptoren[69]. Dieses Verhalten wird als modales Schaltverhalten bezeichnet. Der Wechsel zwischen den kurzen und langen Öffnungen wird demzufolge auch beim $P2X_7$-Rezeptor eher durch zwei verschiedene Schaltmodi ohne Änderung der Permeationseigenschaften bewirkt. Eine Verlängerung der Öffnungszeiten, begleitet von einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit, trat auch bei Substitution des extrazellulären Na^+ auf (s.u.). Inwieweit diese Vorgänge miteinander in Beziehung stehen, muss noch genauer untersucht werden.

Vom Auftreten des Schaltmodus mit langen Öffnungen ist die breite Streuung der Offen- und Geschlossenzeiten innerhalb des Modus mit kurzen Öffnungen zu trennen. Sie wurde vor allem durch die biologische Variabilität der Oozyten von verschiedenen Krallenfröschen und weniger durch die Variabilität der Oozyten einer Präparation oder verschiedener Patches einer Oozyte verursacht. Abweichungen im Stoffwechsel, welche z.B. zu unterschiedlicher Phosphorylierung des Rezeptors führen, könnten einen solchen Effekt bewirken. Insbesondere eine Tyrosin-Phosphorylierung führt zu einer Beeinflussung der Amplitude und des Zeitverlaufs von $P2X_7$-Rezeptor abhängigen Ganzzellströmen[46]. Das Auftreten der langandauernden Öffnungen kann hingegen offensichtlich nur von metabolischen Veränderungen ausgelöst werden, die nicht durch das Auswaschen der intrazellulären Lösung in den hier verwendeten *outside-out*-Experimenten beeinflusst werden.

5.4 Kinetikmodel des $P2X_7$-Kanals

Die Geschwindigkeit der Aktivierung bzw. Deaktivierung der kurzen $P2X_7$-Kanalöffnungen (Zeitkonstanten von ca. 20 ms) ist zu hoch, als dass sie in Ganzzellexperimenten aufgelöst werden könnte. Durch die *outside-out*-Methode war es jedoch möglich, anhand von mikroskopischen und makroskopischen Strömen

ein C-C-C-O Modell (Gl. (25)) zu entwickeln, welches die Kinetik des $P2X_7$-Rezeptorkanals beschreibt. Dies ist die einfachste Modellierung zur vollständigen Beschreibung des Rezeptorverhaltens. Mit diesem Modell ist es möglich die eigentlichen $P2X_7$-Ströme von sekundär aktivierten Strömen[46,70,71] zu trennen.

Aufgrund der trimeren Struktur des $P2X_7$-Kanals wäre im Prinzip auch ein C-C-C-C-O Modell mit einer dritten ATP^{4-}-Bindungsstelle denkbar. Auf die Modellierung einer weiteren Bindungsstelle und damit der Einführung zusätzlicher Parameter wurde jedoch verzichtet, da die experimentellen Daten keinen Beweis für die Existenz eines weiteren geschlossenen Zustandes lieferten. Bei der hier vorausgesetzten voneinander unabhängigen Besetzung der einzelnen ATP^{4-}-Bindungsstellen erfolgt die Besetzung der ersten Bindungsstelle mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit, daher unterscheidet sich die Kinetik des Modells mit 3 ATP^{4-}-Bindungsstellen nur unwesentlich von dem hier vorgestellten Modell mit 2 Bindungstellen.

Für die mittlere Anzahl der Kanalschließungen pro *burst (Kanalöffnungssalve)*, welche durch die Ratekonstanten für die Übergänge zwischen C_3 und C_2 bzw. O bestimmt wird[54], wurde anhand der Modellparameter ein Wert von 0,66 berechnet. Dies bestätigt die Daten der Einzelkanalexperimente, die zeigen, dass $P2X_7$-Kanäle kein ausgeprägtes *burst*-Verhalten aufweisen. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass andere ligandenoperierte Ionenkanäle, wie z.B. nikotinerge Azetylcholin- oder Glycin-Rezeptoren[72], über eine Komponente mit sehr kurzen Geschlossenzeiten von 10 bis 30 µs verfügen. Aufgrund der geringen Einzelkanalamplitude des $P2X_7$-Kanals und der sich daraus ergebenden Notwendigkeit einer relativ starken Filterung können jedoch derartig kurze Ereignisse nicht aufgelöst werden. Sollte der $P2X_7$-Kanal auch über solche kurzzeitigen Schließungen verfügen, so müssten die Offenzeiten als *burst*-Länge interpretiert werden.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass keine *bursts* auftreten, lieferte die Berechnung der Autokorrelationsfunktionen der gemessenen Verweilzeiten. In Patches ohne lange Öffnungen konnte keine Korrelation zwischen aufeinander folgenden Offen- und Geschlossenzeiten gefunden werden, was bei Kanälen mit *burst*-Verhalten, wie nikotinergen Azetylcholinrezeptoren hingegen der Fall ist[72]. Die signifikanten Korrelationen, welche dagegen in Patches mit sowohl langen als

auch kurzen Öffnungen gefunden wurden, können als Wechsel zwischen dem kurz öffnenden und dem lang öffnenden Schaltmodus interpretiert werden.

