

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. Gerrit Isenberg



Charakterisierung koexprimierter humaner purinerge P2X1- und P2X7-Rezeptoren in Oozyten von *Xenopus Laevis*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin / Dr. med.

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

von Christian Seyffert
geboren am 5. 8. 1973

in Hildburghausen

Betreuer: Prof. Dr. Fritz Markwardt

Gutachter: 1. Prof. Dr. Markwardt
2. Prof. Dr. I. Illes (Leipzig)
3. Prof. Dr. G. Reiser (Magdeburg)

eingereicht am: 05.10.2004
verteidigt am: 28.04.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008907

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008907>]

Für meine Eltern

Referat und Bibliographie

Humane purinerge P2X1- und P2X7-Rezeptoren werden auf einer Reihe von Zelltypen, wie Lymphozyten und epithelialen Zellen exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese beiden Rezeptorsubtypen funktionell interagieren und dabei ihr spezifisches elektro-physiologisches Verhalten ändern.

Da weiterhin ausreichend selektive Agonisten und Antagonisten notwendig sind, um die über die beiden Rezeptoren vermittelten verschiedenen Zellantworten von nativen Zellen, die beide P2X-Rezeptoren koexprimieren, getrennt untersuchen zu können, wurden verschiedene Substanzen auf Ihre diesbezügliche Effektivität hin untersucht.

Bei Expression in Oozyten von *Xenopus laevis* zeigt sich, dass die Koexpression der beiden Rezeptoren weder die Kinetik der Aktivierung, Desensitivierung, Deaktivierung noch die der Erholung von der Desensitivierung im Vergleich zur Expression der isolierten Rezeptoren ändert. Nach Koexpression kann eine weitgehend selektive Aktivierung des hP2X7-Rezeptors entweder durch die Applikation des hP2X7-spezifischen Agonisten Benzoyl-Benzoyl-ATP, oder durch Applikation der hP2X1-Rezeptor spezifischen Antagonisten NF279 und NF449 bei Aktivierung mit ATP als Agonisten erreicht werden.

Oxidiertes ATP, Brilliant Blue G, und KN 62, in der Literatur als potente hP2X7-Rezeptor-präferente Antagonisten beschrieben, waren ebenso wie $\alpha\beta$ -methyl-ATP, das als selektiver hP2X1-Agonist beschrieben wird, nicht effektiv, eine Isolierung des hP2X1-Rezeptors zu erreichen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wird bei koexprimierten hP2X1- und hP2X7-Rezeptoren eine isolierte Aktivierung des hP2X1-Rezeptors am ehesten durch die Applikation niedriger ATP-Dosen ($<1 \mu\text{M}$) oder den Zusatz von Mg^{2+} bei Verwendung höherer ATP-Konzentrationen erreicht.

Seyffert, Christian, Charakterisierung koexprimierter humaner purinerge P2X1- und P2X7-Rezeptoren in Oozyten von *Xenopus Laevis*.

Halle, Martin-Luther-Universität, medizinische Fakultät, Dissertation, 78 Seiten, 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Purinorezeptoren	1
1.2	Die P2Y-Rezeptorfamilie.....	2
1.3	Die P2X-Rezeptorfamilie.....	3
1.3.1	Allgemeine Charakteristika.....	3
1.3.2	Der P2X1-Rezeptor	5
1.3.3	Der P2X7 Rezeptor	8
1.3.4	Hetero-oligomere P2X-Rezeptoren.....	13
2	Zielstellung.....	14
3	Material und Methodik.....	15
3.1	Material	15
3.2	Methodik	15
3.2.1	RNA-Präparation	15
3.2.2	Behandlung der Oozyten.....	15
3.2.3	Elektrophysiologie	16
4	Ergebnisse	18
4.1	Kinetik der hP2X1-, hP2X7- und hP2X1/7-abhängigen Ionenkanalströme	18
4.1.1	Beispiele und Approximationen der Zeitverläufe von hP2X1-, hP2X7- und hP2X1/7-abhängigen Ionenkanalströmen	18
4.1.2	Vergleich der Schaltkinetiken von isoliertem hP2X1 und hP2X1/7	22
4.1.3	Vergleich der Schaltkinetiken von isoliertem hP2X7 und hP2X1/7	26
4.2	Pharmakologische Charakteristika der hP2X1/7-vermittelten Ströme	28
4.2.1	Wirkung von ATP auf hP2X1/7 und die beiden Subtypen im Vergleich	28
4.2.2	Der Einfluss von Agonisten und Antagonisten mit P2X1-präferenter Wirkung auf hP2X1/7-abhängige Ströme	35
4.2.3	Der Einfluss von Substanzen mit P2X7-präferenter Wirkung auf hP2X1/7-abhängige Ströme.....	43
5	Diskussion.....	55
6	Zusammenfassung.....	64
7	Literaturverzeichnis.....	66
8	Thesen	77

Abkürzungsverzeichnis

2meSATP	2-methyl-thio-Adenosintriphosphat
AA	Arachidonsäure
Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	one-way repeated measures analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
BrBlue	Brilliant Blue G
BzATP	2'3'-O-(4-benzoyl)-benzoyl-ATP
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cRNA	copy-ribonucleic acid
DAG	Diacylglycerol
dpi	dies post injektionem
EC ₅₀	halbmaximale Aktivierungskonzentration
EDRF	endothelium derived relaxing faktor
ERK	extrazellulär-Signal-regulierte Proteinkinase
FGK	Fluorescent-Green-Protein-Konstrukt
Fluo-3	1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxy-9-xanthenyl)phenoxy]- 2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane- N,N,N',N'-tetraacetic acid
Fura-2	1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]- 2-(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
GABA	gamma-amino-butyric-acid
HEK293	human embryonic kidney 293
HEPES	4-(2hydrxy-ethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
Il	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
Ip5I	Di-Inosin-Pentaphosphat
iPLA ₂	induzierbare Ca ²⁺ -unabhängige Phospholipase A ₂
KIP	Koimmunopräzipitationsexperimente
KN62	1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	messenger-ribonucleic acid

MRS2220	zyklisches Pyridoxin- α 4,5-mono-Phosphat-6-azo-Phenyl-2', 5'-Disulfonat
NF κ B	nuclear factor κ B
NF023	8,8'-carbonylbis(imino-3,1-phenylen carbonylimino) bis (1,3,5-Naphtalentrtrisulfonsäure
NF279	8,8'- (carbonylbis(imino-4,1-Phenylencarbonylimino-4,1-Phenylencarbonylimino)) bis (1,3,5-Naphthalentrisulfonsäure)
NF449	4,4',4'',4'''- (Carbonylbis(imino-5,1,3-benzentriylbis(carbonylimino)))tetrakis-benzen-1,3-disulfonsäure
NMDG	N-methyl-D-Glucamin
oATP	oxidiertes ATP, 2',3'-Dialdehyd-ATP
PCR	polymerase-chain-reaktion
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLD	Phospholipase D
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonsäure
PPNSD	Pyridoxal-5'-Phosphat-6- (2' Naphtylazo-6'-Nitro-4',8'-Disulphonat)
PtdOH	Phosphatidsäure
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaktion
TNP-ADP	2',3'-O- (2,4,6-Trinitrophenyl)- Adenosindiphosphat
TNP-AMP	2',3'-O- (2,4,6-Trinitrophenyl)- Adenosinmonophosphat
TNP-ATP	2',3'-O- (2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosintriphosphat
TNP-GTP	2',3'-O- (2,4,6-Trinitrophenyl)-Guanosintriphosphat
tRNA	transfer-ribonucleic-acid
UTP	Uridin 5'-Triphosphat
Yo-Pro1	Quinolinium,4-[3-methyl-2-(3H)-benzoxazolyliden]methyl-1-[3-(triethylammonium)propyl]di-Iodid

1 Einleitung

1.1 Purinorezeptoren

Vor nunmehr 75 Jahren diskutierten Drury und Szent-Györgyi als erste die Rolle von Purinen als extrazellulären Signalmolekülen, nachdem sie für Adenosin und Adenosinmonophosphat (AMP) verschiedene ausgeprägte biologische Effekte nachweisen konnten (Drury and Szent-Györgyi, 1929). Dies waren insbesondere kardiozirkulatorische Effekte wie arterielle Dilatation, Blutdruckabfall und Leitungsstörungen am Herzen sowie eine Hemmung der Darmperistaltik. Gillespie lenkte 1934 die Aufmerksamkeit auf die Abhängigkeit der biologischen Wirkung von der Struktur der Adenosinderivate, sowohl hinsichtlich der Potenz, als auch der Art der Wirkung (Gillespie, 1934). So konnte er zeigen, dass die Verringerung der Anzahl der Phosphatreste die vasodilatatorische und blutdrucksenkende Wirkung der Adenosinderivate erhöhte, Adenosintriphosphat (ATP) hingegen stärker als AMP und Adenosin Kontraktionen von Ileum und Uterus des Meerschweinchens induzierte. Dies waren die ersten Hinweise auf die unterschiedlichen Wirkungen von Adenosin und ATP und damit auch auf verschiedene Purinorezeptoren (Ralevic and Burnstock, 1998). Holton lieferte einen der ersten Hinweise auf eine physiologische Rolle extrazellulären ATPs als Neurotransmitter (Holton, 1959; Holton and Holton, 1953), indem er die Freisetzung von ATP aus dem Nervus auricularis nachwies. 1972 postulierte Burnstock die Existenz purinerner Nervenendigungen mit entsprechenden Rezeptorproteinen (Burnstock, 1972). In der Zwischenzeit wurden an einer Vielzahl von Geweben und Zellen teils sehr unterschiedliche Wirkungen von ATP oder Adenosin dokumentiert. Dazu zählen Kontraktion glatter Muskelzellen, neuronale Transmission sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem, exokrine und endokrine Sekretion, Beeinflussung der Immunantwort und des Entzündungsgeschehens, Plättchenaggregation, Schmerzperzeption und Modulation der kardialen Funktion (Ralevic and Burnstock, 1998) .

Neue Erkenntnisse über die physiologische Rolle extrazellulärer Purine kommen auch aus Forschungen bezüglich ihrer natürlichen Quellen und der Mechanismen ihrer Freisetzung. So konnte die Freisetzung von Adenosin aus hypoxischem Myocard und seine Rolle bei der Induktion der reaktiven Hyperämie gezeigt werden (Gerlach, Deuticke et al., 1963; Berne, 1963). Die daraus abgeleitete Hypothese, dass Purine ein Signal entsprechend der metabolischen Situation eines Gewebes mit Wirkung auf die lokale Durchblutung darstellen könnten, wurde durch die Beobachtung gestützt, dass Adeninnukleotide, insbesondere ATP, während der Kontraktion aus Skelettmuskelgewebe freigesetzt werden (Boyd and Forrester, 1968; Forrester and Lind, 1969). Daneben können noch eine Vielzahl verschiedener Zellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. bei Gewebhypoxie, Dehnungsreizen, Zelluntergängen oder aber auch bei der Blutgerinnung, Quelle einer Freisetzung von Purinen sein. Dies sind z. B. adrenale

chromaffine Zellen, Thrombozyten, Mastzellen, Erythrozyten, basophile Leukozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen (Ralevic and Burnstock, 1998) .

Die biologischen Effekte von Purinen und Pyrimidinen werden durch verschiedene Zelloberflächenrezeptoren vermittelt. Einen ersten Hinweis auf die Existenz spezifischer Adenosinrezeptoren lieferten Rall und Sattin, indem sie zeigten, dass Methylxanthine die Adenosinvermittelte Akkumulation von cyklischen AMP (cAMP) in Schnitten vom Rattenhirn hemmten (Sattin and Rall, 1970).

Den Begriff der „purinergen Rezeptoren“ führte Burnstock 1978 ein, und unterteilte diese in „P1-Purinorezeptoren“ mit Adenosin als wirksamsten natürlichen Agonisten und „P2-Purinorezeptoren“ mit ATP und Adenosindiphosphat (ADP) als wirksame Agonisten. Diese Einteilung beruhte auf verschiedenen Kriterien, neben der relativen Potenz von ATP, ADP, AMP und Adenosin insbesondere auf dem selektiven Antagonismus der durch Adenosin vermittelten Effekte durch Methylxanthine, Aktivierung der Adenylatzyklase durch Adenosin und Stimulation der Prostaglandinsynthese durch ATP und ADP (Burnstock, 1978)

Die P1-Purinorezeptoren (oder gebräuchlicher: Adenosinrezeptoren) werden heute in vier Subtypen unterteilt: A1, A2A, A2B und A3. Diese Einteilung beruht auf den verschiedenen Molekülstrukturen; sie zeigen unterschiedliche Gewebeverteilungen und pharmakologische Profile. Sie alle sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über Hemmung (A1, A3) oder Stimulation (A2A) der Adenylatzyklase wirken bzw. Phospholipase C aktivieren (A1, A2B, A3).

Die P2-Purinorezeptoren werden heute in zwei Untergruppen unterteilt, die P2X- und die P2Y-Rezeptorfamilie (Ralevic and Burnstock, 1998).

1.2 Die P2Y-Rezeptorfamilie

P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit einer Länge von 308 bis 377 Aminosäureresten und einer Molekülmasse von 41 bis 53 kDa nach Glykosilierung (Abbraccio and Burnstock, 1994). Wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zeigen sie in ihrer Tertiärstruktur sieben transmembranäre Domänen. Zur Zeit sind acht verschiedene P2Y-Rezeptoren kloniert: P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 und 14. Die fehlenden Indizes in der Nummernfolge waren Rezeptoren zugeordnet, die sich als identisch mit anderen klonierten P2Y-Rezeptoren erwiesen oder aber später als nicht der P2Y-Familie zugehörig betrachtet wurden.

Die meisten P2Y-Rezeptoren (1, 2, 4, 6, 11 und 13) aktivieren über G-Proteine die Phospholipase C mit konsekutiver IP₃-Bildung und Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern. Dies kann eine Reihe verschiedener Signalwege stimulieren, wie die Aktivierung von

Proteinkinase C (PKC), Phospholipase A₂ (PLA₂), Ca²⁺-abhängiger Kaliumkanäle oder NO-Synthetase mit nachfolgender Bildung von endothelium derived relaxing factor (EDRF). Über Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Stimulierung der PKC ist eine Aktivierung der phosphatidyl-cholin-spezifischen Phospholipase D (PLD), des MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Weges und über Ca²⁺-Kanäle ein Ca²⁺-Einstrom über die Zellmembran möglich. Ebenso sind Aktivierung (P2Y11), aber auch Hemmung der Adenylatzyklase (P2Y12, 13 und 14) sowie Beeinflussung neuronaler Ca²⁺- und K⁺-Kanäle für einige P2Y-Rezeptoren beschrieben (Ralevic and Burnstock, 1998; King and Townsend-Nicholson, 2003; Boehm, 2003). Verglichen mit P2X-Rezeptoren ist die Zeit bis zum Auftreten der biologischen Effekte P2Y-abhängiger Signalkaskaden relativ lang und bewegt sich im Sekunden-Bereich. Statt des Terminus Purinorezeptoren (oder Purinozeptoren) wird heute meist der Ausdruck P2-Rezeptoren bevorzugt, da das Pyrimidinderivat UTP ein wesentlicher Agonist an P2Y2 und P2Y6-Rezeptoren ist.

1.3 Die P2X-Rezeptorfamilie

1.3.1 Allgemeine Charakteristika

P2X-Rezeptoren sind ATP-getriggerte Kationenkanäle mit einer kurzen Reaktionszeit (<10 ms) (North, 2002).

Derzeit sind sieben verschiedene P2X-Rezeptor-Subtypen kloniert, P2X1-7, deren Länge zwischen 384 (P2X4) und 595 (P2X7) Aminosäuren variiert. Jeder Subtyp weist zwei hydrophobe Regionen auf, die lang genug sind, die Plasmamembran zu kreuzen. Der dazwischen liegende größte Teil des Proteins befindet sich extrazellulär. Damit liegen sowohl das amino- als auch das carboxyterminale Ende intrazellulär. Hinsichtlich der extrazellulären Domäne sind die einzelnen Proteine zu 40 - 55 % paarweise identisch. Hier ist ein auffälliges Merkmal das Vorkommen von 10 konstanten Cysteinresten bei allen bisher bekannten P2X-Rezeptoren. Es wird angenommen, dass diese Cysteinreste paarweise zu Cystin gekoppelt vorliegen und so zur Tertiärstruktur der einzelnen Untereinheit beitragen. Der intrazelluläre carboxyterminale Teil hingegen weist beträchtliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf. Dabei zeigt der P2X7-Rezeptor insgesamt die geringste Übereinstimmung mit anderen Subtypen, ungeachtet welchen P2X-Subtyp man betrachtet und von welcher Spezies die P2X-Rezeptoren stammen. So besitzen die P2X7-Rezeptoren ein deutlich längeres carboxyterminales Ende als die anderen Vertreter dieser Familie sowie eine zusätzliche dritte hydrophobe Domäne.

Bisher ist keine Homologie in der Sequenz von P2X-Rezeptoren und anderen Proteinen beschrieben, lediglich wurde auf eine Ähnlichkeit mit Klasse II- Aminoacyl-tRNA-Synthetasen hingewiesen (North, 2002).

Alle P2X-Rezeptoren besitzen Konsensus-Sequenzen für N-Glykosylierung. Ein bestimmtes Maß an Glykosylierung ist notwendig, um das Protein in die Zellmembran zu integrieren. Die Anzahl solcher Konsensus-Bereiche variiert zwischen den Subtypen und den Spezies (North, 2002).

Alle Genprodukte formen bei heterologer Expression in *Xenopus*-Oozyten oder in Säugerzellen homomere Rezeptoren mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften und pharmakologischen Profilen. Zum Teil können diese bei bestimmten homomeren Rezeptoren gefundenen Charakteristika sehr gut mit solchen in Übereinstimmung gebracht werden, die in nativen Geweben oder Zellen gefunden werden. Teilweise zeigen aber auch die in verschiedenen Expressionssystemen untersuchten heteromeren Rezeptoren Eigenschaften, die jenen in bestimmten nativen Geweben weitgehend entsprechen. (Evans, Lewis et al., 1995; Ralevic and Burnstock, 1998) (siehe dazu auch Kapitel 1.3.4.). Dabei ist hier darauf hinzuweisen, dass das einzelne Protein an sich zunächst nur eine Untereinheit und noch keinen funktionsfähigen Rezeptor darstellt. Es wird angenommen, dass die Quartärstruktur der P2X-Rezeptoren aus einem heteromeren Komplex strukturell verwandter Untereinheiten besteht, ähnlich dem „klassischen“ nicotinenen Acetylcholin (ACh)-Rezeptor. Die Stöchiometrie dieser Komplexe ist bisher nicht sicher bekannt, allerdings gibt es deutliche Hinweise darauf, dass P2X-Rezeptoren aus drei Untereinheiten bestehen (Nicke, Bäumert et al., 1998; Kim, Spelta et al., 2001).

Hinsichtlich der Signaltransduktion werden v.a. die Depolarisation der Zellmembran und die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als wesentliche Mechanismen angesehen. Letztere geschieht über einen Ca^{2+} -Einstrom zum einen direkt über den Rezeptorkanal, zum anderen aber auch über spannungsabhängige Ca-Kanäle in der Zellmembran, welche durch die Depolarisation geöffnet werden und vermutlich den wichtigeren Beitrag zum Ca^{2+} -Einstrom leisten. Da an dieser Stelle zunächst keine weiteren Botenstoffe involviert sind, ist die Reiz-Reaktionszeit dieses Signalweges sehr kurz (Ralevic and Burnstock, 1998). Allerdings zeigt der P2X7-Rezeptor auch hier einige Besonderheiten, auf die weiter unten eingegangen wird.

Bezüglich ihres Desensitivierungsverhaltens können P2X Rezeptoren in zwei Gruppen eingeteilt werden: solche, die sehr schnell (innerhalb einiger hundert Millisekunden), oder langsam bzw. gar nicht desensitivieren. Dabei nennt man „nicht-desensitivierend“ solche Rezeptoren, die während fortgesetzter Gegenwart von ATP einen Einwärtsstrom von wenigstens einigen Sekunden Dauer aufrechterhalten. Zu der ersten Gruppe zählen homomere P2X1- und P2X3- Rezeptoren. Beide sind auch gut durch α,β -methyl-ATP aktivierbar. Die Gruppe der nicht-desensitivierenden P2X-Rezeptoren lässt sich weiter in α,β -methyl-ATP-sensitive und -insensitive Rezeptoren unterteilen (Evans and Surprenant, 1996; Abbraccio and Burnstock, 1994). Zu letzteren zählen alle anderen homomeren, in heterologen Expressionssystemen untersuchten Subtypen, also P2X2, 4, 5, 6 und 7 sowie eine Reihe von nativen

P2X-Rezeptoren. Als zur Gruppe der α,β -methyl-ATP-sensitiven, nicht desensitivierenden Rezeptoren zugehörig vermutet man verschiedene native Rezeptor-Heteromere, bestehend z. B. aus P2X2 und P2X3-Untereinheiten. (Siehe dazu auch Kapitel 1.3.4 Hetero-oligomere Rezeptoren).

Der Mechanismus der Desensitivierung von P2X-Rezeptoren ist bisher kaum verstanden (siehe dazu aber auch Kapitel 1.3.2) (North, 2002).

1.3.2 Der P2X1-Rezeptor

a) Vorkommen

Der P2X1-Rezeptor wurde aus dem Vas deferens der Ratte und aus Harnblase von Maus und Mensch kloniert und ist ein Protein von 399 Aminosäuren Länge (Valera, Hussy et al., 1994). P2X1-mRNA findet sich in Harnblase, der Lamina muscularis von kleinen Arterien, Arteriolen und Vas deferens, niedrigere Level P2X1-mRNA in Lunge und Milz (Collo, North et al., 1996), in Ganglien des Hinterhorns, in Rückenmark, Ganglion trigeminale, Ganglion coeliacum und Rattenhirn (Ralevic and Burnstock, 1998). Der P2X1-Rezeptor scheint der wichtigste P2X-Rezeptorsubtyp in glatten Gefäßmuskelzellen zu sein, wobei zum Teil auch P2X4-Rezeptoren gefunden werden (Soto, Garcia-Guzman et al., 1996). Die praktisch identischen Eigenschaften bezüglich des pharmakologischen Profils und des Desensitivierungsverhaltens stützen die These, dass der P2X-Rezeptor der glatten Gefäßmuskelzellen identisch mit dem rekombinanten homomeren P2X1-Rezeptor ist. Ebenso führte das gleiche pharmakologische Profil der ATP-abhängigen Ionenkanäle in den Membranen von Thrombozyten und Megakaryozyten dazu, diese als P2X1-Rezeptoren ansehen (Somasundaram and Mahaut-Smith, 2004; Ralevic and Burnstock, 1998).

Mittels polyklonaler Antikörper wurden auch auf humanen B-Lymphozyten P2X1-Rezeptoren gefunden (Sluyter, Barden et al., 2001). Allerdings zeigten Spannungsklemmexperimente an humanen B-Lymphozyten keine desensitivierenden ATP-aktivierbaren Ströme, also keinen Hinweis auf eine funktionelle Expression von P2X1-Rezeptoren. (Bretschneider, Klapperstück et al., 1995). Allerdings wurde in humanen B-Lymphozyten mittels RT-PCR mRNA von P2X1 gefunden (Klapperstück, Büttner et al., 1999).

b) Agonisten

Der rekombinante P2X1-Rezeptor wird durch (in der Rangfolge ihrer Potenz)

$2\text{meSATP} \geq \text{ATP} = \alpha,\beta\text{-methyl-ATP} \gg \text{ADP}$ aktiviert. ATP und α,β -methyl-ATP besitzen dabei jeweils eine halbmaximale Aktivierungskonzentration (EC_{50}) von etwa $1 \mu\text{M}$. Kontroverse besteht hinsichtlich der Potenz von $2'3'\text{-O-(4-benzoyl)-benzoyl-ATP}$ (BzATP). Während die Messung P2X1-abhängiger $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Antworten eine EC_{50} im nM-Bereich ergab (Bianchi, Lynch et al., 1999),

fanden Messungen P2X1-Rezeptor-abhängiger Ionenströme EC_{50} -Werte von ca. $3 \mu\text{M}$ (Evans, Lewis, Buell, Valera, North, and Surprenant, 1995) bzw. $>100 \mu\text{M}$ (Markwardt et. al., unveröffentlicht).

c) Antagonisten

Verschiedene Antagonisten blockieren mit unterschiedlicher Selektivität den P2X1-Rezeptor. Recht unselektive Vertreter sind Suramin und PPADS (Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonsäure). Neuere Substanzen sind MRS2220 (zyklisches Pyridoxin- α 4,5-mono-Phosphat-6-azo-Phenyl-2', 5'-Disulfonat), NF023 (8,8'-carbonylbis(imino-3,1-phenylen carbonylimino) bis (1,3,5-Naphthalentrisulfonsäure) und NF279 (8,8'- (carbonylbis(imino-4,1-Phenylencarbonylimino-4,1-Phenylencarbonylimino)) bis (1,3,5-Naphthalentrisulfonsäure). Letzteres besitzt für den humanen P2X1-Rezeptor eine halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50}) von 50 nM , wie durch Messungen an *Xenopus*-Oozyten gezeigt wurde (Klapperstück, Büttner et al., 2000b). Ein weiteres Suraminanalog ist die neuere 4,4',4'',4'''- (Carbonylbis(imino-5,1,3-benzentriylbis(carbonylimino)))tetrakis-benzen-1,3-disulfonsäure (NF449), ein potenter P2X1-Antagonist mit einer IC_{50} im nM-Bereich (Hülsmann, Nickel et al., 2003). Andere Antagonisten sind das PPADS-Analogon Pyridoxal-5'-Phosphat-6- (2' Naphtylazo-6'-Nitro-4',8'-Disulphonat) (PPNDS), 2',3'-O- (2,4,6-Trinitrophenyl)-ATP (TNP-ATP) und seine Derivate TNP-GTP, TNP-ADP und TNP-AMP, nicht jedoch TNP-Adenosin. Schließlich wurde auch Di-Inosin-Pentaphosphat (Ip5I) als selektiver Antagonist an rekombinanten P2X1-Rezeptoren beschrieben. Über die Regionen des Rezeptors, die in die Bindung des Antagonisten involviert sind, ist zur Zeit nur sehr wenig bekannt (North, 2002).

d) Leitfähigkeitseigenschaften

Der homomere P2X1-Rezeptor ist ein Kationen-selektiver Kanal mit leichter Präferenz von Natrium gegenüber Kalium. Er besitzt eine geringe Leitfähigkeit für größere organische Kationen wie Tris oder N-methyl-D-glucamin und eine relativ gute für Ca^{2+} . Extrazelluläres Ca^{2+} hat allenfalls geringen Einfluss auf die Leitfähigkeit des Kanals im Gegensatz zu einem niedrigen extrazellulären pH, der Ströme am P2X1-Rezeptor hemmt, (vergleiche Kapitel 1.3.3, Punkt c). Die Leitfähigkeit des Einzelkanals wird mit 18 pS angegeben (Evans, 1996).

e) Desensitivierung

Wie schon in Kapitel 1.3.1 erwähnt, unterliegt der P2X1-Rezeptor einer schnellen Desensitivierung. Diese ist bei Konzentrationen unterhalb der EC_{50} nur gering ausgeprägt, wird aber bei höheren Konzentrationen deutlich. Die Erholungszeit bei Rückkehr aus der Desensitivierung ist lang; d.h. um bei wiederholten ATP-Applikationen reproduzierbare Stromstärken zu erhalten, muss

ein Intervall von mindestens ca. 15 Minuten eingehalten werden. Dies hat beträchtliche Konsequenzen bei der Untersuchung von ATP-Effekten an verschiedenen Zellen und Geweben (North, 2002). So konnten z. B. ATP-induzierte Einwärtsströme an HL60-Zellen erst dann nachgewiesen werden, nachdem diese mit Apyrase behandelt wurden (Buell, Michel et al., 1996). Dies legt die Vermutung nahe, dass kontinuierlich freigesetztes ATP den Rezeptor in andauernder Desensitivierung hält, womit sich ein beträchtliches experimentelles Problem ergibt (North, 2002). Dabei können auch ATP-Konzentrationen im nanomolaren Bereich, die eine nur minimale Rezeptoraktivierung hervorzurufen scheinen, einen beträchtlichen Teil des P2X1-Rezeptor-Pools einer Zelle langanhaltend desensitivieren. Für die Desensitivierung wird eine scheinbare halbmaximale Konzentration $K_{1/2} = 3,2$ nM angegeben, dies ist deutlich kleiner als die scheinbare halbmaximale Aktivierungskonzentration, die mit $EC_{50} = 0,7$ μ M etwa zwei Größenordnungen darüberliegt. (Rettinger and Schmalzing, 2003)

Die deutlichen Unterschiede im Desensitivierungsverhalten zwischen den verschiedenen P2X-Rezeptorsubtypen gaben Anlass für eine Reihe von Experimenten mit chimären Rezeptoren. So konnte gezeigt werden, dass der Transfer beider transmembranärer Domänen, nicht jedoch der extrazellulären Schleife des P2X1-Rezeptors auf den eigentlich nicht-desensitivierenden P2X2-Rezeptor diesen in einen schnell desensitivierenden verwandelte (Werner, Seward et al., 1996). Diese Experimente legen die Folgerung nahe, dass dem Schluss der Kanalpore während andauernder ATP-Applikation eine konzertierte Konformationsänderung des Proteins mit Einbeziehung beider transmembranärer Domänen zugrunde liegt (North, 2002).

Daneben sind aber auch eine Reihe von Punktmutationen im extrazellulären Teil des Rezeptors beschrieben, die teils drastische Auswirkungen auf das Desensitivierungsverhalten haben. So ergibt z. B. die Mutation K68A einen Rezeptor mit einer im Vergleich zum Wildtyp ca. einhundertmal langsameren Desensitivierung (North, 2002).

Der P2X1-Rezeptor kann aber auch im Sinne einer „Down-Regulation“ internalisiert werden. So führt die heterologe Expression eines P2X1-Rezeptor/ Fluorescent-Green-Protein-Konstrukts (FGK) in Zellen des Ganglion cervicale superius der Ratte zum Neuauftreten eines schnell desensitivierenden, α,β -methyl-ATP-sensitiven Einwärtsstromes neben der dort zu findenden, nativen, nicht desensitivierenden Antwort. Eine α,β -methyl-ATP-Applikation für die Dauer von 60 s führte zum Verschwinden des P2X1-FGK von der Zelloberfläche und seinem Erscheinen in sauren Endosomen (Li, Lee et al., 2000).

