

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

**Charakterisierung koexprimierter humaner purinerge P2X₄-
und P2X₇-Rezeptoren in *Xenopus Laevis* Oozyten**

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

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

von Kirsten Prudic
geboren am 09.02.1987 in Detmold

Betreuer: Prof. Dr. med. Fritz Markwardt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Fritz Markwardt
2. Prof. Dr. Thomas Zimmer, Universität Jena
3. Prof. Dr. Stefan Gründer, Universitätsklinikum der RWTH Aachen

20.09.2016

08.03.2017

Referat:

Humane ATP-gesteuerte P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren werden auf einer Vielzahl von nativen Zelltypen, wie Lymphozyten und Makrophagen, überlappend exprimiert. Sie zeigen insbesondere im Rahmen von Entzündungsprozessen z.T. synergistische Funktionen und scheinen zudem phylogenetisch sehr eng miteinander verwandt zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die durch die Arbeitsgruppe Prof. Schmalzing der RWTH Aachen nachgewiesene Heterooligomerbildung in *Xenopus laevis* Oozyten die Kinetik und das pharmakologische Verhalten koexprimierter hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren verändert. Hierzu wurde nach heterologer Expression beider Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten in Ganzzellmessungen mittels Spannungsklemmmethode der Einfluss der Koexpression, außerdem verschiedener P2X₄R- und P2X₇R-spezifischer Modulatoren, Agonisten und Antagonisten auf die Kinetik der ATP-induzierten Rezeptorströme untersucht. Insgesamt zeigten sich bei koexprimierten Wildtyp P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren keine Hinweise auf die Ausbildung eines Phänotyps mit distinktiven kinetischen oder pharmakologischen Eigenschaften. Die formierten Heterooligomere sind somit möglicherweise nicht funktionell oder zeigen einen im Vergleich zum P2X₄- oder P2X₇-Rezeptor sehr ähnlichen Phänotyp.

Die Koexpression mit funktionell fast inaktiven P2X₇R-Mutanten oder mit anderen Kanalproteinen, wie Pannexin 1 und der α 1-Untereinheit des GFP-markierten Glycinrezeptor, führte dagegen zu einer deutlichen Suppression der P2X₄R-abhängigen Ströme und könnte evtl. auf eine Minderung der Expressionsrate zurückzuführen sein.

Die Koexpression des hP2X₄-Rezeptors mit den dysfunktionellen hP2X₇R-Mutanten führte außerdem in einigen Fällen zu einer veränderten Rezeptorkinetik. Insbesondere die für die P2X₄-Rezeptoren typische Desensitivierung wurde beeinflusst, was für eine funktionelle Interaktion der koexprimierten P2XR-Untereinheiten spricht, deren Ursache in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht abschließend geklärt werden konnte.

Prudic, Kirsten: Charakterisierung koexprimierter humaner purinergere P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren in *Xenopus Laevis* Oozyten, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 ATP als Überträger interzellulärer Kommunikation	1
1.1.1 Purinozeptoren	2
1.2 P2X-Rezeptoren	3
1.2.1 P2X ₄ -Rezeptoren	5
1.2.2 P2X ₇ -Rezeptoren	9
1.2.3 Heteromere P2X-Rezeptoren	15
2 Zielstellung	18
3 Material und Methodik	19
3.1 Material	19
3.2 Methodik	19
3.2.1 Behandlung der Oozyten	19
3.2.2 Elektrophysiologie	19
3.2.3 Statistik	21
4 Ergebnisse	22
4.1 Kinetik der hP2X ₄ R-, hP2X ₇ R- und hP2X _{4/7} R-abhängigen Ionenkanalströme	22
4.1.1 Kinetik der humanen P2X ₄ R-abhängigen Ionenkanalströme	22
4.1.2 Kinetik der humanen hP2X ₇ R-abhängigen Ionenkanalströme	24
4.1.3 Kinetik der humanen koexprimierten P2X ₄ R- und P2X ₇ R-abhängigen Ionenkanalströme	25
4.2 Agonisten und Antagonisten	30
4.2.1 Einfluss P2X ₄ R-spezifischer Modulatoren auf ATP-induzierte Stromkurvenverläufe isoliert und gemeinsam exprimierter hP2X ₄ - und hP2X ₇ -Rezeptoren	31
4.2.2 Einfluss P2X ₇ R-spezifischer Modulatoren auf ATP-induzierte Stromkurvenverläufe isoliert und gemeinsam exprimierter hP2X ₄ - und hP2X ₇ -Rezeptoren	34
4.3 Einfluss von hP2X ₇ -Rezeptormutanten auf hP2X ₄ R-abhängige Ströme	40
4.3.1 Einfluss von hP2X ₇ ¹⁻⁴³⁶ -Rezeptoren auf hP2X ₄ R-abhängige Ströme	42
4.3.2 Einfluss von His-hP2X ₇ ^{D352C} -Rezeptoren auf hP2X ₄ R-abhängige Ströme	43
4.4 Einfluss anderer Kanalproteine auf hP2X ₄ R-abhängige Ströme	43
5 Diskussion	46
6 Zusammenfassung	57
7 Literaturverzeichnis	59
8 Thesen	77
Selbstständigkeitserklärung mit Unterschrift	VI
Erklärung über frühere Promotionsversuche	VII

Lebenslauf
Danksagung

VIII
X

Abkürzungsverzeichnis

2-meSATP	2-Methylthioadenosintriphosphat
5-BDBD	5-(3-bromophenyl)-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzofuro-[3,2- <i>e</i>]-1,4-diazepin-2-one
A438079	3-[[5-(2,3-dichlorophenyl)-1 <i>H</i> -tetrazol-1-yl]methyl]Pyridin
A740003	<i>N</i> -(1-([cyanoimino](5-quinolinylamino)methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl] Azetamid
A839977	1-(2,3-dichlorophenyl)- <i>N</i> -[[2-(2-pyridinyloxy)phenyl]methyl]-1 <i>H</i> -tetrazol-5-Amin
AACBA	<i>N</i> -(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3 <i>R</i> -amino-pyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chloro-Benzamid
Abb.	Abbildung/-en
ADP	Adenosindiphosphat
α,β -meATP	α,β -Methylenadenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANAPP ₃	3'-O-(3-[N-(4-azido-2-nitrophenyl)amino]-propionyl)-Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATP- γ -S	Adenosin-[γ -Thio]-Triphosphat
AZ11645373	3-[1-[[3'nitro[1,1'-biphenyl]-4-yl]oxy]methyl]-3-(4-pyridinyl)propyl]-2,4-Thiazolidinedion
Ba ²⁺	Bariumion
BBG	Brilliant Blue G
β,γ -meATP	β,γ -Methylenadenosintriphosphat
BN-PAGE	Blue Native Polyacrylamidgelelektrophorese
BX430	(1-(2,6-dibromo-4-isopropyl-phenyl)-3-(3-pyridyl)urea
Bz-ATP	2',3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)Adenosintriphosphat
bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalziumion
Cd ²⁺	Cadmiumion
Cl ⁻	Chloridion
Co ²⁺	Cobaltion
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTP	Cytidintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

Cu ²⁺	Kupferion
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
d.h.	Das heißt
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IVM	Ivermectin
JNJ-47965567	<i>N</i> -([4-(4-phenyl-piperazin-1-yl)]tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-4-yl)-methyl)-2-(phenyl-thio) Nikotinamic
K ⁺	Kaliumion
KN-62	1-[<i>N,O</i> -bis(5-isoquinolinesulfonyl)- <i>N</i> -methyl-1-tyrosyl]-4-Phenylpiperazin
L	Liter
Mg ²⁺	Magnesiumion
mM	Millimol pro Liter
μM	Mikromol pro Liter
Mn ²⁺	Manganion
MRS2159	4-[(4-formyl-5-hydroxy-6-methyl-3-[(phosphonoxy)methyl]-2-pyridinyl)azo]-benzoic acid
MRS2339	(1' <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4' <i>R</i> ,5' <i>S</i>)-4-(6-amino-2-chloro-9 <i>H</i> -purin-9-yl)-1-[phosphoryloxymethyl] bicycle[3.1.0]hexane-2,3-diol
Na ⁺	Natriumion
NF023	8,8'-[carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino)]bis-1,3,5-naphthalene-trisulfonyl-Säure
NF279	8,8'-[carbonylbis(imino-4,1-phenylenecarbonylimino-4,1-phenylenecarbonylimino)]bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonyl-Säure
Ni ²⁺	Nickelion
nM	Nanomol pro Liter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDG	N-methyl-D-glucamine
oATP	Perjodat-oxidiertes 2',3'-dialdehyd Adenosintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

PPADS	Pyridoxal 5-phosphat 6-azophenyl-2',4'-disulfonyl-Säure
PSB-12054	N-(benzyloxycarbonyl)phenoxazine
RB2	Reactive Blue 2
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
Sr ²⁺	Strontiumion
s.u.	siehe unten
T	Zeit
TEA ⁺	Tetraethylammoniumion
TNP-ATP	Trinitrophenyladenosintriphosphat
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
Zn ²⁺	Zinkion
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 ATP als Überträger interzellulärer Kommunikation

Das Adeninnukleotid ATP kommt in gesunden Geweben überwiegend intrazellulär vor, wo es u.a. als ubiquitärer Energielieferant eine wichtige Rolle übernimmt. Die intrazelluläre Konzentration im Zytoplasma liegt bei etwa 5-10 mM, einige Zellen lagern ATP sogar in noch höheren Konzentrationen in Granula und sekretorischen Vesikeln ein. Die extrazelluläre Konzentration von ATP in gesunden Geweben ist dagegen vernachlässigbar und liegt nur bei etwa 10-100 nM (Idzko et al., 2007; Di Virgilio et al., 2009a; Boeynaems et al., 2012).

Bei Zelltod oder Zellverletzung, aber auch bei Einwirken verschiedener Stressoren wird ATP freigesetzt. Hierbei gelangt ATP nicht wie ursprünglich angenommen nur passiv (nach Verletzung der Zellmembran) in den Extrazellulärraum, sondern wird auch durch Öffnung verschiedener Membrankanäle (u.a. Connexin und Pannexin Hemikanäle, Maxi-Anion Kanäle, Volumen-abhängige Ionenkanäle) sezerniert (Sabirov und Okada, 2005; Li et al., 2011a; Burow et al., 2014).

Neben dem Transport durch die genannten Membrankanäle erfolgt die Freisetzung bei einigen Zellen auch durch die Exozytose von ATP enthaltenden Vesikeln und Granula (Bodin und Burnstock, 2001; Novak, 2003; Idzko et al., 2007; Di Virgilio et al., 2009a; Boeynaems et al., 2012). ATP agiert hierbei als eine Art „Gefahrensignal“ oder DAMP (Damage-associated molecular pattern), das Zellzerstörung bzw. Zellstress signalisiert (Boeynaems et al., 2012).

Faktoren, welche zur Ausschüttung von ATP aus der Zelle führen, sind dabei vielfältig und reichen von mechanischen Reizen (Scherstress, Dehnung), über Hypoxie, Apoptose bis zur Stimulation der Zellen durch verschiedene Liganden (z.B. Bradykinin, Acetylcholin, Serotonin und ATP) (Vial et al., 1987; Yang et al., 1994; Homolya et al., 2000; Novak, 2003; Burnstock, 2006; Elliott et al., 2009; Burnstock, 2012). Zudem wird bei Bindung, Invasion und Zellaktivierung durch verschiedene Erreger (HIV-1; *Pseudomonas aeruginosa*) ebenfalls die Ausschüttung von ATP aus der betroffenen Zelle beobachtet (McNamara et al., 2001; Séror et al., 2011).

Im Extrazellulärraum wird ATP durch eine Vielzahl von Ektonukleotidasen abgebaut (Corriden und Insel, 2010). Dabei wirken sowohl ATP als auch seine Metaboliten (ADP, AMP und Adenosin) als Agonisten an einer Reihe von Oberflächenrezeptoren und beeinflussen dabei autokrin und parakrin eine ganze Reihe unterschiedlicher physiologischer als auch pathophysiologischer Vorgänge. Zudem scheint ATP in seiner Funktion als Transmitter und Kotransmitter von u.a. Noradrenalin, Acetylcholin, GABA, Glutamat einer der Haupttransmitter des peripheren und zentralen Nervensystems zu sein (Abbraccio et al., 2009). Zielstrukturen sind dabei verschiedene sogenannte Purinozeptoren, welche neben den Nervenzellen auch durch fast alle nicht-exzitatorischen Zellen des Körpers v.a. auf der Plasmamembran z.T. aber auch auf

Einleitung

intrazellulären Kompartimenten exprimiert werden. Dabei handelt es sich mit ATP um evolutionsgeschichtlich wahrscheinlich eines der ältesten Signalmoleküle, wie der Nachweis von Purinozeptoren auch auf Nichtwirbeltieren und sogar einfachen Einzellern vermuten lässt (Burnstock, 2012; Fountain, 2013).

ATP wirkt u.a. als Mediator bei der peripheren und zentralen chemosensorischen Transduktion am Glomus caroticum und an der Aorta und reguliert dabei den Atemantrieb bei Hypoxie und Hyperkapnie (Gourine, 2005; Piskuric und Nurse, 2012). Außerdem wirkt ATP regulierend auf den Gefäßtonus ein und ist nach Gefäßschädigung maßgeblich an der Thrombozytenaktivierung beteiligt (Oury et al., 2006). ATP wirkt zudem bei der Ausbildung der Atherosklerose, bei der Regulation des Tumorwachstums, sowie bei der Entwicklung verschiedener neuroinflammatorischer und neurodegenerativer Erkrankungen sowie der Entwicklung neuropathischer Schmerzen mit. Eine entscheidende Rolle kommt ATP außerdem in der Immunmodulation zu (Di Virgilio und Solini, 2002; Inoue et al., 2007; Takenouchi et al., 2009; Di Virgilio et al., 2009b).

1.1.1 Purinozeptoren

Der erste Hinweis auf die Existenz unterschiedlicher Purinozeptoren ergab sich indirekt schon sehr früh durch die Erkenntnis, dass sich die Potenz und Wirkweise des Adenosins durch Addition von Phosphatgruppen verändert und ATP außerdem deutlich potentere und zum Teil qualitativ andere Effekte als Adenosin und AMP auslöste (Deuticke, 1932; Gillespie, 1934). 1978 war Burnstock der Erste, der sechs Jahre nach Veröffentlichung seiner „purinergen Hypothese“ mit ATP als Transmitter mit eigenen Rezeptoren die Subklassifikation der „purinergen Rezeptoren“ in P1 (Adenosinrezeptoren) und P2 (ATP-Rezeptoren) vornahm. Die Klassifikation basierte unter anderem auf der unterschiedlichen Potenz von ATP, ADP, AMP und Adenosin, außerdem auf dem selektiven Antagonismus der Methylxanthine auf die Effekte des Adenosins nicht aber auf die des Adenosintriphosphats (Gordon, 1986). In den nächsten Jahren erfolgte die weitere Unterteilung dieser Rezeptoren, außerdem wurde der Terminus „purinerge Rezeptoren“, aufgrund des Nachweises von Nukleosid- und Nukleotid-Rezeptoren auch auf nicht-Nervenzellen, durch „Purinozeptoren“ ersetzt (Gordon, 1986). Inzwischen unterscheidet man vier verschiedene Adenosin-Rezeptoren (A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3) (Fredholm et al., 2001; Boison, 2008; Abbracchio et al., 2009) und insgesamt 15 verschiedene P2-Rezeptoren. Dabei werden die P2-Rezeptoren auf Basis der zwei unterschiedlichen Transduktionsmechanismen und strukturellen Unterschiede weiter in P2X- (P2X₁ bis P2X₇) und P2Y-Rezeptoren (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, und P2Y₁₁, bis P2Y₁₄) unterteilt, wobei es sich bei den P2X-Rezeptoren um Liganden gesteuerte Ionenkanäle und bei den P2Y-Rezeptoren um metabotrope G-Protein gekoppelte Rezeptoren handelt (Abbracchio und Burnstock, 1994; Ralevic und Burnstock, 1998).

1.2 P2X-Rezeptoren

Bei den P2X-Rezeptoren (P2XR) handelt es sich, wie oben bereits erwähnt, um ionotrope Rezeptoren, also Liganden-abhängige Ionenkanäle. Funktionsfähige Rezeptoren bestehen aus jeweils drei Proteinuntereinheiten, wobei sich Homomere (aus drei Proteinen derselben Untereinheit) oder Heteromere (aus verschiedenen Untereinheiten) ausbilden können (Coddou et al., 2011).

Die sieben geklonten P2XR-Untereinheiten von Ratte (rP2XR) und Mensch (hP2XR) sind zwischen 379 (rP2X₆R) und 595 (rP2X₇R und hP2X₇R) Aminosäuren lang und haben eine 35 - 54 prozentige Übereinstimmung (North, 2002).

Jede Untereinheit zeigt dabei die gleiche Topologie mit zwei die Membran durchspannenden Transmembrandomänen (TM1 + TM2), einer langen den Liganden bindenden extrazellulären Schleife (die sogenannte Ektodomäne) und jeweils intrazellulär liegenden N- und C-Termini. Damit sind die P2X-Rezeptoren unter den Mitgliedern der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle neben den ASICs (Acid-Sensing-Ion-Channel) die am einfachsten aufgebaute Kanalgruppe. Die Primärsequenz der P2X-Rezeptoren scheint allerdings mit keinem anderen bekannten Protein (auch nicht mit den ASICs) Übereinstimmungen zu besitzen (Khakh, 2001; Coddou et al., 2011). Bei der die zwei Transmembrandomänen verbindenden Ektodomäne handelt es sich mit etwa 280 Aminosäuren Länge um den größten Teil des Polypeptides. Wichtig für die Struktur sind zehn Cysteinreste, welche in den P2X-Rezeptoren aller Wirbeltiere erhalten sind und fünf Disulfidbrücken ausbilden. Die Ektodomäne enthält die ATP-Bindungsstelle, außerdem Stellen für Antagonisten und andere Modulatoren. Bei allen Untereinheiten der Ratte finden sich zudem drei bis sechs übereinstimmende Sequenzen für eine N-Glykosylierung des Proteins. Die N-Termini der verschiedenen Untereinheiten sind in etwa alle gleich lang (20-30 AS) und enthalten übereinstimmende Segmente, die eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C ermöglichen (Khakh, 2001). Die C-Termini unterscheiden sich dagegen in ihrer Länge erheblich (zwischen 30 (P2X₆) und 215 (P2X₇) Aminosäuren). Sie zeigen nur innerhalb der ersten 25 Aminosäuren Übereinstimmungen in der Sequenz und sind damit wahrscheinlich für die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Subtypen verantwortlich. Die C-Termini enthalten unterschiedliche Motive für den Rezeptortransport und die Stabilisierung des Rezeptors innerhalb der Plasmamembran, außerdem für spezifische Proteininteraktionen (Coddou et al., 2011). Ein großer Schritt in dem Verständnis der P2X-Struktur war die erfolgreiche Kristallisation des (trunkierten) P2X₄-Rezeptors des Zebrafisches sowohl in der geschlossenen (Kawate et al., 2009), als auch in der geöffneten, ATP-gebundenen Konformation (Hattori und Gouaux, 2012). Die Untereinheiten ähneln dabei in ihrer Form einem Delfin, wobei die Transmembrandomänen mit der Schwanzflosse und die Ektodomäne mit dem Körper (einschließlich Rückenflosse und zwei

Einleitung

Seitenflossen aus β -Sandwich-Motiven) vergleichbar sind (Kawate et al., 2009). Die trimeren Rezeptoren zeigen insgesamt eine Kelch-artige Form, wobei die Membranpore durch die sich kreuzenden innen gelegenen TM2-Helices gebildet wird. Die ATP-Bindungsstellen liegen jeweils zwischen zwei benachbarten Untereinheiten in der Ektodomäne und beinhalten verschiedene positiv geladene Aminosäuren, an welche die Phosphatgruppen des ATP-Moleküls binden. Bei ATP-Bindung kommt es zu weitreichenden Konformitätsänderungen, wobei insbesondere die vier in Längsachse des Rezeptors gelagerten z.T. miteinander verbundenen Aushöhlungen (obere, zentrale, extrazelluläre Aushöhlung in der Extodomäne, ein intrazelluläre Aushöhlung) inkl. der seitlichen Öffnungen verändert werden. Ionen treten dabei wahrscheinlich durch die geweiteten seitlichen Öffnungen in die (durch negativ geladenes Oberflächenpotential für Kationen attraktive) ebenfalls geweiteten und miteinander verschmolzenen zentrale und extrazelluläre Aushöhlung in die Transmembranpore ein. Die letztendliche Öffnung der Transmembranpore erfolgt durch Dehnung der Transmembranhelices wie bei einer Iris-Blende auf etwa 7 Å an der engsten Stelle (Kawate et al., 2009; Hattori und Gouaux, 2012; Samways et al., 2014).

Alle homomeren und heteromeren P2X-Rezeptoren werden durch ATP aktiviert, allerdings auf eine Rezeptor-spezifische Weise. Die Werte des EC_{50} variieren hier zwischen nanomolaren und submillimolaren Konzentrationen (Coddou et al., 2011). Dabei scheinen einige der Rezeptorsubtypen (P2X₄ und P2X₂) die lose ungebundene Form des ATP [ATP⁴⁻] als Agonisten zu bevorzugen, andere (P2X₁ und P2X₃) dagegen die komplexierte Form (z.B. MgATP²⁻) (Li et al., 2013). Neben ATP werden die meisten der P2X-Rezeptoren auch durch das natürlich vorkommende Diadenosinpolyphosphat und näher verwandte Dinukleotide aktiviert, allerdings mit einer geringeren Potenz und Effizienz als ATP. Außerdem kommt es bei einigen P2X-Rezeptoren auch durch andere Nukleosidtriphosphate wie CTP und GTP zu einer Aktivierung (Coddou et al., 2011).