Die größte Abweichung der experimentellen Daten von den Vorhersagen des Modells tritt bei den mittleren Geschlossenzeiten bei niedrigen ATP^{4-}-Konzentrationen auf. Der Hauptgrund hierfür dürfte die messtechnische Begrenzung der detektierbaren Verweilzeiten auf maximal 500 ms sein. Bei 10 µM ATP^{4-} liegt die erwartete mittlere Geschlossenzeit jedoch im Bereich von mehreren Sekunden. Messungen solcher lang andauernder Geschlossenzeiten setzen sehr lange Registrierungen von Einzelkanalpatches voraus. Allerdings sind derartige Messungen nur schwer zu realisieren, da nur sehr wenige Patches eine Haltbarkeit von bis zu einer Stunde aufweisen. Weiterhin war der Deaktivierungszeitverlauf bei hohen ATP^{4-}-Konzentrationen langsamer als vom Modell vorhergesagt. Obwohl das verwendete System zum Lösungswechsel die schnellste bekannte Möglichkeit zum Austausch der Lösungen darstellt, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Austauschgeschwindigkeit ein limitierender Faktor bei sehr großen Konzentrationsänderungen ist. Auch können kleinere Unregelmäßigkeiten in der Richtung der Strömung von Badlösung und U-Rohrstrahl den genauen Zeitpunkt des Ein- und Auswaschens des ATP^{4-} beeinflussen. Dies könnte zu einer Streuung und damit einer Verzögerung der aus den gemittelten Strömen bestimmten Aktivierungs- und Deaktivierungszeiten führen.

Es wurde nicht versucht, die Kinetik des Schaltmodus mit den langen Öffnungen zu modellieren, da diese zu selten auftraten und ihre Aktivierung von zu vielen schwer zu kontrollierenden Faktoren abhing. Ein Ansatz zur Modellierung dieses Schaltmodus wäre, wie schon bei der Natriumsubstitution, eine Verringerung der Ratekonstante α.

Beschreibungen der Kinetik auf Einzelkanalebene von heterolog exprimierten P2X-Rezeptoren existieren bisher nur für $P2X_2$[73] und zum Teil für $P2X_4$-Rezeptoren[74]. Abgesehen von der leichten Einwärtsgleichrichtung, der schnellen Aktivierung durch ATP^{4-} und der gleichen Einzelkanalleitfähigkeit der $P2X_4$-Rezeptors, unterscheiden sich $P2X_2$ und $P2X_4$ in ihren Eigenschaften von denen des $P2X_7$. Insbesondere die lange mittlere Offenzeit vom etwa 5 ms scheint typisch für den $P2X_7$-Rezeptor zu sein, denn diese und andere Charakteristika der gemessen ATP^{4-}-abhängigen Einzelkanalströme humaner B-Lymphozyten[65] unterscheiden sich nicht von hier gefundenen $P2X_7$-Strömen. Dies stützt die These,

dass es sich bei dem nativen humanen P2Z-Rezeptor um einen $P2X_7$-Rezeptor handelt. Das identische Verhalten in natürlichen Zellen und in Fremdzellen deutet zudem darauf hin, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften des $P2X_7$-Rezeptors nicht durch die heterologe Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten verfälscht wurden.

5.5 Permeationsverhalten einzelner $P2X_7$-Rezeptoren

Die Resultate der Spannungsrampenexperimente zur Messung der Leitfähigkeit und des Umkehrpotenzials der $P2X_7$-Rezeptor abhängigen Ströme für verschiedene monovalente Kationen der Extrazellulärlösung bestätigte, dass die $P2X_7$-Kanalpore nur wenig zwischen kleinen Kationen wie Li^+, Na^+, K^+ und Cs^+ differenziert. Die gemessenen Umkehrpotenziale dieser Alkalimetallionen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, es wurden jedoch deutliche Unterschiede in der Einzelkanalleitfähigkeit gefunden. Die aus den Einzelkanalleitfähigkeiten ermittelte Ionenselektivität ($Na^+ > K^+ \approx Cs+ > Li^+$) entspricht der Eisenmannsequenz VII (siehe 2.3), was auf eine Wechselwirkung mittlerer Feldstärke zwischen Ion und Kanal hindeutet.

Bei der Verwendung organischer Kationen zunehmender Größe (4,5 bis 6,6 Å) als Ladungsträger änderte sich sowohl Einzelkanalleitfähigkeit als auch Umkehrpotenzial signifikant.

In diesem Bereich nimmt die Einzelkanalleitfähigkeit nahezu linear mit dem steigenden Durchmesser der Ionen ab. Dies deutet auf einen Siebeffekt hin, welcher die Ionenselektivität verursacht. Daraus ergibt sich ein extrapolierter Porendurchmesser von 8,5 Å. Diese Permeationscharakteristik ähnelt sehr denen des $P2X_1$ und des $P2X_2$ Rezeptors sowie anderer ligandenoperierter Kanäle wie nikotinischen Azetylcholinrezeptoren und Kanälen, die durch 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) aktiviert werden (5-HT_3-Rezeptoren)[75].