1.3.3 Der P2X7 Rezeptor

a) Vorbemerkungen

Der P2X7-Rezeptor wurde 1996 aus Makrophagen und Hirngewebe der Ratte kloniert (Surprenant, Rassendren et al., 1996), die Klonierung der humanen Variante folgte wenig später (Rassendren, Buell et al., 1997). Er ist ein Protein von 595 Aminosäuren Länge und weist eine Reihe von Besonderheiten auf, die ihn von den anderen P2X-Rezeptoren unterscheiden:

- Er ist das mit einigem Abstand größte Protein innerhalb der P2X-Rezeptorfamilie mit einem deutlich längeren carboxyterminalen Ende und zeigt bei paarweisem Vergleich der Aminosäuresequenz die geringste Übereinstimmung mit anderen P2X-Rezeptoren.
- Im Vergleich mit anderen P2X-Rezeptoren benötigt er zur Aktivierung deutlich höhere ATP-Konzentrationen.
- Er besitzt die Fähigkeit zur Bildung großer, unselektiver Poren mit Permeabilitätserhöhung für große organische Moleküle wie Yo-PRO1 mit nachfolgendem Zelltod.
- Er aktiviert eine Reihe von second-messenger-abhängigen Signalwegen, die für andere P2X-Rezeptoren (bisher) nicht beschrieben sind (North, 2002) (Ralevic and Burnstock, 1998).
- Er lässt sich als einziger mit keinem anderen Vertreter der P2X-Rezeptoren koimmunopräzipitieren (Torres, Egan et al., 1999).

Im Folgenden soll auf diese Eigenschaften detaillierter eingegangen werden.

b) Vorkommen und biologische Wirkungen

Mit verschiedenen Methoden wurden vor allem in Zellen der hämatopoetischen Reihe und des retikulo-endothelialen Systems P2X7-Rezeptoren (mittels PCR oder Antikörpern) bzw. P2X7-artige Rezeptoren beschrieben. Dazu zählen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen, B-Lymphozyten (Klapperstück, Büttner, Schmalzing, and Markwardt, 1999) und Gliazellen der Retina (Pannicke, Wolfgang et al., 2000). Ebenso findet man P2X7-artige Rezeptoren aber auch auf Hepatozyten sowie Azinuszellen verschiedener Speicheldrüsen (Ralevic and Burnstock, 1998), auf glatten Gefäßmuskelzellen und vermutlich auch auf Fibroblasten-Kulturen (Solini, Chiozzi et al., 1999).

Obwohl in ihrer Bedeutung und Komplexität noch nicht vollständig verstanden, wurden doch eine Reihe von Beobachtungen gemacht, die auf eine immunmodulatorische Funktion des P2X7-Rezeptors hinweisen. Zum einen gibt die Fähigkeit des Rezeptors zur Induktion von unselektiven Poren mit nachfolgender Vakuolisierung, Schwellung und Zelltod Anlass, ihm eine Rolle bei Nekrose- und Apoptosevorgängen zuzuweisen, wie sie z.B. bei Zellmauserung, Eliminierung unerwünschter, z. B. virusinfizierter Zellen oder auch anderen physiologischen oder pathophyso-

logischen Prozessen auftreten (Dubyak and El-Moatassim, 1993; Ralevic and Burnstock, 1998). Andere Beobachtungen, die auf eine Rolle des P2X7-Rezeptors bei Immun- bzw. Entzündungsvorgängen deuten, sind die Beteiligung des P2X7-Rezeptors bei der Fusion von Makrophagen zu polynukleären Riesenzellen (Chiozzi, Sanz et al., 1997), die P2X7-Rezeptor vermittelte Freisetzung von Interleukin-1 β (Il-1 β) aus Mastzellen (Ferrari, Chiozzi et al., 1997) sowie wahrscheinlich auch die Freisetzung von Interleukin-6 (Il-6) aus Fibroblasten (Solini, Chiozzi, Morelli, Fellin, and Di Virgilio, 1999). Das Verschwinden des L-Selektin-Moleküls von der Oberfläche verschiedener Leukozyten nach P2X7-Stimulation deutet auf eine Beteiligung des Rezeptors bei der Modulierung der Leukozytenadhäsion und -migration (Gu, Bendall et al., 1998).

An P2X7-defizienten Mäusen konnte eindrucksvoll die essentielle Rolle des Rezeptors und der durch P2X7 aktivierbaren Phospholipase D für die Bakterizidie von mit Mykobakterien infizierten Macrophagen gezeigt werden (Fairbairn, Stober et al., 2001).

Weiterhin wurden veränderte Leukozytenfunktionen und eine im Vergleich mit dem Wildtyp deutlich abgeschwächte Entzündungsantwort nach Induktion einer artefiziellen Arthritis an P2X7-defizienten Mäusen gezeigt (Labasi, Petrushova et al., 2002). Mit Hinblick auf diese Involvierung des Rezeptors in Entzündungsprozessen wird auch seine Rolle, zusammen mit anderen P2X-Rezeptorsubtypen, für die Pathogenese der Arteriosklerose diskutiert (Di Virgilio and Solini, 2002).

c) Agonisten

Der P2X7-Rezeptor zeigt hohe Selektivität für ATP gegenüber anderen Purinverbindungen, die allenfalls geringe oder keine Aktivität am Rezeptor zeigen (Ralevic and Burnstock, 1998). Vier Eigenschaften sind für den P2X7-Rezeptor charakteristisch, die ihn von den anderen P2X-Rezeptoren unterscheiden:

- die Notwendigkeit, relativ hohe ATP-Dosen ab 100 μ M zu applizieren.
- die 10- bis 100fach höhere Potenz von BzATP gegenüber ATP. Dabei ist BzATP allerdings nicht selektiv, sondern zeigt auch an anderen P2X-Rezeptoren Wirkung.
- der ausgeprägte antagonistische Effekt von extrazellulärem Ca²⁺ und Mg²⁺. Dies ist zwar auch an anderen P2X-Rezeptoren, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß nachweisbar.,
- die Beobachtung, dass zeitliches Schaltverhalten und Ionenkanalstromamplitude sich bei wiederholten Applikationen des gleichen Agonisten deutlich verändern können (North, 2002).

Letzter Punkt verweist auf die Beobachtung, dass sich die Abschaltkinetik des Kanals mit wiederholten ATP-Applikationen verlangsamt (Surprenant, Rassendren, Kawashima, North, and Buell, 1996; Rassendren, Buell, Virginio, Collo, North, and Surprenant, 1997). Außerdem gibt es Gründe für die Annahme zweier unterschiedliche ATP-Bindungsstellen mit Dissoziationskonstanten von 4

bzw. 200 μM ATP mit Aktivierung jeweils verschiedener Permeationseigenschaften und Schaltkinetiken (Klapperstück, Büttner et al., 2001).

Die Untersuchungen zur Potenz verschiedener Agonisten werden durch in Ihrer Komplexität noch nicht vollständig verstandene Wechselwirkungen mit divalenten Kationen kompliziert. In physiologischer Lösung wird das freie ATP^{4-} durch Ca^{2+} und Mg^{2+} komplexiert, so dass eine Lösung entsteht, die eine Mischung aus ATP^{4-} , MgATP^{2-} und CaATP^{2-} mit zusätzlich niedrigeren Konzentrationen von MgHATP^- , CaHATP^- und Ca_2ATP enthält, (Ralevic and Burnstock, 1998). Cockcroft und Gomperts warfen die Frage auf, welche Form die aktive sei und schlugen das freie ATP^{4-} vor, basierend auf ihrer Beobachtung, dass dieses die Permeabilität von Mastzellen (die P2X7 exprimieren) erhöhte (Cockcroft and Gomperts, 1979). Andere Arbeiten stützen diese These insbesondere für Zellen, die den P2X7-artigen Rezeptor exprimieren (Ralevic and Burnstock, 1998). Daneben existieren aber auch teils widersprüchliche Hinweise darauf, dass der Einfluss von divalenten Kationen auf die Potenz verschiedener Agonisten nicht nur in der Veränderung der relativen Konzentrationen der einzelnen ATP-Spezies beruht. Diskutiert werden hier v.a. die zusätzliche Hemmung von Ektonukleotidase-Aktivität, die Veränderung der Einzelkanalleitfähigkeit der P2X-Rezeptoren, andere allosterische Effekte am Rezeptor und eventuelle Membrandepolarisation (Ralevic and Burnstock, 1998).

d) Antagonisten

1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin (KN62), ein selektiver Antagonist der Kalzium/Calmidulin-abhängigen Proteinkinase II, wird als potenter Antagonist am P2X7-artigen Rezeptor humaner Lymphozyten mit einer IC_{50} im nM-Bereich beschrieben (Gargett and Wiley, 1997).

2',3'-Dialdehyd-ATP (oxidiertes ATP, oATP) ist ein irreversibler Antagonist am P2X7-Rezeptor (Murgia, Hanau et al., 1993; Wiley, Chen et al., 1994), benötigt aber eine beträchtliche Inkubationszeit von mehreren Stunden.

Verschiedene Ionen haben antagonistische Wirkung am P2X7-Rezeptor. Dazu zählen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} und H^+ (North, 2002).

Als potenter und selektiver Antagonist an murinen und humanen P2X7-Rezeptoren, die heterolog in HEK293-Zellen exprimiert und untersucht wurden, wird Coomassie Brilliant Blue G mit einer IC_{50} im nM-Bereich beschrieben (Jiang, MacKenzie et al., 2000).

e) Permeationseigenschaften und Porenbildung

Der kationenselektive Strom durch den P2X7-Rezeptorkanal weist keine oder nur geringe Gleichrichtung auf. Dabei ist ein charakteristisches Merkmal P2X7-abhängiger Ströme die Zweiphasigkeit sowohl der Aktivierung als auch der Deaktivierung. Nach einer initial exponentiellen

Aktivierung zeigt der weitere Verlauf des Stromes eine linear zunehmende Komponente. Auch bei der Deaktivierung kann man eine Phase der schnellen von einer Phase der langsamen Deaktivierung unterscheiden. (Klapperstück, Büttner et al., 2000a). Bei kurzen Agonist-Applikationen besitzt der Kanal nur geringe Leitfähigkeit für NMDG^+ , diese wächst aber mit der Dauer der Applikation. Die Zeitkonstante des Permeabilitätszuwachses beträgt 1 s für Dimethylamin⁺, 4 s für Tris⁺ und 10 s für NMDG^+ (North, 2002). Bei fortgesetzter ATP-Applikation wird die Membran auch für große Farbstoffmoleküle wie Ethidium⁺ und YO-PRO-1 permeabel, wobei bisher nicht befriedigend geklärt ist, ob dies durch Dilatation der Kanalpore des Rezeptors oder durch die Rekrutierung eines bisher unbekanntes weiteren Proteins, welches die Wirtszelle zu Verfügung stellt, geschieht. Für beide Varianten gibt es Argumente, die im Weiteren erläutert werden. Mit verschiedenen Verfahren kann die Eintrittsgeschwindigkeit des Farbstoffes in die Zelle abgeschätzt werden. Dabei zeigt sich, dass bei Verwendung physiologischer extrazellulärer Lösung der Zeitverlauf des Farbstoffeintrittes in die Zelle (innerhalb einiger Sekunden) deutlich langsamer ist als der Zeitverlauf des Ionenstroms durch den Rezeptor-Kanal. Bei Verwendung von NMDG^+ als extrazellulärem Kation hingegen nähert sich der Zeitverlauf des Ionenstromes dem des Farbstoffeintrittes stark an, was die These stützt, dass beide den gleichen Eintrittsweg benutzen (Virginio, MacKenzie et al., 1999).

Die einfachste Erklärung für diese Veränderungen der Permeationseigenschaften wären Prozesse im P2X7-Rezeptorprotein an sich. Dafür könnten folgende Punkte sprechen:

- der Permeabilitätszuwachs ist progressiv, er tritt schneller für kleine Kationen auf als für größere,
- er wird in verschiedenen Expressionssystemen beobachtet,
- in der Regel blockieren Substanzen, die den initialen Ionenstrom antagonisieren, auch die Aufnahme von YO-PRO-1
- verschiedene Zellen, die P2X2, P2X2/3 und P2X4-Rezeptoren exprimieren, zeigen ein ähnliches Verhalten, und dieses kann durch Punktmutationen im Rezeptor verändert werden (North, 2002).

Auf der anderen Seite stehen folgende Beobachtungen, die leichter mit der These in Einklang zu bringen sind, dass ein zusätzliches Protein in die Porenbildung involviert ist:

- Calmidazolium blockiert den initialen Ionenstrom, lässt die Aufnahme von YO-PRO-1 aber unbeeinflusst,
- Maitotoxin kann einen Farbstoffaufnahme-Mechanismus aktivieren, der dem über P2X7 vermittelten Weg sehr ähnliche Eigenschaften aufweist, ohne dass der P2X7-Rezeptor involviert ist (Schilling, Sinkins et al., 1999), und

- bei Expression in *Xenopus*-Oozyten zeigt der Rezeptor keine Anzeichen für eine Permeabilisierung für große organische Moleküle (Petrou, Ugur et al., 1997; Klapperstück, Büttner, Böhm, Schmalzing, and Markwardt, 2000a).

f) Desensitivierung

P2X7-Rezeptor-abhängige Ionenströme zeigen keine Desensitivierung. Längerandauernde Agonist-Applikationen führen zu den unter e) beschriebenen Veränderungen der Leitfähigkeitseigenschaften, wobei einige artspezifische Besonderheiten beobachtet werden (Ralevic and Burnstock, 1998).

g) Second-Messenger-Mechanismen

Für den P2X7-Rezeptor sind ein Reihe von Interaktionen und Second-Messenger-abhängigen Signalwegen beschrieben. So wurde an Acinuszellen der Glandula Parotidea der Ratte durch Stimulierung des P2X7-Rezeptors eine Proteinkinase C-abhängige Aktivierung der Proteinkinase D und der extrazellulären signal-regulierten Proteinkinasen (ERK) 1 und 2 nachgewiesen (Bradford and Soltoff, 2002). In humanen T-Zellen involviert die Signalkaskade nach P2X7-Rezeptor-Aktivierung die Phosphorylierung der p56^{lck} Kinase, der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B, der c-Jun N-terminale Kinase und ebenfalls der ERK 1 und 2. Diese Effekte sind hier von der Gegenwart extrazellulärer Ca²⁺-Ionen abhängig (Budagian, Bulanova et al., 2003). Die Stimulation des P2X7-Rezeptors bewirkt in Lymphozyten, Monozyten und anderen Zelltypen die Aktivierung einer Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase D (PLD) (Humphreys and Dubyak, 1996), (Fernando, Gargett et al., 1999); (Hung and Sun, 2002) mit Bildung von Phosphatidsäure (PtdOH) aus Phospholipiden. PtdOH aktiviert die Ca²⁺-und DAG-unabhängige Protein Kinase C ζ , eine fett-säureabhängige Proteinkinase, und induziert die Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine (Waite, Wallin et al., 1997). PtdOH kann durch Dephosphorylierung durch die Phosphatidsäurephosphohydrolase in DAG überführt werden, das mit seinen verschiedenen Unterformen eine Reihe unterschiedliche Kalziumkanäle aktivieren kann. Es gibt Hinweise, dass die Aktivierung des P2X7-Rezeptors an die Bildung von Arachidonsäure (AA) durch PLA₂ gekoppelt ist, wodurch verschiedene Kalziumkanäle aktiviert werden. In Speicheldrüsenzellen der Ratte kann durch Stimulation des P2X7-Rezeptors die induzierbare Ca²⁺-unabhängige PLA₂ (iPLA₂) aktiviert werden (Alzola, Perezetxebarria et al., 1998). In Krötenmagenzellen ist die P2X7-abhängige Aktivierung AA-abhängiger K⁺-Kanäle nachgewiesen worden (Zou, Ugur et al., 2001). Außerdem führt die Stimulierung des P2X7-Rezeptors über die Membrandepolarisation zur Verringerung der treibenden Kraft für den Einstrom extrazellulären Kalziums. Zusammengefasst wird deutlich, dass der P2X7-Rezeptor auf verschiedenen Ebenen und auf komplexe Weise den Stoffwechsel der jeweiligen Zielzelle beeinflusst und vielfältige Interaktionen mit anderen Signalkaskaden einght.

1.3.4 Hetero-oligomere P2X-Rezeptoren

Jeder der 7 bekannten P2X-Rezeptor-Proteine formt bei heterologer Expression homo-oligomere funktionsfähige Kanäle. Untersuchungen der P2X-artigen ATP-Antwort einiger nativer Gewebe lässt aber auch auf die Existenz hetero-oligomerer Rezeptoren schließen, wie sie auch bei fast allen anderen Ionenkanälen vorkommen, so z.B. bei den durch Azetylcholin, Glutamat, GABA oder Glyzin aktivierten Kanälen (Torres, Egan, and Voigt, 1999). So wird die Reaktion auf ATP einiger sensorischer Nerven, sympathischer Ganglienzellen und zerebraler Neuronen auch durch α,β -methyl-ATP ausgelöst, ohne dass hier die für P2X1 oder P2X3 typische, im Millisekunden-Bereich auftretende Desensitivierung zu beobachten wäre. Diese Art von Antwort kann auch bei Aktivierung heterolog koexprimierter P2X2- und P2X3-Rezeptoren beobachtet werden. Es ist zu vermuten, dass diese beiden Vertreter zusammen einen hetero-oligomeren Kanal aufbauen, da das beschriebene elektrophysiologische Verhalten nicht mit der Aktivierung der voneinander unabhängigen homomeren Rezeptoren erklärbar wäre (Lewis, Neidhart et al., 1995). Gestützt wird diese Annahme durch Koimmunopräzipitationsexperimente (KIP) (Torres, Egan, and Voigt, 1999). Die Interpretation der funktionellen Ergebnisse erscheint im Falle des P2X2/3-Rezeptors einigermaßen einfach: Der homomere P2X2-Rezeptor lässt sich durch α,β -methyl-ATP nicht aktivieren, wohingegen der homomere P2X3-Rezeptor schnell desensitiviert und einen deutlichen Run-Down durchmacht. Der heteromere P2X2/3 Rezeptor übernimmt also einige Eigenschaften des P2X2- ebenso wie einige des P2X3-Rezeptors (North, 2002).

Im Allgemeinen werden die Ergebnisse bei heteromeren Rezeptoren aber dadurch kompliziert, dass neben diesen auch ein bestimmter Anteil der jeweiligen homomeren Rezeptoren exprimiert wird. Andere beschriebene hetero-oligomere Rezeptoren sind P2X1/5, P2X2/6 und P2X4/6. Hinweise darauf ergeben sich aus verschiedenen Ansätzen wie Northern-blot-Untersuchungen, In-Situ-Hybridisationen, immunhistochemischen Studien sowie den schon erwähnten KIP und funktionellen Untersuchungen nativer und heterolog exprimierter Rezeptoren. Dabei kann für den P2X7-Rezeptor keine KIP mit irgendeinem anderen P2X-Rezeptor-Protein gezeigt werden, wohl aber neben den oben erwähnten für P2X1/2, 1/3, 1/6, 2/5, 2/6, 3/5, 4/5, und 5/6 (Torres, Egan, and Voigt, 1999). Dabei kann nicht notwendigerweise aus vorhandener Koimmunopräzipitation auf die Formierung eines funktionsfähigen heteromeren Rezeptors mit neuem Phänotyp geschlossen werden. Umgekehrt ist aber bisher kein heteromere P2X-Rezeptor mit distinktem Phänotyp bekannt, dessen Untereinheiten nicht koimmunopräzipitieren würden. Trotzdem kann bei fehlender Koimmunopräzipitation eine funktionelle Interaktion verschiedener P2X Subtypen nicht ausgeschlossen werden.

2 Zielstellung

In dieser Arbeit soll für humane P2X1- und P2X7-Rezeptoren nach heterologer Expression in Oozyten von *Xenopus Laevis*

1. nach Hinweisen auf eine funktionelle Interaktion der beiden Rezeptoren gesucht werden. Dabei wird in Erwägung gezogen, dass trotz negativer biochemischer Befunde wie der fehlenden Koimmunopräzipitation die beiden Subtypen einen heteromeren Kanal mit distinkten Eigenschaften formen könnten. Eine andere Möglichkeit der Interaktion wäre die Beeinflussung des hP2X1-Rezeptors durch hP2X7-Rezeptor-abhängige Signalkaskaden (PKC, PLD, Tyrosinkinasen). Dazu sollen die durch ATP induzierten Ionenströme in Voltage-clamp-Technik aufgenommen und hinsichtlich ihrer Kinetik der Aktivierung, der Deaktivierung sowie Desensitivierung charakterisiert und mit den Befunden der homomeren Rezeptoren verglichen werden.
2. nach Möglichkeiten gesucht werden, die beiden Rezeptorsubtypen isoliert zu aktivieren bzw. zu antagonisieren. Zum einen sollen auch hier etwaige Interaktionen untersucht werden, zum anderen könnten Methoden aufgezeigt werden, die durch P2X1 und P2X7 vermittelten Effekte in nativen Zellen, die beide Rezeptoren koexprimieren, voneinander zu trennen und isoliert zu untersuchen.

3 Material und Methodik

3.1 Material

Falls nicht anders angegeben, stammen die Materialien von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Die Synthese von NF279 und NF449 erfolgte nach den publizierten Methoden (Hohenegger, Waldhoer et al., 1998; Klapperstück, Büttner, Nickel, Schmalzing, Lambrecht, and Markwardt, 2000b; Hülsmann, Nickel, Kassack, Schmalzing, Lambrecht, and Markwardt, 2003))

3.2 Methodik

3.2.1 RNA-Präparation

Es wurde cRNA von hP2X1 und hP2X7 verwendet, die aus dem Labor von G. Schmalzing zur Verfügung gestellt wurde (Klapperstück, Büttner, Schmalzing, and Markwardt, 1999). P2X1 und P2X7 wurden dabei aus Ganzzell-RNA aus humanen B-Lymphozyten mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer geklont. Die Sequenz der entsprechenden Primer folgt den publizierten Sequenzen von P2X1 bzw. P2X7 (Rassendren, Buell, Virginio, Collo, North, and Surprenant, 1997). Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung entsprechender Restriktionslängen in den Vektor pNKS2 eingefügt (Gloor, Pongs et al., 1995). Die erhaltene Aminosäuresequenz des P2X1 entsprach den publizierten Daten (Valera, Hussy, Evans, Adami, North, Surprenant, and Buell, 1994), wohingegen P2X7 in zwei Aminosäureresten (G441 und A496) von der publizierten Sequenz abwich (Rassendren, Buell, Virginio, Collo, North, and Surprenant, 1997).

3.2.2 Behandlung der Oozyten

Die von uns benutzten *Xenopus Laevis* Weibchen wurden von der African Xenopus Facility (Knysna, Republic of South Africa) bezogen. Um die Oozyten zu präparieren, wurden die Tiere in einer wässrigen Lösung, der 2 g/l Tricain zugesetzt wurde, anästhetisiert (Lösung a, siehe Tabelle 1). Durch eine kleine Inzision an der Bauchseite wurden Teile des Ovars entfernt und zur Separation der Oozyten über Nacht mit Kollagenase behandelt (Lösung b). Danach wurden die Zellen mehrmals in Ca^{2+} -freier Lösung gespült (Lösung c). Die Aufbewahrung erfolgte dann in mit Oozyten-Ringer-Lösung (Lösung d) gefüllten Petri-Schalen. Ein bis vier Tage vor den Messungen wurden den Oozyten der Reifegrade V oder VI 20 nl (bei isoliert injizierten) bzw. 40 nl (bei Ko-injektion) cRNA injiziert und dann in mit Antibiotika versetzter Oozyten-Ringer-Lösung bei 19°C inkubiert (Lösung e).

3.2.3 Elektrophysiologie

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) ausgeführt. Die Messung der Ströme erfolgte mittels Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik. Die Elektroden wurden aus Borosilikat-Glas Kapillaren gezogen und mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. Es wurden nur Elektroden mit einem Widerstand zwischen 0,9 und 1,5 M Ω benutzt. Die Ströme wurden mit Hilfe eines Oozyten-Spannungsklemmverstärkers (OC-725C, Hamdon, USA) aufgenommen, bei 100 Hz gefiltert und danach mit 85 Hz digitalisiert. Die aufgenommenen Daten wurden auf einem Personalcomputer mit Hilfe einer am Institut für Physiologie entwickelten Software gespeichert und analysiert.

Ein schneller und reproduzierbarer Lösungswechsel wurde mit einer kleinen (0,1 ml) wannenförmigen Kammer erreicht, durch welche die Lösungen mit ca. 75 μ l/s strömten. Das Umschalten zwischen den verschiedenen Lösungen wurde mit mehreren Computer-gesteuerten Magnetventilen bewerkstelligt, die ein modifiziertes U-Rohr-System kontrollierten (Bretschneider and Markwardt, 1999). Die Einwaschzeit betrug 1210 ± 70 ms und die Auswaschzeit 1770 ± 170 ms (Klapperstück, Büttner, Böhm, Schmalzing, and Markwardt, 2000a).

Das Abgleichen der Elektroden und Messung des Membranpotenzial der Oozyten erfolgte in Oozyten-Ringer-Lösung (Lösung f). ATP-induzierte Ströme wurden bei einem Haltepotenzial von -40 mV gemessen. Um Ca²⁺-induzierte Ströme zu vermeiden, wurden alle Messungen in Ca²⁺-freier Lösung ausgeführt (Lösung g); Ebenso wurde, wenn nicht anders angegeben, der Badlösung kein Mg²⁺ zugesetzt, denn der wirksame Agonist am humanen P2X7 ist freies ATP⁴⁻ (Markwardt, Löhn et al., 1997; Di Virgilio, 1995). Daher hätte der Zusatz von Mg²⁺ zur Badlösung wegen der Komplexbildung die benötigte ATP-Menge, die zur Erreichung einer ausreichenden Konzentration erforderlich gewesen wäre, zu nicht mehr löslichen Werten hin verschoben und die Osmolarität der Lösung beträchtlich erhöht (Di Virgilio, 1995; Markwardt, Löhn, Böhm, and Klapperstück, 1997). Da deshalb das gesamte ATP in der Lösung als ATP⁴⁻ vorliegt, werden Konzentrationen vereinfacht immer nur als ATP-Konzentrationen angegeben. Das Fehlen divalenter Kationen in der Lösung aktivierte einen starken Leckstrom, der mittels 0,1 mM Flufenaminsäure unterdrückt wurde (Weber, Liebold et al., 1995). Flufenaminsäure verstärkte hP2X1- und hP2X7-abhängige Ströme um den Faktor $1,58 \pm 0,17$ bzw. $1,25 \pm 0,14$.

Für die genaue Analyse der dosisabhängigen Effekte wurden verschiedene Konzentrationen verschiedener Agonisten und Antagonisten in zufälligen Sequenzen appliziert. Zu Beginn eines jeden Experimentes wurde 0,1 mM ATP für 6 s dreimal im Abstand von 4 min appliziert, und, falls nicht anders angegeben, der dritte Wert als Vergleichswert herangezogen. Dieses Schema wurde gewählt, da Pilotversuche zeigten, dass nach der dritten Applikation die gemessenen Amplituden nur noch wenig variierten (Streuung <20%). Für Untersuchungen mit Antagonisten wurden diese, falls nicht anders angegeben, 20 sec. vor dem Agonisten für ca. 60 sec. appliziert und danach ca. 3 min mit divalentfreier Badlösung (Lösung g, Tabelle 1) ausgewaschen. Die P2X-abhängigen

Ströme wurden als Gipfelstrom (I_{peak} für P2X1) bzw. als Strom nach 6 s (I_{late} für P2X7), jeweils abzüglich des Haltestromes vor der Applikation gemessen. Diese Zuordnung gilt sowohl für die einzeln injizierten als auch für die koinjizierten Zellen.

Um den Grad der Desensitivierung des P2X1-Rezeptors möglichst konstant zu halten, folgte jeder ATP-Applikation mit einer Konzentration, die kleiner war als 0,1 mM ATP, eine Applikation von 0,1 mM ATP im Abstand von ca. 30 s. Der nächste Messwert des jeweiligen Versuches wurde dann immer nach 4 min erhoben. Um den unterschiedlichen Expressionsgrad der verschiedenen Zellen zu berücksichtigen, wurden, falls nicht anders angegeben, die P2X-abhängigen Ströme bei verschiedenen Agonisten- bzw. Antagonistenkonzentrationen in Bezug zu den Werten gesetzt, die durch 0,1 mM ATP induziert wurden.

Nichtlineare Approximationen sowie die graphische Darstellung der Daten wurden mit Hilfe des Programms Sigmaplot (Jandel, Corte Madeira, USA) erstellt. Gemittelte Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben bzw. dargestellt.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch one-way repeated measures analysis of variance (ANOVA). Statistische Signifikanz bei Differenzen von Mittelwerten wurde mittels paarweisem multiplen T-Test durch das Program Sigmastat getestet (Jandel). Signifikante Unterschiede der Mittelwerte wurden bei $P < 0,05$ angenommen.

Tabelle 1

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

4 Ergebnisse

4.1 Kinetik der hP2X1-, hP2X7- und hP2X1/7-abhängigen Ionenkanalströme

4.1.1 Beispiele und Approximationen der Zeitverläufe von hP2X1-, hP2X7- und hP2X1/7-abhängigen Ionenkanalströmen

In diesem Teil wird untersucht, ob die Koexpression von humanen P2X1- (hP2X1) und humanen P2X7- (hP2X7) Rezeptoren in Oozyten von *Xenopus Laevis* zu einer Interaktion der Rezeptoren mit Veränderung des elektrophysiologischen Verhaltens führt. Dazu wurden hP2X1 und hP2X7 zunächst isoliert exprimiert. Um die Schaltkinetik der Rezeptoren quantitativ vergleichen zu können, wurde der Zeitverlauf der durch 0,1 und 0,001 mM ATP erzeugten hP2X1-, hP2X7- und hP2X1/7-abhängigen Ströme nichtlinear approximiert. In den Kapiteln 4.1.2 und 4.1.3 werden die einander entsprechenden Parameter der Approximationen dann miteinander verglichen. Einen Beispielstrom mit entsprechendem Fit für einen isolierten hP2X1 zeigt Abb. 1.