P2X-Rezeptoren finden sich in allen Säugetiergeweben, sind zudem weit verbreitet in allen Wirbeltieren und wurden inzwischen auch in wirbellosen Tieren (wie *Schistosoma mansoni*) und primitiven Einzellern gefunden (Kaczmarek-Hájek et al., 2012).

Die P2X-Rezeptoren stellen nicht-selektive Kationenkanäle dar, welche den Durchtritt einfacher mono- und bivalenter Kationen ermöglichen. Unter physiologischen Bedingungen bestehen die größten Permeabilitäten dabei für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺. Mindestens ein Subtyp (P2X₅) zeigt zudem noch eine signifikante Permeabilität auch für das Anion Cl⁻ (North, 2002; Samways et al., 2014). Wie auch bei anderen Kationen-permeablen Ionenkanäle führt die Öffnung des P2X-Kanals durch den zelleinwärts gerichteten elektrochemischen Gradienten zu einem Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺, was wiederum zu einer Depolarisation und einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) führt. Diese Depolarisation kann dabei stark genug sein die Ausbildung von Aktionspotentialen zu initiieren (Cook et al., 1997; Kirkup et al., 1999; Samways et al., 2014).

Einleitung

Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt zu einer Reihe Ca^{2+} -abhängiger Prozesse wie z.B. die Transmitterausschüttung an Synapsen (Khakh und Henderson, 2000) oder die Kontraktion glatter Muskulatur (Smith und Burnstock, 2004); (Samways et al., 2014).

Üblicherweise zeigen die P2X-Rezeptoren bei Agonistenbindung ein dreiphasiges Öffnungsverhalten, bei dem sich Aktivierungs-, Desensitivierungs- und Deaktivierungsphase unterscheiden lassen. Die Aktivierungsphase zeichnet sich durch einen rapide ansteigenden Einwärtsstrom nach Agonistenapplikation aus. Noch während der Applikation kommt es dann langsam zu einem Abfall des Einwärtsstromes (Desensitivierungsphase), der nach Entfernung des Agonisten relativ schnell weiter fällt (Deaktivierungsphase). Die einzelnen Rezeptorsubtypen zeigen hierbei große Unterschiede, v.a. in ihren Aktivierungs- und Desensitivierungsphasen (Coddou et al., 2011).

1.2.1 P2X₄-Rezeptoren

Die Klonierung des P2X₄-Rezeptors erfolgte erstmals 1996 aus dem Hirn der Ratte, ein Jahr später konnte ein menschliches Pendant aus cDNA des menschlichen Hirns isoliert werden (Soto et al., 1996; Garcia-Guzman et al., 1997). Das für den hP2X₄-Rezeptor kodierende Gen wurde via in situ Hybridisierung der Region q24.32 auf dem Chromosom 12 zugeordnet (Garcia-Guzman et al., 1997). Mit 388 AS Länge handelt es sich um die kürzeste der sieben bekannten Untereinheiten (Garcia-Guzman et al., 1997; North, 2002). Wie bei den anderen hP2X-Rezeptoren auch, erfolgt der Zusammenbau und die Glykosylierung des P2X₄-Rezeptors im endoplasmatischen Retikulum, bevor die Rezeptoren über den Golgi-Apparat in die Plasma-Membran eingebaut werden (Robinson und Murrell-Lagnado, 2013). Anders als z.B. der P2X₇ Rezeptor verbleiben viele P2X₄ Rezeptoren jedoch nicht an der Zelloberfläche, sondern werden zügig via Dynamin/Clathrin abhängiger Endozytose internalisiert und in intrazellulären Kompartimenten (v.a. in Lysosomen, aber auch Vesikeln, Vakuolen und Lammellar-Körperchen) gelagert (Bobanovic et al., 2002; Royle et al., 2005; Qureshi et al., 2007; Xu et al., 2014). Die Internalisierung und Speicherung in den Lysosomen wird durch ein Dileucin-Motif (L₂₂L₂₃) im N-Terminus, außerdem einem Tyrosin-basierten Endozytose-Motiv (Y378xxGL) im C-Terminus des P2X₄-Rezeptors gesteuert (Royle et al., 2005; Qureshi et al., 2007).

Durch N-Glykosylierung der Extrazellulardomäne vor Abbau innerhalb der Lysosomen geschützt, gelangen die P2X₄-Rezeptoren durch Stimulation der Lysosomen-Exozytose erneut in die Plasmamembran. Zudem wird nach Stimulation der Phagozytose auch eine Akkumulation der lysosomalen P2X₄-Rezeptoren auf der Phagosomenmembran beobachtet. Die innerhalb der Lysosomen gelagerten P2X₄-Rezeptoren agieren also als ‚Reserve‘ Pool, über den schnell und bedarfsgerecht P2X₄-Rezeptoren zu anderen Zellkompartimenten mobilisiert werden können (Qureshi et al., 2007; Robinson und Murrell-Lagnado, 2013).

Einleitung

Ob die auf intrazellulären Kompartimenten gelagerten P2X₄ Rezeptoren auch eine spezifische funktionelle Rolle einnehmen, ist bisher nicht geklärt. Die in ruhenden Lysosomen gelagerten P2X₄-Rezeptoren scheinen durch das saure Milieu innerhalb der Lysosomen (pH ~ 4.6) inaktiviert und deshalb resistent gegenüber einer Aktivierung durch das intralysosomale ATP zu sein (Huang et al., 2014).

a) Vorkommen

Der P2X₄-Rezeptor ist wahrscheinlich der in Säugetiergeweben am weitesten verbreitete P2X-Rezeptor-Subtyp. P2X₄-Rezeptoren wurden in Zellen des zentralen- und peripheren Nervensystems (Purkinjezellen und Pyramidal-Zellen v.a. im Hypocampus), in Epithelzellen von Drüsengängen und Atemwegen, in glatter Muskulatur der Blase, des Gastrointestinaltraktes, des Uterus und der Arterien, außerdem in Myokardzellen, Endometriumzellen des Uterus, Lymphozyten, Mikroglia, Zellen des Thymus, Fettzellen, Makrophagen und Endothelzellen nachgewiesen (Garcia-Guzman et al., 1997; Glass et al., 2000; Yamamoto et al., 2000a; Rubio und Soto, 2001; Lewis und Evans, 2001; Sluyter et al., 2001; Bo et al., 2003; Bowler et al., 2003).

b) Aufgaben

Die funktionelle Rolle des P2X₄-Rezeptors ist in den meisten Geweben bislang unklar. Am Herzen wird eine positiv inotrope Regulierung der Herzmuskulatur durch P2X₄ Rezeptoren beschrieben (Hu et al., 2001; Hu et al., 2002), in Endothelzellen scheinen P2X₄ Rezeptoren ausgelöst durch Scherstress den Gefäßtonus zu modulieren (Yamamoto et al., 2000a; Yamamoto et al., 2000b; Yamamoto et al., 2006). Eine wichtige Rolle wird dem P2X₄-Rezeptor außerdem in der Modulation von chronischer Entzündung, neuropathischer Schmerzen und der Auslösung der Schmerzhypersensibilität (taktile Allodynie) zugeschrieben. Nach peripherer Nervenschädigung, starker peripherer Entzündung oder Schädigung des Rückenmarkes kommt es zu einer Hochregulation des P2X₄R in aktivierten Mikrogliazellen im Rückenmark (Tsuda et al., 2003; Guo et al., 2005; Schwab et al., 2005). Auch nach Ischämie (Cavaliere et al., 2003), experimentell herbeigeführter Autoimmun-Enzephalomyelitis und -Neuritis (Guo und Schluesener, 2005; Zhang et al., 2008), traumatischer Hirnschädigung (Zhang et al., 2006) und Tumordinfiltration (Guo et al., 2004) wird eine Aktivierung mit P2X₄R-Hochregulation (z.B. in Mikroglia, Makrophagen und Monozyten) im Hirngewebe beschrieben. Zusätzlich zeigen z.T. auch die geschädigte Neuronen selber eine vermehrte P2X₄R-Expression z.B. nach Rückenmarksschädigung oder bei der amyotrophen Lateralsklerose (Schwab et al., 2005; Casanovas et al., 2008).

Einleitung

Auch bei Osteoarthritis (Fan et al., 2013), bei Ausbildung einer diabetischen Nephropathie (Chen et al., 2013) und bei der Alzheimererkrankung (Varma et al., 2009) scheinen die P2X₄-Rezeptoren eine Rolle zu spielen.

c) Kinetik

In HEK-293-Zellen oder in *Xenopus* Oozyten heterolog exprimierte homomere P2X₄-Rezeptoren fungieren bei kurzer ATP Applikation als Kationen-selektive Kanäle, wobei es schnell zu einem durch kleine Kationen (v.a. Na⁺) getragenen Einwärtsstrom mit Membrandepolarisation kommt. Im Vergleich zu den anderen P2X-Subtypen zeigt der homologe P2X₄-Rezeptor eine hohe Kalziumpermeabilität (Soto et al., 1996). Unter physiologischen extrazellulären Kalziumkonzentrationen (etwa 1,8 mM) liegt der Anteil des durch Kalziumionen getragenen Stromes dabei bei etwa 8 % (Garcia-Guzman et al., 1997; North, 2002).

Die P2X₄-Rezeptoren gehören zusammen mit den P2X₅R zu den moderat desensitivierenden Rezeptoren, d.h. nach 5-10 s Agonistenapplikation kommt es zu einer langsamen Desensitivierung (North, 2002; Stojilkovic et al., 2005; Gevers et al., 2006; Coddou et al., 2011). Der Strom fällt hierbei unabhängig von der Höhe der applizierten ATP-Konzentration, der extrazellulären Kalziumkonzentration oder des Membranpotentials auf etwa 30 % der initialen Spitzenamplitude ab (Fountain und North, 2006).

Neben der beschriebenen Desensitivierungskinetik mit Abfall der Stromamplitude während der ATP-Applikation kann in Ganzzellmessungen zudem eine zweite Form der Rezeptordesensitivierung beobachtet werden. Bei rezidivierender ATP-Applikation kommt es bei dem humanen P2X₄-Rezeptor (unabhängig von den Applikationsintervallen, der extrazellulären Kalziumkonzentration oder der Rezeptorinternalisation) zu einem einfach exponentiellen Abfall der Spitzenamplitude auf ein Plateau, was etwa 20% der durch die erste ATP-Applikation ausgelösten Spitzenamplitude entspricht (Fountain und North, 2006). Was genau zu diesem Amplitudenabfall beim hP2X₄-Rezeptor führt, ist bisher nicht abschließend geklärt. Nach Beendigung der Agonistenapplikation zeigt der P2X₄R eine rasche Deaktivierung, welche durch Applikation von Ivermectin verlangsamt werden kann (Khakh et al., 1999b; Priel und Silberberg, 2004).

Bei prolongierter ATP-Applikation wird (wie auch bei den P2X₂, P2X_{2/3} und P2X₇-Rezeptoren) eine biphasische Stromantwort beobachtet, wobei nach der initialen kurzen, schnell ansteigenden und moderat desensibilisierenden Spitzenamplitude (I1) ein zweiter, langsam ansteigender Strom (I2) beobachtet wird. I2 erreicht dabei nach 2 – 4 min ein Maximum, welches etwa 150 -300 % der ersten Amplitude entspricht. Während dieses zweiten Stromanstieges kommt es zur Porendilatation oder zur Aktivierung anderer Zellmembranleitfähigkeiten, was den Durchtritt auch großer Moleküle (wie NMDG und YO-PRO®1) ermöglicht (Khakh et al., 1999a).

Einleitung

Anders als beim P2X₇ Kanal ist diese „Porenbildung“ (zumindest in Mikrogliazellen) unabhängig von Pannexin-Hemikanälen und führt nicht zum Zelltod.

Diese „nichtletale“ Porenbildung wird dabei evtl. durch verschiedene Gefahrensignale (u.a. repetitive oder andauernde ATP-Ausschüttung, Abfall der extrazellulären Kalziumkonzentration) reguliert und könnte z.B. in der Ausbildung neuropathischer Schmerzen durch den Einstrom großer organischer Moleküle in Mikrogliazellen eine Rolle spielen (Bernier et al., 2008; Bernier et al., 2012).

d) Agonisten

Der P2X₄-Rezeptor zeigt die größte Aktivierung durch den natürlichen Agonisten ATP (EC₅₀ rangiert dabei etwa zwischen 1 und 10 µM (Soto et al., 1996; Garcia-Guzman et al., 1997; He et al., 2003; Coddou et al., 2011)), wobei beim P2X₄ die freie Form des ATP (ATP⁻⁴) als Agonist agiert (Li et al., 2013). Zudem wird der P2X₄-Rezeptor auch durch einige Nukleotid-Analoga aktiviert (ATP>>2-meSATP>>CTP>α,β-meATP>dATP), nicht aber durch ADP, AMP, β,γ-meATP, GTP oder Adenosin (Garcia-Guzman et al., 1997). Benzoyl-benzoyl-ATP (Bz-ATP) führt ebenfalls zur P2X₄-Rezeptoraktivierung, zeigt sich allerdings weniger potent als ATP (EC₅₀ etwa 2.5 µM) (He et al., 2003). Durch Zhou et al. wurde mit MRS2339, einem Hydrolyse-resistentem Derivat des Adenosin-Monophosphat, ein möglicher kardialer P2X₄-Agonist vorgestellt (Zhou et al., 2010).

e) Antagonisten

Einer der größten Unterschiede des P2X₄-Rezeptors zu den anderen Subtypen ist seine relative Insensibilität gegenüber dem klassischen P2X-Antagonisten Suramin. Der P2X₄-Rezeptor der Ratte (rP2X₄R) zeigt sich zudem auch gegenüber PPADS resistent, die P2X₄-Rezeptoren des Menschen (hP2X₄R) und der Maus (mP2X₄R) dagegen, werden durch diesen klassischen P2X-Antagonisten geblockt (Soto et al., 1996; Garcia-Guzman et al., 1997). Auch das Suramin-Analogon NF023, welches gute antagonistische Potenzen gegenüber P2X₁ und P2X₂ Rezeptoren zeigt, hat keine antagonistische Potenz gegenüber P2X₄-Rezeptoren (r- und hP2X₄R) (Soto et al., 1999; Coddou et al., 2011). Die Substanzen TNP-ATP, BBG außerdem das als Antidepressivum bekannte Paroxetin zeigen antagonistische Effekte, sind allerdings wenig selektiv und signifikant potenter an anderen Rezeptoren (Virginio et al., 1998; Nagata et al., 2009; Gum et al., 2012; North und Jarvis, 2013). Die Entwicklung selektiver P2X₄-Antagonisten gestaltete sich insgesamt mühsam, erst 2004 wurde durch Fischer et al. mit 5-BDBD ein möglicher selektiver P2X₄R Antagonist vorgestellt (Fischer et al., 2004; Donnelly-Roberts et al., 2007; Coddou et al., 2011; Balázs et al., 2013).

Einleitung

Kürzlich wurden zudem u.a. PSB-12054 (Phenoxazin-Derivat), N,N-diisopropyl-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide (Carbamazepin-Derivat), BX430 (Phenylharnsäure) und PSB-15417 als sehr potente und selektive P2X₄-Antagonisten beschrieben (Hernandez-Olmos et al., 2012; North und Jarvis, 2013; Tian et al., 2014; Ase et al., 2015).

f) Allosterische Modulation

Neben den klassischen Agonisten und Antagonisten werden P2X₄-Rezeptoren durch eine Vielzahl von Substanzen in ihrer Aktivität moduliert. Der wahrscheinlich bekannteste unter ihnen ist Ivermectin. Bei Ivermectin handelt es sich um einen großen makrozyklischen lipophilen Stoff (Lacton), welcher als antiparasitisches Agens in der Human- und Veterinärmedizin benutzt wird (Priel und Silberberg, 2004; Jelinkova et al., 2008).

Die extrazelluläre Applikation von Ivermectin (IVM) führt durch zwei unterschiedliche Bindungsstellen (Priel und Silberberg, 2004; Gevert et al., 2006) zu einer verstärkten Sensitivität des P2X₄ Rezeptors gegenüber ATP, zur Erhöhung der Amplitude der maximalen Stromantwort und zur Verlängerung der Deaktivierungskinetik (North, 2002; Priel und Silberberg, 2004; Gevert et al., 2006; Jelinkova et al., 2006). Dabei wurde diese Substanz lange als spezifischer positiver allosterischer Effektor der heterolog exprimierten P2X₄-Rezeptoren beschrieben. 2012 zeigten Nörenberg et al. allerdings auch einen modulierenden Effekt gegenüber endogen in Makrophagen und heterolog in HEK-Zellen exprimierten humanen P2X₇-Rezeptoren, wobei es zur Potenzierung ATP-induzierter Ströme kam (Nörenberg et al., 2012). Daneben werden P2X₄-Rezeptoren auch durch Propofol (Tomioka et al., 2000), Ethanol (Xiong et al., 2000; Ostrovskaya et al., 2011) und Spurenmetalle wie Zn²⁺ und Cd²⁺ (Soto et al., 1996; Garcia-Guzman et al., 1997; Acuna-Castillo et al., 2000; Coddou et al., 2003) moduliert. Dabei wird der P2X₄R durch Propofol und niedrige Zn²⁺ und Cd²⁺-Konzentrationen positiv, dagegen durch Ethanol und hohe Konzentrationen von Zn²⁺ und Cd²⁺ negativ beeinflusst. Wie beim P2X₇R beschrieben, wird auch die Stromantwort des P2X₄R zudem durch Mg²⁺ reduziert. Zur Inhibierung des P2X₄R sind dabei allerdings höhere Konzentrationen (3-10 mM) notwendig (Negulyaev und Markwardt, 2000; North, 2002).

1.2.2 P2X₇-Rezeptoren

Der P2X₇-Rezeptor, zunächst als P2Z-Rezeptor klassifiziert, wurde erstmals 1996 aus DNA des Ratten-Hirns geklont, ein Jahr später folgte die erfolgreiche Klonierung des menschlichen Rezeptors aus Monozyten-DNA (Surprenant et al., 1996; Rassendren et al., 1997; Tewari und Seth, 2015). Unter den P2X-Rezeptoruntereinheiten ist der P2X₇R-Subtyp mit einer Länge von 595 Aminosäuren das größte Protein. Innerhalb der ersten 395 Aminosäuren teilt er eine 35 – 40 % Sequenzhomologie mit den anderen sechs Untereinheiten. Der deutlich längere C-Terminus

Einleitung

des P2X₇-Rezeptors (239 AS vs. 27 – 120 AS bei den anderen Subtypen) zeigt dagegen keine Übereinstimmung innerhalb dieser Rezeptorfamilie (Surprenant et al., 1996; Rassendren et al., 1997; Bartlett et al., 2014). Dieser lange intrazellulär gelegene C-Terminus ist essentiell für die Ausbildung einer Rezeptor-vermittelten zytolytischen Porenbildung (Surprenant et al., 1996) und enthält Stellen zur Interaktion mit anderen Proteinen und Lipiden (u.a. Lipopolysacchariden) (Denlinger et al., 2001; Kim et al., 2001; Donnelly-Roberts und Jarvis, 2007). Dabei weist das menschliche P2X₇R-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 12 (12q24.31) eine große Varianz mit über 686 nachgewiesenen Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) auf, von denen aber nur wenige zu einer veränderten Aminosäurefrequenz des P2X₇-Protein mit meist verringerter, selten gesteigerter Rezeptorfunktion führen (Sun et al., 2009; Sluyter und Stokes, 2011; Bartlett et al., 2014). Neben den SNPs führt alternatives Spleißen zur Bildung weiterer Proteinvarianten. Bisher sind zehn Splicevarianten (P2X_{7(b)} bis _{-(k)}) identifiziert und beschrieben worden (Cheewatrakoolpong et al., 2005; Adinolfi et al., 2010; Wiley et al., 2011; Sluyter und Stokes, 2011). Interessanterweise scheinen Splicevarianten, bei denen der lange zytoplasmatische C-Terminus entfernt ist (mit erhaltener Kationenkanalfunktion aber fehlender Porenbildung) in vielen humanen Geweben führend exprimiert zu sein (Cheewatrakoolpong et al., 2005; Sperlágh et al., 2006).

Immunopräzipitationsstudien lassen vermuten, dass der P2X₇R in der Zelle als großer Multiproteinkomplex vorliegt. Dabei beinhaltet dieser Multiproteinkomplex Strukturproteine (u.a. Laminin α 3, Integrin β 2, β -Aktin, α -Aktinin, Supravillin) und außerdem Signalproteine (Phosphatidylinositol-4-Kinase und Rezeptorprotein-Tyrosinphosphatase- β) (Kim et al., 2001; Gu et al., 2009; Wiley et al., 2011).

a) Vorkommen

Neben der vorrangigen Expression dieser Untereinheit von Zellen der hämatopoetischen Linie, (insbesondere Makrophagen, dendritische Zellen, Monozyten, Natürliche Killerzellen, B- und T-Lymphozyten und Erythrozyten aber auch Mastzellen, Mikroglia, Osteoklasten und Eosinophile) findet man den P2X₇R auch auf der Oberfläche von Zellen vieler anderer Gewebe. Inzwischen wurde er weit verbreitet, u.a. auch auf Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, auf Osteoblasten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen nachgewiesen (Collo et al., 1997; Suh et al., 2001; Sperlágh et al., 2006; Sluyter und Stokes, 2011; Wiley et al., 2011; Bartlett et al., 2014; Tewari und Seth, 2015).