Messungen intrazellulärer pH-Änderungen infolge des Einstroms von Ammonium+-Verbindungen ergaben für den nativen P2Z-Rezeptor humaner B-Lymphozyten eine Durchlässigkeit für MMA^+ und DMA^+, nicht aber für TMA^+ und TEA^+ [76]. Dies stellt jedoch nicht zwingend einen Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit dar, da die Sensitivität der *patch-clamp*-Methode zur Detektion von Einwärtsströmen vermutlich höher liegt als die der pH-Messungen. Der größenselektive Filter scheint nur wenig zwischen größeren organischen Katio-

nen im Bereich von 6,7 ($4MA^+$) bis 8,3 Å (TEA^+) zu unterscheiden. Ein entsprechender Effekt wurde bereits für den $P2X_2$-Rezeptor publiziert[77], dabei wurde eine Wechselwirkung der Kanalpore mit den organischen Kationen für diesen Effekt verantwortlich gemacht. Eine solche Möglichkeit kann auch für den $P2X_7$-Rezeptor nicht ausgeschlossen werden. Jedoch sind auch andere Erklärungen denkbar. So besteht eine gewisse Unsicherheit bei der Abschätzung des Ionendurchmessers, die Annahme einer kreisförmigen Pore stellt nur eine grobe Näherung der tatsächlichen Kanalgeometrie dar und nicht zuletzt wurden sowohl die Ionen als auch die geöffnete Pore als starre Strukturen betrachtet, was die potenziell flexible Struktur dieser Moleküle außer Acht lässt.

Obwohl $P2X_7$-Rezeptoren durchlässig für Ca^{2+}-Ionen sind und die Lösungen in unseren Experimenten aus Gründen der Patchstabilität 0,5 mM freies Ca^{2+} enthielten, ist ein wesentlicher Beitrag des Ca^{2+} zum Gesamtstrom aus folgenden Gründen unwahrscheinlich:

1) In Ganzzellexperimenten trug Ca^{2+} lediglich mit einem Anteil von 4,6 % zum $P2X_7$-verursachten Strom bei (V_h = -55 mV; 145 mM Na^+; 1 mM Mg^{2+}; 2 mM Ca^{2+})[78]. Wird eine lineare Abhängigkeit des relativen Ca^{2+}-Stroms von der prozentualen Zusammensetzung der Extrazellulärlösung angenommen, ergibt sich bei 0,5 mM Ca^{2+} ein Beitrag von lediglich 1,7 %. Bezogen auf die Na^+-Leitfähigkeit von ca. 11 pS ergibt sich eine anteilige Ca^{2+}-Leitfähigkeit von ca. 0,18 pS. Diese liegt weit unterhalb der für die größten hindurchtretenden Ionen ermittelten 2 - 3 pS.

2) Messungen der Leitfähigkeit und des Umkehrpotenzials in Na^+-freier Lösung (100 mM NMDG) zeigten keine signifikanten Änderungen für freie Ca^{2+}-Konzentrationen von 0,2; 0,5 und 2 mM (Tabelle 5). Lediglich bei 10 mM freiem extrazellulären Ca^{2+} wurde eine signifikante Verschiebung des Umkehrpotenzials beobachtet.

Ca^{2+} (mM)	**γ (pS)**	**V_U (mV)**
0,2	2,6 ± 0,3	-74,4 ± 5,8
0,5	2,9 ± 0,2	-74,7 ± 3,8
2,0	2,6 ± 0,3	-68,9 ± 3,9
10,0	3,1 ± 0,4	-54,4 ± 6,7

Tabelle 5 Einzelkanalleitfähigkeit und Umkehrpotenzial bei verschiedenen extrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen

Das Molekulargewicht von TEA^+ liegt deutlich unter dem von $Ethidium^+$ (314 Da), welches den P2Z-Rezeptor passieren soll[79]. Dieser Ethidiumeinstrom

könnte durch die in vielen Publikationen beschriebene Erweiterung der Kanalpore erfolgen[11,14-21]. Andere Veröffentlichungen bestätigen die $P2X_7$-abhängige Porenerweiterung jedoch nicht[37,41,44,50]. Auch in unseren Experimenten wurde kein Hinweis auf eine Vergrößerung des Porendurchmessers wie Anstieg der Einzelkanalleitfähigkeit oder eine Änderung des Umkehrpotenzials infolge einer längeren ATP^{4-}-Applikation gefunden. Auch blieb die Schaltkinetik des Kanals unter langandauernder ATP^{4-}-Applikation konstant. Entsprechende Ergebnisse wurden auch für P2Z-Rezeptoren in humanen B-Lymphozyten gefunden[65]. Daraus lässt sich schließen, dass der $P2X_7$-Kanal selbst nicht in der Lage ist, den Durchmesser seiner Pore so zu vergrößern, dass sehr große organische Ionen hindurchtreten können. Vielmehr ist anzunehmen, dass andere Membranproteine und sekundäre Botenstoffe an der Bildung der großen Pore beteiligt sind (siehe auch [67]). Interessanterweise wurde diese Porenformation auch nicht bei einzelnen $P2X_2$- [77] oder $P2X_4$-Rezeptoren[74], sondern nur für ganze Zellen, welche diese Rezeptoren exprimieren, beobachtet[49,80].

5.6 Einfluss extrazellulärer monovalenter Kationen auf Aktivierung und Deaktivierung von $P2X_7$-Rezeptoren

Alle getesteten Substitute des Na^+ veränderten nicht nur das Permeationsverhalten des Einzelkanals, sondern beeinflussten auch stark die Kinetik des $P2X_7$-Rezeptors. Insbesondere die mittlere Offenzeit, die Offenwahrscheinlichkeit und die Aktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten stiegen an. Der gefundene Effekt kann durch eine allosterische Na^+-spezifische Bindungsstelle am $P2X_7$-Rezeptor mit einem K_d von etwa 5 mM erklärt werden, welche ein beschleunigtes Schließen des Kanals verursacht. Im C-C-C-O Modell (Gl. (25)) führt die Abwesenheit von Natrium zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der Übergangsrate α von O nach C_3. Geht man davon aus, dass Na^+ sowohl an $P2X_7$ im geschlossenen als auch offenen Kanalzustand binden kann, besitzt ein komplettes $P2X_7$-Modell, dass den Na^+-Effekt einschließt (32), jedoch acht Zustände und 20 Ratekonstanten, welche Anhand der vorhandenen Daten nicht ermittelt werden können.