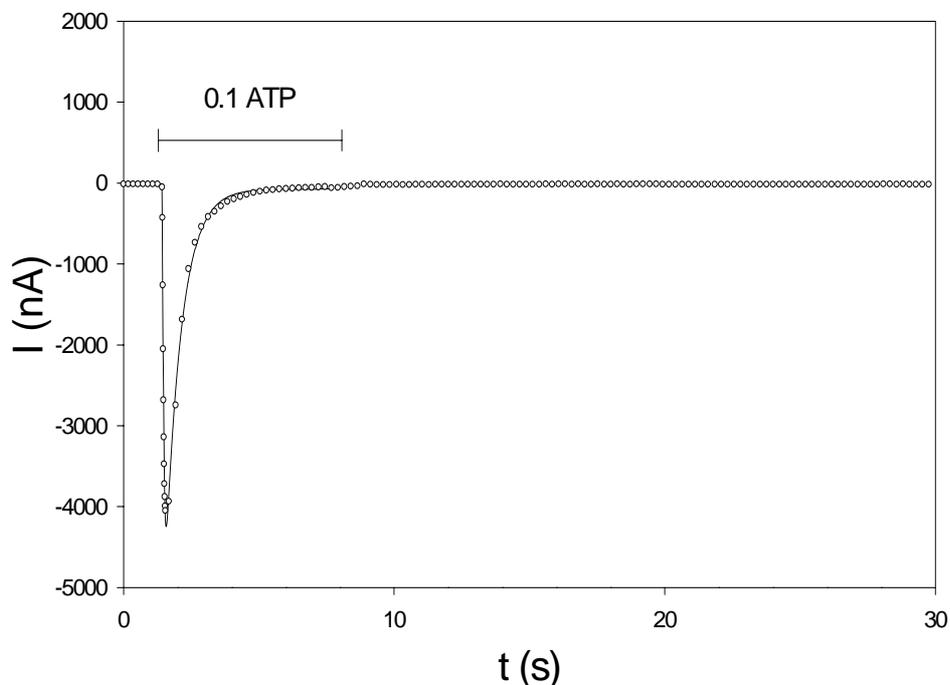


Abb. 1: Beispielstrom für isolierten hP2X1. Die Applikation von ATP (in mM) ist markiert. Das Haltepotenzial betrug wie in allen anderen Messungen -40 mV. Die Messung erfolgte in Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Ba^{2+} -freier Lösung (Lösung g, Tabelle 1) am zweiten Tag nach Injektion

(dpi) von 20 nl im Verhältnis 1:5 verdünnter mRNA. O stellen den tatsächlich aufgenommenen Strom dar, die durchgezogene Linie repräsentiert die Approximation. In diesem Beispiel ist $R_{act} = 22,6 \text{ s}^{-1}$; $R_{inact} = 1,67 \text{ s}^{-1}$; $Gr_{noninact} = 0,01$. Für weitere Erklärungen siehe Text.

hP2X1-abhängige Ströme wurden entsprechend nachfolgender Gleichung 1 gefittet.

$$I_{P2X1,act}(t) = I_0 + I_{act} \cdot (1 - e^{-R_{act} \cdot t}) \cdot (Gr_{noninact} + e^{-R_{inact} \cdot t}) \quad \text{Gleichung 1}$$

Dabei ist I_0 der Haltestrom ohne ATP-Applikation, I_{act} der aktivierende Strom, und R_{act} und R_{inact} die Ratekonstanten für die Aktivierung und Inaktivierung bzw. Desensitivierung. Im weiteren soll hierfür nur noch der Begriff der Desensitivierung gebraucht werden. $Gr_{noninact}$ repräsentiert den nicht-desensitivierenden Anteil des aktivierenden Stromes I_{act} .

Ein Beispiel für einen isolierten hP2X7-abhängigen Strom mit entsprechender Approximation zeigt Abb. 2.

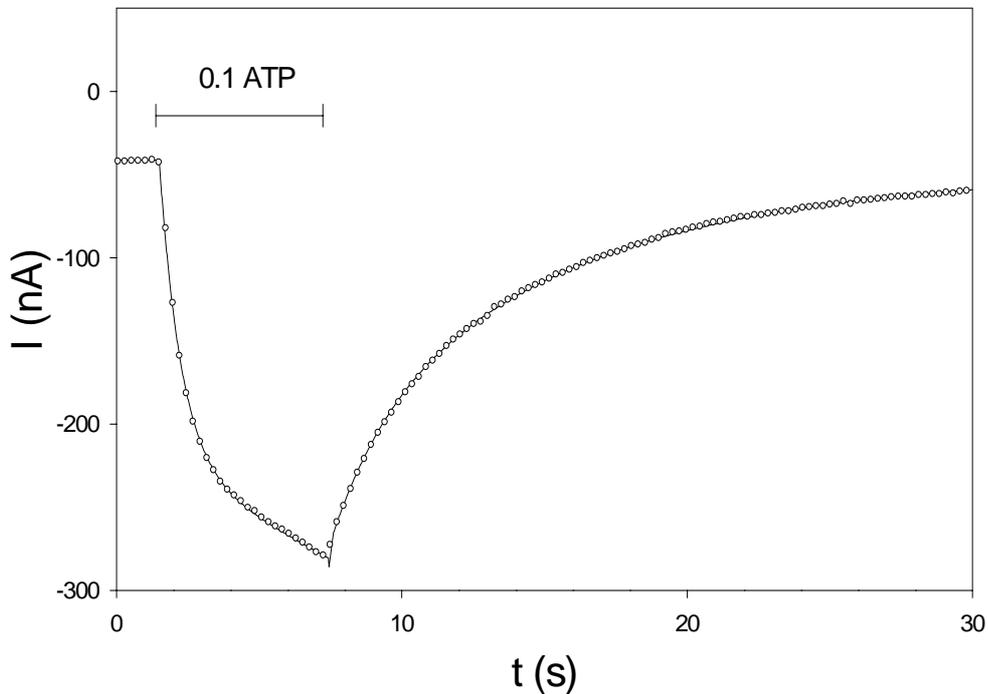


Abb. 2: Beispielstrom für isolierten hP2X7. Die Zeit der ATP-Applikation (in mM) ist markiert. Die übrigen Bedingungen entsprechen denen in Abb. 1. O zeigt den tatsächlich aufgenommenen Strom, die durchgezogene Linie repräsentiert den Fit. In diesem Beispiel

ist $\text{slope}_{\text{act}} = -9,4 \text{ nA/s}$; $R_{1\text{deact}} = 0,55 \text{ s}^{-1}$; $R_{2\text{deact}} = 0,12 \text{ s}^{-1}$ und $I_{\text{deact},1} / I_{\text{deact},1} + I_{\text{deact},2} = 0,26$ und $R_{\text{act}} = 1,31 \text{ s}^{-1}$. Erklärungen siehe Text.

Der aktivierende Teil dieser durch 0,1 mM ATP induzierten hP2X7-abhängigen Ströme zeigt zwei Komponenten: eine schnelle, exponentiell zunehmende Komponente und eine langsamere, linear zunehmende Komponente; Er wurde entsprechend nachfolgender Gleichung 2 approximiert.

$$I_{\text{act}}(t) = I_{\text{act},\infty} \cdot (1 - e^{-R_{\text{act}} \cdot t}) + \text{slope}_{\text{act}} \cdot t + I_0 \quad \text{Gleichung 2}$$

Dabei ist $I_{\text{act},\infty}$ die Amplitude des aktivierenden Stromes bei theoretisch unendlich langer ATP-Applikation, R_{act} die Ratekonstante der Aktivierung, $\text{slope}_{\text{act}}$ der Anstieg der linear zunehmenden Komponente der Aktivierung und I_0 wie in Gleichung 1 der Haltestrom ohne ATP-Applikation.

Die Deaktivierung des P2X7-Rezeptors erfolgt ebenfalls biphasisch, d.h. es gibt eine schnell und eine langsam deaktivierende Komponente. Der deaktivierende Teil der P2X7-abhängigen Ströme wurde entsprechend:

$$I_{\text{deact}}(t) = I_{\text{deact},1} \cdot e^{-R_{\text{deact},1} \cdot t} + I_{\text{deact},2} \cdot e^{-R_{\text{deact},2} \cdot t} + I_0 \quad \text{Gleichung 3}$$

gefittet.

Hier ist $I_{\text{deact},1}$ die Amplitude der schnellen Deaktivierung, $I_{\text{deact},2}$ die Amplitude der langsamen Deaktivierung, $R_{\text{deact},1}$ die Ratekonstante der schnellen und $R_{\text{deact},2}$ die Ratekonstante der langsamen Deaktivierung, I_0 besitzt die gleiche Bedeutung wie in Gleichung 1 und Gleichung 2.

Bei der Aktivierung der hP2X1/7-abhängigen Ströme kann man ebenfalls zwei Komponenten abgrenzen. Eine sehr schnelle, desensitivierende Komponente, die einem hP2X1-abhängigen Strom zu entsprechen scheint, wird gefolgt von einer langsamen Komponente, die anscheinend einem hP2X7-abhängigen Strom entspricht. Die Relation der beiden Komponenten zueinander ist dabei abhängig von der applizierten ATP-Konzentration. Beispiele für hP2X1/7-abhängige Ströme bei drei verschiedenen ATP-Konzentrationen zeigt Abb. 3.

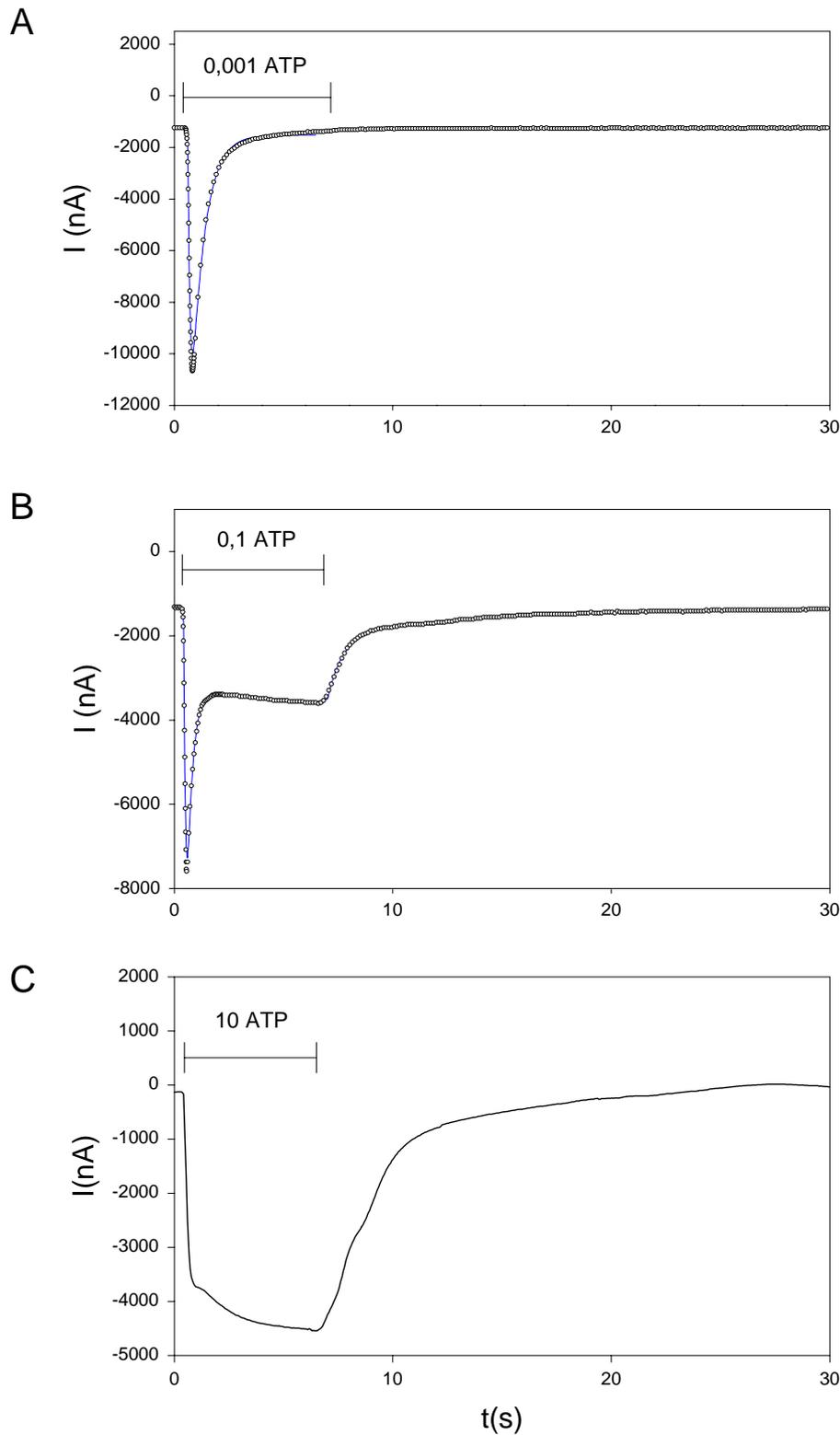


Abb. 3: Beispielströme für koinjizierte hP2X1/7 Rezeptoren bei drei verschiedenen ATP-Konzentrationen. Es wurden 0,001 (A), 0,1 (B) bzw. 10 mM ATP (C) wie angegeben appliziert. Die gezeigten Messungen stammen von drei verschiedenen Oozyten. Es wurden jeweils 20 nl 1:5 verdünnter mRNA für hP2X1 und hP2X7 injiziert. Die Messungen

erfolgten am zweiten Tag nach der Injektion. In **A** und **B** zeigt O den tatsächlich aufgenommenen Strom, die durchgezogene Linie repräsentiert hier den Fit. In **C** zeigt die durchgezogene Linie den aufgenommenen Strom. Folgende Parameter wurden approximiert: **A**: $R_{act} = 11,04 \text{ s}^{-1}$; $R_{inact} = 1,69 \text{ s}^{-1}$; $Gr_{noninact} = 0,02$; **B**: $R_{act} = 13,3 \text{ s}^{-1}$; $R_{inact} = 4,14 \text{ s}^{-1}$; $Gr_{noninact} = 0,18$; $slope_{act} = -45,5 \text{ nA/s}$; $R_{deact,1} = 1,5 \text{ s}^{-1}$; $R_{deact,2} = 0,16 \text{ s}^{-1}$; und $I_{deact,1} / (I_{deact,1} + I_{deact,2}) = 0,30$. Für nähere Erklärung siehe Text.

Dabei soll die Bezeichnung hP2X1/7 nur die Koexpression der beiden Subtypen in einer Oozyte, und nicht die Annahme eines eigenständigen, hetero-oligomeren Rezeptors verdeutlichen.

Der aktivierende Teil dieser hP2X1/7-abhängigen Ströme wurde bei ATP-Konzentrationen von 0,1 mM entsprechend:

$$I_{P2X1/7,act}(t) = I_0 + slope_{act} \cdot t + I_{act} \cdot (1 - e^{-R_{act}t}) \cdot (Gr_{noninact} + e^{-R_{inact}t}) \quad \text{Gleichung 4}$$

approximiert. Die Parameter besitzen hier die gleiche Bedeutung wie in Gleichung 1 und Gleichung 2. Der Zeitverlauf der Deaktivierung der durch 0,1 mM ATP induzierten Ströme wurde sowohl für hP2X7 als auch hP2X1/7 entsprechend Gleichung 3 approximiert.

Die durch 0,001 mM ATP aktivierten Ströme bei hP2X1/7 wurden entsprechend Gleichung 1 approximiert, da bei dieser Konzentration weder eine langsame Aktivierungskomponente noch die für hP2X7 charakteristische zweiphasige Deaktivierung abgrenzbar war.

4.1.2 Vergleich der Schaltkinetiken von isoliertem hP2X1 und hP2X1/7

Bei der statistischen Analyse der für hP2X1 und hP2X1/7 identischen Parameter R_{act} (siehe Abb. 4), R_{inact} (siehe Abb. 5) und $Gr_{noninact}$ (siehe Abb. 6) fanden sich bei Aktivierung mit einer ATP-Konzentration von 0,001 mM ATP keine signifikanten Unterschiede, ebensowenig für R_{act} und R_{inact} bei Aktivierung mit einer ATP-Konzentration von 0,1 mM ATP. Bei letzterer allerdings erhöht sich bei hP2X1/7-abhängigen Strömen $Gr_{noninact}$ als Ausdruck eines nicht desensitivierenden Stromes signifikant gegenüber hP2X1 um ca. das 4,5-fache, und zwar von $0,009 \pm 0,002$ bei hP2X1 auf $0,04 \pm 0,005$ bei hP2X1/7. Dies ist vermutlich Ausdruck einer hP2X7-abhängigen Stromkomponente, die bei 0,1 mM ATP, jedoch noch nicht bei 0,001 mM ATP den Stromkurvenverlauf gegenüber isoliertem hP2X1 beeinflusst. Dies entspricht der im Vergleich mit hP2X1 geringeren Sensitivität des hP2X7-Rezeptors gegenüber ATP.

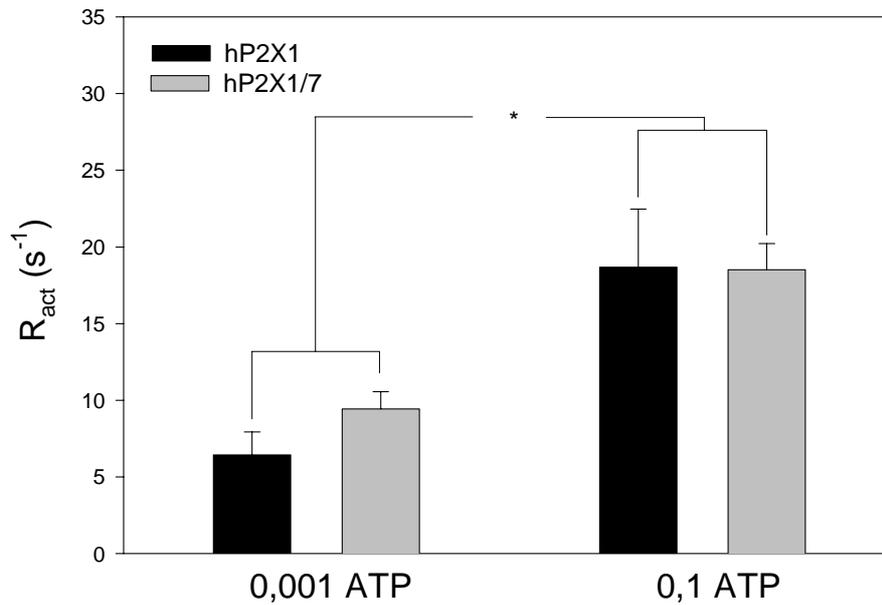


Abb. 4: Vergleich der Ratekonstante der Aktivierung R_{act} bei hP2X1 und hP2X1/7, Es wurden 0,001 bzw. 0,1 mM ATP wie angegeben appliziert. Dargestellt ist der Mittelwert aus Messungen an jeweils 5 bis 7 verschiedenen Oozyten. Bei beiden Konzentrationen findet sich bezüglich R_{act} kein signifikanter Unterschied zwischen hP2X1 und hP2X1/7. Für beide ist aber der Anstieg der Ratekonstante bei Vergrößerung der applizierten ATP-Dosis jeweils signifikant (dargestellt mit *). Zur Erklärung der Parameter siehe Kapitel 4.1.1.

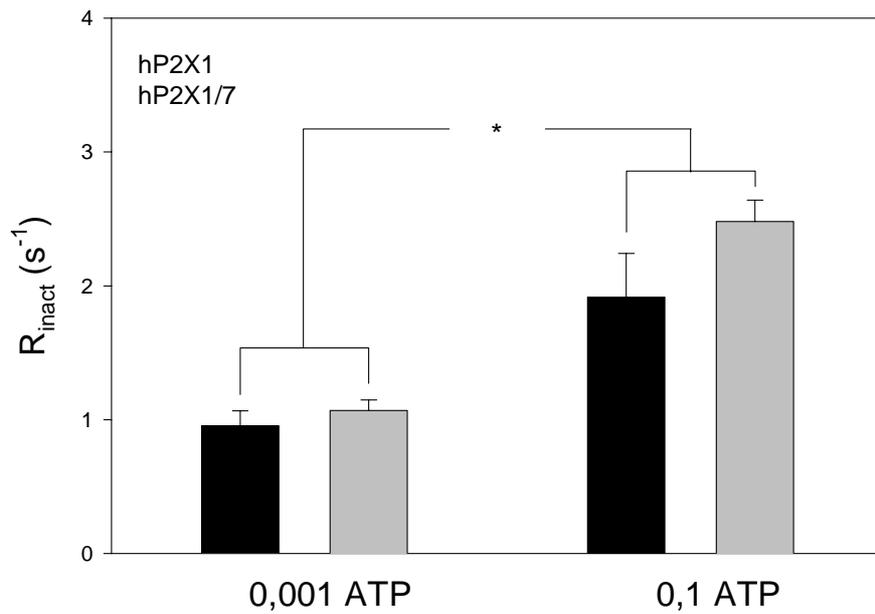


Abb. 5: Vergleich der Ratekonstante der Inaktivierung R_{inact} bei hP2X1 und hP2X1/7.

Versuchsbedingungen wie in Abb. 4, die Werte stammen aus dem gleichen Versuch. Bei den wie angegeben applizierten ATP-Dosen findet sich auch hinsichtlich des Parameters R_{inact} kein signifikanter Unterschied zwischen hP2X1 und hP2X1/7. Die Ratekonstante der Inaktivierung (R_{inact}) steigt jedoch bei Vergrößerung der applizierten ATP-Dosis jeweils signifikant an.

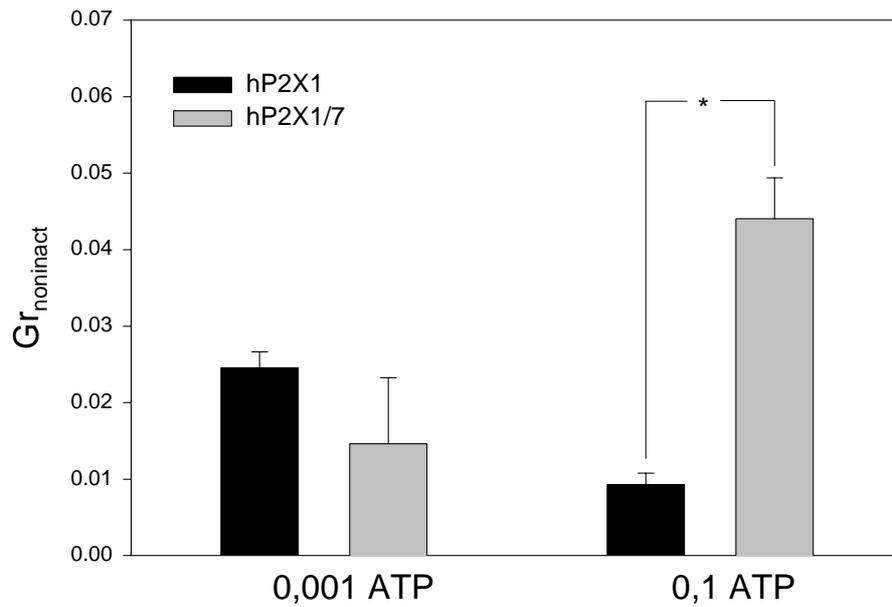


Abb. 6: $G_{r_{\text{noinact}}}$ bei hP2X1 und hP2X1/7. Die Werte stammen aus dem gleichen Versuch wie die der Abb. 4 und 5, es wurden 0,001 bzw. 0,1 mM ATP in divalentfreier Lösung (Lösung g) appliziert. Für weitere Erklärung siehe Text Kapitel 4.1.2

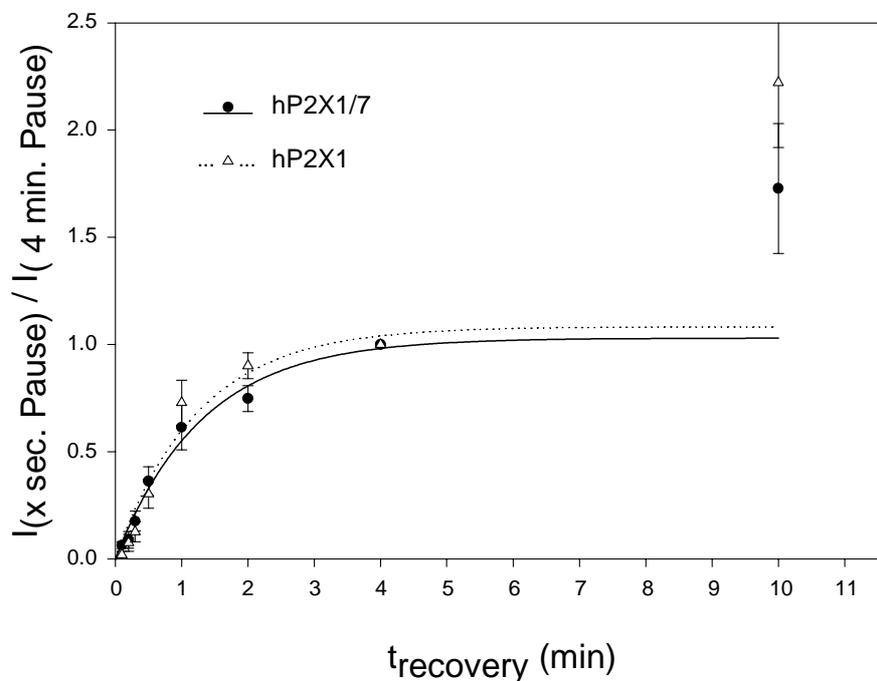


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Rückkehr aus der Desensitivierung bei hP2X1 und hP2X1/7. hP2X1- und hP2X1/7-abhängige Ströme wurden durch Applikation von 0,1 mM ATP nach unterschiedlich langen Erholungszeiten zwischen zwei Applikationen aktiviert und die

gemessenen Gipfelströme (I) auf den entsprechenden Wert nach 4 min Erholung normiert.
N = 3 - 8.

Abb. 7 veranschaulicht das Verhalten der Gipfelströme während der Rückkehr aus der Desensitivierung bei hP2X1/7 im Vergleich zu hP2X1. Die Koexpression verändert das Verhalten dieser Komponente nicht. Während des angegebenen Zeitraumes (10 min) wird keine vollständige Erholung der Rezeptoren erreicht.

4.1.3 Vergleich der Schaltkinetiken von isoliertem hP2X7 und hP2X1/7

Der Vergleich der Kinetik der Aktivierung und Deaktivierung des hP2X7-Rezeptors und der koinjizierten hP2X1/7-Rezeptoren erfolgte anhand der Stromkurvenverläufe, die durch 0,1 mM ATP aktiviert wurden. Die verwendeten Approximationen wurden in Kapitel 4.1.1 dargestellt.

Aktivierung

Für den Vergleich der Kinetik der Aktivierung bietet sich nur der Parameter $\text{slope}_{\text{act}}$ an, der bei der Approximation der Aktivierung sowohl von hP2X7 als auch von hP2X1/7 Eingang findet. Er repräsentiert die linear zunehmende Komponente während der Aktivierung von hP2X7. Wie Abb. 8 zeigt, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen hP2X1 und hP2X1/7 bezüglich dieses Parameters.

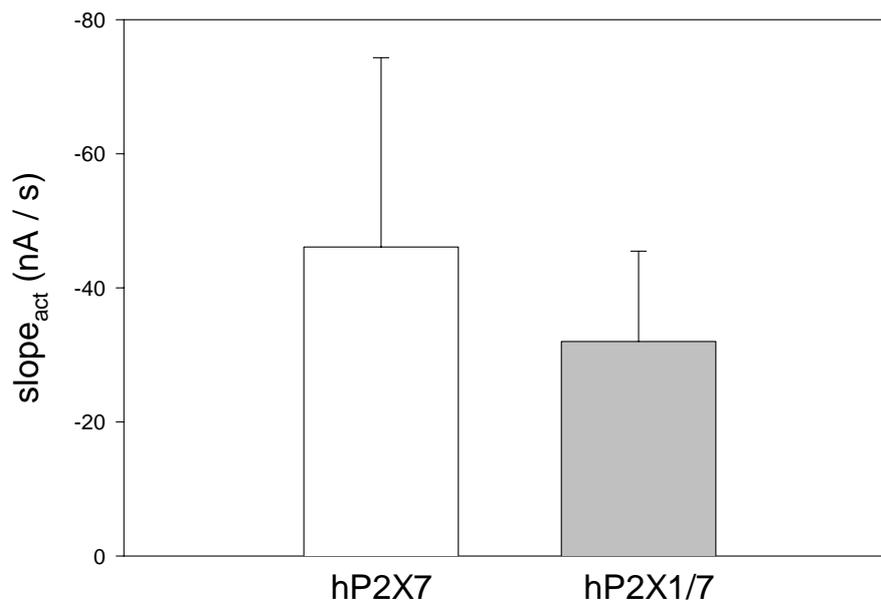


Abb. 8: Vergleich des Anstiegs der linear zunehmenden Komponente der Aktivierung ($\text{slope}_{\text{act}}$) bei hP2X7- und hP2X1/7-abhängigen Strömen. Es wurde 0,1 mM ATP für die

Dauer von 6 s. appliziert. Die Messungen erfolgten am zweiten Tag nach der Injektion an 6 bzw. 9 verschiedenen Oozyten. Zu den verwendeten Approximationen siehe Kapitel 4.1.1.

Deaktivierung

Hinsichtlich der Kinetik der Deaktivierung nach Unterbrechung der ATP-Applikation unterscheiden sich die beiden Ratekonstanten der schnellen ($R_{\text{deact},1}$) und langsamen ($R_{\text{deact},2}$) Deaktivierung beim Vergleich zwischen hP2X7 und hP2X1/7 nicht signifikant, wie Abb. 9 illustriert

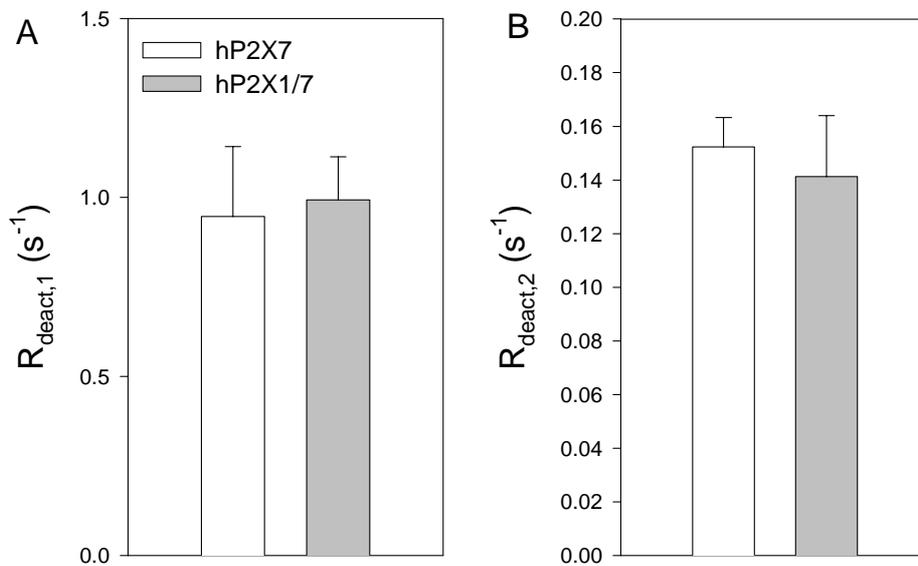


Abb. 9: Vergleich der Ratekonstanten der schnellen Deaktivierung $R_{\text{deact},1}$ (A) und der langsamen Deaktivierung $R_{\text{deact},2}$ (B) bei hP2X7 und hP2X1/7. Die Werte stammen aus dem gleichen Versuch wie die in Abb.8. Zu den verwendeten Approximationen siehe Kapitel 4.1.1.