Da der P2X₇R ähnlich wie der P2X₂R nur relativ langsam über den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche transportiert wird, findet man ihn häufig vorwiegend auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums verteilt vor (Robinson und Murrell-Lagnado, 2013). Dabei hängt der Transport zur Plasmamembran auch vom Zelltyp und der Spezies ab. Bei humanen

Einleitung

Monozyten und Lymphozyten findet sich der P2X₇R zum Beispiel vorwiegend intrazellulär, nach Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen ist der Rezeptor dagegen überwiegend auf der Plasmamembran lokalisiert (Hickman et al., 1994; Gu et al., 2000; Boumechache et al., 2009; Robinson und Murrell-Lagnado, 2013). Welche Faktoren die Transportrate des P2X₇R zur Plasmamembran regulieren ist nicht abschließend geklärt. Mutationsstudien legen nahe, dass die C-terminale Domäne des Rezeptors involviert ist (Denlinger et al., 2003; Smart et al., 2003; Robinson und Murrell-Lagnado, 2013). Zudem scheint die Palmitoylierung von Cysteinresten für den korrekten Transport in lipidreiche Regionen der Zellmembran wichtig zu sein. Rezeptormutationen, die eine Palmitoylierung unmöglich machen, führen zu verringerter Membranexpression und zum vermehrten Verbleib der Rezeptorproteine im endoplasmatischen Retikulum (Gonnord et al., 2009).

b) Aufgaben

Sowohl die Verteilung des P2X₇R, als auch die zur Aktivierung notwendige (im Vergleich zu den anderen Subtypen) ungewöhnlich hohe ATP-Konzentration führt zur Vermutung, dass dieser Rezeptor als „Gefahrensensor“ fungiert (Ferrari et al., 2006; Donnelly-Roberts und Jarvis, 2007). Unter normalen physiologischen Konditionen ist die Rezeptoraktivität dabei durch die extrazelluläre Konzentration divalenter Kationen wie Ca²⁺ und Mg²⁺, die einen Komplex mit ATP⁴⁻ eingehen und die ATP-Affinität allosterisch inhibieren, auf einem niedrigen Level gehalten. Damit wird unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich eine Permeabilitätssteigerung oder Porenformation verhindert (Jiang, 2009; Miller et al., 2011).

Unter pathophysiologischen Konditionen dagegen (Entzündung oder Infektion) wird die Rezeptor-Expression (u.a. in Monozyten, Makrophagen und Mikroglia) durch inflammatorische Zytokine hochreguliert. Die Freisetzung von ATP aus zerstörten oder gestressten Zellen (s. 1.1) führt dabei zur P2X₇-Rezeptor-Aktivierung (Lister et al., 2007; Lenertz et al., 2011; Miller et al., 2011; Bartlett et al., 2014).

Heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierte humane P2X₇-Rezeptoren (hP2X₇R) zeigen zwei funktionell unterschiedliche Aktivierungsstellen, wobei eine dieser Bindungsstellen deutlich affiner gegenüber freiem ATP⁴⁻ ist (Dissoziierungskonstante 4 vs. 200 µM) (Klapperstück et al., 2001).

Neben der Regulation der Knochenmineralisierung (Ke et al., 2003) und der Beeinflussung der Neurotransmission durch z.B. Initiierung der Glutamatausschüttung (Marcoli et al., 2008) scheint der P2X₇R insbesondere im Entzündungsprozess und in der Immunabwehr eine wichtige Rolle zu spielen.

Dabei führt die Aktivierung von P2X₇R über die Initiierung verschiedenster Enzymkaskaden, außerdem Stimulation unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren zur Expression, Bildung

Einleitung

und/oder Sekretion proinflammatorischer Zytokine und vieler anderer immunmodulatorischer Faktoren (u.a. IL-1 β , IL-18, COX-2, IL-2, IL-6, TNF- α , ROS, iNOS und VEGF) (Ferrari et al., 1997; Hu et al., 1998; Sperlágh et al., 1998; Mehta et al., 2001; Suh et al., 2001; Donnelly-Roberts et al., 2004; Guerra et al., 2007; Lister et al., 2007; Lenertz et al., 2011; Wiley et al., 2011; Bartlett et al., 2014; Tewari und Seth, 2015).

Die Aktivierung von P2X₇R triggert zudem diverse Prozesse, die über eine Modulation des Membrantransports zu Veränderungen der Zusammensetzung der Oberflächenproteine- und -lipide (Oberflächenmoleküle wie CXCL16 und CD 23) in Leukozyten und Epithelzellen führen. Damit beeinflusst der P2X₇R die direkte Interaktion von P2X₇R-exprimierenden Zellen mit anderen Zelltypen auch im Rahmen der Aktivierung von Immun- und Inflammationsprozessen (Qu und Dubyak, 2009; Wiley et al., 2011; Pupovac et al., 2014; Bartlett et al., 2014). Die prolongierte Aktivierung von P2X₇R führt außerdem zu einer Reihe von zytoskelettalen Veränderungen, die zu Blasenbildung der Plasmamembran, Zell-Zellfusion und Exosomausschüttung führen und die Apoptose initiieren können (Bartlett et al., 2014; Tewari und Seth, 2015).

Es gibt Hinweise, dass der P2X₇R auch als sogenannter „Scavenger-Rezeptor“ bisher nicht genauer definierte Oberflächenmarker (z.B. von apoptotischen Zellen) erkennen kann und so die Phagozytose solcher Zellen initiiert (Gu et al., 2011; Bartlett et al., 2014).

Aufgrund der Vielzahl an genannten immunmodulatorischen Prozessen, in denen der P2X₇R involviert ist, wird dieser Rezeptor mit einer Reihe von infektiösen und inflammatorischen Erkrankungen in Verbindung gebracht:

Der P2X₇R fördert die Abtötung obligat intrazellulärer Bakterien (z.B. *Mycobacterium tuberculosis* (Lammas et al., 1997) und Chlamydien (Darville et al., 2007)) und spielt eine Rolle in der Entwicklung neuropathischer und inflammatorischer Schmerzen (Chessell et al., 2005; Donnelly-Roberts und Jarvis, 2007; Sluyter und Stokes, 2011) und einigen neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen (u.a. Alzheimerdemenz, Multiple Sklerose, Amyotrophe Lateralsklerose und Chorea Huntington) (Yiangou et al., 2006; Ryu und McLarnon, 2008; Diaz-Hernandez et al., 2009; Diaz-Hernandez et al., 2012; Tewari und Seth, 2015). Durch die Initiierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wird der P2X₇R auch mit der Tumorbildung assoziiert (Adinolfi et al., 2012; Adinolfi et al., 2015).

c) Kinetik

Der P2X₇R ist ein nicht-selektiver Kationenkanal. Dabei zeigt er abhängig von der Agonistenkonzentration und –applikationszeit unterschiedliche Antworten (Tewari und Seth, 2015). Kurze Agonistenapplikationen von ATP oder Bz-ATP führen zur Öffnung eines nicht-selektiven Kationenkanals mit K⁺-Ausstrom und Ca²⁺ und Na⁺-Einstrom (Tewari und Seth, 2015).

Einleitung

Dabei zeigen heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimierte hP2X₇-Rezeptoren in einer divalentfreien extrazellulären Lösung initial eine annähernd exponentiell ansteigende Aktivierung bei Agonistenapplikation, der eine linear ansteigende Stromzunahme folgt (Klapperstück et al., 2000). Der Deaktivierungsverlauf kann durch die Summe einer schnellen und einer langsamen exponentiell abfallenden Komponente beschrieben werden (Klapperstück et al., 2000). Zu einer Rezeptordesensitivierung, wie z.B. beim P2X₄-Rezeptor, kommt es nicht. Im Gegensatz zu den anderen P2X-Rezeptoren wird bei wiederholter Agonistenapplikation eine Sensitivierung des P2X₇R mit zunehmender Amplitudenzunahme und verlangsamter Deaktivierungsrate beobachtet (Coddou et al., 2011). Zudem scheinen P2X₇-Rezeptoren bereits durch eine kurze Agonistenexposition sensibilisiert zu werden und zeigen danach eine gesteigerte Agonistenpotenz und sogar erweiterte Agonistenpharmakologie mit einer Stimulierbarkeit durch sonst wirkungsloses ADP und AMP (Chakfe et al., 2002; Donnelly-Roberts und Jarvis, 2007).

Bei prolongierter Aktivierung durch einen Agonisten kommt es zur Formation einer großen Pore, welche permeabel für große Moleküle bis zu einer Molekülmasse von 900 Da ist (u.a. für Moleküle wie Lucifer-Gelb (457 Da), Propidium (414 Da), Ethidium (314 Da) und Methylglukamin (190 Da)) (Tewari und Seth, 2015).

Dabei ist noch nicht abschließend geklärt, ob diese Porenbildung durch die Dilatation des nicht-selektiven Kationenkanals selber geschieht, oder zusätzliche Komponenten zur Öffnung einer nicht-selektiven Membran-Pore führen (Tewari und Seth, 2015). Da der P2X₇R zu den nicht-desensitivierenden Rezeptoren gehört, bleibt die Pore solange geöffnet, wie ATP am Rezeptor gebunden ist. Die Entfernung des Nukleotids führt zum Porenschluss, erlaubt also eine reversible Membranpermeabilisierung. Bei prolongierter ATP-Stimulation (> 15 min) führt die Membranpermeabilisierung bei den meisten Zellen allerdings zu einer irreversiblen Zellschädigung und die Zelle stirbt (Di Virgilio et al., 1998; Ferrari et al., 2006).

d) Agonisten

Im Vergleich zu den anderen P2X-Rezeptoren benötigt der P2X₇-Rezeptor zur Aktivierung deutlich höhere (submillimolare bis millimolare) ATP-Konzentrationen (EC_{50} ATP für P2X₇R = 0,2 – 4 mM, für andere P2XR = 1 – 10 μ M) (Tewari und Seth, 2015).

Eine deutlich größere Potenz (etwa 10 – 30mal potenter als ATP) zeigt dagegen Bz-ATP (EC_{50} = 7 μ M) und ist damit der stärkste Agonist für P2X₇-Rezeptoren. Dabei aktiviert dieser Agonist jedoch nicht spezifisch nur diesen Subtyp, sondern besitzt auch gegenüber anderen P2X-Rezeptoren agonistische Fähigkeiten (Tewari und Seth, 2015).

Zudem werden P2X₇-Rezeptoren auch durch einige andere Nukleotid-Analoga aktiviert (Bz-ATP >> ATP > 2MeSATP > ATP- γ -S), nicht aber durch $\alpha\beta$ -meATP, $\beta\gamma$ -meATP, UTP und Adenosin (Surprenant et al., 1996; Wiley et al., 2011; Bartlett et al., 2014; Tewari und Seth, 2015). Die

Einleitung

beschriebene geringe agonistische Aktivität des ADP an P2X₇R (Surprenant et al., 1996) konnte in Einzelkanaluntersuchungen nicht bestätigt werden (Markwardt et al., 1997; Riedel et al., 2007).

e) Antagonisten

Aufgrund der Vielzahl von Erkrankungen, in denen der P2X₇R involviert scheint, wurden schon früh große Anstrengungen bei der Entwicklung verschiedener Antagonisten unternommen. Die ersten P2X₇R-Antagonisten wurden in den 70er-Jahren entwickelt, dabei besitzt diese erste Generation der verwendeten P2X₇R-Antagonisten allerdings eine nur sehr geringe Spezifität und zeigt auch gegenüber anderen P2X- und zum Teil auch gegenüber P2Y-Rezeptoren antagonistische Eigenschaften (Gever et al., 2006; Bartlett et al., 2014). Zu diesen ersten Antagonisten zählen u.a. Reactive Blue 2 (Kerr und Krantis, 1979) außerdem Suramin (Rassendren et al., 1997) und BBG (Dunn und Blakeley, 1988; Soltoff et al., 1989), PPADS und KN-62 (Lambrech et al., 1992; Murgia et al., 1993; Surprenant et al., 1996; Gargett und Wiley, 1997; Bartlett et al., 2014). Auch das Perjodat-oxidierte 2',3'-dialdehyd ATP (= oATP, eine Schiff'sche Base formendes Agens mit Nukleotid-Struktur) gehört zu dieser ersten Generation von P2X₇-Rezeptorantagonisten. Dabei führt die prolongierte Inkubation von mindestens 1 – 2 h in oATP zu einer irreversiblen Inhibierung von P2X₇ Rezeptoren (Di Virgilio, 2003).

Ausgehend von diesen Stoffen führten Strukturmodifikationen zu verbesserten antagonistischen Eigenschaften und einer Steigerung der Rezeptorspezifität (Bartlett et al., 2014).

Diese zweite Generation von Antagonisten umfasst u.a. Tetrazol/Triazol-basierte Stoffe wie A438079 und A839977 (Nelson et al., 2006; Nelson et al., 2008; Honore et al., 2009), Adamantanamide wie AACBA (oder GSK314181) (Broom et al., 2008), das Cyanoguanidin-Derivat A740003 (Honore et al., 2006), außerdem das zyklische Imid AZ11645373 (Stokes et al., 2006) und das Nikotinamid-Derivat JNJ-47965567 (Donnelly-Roberts et al., 2009); (Bhattacharya et al., 2013; Bartlett et al., 2014).

2014 wurde mit JNJ-42253432 ein neuer hoch affiner und selektiver außerdem ZNS-gängiger P2X₇R Antagonist vorgestellt (Lord et al., 2014).

Daneben wird der P2X₇-Rezeptor durch verschiedene bekannte P2X₁-Rezeptor-Antagonisten wie MRS2159 und NF279 (Hülsmann et al., 2003; Donnelly-Roberts et al., 2009; Bartlett et al., 2014), außerdem durch das als Anti-Histaminikum bekannte Oxatomid signifikant inhibiert (Yoshida et al., 2015).

f) Allosterische Modulation

Wie der P2X₄R wird auch der P2X₇R durch eine Vielzahl an Stoffen allosterisch in seiner Funktion moduliert.

Einleitung

Dabei wird die P2X₇R-Funktion u.a. durch extrazelluläre divalente Ionen ($\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} \sim \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+} \sim \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} = \text{Ba}^{2+} \gg \text{Sr}^{2+}$) aber auch durch Na^+ inhibiert (Virginio et al., 1997; Nakazawa und Ohno, 1997; Li et al., 2005; Acuna-Castillo et al., 2007; Moore und MacKenzie, 2008; Coddou et al., 2011). Ein möglicher Mechanismus ist dabei, dass divalente Kationen auch an ATP binden und so die Konzentration des freien wirksamen ATP^{4-} reduzieren (Markwardt et al., 1997; North, 2002; Riedel et al., 2007).

Neben der Komplexbildung und der damit verbundenen Verminderung der Agonistenkonzentration wird die Ausbildung eines nichtkompetitiven Blocks der offenen Kanal-Konformation durch extrazelluläres Mg^{2+} , wie es z.B. auch bei NMDA-Rezeptoren beobachtet wird, diskutiert (Nakazawa und Hess, 1993; Negulyaev und Markwardt, 2000; North, 2002). So wurde bei der Untersuchung der hemmenden Wirkung von ATP auf P2X₇-Rezeptoren gefunden, dass zusätzlich zur Chelatierung von ATP^{4-} ein zusätzlicher Hemmeffekt von Mg^{2+} auftritt (Pippel et al., 2015). Dieser könnte durch einen allosterischen Effekt von Mg^{2+} durch Bindung außerhalb der ATP-Bindungsstelle oder durch Blockierung der Kationenkanalpore zustande kommen (Seyffert et al., 2004; Acuna-Castillo et al., 2007; Coddou et al., 2011).

Neben divalenten Ionen werden die P2X₇R-abhängigen Ströme zudem durch saures Milieu reduziert (Liu et al., 2009; Coddou et al., 2011). Hierbei spielt sowohl die durch H^+ -Ionen verursachte Verringerung an freiem ATP^{4-} , als auch ein Effekt der Bindung von H^+ am P2X₇R selbst eine Rolle (Liu et al., 2009; Flittiger et al., 2010). Auch extrazelluläre Cl^- -Ionen üben einen hemmenden Effekt auf hP2X₇R-vermittelte Ionenströme aus (Kubick et al., 2011).

Wie auch der P2X₄R werden native P2X₇R in Mikroglia durch Propofol potenziert, ähnliche Effekte werden außerdem auch durch Thiopental und Ketamin beobachtet (Nakanishi et al., 2007; Coddou et al., 2011).

Eine Reihe von Lipiden (u.a. Lysophatidylcholin und Sphingosylphosphorylcholin) können ebenfalls die Funktion des P2X₇-Rezeptors steigern (Michel und Fonfria, 2007; Bartlett et al., 2014), zudem scheint auch das antibiotisch wirksame Polymyxin B die Aktivierung des hP2X₇R zu potenzieren (Ferrari et al., 2004; Bartlett et al., 2014).

1.2.3 Heteromere P2X-Rezeptoren

Neben der homomeren Bauweise bestehend aus drei Proteinen derselben Untereinheiten scheinen die P2X-Rezeptoren ebenso wie andere ionotrope Rezeptoren (u.a. spannungsabhängige Kaliumkanäle, nikotinerge Acetylcholinrezeptoren) ihre Diversität durch die Bildung von Heterooligomeren zu vergrößern. Dabei werden die funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften direkt durch die Zusammenstellung der verschiedenen Untereinheiten beeinflusst, was beachtlich die Bandbreite der ATP-gesteuerten Signalantworten der Zellen erhöht (Torres et al., 1999; Nicke, 2008).

Einleitung

Die Tatsachen, dass in vielen Geweben und Zellen verschiedene Untereinheiten überlappend exprimiert werden und sich außerdem ATP-induzierte Ströme finden, die nicht zu denen heterolog exprimierter homomerer P2X-Rezeptoren passen (u.a. in sensorischen Nervenzellen, kortikalen Astrozyten), machen das Vorliegen von heteromeren P2X-Rezeptoren wahrscheinlich (Lewis et al., 1995; Lalo et al., 2008). Anders als bei den anderen ionotropen Rezeptoren scheint bei den P2X-Rezeptoren diese heterotrimeren Bauweise allerdings eher die Ausnahme zu sein (Saul et al., 2013).

Koimmunopräzipitationsstudien heterolog koexprimierter, aber auch einiger endogener P2X-Rezeptoren lieferten Hinweise auf eine Vielzahl von möglichen Paarungen (P2X_{1/2}, P2X_{1/3}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{1/6}, P2X_{2/3}, P2X_{2/5}, P2X_{2/6}, P2X_{3/5}, P2X_{4/5}, P2X_{4/6}, P2X_{4/7} und P2X_{5/6}) (Radford et al., 1997; Torres et al., 1998; Torres et al., 1999; Guo et al., 2007; Casas-Pruneda et al., 2009; Compan et al., 2012).

Weitere Studien zeigten zudem nicht nur die räumliche Assoziation, sondern auch eine funktionelle Beeinflussung der pharmakologischen Eigenschaften und der Rezeptorkinetik verschiedener Untereinheiten durch die Koexpression (u.a. P2X_{1/2} (Brown et al., 2002), P2X_{1/4} (Nicke et al., 2005), P2X_{1/5} (Torres et al., 1998; Lê et al., 1999), P2X_{2/3} (Lewis et al., 1995; Radford et al., 1997; Liu et al., 2001), P2X_{2/5} (Compan et al., 2012), P2X_{2/6} (King et al., 2000) und P2X_{4/6} (Lê et al., 1998)). Dabei ist meist jedoch nicht abschließend geklärt, ob diese nachgewiesene räumliche Assoziation oder auch funktionelle Beeinflussung der verschiedenen Untereinheiten auf der Ausbildung tatsächlicher Heteromere fußt, oder möglicherweise alleine durch Paarungen zwischen den einzelnen Homotrimeren verursacht wird (Antonio et al., 2011; Saul et al., 2013). Solche ‚Rezeptorpaarungen‘ finden sich z.B. auch mit anderen ionotropen Rezeptoren (u.a. nikotinerge Acetylcholinrezeptoren, GABA-Rezeptoren und Serotoninrezeptoren) wo die Koexpression mit P2X-Rezeptoren zu einer funktionellen Interaktion führt (Boué-Grabot et al., 2004a; Boué-Grabot et al., 2004b; Khakh et al., 2005; Toulmé et al., 2007; Xia et al., 2008; Decker und Galligan, 2009; Limapichat et al., 2014).

Genauere Studien koexprimierter P2X-Untereinheiten (durch u.a. Crosslinking Studien und Rasterkraftmikroskopie) ergaben bisher nur direkte Hinweise für die Existenz von P2X_{1/2} (Aschrafi et al., 2004), P2X_{1/5} (Compan et al., 2012), P2X_{2/3} (Jiang et al., 2003) und P2X_{2/6} (Barrera et al., 2007; Hausmann et al., 2012). 2014 wurde zudem der erste Hinweis auf eine Heterooligomerbildung bestehend aus drei verschiedenen Untereinheiten (rP2X_{2/4/6}) veröffentlicht (Antonio et al., 2014). Dabei scheint das Expressionslevel der einzelnen Untereinheiten (u.a. beim P2X_{2/6}, P2X_{2/3}) die Komposition der Heteromere, bzw. die ‚Neigung‘ zur Heteromerbildung zu beeinflussen (Liu et al., 2001; Barrera et al., 2007).

Die Frage, ob auch die hP2X₄ und hP2X₇-Rezeptoren funktionelle Heteromere ausbilden, wurde in der Literatur bislang kontrovers diskutiert. Erschwert wurde dies u.a. durch die nur langsame

Einleitung

Entwicklung P2X₇-spezifischer Liganden und der relativen Insensitivität des P2X₄-Rezeptors gegenüber den üblichen P2XR-Antagonisten (Nicke, 2008). Allerdings bestehen zwischen den beiden Subtypen interessante Schnittstellen und Gemeinsamkeiten, weshalb die Frage nach einer Rezeptorassoziation entweder in Form einer Heteromerbildung oder aber funktionellen Interaktion zwischen den homomeren Rezeptoren weiterhin aktuell ist. Neben einer überlappenden Gewebeverteilung insbesondere in Immunzellen (Burnstock und Knight, 2004; Nicke, 2008; Surprenant und North, 2008; Boumechache et al., 2009), modulieren sich beide Rezeptoren z.T. gegenseitig in der Funktion, bzw. wirken synergistisch insbesondere im Rahmen von Entzündungsprozessen und bei der Entwicklung neuropathischer und inflammatorischer Schmerzen (Nicke, 2008; Kawano et al., 2012a; Kawano et al., 2012b; Sakaki et al., 2013). Außerdem scheinen beide Rezeptortypen eng miteinander verwandt zu sein (die für die beiden Untereinheiten kodierenden Gene liegen gemeinsam auf dem Chromosom 12 nur 23 bis 130 Kilobasenpaare voneinander entfernt im Bereich einer Reptitionssequenz) (Garcia-Guzman et al., 1997), zumal sie die unter den verschiedenen Untereinheiten größte Übereinstimmung in der Aminosäure-Sequenz besitzen (48,6% verglichen mit 41-45 % Übereinstimmung zwischen den anderen Subtypen) (Buell et al., 1998; North, 2002; Wiley et al., 2011).