$$\begin{array}{ccccccc} C_1 & \rightleftarrows & C_2 & \rightleftarrows & C_3 & \rightleftarrows & O \\ \downarrow\uparrow & & \downarrow\uparrow & & \downarrow\uparrow & & \downarrow\uparrow \\ C_5^{Na} & \rightleftarrows & C_6^{Na} & \rightleftarrows & C_7^{Na} & \rightleftarrows & O^{Na} \end{array} \qquad (32)$$

Diese Na^+-Bindungsstelle befindet sich auf der extrazellulären Seite des Rezeptors, da das Auswaschen bzw. die Zugabe von Na^+-Ionen die kinetischen Kanaleigenschaften innerhalb von wenigen Millisekunden verändert. Im Gegensatz dazu konnte keine offensichtliche Änderung der Kanalkinetik bei Substitution des intrazellulären K^+ bzw. Cs^+ gegen Na^+ beobachtet werden.
Des Weiteren scheint sich die Na^+-Bindungsstelle im elektrischen Feld der Zellmembran zu befinden, worauf eine geringe Spannungsabhängigkeit der Na^+-Substitutionseffekte (Abb. 4.27 B) hinweist. Die Na^+-Bindung wurde bei positiveren Membranpotenzialen abgeschwächt. Dies bedeutete, dass allein ein ausreichend positives Membranpotenzial zu einer Verlängerung der mittleren Offenzeiten und einem Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit führt. Lange Kanalöffnungen mit bis zu 20 ms wurden allerdings auch in einigen Patches in Na^+-Badlösung bei negativen Potenzialen, insbesondere bei langandauernder Applikation hoher ATP^{4-}-Konzentrationen beobachtet (s.o.). Möglicherweise wird die Na^+-Bindung durch ATP^{4-} beeinflusst. Andererseits gibt es keinen direkten Effekt der Na^+-Bindung auf die ATP^{4-}-Bindung, d.h. Na^+- und ATP^{4-}-Bindungsstellen sind nach dem hier vorgestellten Modell zur Erklärung der Effekte des extrazellulären Na^+ räumlich voneinander getrennt.
Der Einfluss einer Na^+-Substitution auf heterolog exprimierte Purinorezeptoren wurde auch für $P2X_2$-[73] und native $P2X_7$-artige Rezeptoren aus Flimmerepithelzellen der Lunge[7] untersucht. In beiden Fällen konnte keine Verlängerung der Offenzeiten durch Na^+-Substitution beobachtet werden. Die Na^+-Abhängigkeit scheint also eine spezifische Eigenschaft des $P2X_7$-Rezeptors zu sein.

5.7 Physiologische Bedeutung der Natrium$^+$-Bindungsstelle

Es ist bekannt, dass eine Substitution des extrazellulären Na^+ durch andere monovalente Kationen zu einem Anstieg des Ba^{2+}-, Ethidium$^+$-[79], und Ca^{2+}-Einstromes[81] in P2Z exprimierenden B-Lymphozyten führt. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration bewirkt eine Aktivierung sekundärer Kanäle in *Xenopus*-Oozyten, welche $hP2X_7$-Rezeptoren exprimieren[41]. Na^+-Substitution führt außerdem zu einer $NMDG^+$-Permeabilität in $P2X_7$-Rezeptoren exprimierenden HEK-293-Zellen[47] und zur Erhöhung der Beweglichkeit von Flimmerhaarzellen, welche $P2X_7$-artige Rezeptoren exprimieren[7].

Diese Effekte wurden durch eine Konkurrenz von Na^+ und Ca^{2+} um den Permeationsweg[81], eine extrazelluläre Na^+-Bindungsstelle, welche die Formierung der $P2X_7$-Rezeptor abhängigen Pore verhindert[47] oder durch eine Hemmung der ATP^{4-}-Bindung am Rezeptor durch Na^+ [7] erklärt. Aufgrund der hier beobachteten Wirkung der Na^+-Substitution auf $P2X_7$-Einzelkanäle können diese makroskopischen Effekte jedoch auf die verlängerten Offenzeiten bzw. die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit zurückgeführt werden. Unter der Annahme einer unveränderten Ca^{2+}-Permeabilität ergibt sich in Na^+-freier Badlösung ein stark erhöhter $P2X_7$-abhängiger Ca^{2+}-Einstrom. Dies könnte zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in Membrannähe führen, da die Wirkung der intrazellulären Ca^{2+}-Puffer möglicherweise nicht ausreicht, einen für längere Zeit nicht durch Kanalschließungen unterbrochenen Kalziumeinstrom durch $P2X_7$-Kanäle zu kompensieren. Die erhöhte Ca^{2+}-Konzentration könnte, wie schon Faria[67] angenommen hat, für die Bildung der „großen Pore“ und auch für die erhöhte Flimmerhaarbeweglichkeit verantwortlich sein.

Die hier gezeigten *patch-clamp*-Experimente konnten nicht in Ca^{2+}-freien Lösungen durchgeführt werden, da dies die Patches destabilisierte. Mehrere in der Literatur beschriebene Ganzzellexperimente wurden dagegen ohne Kompensation der Chelatierung von extrazellulärem Ca^{2+} durch ATP^{4-} durchgeführt. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Entzug von extrazellulärem Kalzium für die makroskopischen Effekte in diesen Ganzzellexperimenten mitverantwortlich ist.