Eine signifikante Differenz von 30 % besteht hinsichtlich des Anteils der Amplitude der schnellen Deaktivierung $I_{\text{deact},1}$ an der Gesamtdeaktivierung. Dieser Anteil beträgt bei hP2X7-abhängigen Strömen $46 \pm 10\%$, bei hP2X1/7-abhängigen Strömen $75 \pm 10\%$. Abb. 10 illustriert diesen Zusammenhang. Die Ursache dürfte in der zusätzlichen schnellen Deaktivierung der nicht-desensitivierenden Komponente des hP2X1-abhängigen Stromes beim P2X1/7-Rezeptor liegen.

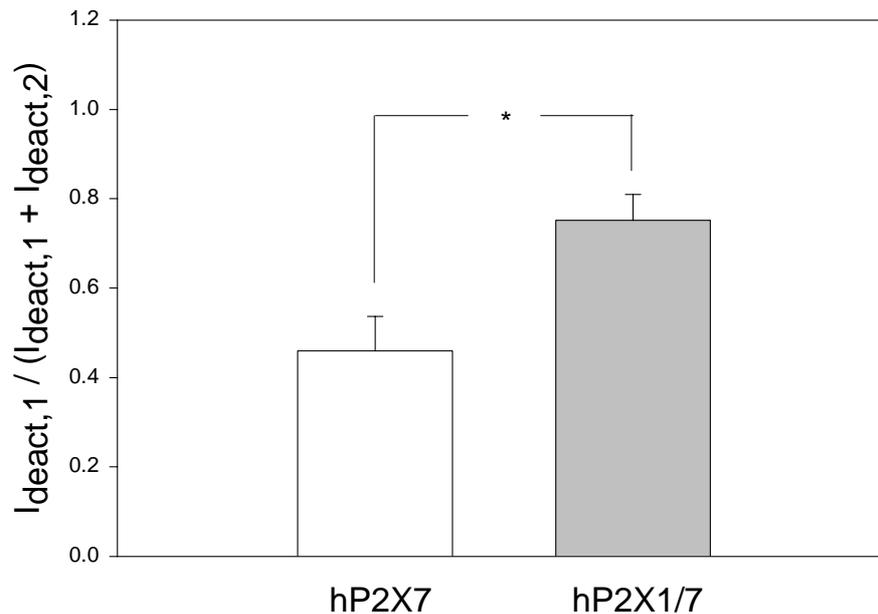


Abb. 10: Der Anteil der Amplitude der schnellen Deaktivierung $I_{\text{deact},1}$ an der Gesamtdeaktivierung $I_{\text{deact,total}}$ bei hP2X7 und hP2X1/7. $I_{\text{deact,total}} = I_{\text{deact},1} + I_{\text{deact},2}$. Gleicher Versuch wie in den Abb. 8 und Abb. 9. Zu den verwendeten Approximationen siehe Kapitel 4.1.1. Für weitere Informationen siehe Text Kapitel 4.1.3.

4.2 Pharmakologische Charakteristika der hP2X1/7-vermittelten Ströme

4.2.1 Wirkung von ATP auf hP2X1/7 und die beiden Subtypen im Vergleich

In folgenden wurde untersucht, ob die Koexpression von hP2X1- und hP2X7-Rezeptoren die Eigenschaften der ATP-Dosis-Wirkungs-Kurven gegenüber denen bei Einzeldexpression verändert. Abb. 11 zeigt die [ATP]-Abhängigkeit der aktivierten Ströme bei isoliertem hP2X1-Rezeptor zum einen anhand der gemessenen Gipfel-Ströme (Abb. 11 A), zum anderen anhand der errechneten Strom-Zeit-Integrale, also der bewegten Ladungsmengen (Abb. 11 B).

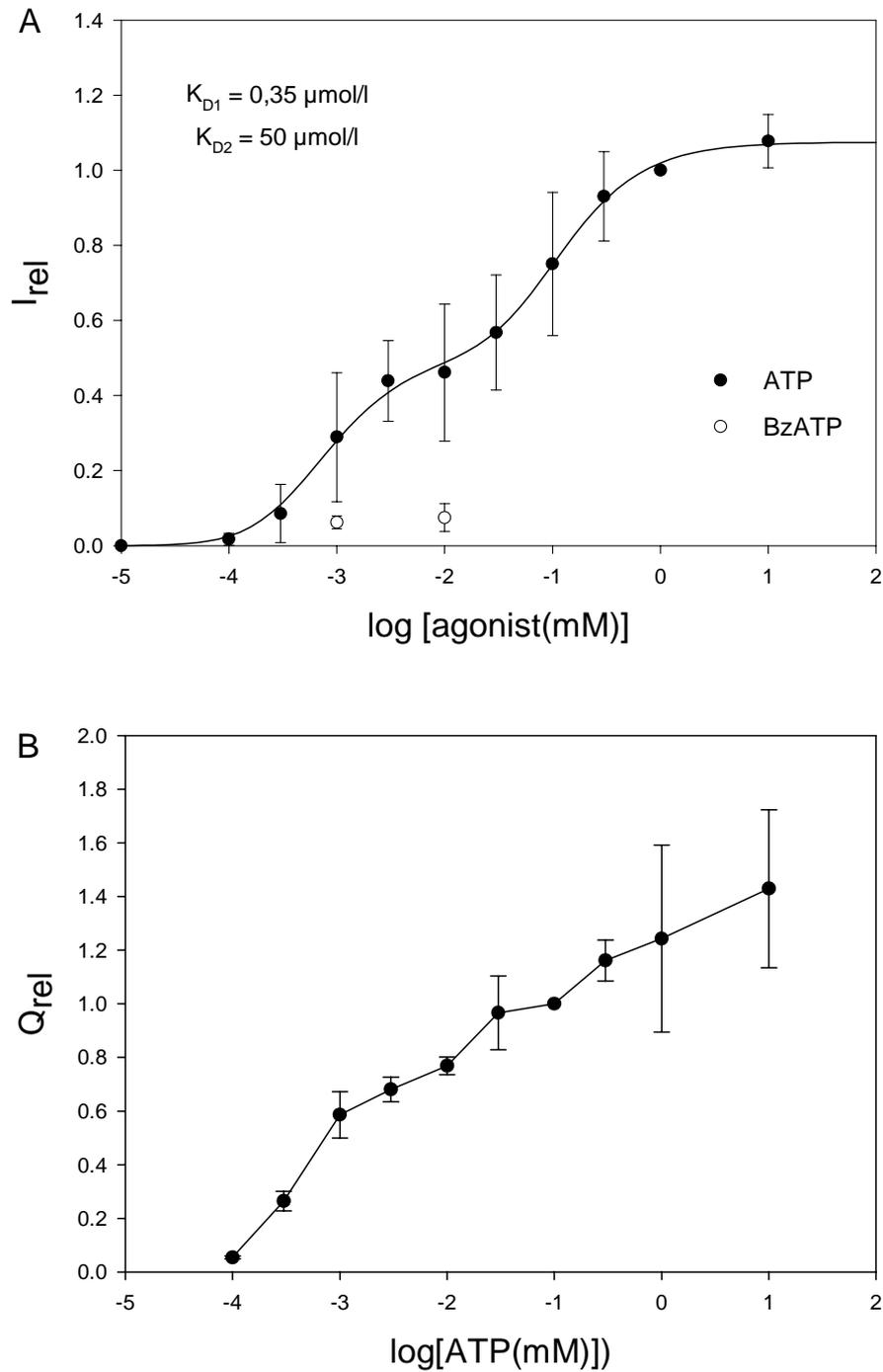


Abb. 11: Dosis-Wirkungs Kurven für hP2X1-abhängige Ströme. A: Um die Abhängigkeit der Amplitude der hP2X1-Rezeptor-vermittelten Gipfel-Ströme von der Konzentration des Agonisten zu bestimmen, wurden verschiedene ATP bzw. BzATP-Konzentrationen für 6 s appliziert. Die gemessenen Amplituden wurden gegen den Wert bei 1 mM ATP normiert. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Fit entsprechend Gleichung 5. $N = 2 - 9$. **B:** Abhängigkeit des Strom-Zeit-Integrals Q_{rel} hP2X1-vermittelter Stöme von der

applizierten ATP-Konzentration, normiert gegen den Wert bei 0,1 mM ATP. Die Werte stammen aus den gleichen Messungen wie die der Abb. 11 A.

Die anhand der Stromamplituden erhaltenen Daten wurden mit einer zweifachen Hill-Funktion entsprechend:

$$I_{rel[ATP]} = \frac{I([ATP])}{I_{cont}} = \frac{I_{rel,max,1}}{\left(1 + \frac{K_{D1}}{[ATP]}\right)^2} + \frac{I_{rel,max,2}}{\left(1 + \frac{K_{D2}}{[ATP]}\right)^2} \quad \text{Gleichung 5}$$

gefittet.

Hier ist [ATP] die jeweils applizierte Konzentration des Agonisten, $I([ATP])$ die dabei gemessene absolute Stromstärke (Amplitude) des ATP-induzierten Stroms, I_{cont} die gemessene Stromamplitude bei Applikation von 1 mM ATP, $I_{rel,max,1}$ die erste und $I_{rel,max,2}$ die zweite maximale relative Stromstärke bei theoretisch unendlich hoher Konzentration des Agonisten. K_{D1} und K_{D2} sind die Konzentrationen des Agonisten, die jeweils eine halbmaximale Aktivierung erreichen.

Diese Funktion impliziert 2 Bindungsstellen für die Aktivierung von hP2X1 mit den scheinbaren Dissoziationskonstanten K_{D1} und K_{D2} . Dabei ergaben sich bei hP2X1 $\log K_{D1} = -3,461 \pm 0,06$ und $\log K_{D2} = -1,284 \pm 0,06$.

Abb. 12 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve für hP2X7-abhängige Ströme. Sie wurde auch mit einer zweifachen Hill-Funktion entsprechend Gleichung 5 gefittet, was ebenfalls die Existenz zweier Bindungsstellen impliziert. Hier ergaben sich $\log K_{D1} = -2,4 \pm 0,117$ und $\log K_{D2} = -0,656 \pm 0,07$.

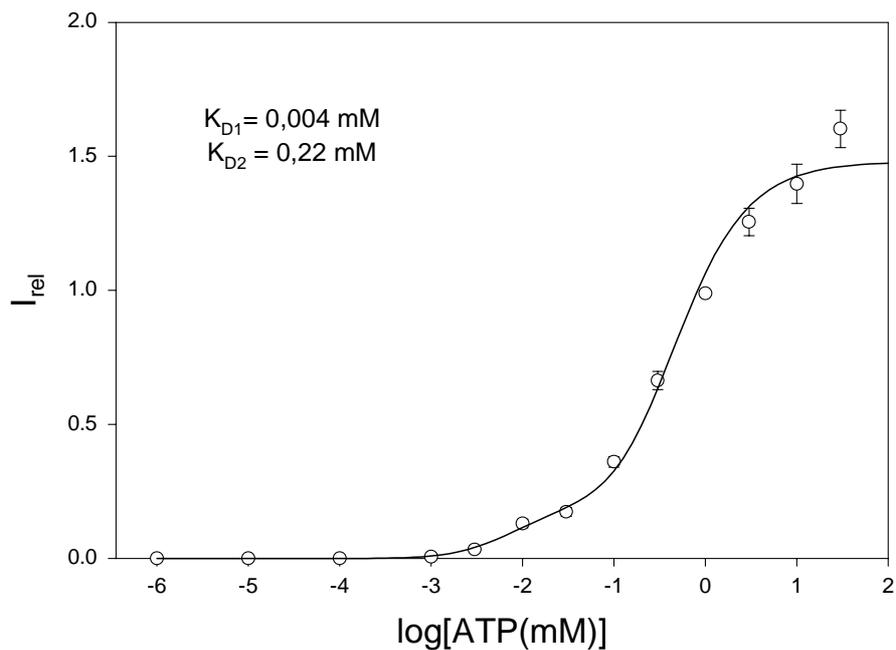


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Kurve für hP2X7-abhängige Ströme. Die durch Applikation verschiedener ATP-Konzentrationen aktivierten hP2X7-abhängigen Ströme wurden auf den durch Applikation von 1 mM ATP aktivierten Strom normiert. Die Dauer der ATP-Applikation betrug 6 s. (Lösung g). Gezeigt werden die Mittelwerte aus Messungen an 2 bis 32 Oozyten. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Fit entsprechend Gleichung 5.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven für die beiden Komponenten I_{peak} und I_{late} bei Koexpression zeigt Abb. 13. Die Komponente I_{peak} bei hP2X1/7-abhängigen Strömen entspricht dabei dem Gipfelstrom wie bei isoliertem hP2X1; I_{late} ist wie bei isoliertem hP2X7 die durch Applikation des Agonisten für die Dauer von 6 s aktivierte Stromamplitude.

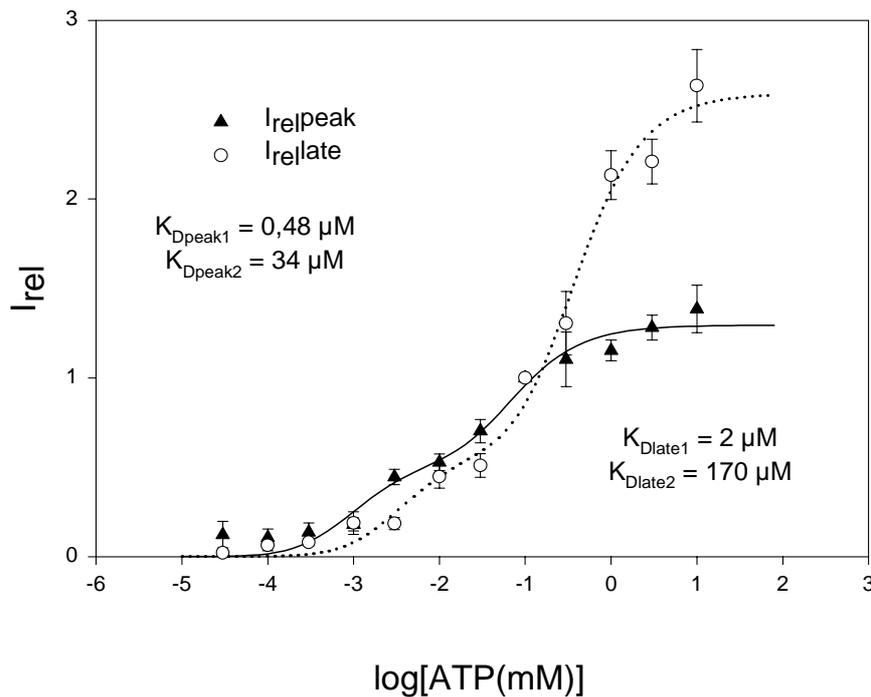


Abb. 13: ATP-Dosis-Wirkungs-Kurven für die beiden Komponenten I_{peak} und I_{late} bei hP2X1/7-abhängigen Strömen. Um bei hP2X1/7-Rezeptor-vermittelten Strömen die Abhängigkeit der Amplitude der beiden Komponenten I_{peak} und I_{late} von der Konzentration des Agonisten zu bestimmen, wurden verschiedene ATP-Konzentrationen für 6 s appliziert. Die jeweils gemessenen Komponenten I_{peak} und I_{late} wurden getrennt auf die entsprechenden Amplituden bei Applikation von 0,1 mM ATP normiert. Gezeigt werden die Mittelwerte aus Messungen an 4 bis 29 Oozyten. Die durchgezogene bzw. gepunktete Linie repräsentieren die jeweiligen Fits entsprechend Gleichung 5 für I_{peak} bzw. I_{late} .

Für die Dosis-Wirkung-Kurven beider Komponenten konnte auch hier eine gute Approximation mit Hilfe einer zweifachen Hill-Funktion entsprechend Gleichung 5 erreicht werden. Damit ergeben sich für die Peak-Komponente zwei $\log K_D$ -Werte von $\log K_{D_{\text{peak}1}} = -3,32 \pm 0,249$ und $\log K_{D_{\text{peak}2}} = -1,47 \pm 0,21$. Für die Komponente I_{late} finden sich $\log K_D$ -Werte von $\log K_{D_{\text{late}1}} = -2,76 \pm 0,3$ und $\log K_{D_{\text{late}2}} = -0,763 \pm 0,116$.

Für den Vergleich der ATP-Dosis-Wirkungs-Kurven der Komponenten I_{peak} und I_{late} bei hP2X1/7 mit den entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurven bei hP2X1 bzw. hP2X7 wurden die $\log K_D$ -Werte herangezogen und mit dem t-Test überprüft. Es wurden somit die $\log K_{D_{\text{peak}}}$ -Werte bei hP2X1/7 mit den $\log K_D$ -Werten für hP2X1 und die $\log K_{D_{\text{late}}}$ -Werte bei hP2X1/7 mit den $\log K_D$ -Werten bei hP2X7 verglichen. Dabei ergab sich für keines der korrespondierenden Paare ein signifikanter

Unterschied. Dies deutet darauf hin, dass I_{peak} weitgehend die P2X1-Komponente, I_{late} dagegen hauptsächlich die P2X7-Komponente repräsentiert.

Um eine Beeinflussung des Expressionsgrades der Rezeptoren bei Koexpression zu beurteilen, wurden die gemessenen absoluten Ströme bei hP2X1, hP2X7 und hP2X1/7 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach RNA-Injektion (dies post injectionem, dpi) miteinander verglichen. Abb. 14 illustriert, dass sich die einander entsprechenden Komponenten I_{peak} bei hP2X1 und hP2X1/7 sowie I_{late} bei hP2X7 und hP2X1/7 durch die Koexpression nicht signifikant gegenüber der isolierten Variante ändern.

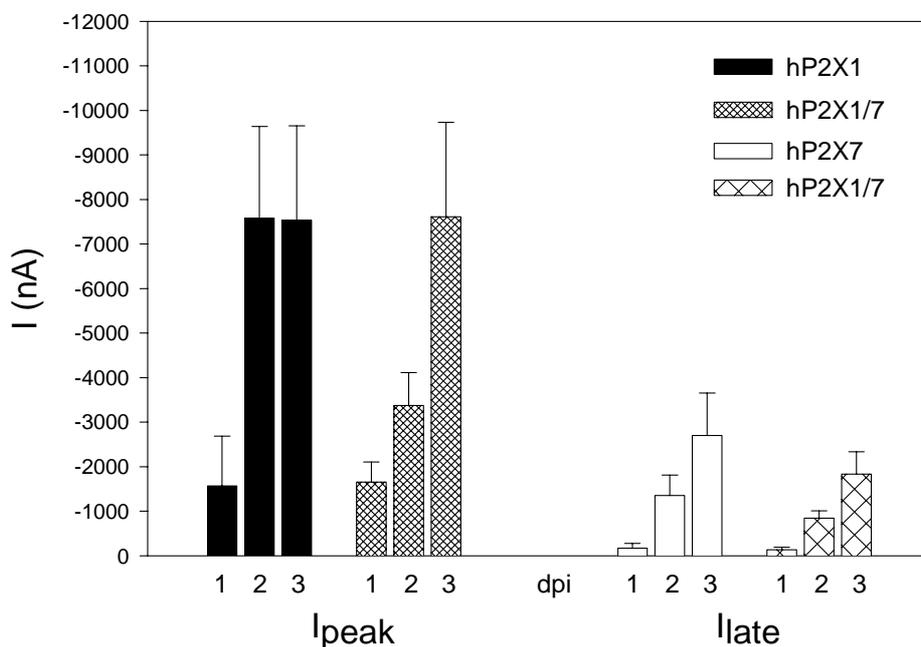


Abb. 14: Vergleich der absoluten Ströme I_{peak} bei hP2X1 und hP2X1/7 und I_{late} bei hP2X7 und hP2X1/7. Es wurden für jeden Subtyp jeweils 20 nl 1:5 verdünnter mRNA injiziert. Die Messungen erfolgten am ersten, zweiten und dritten Tag nach der Injektion (dpi). Die applizierte ATP-Dosis betrug 0,1 mM. Gezeigt werden die Mittelwerte aus 5 bis 27 Messungen. Zwischen den korrespondierenden Paaren I_{peak} bei hP2X1 und hP2X1/7 sowie I_{late} bei hP2X7 und hP2X1/7 findet sich bei Testung mit One-Way-Anova kein signifikanter Unterschied.

Abb. 15 illustriert die Abhängigkeit des relativen Anteils der Komponente I_{late} am Gesamtstrom $I_{\text{peak}}+I_{\text{late}}$ von der applizierten ATP-Konzentration. Dieser steigt ab ATP-Konzentrationen von 1 μM stark an, vermutlich durch die erst bei diesen höheren Konzentrationen deutlich werdende Aktivierung von hP2X7-abhängigen Strömen, was zu einem stärkeren Anstieg von I_{late} führt. Dies entspricht der geringeren Potenz von ATP am hP2X7-Rezeptor, also den im Vergleich zum hP2X1-

Rezeptor höheren K_D -Werten der Dosis-Wirkungs-Kurve des hP2X7-Rezeptors. Siehe dazu auch Abb. 3, Abb. 11, Abb. 12 und Abb. 13.

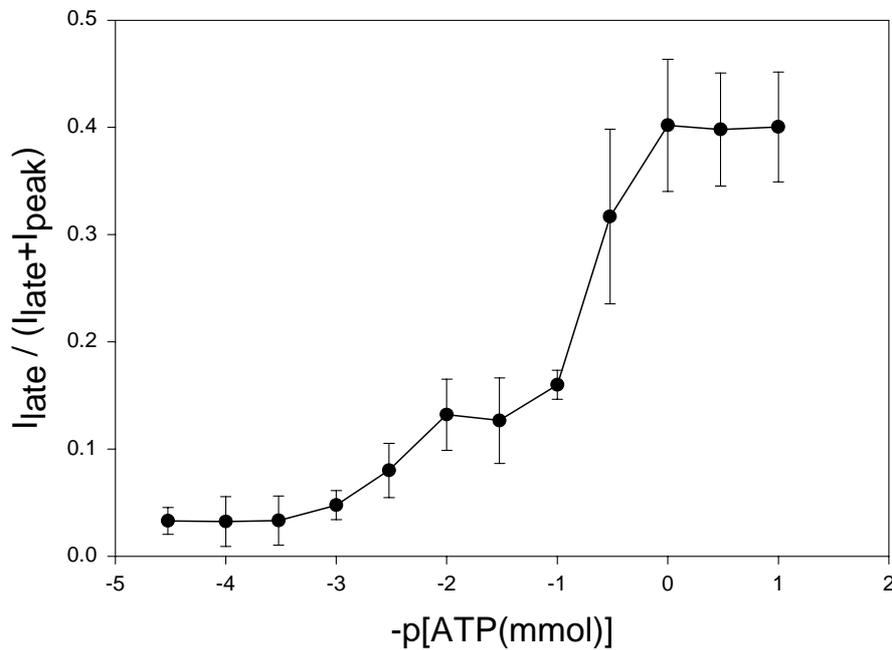


Abb. 15: Der Anteil von I_{late} am Gesamtstrom $I_{peak} + I_{late}$ in Abhängigkeit von der applizierten ATP-Konzentration. Die Messungen wurden 2 Tage nach mRNA-Injektion durchgeführt. Die hier vorliegenden Werte wurden nach Injektion von jeweils 20 nl im Verhältnis 1:5 verdünnter P2X1- und P2X7-mRNA erhoben. $N = 2 - 23$.

Wie in Abb. 14 gezeigt, nehmen die Amplituden der hP2X1-, hP2X7- und hP2X1/7-abhängigen Ströme mit der verstrichenen Zeit nach mRNA-Injektion deutlich zu. Dabei ist der Zuwachs für die einzelnen Subtypen jedoch unterschiedlich schnell, was mit zunehmender Expressionsdauer zu einer Erhöhung des relativen Anteils von I_{late} am Gesamtstrom von hP2X1/7 führt, siehe Abb. 16.

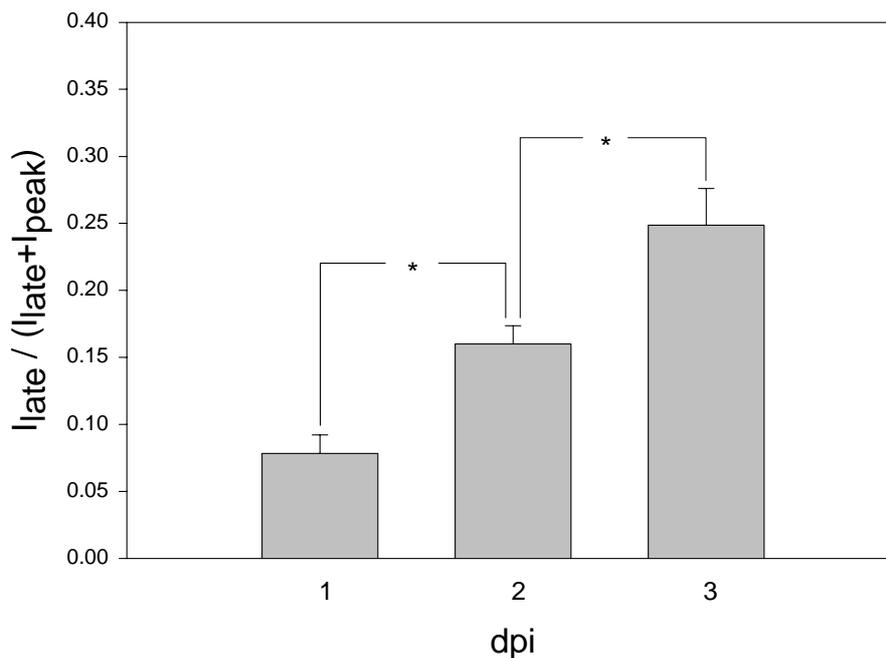


Abb. 16: Der Anteil des späten Stromes I_{late} am Gesamtstrom $I_{peak} + I_{late}$ in Abhängigkeit von der Expressionsdauer bei hP2X1/7-abhängigen Strömen. Es wurden für jeden Subtyp jeweils 20 nl 1:5 verdünnter mRNA injiziert. Die Messungen erfolgten am ersten, zweiten und dritten Tag nach der Injektion (dpi). Die applizierte ATP-Dosis betrug 0,1 mM in divalentfreier Lösung (Lösung g). N = 23 – 32.

4.2.2 Der Einfluss von Agonisten und Antagonisten mit P2X1-präferenter Wirkung auf hP2X1/7-abhängige Ströme

In den folgenden beiden Kapiteln werden eine Reihe von Agonisten und Antagonisten auf Ihren Einfluss auf die beiden Komponenten I_{peak} und I_{late} hP2X1/7-abhängiger Ströme hin untersucht.

α, β -methyl-ATP

Abb. 17 zeigt ein Beispiel für die Wirkung des P2X1-Agonisten α, β -methyl-ATP auf hP2X1/7-abhängige Ströme. Verglichen mit dem Strom, der durch Applikation von 0,1 mM ATP ausgelöst wird, zeigt sich bei Applikation von 0,01 mM α, β -methyl-ATP eine deutlich stärkere Aktivierung des Gipfelstroms I_{peak} als der späten Komponente I_{late} , was auf eine vorwiegende Aktivierung von hP2X1 hindeutet.

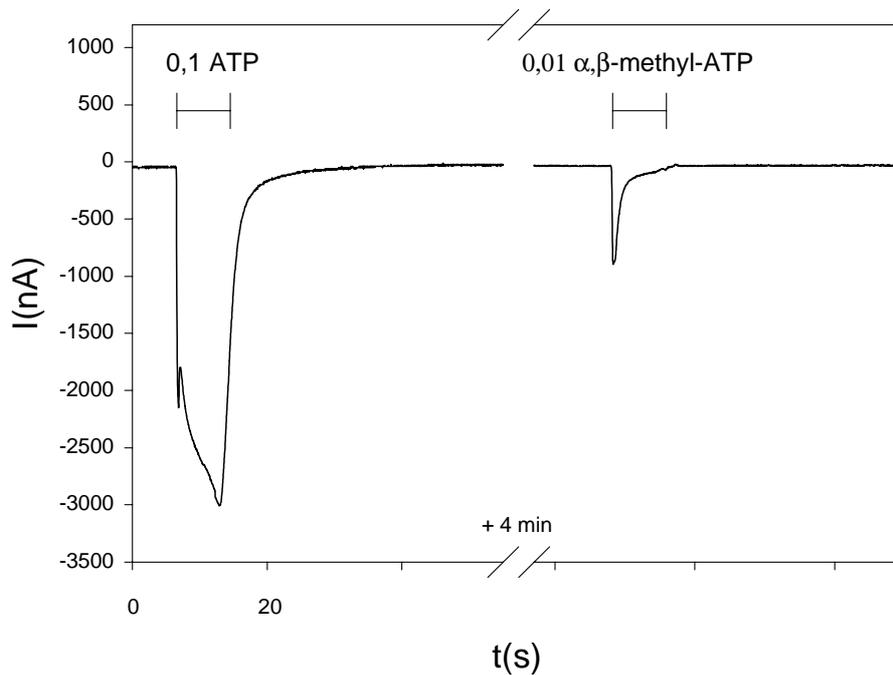


Abb. 17: Beispiel für die Wirkung von α,β -methyl-ATP auf hP2X1/7 im Vergleich zur Wirkung von ATP. Die Applikation von ATP bzw. α,β -methyl-ATP (in mM) ist markiert. Das Haltepotenzial betrug wie in allen anderen Messungen -40 mV. Die Messung erfolgte in Ca^{2+} , Mg^{2+} und Ba^{2+} -freier Lösung (Lösung g, Tabelle 1) am zweiten Tag nach Injektion von 20 nl im Verhältnis 1:5 verdünnter mRNA.