2 Zielstellung

Wie viele ionotrope Rezeptoren können auch die aus drei Untereinheiten bestehenden ATP gesteuerten P2X-Rezeptoren Hetero-Oligomere ausbilden und damit die Bandbreite der rezeptorgesteuerten Signalantworten der Zelle deutlich erhöhen. Bisher sind verschiedene funktionelle P2X-Heterotrimere (u.a. P2X_{1/2}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6}) beschrieben worden (Hausmann et al., 2012). Bei einer überlappenden Gewebeverteilung insbesondere in Immunzellen, eng miteinander verzahnten Effekten z.B. im Rahmen von Entzündungsprozessen und bei der unter den Untereinheiten bestehenden größten Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz stellt sich unweigerlich die Frage nach einer Heterooligomerbildung auch zwischen den beiden Untereinheiten P2X₄ und P2X₇ (North, 2002; Boumechache et al., 2009; Sakaki et al., 2013). Ob es zwischen den hP2X₇ und hP2X₄ Untereinheiten aber tatsächlich zur Ausbildung funktioneller heteromerer Rezeptoren mit distinktiven Eigenschaften kommt, wird in der Literatur bislang kontrovers diskutiert. Koimmunopräzipitationsstudien zeigten, dass alle Untereinheiten außer dem P2X₇-Rezeptor in der Lage sind heteromere Rezeptoren auszubilden (Torres et al., 1999). Spätere Arbeiten widersprachen dieser These mit der Veröffentlichung von weiteren Koimmunopräzipitationsstudien und Ganzzellstrommessungen von koexprimierten P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren, die auf die Ausbildung heteromerer Rezeptoren mit neuen Eigenschaften hindeuteten (Guo et al., 2007).

Veröffentlichungen von weiteren Arbeitsgruppen folgten, welche eine Heteromerenbildung zumindest von Nagetier-Rezeptoren widerlegten, allerdings auf eine Interaktion zwischen homomeren Rezeptorpaaren und damit auf eine funktionelle Beeinflussung beider Untereinheiten hinwiesen. Ob und wie genau diese beiden Rezeptorsubtypen nun miteinander interagieren, ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Jüngste Untersuchungen der Arbeitsgruppe Prof. Schmalzing der RWTH Aachen mittels BN-PAGE- und SDS-PAGE-Analyse ergaben nun erstmalig doch direkte Hinweise auf eine Heteromerbildung von heterolog in *Xenopus laevis* koexprimierter humaner P2X₄ und P2X₇-Rezeptoren (Prudic et al., 2016).

Die folgende Arbeit sollte mittels Ganzzellstrommessungen heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimierter hP2X₇ und hP2X₄-Rezeptoren untersuchen, ob es durch die Koexpression zur Ausbildung von Heterotrimern mit einem distinktiven elektrophysiologischen Phänotyp kommt. Hierzu sollten zum einen die kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der isoliert exprimierten Rezeptoren untersucht und mit den Eigenschaften bei Koexpression beider Subtypen verglichen werden. Zum anderen sollte untersucht werden, wie die Koexpression von P2X₄R mit funktionell nahezu inaktiven P2X₇-Rezeptormutanten oder auch anderen Kanaltypen, wie Pannexin und Glycinrezeptoren, die elektrophysiologischen Eigenschaften des hP2X₄-Rezeptors beeinflusst.

3 Material und Methodik

3.1 Material

Falls nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Die afrikanischen Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) erhielten wir von Xenopus express (Vernassal, Frankreich). Die verwendeten cRNAs der hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren, außerdem der Pannexin1- und Glycinrezeptor-Untereinheiten wurde vom Labor von Herrn Prof. G.Schmalzing (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt.

3.2 Methodik

3.2.1 Behandlung der Oozyten

Zur Präparation der als Expressionssystem der cRNA verwendeten *Xenopus laevis* Oozyten wurde den afrikanischen Krallenfröschen durch eine kleine bauchseitige Inzision ein Teil des Ovars entfernt. Hierzu erfolgte zunächst die Anästhesie der Frösche in einer wässrigen Tricain/Hepes Lösung (Lösung a, Tabelle 1). Dem entnommenem Teilresektat wurde zur Entfernung der bindegewebigen und folliculären Anteile für etwa vier bis sechs Stunden Kollagenase zugesetzt (Lösung b, Tabelle 1), welche anschließend durch Ca²⁺-freie Lösung (Lösung c, Tabelle 1) ausgewaschen wurde. Die Aufbewahrung der so gereinigten Oozyten erfolgte in einer Ringer-Lösung (Lösung d, Tabelle 1) bei 19°C.

Nach Selektion der geeigneten Oozyten unter Mikroskopkontrolle (Reifegrad V oder VI) wurden 23 nl gelöster cRNA in verschiedenen Verdünnungen injiziert. Anschließend erfolgte vor Durchführung der Spannungsklemmexperimente eine zwei- bis dreitägige Inkubation der Zellen in einer Antibiotika enthaltenden Lösung (Lösung e, Tabelle 1) bei ebenfalls 19°C.

3.2.2 Elektrophysiologie

Die Datenerhebung erfolgte durch elektrophysiologische Messungen an den *Xenopus laevis* Oozyten mittels der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmmethode (Voltage-Clamp-Methode (Schwarz und Rettinger, 2004)). Hierbei handelt es sich um Ganzzellstrommessungen, wobei das Membranpotential der Zelle auf einem definierten Wert fixiert wird und jedem entstehenden Strom (z.B. durch sich öffnende Ionenkanäle) mit normalerweise folgender Änderung des Membranpotentials mit einem entgegengerichteten Kompensationsstrom durch den Spannungsklemmverstärker entgegengewirkt wird. Eine Mikroelektrode misst hierbei das Membranpotential, durch die zweite Elektrode erfolgt die Injektion des Kompensationsstromes zur Einhaltung der vorgegebenen Spannung. Bei den erfolgten Messungen betrug das Haltepotential -40 mV. Die Elektroden wurden aus dünnwandigen Borosilikat-Glaskapillaren gezogen und mit einer 3 M KCl-Lösung gefüllt. Verwendet wurden nur Elektroden mit einem geeigneten Widerstand von 0,9 bis 1,5 MΩ.

Material und Methodik

Die Durchführung der Versuche erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 21 °C). Unter Verwendung des Spannungsklemmverstärkers OC-725C (Hamdon, USA) wurden die Ströme erzeugt, gewandelt und verstärkt. Dann wurden die Ströme bei 100 Hz Tiefpass-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.

Der notwendige schnelle und reproduzierbare Lösungswechsel wurde mit einer kleinen (0,1 ml) wannenförmigen Kammer erreicht, durch die mit Hilfe eines Saugpumpensystems Lösungen mit einer Geschwindigkeit von ca. 75 µl/s strömten. Das Umschalten zwischen den verschiedenen Lösungen wurde mittels mehrerer Computer-gesteuerter Magnetventile bewerkstelligt, die ein modifiziertes U-Rohr-System kontrollierten (Bretschneider und Markwardt, 1999). Die Einwaschzeit betrug 1210 ± 70 ms und die Auswaschzeit 1770 ± 170 ms (Klapperstück et al., 2000).

Das Abgleichen der Elektroden und Messung des Membranpotential der Oozyten erfolgte in Oozyten-Ringer-Lösung (Lösung f). Um Ca^{2+} -induzierte Ströme zu vermeiden und außerdem eine Modulation der P2XR-Aktivierung durch extrazelluläre divalente Ionen (u.a. Komplexbildung mit ATP^{4-} , aber auch mögliche allosterische Modulation der P2XR) zu umgehen, wurden alle Messungen in Ca^{2+} und Mg^{2+} freien Lösungen durchgeführt. Zur Blockierung von Ionenströmen, die durch den extrazellulären Entzug divalenter Kationen entstehen, wurde 0,1 mM Flufenaminsäure hinzugeführt (Lösung g) (Klapperstück et al., 2000).

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

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

Material und Methodik

3.2.3 Statistik

Nichtlineare Approximationen sowie die graphische Darstellung der Daten wurden mit Hilfe des Programms Sigmaplot (SPSS, Chicago, USA) erstellt. Gemittelte Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung 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 Programm Sigmastat getestet. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte wurden bei $P < 0,05$ angenommen und in den Abbildungen mit * markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Kinetik der hP2X₄R-, hP2X₇R- und hP2X_{4/7}R-abhängigen Ionenkanalströme

Es wurde untersucht, ob die heterologe Koexpression von humanen P2X₄- (hP2X₄) und humanen P2X₇ (hP2X₇) Rezeptoren in *Xenopus Laevis* Oozyten zu einer Interaktion mit Veränderung des elektrophysiologischen Verhaltens dieser Rezeptor-abhängigen Ionenkanäle führt.

4.1.1 Kinetik der humanen P2X₄R-abhängigen Ionenkanalströme

Zunächst wurde der humane P2X₄-Rezeptor näher charakterisiert.

Abb. 1 zeigt einen Beispielstrom heterolog exprimierter hP2X₄-Rezeptoren.

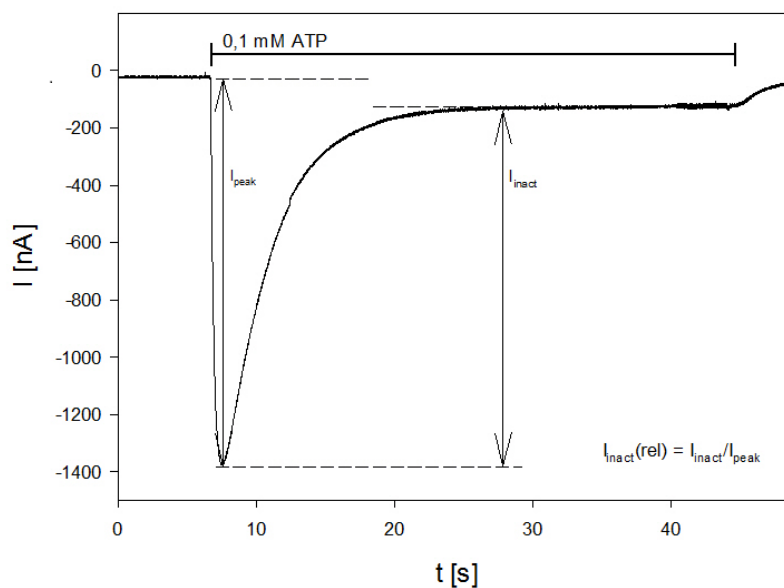


Abb. 1: Beispiel für einen hP2X₄R-abhängigen Ionenstrom. Die ATP-Applikation ist markiert.

Heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierte hP2X₄-Rezeptoren zeigten auf die ATP-Applikation einen Gipfelstrom I_{peak} (bei 0,1 mM ATP nach $1,2 \pm 0,5$ s, $n = 68$). Noch während der Agonistenapplikation kam es als Zeichen der Rezeptor-Desensitivierung zum Absinken der Stromamplitude. D.h. bei Applikation von 0,1 mM ATP betrug der ATP-induzierte Strom nach 12 s nur noch 14 ± 3 % des Gipfelstroms, $n = 6$.

Bei wiederholten ATP-Applikationen kam es (s.u.) zu einer signifikanten Reduktion der maximal erreichten Stromamplitude. Diese sank bei der zweiten ATP-Applikation auf etwa 40 % und reduzierte sich bei der dritten Applikation weiter auf 10 % im Vergleich zur ersten Gipfelstromamplitude.

Die Desensitivierungsrate während der einzelnen ATP-Applikationen wurde durch die repetitive Applikation nicht verändert (Das Verhältnis der Stromamplitude nach 12 s Applikation von 0,1

Ergebnisse

mM ATP zum Gipfelstrom betrug bei der 1. Applikation $19 \pm 7\%$, $n = 21$; bei der zweiten Applikation $14 \pm 6\%$, $n = 21$ und bei der dritten Applikation $18 \pm 12\%$, $n = 9$).

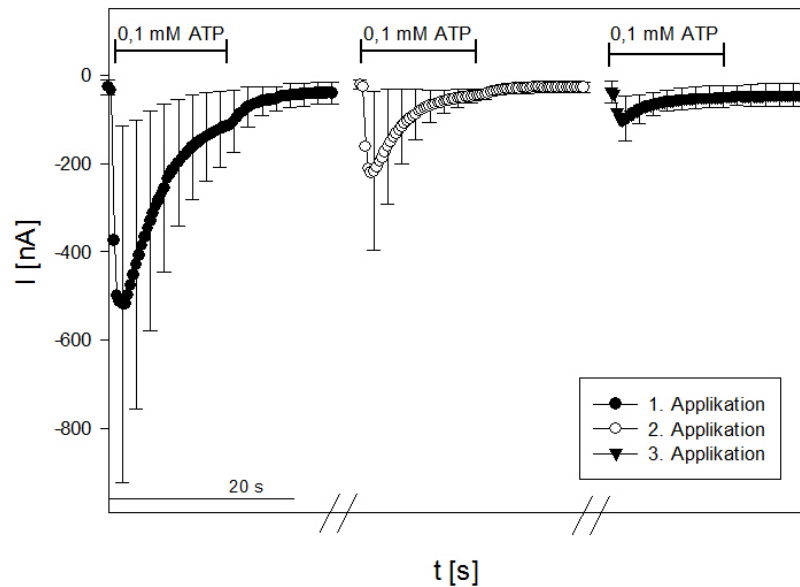


Abb. 2: Veränderung der hP2X₄R-abhängigen Ströme bei wiederholter ATP-Applikation. Gemittelte Stromamplituden bei dreimalig hintereinander durchgeführter ATP-Applikation von 0,1 mM ATP. Die Zeit zwischen den ATP-Applikationen betrug 3 – 10 min. Die Dauer der ATP-Applikationen ist markiert. Mittelwerte aus $n = 10$ Oozyten.

Weiterhin gab es keine signifikanten Unterschiede in der Verringerung der relativen Gipfelstromamplitude $I_{rel} = I_{peak2}/I_{peak1}$, (I_{peak1} , I_{peak2} = Gipfelstromamplitude der 1. bzw. 2. ATP-Applikation) wenn die Wartezeit zwischen den einzelnen Applikationen 10, 3 oder nur 1 Minute betrug (10 min 0.31 ± 0.23 , $n = 24$; 3 min 0.45 ± 0.23 , $n = 14$; 1 min 0.18 ± 0.12 , $n = 3$). Erst bei Verminderung des Applikationsintervalls auf 20 s kam es zu einer signifikanten zusätzlichen Stromamplitudenreduktion (s.Abb. 3).

Ergebnisse

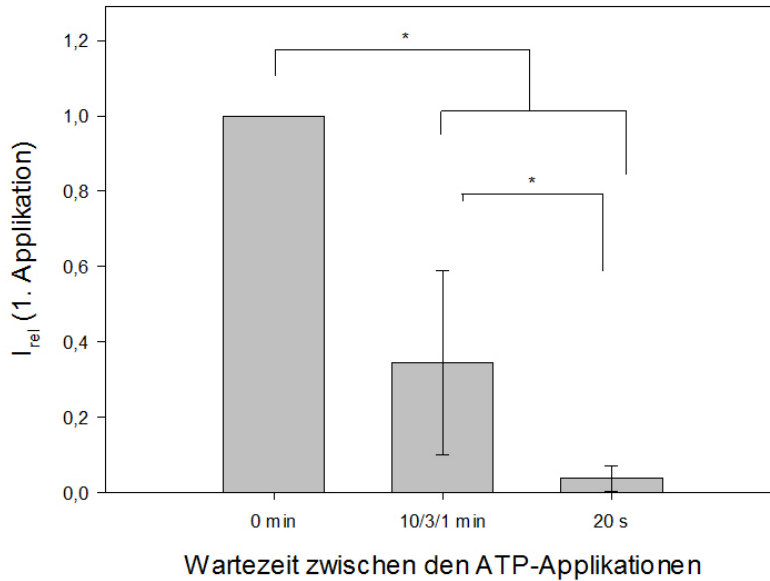


Abb. 3: Abhängigkeit der hP2X₄R-abhängigen Stromamplitude von der Zeit zwischen den ATP-Applikationen. Der ATP-induzierte Gipfelstrom I_{peak} bei wiederholter ATP-Applikation wurde auf den Gipfelstrom der ersten Applikation normiert. Mittelwerte aus 4 – 41 Oozyten.

4.1.2 Kinetik der humanen hP2X₇R-abhängigen Ionenkanalströme

Als nächstes wurde der humane P2X₇-Rezeptor näher charakterisiert.

Abb. 4 zeigt einen Beispielstrom heterolog exprimierter hP2X₇-Rezeptoren.

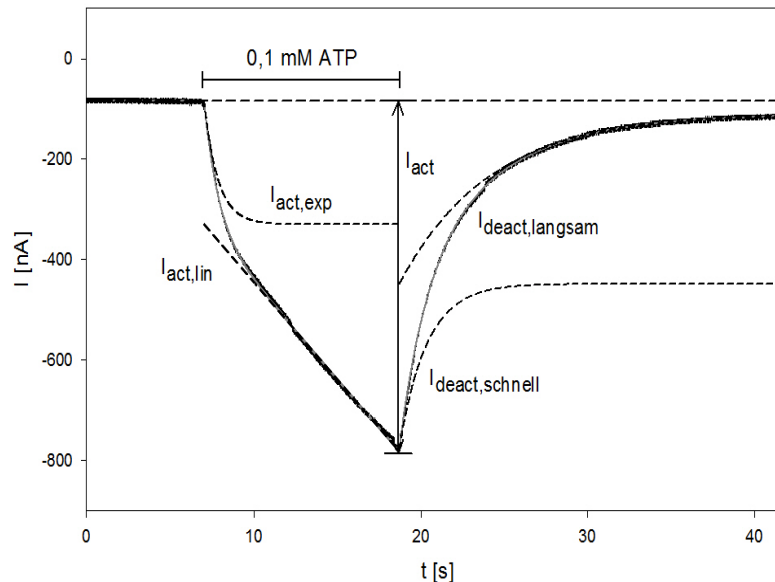


Abb. 4: Beispiel für einen hP2X₇R-abhängigen Ionenstrom. Die Dauer der ATP-Applikation ist markiert.

Bei dem verwendeten Haltepotential von -40 mV wurde ein Einwärtsstrom während der ATP-Applikation gemessen, bei dem eine exponentiell sättigend ansteigende und eine anschließend annähernd linear ansteigende Stromkomponente unterschieden werden konnte. Der relative

Ergebnisse

Anteil der exponentiell sättigend ansteigenden Stromkomponente ($I_{akt,exp,rel}$) wurde folgendermaßen abgeschätzt:

$$I_{akt,exp,rel} = \frac{ATP - \text{induzierte Stromamplitude nach } 2,5 \text{ s}}{ATP - \text{induzierte Stromamplitude am Ende der Applikation}}$$

Beim hP2X₇R nahm die exponentiell ansteigende Stromkomponente bei 6 s dauernder ATP-Applikation (gemessen 2,5 s nach Beginn der ATP-Applikation) $37 \pm 1 \%$ ($n = 3$) der Maximalstromamplitude ein. Bei prolongierter ATP-Applikation sank der relative Anteil der exponentiell ansteigenden Stromkomponente signifikant auf $27 \pm 5 \%$ ($n = 9$) bei 12 s bzw. $12 \pm 2 \%$ ($n = 5$) bei 36 s Applikationsdauer. D.h. der relative Anteil des linear aktivierenden Stroms nahm zu, da nach 2,5 s der exponentielle Teil der P2X₇R-Aktivierung weitgehend abgeschlossen ist (Klapperstück et al., 2001).

hP2X₇-Rezeptoren zeigen zwei verschieden schnelle Deaktivierungskomponenten (Klapperstück et al., 2001). Der Anteil der schnell deaktivierenden Stromkomponente $I_{deakt,fast,rel}$ wurde abgeschätzt mittels

$$I_{deakt,fast,rel} = \frac{\text{Amplitude des innerhalb von } 3 \text{ s deaktivierenden Stroms}}{\text{Amplitude des innerhalb von } 6 \text{ s deaktivierenden Stroms}}$$

Der Grad der schnellen Deaktivierung nach Beendigung der ATP-Applikation betrug bei 6 s ATP-Applikation $40 \pm 6 \%$ ($n = 3$) und änderte sich auch bei verlängerter Applikationsdauer nicht (12 s $48 \pm 5 \%$ ($n = 5$); 36 s $40 \pm 4 \%$ ($n = 5$)).

Im Gegensatz zu den hP2X₄-Rezeptoren kam es nicht zu einer Desensitivierung und damit auch nicht zur Ausbildung eines Gipfelstromes.

4.1.3 Kinetik der humanen koexprimierten P2X₄- und P2X₇R-abhängigen Ionenkanalströme

Als nächstes wurde untersucht, ob es bei Koexpression von hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren zu einer Änderung der ATP-abhängigen Ionenkanalströme kommt.

Um eine mögliche Beeinflussung durch die Koexpression beurteilen zu können, wurde ein bei reiner Addition beider homomeren Rezeptorströme zu erwartender, theoretischer Stromkurvenverlauf ermittelt.