Während einer Gewebeverletzung wird von den nekrotischen Zellen ATP, aber auch K^+ freigesetzt. Des weiteren ist bekannt, dass unter hypoxischen Bedingungen von in ihrem Stoffwechsel gestörten Zellen ATP und K^+ abgegeben werden[31,82,83]. Unter diesen Bedingungen ersetzt K^+ das Na^+ in metabolisch gefährdeten Geweben und verstärkt somit den Effekt das ATP^{4-} auf Zellen des Immun- und Entzündungssystems. Außerdem bewirkt die ATP-induzierte Depolarisation der Zellen[81] eine Erhöhung der treibenden Kraft des K^+-Ausstroms und verringert die Affinität des Na^+ zur Bindungsstelle. Auf diese Weise verstärkt der Kaliumausstrom die Wirkung des ATP^{4-} auf $P2X_7$-Kanäle exprimierende Zellen, weshalb schon geringe Mengen ATP^{4-} zu einem großen Effekt führen könnten.

6 Zusammenfassung

Erstmalig wurde der $P2X_7$-Rezeptor ausführlich auf Einzelkanalebene untersucht. Die Schwerpunkte bildeten dabei zum einen die Charakterisierung grundlegender Kanaleigenschaften wie ATP^{4-}- und Membranpotenzial-Abhängigkeit der Einzelkanalleitfähigkeit, Offen- und Geschlossenzeiten, Offenwahrscheinlichkeit, Permeabilität für unterschiedliche Ionen sowie Aktivierungs- und Deaktivierungszeitverlauf.

Mit den gewonnenen Daten war es möglich, die Anzahl der vorhandenen Kanalzustände und der ATP^{4-}-Bindungsstellen abzuschätzen. Schließlich konnte ein mathematisches Modell mit drei geschlossenen und einem geöffnetem Zustand entwickelt werden, welches die Einzelkanalkinetik, aber auch das makroskopische An- und Abschaltverhalten des Kanals mit hoher Genauigkeit abbildet.

Ausgehend von den Permeabilitätsmessungen wurde der Durchmesser der Kanalpore bestimmt. Ein besonderes Augenmerk galt der möglichen Existenz einer großen unspezifischen $P2X_7$-induzierten Pore, welche in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Die Bildung einer solchen Pore durch $P2X_7$ konnte auf Einzelkanalebene nicht bestätigt werden, jedoch wurde ein bis dato unbekannter Effekt von extrazellulären Na^+-Ionen auf den Kanal aufgedeckt, welcher wahrscheinlich zur Porenhypothese führte. Anhand der Einzelkanalmessungen war es nun möglich, den dahinterstehenden Mechanismus aufzuklären. Der $P2X_7$-Kanal verfügt demnach über eine spezifische Na^+-Bindungsstelle auf extrazellulärer Seite, die das Schließen des Kanals beschleunigt. Fehlt das Natrium, bewirkt dies eine drastische Verlängerung der Kanaloffenzeit und somit sehr große Kationeneinströme. Insbesondere der verstärkte Ca^{2+}-Einstrom könnte Ca^{2+}-abhängige sekundäre Leitfähigkeiten aktivieren, was wiederum als Bildung großer Poren fehlinterpretiert werden könnte. Auch dieses Verhalten des $P2X_7$-Rezepors in Na^+-freier Umgebung konnte durch eine geringfügige Modifikation des erstellten Modells beschrieben werden,

Die hier aufgezeigte Charakteristik des $P2X_7$-Rezeptors liefert grundlegende Erkenntnisse, welche für die Interpretation vieler mit anderen Methoden durchgeführter Experimente am $P2X_7$-Rezeptor relevant sind sowie die Effekte von Kanalmutationen und pharmakologischer Beeinflussung zu erklären helfen wird.

Abkürzungen und Formelzeichen

Abkürzung	Bedeutung
4MA	Tetra-Methyl-Ammonium
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'- Tetraessigsäure
DMA	Di-Methyl-Ammonium
EC_{50}	halbmaximale Aktivierungskonzentration
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
Hepes	4-(2hydrxy-ethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
MMA	Mono-Methyl-Ammonium
NMDG	N-methyl-D-Glucamin
ORi	Oozyten-Ringerlösung
RNA	Ribonukleinsäure
TBA	Tetra-Buthyl-Ammonium
TEA	Tetra-Ethyl-Ammonium
TMA	Tri-Methyl-Ammonium
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Formelzeichen	Bedeutung
c	Konzentration
F	Faraday-Konstante
G	Freie Enthalpie
I	makroskopische Stromstärke (Summenstrom)
i	mikroskopische Stromstärke (Einzelkanal)
k	Ratekonstante
P	Permeabilität
P_c	Geschlossenwahrscheinlichkeit
P_o	Offenwahrscheinlichkeit
q_e	Elementarladung
R	Universelle Gaskonstante
t	Zeit
T	absolute Temperatur
V_h	Haltepotenzial
V_U	Umkehrpotenzial
γ	elektrische Leitfähigkeit
ε	Dielektrizitätskonstante

Literaturverzeichnis

1. Alberts.B *et al.* Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York (1994).

2. Ralevic,V. & Burnstock,G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413-492 (1998).

3. Berne & Levy. Physiology. (1988).

4. Eltzschig,H.K. *et al.* ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ. Res.* **99**, 1100-1108 (2006).

5. Sperlagh,B., Vizi,E.S., Wirkner,K. & Illes,P. $P2X_7$ receptors in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **78**, 327-346 (2006).