Abb. 18 und Abb. 19 illustrieren diesen Zusammenhang im Kontext wiederholter ATP-Applikationen. Hiermit wird gezeigt, dass dieser Effekt von α,β -methyl-ATP auf I_{peak} und I_{late} nicht durch den in Abb. 18 illustrierten „Run-Down“ beider Komponenten vorgetäuscht wird. Während der ersten vier Applikationen von 0,1 mM ATP wächst durch den stärkeren „Run-Down“ der Gipfelstromkomponente das Verhältnis I_{late} zu I_{peak} . Bei der dann folgenden Applikation von 0,01 mM α,β -methyl-ATP fällt dieser Wert auf $0,13 \pm 0,05$, um bei der danach folgenden ATP-Applikation wieder anzusteigen. Bei Aktivierung hP2X1-abhängiger Ströme mit 0,1 mM ATP wurde das Verhältnis I_{late} zu I_{peak} an 5 Oozyten bestimmt. Es beträgt hier $0,07 \pm 0,02$ und unterscheidet sich damit nicht signifikant von dem entsprechenden Wert hP2X1/7-abhängiger Ströme, die durch die angeführten α,β -methyl-ATP-Konzentrationen aktiviert wurden. Dies bedeutet, dass die vermutlich hP2X1-Rezeptor-abhängige Komponente I_{peak} durch α,β -methyl-ATP stärker aktiviert wird als die späte Komponente I_{late} .

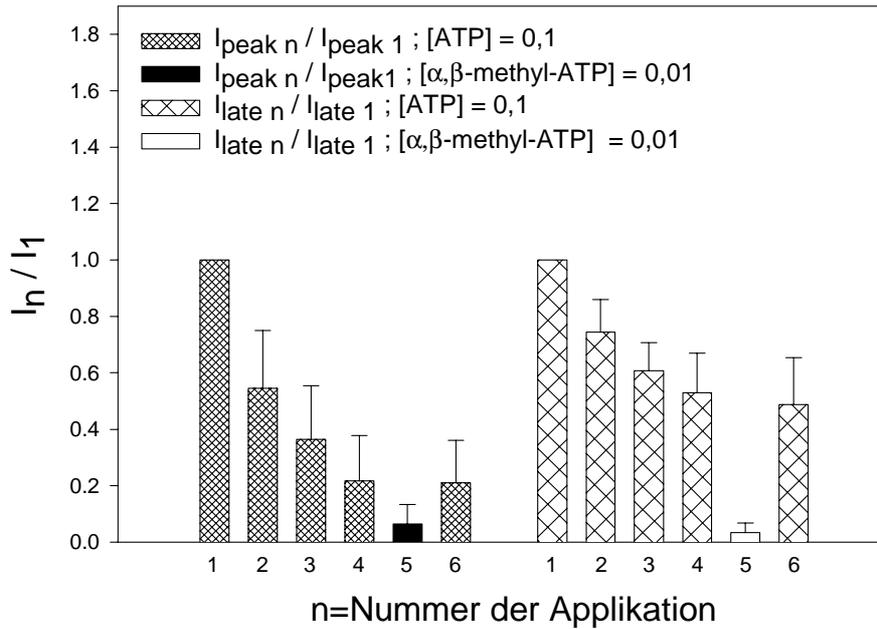


Abb. 18: Wirkung von α,β -methyl-ATP auf die Komponenten I_{peak} und I_{late} im Kontext wiederholter ATP-Applikationen bei hP2X1/7. Zunächst wurde 4 mal 0,1 mM ATP (Lösung g) für jeweils 6 s. appliziert. Danach folgt die Applikation von 0,01 mM α,β -methyl-ATP, im Anschluss wieder 0,1 mM ATP. Die Zeit zwischen den Applikationen betrug 4 min. Um den unterschiedlichen Expressionsgrad der Rezeptoren in verschiedenen Oozyten zu berücksichtigen, wurden die jeweils gemessenen Komponenten I_{peak} und I_{late} getrennt auf die entsprechenden Amplituden bei der ersten Applikation von 0,1 mM ATP ($I_{peak\ n} / I_{peak\ 1}$ bzw. $I_{late\ n} / I_{late\ 1}$) normiert. N = 6.

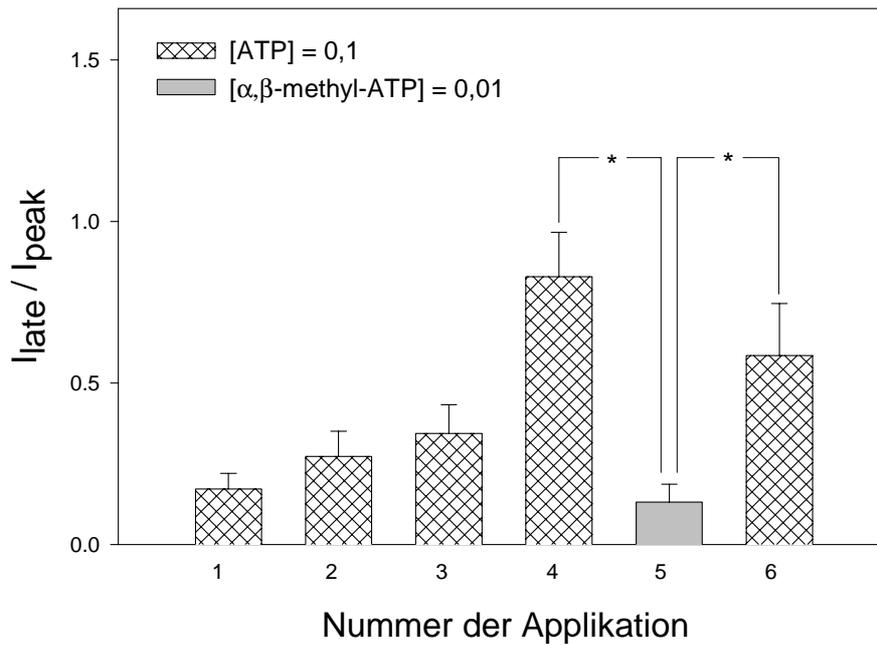


Abb. 19: Wirkung von α,β -methyl-ATP auf das Verhältnis der beiden Komponenten I_{peak} und I_{late} hP2X1/7-Rezeptor-abhängiger Ströme im Kontext wiederholter ATP-Applikationen. Die Werte stammen aus dem gleichen Versuch wie die der Abb. 18. Signifikant verschiedene Mittelwerte sind durch * markiert.

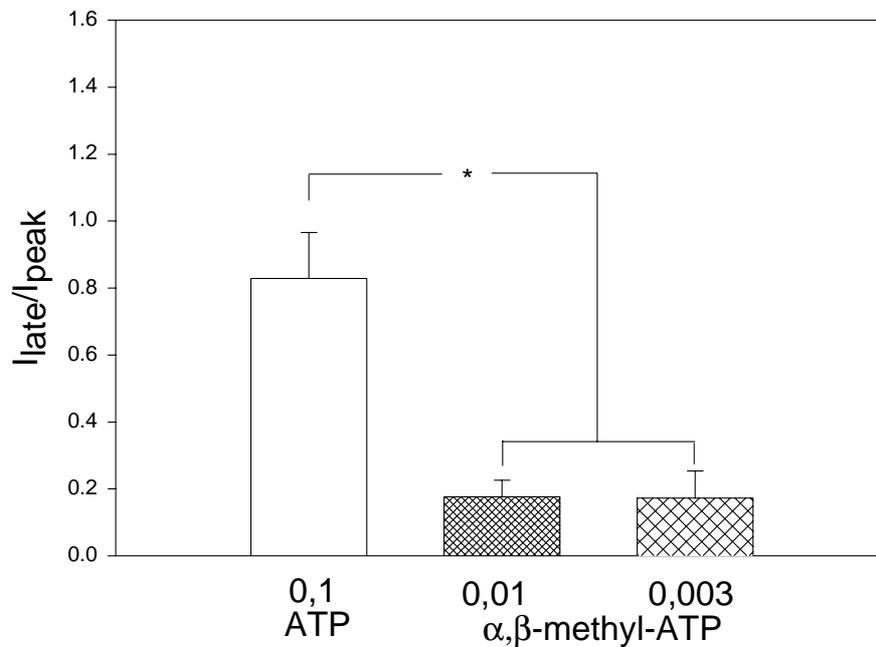


Abb. 20: Abhängigkeit der Aktivierungskinetik von hP2X1/7 von der Agonistenkonzentration. Die in Abb. 19 gezeigte Wirkung von 0,01 mM α,β -methyl-ATP auf die

Aktivierungskinetik der hP2X1/7-abhängigen Ströme lässt sich auch bei Applikation 0,003 millimolaren α,β -methyl-ATPs zeigen. Die Versuchsbedingungen entsprechen denen, wie sie in Abb. 18 beschrieben sind. Signifikante Unterschiede wurden mit * markiert. N = 8 – 15.

Abb. 20 zeigt die Wirkung zwei verschiedener α,β -methyl-ATP-Konzentrationen im Vergleich zur Wirkung von 0,1 mM ATP auf die beiden Komponenten I_{peak} und I_{late} bei hP2X1/7-abhängigen Strömen. Die Verhältnisse der beiden Stromkomponenten $I_{\text{late}}/I_{\text{peak}}$ unterscheiden sich bei den untersuchten Konzentrationen von 0,01 und 0,03 mM α,β -methyl-ATP nicht signifikant voneinander. Die Aktivierungskinetik ändert sich allerdings signifikant gegenüber den Strömen, die durch 0,1 mM ATP aktiviert wurden.

NF279

Mit den Suramin-Analoga NF279 sowie dem neueren NF449 stehen zwei potente und gut selektive kompetitive hP2X1-Antagonisten für Untersuchungen an P2X-Rezeptoren zur Verfügung. NF279 blockiert aber auch andere P2X-Rezeptor-Subtypen mit geringerer Potenz in der Reihenfolge: P2X1 > P2X2 \geq P2X3 \geq P2X7 (Lambrecht, 2000).

Abb. 21 zeigt an einem Beispiel die Wirkung von NF279 auf hP2X1/7-abhängige Ströme bei Aktivierung mit 1 mM ATP. Man sieht eine fast vollständige Suppression des Gipfelstroms I_{peak} und eine deutlich geringere Beeinflussung des späten Stromes.

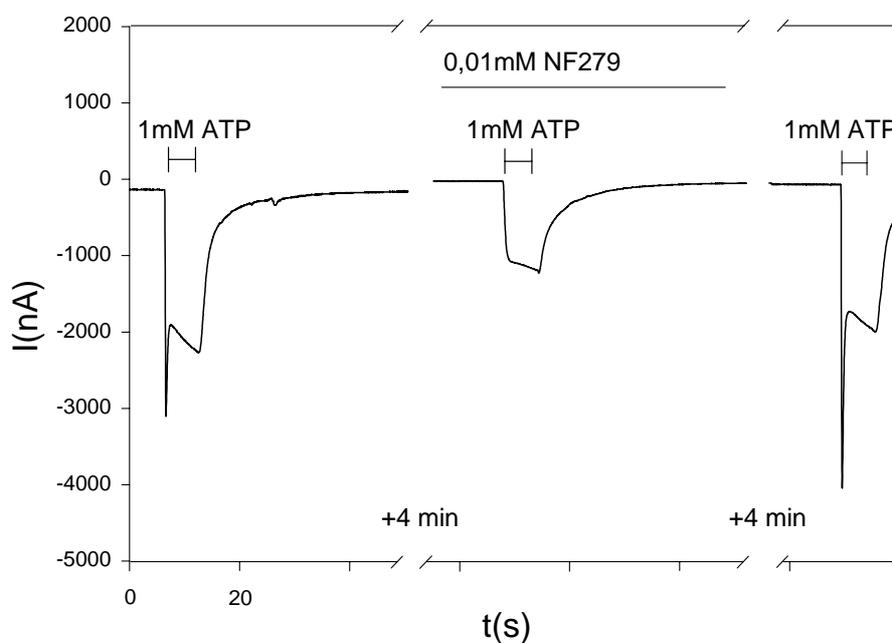


Abb. 21: Beispiel für die Wirkung von NF279 auf hP2X1/7. Die Applikation von ATP bzw. von NF279 ist markiert. Die Messung erfolgte in Lösung g, am zweiten Tag nach Injektion von

20 nl im Verhältnis 1:20 verdünnter mRNA für hP2X1 und 20 nl unverdünnter mRNA für hP2X7.

Das unterschiedliche Ausmaß des antagonisierenden Effektes von NF279 auf die Komponenten I_{peak} und I_{late} bei verschiedenen Konzentrationen von Agonist und Antagonist zeigt Abb. 22.

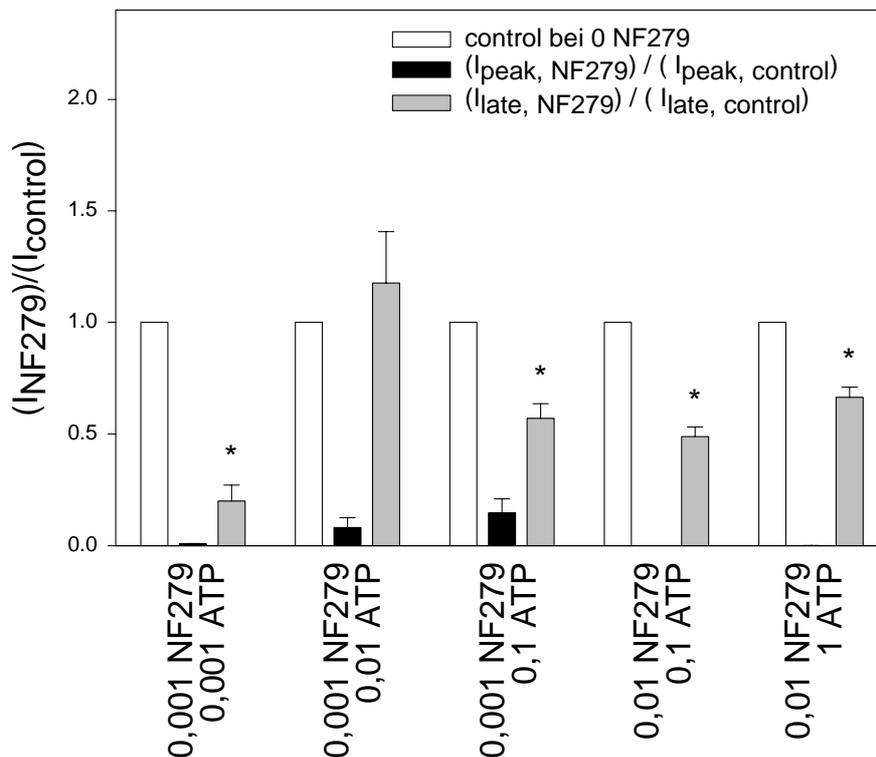


Abb. 22: Wirkung von NF279 auf hP2X1/7 bei verschiedenen Konzentrationen von NF279 und ATP. Es wurden zwei NF279-Konzentrationen mit drei verschiedenen ATP-Konzentrationen wie angegeben kombiniert. Der Versuchsablauf und die Versuchsbedingungen entsprechen im übrigen denen der Abb. 21. Die bei zusätzlicher Applikation von NF279 gemessenen Amplituden des Gipfelstromes ($I_{\text{peak, NF279}}$, schwarze Säulen) und des späten Stromes ($I_{\text{late, NF279}}$, graue Säulen) werden als Verhältnis zu den entsprechenden Stromamplituden der jeweils vorangehenden ATP-Applikation (I_{control} , weiße Säulen) dargestellt. $N = 4 - 14$. Alle mit * markierten Werte sowie alle relativen Gipfelströme (nicht extra gekennzeichnet) sind signifikant von 1 verschieden

Das Verhalten der Komponenten I_{peak} und I_{late} vor und nach NF279 -Applikation illustriert Abb. 23. Wie in Abb. 21 beispielhaft gezeigt wurde, sind bei NF279-Konzentrationen von 0,01 mM die Gipfelströme nach der NF279-Applikation (I_{post}) größer als vor der NF279-Applikation (I_{prae}), und das Verhältnis $I_{\text{post}} / I_{\text{prae}}$ wird größer als 1. Der Unterschied ist allerdings nur bei Aktivierung mit

einer ATP-Konzentration von 0,1 mM signifikant. Da bei diesem Versuch die Zeit zwischen zwei Applikationen auch 4 min betrug, erholt sich der hP2X1-Rezeptor-abhängige Gipfelstrom zwischen zwei Applikationen nicht vollständig. Vermutlich verlängert sich durch die Applikation von NF279 die Erholungszeit dieser Komponente, da durch die Applikation von NF279 die Aktivierung und damit auch die Desensitivierung der hP2X1-Rezeptoren verhindert wird, was zu den beobachteten größeren Strömen führt. Vermutlich wird auch nur bei dieser Kombination von ATP und NF279 ([ATP]=0,1 mM; [NF279]=0,01 mM) eine vollständige Blockierung der hP2X1-Rezeptor-Aktivierung und -desensitivierung erreicht. Siehe dazu auch Kapitel 4.1.2, Abb. 7 und Kapitel 5.

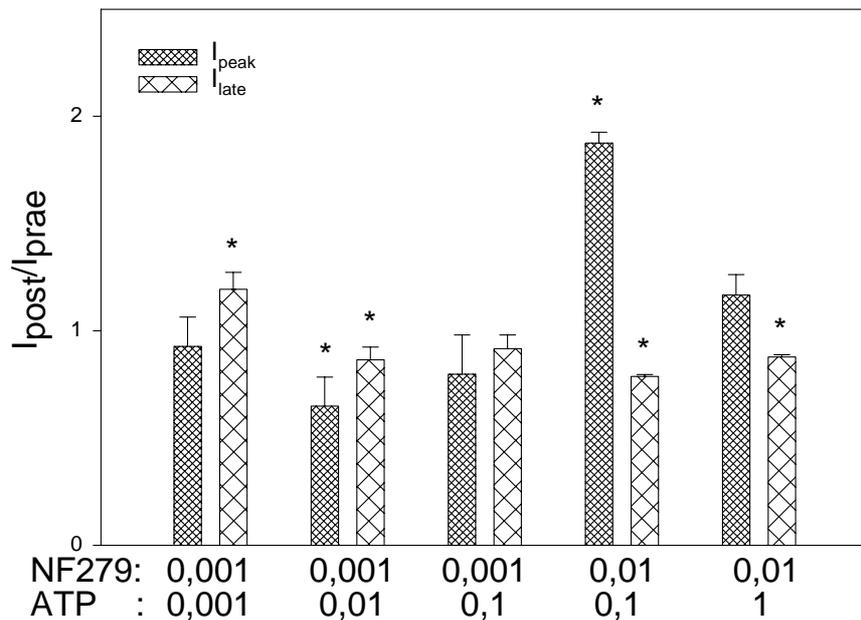


Abb. 23: Einfluss einer vorübergehenden Applikation von NF279 auf die Kinetik

koexprimierter hP2X1/hP2X7-Rezeptoren. Der Versuchsablauf und die Versuchsbedingungen entsprechen denen, wie sie in Abb. 21 beschrieben sind. Um die Reversibilität der NF279-Wirkung zu beurteilen, wurden die Amplituden I_{peak} und I_{late} nach der NF279-Applikation (I_{post}) zu den entsprechenden Amplituden vor der NF279-Applikation (I_{prae}) ins Verhältnis gesetzt. N 7 – 9. Mit * markierte Werte sind signifikant von 1 verschieden.,

NF449

NF449 ist ein kompetitiver Antagonist an P2X-Rezeptoren mit deutlich höherer Potenz am P2X1-Rezeptor als am P2X7-Rezeptor (Braun, Rettinger et al., 2001; Hülsmann, Nickel, Kassack, Schmalzing, Lambrecht, and Markwardt, 2003). Ein Beispiel für die Wirkung von NF449 auf hP2X1/7-abhängige, durch 1 mM ATP aktivierte Ströme zeigt Abb. 24. Die unter Kontrollbedingungen deutliche sichtbare Gipfelstromkomponente ist während der Applikation von 1 μ M

NF449 nicht mehr vorhanden. Die statistische Untermauerung dieser Beobachtung illustriert Abb. 25.

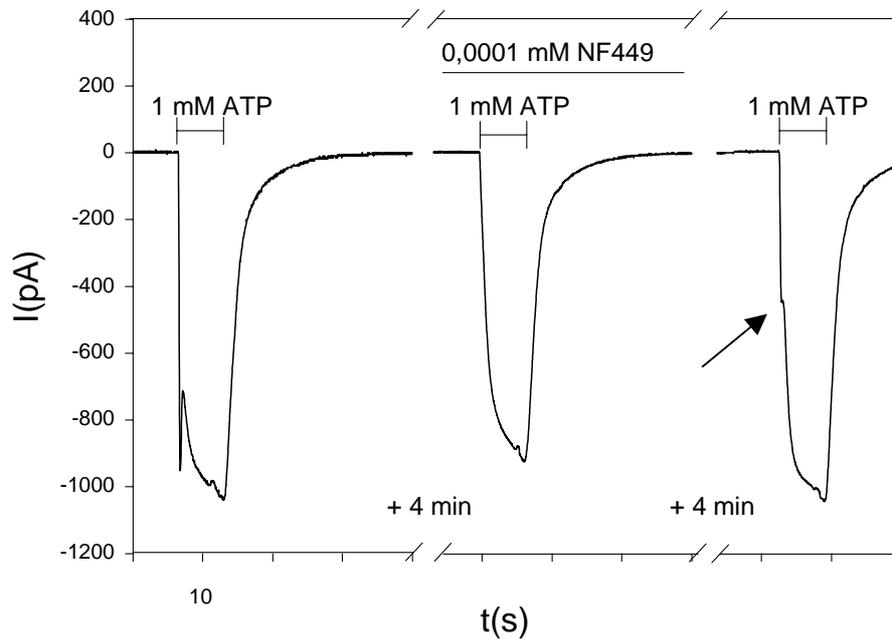


Abb. 24: Beispiel für die Wirkung von NF449 auf die Komponenten I_{peak} und I_{late} bei

hP2X1/7. Die Applikation von ATP^{4-} bzw. von NF449 ist markiert. Die Messung erfolgte in Lösung g am zweiten Tag nach Injektion von jeweils 20 nl im Verhältnis 1:5 verdünnter mRNA. Der Pfeil deutet die nach Auswaschen von NF449 wiedergekehrte Gipfelstromkomponente an.

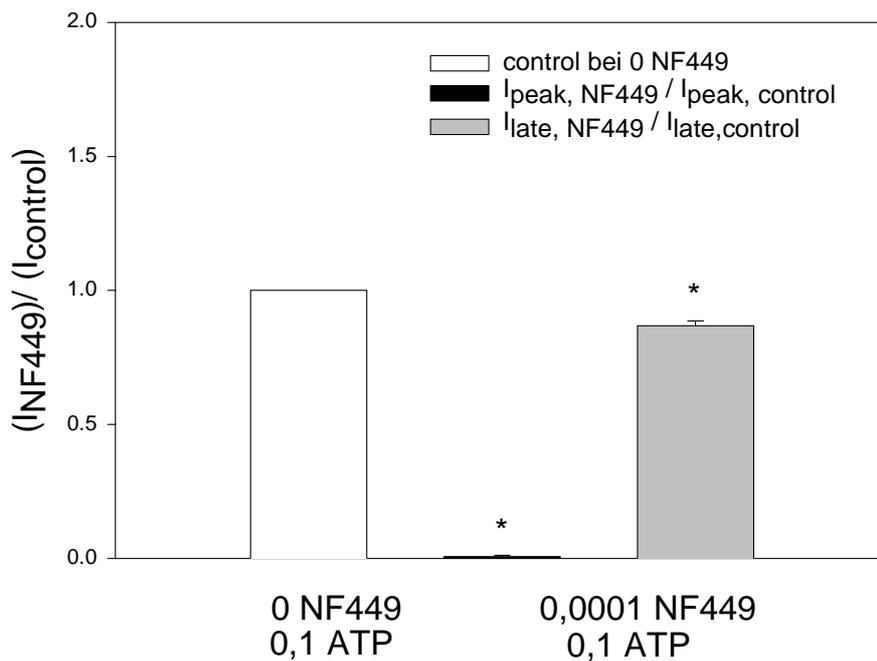


Abb. 25: Wirkung von NF449 auf die Komponenten I_{peak} und I_{late} bei hP2X1/7 Versuchsablauf und Versuchsbedingungen entsprechen dem der Abb. 24. Die bei zusätzlicher Applikation von NF449 gemessenen Amplituden des Gipfelstromes (schwarze Säule, $I_{\text{peak, NF449}}/I_{\text{peak, control}}$) und des späten Stromes (graue Säule, $I_{\text{late, NF449}}/I_{\text{late, control}}$) werden als Verhältnis zu den entsprechenden Stromamplituden der vorangehenden ATP-Applikation (weiße Säule) dargestellt. N = 6.

4.2.3 Der Einfluss von Substanzen mit P2X7-präferenzter Wirkung auf hP2X1/7-abhängige Ströme

Benzoyl-ATP

Es wurde die Wirkung des P2X7-Agonisten BzATP auf hP2X1/7 in Konzentrationen von 0,1 μM bis 100 μM untersucht. Bei keiner dieser Konzentrationen konnte eine (hP2X1-abhängige) Gipfelstromkomponente abgegrenzt werden, was auf eine vorwiegende Wirkung am hP2X7-Rezeptor hindeutet. Dies ist im Einklang mit den Messungen an isoliertem hP2X1, an dem die Applikation von 1 bzw. 10 μM BzATP nur eine minimale Aktivierung von 6 bzw 7 % der durch 1 mM ATP aktivierten Ströme hervorruft (siehe Abb. 11). Ein Beispiel für die Wirkung von BzATP auf hP2X1/7 bei der hier maximal applizierten BzATP-Konzentration von 0,1 mM zeigt Abb. 26.

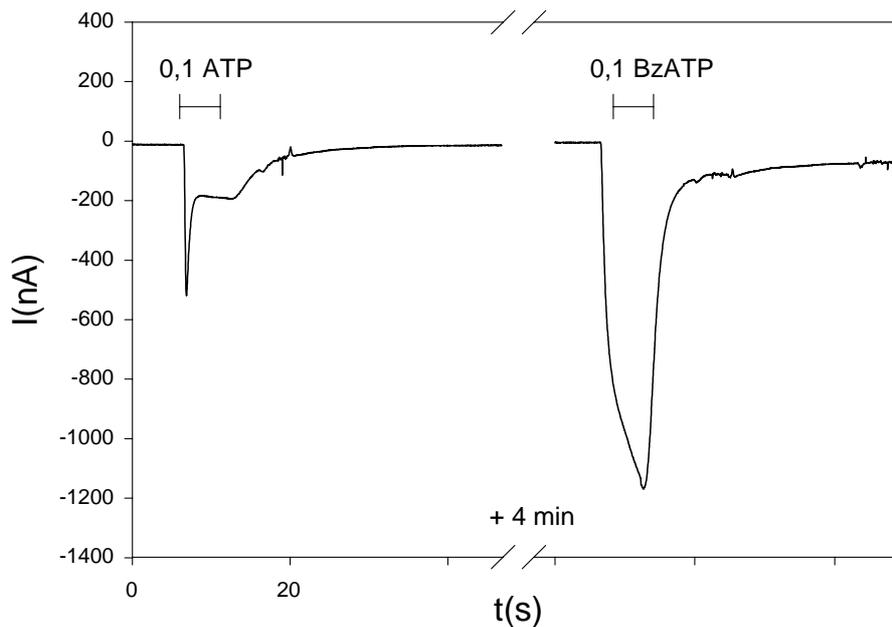


Abb. 26: Beispiel für die Wirkung von Benzoyl-ATP auf hP2X1/7 Die Applikation von ATP bzw. von BzATP (in mM) ist markiert. Die Messung erfolgte in Lösung g am ersten Tag nach Injektion von 20 nl im Verhältnis 1:20 verdünnter mRNA für hP2X1 und 20 nl unverdünnter mRNA für hP2X7.

Den Vergleich zwischen ATP- und BzATP-Dosis-Wirkungs-Kurve für die späte Komponente I_{late} zeigt Abb. 27. Hier werden die größere Potenz und Maximalwirkung des BzATP gegenüber ATP deutlich. BzATP aktiviert bei Konzentrationen von 0,01 bzw. 0,1 mM Ströme, die 3,5 bzw. 4,3 mal größer sind, als die durch die gleichen ATP-Konzentrationen hervorgerufenen. Außerdem werden auch mit maximaler ATP-Konzentration von 10 mM die mit 0,1 mM BzATP aktivierten Stromstärken nicht erreicht. Dies zeigt, dass auch bei Koexpression ATP am hP2X7-Rezeptor nur als partieller Agonist wirkt.

Die ATP-Dosis-Wirkungskurve in Abb. 27 entspricht der in Abb. 13, Kapitel 4.2.1 gezeigten. Da sich Benzoyl-ATP bei Konzentrationen $> 0,1$ mM nur noch sehr schlecht löst, waren Messungen mit höheren Konzentrationen nicht möglich.

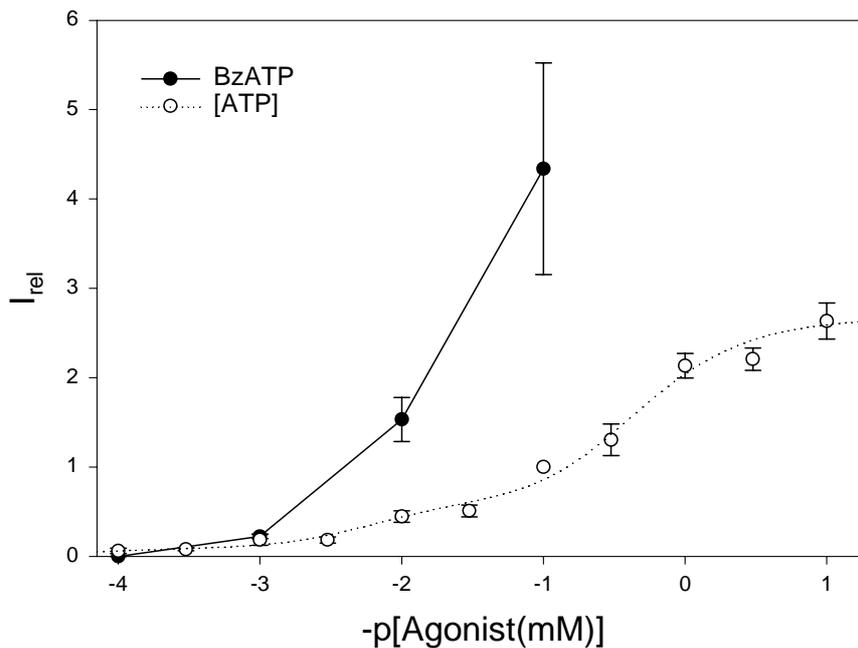


Abb. 27: Dosis-Wirkungs-Kurve mit ATP und Benzoyl-ATP für die Komponente I_{late} bei hP2X1/7. Um die Abhängigkeit der Amplitude der hP2X1/7-Rezeptor-vermittelten Ströme von der Konzentration des Agonisten zu bestimmen, wurden verschiedene ATP- bzw. BzATP-Konzentrationen in divalentfreier Badlösung (Lösung g) für 6 s appliziert. $I_{rel} = I_{peak}/I_{peak,0.1ATP}$. $N = 5 = 27$.