Dieser theoretische gemittelte Stromkurvenverlauf wurde abgeschätzt mittels

$$I_{mean,theor}(hP2X_4R + hP2X_7R) = I_{mean}(hP2X_4R) + I_{mean}(hP2X_7R)$$

Ergebnisse

Die angegebene Standardabweichung wurde errechnet mittels

$$SD_{theor}(hP2X_4R + hP2X_7R) = (SEM(hP2X_4R) + SEM(hP2X_7R)) \times \sqrt{\frac{N(hP2X_4R) + N(hP2X_7R)}{2} - 1}$$

Wobei gemäß Fehlerfortpflanzungsgesetz davon ausgegangen wurde, dass sich bei Addition zweier Mittelwerte auch die Standardfehler addieren (Ku, 1966).

Zum besseren Vergleich der ATP-abhängigen Ströme wurden von den Stromkurvenverläufen der ATP-unabhängige Haltestrom vor der ATP-Applikation subtrahiert.

Bei Koexpression des hP2X₄-Rezeptors mit dem hP2X₇-Rezeptor ergaben sich keine Hinweise auf signifikante Änderungen der ATP-induzierten Stromkurvenverläufe der beiden einzelnen Komponenten. Wie in Abb. 5 ersichtlich, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem gemessenen gemittelten Stromkurvenverlauf bei Koexpression und dem theoretisch (durch einfache Addition der homomeren hP2X₄- und hP2X₇-Ströme) zu erwartenden Stromkurvenverlauf.

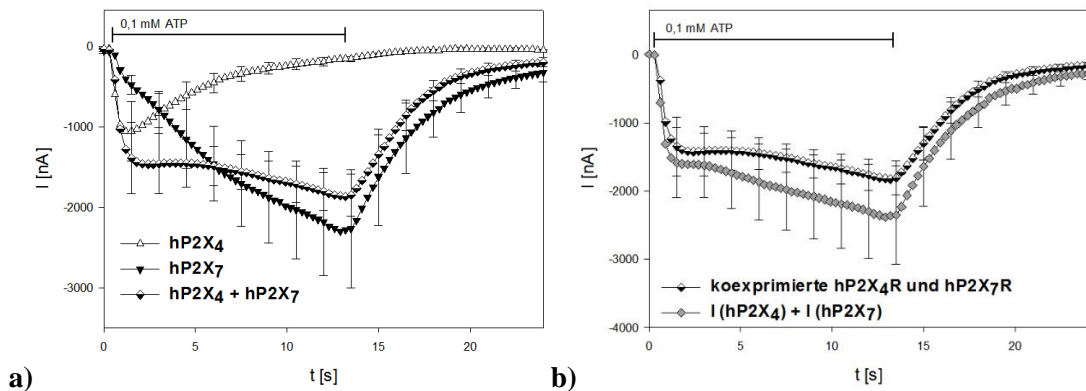


Abb. 5: Einfluss der Koexpression von hP2X₇- und hP2X₄-Rezeptoren auf den Zeitverlauf ATP-abhängiger Ströme. Applikation von 0,1 mM ATP für 12 s. a) Gemittelte Stromkurvenverläufe der einzeln und der gemeinsam exprimierten hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren. b) Gemessener Stromkurvenverlauf im Vergleich zum errechneten Stromkurvenverlauf bei Koexpression. Mittelwerte aus 5 – 6 Oozyten.

Es wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Konstrukte hP2X₄, hP2X₇ und koexprimierte hP2X₄ und hP2X₇-Rezeptoren erstellt. ATP wurde für 12 s appliziert und es wurde der maximale ATP-induzierte Strom gemessen. Wie aus den vorherigen Abb. 1 und 4 ersichtlich, bildete sich bei den isoliert exprimierten hP2X₄Rezeptoren ein Gipfelstrom aus. Bei isoliert exprimierten hP2X₇-Rezeptoren kam es dagegen zu zunächst exponentiell sättigenden und anschließend annähernd linear ansteigenden Stromkurvenverläufen bei Applikation von ATP. Bei

Ergebnisse

koexprimierten Konstrukten (s.Abb. 6b) wurden nur bei sehr geringen ATP-Konzentrationen desensitivierende Ströme gemessen.

Auch in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der koexprimierten hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren war der hP2X₄R-abhängige Anteil praktisch nicht zu sehen (s.Abb. 6a) und entsprach im Kurvenverlauf praktisch der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des isoliert exprimierten hP2X₇-Rezeptors.

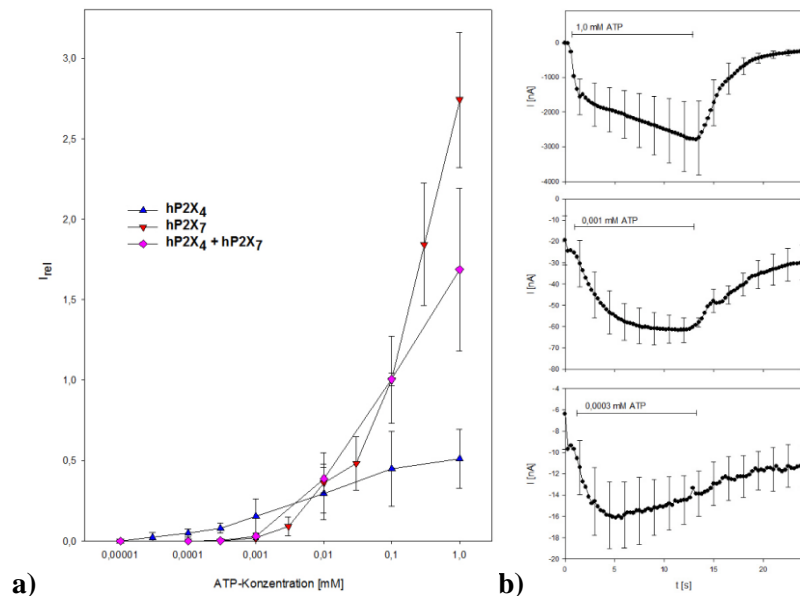


Abb. 6: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für koexprimierte hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren. Abhängigkeit der maximalen Stromamplitude während der ATP-Applikation von der Agonistenkonzentration. a) Die Messungen in der angegebenen Konzentration wurden auf den maximalen Strom während der 1. Applikation von 0,1 mM ATP in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Werte der 2. ATP-Applikation. Zwischen den Messungen erfolgte eine Wartezeit von 3-10 min. Mittelwerte von 2 bis 32 Messungen. b) Dargestellt sind die gemittelten Stromkurvenverläufe bei Koexpression und Applikation von 1,0 mM, 0,001 mM bzw. 0,0003 mM ATP. Mittelwerte aus 4 bis 5 Messungen. Die Dauer der ATP-Applikationen ist markiert.

Der hP2X₇R-abhängige Strom weist eine stark ausgeprägte und annähernd linear ansteigende Stromkomponente auf, deren Ursprung nicht klar ist und die bei länger andauernder ATP-Applikation den Stromverlauf stark dominiert (Klapperstück et al., 2001). Diese Komponente könnte hP2X₄R-abhängige Ströme bei Koexpression überdecken. Deshalb wurden weitere Versuche mit einem N-terminal His-getagten hP2X₇R-Konstrukt durchgeführt, das eine weniger stark ausgeprägte lineare Stromkomponente aufweist (Klapperstück et al., 2001). Abb. 7 zeigt einen Beispielstrom isoliert exprimierter His-hP2X₇-Rezeptoren bei 0,1 mM ATP-Applikation für 12 s.

Bei den heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten His-hP2X₇-Rezeptoren ließen sich ebenso wie beim nicht his-getagten Konstrukt, insbesondere bei prolongierter ATP-Applikation,

Ergebnisse

eine exponentiell ansteigende und eine anschließend annähernd linear ansteigende Stromkomponente unterscheiden.

Beim His-getagten Konstrukt wies die linear ansteigende Komponente im Vergleich zum nicht His-getagten hP2X₇-Rezeptor eine geringere Steigung auf. Die exponentiell ansteigende Stromkomponente nahm dabei bei 6 s ATP-Applikation (gemessen 2,5 s nach Beginn der ATP-Applikation) etwa 84 % der Maximalstromamplitude ein, beim nicht His-getagten Konstrukt waren es dagegen nur 37 % der Maximalstromamplitude.

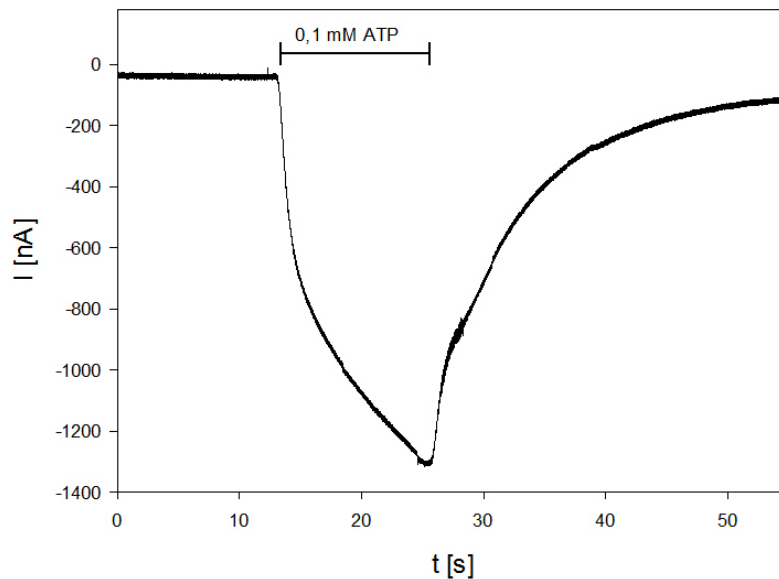


Abb. 7: Beispiel für einen N-terminal His-getagten hP2X₇R-abhängigen Ionenstrom. Die Dauer der ATP-Applikation ist markiert.

Wie die nicht His-getagte Variante zeigt auch der His-hP2X₇-Rezeptor keine Desensitivierung.

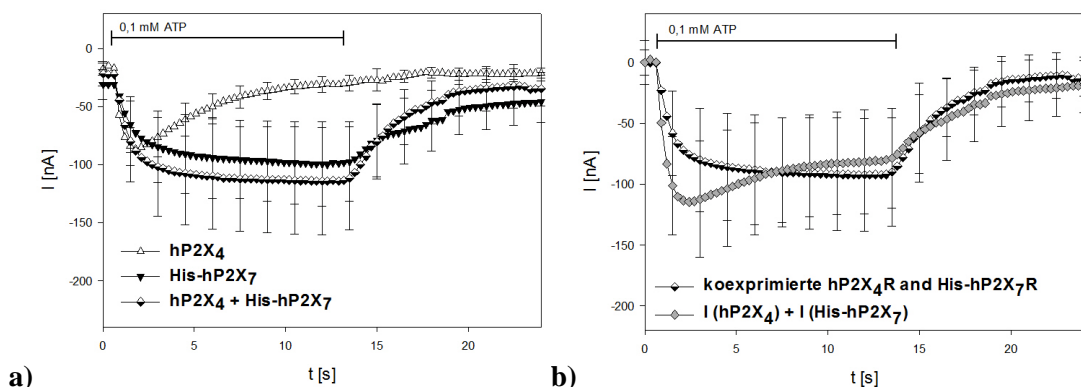


Abb. 8: Einfluss der Koexpression mit His-hP2X₇ auf den Zeitverlauf hP2X₄R-abhängiger Ströme. Applikation von 0,1 mM ATP für 12 s. a) Gemittelte Stromkurvenverläufe der isolierten und koexprimierten hP2X₄ und hP2X₇-Rezeptoren. b) Gemittelter Stromkurvenverlauf im Vergleich zum errechneten Stromkurvenverlauf bei Koexpression. Mittelwerte aus 4 – 6 Oozyten.

Ergebnisse

Obwohl sich eine Verringerung der P2X₄R-abhängigen Stroms dadurch andeutet, dass bei Koexpression der desensitivierende Stromanteil verschwindet, ergab der Vergleich des gemittelten Stromkurvenverlaufs bei Koexpression mit dem theoretischen mittels Addition errechneten Stromkurvenverlauf keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 8).

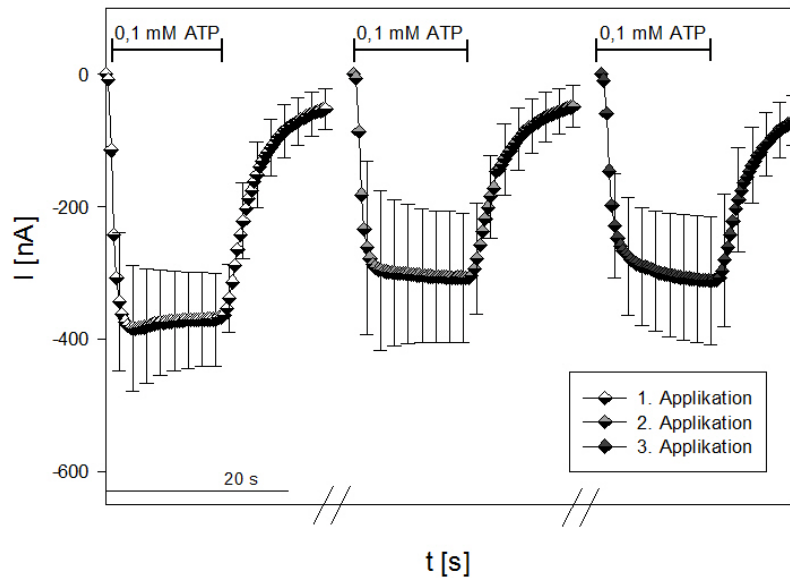


Abb. 9: Veränderung der koexprimierten hP2X₄R- und His-hP2X₇R-abhängigen Ströme bei wiederholter ATP-Applikation. Gemittelte Stromamplituden bei dreimalig hintereinander durchgeführter ATP-Applikation von 0,1 mM ATP. Die Zeit zwischen den ATP-Applikationen betrug 3 – 10 min. Die Dauer der ATP-Applikationen ist markiert. Mittelwerte aus n = 10 Oozyten.

Bei wiederholter Applikation von 0,1 mM ATP kam es bei Koexpression beider Rezeptoren zur signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Stromantwort auf etwa 60 – 75 %. Wie in Abb. 9 ersichtlich, wurde dabei insbesondere der Beginn des Stromkurvenverlaufs supprimiert. Während es bei der ersten Applikation z.T. noch zur Ausbildung eines angedeuteten Gipfelstroms kam, zeigten die Stromkurvenverläufe bei wiederholter ATP-Gabe diesen Gipfelstrom nicht.

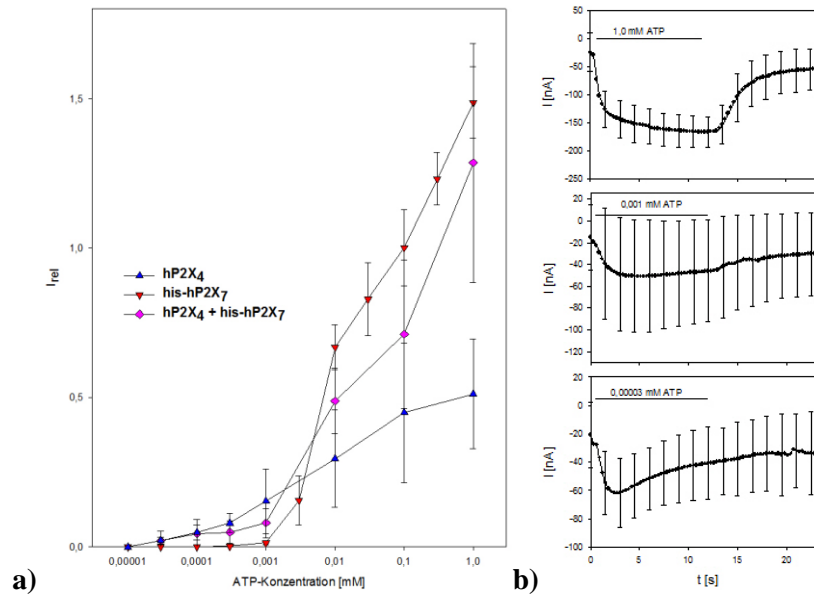


Abb. 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für koexprimierte hP2X₄- und his-hP2X₇-Rezeptoren. Abhängigkeit der maximalen Stromamplitude während der ATP-Applikation von der Agonistenkonzentration. a) Die Messungen in der angegebenen Konzentration wurden auf den maximalen Strom während der 1. Applikation von 0,1 mM ATP in Relation gesetzt. Dargestellt sind Werte der 2. ATP-Applikation. Zwischen den Messungen erfolgte eine Wartezeit von 3 – 10 min. Mittelwerte von 3 – 28 Messungen. b) Dargestellt sind die gemittelten Stromkurvenverläufe bei Koexpression und Applikation von 1,0 mM, 0,001 mM bzw. 0,00003 mM ATP. Mittelwerte von 3 bis 7 Messungen. Die Dauer der ATP-Applikationen ist markiert.

In der Konzentrations-Wirkungs-Kurve lag die Amplitude der ATP-induzierten Antwort bei Koexpression von hP2X₄ und his-hP2X₇ immer zwischen denen der isolierten hP2X₄R-Antwort und denen der isolierten his-hP2X₇R-Antwort.

Zudem kam es bei Koexpression des hP2X₄-Rezeptors mit dem His-hP2X₇-Rezeptor (wie bei Koexpression mit der nicht His-getagten Variante) insbesondere bei höheren ATP-Konzentrationen zu einem Stromkurvenverlauf, der dem isoliert exprimierter His-hP2X₇-Rezeptoren ähnelte. Es fand sich eine linear ansteigende Stromkomponente, die im Vergleich weniger stark als bei Expression mit dem nicht His-getagten hP2X₇-Rezeptors ansteigt. Auch hier bildete sich bei niedrigen ATP-Konzentrationen ein Gipfelstrom, ähnlich dem des hP2X₄R aus (s.Abb. 10b).

4.2 Agonisten und Antagonisten

In den folgenden Kapiteln wurden verschiedene Agonisten und Antagonisten und ihr Einfluss auf die Stromkurvenverläufe der isoliert exprimierten hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren untersucht und mit den Effekten bei Koexpression beider Kanäle verglichen. Änderungen des pharmakologischen Verhaltens durch die Koexpression und damit Hinweise auf eine mögliche Interaktion oder Bildung von heteromeren Rezeptoren sollten damit ermittelt werden.

Ergebnisse

4.2.1 Einfluss P2X₄R-spezifischer Modulatoren auf ATP-induzierter Stromkurvenverläufe isoliert und gemeinsam exprimierter hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren

Zunächst wurde der Einfluss der selektiv P2X₄R-modulierenden Substanzen Ivermectin und PSB-15417 auf isoliert exprimierte hP2X₄R- und hP2X₇R-abhängige Stromkurvenverläufe untersucht und mit dem bei Koexpression beider Subtypen verglichen.

a) Ivermectin

Abb. 11a) zeigt den Einfluss von Ivermectin auf den ATP-induzierten Stromkurvenverlauf des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors bei Applikation von 0,1 mM ATP.

Bei Zusatz von Ivermectin kam es zu einer signifikanten Potenzierung der maximalen Stromamplitude des hP2X₄-Rezeptors auf etwa das 1,9 fache. Zudem reduzierte sich unter der Ivermectingabe die Desensitivierungsrate des hP2X₄-Rezeptors von etwa 84 % auf etwa 53 % (n = 5; P = <0,001).

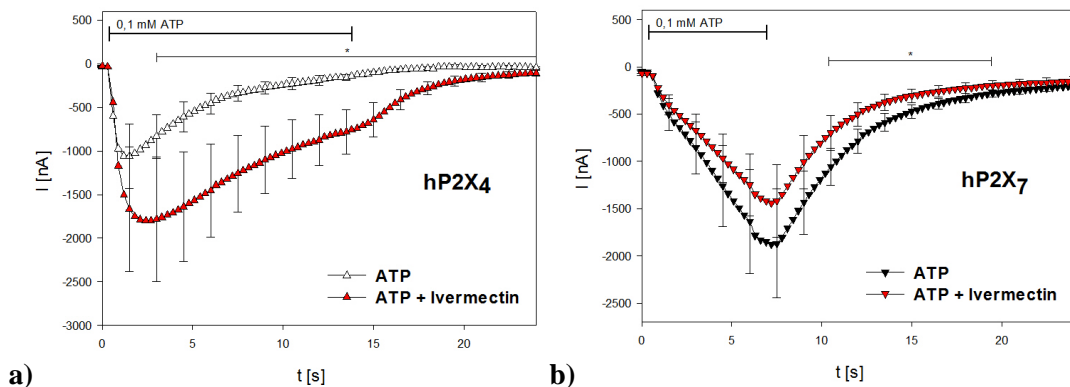


Abb. 11: Einfluss von Ivermectin auf den Zeitverlauf hP2X₄R- und hP2X₇R-abhängiger Ströme. Applikation von 0,1 mM ATP mit und ohne Zusatz von Ivermectin in einer Konzentration von 3 μ mol/l für 12 (hP2X₄) bzw. 6 (hP2X₇) s. a) Stromkurvenverläufe isoliert exprimierter hP2X₄-Rezeptoren. Mittelwerte aus Stromantworten von jeweils 5 Oozyten. b) Stromkurvenverläufe isoliert exprimierter hP2X₇-Rezeptoren. Mittelwerte aus Stromantworten von 3 – 6 Oozyten.

Bei isoliert exprimierten hP2X₇-Rezeptoren kam es dagegen nicht zu einer verstärkten ATP-Antwort. Der Vergleich der gemittelten ATP-induzierten Stromkurvenverläufe ergab dagegen während der Deaktivierungsphase (10,5 bis 19,5 s, also etwa 4 s nach Beendigung der ATP-Applikation) signifikant geringere Mittelwerte bei IVM-Zugabe (s. Abb. 11b).