6. Lucae,S. *et al.* P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2438-2445 (2006).

7. Ma,W.Y., Korngreen,A., Uzlaner,N., Priel,Z. & Silberberg,S.D. Extracellular sodium regulates airway ciliary motility by inhibiting a P2X receptor. *Nature* **400**, 894-897 (1999).

8. Stokes,L. *et al.* Characterization of a selective and potent antagonist of human $P2X_7$ receptors, AZ11645373. *Br. J. Pharmacol.* (2006).

9. Honore,P. *et al.* A-740003 [N-(1-{[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective $P2X_7$ receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 1376-1385 (2006).

10. Liu PS. 2,4-Toluene diisocyanate suppressed the calcium signaling of ligand gated ion channel receptors. *Toxicology* **219**, 167-174 (2005).

11. Cockcroft,S. & Gomperts,B.D. ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* **279**, 541-542 (1979).

12. Hille,B. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2001).

13. Di Virgilio,F. The P2Z purinoceptor: An intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol. Today* **16**, 524-528 (1995).

14. Steinberg,T.H., Newman,A.S., Swanson,J.A. & Silverstein,S.C. ATP^{4-} permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8884-8888 (1987).

15. Nuttle,L.C. & Dubyak,G.R. Differential activation of cation channels and non-selective pores by macrophage P_{2z} purinergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 13988-13996 (1994).

16. Surprenant,A., Rassendren,F., Kawashima,E., North,R.A. & Buell,G. The cytolytic P_{2Z} receptor for extracellular ATP identified as a P_{2X} receptor ($P2X_7$). *Science* **272**, 735-738 (1996).

17. Rassendren,F. *et al.* The permeabilizing ATP receptor, $P2X_7$ - Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* **272**, 5482-5486 (1997).

18. Virginio,C., MacKenzie,A., North,R.A. & Surprenant,A. Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat $P2X_7$ receptor. *J. Physiol. (Lond.)* **519**, 335-346 (1999).

19. Chessell,I.P., Michel,A.D. & Humphrey,P.P.A. Properties of the pore-forming $P2X_7$ purinoceptor in mouse NTW8 microglial cells. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 1429-1437 (1997).

20. Chessell,I.P., Grahames,C.B.A., Michel,A.D. & Humphrey,P.P.A. Dynamics of $P2X_7$ receptor pore dilation: Pharmacological and functional consequences. *Drug Dev. Res.* **53**, 60-65 (2001).

21. Smart,M.L. *et al.* $P2X_7$ receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J. Biol. Chem.* **278**, 8853-8860 (2003).

22. Colquhoun,D. Agonist-activated ion channels. *Br. J. Pharmacol.* **147**, S17-S26 (2006).

23. Lothr Jaenicke. Molekularbiologie der Zelle. 1990.

24. Singer,S. & J.Nicolson,G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. 1972. Science.

25. Jordan,P.C. & Partenskii,M.B. Nonlinear Dielectric Behavior of Water in Transmembrane Ion Channels: Ion Energy
Barrlers and the Channel Dielectric Constant. *J. Phys. Chem* ***96***, 3906-3910 (1992).

26. Edsall,J.T. & McKenzie,H.A. Water and proteins. I. The significance and structure of water; its interaction with electrolytes and non-electrolytes. *Adv. Biophys.* **10**, 137-207 (1978).

27. Drury,A.N. & Szent-Györgyi,A. The physiological activityof adenine compounds with especial reference to their action upon mammalian heart. *J. Physiol. (Lond.)* **68**, 213-237 (1929).

28. Burnstock,G., Campbell,G., Satchell,D. & Smythe,A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.* **40**, 668-688 (1970).

29. Fredholm,B.B. *et al.* Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* **46**, 143-156 (1994).

30. Illes,P., Klotz,K.N. & Lohse,M.J. Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**, 295-298 (2000).

31. North,R.A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **82**, 1013-1067 (2002).

32. North,R.A. & Surprenant,A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 563-580 (2000).

33. Hibell,A.D., Thompson,K.M., Xing,M., Humphrey,P.P.A. & Michel,A.D. Complexities of measuring antagonist potency at $P2X_7$ receptor orthologs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 947-957 (2001).

34. Seyffert,C., Schmalzing,G. & Markwardt,F. Dissecting individual current components of co-expressed human $P2X_1$ and $P2X_7$ receptors. *Curr. Top. Med Chem.* **4**, 1719-1730 (2004).

35. Humphreys,B.D., Virginio,C., Surprenant,A., Rice,J. & Dubyak,G.R. Isoquinolines as antagonists of the $P2X_7$ nucleotide receptor: High selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol. Pharmacol.* **54**, 22-32 (1998).

36. Nicke,A. *et al.* $P2X_1$ and $P2X_3$ receptors form stable trimers: A novel structural motiv of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* **17**, 3016-3028 (1998).

37. Bretschneider,F., Klapperstück,M., Löhn,M. & Markwardt,F. Nonselective cationic currents elicited by extracellular ATP in human B-lymphocytes. *Pflügers Arch.* **429**, 691-698 (1995).

38. Ugur,M. *et al.* An ATP-gated cation channel with some P2Z-like characteristics in gastric smooth muscle cells of toad. *J. Physiol. (Lond.)* **498**, 427-442 (1997).