Brilliant Blue G

Brilliant Blue G (BrBlue) wird als selektiver, nichtkompetitiver Inhibitor am P2X7-Rezeptor beschrieben (Jiang, MacKenzie, North, and Surprenant, 2000). Abb. 28 zeigt an einem Beispiel die Wirkung von Brilliant Blue an hP2X1/7. Während die vorwiegend hP2X1-abhängige Gipfelstromkomponente deutlich auf ca. 13 % (Mittelwert aus 8 Messungen) des Kontrollwertes geblockt wird, bleibt die späte Komponente, die hauptsächlich hP2X7 charakterisiert, mit 98 % des Kontrollwertes praktisch unbeeinflusst. Diese Beobachtung wurde nicht nur bei Koexpression, sondern auch bei Einzelexpression von hP2X1 und hP2X7 gemacht, wobei auch hier die Koexpression das Verhalten der Komponenten I_{peak} und I_{late} gegenüber dem Verhalten bei Einzelexpression nicht signifikant verändert, wie Abb. 29 illustriert. Dies bedeutet, dass Brilliant Blue G den hP2X1-Rezeptor nach Expression in *Xenopus*-Oozyten besser blockt als den hP2X7-Rezeptor.

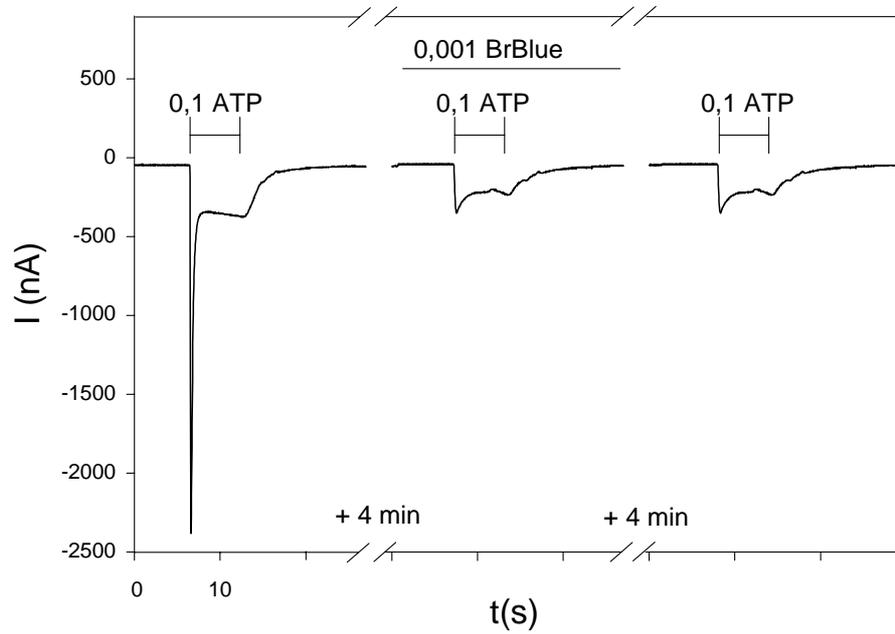


Abb. 28: Beispiel für die Wirkung von Brilliant Blue auf hP2X1/7. Die Applikation von ATP bzw. von Brilliant Blue G (in mM) ist markiert. Die Messung erfolgte in Lösung g am dritten Tag nach Injektion von 20 nl im Verhältnis 1:5 verdünnter mRNA für hP2X1 und 20 nl 1:10 verdünnter mRNA für hP2X7.

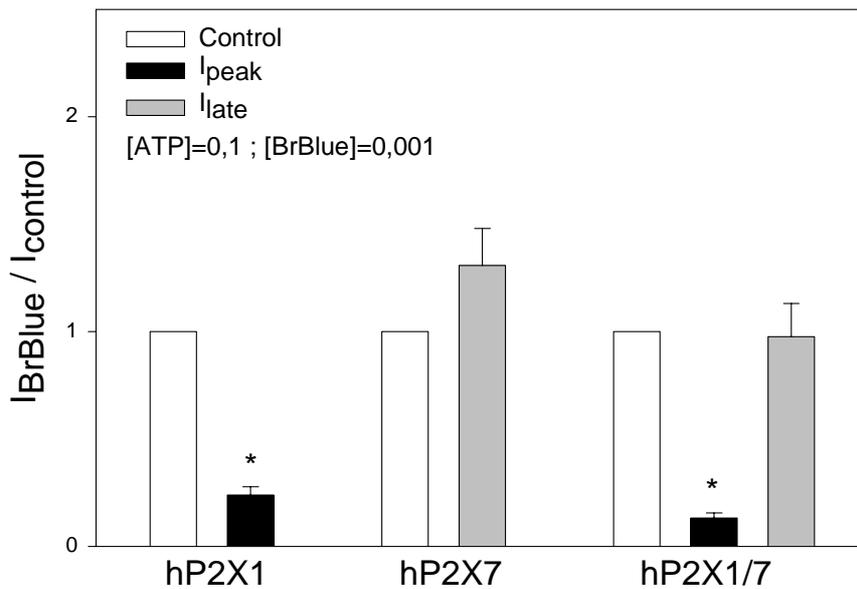


Abb. 29: Wirkung von Brilliant Blue G auf die Komponenten I_{peak} bei hP2X1 und hP2X1/7 sowie I_{late} bei hP2X7 und hP2X1/7. Versuchsablauf und Versuchsbedingungen wie in Abb. 28 beschrieben. Konzentrationsangaben in mM. Die bei zusätzlicher Applikation von Brilliant Blue G gemessenen Amplituden der Gipfelströme (schwarze Säulen) und der späten Ströme (graue Säulen) werden als Verhältnis zu den entsprechenden Stromamplituden der vorangehenden ATP-Applikation (weiße Säulen) dargestellt. N = 4 - 8. Alle mit * markierten Werte sind signifikant von 1 verschieden.

Oxidiertes ATP

Es wurde die Wirkung des P2X7-Blockers oATP (Wiley, Chen, Snook, and Jamieson, 1994; Hibell, Thompson et al., 2001) (North, 2002) auf den späten Strom I_{late} und sein Verhältnis zum Gipfelstrom I_{peak} bei durch verschiedene ATP-Konzentrationen aktivierten hP2X1/7-abhängigen Strömen untersucht. Dabei zeigte sich eine nur schwache Selektivität für die Komponente I_{late} . Eine signifikante Verringerung des Verhältnisses I_{late} zu I_{peak} konnte nur bei hoher ATP-Konzentration von 1 mM beobachtet werden, ohne dass jedoch eine vollständige Blockierung der späten Komponente erreicht wurde. Ein typisches Beispiel zeigt Abb. 30, die statistische Auswertung Abb. 31.

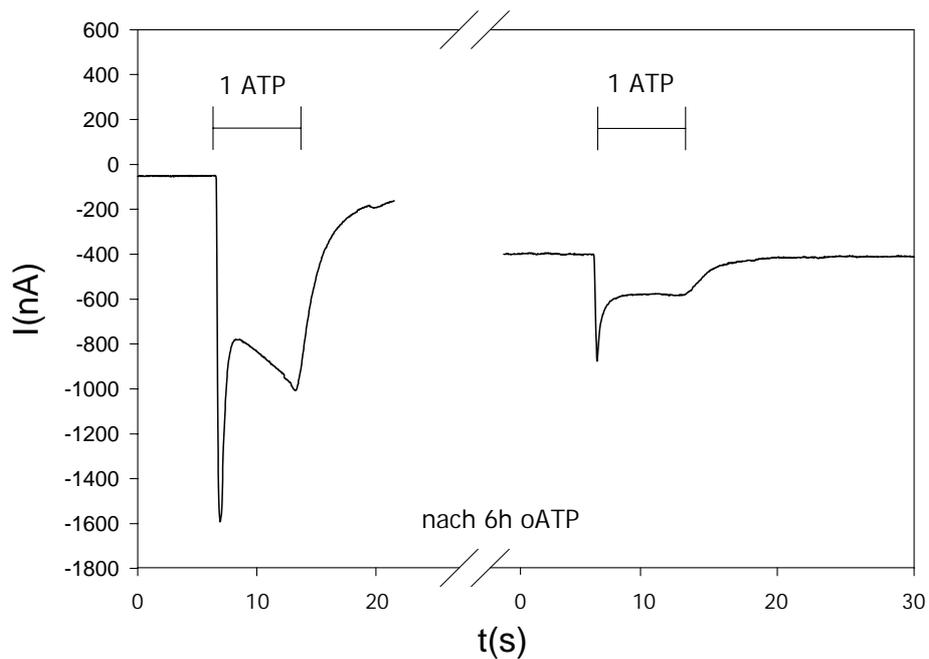


Abb. 30: Beispiel für die Wirkung von 0,3 mM oATP auf hP2X1/7-abhängige Ströme. Die Applikation von ATP (in mM) ist markiert. Die gezeigten typischen Ströme stammen von zwei verschiedenen Oozyten einer Präparation, von denen die zweite vor der Messung 6 h in Oozyten-Ringer-Lösung (Lösung e, Tabelle 1), die 0,3 mM oATP enthielt, inkubiert war. Die Messung erfolgte am dritten Tag nach cRNA-Injektion.

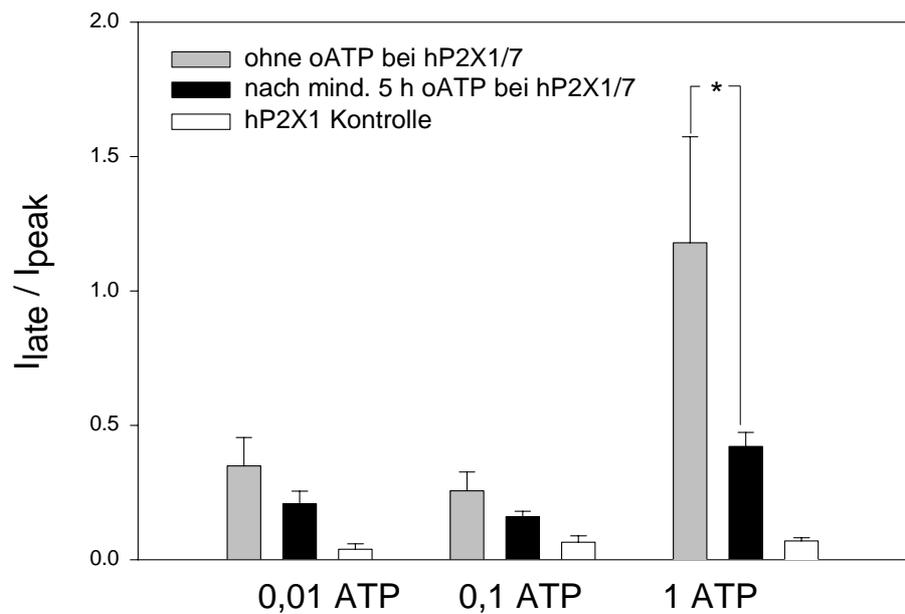


Abb. 31: Wirkung von oATP auf das Verhältnis der beiden Komponenten I_{late} und I_{peak} bei hP2X1/7. Zum Vergleich ist dieser Wert bei isoliertem hP2X1 mit dargestellt (weiße

Säulen). Es wurden drei verschiedene ATP-Konzentrationen wie in der Abszisse in mM angegeben, appliziert. Im übrigen entsprechen Versuchsbedingungen und Versuchsablauf dem, wie es in Abb. 30 beschrieben wurde.

Mg²⁺

Wie in Kapitel 3.2.3 schon erwähnt, ist die am hP2X7-Rezeptor wirksame Form des ATP die freie, nicht komplexierte Form ATP⁴⁻ (Markwardt, Löhn, Böhm, and Klapperstück, 1997), (Di Virgilio, 1995). Folglich schwächt die Zugabe von Mg²⁺ die ATP-Wirkung am hP2X7-Rezeptor. Dieser Effekt ist für den hP2X1-Rezeptor dagegen nicht beschrieben worden.. Bei hP2X1/7 lässt sich durch Zugabe von Mg²⁺ zur Lösung die Aktivierung der späten Komponente deutlich unterdrücken. Ein typisches Beispiel für diese Beobachtung zeigt Abb. 32. Die in dem Beispiel zu sehende Verkleinerung der Peak-Komponente dürfte weniger in einer Mg²⁺-Wirkung, als vielmehr in dem zu beobachtenden „Run-down“ der hP2X1-abhängigen Gipfelstromkomponente begründet sein. Dies verdeutlicht Abb. 33, in der das Verhalten der Komponenten I_{peak} und I_{late} bei Applikation von 0,1 mM ATP in Mg²⁺-haltiger Lösung im Kontext wiederholter ATP-Applikationen in Mg²⁺-freier Lösung dargestellt ist. Das daraus resultierende, sich ändernde Verhältnis der späten Komponente zur Gipfelstromkomponente zeigt Abb. 34. Das Verhältnis der beiden Stromkomponenten zueinander ändert sich zunächst bei drei wiederholten ATP-Applikationen nicht. Bei der darauffolgenden 4. Applikation in Mg²⁺-haltiger Lösung verringert sich das Verhältnis des späten Stromes I_{late} zum Gipfelstrom I_{peak} dagegen signifikant auf $I_{\text{late}} / I_{\text{peak}} = 0,03 \pm 0,006$ und unterscheidet sich damit nicht signifikant vom entsprechenden Verhältnis bei isoliertem hP2X1.

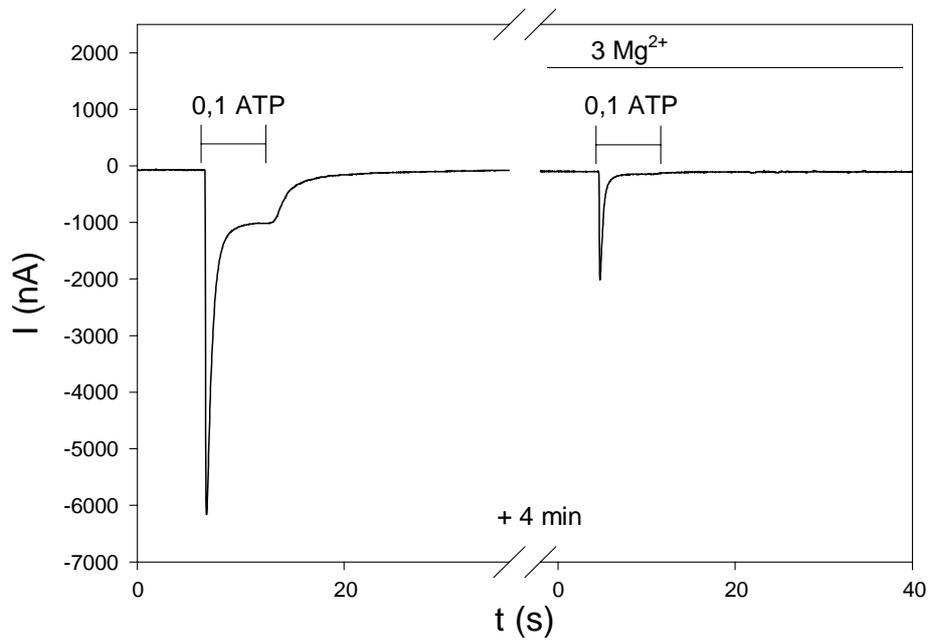


Abb. 32: Beispiel für die Wirkung von Mg^{2+} auf hP2X1/7 Die ATP-Applikation erfolgte zunächst in Ca^{2+} , Mg^{2+} und Ba^{2+} -freier Lösung (Lösung g, Tabelle 1), zusätzlich wurde Mg^{2+} wie angegeben appliziert. Die Messungen erfolgten 3 dpi.

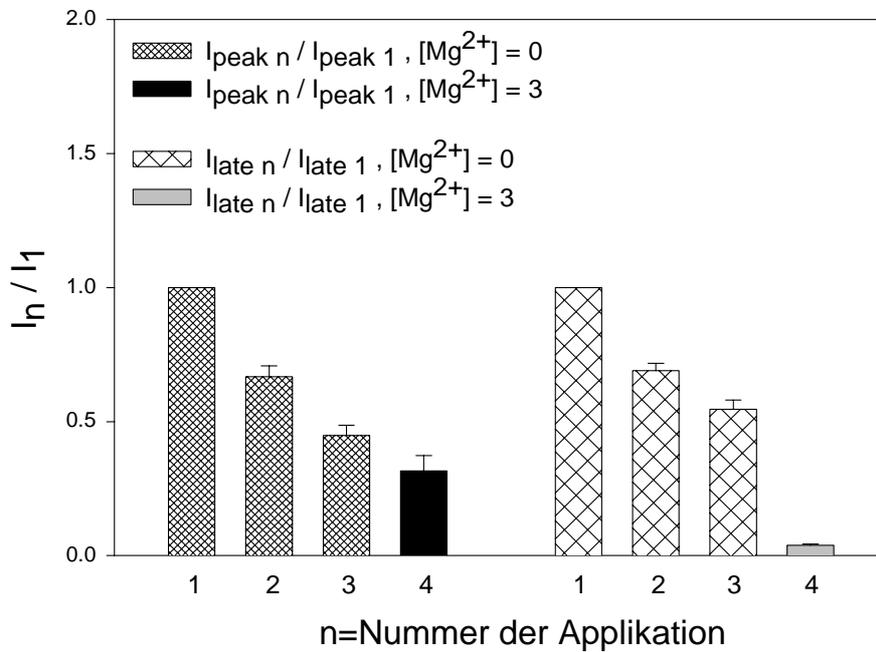


Abb. 33: Wirkung von Mg^{2+} auf hP2X1/7-abhängige Ströme im Kontext wiederholter ATP-Applikationen. Zunächst wurde 3 mal 0,1 mM ATP in divalentfreier Badlösung (Lösung g) für jeweils 6 s. appliziert. Danach erfolgt die ATP-Applikation unter zusätzlicher Applikation von 3 mM Mg^{2+} . Die Zeit zwischen zwei Applikationen betrug

4 min. Die jeweils gemessenen Komponenten I_{peak} und I_{late} wurden getrennt auf die entsprechenden Amplituden normiert, die durch die erste Applikation von 0,1 mM ATP aktiviert wurde ($I_{\text{peak } n} / I_{\text{peak } 1}$ bzw. $I_{\text{late } n} / I_{\text{late } 1}$). $N = 7$. Konzentrationsangaben in mM. Die Messungen erfolgten 3 dpi

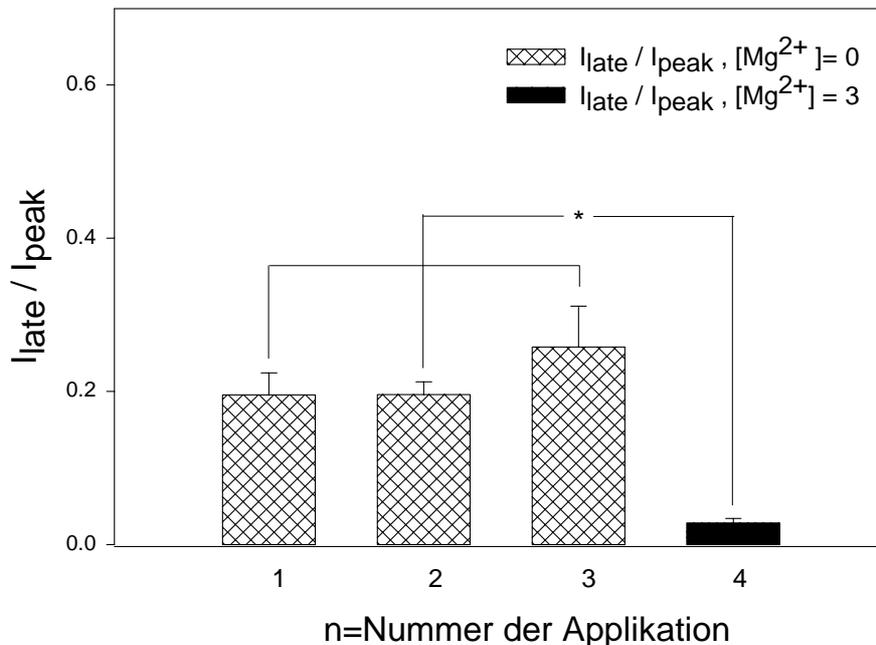


Abb. 34: Wirkung von Mg^{2+} auf das Verhältnis der beiden Komponenten I_{peak} und I_{late} bei hP2X1/7 im Kontext wiederholter ATP-Applikationen. Die Werte stammen aus dem gleichen Versuch wie die der Abb. 33

KN62

Als weiterer potenter Antagonist an hP2X7-Rezeptoren wird das Isoquinolin-Derivat KN62 beschrieben (Humphreys, Virginio et al., 1998; Gargett and Wiley, 1997) (Michel, Kaur et al., 2000). Abb. 35 zeigt an einem Beispiel die Wirkung von KN62 auf hP2X1/7-abhängige Ströme. Bei Betrachtung der Komponente I_{late} erreicht 1 μM KN62 bei einer Agonisten-Konzentration von $[\text{ATP}] = 0,1 \text{ mM}$ eine Blockade von ca. 80 %. Allerdings wird der Gipfelstrom auch zu ca. 72 % geblockt. Auch hierbei findet sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den einzeln injizierten hP2X1- und hP2X7-Rezeptoren und den entsprechenden Komponenten bei hP2X1/7. Siehe Abb. 36 und Abb. 37. Die aus der praktisch unselektiven Blockade beider Komponenten resultierende Verkleinerung des relativen Anteils der späten Komponente I_{late} im Verhältnis zu I_{peak} ist nur minimal und nicht signifikant, siehe Abb. 38.

Um bei hP2X1/7 die späte Komponente I_{late} besser zur Darstellung zu bringen, wurde hierbei die dreifache Menge an P2X7-mRNA injiziert, als bei den einzeln injizierten hP2X1 und hP2X7, nämlich statt 20 nl 1:5 verdünnter mRNA 20 nl 3:5 verdünnter mRNA. Deswegen erscheint bei hP2X1/7 die Komponente I_{late} im Vergleich zu I_{peak} (siehe Abb. 36) größer als das analoge Verhältnis der isolierten hP2X7-abhängigen Ströme zu den hP2X1-abhängigen Strömen (siehe Abb. 37). Außerdem wurden die Experimente für koinjizierte und einzeln injizierte Rezeptoren an Oozyten verschiedener Frösche durchgeführt, weshalb nicht die absoluten Amplituden, sondern nur die relative Wirkung des KN62 auf das Verhältnis der beiden Komponenten I_{peak} und I_{late} miteinander vergleichbar sind.

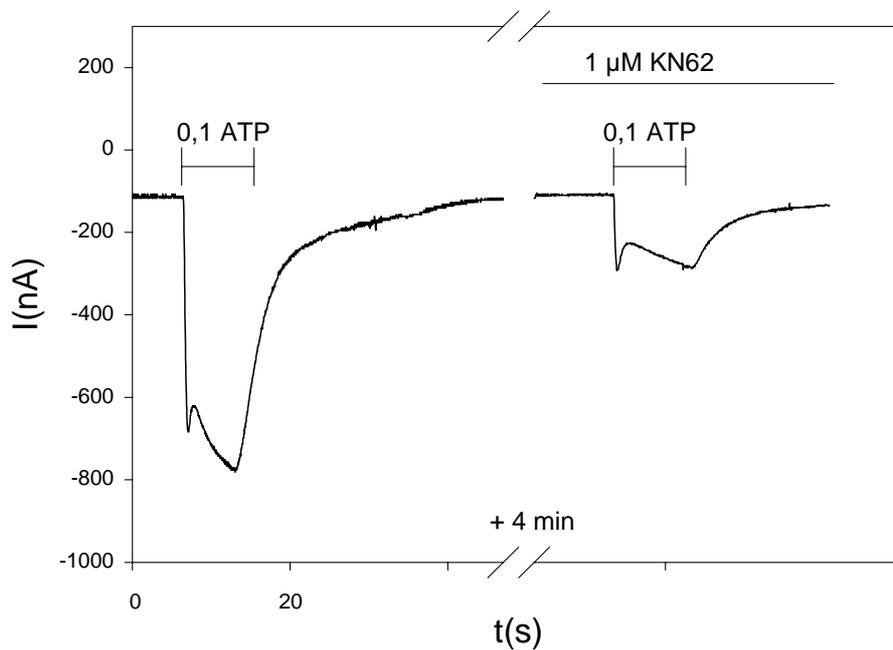


Abb. 35: typisches Beispiel für die Wirkung von KN62 auf hP2X1/7-abhängige Ströme. Die Applikation von ATP (in mM) und KN62 ist markiert. Die gezeigten Ströme stammen von zwei verschiedenen Oozyten, von denen die zweite vor der Messung 10 min in Ca-freier Lösung (Lösung g, Tabelle 1), der 1 μM KN62 zugesetzt wurde, inkubiert war. Die Messungen wurden am zweiten Tag nach Injektion von 20 nl im Verhältnis 1:5 verdünnter mRNA für hP2X1 und 20 nl im Verhältnis 3:5 verdünnter mRNA für hP2X7 durchgeführt.

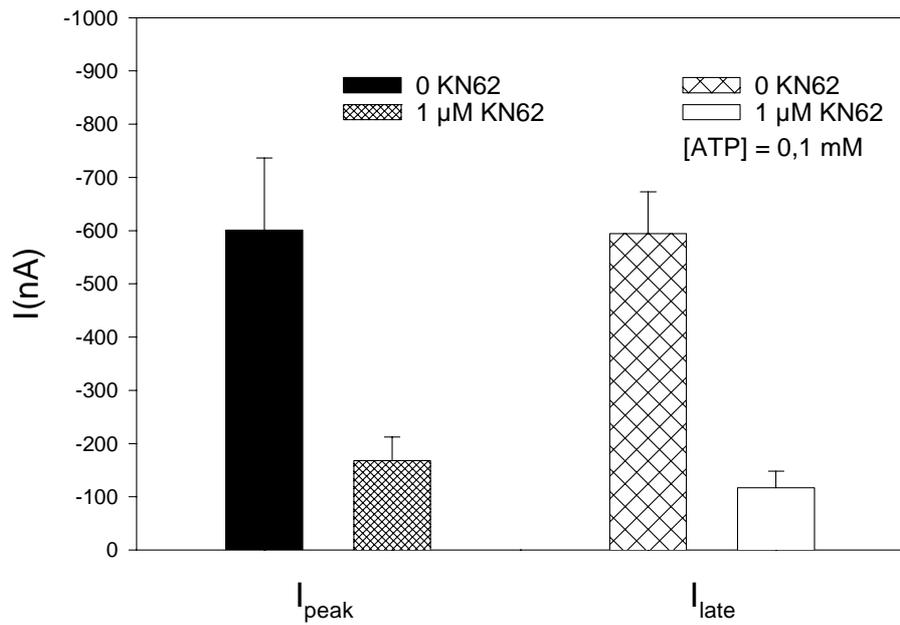


Abb. 36: Durchschnittliche Ströme I_{peak} und I_{late} bei hP2X1/7 unter dem Einfluss von KN62.

Versuchsbedingungen und Versuchsablauf entsprechen dem, wie sie in Abb. 35 beschrieben sind. N = 5 – 6.

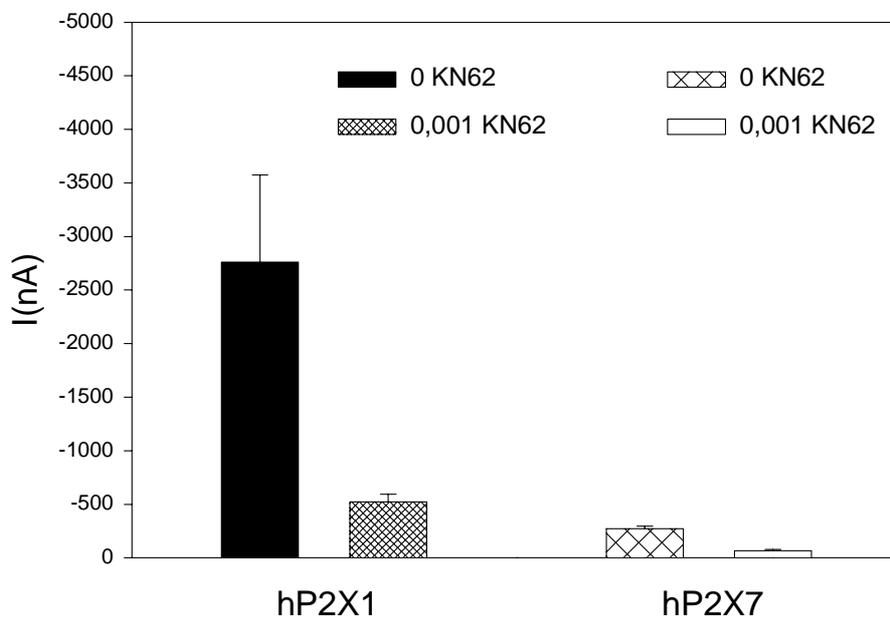


Abb. 37: durchschnittlichen Ströme bei isoliertem hP2X1 bzw. hP2X7 unter dem Einfluss von KN62. Die Messungen wurden am zweiten Tag nach Injektion von jeweils 20 nl im Verhältnis 1:5 verdünnter mRNA durchgeführt.. Die Aktivierung erfolgte mit 0,1 mM ATP. Konzentrationsangaben in mM. N = 4 - 6

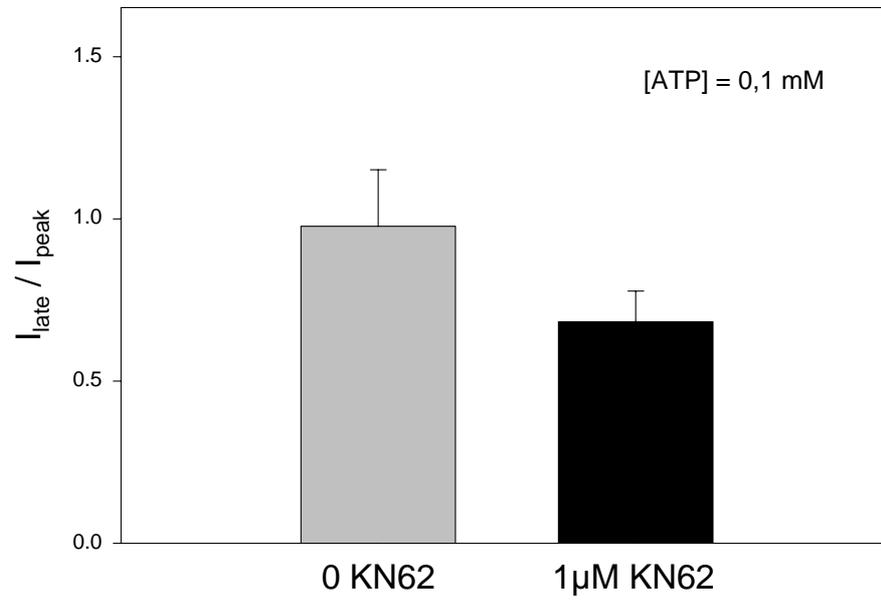


Abb. 38 Einfluss von KN62 auf das Verhältnis der beiden Komponenten I_{peak} und I_{late} bei hP2X1/7. Die Werte stammen aus dem gleichen Versuch wie die der Abb. 36.