Ergebnisse

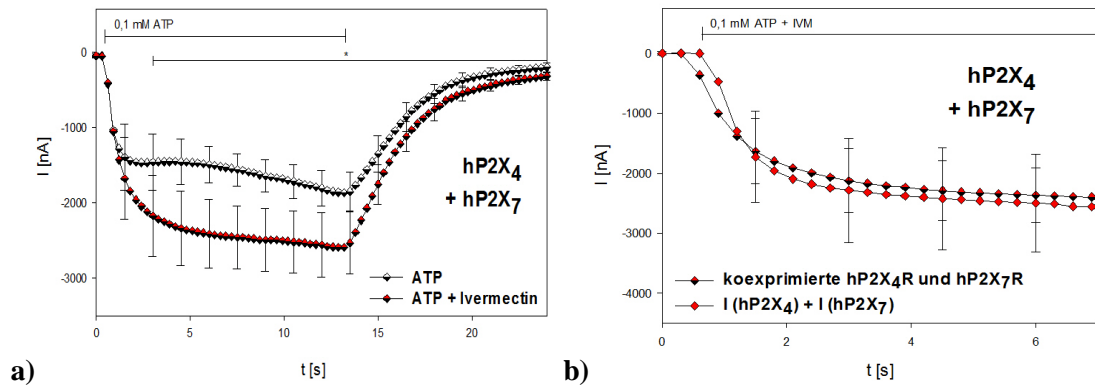


Abb. 12: Einfluss von extrazellulärem Ivermectin auf ATP-induzierte Ströme bei Koexpression von hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren. a) Vergleich der gemittelten Stromkurvenverläufe bei Applikation von 0,1 mM ATP mit und ohne Zugabe von Ivermectin in einer Konzentration von 3 μ mol/l. b) Vergleich des theoretischen Stromverlaufs bei Koexpression mit dem gemittelten tatsächlichen Stromverlauf bei Zugabe von Ivermectin. Mittelwerte aus Stromantworten von jeweils 5 Oozyten. Die Dauer der ATP-Applikation ist markiert.

Auch bei koexprimierten hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren führte der Zusatz von Ivermectin zur Potenzierung der ATP-induzierten Stromantwort auf das etwa 1,4fache. Dabei ergab der Vergleich des gemittelten Stromkurvenverlaufs bei Koexpression mit dem theoretisch (durch einfache Addition der hP2X₄ und hP2X₇-Ströme) zu erwartenden Stromkurvenverlaufs keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 12b).

Ergebnisse

b) PSB-15417

Bei PSB-15417 handelt es sich um einen neuen P2X₄R-selektiven Antagonisten. Er wurde von Frau Prof. C. Müller (Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

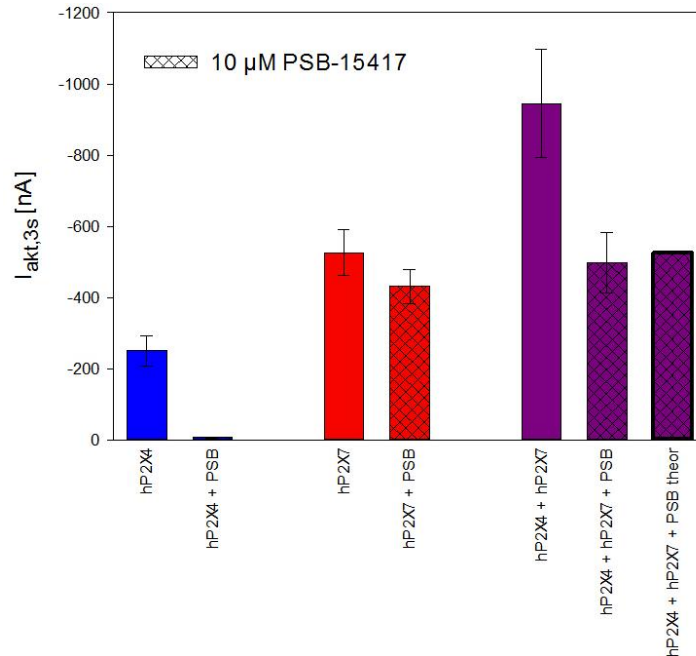


Abb. 13: Einfluss von PSB-15417 auf ATP-induzierte Ströme bei Koexpression von hP2X₄- mit hP2X₇-Rezeptoren. Messungen der Stromamplituden 3 s nach Applikation von 0,1 mM ATP. Die theoretischen Amplituden bei Koexpression wurden durch Addition der Stromantworten errechnet, die bei isoliert exprimierten hP2X₄R und hP2X₇R gemessen wurden. Mittelwerte von 4 – 11 Oozyten.

Die Ströme des hP2X₄R wurden durch die Gabe von PSB-15417 vollständig inhibiert. Die Ströme des hP2X₇R wurden durch die Zugabe von PSB-15417 um etwa 18 % reduziert. Bei Koexpression kam es durch die PSB-15417-Gabe wie erwartet ebenfalls zu einer Inhibierung der ATP-induzierten Stromantworten. Aus dem Vergleich der Stromamplituden der isoliert P2X₄R und P2X₇R exprimierenden Oozyten mit der mittleren Amplitude der P2X₄R und P2X₇R koexprimierenden Oozyten (jeweils erste ATP-Applikation) wurde ein Stromanteil des P2X₄R von 32 % berechnet. Bei angenommener Blockierung des P2X₄R-Anteils von 100 % und des P2X₇R-Anteils von 18 % wurde eine verbleibende Stromamplitude der koexprimierten P2X₄R/P2X₇R-Rezeptoren nach Zugabe von PSB-15417 von 55,5 % errechnet. Bezogen auf die absoluten Stromamplituden der koexprimierenden Oozyten vor Applikation von PSB-15417 ergab sich eine theoretische Stromamplitude von -542 nA („P2X₄ + P2X₇ + PSB theor“, s. Abb. 13), die nicht signifikant verschieden von der tatsächlich gemessenen Stromamplitude von -498 ± 84 nA („P2X₄ + P2X₇ + PSB“) war. D.h. der blockierende Effekt des P2X₄R-Blockers kann durch Blockierung des P2X₄R-Anteils bei Koexpression von P2X₄R und P2X₇R erklärt werden,

Ergebnisse

ohne dass ein neuer pharmakologischer Phänotyp eines putativen P2X₄R/P2X₇R Heteromers vermutet werden muss.

4.2.2 Einfluss P2X₇R-spezifischer Modulatoren auf ATP-induzierte Stromkurvenverläufe isoliert und gemeinsam exprimierter hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren

Es wurde der Einfluss der selektiv P2X₇R modulierenden Substanzen Bz-ATP, Mg²⁺, oATP und A-438079 auf isoliert exprimierte hP2X₄R- und hP2X₇R-abhängige Stromkurvenverläufe untersucht und mit dem bei Koexpression beider Subtypen verglichen.

a) Bz-ATP

Zunächst wurde die Stromantwort der isoliert exprimierten hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren auf 0,1 mM Bz-ATP gemessen und mit dem Stromkurvenverlauf bei Applikation von 0,1 mM ATP verglichen. Im Anschluss wurde untersucht, ob Koexpression beider Kanäle einen Einfluss auf die Bz-ATP-Wirkung hat.

Abb. 14a) zeigt die gemittelten Stromkurvenverläufe des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors. Bei Bz-ATP-Applikation ergab sich eine geringere Stromantwort als bei Applikation von ATP in der gleichen Konzentration.

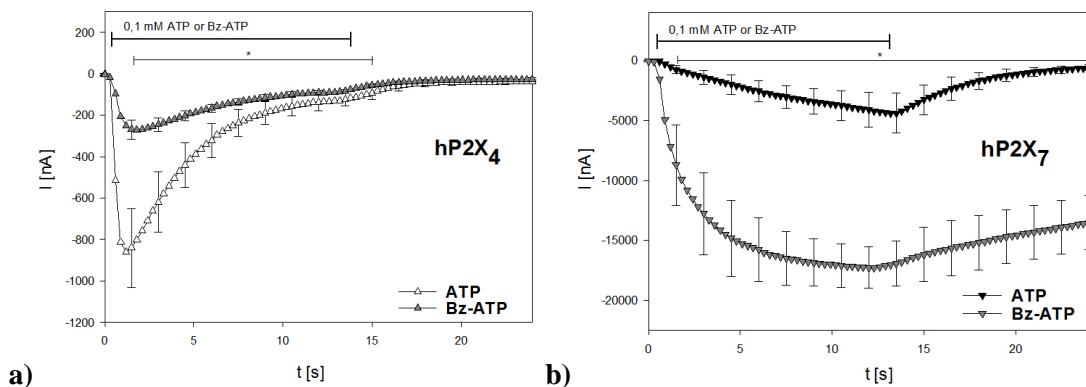


Abb. 14: Einfluss von Bz-ATP auf den Zeitverlauf ATP-induzierter hP2X₄R- und hP2X₇R-abhängiger Ströme. Applikation von 0,1 mM ATP bzw. 0,1 mM Bz-ATP für 12 s. a) Stromkurvenverläufe isoliert exprimierter hP2X₄-Rezeptoren. Mittelwerte von 5 - 6 Oozyten. b) Stromkurvenverläufe isoliert exprimierter hP2X₇-Rezeptoren. Mittelwerte von jeweils 5 Oozyten.

Beim isoliert exprimierten hP2X₇-Rezeptor kam es bei der Applikation von Bz-ATP im Vergleich zur ATP-induzierten Stromantwort zu einer etwa vervierfachen Stromamplitude mit verzögerter Deaktivierung.

Ergebnisse

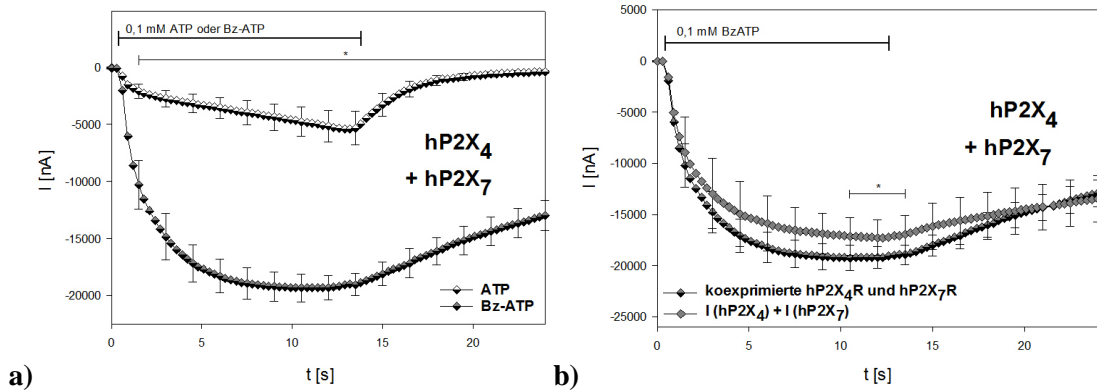


Abb. 15: Einfluss von Bz-ATP auf den Zeitverlauf ATP-induzierter Ströme bei Koexpression von hP2X₄- mit hP2X₇-Rezeptoren. a) Vergleich der gemittelten Stromkurvenverläufe bei Applikation von 0,1 mM ATP bzw. 0,1 mM Bz-ATP. b) Vergleich des theoretischen Stromverlaufs bei Koexpression mit dem gemittelten tatsächlichen Stromkurvenverlauf bei Applikation von 0,1 mM Bz-ATP. Mittelwerte von 5 – 6 Oozyten. Die Dauer der (Bz-)ATP-Applikationen ist markiert.

Bei Koexpression beider Rezeptoren kam es ebenfalls durch die Bz-ATP-Applikation zu einem signifikanten Anstieg der induzierten Stromantwort auf etwa das 4fache im Vergleich zur ATP-Gabe in der gleiche Konzentration (Abb. 15).

Der gemessene Stromverlauf entsprach dabei weitgehend dem errechneten theoretisch zu erwartenden Stromkurvenverlauf bei Addition der isolierten hP2X₄- und hP2X₇-abhängigen Ströme. Nur im Verlauf des späten Stromkurvenverlaufes wurde eine signifikante gering größere Stromamplitude gemessen, als durch reine Addition der Ströme zu erwarten wäre.

b) Mg²⁺-Ionen

Zunächst wurde der Einfluss von Mg²⁺ bei einer Konzentration von 1,5 mM auf die ATP-induzierte Stromantwort der isoliert exprimierten hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren gemessen. Dann wurde der Magnesiumeffekt bei Koexpression beider Rezeptoren untersucht.

Abb. 16 a) zeigt den Einfluss von 1,5 mM Mg²⁺ auf den ATP-induzierten Stromkurvenverlauf des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors bei Applikation von 1,0 mM ATP.

Die Zugabe von Mg²⁺ mit einer Konzentration von 1,5 mM führte zu keiner signifikanten Änderung der hP2X₄R-abhängigen ATP-induzierten Stromantwort.

Ergebnisse

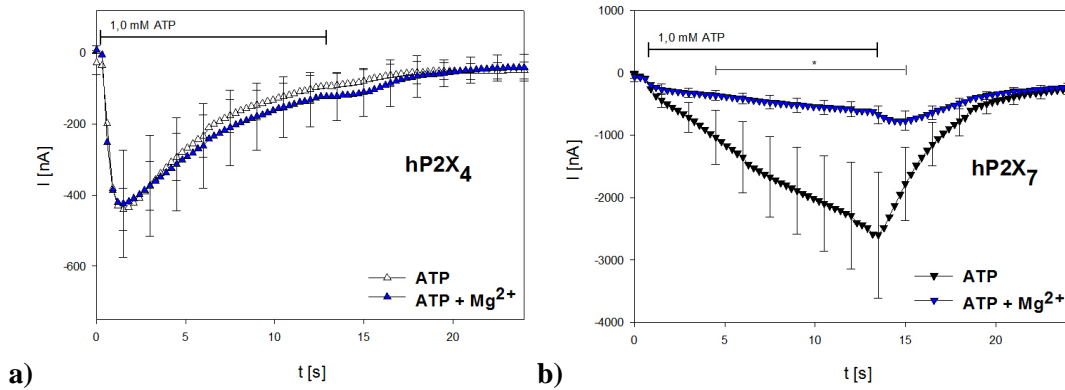


Abb. 16: Einfluss von Mg²⁺ auf den Zeitverlauf hP2X₄R- und hP2X₇R-abhängiger Ströme. Applikation von 1,0 mM ATP mit und ohne Zusatz von 1,5 mM Mg²⁺ für 12 s. a) Stromkurvenverläufe isoliert exprimierter hP2X₄-Rezeptoren. Mittelwerte aus Stromantworten von jeweils 6 Oozyten. b) Stromkurvenverläufe isoliert exprimierter hP2X₇-Rezeptoren. Mittelwerte aus Stromantworten von 4 – 5 Oozyten.

Beim isoliert exprimierten hP2X₇-Rezeptor dagegen führte der Zusatz von Mg²⁺ wie erwartet zu einer signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Stromantwort. Dabei reduzierte sich die Stromamplitude gemessen nach 12 s ATP-Applikation durch den Zusatz von 1,5 mM Mg²⁺ um etwa 76 %. Insgesamt wurde durch Mg²⁺ v.a. der späte, linear ansteigende Anteil der ATP-induzierten Stromantwort blockiert, der frühe, exponentiell ansteigende Stromanteil dagegen wurde weniger gehemmt. Wie in Abb. 16b) zu sehen, kam es unter Zusatz von Mg²⁺ nach Beendigung der ATP-Applikation zunächst zu einer weiteren Zunahme der Stromamplitude um durchschnittlich etwa 170 nA. Dabei wurde nach etwa 1,5 s ein „Peak“ erreicht, bevor die Stromkurvenamplitude im Rahmen der Deaktivierung wieder fiel. Die Ursache hierfür könnte sein, dass Mg²⁺ von seiner allosterischen Bindungsstelle bzw. der Bindungsstelle in der Kanalpore schneller abdissoziiert als ATP von der Agonistenbindungsstelle.

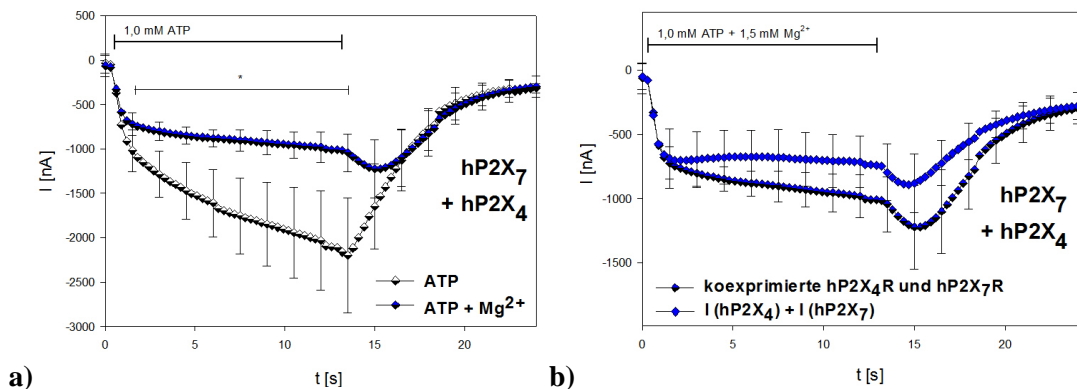


Abb. 17: Einfluss von extrazellulärem Mg²⁺ auf die ATP-induzierten Ströme bei Koexpression von hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren. a) Vergleich der gemittelten Stromkurvenverläufe bei Applikation von 1,0 mM ATP mit und ohne Zugabe von 1,5 mM Mg²⁺ für 12 s. b) Vergleich des theoretischen Stromkurvenverlaufs mit dem gemittelten tatsächlichen Stromverlauf bei Koexpression und Zugabe von 1,5 mM Mg²⁺. Mittelwert von 5 – 6 Oozyten.

Ergebnisse

Bei Koexpression beider Rezeptoren kam es zu einer signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Stromantwort durch die Magnesiumzugabe (Abb. 17a). Wie auch bei der Inhibierung des isoliert exprimierten hP2X₇-Rezeptors wurde dabei v.a. der linear ansteigende Stromanteil gehemmt. Nach Beendigung der ATP-Applikation kam es (wie ebenfalls beim isoliert exprimierten hP2X₇-Rezeptor unter Magnesiumzugabe beobachtet) zunächst zu einer raschen weiteren Zunahme der Stromamplitude, bevor die Amplitude im Rahmen der Deaktivierung wieder fiel.

Die unter der Magnesiumgabe beobachteten Veränderungen des Stromkurvenverlaufs bei Koexpression beider Rezeptoren können auf die alleinige Hemmung des hP2X₇-Rezeptors zurückgeführt werden. Wie in Abb. 17b) ersichtlich, ergab der Vergleich des gemittelten Stromkurvenverlaufes bei Koexpression mit dem theoretisch (durch einfache Addition der hP2X₄R- und hP2X₇R-abhängigen Ströme) zu erwartenden Stromkurvenverlaufes keinen signifikanten Unterschied.

c) oATP

Zunächst wurde der Einfluss von oATP auf die ATP-induzierte Stromantwort der isoliert exprimierten hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren gemessen. Danach wurde der oATP-Effekt bei Koexpression beider Rezeptoren untersucht.

Abb. 18a) zeigt den Einfluss der vorherigen mehrstündigen Inkubation der Oozyten in oATP auf den ATP-induzierten Stromkurvenverlauf des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors.

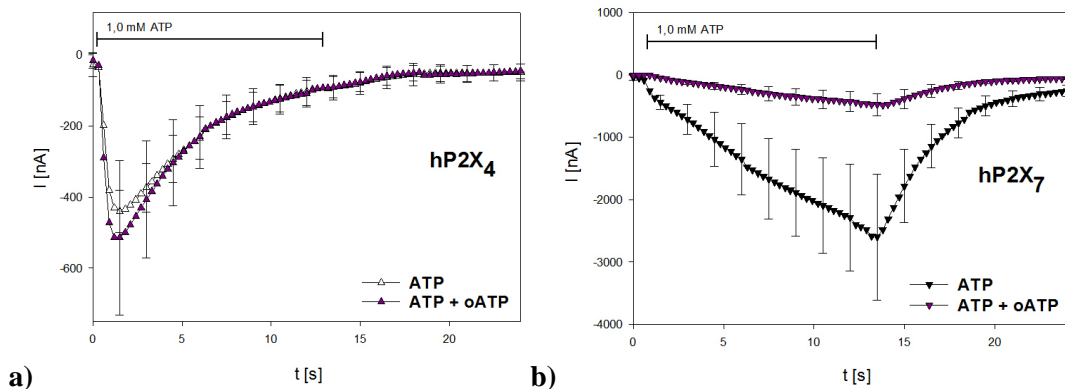


Abb. 18: Einfluss von oATP auf den Zeitverlauf ATP-induzierter hP2X₄R- und hP2X₇R-abhängiger Ströme. Applikation von 1,0 mM ATP für 12 s mit und ohne vorherige Inkubation in 0,3 mM oATP. a) Stromkurvenverläufe isoliert exprimierter hP2X₄-Rezeptoren. Mittelwerte aus Stromantworten von jeweils 6 Oozyten. b) Stromkurvenverläufe isoliert exprimierter hP2X₇-Rezeptoren. Mittelwerte aus Stromantworten von jeweils 4 Oozyten.

Die vorherige Inkubation in oATP führte zu keiner signifikanten Änderung der ATP-induzierten Stromantwort des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors.

Ergebnisse

Beim isoliert exprimierten hP2X₇-Rezeptor dagegen führte die vorherige Inkubation in oATP zu einer signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Stromantworten. Dabei wurde die Stromamplitude I_{act} bei einer Applikation von 1,0 mM ATP um über 60 % gehemmt (s. Abb. 18b).