39. Zou,H., Ugur,M., Drummond,R.M. & Singer,J.J. Coupling of a P2Z-like purinoceptor to a fatty acid-activated K^+ channel in toad gastric smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)* **534**, 59-70 (2001).

40. Colomar,A. & Amedee,T. ATP stimulation of $P2X_7$ receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 927-936 (2001).

41. Klapperstück,M., Büttner,C., Böhm,T., Schmalzing,G. & Markwardt,F. Characteristics of $P2X_7$ receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, 444-456 (2000).

42. Klapperstück,M., Büttner,C., Schmalzing,G. & Markwardt,F. Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human $P2X_7$ receptor. *J. Physiol. (Lond.)* **534**, 25-35 (2001).

43. Li,Q., Luo,X. & Muallem,S. Regulation of the P2X7 receptor permeability to large molecules by extracellular Cl^- and Na^+. *J. Biol. Chem.* **280**, 26922-26927 (2005).

44. Petrou,S., Ugur,M., Drummond,R.M., Singer,J.J. & Walsh,J.V. $P2X_7$ purinoceptor expression in Xenopus oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. *FEBS Lett.* **411**, 339-345 (1997).

45. Virginio,C., Church,D., North,R.A. & Surprenant,A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat $P2X_7$ receptor. *Neuropharmacology* **36**, 1285-1294 (1997).

46. Kim,M., Jiang,L.H., Wilson,H.L., North,R.A. & Surprenant,A. Proteomic and functional evidence for a $P2X_7$ receptor signalling complex. *EMBO J.* **20**, 6347-6358 (2001).

47. Jiang,L.H. *et al.* N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat $P2X_7$ receptors. *Am. J. Physiol.* **289**, C1295-C1302 (2005).

48. Klapperstück,M., Schmalzing,G. & Markwardt,F. Characteristics of binding sites for ATP^{4-} at the human $P2X_7$ receptor. *Drug Dev. Res.* **53**, 77-82 (2001).

49. Virginio,C., MacKenzie,A., Rassendren,F.A., North,R.A. & Surprenant,A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* **2**, 315-321 (1999).

50. Amstrup,J. & Novak,I. $P2X_7$ receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* **374**, 51-61 (2003).

51. Qin,F. Restoration of single-channel currents using the segmental k-means method based on hidden Markov modeling. *Biophys. J.* **86**, 1488-1501 (2004).

52. Horn,R. & Lange,K. Estimating kinetic constants from single channel data. *Biophys. J.* **43**, 207-223 (1983).

53. Milescu,L.S., Akk,G. & Sachs,F. Maximum likelihood estimation of ion channel kinetics from macroscopic currents. *Biophys. J.* **88**, 2494-2515 (2005).

54. Colquhoun,D. & Hawkes,A.G. On the stochastic properties of single ion channels. *Proc. R. Soc. Lond. [B]* **211**, 205-235 (1981).

55. Goldstein,D.A. Calculation of the concentrations of free cations and cation-ligand complexes in solutions containing multiple divalent cations and ligands. *Biophys. J.* **26**, 235-242 (1979).

56. Schubert,R. Multiple ligand-ion solutions: A guide for solution preparation and computer program understanding. *J. Vasc. Res.* **33**, 86-98 (1996).

57. Klapperstück,M., Büttner,C., Schmalzing,G. & Markwardt,F. Human B lymphocytes express $P2X_1$, $P2X_4$ and $P2X_7$ purinoceptors. *Biophys. J.* **76**, A338 (1999).

58. Gloor,S., Pongs,O. & Schmalzing,G. A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in
Xenopus laevis oocytes. *Gene* **160**, 213-217 (1995).

59. Axopatch 200B Patch Clamp Theory and Operation. 1999. Axon Instruments, Inc.

60. Bretschneider,F. & Markwardt,F. Drug-dependent ion channel gating by application of concentration jumps using U-tube technique. *Methods Enzymol.* **294**, 180-189 (1999).

61. Neher,E. Ion channels. Rudy,B. & Iverson,L. (eds.), pp. 123-131 (Academic press, San Diego,1992).

62. Butcher,E.C. Leukocyte-Endothelial Cell Recognition - Three (or More) Steps to Specificity and Diversity. *Cell* **67**, 1033-1036 (1991).

63. Sigworth,F.J. & Sine,S.M. Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys. J.* **52**, 1047-1054 (1987).

64. Colquhoun,D. & Hawkes,A.G. Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. *Proc. R. Soc. Lond. [B]* **199**, 231-262 (1977).

65. Markwardt,F., Löhn,M., Böhm,T. & Klapperstück,M. Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *J. Physiol. (Lond.)* **498**, 143-151 (1997).

66. Nuttle,L.C., El-Moatassim,C. & Dubyak,G.R. Expression of the pore-forming P_{2z} purinoreceptor in *Xenopus* oocytes injected with poly(A)$^+$ RNA from murine macrophages. *Mol. Pharmacol.* **44**, 93-101 (1993).

67. Faria,R.X., DeFarias,F.P. & Alves,L.A. Are second messengers crucial for opening the pore associated with $P2X_7$ receptor? *Am. J. Physiol.* **288**, C260-C271 (2005).

68. Auerbach,A. & Lingle,C.J. Heterogeneous kinetic properties of acetylcholine receptor channels in Xenopus myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* **378**, 119-140 (1986).