5 Diskussion

Verschiedene P2X-Rezeptor-Subtypen formen in nativen Geweben hetero-oligomere Rezeptoren mit distinkten Eigenschaften. Daneben exprimieren aber auch eine Reihe von Geweben mehr als einen P2X-Rezeptor-Subtyp, ohne dass sich für diese eine Interaktion oder die Bildung eines Heteromers nachweisen lässt. (North, 2002) Die Koexpression von P2X1- und P2X7-Rezeptoren wird z.B. in B-Lymphozyten (Sluyter, Barden, and Wiley, 2001; Klapperstück, Büttner, Schmalzing, and Markwardt, 1999), Endothelzellen (Ray, Huang et al., 2002), Prostata (Slater, Barden et al., 2000b), Uterusepithelzellen (Slater, Barden et al., 2000a) und glatten Muskelzellen der V. saphena magna (Cario-Toumaniantz, Loirand et al., 1998) beschrieben.

Die vorliegende Arbeit verfolgte zwei Ziele: Zum einen sollte nach Koexpression des hP2X1-Rezeptors mit dem hP2X7-Rezeptor in *Xenopus*-Oozyten nach einer funktionellen Interaktion der beiden Rezeptoren gesucht werden. Zum anderen sollten Möglichkeiten untersucht werden, die beiden Rezeptor-Subtypen getrennt voneinander zu aktivieren bzw. antagonisieren, um die über P2X1- und P2X7-Rezeptoren vermittelten Effekte in nativen Zellen unterscheiden und getrennt untersuchen zu können.

Langfristig verbindet sich damit aber auch die Hoffnung, P2X-Rezeptoren zum Angriffspunkt therapeutischer Interventionen machen zu können. Zum Beispiel wären immunmodulatorische Medikamente, die über den P2X7-Rezeptor wirken, für der Behandlung entzündlicher, neurodegenerativer oder Krebserkrankungen denkbar (Jacobson, Jarvis et al., 2002).

Zunächst wurde die Kinetik der hP2X1- und hP2X7-abhängigen Ströme detailliert untersucht und mit den Verhältnissen bei Koexpression verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Kinetik der Aktivierung, Desensitivierung, Deaktivierung sowie der Erholung von der Desensitivierung durch die Koexpression der beiden Rezeptoren nicht beeinflusst wurde. Es fanden sich hier keine Veränderungen, die nicht durch die Aktivierung der beiden voneinander unabhängig exprimierten Subtypen erklärbar wären.

Ebenso ergaben die Untersuchungen mit verschiedenen Agonisten und Antagonisten keine Hinweise auf eine Interaktion der beiden Rezeptoren. Die Dosis-Wirkungs-Kurven für die die beiden Komponenten der hP2X1/7-abhängigen Ströme lassen sich ebenfalls durch einfache Überlagerung reiner hP2X1- und hP2X7-Rezeptor-abhängiger Ströme erklären. Dies bestätigt zunächst im Wesentlichen die von Cario-Toumaiantz (Cario-Toumaniantz, Loirand, Ladoux, and Pacaud, 1998) publizierten Ergebnisse. Jene Arbeit untersucht u.a. in einer Affenzelllinie (COS-Zellen) heterolog koexprimierte hP2X1- und hP2X7-Rezeptoren und zeigt dort ebenfalls Hinweise auf eine unabhängige Aktivierung der isolierten homomeren Rezeptor-Kanäle. So induziert die Applikation von ATP einen Einwärtsstrom, der wie in der vorliegenden Arbeit eine schnell desensitivierende Komponente aufweist, die von einer nichtdesensitivierenden Komponente gefolgt wird. Die Appli-

kation von α,β -methyl-ATP hingegen aktiviert nur die schnell desensitivierende Komponente. Ebenso inhibiert die Zugabe von divalenten Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} wie in dieser Studie die nicht desensitivierende späte Komponente, nicht jedoch den initialen Gipfelstrom. Dieses Verhalten weist auf die Aktivierung zweier unabhängiger homomerer Rezeptoren hin (Cario-Toumaniantz, Loirand, Ladoux, and Pacaud, 1998). Allerdings verzichtet diese Arbeit auf eine ausführliche Untersuchung der Kinetik der hP2X1/7-abhängigen Ströme wie des Aktivierungszeitverhaltens oder der Desensitivierung der Rezeptoren ebenso wie auf eine detaillierte pharmakologische Charakterisierung wie die Beschreibung von Dosis-Wirkungs-Kurven.

Die hier dargestellten Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den Befunden, die anhand von Koimmunoprecipitationsexperimenten für den hP2X7-Rezeptor keine Hinweise auf die Bildung eines heterooligomeren Rezeptors geben (Torres, Egan, and Voigt, 1999).

Ebensowenig findet sich ein Anhalt für funktionelle Interaktionen von hP2X1 mit hP2X7 aufgrund der durch den hP2X7-Rezeptor aktivierten Signalkaskaden (s. Einleitung, Kapitel 1.3.3). Jedoch ist eine solche Interaktion anhand unserer Ergebnisse auch nicht völlig auszuschließen, da Oozyten als Expressionssystem diese Interaktionen möglicherweise nicht erkennen lassen. (s. unten).

Allerdings ergab die vorliegende Arbeit auch eine Reihe von Ergebnissen, die im Widerspruch zu den Resultaten anderer Autoren zu stehen scheinen. Dies bezieht sich insbesondere auf die Potenz und die Selektivität verschiedener Agonisten und Antagonisten.

Generell wird allerdings der Vergleich von Ergebnissen verschiedener Arbeiten durch die teils sehr unterschiedlichen Methoden kompliziert. Zum einen kann nicht ausgeschlossen werden bzw. ist es sogar wahrscheinlich, dass das Expressionssystem bei Untersuchungen an heterolog exprimierten Rezeptoren deren Funktion auf bisher unbekannt Weise, z.B. durch Interaktion mit bisher nicht identifizierten Proteinen der Zellmembran oder des Cytosols oder unterschiedliche Struktur der durch P2X7 aktivierten Signalkaskaden, beeinflusst. Ein deutlicher diesbezüglicher Hinweis ergab sich beim Vergleich der rP2X7-Rezeptorfunktion nach heterologer Expression in HEK293-Zellen und *Xenopus*-Oozyten. Drei von den von Smart und Gu untersuchten punktmutierten P2X7-Rezeptoren wurden nicht an der Oberfläche von HEK293-Zellen exprimiert und zeigten auch keine Kanalfunktion. Zwei dieser drei Mutanten wiederum zeigten bei Expression in *Xenopus*-Oozyten aber normale Kanaleigenschaften (Smart, Gu et al., 2003). Ebenso wird auf die unterschiedliche Kinetik der Deaktivierung hP2X7-abhängiger Ströme nach Expression in *Xenopus*-Oozyten (schnell und konstant)(Klapperstück, Büttner, Böhm, Schmalzing, and Markwardt, 2000a) bzw in HEK293-Zellen (langsam, besonders nach wiederholter BzATP-Applikation) (Surprenant, Rassendren, Kawashima, North, and Buell, 1996) hingewiesen. Auch ist der hP2X7-Rezeptor nach Expression in *Xenopus*-Oozyten offenbar nicht in der Lage, die in anderen Expressionssystemen oder in Zellen mit endogener P2X7-artiger Aktivität beobachtete Porenbildung zu induzieren

(Klapperstück, Büttner, Böhm, Schmalzing, and Markwardt, 2000a). Gleiches gilt für den P2X7-Rezeptor der Ratte (Petrou, Ugur, Drummond, Singer, and Walsh, 1997)

Zum anderen werden für die Beurteilung der P2X7-Aktivierung sehr unterschiedliche Verfahren benutzt. So werden neben Messungen von Ionenströmen in Ganzzellspannungsklammertechnik auch die Messung des Kalziumeinstromes mittels Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluo-3 (Bianchi, Lynch, Touma, Niforatos, Burgard, Alexander, Park, Yu, Metzger, Kowaluk, Jarvis, and van Biesen, 1999), die Messung des Ba^{2+} -Einstromes in Fura-2-beladene Lymphozyten (Gargett and Wiley, 1997), die Aufnahme der höhermolekularen Farbstoffe Ethidium und YO-PRO-1 in die untersuchte Zelle oder das sichtbare Auftreten der Membraneorganisation (Jiang, MacKenzie, North, and Surprenant, 2000; Hibell, Thompson, Xing, Humphrey, and Michel, 2001) als Kriterium und Maß der P2X7-Aktivierung herangezogen. So zeigte sich, dass bei einem Glu496Ala mutierten hP2X7-Rezeptor kein Ba^{2+} oder Ethidium⁺-Influx in Lymphozyten gemessen werden konnte (Gu, Zhang et al., 2001), dieser Rezeptor nach Expression in *Xenopus*-Oozyten jedoch einen zum nicht-mutierten hP2X7-Rezeptor ununterscheidbaren Ionenstrom aktivierte (Boldt, Klapperstück et al., 2003).

α,β -methyl-ATP

Elektrophysiologische Untersuchungen an rekombinanten P2X-Rezeptor-Subtypen zeigen, dass α,β -methyl-ATP ein relativ potenter Agonist an homomeren P2X1-, P2X3- und heteromeren P2X2/3- und P2X1/5-Rezeptoren mit einer EC_{50} von ca. 1 μ M ist. An homomeren P2X2- und P2X4-7- sowie heteromeren P2X4/6-Rezeptoren hingegen ist α,β -methyl-ATP ein schwacher partieller Agonist ($EC_{50} > 10 \mu$ M) oder inaktiv (Lambrech, 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich bei Verwendung von Konzentrationen von 3 und 10 μ M α,β -methyl-ATP bei hP2X1/7-abhängigen Strömen der Anteil des späten Stromes I_{late} am Gesamtstrom $I_{peak} + I_{late}$ nicht vom entsprechenden Verhältnis bei durch isolierte hP2X1-Rezeptoren vermittelten Ströme unterscheidet, sich also eine recht gute Isolierung der hP2X1-abhängigen Antwort erreichen lässt. Allerdings wird bei diesen Konzentrationen der hP2X1-Rezeptor möglicherweise nur zu einem geringeren Grad aktiviert als mit entsprechenden ATP-Konzentrationen (vergleiche Abb. 18).

Benzoyl-ATP

2'3'-O-(4-benzoyl)-benzoyl-ATP (BzATP) gilt zur Zeit als der potenteste Agonist an endogenen und rekombinanten P2X7-Rezeptoren. BzATP ist aber auch an anderen P2X-Rezeptoren sowie an P2Y1- und P2Y11-Rezeptor wirksam (Lambrech, 2000; North, 2002).

Für Benzoyl-ATP konnte in Konzentrationen bis 10 μM keine bzw. nur minimale Wirkung auf den hP2X1-Rezeptor festgestellt werden. Auch bei Applikation von 100 μM Benzoyl-ATP konnte bei koexprimierten hP2X1/7 kein Gipfelstrom, der die Aktivierung von hP2X1 repräsentiert hätte, abgegrenzt werden. Im Gegensatz dazu wird in verschiedenen Arbeiten auf die Wirksamkeit von Benzoyl-ATP auf den hP2X1-Rezeptor in gleichen oder sogar geringeren Konzentrationen als den hier verwendeten hingewiesen. (Cario-Toumaniantz, Loirand, Ladoux, and Pacaud, 1998) (Bianchi, Lynch, Touma, Niforatos, Burgard, Alexander, Park, Yu, Metzger, Kowaluk, Jarvis, and van Biesen, 1999). Bianchi quantifiziert die Rezeptoraktivierung anhand von Messungen des Ca-Einstroms in Fluo-3-beladene Zellen einer humanen Astrozytom-Zelllinie und gibt für hP2X7 und rP2X7 im Vergleich zu den anderen P2X-Rezeptor-Subtypen sogar die geringste Empfindlichkeit gegen BzATP an ($p\text{EC}_{50} = 5,33$). Demgegenüber ist in jener Arbeit BzATP am hP2X1-Rezeptor im nM-Bereich wirksam mit $p\text{EC}_{50} = 8,74$ (Bianchi, Lynch, Touma, Niforatos, Burgard, Alexander, Park, Yu, Metzger, Kowaluk, Jarvis, and van Biesen, 1999). Cario-Toumaniantz zeigt u.a. an heterolog in COS-Zellen exprimierten hP2X1-Rezeptoren mittels Spannungsklammertechnik eine deutliche Aktivierung des Rezeptors durch 100 μM BzATP. Die Ursache für diese unterschiedlichen Befunde ist unbekannt, spiegelt aber möglicherweise die Beeinflussung der Rezeptorfunktion durch das Expressionssystem wider.

ATP

In nativen Zellen induziert ATP über einen sehr großen Konzentrationsbereich verschiedene Effekte. So erhöht ATP in T-Lymphozyten die Membranpermeabilität, vermag aber bei Konzentrationen unter 0,1 mM keine Cytolyse zu induzieren. (El-Moatassim, Maurice et al., 1989). Cytolyse und Zelltod der untersuchten T-Lymphozyten sind aber die Folge von ATP-Applikationen im millimolaren Bereich (Di Virgilio, Bronte et al., 1989), (Filippini, Taffs et al., 1990), (Zanovello, Bronte et al., 1990). Verschiedene immunmodulatorische Effekte treten schon bei applizierten ATP-Konzentrationen von unter 0,1 mM ATP auf, wohingegen ATP-induzierte Abtötung von Mykobakterien in humanen Macrophagen erst bei ATP-Konzentrationen von mindestens 0,5 mM auftrat (Lammas, Stober et al., 1997). Die molekulare Basis für die unterschiedlichen Effekte über diesen großen ATP-Konzentrationsbereich hinweg sind noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Erklärung könnten verschiedene ATP-Bindungsstellen mit unterschiedlichen Dissoziationskonstanten sein. Für den hP2X7-Rezeptor geben detaillierte Untersuchungen zur Kinetik sowie die ATP-Dosis-Wirkungs-Kurven für verschiedene Komponenten hP2X7-abhängiger Ströme deutliche Hinweise auf funktionell unterschiedliche Bindungsstellen für ATP und BzATP. So konnte für die ATP-Dosis-Wirkungs-Kurve eine gute Approximation mittels Summe zweier Hillfunktionen (s. Gleichung 5) erreicht werden, was ein Hinweis auf die Existenz zweier ATP-Bindungsstellen mit scheinbaren Dissoziationskonstanten von $K_{D1} = 4 \mu\text{M}$ und $K_{D2} = 200 \mu\text{M}$ ist. Dabei ist unklar, ob die beiden Bindungsstellen per se unterschiedliche Dissozia-

tionskonstanten aufweisen, oder ob die Besetzung der ersten Bindungsstelle mit einem ATP-Molekül die Affinität der zweiten Bindungsstelle im Sinne einer negativen Kooperativität sekundär vermindert (Klapperstück, Büttner, Schmalzing, and Markwardt, 2001).

In dieser Arbeit wurde neben der ATP-Dosis-Wirkungs-Kurve für hP2X7 auch jene für hP2X1 sowie die entsprechenden Komponenten bei hP2X1/7 jeweils mit einer zweifachen Hill-Funktion entsprechend Gleichung 5 gefittet. Für hP2X1 ergaben sich damit K_D -Werte von $K_{D1} = 0,35 \mu\text{M}$ und $K_{D2} = 50 \mu\text{M}$.

Interessanterweise werden von vielen Autoren ATP Dosis-Wirkungs-Kurven für den P2X1-Rezeptor nur bis zu $30 \mu\text{M}$ mit Werten für die halbmaximale Aktivierungskonzentration von $EC_{50} \approx 1 \mu\text{M}$ (Valera, Hussy, Evans, Adami, North, Surprenant, and Buell, 1994), $0,7 \mu\text{M}$ (Rettinger and Schmalzing, 2003), $3 \mu\text{M}$ (Buell, Michel, Lewis, Collo, Humphrey, and Surprenant, 1996) oder $0,9 \mu\text{M}$ (Evans, Lewis, Buell, Valera, North, and Surprenant, 1995) angegeben.

Evans untersucht die ATP-Dosis-Wirkungs-Kurve nach Expression in *Xenopus*-Oozyten auch bis 1 mM ATP, gibt jedoch auch dafür einen EC_{50} -Wert von $0,8 \mu\text{M}$ an.

In der vorliegenden Studie liegt bei ca. $10 \mu\text{M}$ ATP in etwa der Konzentrationsbereich, in dem die erste maximale relative Stromstärke bei theoretisch unendlicher ATP-Konzentration erreicht wird. Zumindest unter den Versuchsbedingungen, die dieser Arbeit zu Grunde lagen, ist aber eine Sättigung der Rezeptorantwort bei dieser Konzentration noch nicht erreicht, weder bei Einzelexpression von hP2X1 noch bei Koexpression mit hP2X7. Nun ist die Annahme zweier verschiedener ATP-Bindungsstellen analog zum hP2X7-Rezeptor auch für den hP2X1-Rezeptor allein aufgrund der Dosis-Wirkungs-Kurve sehr spekulativ. Sie böte aber eine mögliche Erklärung für den großen Konzentrationsbereich, in dem die Rezeptorantwort von der Konzentration des Agonisten abhängig ist. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für den weiteren Anstieg des ATP-induzierten Stroms bei Konzentrationen $>30 \mu\text{M}$ ist die Tatsache, dass die Messung von Gipfelströmen eigentlich keine Messung in stabilen Gleichgewichtszuständen darstellt. Dies wird jedoch eigentlich bei Beschreibungen von Dosis-Wirkungs-Kurven mittels Hillfunktion, die aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet werden, gefordert. Genauer gesagt heißt dies für den P2X1-Rezeptor, dass der im Vergleich zur schnellen Aktivierung des P2X1-Rezeptors langsame Lösungswechsel zu einem langsamen Anfluten des ATP, das den Rezeptor aktiviert, führt. Dies bedeutet wiederum für Oozyten, dass nicht alle hP2X1-Rezeptoren gleichzeitig aktiviert werden. Wegen der sehr schnell auf die Aktivierung folgenden Desensitivierung führt dies dazu, dass während des Stromgipfels nur ein Teil der insgesamt aktivierten hP2X1-Rezeptoren gerade aktiv sind. Mit anderen Worten, die Stromantwort wird durch den relativ langsamen Lösungswechsel zeitlich verschmiert, d.h. kleiner aber länger andauernd. Bei höheren, supramaximalen ATP-Konzentrationen wird der Konzentrationsanstieg zu aktivierenden ATP-Konzentrationen schneller vonstatten gehen, da das Erreichen der supramaximalen Konzentrationen zwar genauso dem langsamen Lösungswechsel unterliegt, aber

schon geringere Konzentrationen (die schneller erreicht werden) zur maximalen Aktivierung der hP2X1-Rezeptoren ausreichen.

Um nachzuweisen, dass dieser Mechanismus nicht ausschlaggebend für den weiteren Anstieg der ATP-Dosis-Wirkungs-Kurve ist, wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurve für den hP2X1-Rezeptor die Wirkung nicht nur anhand der maximalen Stromamplituden, sondern auch anhand des Strom-Zeit-Integrals, also der geflossenen Ladungsmenge bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass eine Desensitivierung des Rezeptors nur nach seiner Aktivierung erfolgt, müsste die damit gemessene Antwort unabhängig von der Geschwindigkeit des Lösungswechsels sein. In der Tat lässt sich auf diese Weise auch ein weiterer Anstieg der geflossenen Ladungsmenge bei Konzentrationen $>30\mu\text{M}$ zeigen, und zwar ebenfalls mit einer angedeuteten doppelten S-Form. Dies stützt die Annahme zweier verschiedener Bindungsstellen auch für den hP2X1-Rezeptor. Weitere Untersuchungen sind aber zur Abklärung dieser Hypothesen notwendig.

Die Suramin-Analoga NF279 und NF449

Die Wirkung dieser Suramin-Analoga auf verschiedene einzelne P2X-Rezeptoren wurde schon in einigen Arbeiten untersucht (Damer, Niebel et al., 1998) (Braun, Rettinger, Ganso, Kassack, Hildebrandt, Ullmann, Nickel, Schmalzing, and Lambrecht, 2001). Untersuchungen an heterolog in *Xenopus*-Oozyten exprimierten Rezeptoren zeigte eine hohe Potenz am P2X1-Rezeptor der Ratte (rP2X1) verglichen mit rP2X2, rP2X3 und hP2X4 (Rettinger, Schmalzing et al., 2000) sowie eine deutlich höhere Potenz am hP2X1-Rezeptor als am hP2X7-Rezeptor mit Werten für die halbmaximale Hemmkonzentration von $0,05\ \mu\text{M}$ bzw. $2,8\ \mu\text{M}$ (Klapperstück, Büttner, Nickel, Schmalzing, Lambrecht, and Markwardt, 2000b). Die Wirkung von NF449 wurde ebenfalls an heterolog in *Xenopus*-Oozyten exprimierten hP2X1- und hP2X7-Rezeptoren untersucht. Dabei ergaben sich IC_{50} -Werte von $0,05\ \text{nM}$ für hP2X1 und $40\ \mu\text{M}$ für hP2X7 (Hülsmann, Nickel, Kassack, Schmalzing, Lambrecht, and Markwardt, 2003). Die vorliegende Arbeit bestätigt auch bei Koexpression der beiden Rezeptoren die hohe Wirksamkeit der beiden Substanzen am hP2X1-Rezeptor und die in den verwendeten Konzentrationen deutlich geringere (NF279) bzw. fast fehlende (NF449) Wirkung am hP2X7-Rezeptor. Damit wird zum einen die Vermutung untermauert, dass mit beiden Substanzen eine gute Isolierung der über die beiden untersuchten Rezeptoren vermittelten Effekte in nativen Geweben möglich ist. Da zum anderen die Applikation von NF449 die späte, hP2X7-abhängige Stromkomponente der durch hP2X1/7 vermittelten Ströme praktisch unbeeinflusst lässt, ist dies ein weiteres Indiz für die fehlende Interaktion der beiden untersuchten Rezeptoren.

Die Applikation von NF279 beeinflusst aber nicht nur die Aktivierung des hP2X1-Rezeptors durch die erste ATP-Applikation. Nach Auswaschen des NF279 werden die durch ATP aktivierten hP2X1-abhängigen Ströme in Abhängigkeit der zuvor applizierten NF279-Konzentration und des

damit erreichten antagonistischen Effektes größer als die vor der NF279-Applikation gemessenen Kontrollströme. NF279 antagonisiert also nicht nur die Aktivierung, sondern auch die Desensitivierung von hP2X1. Dies ist Indiz für die Annahme, dass die Desensitivierung des Rezeptors seine vorangehende Aktivierung voraussetzt (Klapperstück, Büttner, Nickel, Schmalzing, Lambrecht, and Markwardt, 2000b; Rettinger and Schmalzing, 2003).

In dieser Arbeit zeigt die hP2X1-abhängige Gipfelstromkomponente der hP2X1/7-abhängigen Ströme ebenfalls dieses Verhalten. Bei NF279-Konzentrationen von 0,01 mM sind die Gipfelströme nach der NF279-Applikation größer als vor der NF279-Applikation. Der Unterschied ist allerdings nur bei Aktivierung mit einer ATP-Konzentration von 0,1 mM signifikant.

Hier kommt der kompetitive Charakter der Hemmung durch NF279 zum Ausdruck. D.h. bei einer ATP-Konzentration von 1 μ M ATP braucht man 1 μ M NF279 zur vollständigen Blockade, bei 100 μ M ATP braucht man 10 μ M NF279. Trotz scheinbar vollständiger Hemmung des hP2X1-abhängigen Stroms bei 1 mM ATP und 10 μ M NF279 scheint es bereits eine gewisse Desensitivierung zu geben, da erst bei Senkung der Agonistenkonzentration (0,1 mM ATP und 10 μ M NF279) die Desensitivierung geblockt wird. D.h. erst die Verringerung der Agonistenkonzentration führt zu einer effektiv höheren Wirkung des Antagonisten. Dadurch haben die hP2X1-Rezeptoren die doppelte Zeit für die Rückkehr aus der Desensitivierung als bei noch verbleibender Wirkung des Agonisten ATP und somit werden die Ströme nach dem Auswaschen von NF279 größer als ohne NF279-Applikation.

Insgesamt gesehen erscheint die Unterdrückung der hP2X1-Rezeptor-abhängigen Zellantworten bei Zellen, die hP2X1 und hP2X7 koexprimieren, durch Anwendung verschiedener hP2X1-Antagonisten leicht möglich. Unter Umständen sollte eine Applikation von 0,1 μ M ATP für einige Minuten ausreichen, um die hP2X1-Rezeptoren vollständig zu desensitivieren (Buell, Michel, Lewis, Collo, Humphrey, and Surprenant, 1996; Rettinger and Schmalzing, 2003) hP2X7-Rezeptoren werden bei dieser Konzentration noch nicht aktiviert (Klapperstück, Büttner, Schmalzing, and Markwardt, 2001).

Antagonisierung der hP2X7-abhängigen späten Stromkomponente bei hP2X1/7

Für verschiedene Substanzen wird eine gute inhibitorische Potenz am P2X7-Rezeptor beschrieben, wie Brilliant Blue G (Jiang, MacKenzie, North, and Surprenant, 2000), oxidiertes ATP (oATP) (Wiley, Chen, Snook, and Jamieson, 1994) oder KN62 (Humphreys, Virginio, Surprenant, Rice, and Dubyak, 1998; Gargett and Wiley, 1997; Michel, Kaur, Chessell, and Humphrey, 2000). In transfizierten HEK293 Zellen wurde mit 300 nM KN62 eine $95 \pm 2\%$ Blockade der durch 300 μ M Benzoyl-ATP induzierten Ströme erreicht (Humphreys, Virginio, Surprenant, Rice, and Dubyak, 1998; Gargett and Wiley, 1997). An Fura-2 beladenen nativen humanen B-Lymphozyten von Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie wurde u.a. eine komplette Inhibition des durch 260 μ M ATP⁴⁻-induzierten Ba²⁺ Influxes bei einer Konzentration von [KN62] = 500 nM

(Gargett and Wiley, 1997), sowie des durch $100 \mu\text{M ATP}^{4-}$ -induzierten Ba^{2+} Influxes durch Inkubation der Zellen mit $0,3 \text{ mM oATP}$ für 60 min beschrieben (Wiley, Chen, Snook, and Jamieson, 1994). Da B-Lymphozyten aber neben P2X7 auch andere P2X-Rezeptoren wie P2X1 und P2X4 exprimieren (Klapperstück, Büttner, Schmalzing, and Markwardt, 1999), ist die Interpretation dieser Ergebnisse bezüglich der Wirkung am isolierten P2X7 erschwert. Über die Wirkung von KN62 auf hP2X1-Rezeptoren ist bisher nichts bekannt.

Jiang untersucht die Wirkung von Brilliant Blue G an heterolog in HEK293-Zellen exprimierten P2X-Rezeptoren. Dabei werden u.a. für hP2X7 bei einer Agonisten-Konzentration von $[\text{BzATP}] = 300 \mu\text{M}$ eine halbmaximale Hemmkonzentration von $\text{IC}_{50} = 265 \pm 192 \text{ nM}$, für hP2X1 bei einer Agonisten Konzentration von $[\text{ATP}] = 0,5 \mu\text{M}$ eine IC_{50} von größer 5000 nM angegeben (Jiang, MacKenzie, North, and Surprenant, 2000).

In dieser Studie war es jedoch mit keinem dieser Antagonisten möglich, die hP2X7-abhängige späte Stromkomponente der hP2X1/7-abhängigen Ströme ausreichend selektiv zu blockieren. Für KN62 und oATP wurde zum einen die beschriebene hohe Potenz am hP2X7-Rezeptor nicht erreicht, zum anderen bei einer Agonistenkonzentration von $[\text{ATP}] = 0,1 \text{ mM}$ die hP2X1-abhängige Gipfelstromkomponente ebenfalls zu 72% (KN62) bzw. 63% (oATP) geblockt.

Brilliant Blue G zeigte eine geradezu umgekehrte Wirkung an den beiden untersuchten Rezeptoren als die von Jiang publizierte. Bei den hP2X1/7-abhängigen Strömen bleibt die späte Komponente, die hauptsächlich hP2X7 charakterisiert, mit 98% des Kontrollwertes praktisch unbeeinflusst, während die vorwiegend hP2X1-abhängige Gipfelstromkomponente deutlich auf ca. 13% des Kontrollwertes geblockt wird. Für die fehlende Wirkung auf den hP2X7-Rezeptor könnte die sehr kurze Einwaschzeit des Brilliant Blue G von nur 18 s ursächlich sein (In der Arbeit von Jiang werden 4 min Inkubationszeit angegeben.). Der Grund für die starke Wirkung am hP2X1-Rezeptor ist allerdings unklar.