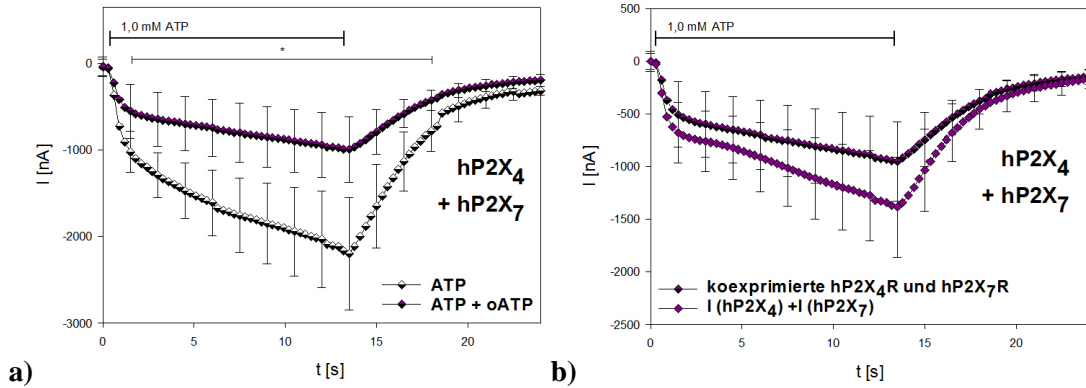


Abb. 19: Einfluss von oATP auf ATP-induzierte Ströme bei Koexpression von hP2X₄- mit hP2X₇-Rezeptoren. a) Vergleich der gemittelten Stromkurvenverläufe bei Applikation von 1,0 mM ATP mit und ohne vorherige Inkubation in 0,3 mM oATP. b) Vergleich des theoretischen Stromverlaufs bei Koexpression mit dem gemittelten tatsächlichen Stromkurvenverlauf bei vorheriger Inkubation in oATP b). Mittelwerte aus Stromantworten von jeweils 4 Oozyten. Die Dauer der ATP-Applikationen ist markiert.

Bei Koexpression beider Rezeptoren kam es durch die vorherige Inkubation in oATP ebenfalls zu einer signifikanten Änderung der Stromantwort. I_{act} reduzierte sich dabei um etwa 60 %. Der Vergleich der gemittelten Stromkurvenverläufe bei koexprimierter hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren mit den theoretischen Stromkurvenverläufen der Addition der hP2X₄R- und hP2X₇R-abhängigen Stromkomponenten zeigte keine signifikanten Unterschiede des Effekts von oATP. D.h. der Effekt von oATP bei Koexpression von hP2X₄R und hP2X₇R kann durch einfache Hemmung der hP2X₇R-Komponente erklärt werden.

d) A438079

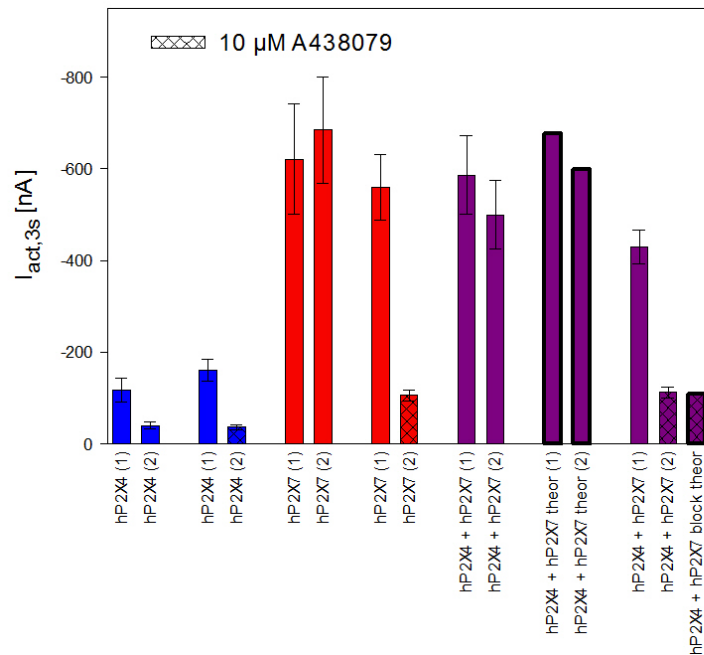


Abb. 20: Einfluss von A438079 auf ATP-induzierte Ströme bei Koexpression von hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren. Messungen der Stromamplituden 3 s nach Applikation von 0,1 mM ATP. Die Injektion der entsprechenden cRNAs für hP2X₄R und/oder hP2X₇R sind auf der Abzisse angegeben. (1) und (2) bezeichnen die erste bzw. die 3 min spätere zweite ATP-Applikation. Die theoretischen Amplituden bei Koexpression („hP2X₄ + hP2X₇ theor“) wurden durch Addition der bei isoliert exprimierten hP2X₄R und hP2X₇R ermittelten Stromantworten errechnet. Mittelwerte aus Stromantworten von 4 – 11 Oozyten. Weitere Erklärungen s. Text.

Wie in Abb. 20 ersichtlich, führte der Zusatz von 10 µM A438079 zu einer signifikanten Reduktion der hP2X₇R-abhängigen Rezeptorströme auf durchschnittlich 19 %. Bei den isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptoren dagegen kam es zu keiner signifikanten Änderung der Stromamplituden durch die Applikation von A438079. Die Verringerung der hP2X₄R-abhängigen Stromamplitude bei der 2. ATP-Applikation („hP2X₄ (2)“) kam durch die bereits beschriebene Desensitivierung zustande. Sie betrug im Mittel 72 % der Amplitude der 1. Applikation. Die hP2X₇R-abhängigen Ströme („hP2X₇ (2)“) zeigten, wie bereits vorher beschrieben, keine solche Desensitivierung. Die theoretischen Amplituden der ATP-induzierten Ströme der 1. und 2. Applikation bei hP2X₄R/hP2X₇R-Koexpression („hP2X₄ + hP2X₇ theor (1) bzw. (2)“) wurden durch Addition der Amplituden der hP2X₄R- bzw. hP2X₇R-vermittelten Ströme bei isolierter Expression berechnet und waren nicht signifikant von den gemessenen Werten („hP2X₄ + hP2X₇ (1) bzw. (2)“) verschieden.

Um den theoretisch zu erwartenden Blockierungseffekt von A438079 zu berechnen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Es wurde angenommen, dass sich der ATP-induzierte Strom bei Koexpression aus Stromanteilen von homomeren hP2X₄R und hP2X₇R ergibt, also keine Heteromerisierung auftritt.

Ergebnisse

Zuerst wurde bei den koexprimierten hP2X₄R/hP2X₇R für die Stromamplitude der ersten ATP-Applikation vor Blockerzugabe (13. Säule in Abb. 20 „hP2X₄ + hP2X₇(1)“) der Anteil des hP2X₄R-abhängigen Stroms (hP2X₄R_{abs}) aus dem desensitivierenden Stromanteil bei der 2. ATP-Applikation berechnet (Werte der 10. Säule („hP2X₄ + hP2X₇ (2)“ minus Werte der 9. Säule („hP2X₄ + hP2X₇ (1)“)). Unter der Annahme, dass der hP2X₄R unverändert eine Desensitivierungsrate von 72 % aufweist, ergab sich ein P2X₄R-Anteil von 20 % (hP2X₄R_{abs}/0,72). Der zu erwartende Strom bei Applikation des nur auf hP2X₇R wirkenden A438079 wurde dann als Summe aus dem zu 72 % desensitivierten Anteil hP2X₄R- und dem zu 81 % blockierten P2X₇R-Anteil errechnet („hP2X₄ + hP2X₇ block theor“) Dieser Wert ist nicht signifikant verschieden von der gemessenen Stromamplitude der koexprimierten hP2X₄R/hP2X₇R unter Blockerzugabe („hP2X₄ + hP2X₇ (2)“, Säule 14). Das bedeutet, der blockierende Effekt von A438079 kann durch dessen Wirkung auf die unabhängig von hP2X₄R exprimierten hP2X₇R Homomere erklärt werden.

4.3 Einfluss von hP2X₇-Rezeptormutanten auf hP2X₄R-abhängige Ströme

Nachfolgend wurden die ATP-induzierten Ströme verschiedener trunkierter oder punktmutierter hP2X₇-Rezeptoren untersucht und der Einfluss auf koexprimierte hP2X₄-Rezeptoren analysiert.

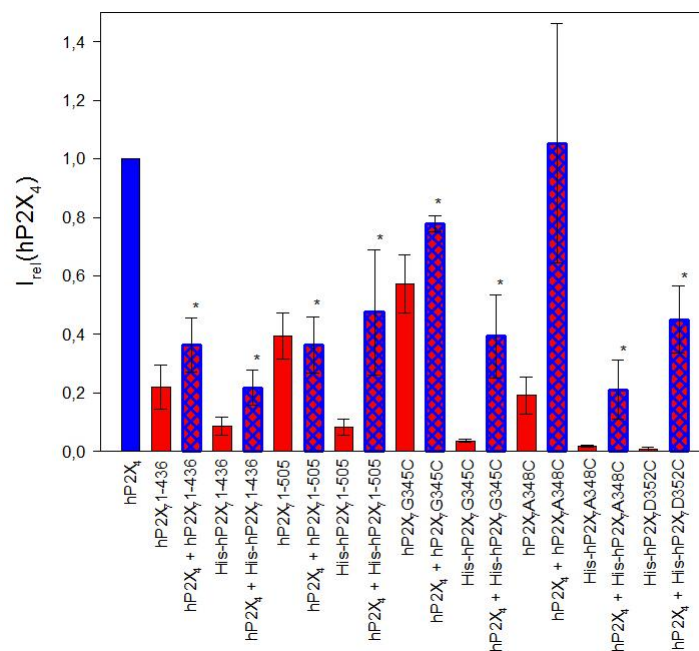


Abb. 21: Vergleich der ATP-induzierten Stromamplitude des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors mit denen der isoliert und koexprimierten hP2X₇-Rezeptormutanten. Messungen der ATP-induzierten Ströme nach Applikation von 0,1 mM ATP. Die Gipfelstromamplituden bzw. Stromamplituden bei 1,6 s wurden auf die Gipfelstromamplitude des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors normiert. Mittelwerte aus 5 – 24 Oozyten.

Ergebnisse

Die untersuchten trunktierten oder in der zweiten Transmembrandomäne punktmultierten hP2X₇-Rezeptoren zeigten bei isolierter Expression nur sehr kleine ATP-induzierte Stromantworten. Die Koexpression der einzelnen hP2X₇-Rezeptormutanten mit dem hP2X₄-Rezeptor führte (mit Ausnahme bei koexprimierten hP2X₇^{A348C}R) zur signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Ströme im Vergleich zur isolierten hP2X₄R-Expression.

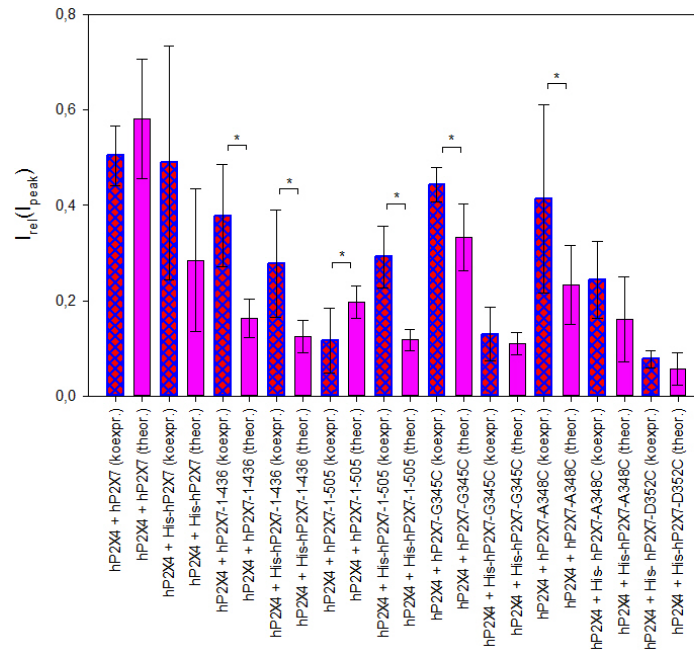


Abb. 22: Einfluss der Koexpression mit hP2X₇-Rezeptoren oder -Rezeptormutanten auf die Desensitivierung ATP-induzierter hP2X₄-Rezeptorströme. Messungen der ATP-induzierten Ströme nach Applikation von 0,1 mM ATP. Die gemittelten und theoretisch bei unabhängiger Koexpression zu erwartenden Stromamplituden wurden auf die Gipfelstromamplituden bzw. bei fehlender Gipfelstromamplitude auf $I_{\text{mean}}(t = 1,6 \text{ s})$ normiert. Dargestellt sind die normierten Stromamplituden zum Ende der ATP-Gabe ($t = 12 \text{ s}$) als Maß für die Desensitivierung. Mittelwerte aus 3 - 16 Oozyten.

Es zeigten sich durch die Koexpression z.T. außerdem signifikant veränderte Desensitivierungsraten, welche nicht einfach durch die Koexpression zweier isolierter homomeren Rezeptorsubtypen zu erklären wäre (s. Abb. 22). Meist führte die Koexpression dabei zu einer verminderten Desensitivierung, nur bei Koexpression mit dem hP2X₇¹⁻⁵⁰⁵R kam es durch die Koexpression zu einer verstärkten Rezeptordesensitivierung. Die Desensitivierungskinetik wurde jedoch nicht durch alle untersuchten koexprimierten hP2X₇R-Mutanten signifikant verändert. Die Koexpression mit den His-hP2X₇^{G345C}-, His-hP2X₇^{A348C}- oder His-hP2X₇^{D352C}-Rezeptoren führte zu keiner signifikanten Reduktion der Desensitivierungsrate, ebenso wie die Koexpression mit dem (His-)hP2X₇-Wildtyprezeptor.

Nachfolgend wurde exemplarisch der Einfluss des hP2X₇¹⁻⁴³⁶R, bei dem es durch die Koexpression zu einer deutlichen Änderung des hP2X₄R-vermittelten Stromkurvenverlaufes kam

Ergebnisse

und der Einfluss des hP2X₇^{D352C}R, bei dem die Kinetik des koexprimierten hP2X₄R-vermittelten Stromkurvenverlaufs nicht verändert wurde, genauer untersucht.

4.3.1 Einfluss von hP2X₇¹⁻⁴³⁶-Rezeptoren auf hP2X₄R-abhängige Ströme

Beim hP2X₇¹⁻⁴³⁶-Rezeptor handelt es sich um eine trunkierte, am intrazellulären C-Terminus um 159 Aminosäuren gekürzte Rezeptorvariante. Diese trunkierten P2X₇-Untereinheiten sind in der Lage, Homotrimere zu bilden. Sie vermitteln im Vergleich zum Vollängen-Rezeptors aber nur etwa 5 % der ATP-induzierten Stromantwort (Becker et al., 2008).

Wie erwartet, zeigten die isoliert exprimierten trunkierten hP2X₇¹⁻⁴³⁶-Rezeptoren bei heterologer Expression nur sehr kleine ATP-induzierte Stromamplituden, wobei es bei diesen Rezeptormutanten, wie bei den Vollängen-hP2X₇-Rezeptoren, zu keiner Rezeptordesensitivierung während der ATP-Applikation kam. Die linear ansteigende ATP-induzierten Stromantwort ist im Vergleich zum Vollängenklon deutlich reduziert.

Bei Koexpression des hP2X₄- mit diesem trunkierten hP2X₇-Rezeptor kam es zu signifikant reduzierten Stromamplituden bei ATP-Applikation im Vergleich zur Stromantwort des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors ($36 \pm 9\%$) (s.Abb. 23a).

Zudem zeigten sich Stromkurvenverläufe, die denen der trunkierten Rezeptorvariante ähnelten. Dabei reduzierte sich bei Koexpression insbesondere die Desensitivierungsrate im Vergleich zum isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptor (I_{Inactrel} 5.6 % bei Koexpression vs. 80.1 % bei isoliert exprimierten hP2X₄R).

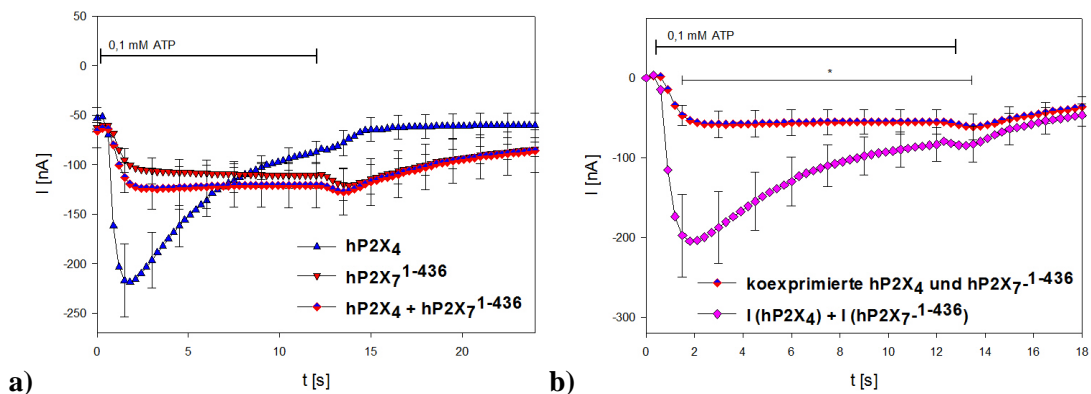


Abb. 23: Einfluss der Koexpression von hP2X₄- und hP2X₇¹⁻⁴³⁶-Rezeptoren auf den Zeitverlauf ATP-abhängiger Ströme. Messungen der ATP-induzierten Ströme nach Applikation von 0,1 mM ATP für 12 s. a) Stromkurvenverläufe isolierter und koexprimierter hP2X₄ und hP2X₇¹⁻⁴³⁶-Rezeptoren. Mittelwerte aus Stromantworten von jeweils 12 Oozyten. b) Vergleich des theoretischen Stromverlaufs bei unabhängiger Koexpression mit dem gemittelten tatsächlichen Stromkurvenverlauf. Mittelwerte aus Stromantworten von jeweils 12 Oozyten.

Ergebnisse

Auch der Vergleich des gemittelten Stromkurvenverlaufs mit dem theoretisch (bei fehlender Interaktion) zu erwartenden Stromverlaufs zeigte sowohl die signifikante Amplitudenreduktion, als auch die deutliche Minderung der Desensitivierung durch die Koexpression (s. Abb. 23b).

4.3.2 Einfluss von His-hP2X₇^{D352C}-Rezeptoren auf hP2X₄R-abhängige Ströme

Diese Rezeptormutante zeigte in Ganzzellstrommessungen eine fast vernachlässigbar kleine ATP-induzierte Stromantwort (siehe Abb. 24a).

Die Koexpression mit dem hP2X₄R führte zur signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Stromantwort mit im Vergleich zum isoliert exprimierten hP2X₄R auf 45 % verminderte Amplituden. Anders als bei Koexpression z.B. mit den hP2X₇¹⁻⁴³⁶-Rezeptoren, zeigte sich im Vergleich des gemittelten Stromkurvenverlaufs mit dem theoretisch bei unabhängiger Expression beider Rezeptoren zu erwartenden Stromkurvenverlaufs keine signifikante Veränderung der Desensitivierungskinetik (s. Abb. 22).

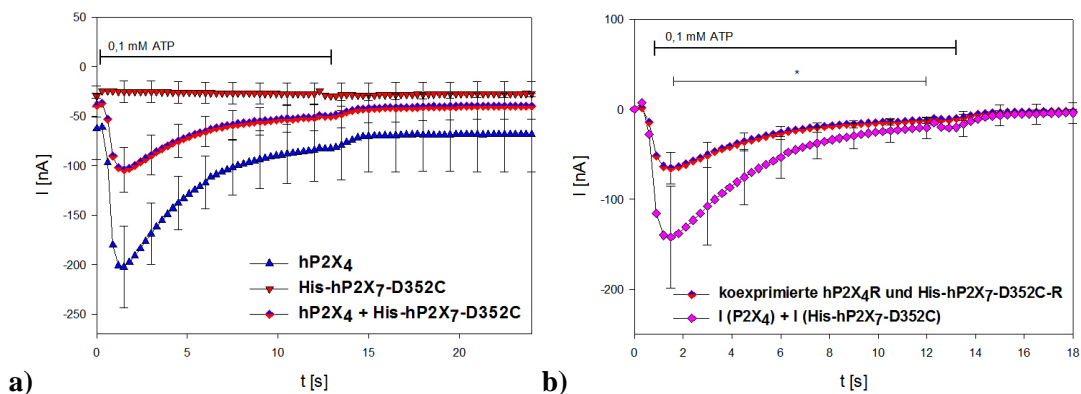


Abb. 24: Einfluss der Koexpression von hP2X₄- und His-hP2X₇^{D352C}-Rezeptoren auf den Zeitverlauf ATP-abhängiger Ströme. Messungen der ATP-induzierten Ströme nach Applikation von 0,1 mM ATP für 12 s. a) Stromkurvenverläufe isolierter und koexprimierter hP2X₄ und His-hP2X₇^{D352C}-Rezeptoren. Mittelwerte aus Stromantworten von 11 - 12 Oozyten. b) Vergleich des theoretischen Stromverlaufs bei unabhängiger Koexpression mit dem gemittelten tatsächlichen Stromkurvenverlauf. Mittelwerte aus Stromantworten von jeweils 12 Oozyten.

4.4 Einfluss anderer Kanalproteine auf hP2X₄R-abhängige Ströme

Nachfolgend wurde der Einfluss von humanen Pannexin-1-Kanälen und der GFP-markierten humanen Glycin- α_1 -Rezeptoruntereinheit auf die ATP-induzierten Stromkurvenverläufe koexprimierter hP2X₄-Rezeptoren untersucht.