69. Magleby,K.L. Modal gating of NMDA receptors. *Trends Neurosci.* **27**, 231-233 (2004).

70. Wilson,H.L., Wilson,S.A., Surprenant,A. & North,R.A. Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the $P2X_7$ receptor C terminus. *J. Biol. Chem.* **277**, 34017-34023 (2002).

71. Adinolfi,E., Kim,M., Young,M.T., Di Virgilio,F. & Surprenant,A. Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the $P2X_7$ receptor complex negatively regulates $P2X_7$ receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 37344-37351 (2003).

72. Colquhoun,D. & Sakmann,B. Fast events in single channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscular endplate. *J. Physiol. (Lond.)* **369**, 501-557 (1985).

73. Ding,S.H. & Sachs,F. Single channel properties of $P2X_2$ purinoceptors. *J. Gen. Physiol.* **113**, 695-719 (1999).

74. Negulyaev,Y.A. & Markwardt,F. Block by extracellular Mg^{2+} of single human purinergic $P2X_4$ receptor channels expressed in human embryonic kidney cells. *Neurosci. Lett.* **279**, 165-168 (2000).

75. Evans,R.J. *et al.* Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J. Physiol. (Lond.)* **497**, 413-422 (1996).

76. Chen,J.R., Jamieson,G.P. & Wiley,J.S. Extracellular ATP increases NH_4^+ permeability in human lymphocytes by opening a P2Z purinoceptor operated ion channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1511-1516 (1994).

77. Ding,S. & Sachs,F. Ion permeation and block of $P2X_2$ purinoceptors: single channel recordings. *J. Membr. Biol.* **172**, 215-223 (1999).

78. Egan,T.M. & Khakh,B.S. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J. Neurosci.* **24**, 3413-3420 (2004).

79. Wiley,J.S., Chen,R. & Jamieson,G.P. The ATP^{4-} receptor-operated channel (P_2Z class) of human lymphocytes allows Ba^{2+} and ethidium$^+$ uptake: inhibition of fluxes by suramin. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 54-60 (1993).

80. Khakh,B.S., Bao,X.R., Labarca,C. & Lester,H.A. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat. Neurosci.* **2**, 322-350 (1999).

81. Löhn,M., Klapperstück,M., Riemann,D. & Markwardt,F. Sodium block and depolarization diminish P2Z-dependent Ca^{2+} entry in human B lymphocytes. *Cell Calcium* **29**, 395-408 (2001).

82. Di Virgilio,F. *et al.* Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation. *Drug Dev. Res.* **59**, 171-174 (2003).

83. Lim,R.K.S. Pain. *Annual Review of Physiology* **32**, 269-288 (1970).

Publikationsliste

1. Patch clamp recording of single human $P2X_7$ receptors
F. Markwardt, I. Lozinsky, T. Riedel, W. Boldt and G. Schmalzing
Pflügers Arch. 447 (S1) (2004), 105 (A)

2. Patch clamp recording of single human $P2X_7$ receptors
T. Riedel, I. Lozinsky, G. Schmalzing and F. Markwardt
Biophys. J. 86 (2005) 3037-P (A)

3. Permeation properties of single human purinergic $P2X_7$ receptors
T. Riedel, G. Schmalzing and F. Markwardt
Pflügers Arch. 449 (S1) (2005), 115 (A)

4. Complex kinetics of $P2X_7$ -dependent single channel currents.
T. Riedel, I. Lozinsky, G. Schmalzing and F. Markwardt
Acta Physiol. 186 S1 (2006), 127 (A)

5. Kinetics of $P2X_7$ receptor-operated single channels currents
T. Riedel, I. Lozinsky, G. Schmalzing and F. Markwardt
Biophys. J. 92 (2007), 92 (2007), 2377-2391

6. Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of $P2X_7$ receptor-operated single channels currents
T. Riedel, G. Schmalzing and F. Markwardt
Biophys. J. (2007), 93 (2007), 846-858

7. Na^+ and voltage-dependent closing of the unitary $hP2X_7$ receptor channel
T. Riedel, G. Schmalzing and F. Markwardt
Acta Physiol. 189 (2007), S 653, 122 (A)

Danksagung

Ganz besonderes bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Fritz Markwardt für die vielfältigen Anregungen, fördernden Diskussionen und die allseitige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Danken möchte ich weiterhin den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Elektrophysiologie der Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg, Herrn Dr. W. Boldt, Frau Dr. M. Klappperstück sowie Frau M. Schmidt, die mich bei der Erarbeitung der Dissertation unterstützten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Es fanden keine früheren Promotionsversuche statt.

Halle / Saale, den 9. Dezember 2007

Thomas Riedel

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Riedel
Vorname	Thomas George
Geburtstag	31.07.1977
Geburtsort	Leipzig
Familienstand	verheiratet, 1 Kind

Werdegang

09/1984 – 07/1992	Alwin-Malz-Schule, Markkleeberg
08/1992 – 07/1996	Rudolf-Hildebrand-Gymnasium, Markkleeberg
10/1996 – 05/2003	Physikstudium an der Universität Leipzig Diplomarbeit am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Leipzig: „Wechselwirkung des Fusionsproteins Sp 18 mit Phospholipidmembranen: Bindung, Aggregation und Fusion“
07/2003 – 06/2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie an der Universität Halle
Derzeit:	Dissertation unter Professor Dr. F. Markwardt am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Universität in Halle: „Charakterisierung des humanen $P2X_7$-Rezeptors auf Einzelkanalebene“