Lediglich die Applikation von 3 mM Mg^{2+} führte bei hP2X1/7 durch Suppression der hP2X7-abhängigen späten Komponente zu einer effektiven Isolierung der Gipfelstromkomponente. Der hP2X7-abhängige Stromanteil wurde vollständig unterdrückt, während der hP2X1-induzierte Strom nicht signifikant verringert wurde. Die Mg^{2+} -Zugabe verringert den freien ATP^{4-} -Anteil von $100 \mu\text{M}$ auf ca. $2,4 \mu\text{M}$. Dies müsste, falls für beide P2X-Rezeptortypen freies ATP^{4-} die aktive Form darstellen würde, nach Abb. 13 die hP2X1-Rezeptor-abhängige Stromantwort auf ca. 30% , die hP2X7-Rezeptor-abhängige Stromantwort auf ca. 15% reduzieren. Nur letzteres stimmt jedoch mit den hier erhobenen Befunden (s. Abb. 34) überein. Dies spricht somit dafür, dass ATP^{4-} der aktive Agonist für hP2X7, jedoch nicht für hP2X1 ist. Allerdings bleibt dann unklar, welche Form (komplexiert oder nicht) bzw. welcher Teil des ATP-Moleküls den aktiven Agonisten beim hP2X1-Rezeptor darstellt. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Hemmwirkung durch extrazelluläres Mg^{2+} am hP2X7-Rezeptor nicht durch Komplexierung des freien ATP^{4-} , sondern

durch direkte Bindung am hP2X7-Rezeptor-Molekül mit nachfolgender allosterischer Wirkung an der ATP-Bindungsstelle zustande kommt. Für diese Auffassung gibt es Hinweise (Virginio, Church et al., 1997), die Problematik erscheint aber noch nicht geklärt.

6 Zusammenfassung

Adenosintriphosphat (ATP) bewirkt als extrazelluläres Signalmolekül an einer Vielzahl verschiedener Gewebe eine Reihe sehr unterschiedlicher Effekte, die über bestimmte Oberflächenrezeptoren der Zellmembranen vermittelt werden. Dazu zählen Kontraktion glatter Muskelzellen, neuronale Transmission, exokrine und endokrine Sekretion, modulatorische Wirkungen in der Immunantwort, Vermittlung von Entzündungsvorgängen, Plättchenaggregation, Schmerzperzeption und Modulation der kardialen Funktion (Ralevic and Burnstock, 1998). Rezeptoren für extrazelluläre Nukleotide werden heute in P2Y- und P2X-Rezeptoren unterteilt. Während bei ersteren die Signaltransduktion über die Interaktion mit G-Proteinen vermittelt wird, stellen letztere eine neue Klasse Liganden-gesteuerter Ionenkanäle dar (Valera, Hussy, Evans, Adami, North, Surprenant, and Buell, 1994). Sieben P2X-Rezeptor-Subtypen (P2X1-7) wurden bis heute kloniert, funktionell charakterisiert und ihre Gewebeverteilung untersucht. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die funktionsfähigen Rezeptoren aus drei Untereinheiten bestehen (Nicke, Bäumert, Rettinger, Eichele, Lambrecht, Mutschler, and Schmalzing, 1998; North, 2002). Native Zellen können mehrere verschiedenen Subtypen koexprimieren. Dabei werden neben voneinander unabhängigen homooligomeren Rezeptoren auch heterooligomere Rezeptoren mit besonderen Eigenschaften gefunden (Torres, Egan, and Voigt, 1999; Lewis, Neidhart, Holy, North, Buell, and Surprenant, 1995; North, 2002). In der vorliegenden Arbeit werden humane P2X1- und P2X7-Rezeptoren nach Koexpression in Oozyten von *Xenopus Laevis* auf eventuelle Interaktionen hin untersucht, die in einer Veränderung des jeweiligen elektrophysiologischen Verhaltens resultieren. Weiterhin werden Möglichkeiten untersucht, die beiden Subtypen isoliert zu aktivieren, um die durch P2X1 und P2X7 vermittelten Effekte in nativen Geweben getrennt voneinander untersuchen zu können. Bei der detaillierten Untersuchung der P2X1/7-Rezeptor vermittelten Ströme zeigt sich, dass die Kinetik der Aktivierung von hP2X1- und hP2X7-, der Desensitivierung von hP2X1-, der Deaktivierung von hP2X7- und der Erholung von der Desensitivierung von hP2X1-Rezeptoren durch die Koexpression nicht verändert ist.

Bei Koexpression kann eine isolierte Aktivierung von P2X7 durch die Blockade der P2X1-abhängigen Komponente mit den Suramin-Analoga NF279 und NF449 sowie durch Applikation des P2X7-Agonisten Benzoyl-ATP erreicht werden. Eine isolierte Aktivierung der P2X1-abhängigen Komponente erscheint insgesamt schwieriger. Sie gelingt relativ gut durch Applikation des P2X1-Agonisten α,β -methyl-ATP in geringen Konzentrationen ($<10\mu\text{M}$), durch Suppression der P2X7-abhängigen Komponente mittels 3 mM Mg^{2+} , sowie durch Applikation sehr kleiner ATP-Konzentrationen von unter $1\mu\text{M}$, bei denen allerdings der hP2X1-Rezeptor nicht vollständig aktiviert ist. Mit den als P2X7-Antagonisten beschriebenen Substanzen Brilliant Blue G, KN62 und

2,3-Dialdehyd-ATP (oATP) kann dagegen keine effektive Isolierung der P2X1-abhängigen Komponente erzielt werden.

In dieser Studie findet kein Hinweis auf die Bildung eines heteromeren Rezeptors oder auf funktionelle Interaktionen der beiden isolierten Rezeptoren. Zu bedenken ist allerdings die mögliche Beeinflussung der Rezeptorfunktion durch das Expressionssystem.

7 Literaturverzeichnis

1. Abbracchio, M.P., Burnstock, G., 1994. Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64, 445-475.
2. Alzola, E., Pereztxebarria, A., Kabre, E., Fogarty, D.J., Metioui, M., Chaib, N., Macarulla, J.M., Matute, C., Dehaye, J.P., Marino, A., 1998. Activation by P2X₇ agonists of two phospholipases A₂ (PLA₂) in ductal cells of rat submandibular gland - coupling of the calcium-independent PLA₂ with kallikrein secretion. *J. Biol. Chem.* 273, 30208-30217.
3. Berne, R.M., 1963. Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* 204, H317-H322.
4. Bianchi, B.R., Lynch, K.J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E.C., Alexander, K.M., Park, H.S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., Jarvis, M.F., van Biesen, T., 1999. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 376, 127-138.
5. Boehm, S., 2003. P2Ys go neuronal: modulation of Ca²⁺ and K⁺ channels by recombinant receptors. *Br. J. Pharmacol.* 138, 1-3.
6. Boldt, W., Klapperstück, M., Büttner, C., Sadtler, S., Schmalzing, N., Markwardt, F., 2003. Glu⁴⁹⁶Ala polymorphism of human P2X₇ receptor does not affect its electrophysiological phenotype. *Am. J. Physiol.* 284, C749-C756.
7. Boyd, I.A., Forrester, T., 1968. The release of adenosine triphosphate from frog skeletal muscle in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 199, 115-135.

8. Bradford,M.D., Soltoff,S.P., 2002. P2X₇ receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *Biochem.J.* 366, 745-755.
9. Braun,K., Rettinger,J., Ganso,M., Kassack,M., Hildebrandt,C., Ullmann,H., Nickel,P., Schmalzing,G., Lambrecht,G., 2001. NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 364, 285-290.
10. Bretschneider,F., Klapperstück,M., Löhn,M., Markwardt,F., 1995. Nonselective cationic currents elicited by extracellular ATP in human B-lymphocytes. *Pflügers Arch.* 429, 691-698.
11. Bretschneider,F., Markwardt,F., 1999. Drug-dependent ion channel gating by application of concentration jumps using U-tube technique. *Methods Enzymol.* 294, 180-189.
12. Budagian,V., Bulanova,E., Brovko,L., Orinska,Z., Fayad,R., Paus,R., Bulfone-Paus,S., 2003. Signaling through P2X₇ receptor in human T cells involves p56(lck), kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *J.Biol.Chem.* 278, 1549-1560.
13. Buell,G., Michel,A.D., Lewis,C., Collo,G., Humphrey,P.P.A., Surprenant,A., 1996. P2X₁ receptor activation in HL60 cells. *Blood* 87, 2659-2664.
14. Burnstock,G., 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol.Rev.* 24, 509-581.
15. Burnstock,G., 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Bolis,L., Straub,R.W. (Eds.), *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones.* New York, pp. 107-118.
16. Cario-Toumaniantz,C., Loirand,G., Ladoux,A., Pacaud,P., 1998. P2X₇ receptor activation-induced contraction and lysis in human saphenous vein smooth muscle. *Circ.Res.* 83, 196-203.

17. Chiozzi,P., Sanz,J.M., Ferrari,D., Falzoni,S., Aleotti,A., Buell,G., Collo,G., Di Virgilio,F., 1997. Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X₇ receptor. *J.Cell.Biol.* 138, 697-706.
18. Cockcroft,S., Gomperts,B.D., 1979. ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* 279, 541-542.
19. Collo,G., North,R.A., Kawashima,E., Merlo-Pich,E., Neidhart,S., Surprenant,A., Buell,G., 1996. Cloning of P2X₅ and P2X₆ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J.Neurosci.* 16, 2495-2507.
20. Damer,S., Niebel,B., Czeche,S., Nickel,P., Ardanuy,U., Schmalzing,G., Rettinger,J., Mutschler,E., Lambrecht,G., 1998. NF279: a novel potent and selective antagonist of P2X receptor-mediated responses. *Eur.J.Pharmacol.* 350, 5-6.
21. Di Virgilio,F., 1995. The P2Z purinoceptor: An intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol.Today* 16, 524-528.
22. Di Virgilio,F., Bronte,V., Collavo,D., Zanovello,P., 1989. Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *J.Immunol.* 143, 1955-1960.
23. Di Virgilio,F., Solini,A., 2002. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br.J.Pharmacol.* 135, 831-842.
24. Drury,A.N., Szent-Györgyi,A., 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon mammalian heart. *J.Physiol.(Lond.)* 68, 213-237.
25. Dubyak,G.R., El-Moatassim,C., 1993. Signal transduction via P2-purinergetic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am.J.Physiol.* 265, 577-606.

26. El-Moatassim,C., Maurice,T., Mani,J.C., Dornand,J., 1989. The $[Ca^{2+}]_i$ increase induced in murine thymocytes by extracellular ATP does not involve ATP hydrolysis and is not related to phosphoinositide metabolism. *FEBS Lett.* 242, 391-396.
27. Evans,R.J., 1996. Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in chinese hamster ovary cells. *Neurosci.Lett.* 212, 212-214.
28. Evans,R.J., Lewis,C., Buell,G., Valera,S., North,R.A., Surprenant,A., 1995. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol.Pharmacol.* 48, 178-183.
29. Evans,R.J., Surprenant,A., 1996. P2X receptors in autonomic and sensory neurons. *Semin.Neurosci.* 8, 217-223.
30. Fairbairn,I.P., Stober,C.B., Kumararatne,D.S., Lammas,D.A., 2001. ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X₇-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J.Immunol.* 167, 3300-3307.
31. Fernando,K.C., Gargett,C.E., Wiley,J.S., 1999. Activation of the P2Z/P2X₇ receptor in human lymphocytes produces a delayed permeability lesion: involvement of phospholipase D₁. *Arch.Biochem.Biophys.* 362, 197-202.
32. Ferrari,D., Chiozzi,P., Falzoni,S., Dalsusino,M., Melchiorri,L., Baricordi,O.R., Di Virgilio,F., 1997. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J.Immunol.* 159, 1451-1458.
33. Filippini,A., Taffs,R.E., Agui,T., Sitkovsky,M.V., 1990. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 265, 334-340.
34. Forrester,T., Lind,A.R., 1969. Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during and after sustained contractions. *J.Physiol.(Lond.)* 204, 347-364.

35. Gargett,C.E., Wiley,J.S., 1997. The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br.J.Pharmacol.* 120, 1483-1490.
36. Gerlach,E., Deuticke,B., Dreisbach,R.H., 1963. Der Nukleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Coronardurchblutung. *Naturwissenschaften* 50, 228-229.
37. Gillespie,J.H., 1934. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J.Physiol.(Lond.)* 80, 345-349.
38. Gloor,S., Pongs,O., Schmalzing,G., 1995. A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Gene* 160, 213-217.
39. Gu,B., Bendall,L.J., Wiley,J.S., 1998. Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* 92, 946-951.
40. Gu,B.J., Zhang,W.Y., Worthington,R.A., Sluyter,R., Dao-Ung,P., Petrou,S., Barden,J.A., Wiley,J.S., 2001. A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X₇ receptor. *J.Biol.Chem.* 276, 11135-11142.
41. Hibell,A.D., Thompson,K.M., Xing,M., Humphrey,P.P.A., Michel,A.D., 2001. Complexities of measuring antagonist potency at P2X₇ receptor orthologs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 296, 947-957.
42. Hohenegger,M., Waldhoer,M., Beindl,W., Boing,B., Kreimeyer,A., Nickel,P., Nanoff,C., Freissmuth,M., 1998. Gs α -selective G protein antagonists. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95, 346-351.
43. Holton,F.A., Holton,P., 1953. The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J.Physiol.(Lond.)* 119, 50-51.

44. Holton,P., 1959. The liberation of ATP on antidromic stimulation of sensory nerves. *J.Physiol.(Lond.)* 145, 494-504.
45. Hülsmann,M., Nickel,P., Kassack,M., Schmalzing,G., Lambrecht,G., Markwardt,F., 2003. NF449, a novel picomolar potency antagonist at human P2X₁ receptors. *Eur.J.Pharmacol.* 470, 1-7.
46. Humphreys,B.D., Dubyak,G.R., 1996. Induction of the P2z/P2X₇ nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN- γ in the human THP-1 monocytic cell line. *J.Immunol.* 157, 5627-5637.
47. Humphreys,B.D., Virginio,C., Surprenant,A., Rice,J., Dubyak,G.R., 1998. Isoquinolines as antagonists of the P2X₇ nucleotide receptor: High selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol.Pharmacol.* 54, 22-32.
48. Hung,A.C., Sun,S.H., 2002. The P2X₇ receptor-mediated phospholipase D activation is regulated by both PKC-dependent and PKC-independent pathways in a rat brain-derived Type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell.Signal.* 14, 83-92.
49. Jacobson,K.A., Jarvis,M.F., Williams,M., 2002. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J.Med.Chem.* 45, 4057-4093.
50. Jiang,L.H., MacKenzie,A.B., North,R.A., Surprenant,A., 2000. Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X₇ receptors. *Mol.Pharmacol.* 58, 82-88.
51. Kim,M., Spelta,V., Sim,J., North,R.A., Surprenant,A., 2001. Differential assembly of rat purinergic P2X₇ receptor in immune cells of the brain and periphery. *J.Biol.Chem.* 276, 23262-23267.
52. King,B.F., Townsend-Nicholson,A., 2003. Nucleotide and nucleoside receptors. *Toctris Reviews* 23, 1-11.

53. Klapperstück,M., Büttner,C., Böhm,T., Schmalzing,G., Markwardt,F., 2000a. Characteristics of P2X₇ receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1467, 444-456.
54. Klapperstück,M., Büttner,C., Nickel,P., Schmalzing,G., Lambrecht,G., Markwardt,F., 2000b. Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X₁ and P2X₇ receptors. *Eur.J.Pharmacol.* 387, 245-252.
55. Klapperstück,M., Büttner,C., Schmalzing,G., Markwardt,F., 1999. Human B lymphocytes express P2X₁, P2X₄ and P2X₇ purinoceptors. *Biophys.J.* 76, A338.
56. Klapperstück,M., Büttner,C., Schmalzing,G., Markwardt,F., 2001. Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X₇ receptor. *J.Physiol.(Lond.)* 534, 25-35.
57. Labasi,J.M., Petrushova,N., Donovan,C., McCurdy,S., Lira,P., Payette,M.M., Brissette,W., Wicks,J.R., Audoly,L., Gabel,C.A., 2002. Absence of the P2X₇ receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J.Immunol.* 168, 6436-6445.
58. Lambrecht,G., 2000. Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 362, 340-350.
59. Lammas,D.A., Stober,C., Harvey,C.J., Kendrick,N., Panchalingam,S., Kumararatne,D.S., 1997. ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z (P2X₇) receptors. *Immunity* 7, 433-444.
60. Lewis,C., Neidhart,S., Holy,C., North,R.A., Buell,G., Surprenant,A., 1995. Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432-435.
61. Li,G.H., Lee,E.M., Blair,D., Holding,C., Poronnik,P., Cook,D.I., Barden,J.A., Bennett,M.R., 2000. The distribution of P2X receptor clusters on individual neurons in

- sympathetic ganglia and their redistribution on agonist activation. *J.Biol.Chem.* 275, 29107-29112.
62. Markwardt,F., Löhn,M., Böhm,M., Klapperstück,M., 1997. Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *J.Physiol.(Lond.)* 498, 143-151.
63. Michel,A.D., Kaur,R., Chessell,I.P., Humphrey,P.P.A., 2000. Antagonist effects on human P2X₇ receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br.J.Pharmacol.* 130, 513-520.
64. Murgia,M., Hanau,S., Pizzo,P., Rippa,M., Di Virgilio,F., 1993. Oxidized ATP - an irreversible inhibitor of the macrophage purinergic-P2Z receptor. *J.Biol.Chem.* 268, 8199-8203.
65. Nicke,A., Bäumer,H.G., Rettinger,J., Eichele,A., Lambrecht,G., Mutschler,E., Schmalzing,G., 1998. P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: A novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17, 3016-3028.
66. North,R.A., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol.Rev.* 82, 1013-1067.
67. Pannicke,T., Wolfgang,F., Biedermann,B., Schadlich,H., Grosche,J., Faude,F., Wiedemann,P., Allgaier,C., Illes,P., Burnstock,G., Reichenbach,A., 2000. P2X₇ receptors in Müller glial cells from the human retina. *J.Neurosci.* 20, 5965-5972.
68. Petrou,S., Ugur,M., Drummond,R.M., Singer,J.J., Walsh,J.V., 1997. P2X₇ purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. *FEBS Lett.* 411, 339-345.
69. Ralevic,V., Burnstock,G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol.Rev.* 50, 413-492.

70. Rassendren,F., Buell,G.N., Virginio,C., Collo,G., North,R.A., Surprenant,A., 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X₇ - Cloning and expression of a human cDNA. *J.Biol.Chem.* 272, 5482-5486.
71. Ray,F.R., Huang,W., Slater,M., Barden,J.A., 2002. Purinergic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts. *Atherosclerosis* 162, 55-61.
72. Rettinger,J., Schmalzing,G., 2003. Activation and desensitization of the recombinant P2X₁ receptor at nanomolar ATP concentrations. *J.Gen.Physiol.* 121, 451-461.
73. Rettinger,J., Schmalzing,G., Damer,S., Müller,G., Nickel,P., Lambrecht,G., 2000. The suramin analogue NF279 is a novel and potent antagonist selective for the P2X₁ receptor. *Neuropharmacology* 39, 2044-2053.
74. Sattin,A., Rall,T.W., 1970. The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol.Pharmacol.* 6, 13-23.
75. Schilling,W.P., Sinkins,W.G., Estacion,M., 1999. Maitoxin activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X₇-like cytolytic pore in human skin fibroblasts. *Am.J.Physiol.* 277, C755-C765.
76. Slater,M., Barden,J.A., Murphy,C.R., 2000a. Distributional changes of purinergic receptor subtypes (P2X₁₋₇) in uterine epithelial cells during early pregnancy. *Histochem.J.* 32, 365-372.
77. Slater,M., Barden,J.A., Murphy,C.R., 2000b. The purinergic calcium channels P2X_{1,2,5,7} are down-regulated while P2X_{3,4,6} are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. *Histochem.J.* 32, 571-580.

78. Sluyter,R., Barden,J.A., Wiley,J.S., 2001. Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. *Cell Tissue Res.* 304, 231-236.
79. Smart,M.L., Gu,B., Panchal,R.G., Wiley,J., Cromer,B., Williams,D.A., Petrou,S., 2003. P2X₇ receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J.Biol.Chem.* 278, 8853-8860.
80. Solini,A., Chiozzi,P., Morelli,A., Fellin,R., Di Virgilio,F., 1999. Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X₇ receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *J.Cell Sci.* 112, 297-305.
81. Somasundaram,B., Mahaut-Smith,M.P., 2004. Three cation influx currents activated by purinergic receptor stimulation in rat megakaryocytes. *J.Physiol.(Lond.)* 480, 225-231.
82. Soto,F., Garcia-Guzman,M., Gomez-Hernandez,J.M., Hollmann,M., Karschin,C., Stühmer,P., 1996. Cloning and tissue distribution of a novel P2x receptor from rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 3684-3688.
83. Surprenant,A., Rassendren,F., Kawashima,E., North,R.A., Buell,G., 1996. The cytolytic P_{2Z} receptor for extracellular ATP identified as a P_{2X} receptor (P2X₇). *Science* 272, 735-738.
84. Torres,G.E., Egan,T.M., Voigt,M.M., 1999. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits - Specificities exist with regard to possible partners. *J.Biol.Chem.* 274, 6653-6659.
85. Valera,S., Hussy,N., Evans,R.J., Adami,N., North,R.A., Surprenant,A., Buell,G., 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516-519.
86. Virginio,C., Church,D., North,R.A., Surprenant,A., 1997. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor. *Neuropharmacology* 36, 1285-1294.

87. Virginio,C., MacKenzie,A., North,R.A., Surprenant,A., 1999. Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X₇ receptor. J.Physiol.(Lond.) 519, 335-346.
88. Waite,K.A., Wallin,R., Qualliotine-Mann,D., McPhail,L.C., 1997. Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase. J.Biol.Chem. 272, 15569-15578.
89. Weber,W.M., Liebold,K.M., Reifarth,F.W., Uhr,U., Clauss,W., 1995. Influence of extracellular Ca²⁺ on endogenous Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. Pflügers Arch. 429, 820-824.
90. Werner,P., Seward,E.P., Buell,G.N., North,R.A., 1996. Domains of P2X receptors involved in desensitization. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93, 15485-15490.
91. Wiley,J.S., Chen,J.R., Snook,M.B., Jamieson,G.P., 1994. The P_{2Z}-Purinoceptor of human lymphocytes: Actions of nucleotide agonists and irreversible inhibition by oxidized ATP. Br.J.Pharmacol. 112, 946-950.
92. Zanollo,P., Bronte,V., Rosato,A., Pizzo,P., Di Virgilio,F., 1990. Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. J.Immunol. 145, 1545-1550.
93. Zou,H., Ugur,M., Drummond,R.M., Singer,J.J., 2001. 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.

8 Thesen

- Purinerge P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionen-Kanäle. Sie werden auf einer Vielzahl von nativen Zellen koexprimiert. Für mehrere der bisher klonierten sieben Subtypen sind Interaktionen oder die Bildung hetero-oligomere Rezeptoren beschrieben, nicht jedoch für den hP2X7-Rezeptor.
- Zur Untersuchung möglicher Interaktionen, die zu einer Änderung des jeweiligen elektrophysiologischen Verhaltens führen, lassen sich die Rezeptoren heterolog in Oozyten von *Xenopus Laevis* exprimieren und mittels Voltage-clamp-Technik funktionell charakterisieren. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass das Expressionssystem die Rezeptorfunktion ebenso wie etwaige Interaktionen beeinflusst.
- Eine Isolierung der durch hP2X1- und hP2X7-Rezeptoren vermittelten Ströme durch selektive Agonisten und Antagonisten ist notwendig, um die durch diese Rezeptoren vermittelten Zellantworten in Zellen, die beide Rezeptoren exprimieren, unterscheiden und getrennt untersuchen zu können.
- Bei der detaillierten Untersuchung der P2X1/7-Rezeptor vermittelten Ströme zeigt sich, dass die Kinetik der Aktivierung von hP2X1- und hP2X7-, der Desensitivierung und der Erholung von der Desensitivierung von hP2X1-Rezeptoren sowie der Deaktivierung von hP2X7-Rezeptoren durch die Koexpression nicht verändert ist.
- Nach Koexpression in *Xenopus*-Oozyten gelingt eine gut selektive Aktivierung des hP2X7-Rezeptors durch die Applikation des hP2X7-präferenten Agonisten Benzoyl-ATP, oder durch die Applikation der hochaffinen Blocker des hP2X1-Rezeptors NF279 und NF449 in Kombination mit ATP als Agonisten.
- Die Isolierung der hP2X1-Rezeptor-abhängigen Antwort ist schwieriger. Sie gelingt relativ gut durch Aktivierung mit niedrigen Konzentrationen des als hP2X1-selektiv beschriebenen α,β -methyl-ATP, durch Applikation niedriger Dosen ATP ($< 1\mu\text{M}$) oder durch Zusatz von Mg^{2+} bei Aktivierung mit höheren Konzentrationen ATP. Mit den als potent beschriebenen hP2X7-Antagonisten oxidiertes ATP, Brilliant Blue G und KN 62 lässt sich bei Expression in *Xenopus*-Oozyten keine effektive Isolierung des hP2X1-Subtyps erreichen.

- Die pharmakologischen Eigenschaften des hP2X1- und hP2X7-Rezeptors, charakterisiert durch die Parameter ihrer Dosis-Wirkungs-Kurven, verändern sich durch die Koexpression nicht.
- Bei Koexpression in *Xenopus*-Oozyten findet sich kein Hinweis auf eine Interaktion der beiden Rezeptoren.
- Die Dosis-Wirkungs-Kurven des hP2X1- und des hP2X7-Rezeptors zeigen ebenso wie die Dosis-Wirkungs-Kurven der entsprechenden Komponenten nach Koexpression eine Dosisabhängigkeit über einen großen Konzentrationsbereich von 4 bis 5 Zehnerpotenzen. Sie lassen sich gut mit Hilfe der Summe zweier Hill-Funktionen beschreiben. Dies könnte ein Hinweis auf die Existenz zweier Bindungsstellen am hP2X1- ebenso wie am hP2X7-Rezeptor sein, für den dies schon gut belegt ist.

Tabellarischer Lebenslauf

persönliche Information

geboren am: 5.8.1973
Geburtsort: Hildburghausen
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1980 - 1988	>Polytechnische Oberschule in Hildburghausen
1988 - 1992	>Erweiterte Oberschule mit Spezialklassen mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung, Abitur mit Prädikat „sehr gut“

Wehrersatzdienst

1992 - 1994	>Pflegetätigkeit im Wohnheim der Lebenshilfe e.V. in Ilmenau
-------------	--

Tätigkeiten neben dem Studium

1994 – 1995	>ambulante Pflege an der Diakonie-Sozialstation in Jena
1998 – 1999	>Wochenenddienste an der Diakonie-Sozialstation in Halle

universitäre Ausbildung

1995 – 1996	>Studium der Sonderschulpädagogik an der MLU Halle/Wittenberg
1996 – 2002	>Medizinstudium an der MLU Halle/Wittenberg
1999	>Famulatur bei einem niedergelassenen Chirurgen

- 2000 >jeweils einmonatige Famulaturen an der Klinik für Neurologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie der Klinik für Innere Medizin am Sankt-Josef-Hospital Oberhausen
- 2001 >einmonatige Famulatur an der Klinik für Kinderheilkunde der Wedau-Kliniken Duisburg
- 2001 - 2002 >PJ-Ausbildung, davon:
- >4 Monate Innere Medizin mit den Schwerpunkten Rheumatologie, Kardiologie, Pulmologie und Infektionskrankheiten sowie wöchentliche Dienste in der Notaufnahme am Academic Hospital Pretoria/ Südafrika
 - >4 Monate Chirurgie mit den Schwerpunkten Abdominalchirurgie, Orthopädie/Traumatologie und Kinderchirurgie sowie ebenso mindestens wöchentliche Dienste in der Notaufnahme am Academic Hospital Pretoria
 - >4 Monate Kinderheilkunde mit den Schwerpunkten Rheumatologie, Endokrinologie, Infektionskrankheiten und Kinderkardiologie in der Klinik für Kinderheilkunde der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
- 1999-2004 >mit Unterbrechungen: Arbeit an meiner Promotion mit dem Thema: "Charakterisierung koexprimierter humaner purinerger P2X1- und P2X7-Rezeptoren in Oozyten von *Xenopus Laevis*" am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Betreuer: Prof. Dr. Fritz Markwardt

Beruflicher Werdegang

Seit 1.7.2003 Tätigkeit als Arzt im Praktikum an der Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde des St.-Josef-Hospital, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir mittelbar oder unmittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Halle, den 4.8. 2004

Christian Seyffert

Verweis auf Publikationen

Teile dieser Arbeit sind

- akzeptiert und derzeit in Vorbereitung zur Veröffentlichung:
Dissecting individual current components of co-expressed human P2X₁ and P2X₇ receptors
C. Seyffert, G. Schmalzing and F. Markwardt
Current topics in Medical Chemistry (2004), in press
- als Poster auf dem Symposium „Epithelial Transport Of Ions In Health And Disease“ der
Vereinigung der Naturforscher „Leopoldina“ vom 19.3.03 –22.3.03 in Halle/S.
sowie auf der 83. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft e.V. vom
14.-17.03.2004 in Leipzig gezeigt worden:
Discrimination of coexpressed human P2X₁ and P2X₇ receptors
F. Markwardt, C. Seyffert, G. Lambrecht, G. Schmalzing, W. Boldt and M. Klapperstück
Pflügers Arch. 447 (S1) (2004), 105 (Abstract)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht entstanden wäre. Zunächst Herrn Prof. Dr. Fritz Markwardt zum einen für die freundliche Überlassung des Themas, zum anderen aber für die vielen Anregungen, Diskussionen und die schier grenzenlose Geduld und Freundlichkeit bei der Beantwortung meiner sehr zahlreichen Fragen auch zu den mitunter unmöglichsten Tageszeiten.

Weiterhin danken möchte ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Markwardt: Frau Dr. Manuela Klapperstück für das Injizieren der RNA in die Oozyten, Ihre Heiterkeit und die vielen aufmunternden Worte, die mir während der Durststrecken halfen, bei der Stange zu bleiben, Herrn Dr. Wolfgang Boldt für die zahlreichen kleinen praktischen Tipps bei den Messungen und beim Kampf gegen die Tücken der Technik, Frau Monika Schmidt, die die Frösche immer kunstgerecht operiert und alle Versuche mit vorbereitet hat.

Meinen Eltern danke ich für ihr Interesse, ihre Geduld und ihre nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung, die mir die Arbeit an dieser Promotion überhaupt erst ermöglichte.

Ebenfalls danke ich meiner Freundin Anne Seela, die mich immer wieder zum Weiterarbeiten ermutigt und mir manches Geheimnis in Word gelüftet hat.