Ergebnisse

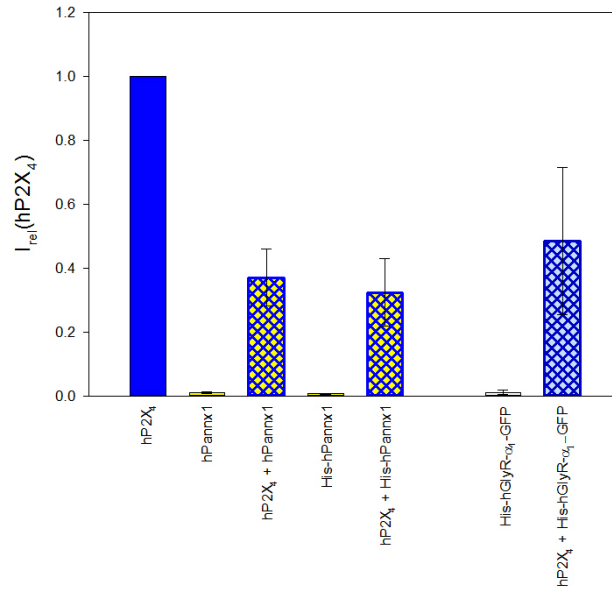


Abb. 25: Vergleich der ATP-induzierten Stromamplitude des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors mit denen der isoliert und koexprimierten Pannexin-Kanäle und der GFP-markierten humanen Glycin- α_1 -Rezeptoruntereinheit. Messungen der ATP-induzierten Ströme nach Applikation von 0,1 mM ATP. Die Gipfelstromamplituden bzw. Stromamplituden bei 1,6 s wurden auf die Gipfelstromamplitude des isoliert exprimierten hP2X₄-Rezeptors normiert. Mittelwerte aus 5 – 24 Oozyten.

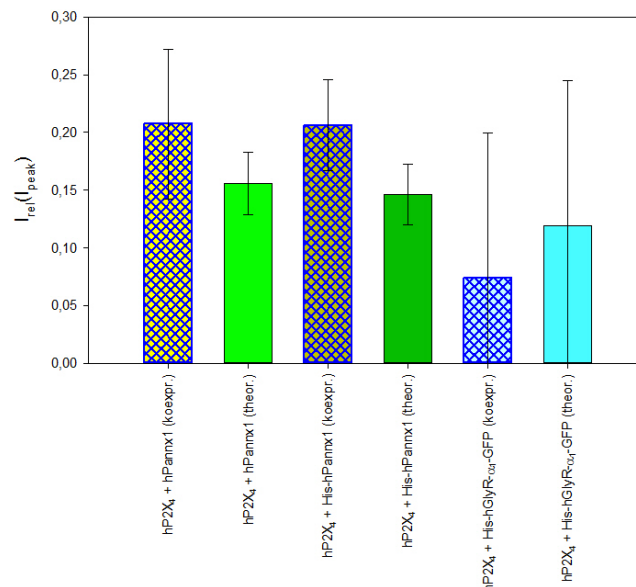


Abb. 26: Einfluss der Koexpression mit Pannexin-Kanälen bzw. hGly- α_1 -GFP-Rezeptoren auf die Desensitivierung ATP-induzierter hP2X₄-Rezeptorströme.

Messungen der ATP-induzierten Ströme nach Applikation von 0,1 mM ATP für 12 s. Die gemittelten und theoretisch bei unabhängiger Koexpression zu erwartenden Stromamplituden wurden auf die Gipfelstromamplituden normiert. Dargestellt sind die normierten Stromamplituden zum Ende der ATP-Gabe ($t = 12$ s) als Maß für die Desensitivierungskinetik. Mittelwerte aus 3 - 12 Oozyten.

Die Pannexine zeigten bei heterologer isolierter Expression in *Xenopus laevis* Oozyten keine ATP-induzierten Stromamplituden in Ganzzellstrommessungen (s.Abb. 25).

Ergebnisse

Die Koexpression mit den hP2X₄-Rezeptoren führte zur signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Gipfelstromamplitude im Vergleich der isoliert exprimierten hP2X₄Rezeptoren (s.Abb.25). Dabei wurde die Desensitivierungsrate durch die Koexpression nicht verändert (s.Abb. 26).

Auch bei heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten Glycinrezeptoren (His-hGly- α_1 -GFP-Rezeptoren) kam es zu vernachlässigbaren ATP-induzierten Stromantworten. Bei Koexpression mit den hP2X₄Rezeptoren kam es zur signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Stromamplituden auf etwa 48 % im Vergleich zu den Amplituden isoliert exprimierter hP2X₄-Rezeptoren. Dabei wurde die Desensitivierung durch die Koexpression nicht verändert (s.Abb. 26).

5 Diskussion

Wie viele ionotrope Rezeptoren, können auch die P2X-Rezeptoren Hetero-Oligomere, d.h. Trimere aus unterschiedlichen Untereinheiten ausbilden (Torres et al., 1999; Nicke, 2008; Saul et al., 2013).

Ob auch die hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren funktionelle Heteromere bilden, ist bisher nicht abschließend geklärt und wird kontrovers diskutiert. Tatsächlich werden beide Rezeptoruntereinheiten in einigen Zellen (u.a. Immunzellen, aber auch Epithelzellen) endogen koexprimiert, zudem haben beide Rezeptoren überlappende Aufgabenbereiche, insbesondere in der Immunmodulation, außerdem der Entwicklung neuropathischer und inflammatorischer Schmerzen (Nicke, 2008; Boumechache et al., 2009; Kawano et al., 2012a; Kawano et al., 2012b; Sakaki et al., 2013). Dabei modulieren sich beide Rezeptoren z.T. gegenseitig in der Funktion. Ein zugrunde liegender Mechanismus scheint dabei der nach ATP-induzierter Öffnung hervorgerufene rasche Kalziumeinstrom des P2X₄-Rezeptors zu sein, der einige P2X₇R-vermittelte Funktionen positiv beeinflusst (Kawano und Hiraoka, 1991; Kawano et al., 2012a; Sakaki et al., 2013).

In makrophagenähnlichen RAW 264.7 Zellen der Maus führt die Suppression des P2X₄R zur verminderten P2X₇R-vermittelten LDH-, IL-1 β - und HMBG1- (High-mobility-group box 1 Protein, ein endogenes Gefahrensignal) Ausschüttung, zudem zur vermehrten ROS-Produktion und Autophagie (Kawano et al., 2012a; Kawano et al., 2012b). Auch in dendritischen Zellen aus Knochenmark der Maus führt die P2X₄R-Suppression zu verminderter IL-1 β -Ausschüttung und auch die IL-18 Ausschüttung wird reduziert (Sakaki et al., 2013). In Endothelzellen sind P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren gemeinsam an der endothelialen Dysfunktion mit inflammatorischen Reaktionen beteiligt, welche durch metabolischen Stress induziert wird. In Endothelzell-Kulturen kommt es bei hohen Glukose- und Palmitat-Konzentrationen zur Hochregulation beider Rezeptoren und einer Vielzahl proinflammatorischer Gene, wobei die Hochregulation der proinflammatorischen Gene (u.a. für IL-1 β , IL-6) sowohl bei P2X₇R, als auch bei P2X₄R-Knockdown signifikant reduziert ist. Beide Rezeptoren scheinen direkt für die erhöhte IL-6 Ausschüttung und für die erhöhte Endothelzellpermeabilität verantwortlich zu sein (Sathanoori et al., 2015).

Neben den beschriebenen eng miteinander verzahnten Effekten, insbesondere in Entzündungsvorgängen, scheinen beide Rezeptortypen zudem miteinander verwandt zu sein. Das für den hP2X₄-Rezeptor kodierende Gen auf dem Chromosom 12 liegt nur 23 bis 130 Kilobasenpaare von der Kodierungssequenz des hP2X₇-Rezeptors entfernt (Garcia-Guzman et al., 1997). Auch die Lage im Bereich einer Repetitionssequenz und die unter den Untereinheiten bestehende größte Übereinstimmung in der Aminosäure-Sequenz (48,6% verglichen mit 41%-45% Übereinstimmung zwischen den anderen Subtypen) legen eine enge Verwandtschaft der

Diskussion

beiden Untereinheiten nahe. Die Entstehung der beiden Rezeptoren durch Genduplikation wird diskutiert (Buell et al., 1998; North, 2002; Wiley et al., 2011).

Vom P2X₄-Rezeptor wird bereits länger angenommen, dass er Heterooligomere mit anderen Untereinheiten (u.a. der P2X₆- und der P2X₁-Untereinheit) ausbilden kann, zumal native Rezeptoren mit funktionellen Eigenschaften, die denen heterolog exprimierter homomeren P2X₄-Rezeptoren ähneln, selten sind (Nicke et al., 2005).

Bei heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimierten rP2X₄- und rP2X₁-Rezeptoren fanden sich ATP-induzierte Ströme mit veränderten Eigenschaften. Dabei zeigten sich in Ganzzellstrommessungen langsam desensitivierende Stromkurvenverläufe, die durch geringe Konzentrationen von α,β -meATP aktiviert, außerdem durch geringe Konzentrationen der Antagonisten Suramin und TNP-ATP inhibiert wurden (Nicke et al., 2005). Auch bei Koexpression mit dem rP2X₆, der isoliert exprimiert keine homomeren Rezeptoren ausbilden kann (Torres et al., 1999), fand sich in *Xenopus laevis* Oozyten ein neuer pharmakologischer Phänotyp ionotroper ATP-Rezeptoren. Dabei zeigten sich in Ganzzellstrommessungen Ströme, die durch niedrige mikromolare Konzentrationen von α,β -meATP aktiviert und sowohl durch Suramin, als auch durch RB2 blockiert werden (Lê et al., 1998). Zudem zeigten Kopurifikationsstudien mit anschließender BN-PAGE und SDS-PAGE-Analyse, dass diese Untereinheiten strukturell miteinander assoziiert sind (Lê et al., 1998; Nicke et al., 2005).

Auch mit dem P2X₅-Subtyp scheint eine Interaktion des P2X₄-Rezeptors möglich. Zum Einen zeigten Koimmunopräzipitationsstudien eine strukturelle Interaktion zwischen diesen Subtypen, zum Anderen führte die Koexpression des rP2X₄ mit einer transportdefizienten rP2X₅-Mutante (P2X₅^{K352A}) zur Expression von P2X₅-Untereinheiten auf der Zelloberfläche. Ob es auch hierbei zu einer funktionellen Interaktion zwischen den Untereinheiten kam, wurde in dieser Studie jedoch nicht genauer untersucht (Compan et al., 2012).

Nachdem in Koimmunopräzipitationsstudien in HEK-293-Zellen keine strukturelle Interaktion zwischen dieser und anderen P2X-Untereinheiten nachgewiesen wurde, nahm man dagegen lange an, dass der P2X₇-Rezeptor als einziger der P2X-Subtypen keine Heteromere ausbilden kann (Torres et al., 1999). Allerdings fanden sich folgende endogen exprimierte P2X-Rezeptoren, die typische Eigenschaften sowohl des P2X₇- als auch des P2X₄-Rezeptors besitzen, die nicht allein durch die Ausbildung homomerer Rezeptoren erklärt werden könnten:

Endogen in Zilienzellen des Respirationssystems von Kaninchen exprimierte Rezeptoren (P2X_{cilia}) bildeten in Ganzzellmessungen ATP-induzierte Ströme aus, die wie beim P2X₇-Rezeptor beschrieben, nur eine geringe ATP-Affinität, eine im Vergleich zu ATP größere Bz-ATP-Sensitivität aufwiesen und zudem durch extrazelluläre divalente Kationen und Na⁺ moduliert wurden. Die Bz-ATP-induzierten Ströme konnten außerdem durch hohe Konzentrationen von BBG und KN62 (bekannte P2X₇R-Antagonisten) inhibiert werden. Neben

Diskussion

diesen für den P2X₇-Rezeptor typischen Eigenschaften, wurden diese Rezeptorströme allerdings wie für den P2X₄R beschrieben durch extrazelluläre Zn²⁺-Ionen verstärkt (beim P2X₇R dagegen wirken Zn²⁺-Ionen inhibierend) und durch die Ivermectingabe potenziert (Ma et al., 2006). Dabei bildete sich in respiratorischem Epithel von Kaninchen bei Zusatz von P2X₄R-Antikörpern eine Immunreaktion aus, wohingegen sich bei Zugabe von zwei verschiedenen P2X₇R-Antikörpern keine Reaktionen zeigten (Ma et al., 2006). Es wurde geschlussfolgert, dass es sich bei den beschriebenen P2X_{cilia}-Rezeptoren entweder um unübliche Varianten des P2X₄-Rezeptors oder um heterooligomere Rezeptoren, bestehend aus P2X₄- und P2X₇-Untereinheiten, handeln müsse (Ma et al., 2006).

Auch in Azinuszellen der Gl. parotis von Mäusen fanden sich ATP-induzierte Ströme, die weder von heterolog exprimierten homomeren mP2X₄- noch von mP2X₇-Rezeptoren reproduziert werden konnten. In Ganzzellstrommessungen in Na⁺-freien (TEA⁺)-Lösungen wurden ATP-induzierte Stromkurvenverläufe mit Gipfelstromverhalten gefunden, die bei heterolog in HEK-293 Zellen exprimierten P2X₇-Rezeptoren nur durch die Koexpression mit P2X₄-Rezeptoren imitiert wurden, denn P2X₇-abhängige Ströme zeigen meist kein desensitivierendes Gipfelstromverhalten und der isoliert exprimierte P2X₄-Rezeptor bildet in natriumfreien TEA⁺-Lösungen selber keine ATP-induzierten Ströme aus. Bei Koexpression beider Rezeptoren kam es zudem zu einer signifikant reduzierten Ethidumbromidaufnahme und zu fehlender Potenzierung der ATP-induzierten Ströme durch Ivermectin (Casas-Pruneda et al., 2009). Es wurde geschlussfolgert, dass es sowohl bei endogen exprimierten, als auch bei heterolog in HEK-293 Zellen zur Bildung heteromere P2X_{4/7}-Rezeptoren mit neuen funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften kommt (Ma et al., 2006; Casas-Pruneda et al., 2009).

Und tatsächlich wurde 2007 durch eine erneute Koimmunopräzipitationsstudie heterolog in HEK-293 Zellen koexprimierten rP2X₄- und rP2X₇-Rezeptoren sowie bei endogen in Knochenmarksmakrophagen der Maus exprimierten P2X₄R und P2X₇R die enge strukturelle Assoziation und eine funktionelle Beeinflussung beider Rezeptoruntereinheiten nachgewiesen (Guo et al., 2007).

Die Koexpression des P2X₇R mit einer (dominant negativen) nichtfunktionellen P2X₄^{C353W}-Rezeptormutante führte dabei zur Reduktion der ATP-induzierten Ströme ohne jedoch die Oberflächenexpression zu verändern. Die Koexpression mit einer ebenfalls afunktionellen (aber nichtdominant negativen) P2X₄^{S341W}-Mutante verursachte zudem die Ausbildung von Phänotypen mit verändertem pharmakologischem Verhalten. Dabei wurde die Potenzierung der koexprimierten P2X₇R-Ströme durch Ivermectin sowie eine Inhibierung durch den P2X₄R-Antagonisten TNP-ATP und den P2X₇R-Antagonisten BBG beobachtet (Guo et al., 2007).

Nachfolgende weiterführende Experimente mit BN-PAGE, SDS-PAGE-Analyse und subtypspezifischen Antikörpern von endogen exprimierten P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren aus

Diskussion

unterschiedlichen Geweben der Ratte und Knochenmarksmakrophagen von Mäusen sowie von heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimierten rP2XR ergaben jedoch keine Hinweise auf eine tatsächliche Heteromerisation dieser beiden Rezeptoren. D.h. durch die sehr unterschiedlichen Proteinmassen der beiden Untereinheiten würde man bei erfolgter Heterooligomerbildung zusätzliche, sich von den Homomeren unterscheidende, Banden aufgrund der veränderten Laufgeschwindigkeit in der Elektrophorese vermuten, was jedoch nicht gefunden wurde. Es wurde geschlussfolgert, dass die bei Koimmunopräzipitation nachgewiesene Interaktion zwischen P2X₄R und P2X₇R zwischen den homomeren Rezeptoren bestehen müsse, oder aber nur trunkierte P2X₇-Untereinheiten mit ähnlichen Molekülmassen wie der P2X₄-Rezeptor Heterotrimere ausbilden würden (Nicke, 2008; Boumechache et al., 2009).

In situ proximity ligation Assays, die Molekülabstände < 40 nm anzeigen sowie Koimmunopräzipitationsstudien wiesen eine räumliche Nähe heterolog in HEK-293 koexprimierter rP2X₄- und rP2X₇-Rezeptoren nach. Allerdings ergaben sich mittels Cross-linking Analyse mit anschließender SDS-PAGE-Analyse und Immunoblotting mit Untereinheitenspezifischen Antikörpern keine direkten Hinweise auf eine Heteromerisierung. Die Rasterkraftmikroskopie isoliert und koexprimierter Rezeptoren zeigte Dimerbildungen zwischen den einzelnen (homotrimeren) Rezeptoren (Antonio et al., 2011). Weitere Koimmunopräzipitationsstudien zusammen mit Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Messungen zur Untersuchung der dynamischen Protein-Interaktionen heterolog in HEK 293 Zellen koexprimierter mP2X₄ und mP2X₇-Rezeptoren lassen vermuten, dass diese Interaktion über den C-Terminus des P2X₇R erfolgt. Möglicherweise führt die Aktivierung des P2X₇R zu einer Konformitätsänderung, welche die C-Termini beider Rezeptoren annähert und so die Interaktion triggert (Perez-Flores et al., 2015). Dies steht jedoch wiederum im Widerspruch zu der Vermutung, dass nur trunkierte P2X₇-Untereinheiten mit P2X₄R Heterotrimere ausbilden (s.o.).

Nun haben sich durch die Arbeitsgruppe Prof. Schmalzing der RWTH Aachen mittels BN-PAGE und SDS-PAGE-Analyse erstmalig doch direkte Hinweise auf die Heteromerbildung beider heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimierten Untereinheiten ergeben. Dabei konnte der hP2X₇-Subtyp bei Koexpression mit den Strep-II-markierten, His-hP2X₄-Rezeptoren mittels Streptactin aufgereinigt werden (als Hinweis einer physikalischen Assoziation beider Untereinheiten). Zudem bildete sich bei Koexpression eine zusätzliche Bande in der Elektrophorese aus, welche mit GFP-markierte hP2X₇-Fluoreszenzsignale enthielt und eine größere Proteinmasse als das homomere hP2X₄R-Strep-II Protein zeigte.

Dabei wurde geschlussfolgert, dass die Proteinbande mit der signifikant größeren Masse die hP2X₇-GFP Untereinheit enthält (109 kDA vs etwa 61 kDA der hP2X₄-Untereinheit) und das Oligomer wahrscheinlich aus zwei hP2X₄- und einer hP2X₇-Untereinheit aufgebaut ist

Diskussion

(berechnete Masse von 231 kDa vs. 183 kDa des homotrimeren hP2X₄R). Da diese Proteinbande zudem das Oberflächen-markierte sulfo-Cy5-Fluoreszenzsignal aufwies, ist davon auszugehen, dass es sich um tatsächlich auf der Zelloberfläche exprimierte heteromere Rezeptoren handelte (Prudic et al., 2016).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, diese beschriebene Heteromerbildung der heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten humanen P2X₄- und P2X₇-Untereinheiten genauer funktionell zu untersuchen. Dabei sollte mittels Ganzzellstrommessungen nach möglichen neuen elektrophysiologischen Phänotypen geschaut werden, die bei Koexpression beider P2XR-Subtypen auftreten könnten und sich sowohl von reinen P2X₄R- als auch P2X₇R-Phänotypen hinsichtlich der Rezeptorkinetik als auch der pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. Hierzu wurde zunächst die Kinetik der hP2X₄R- und hP2X₇R-abhängigen Ströme detailliert untersucht und mit der Kinetik bei Koexpression beider Rezeptoren verglichen.

Dabei ergaben sich sowohl bei Koexpression mit dem hP2X₇wt-Rezeptor, als auch mit dem langsamere linear ansteigende Ströme zeigenden His-getagten Subtyp, keine signifikanten Hinweise, die auf geänderte kinetische Eigenschaften durch z.B. die Heterooligomerbildung hindeuteten.

Der humane P2X₄-Rezeptor zeigte in Ganzzellstrommessungen schnelle Einwärtsströme, die nach Erreichen eines Gipfelstromes etwa 1,2 s nach Beginn der ATP-Applikation innerhalb der ATP-Applikationsdauer von 12 s auf etwa 14 % der maximal erreichten Stromamplitude desensitivierten. Der hP2X₇R dagegen zeigte einen zweiphasigen Stromkurvenverlauf, der nach initial schnell exponentiell ansteigenden Strömen im Verlauf linear weiter anstieg. Zu einer Rezeptordesensitivierung wie beim hP2X₄R kam es, wie in der Literatur beschrieben, nicht (Klapperstück et al., 2000). Bei einer, z.B. durch vorliegende Heterooligomere geänderten Rezeptorkinetik würde es bei Koexpression entweder (bei Heteromeren mit P2X₇R-ähnlichen Eigenschaften) zu vermehrt nicht-desensitivierenden Rezeptoranteilen oder aber (bei Ausbildung von P2X₄R-ähnlichen Eigenschaften) zu vermehrt desensitivierenden Rezeptoranteilen kommen. Insbesondere im Bereich des späteren ATP-aktivierten Stromkurvenverlaufs (etwa ab 1,2 bis 3 Sekunden nach ATP-Applikation, $I_{\text{inakt}} \text{P2X}_4$ bzw. $I_{\text{akt,lin}} \text{P2X}_7$) würde man bei Koexpression also entweder verstärkte oder aber verminderte Stromkurvenverläufe erwarten. Der Vergleich der Stromkurvenverläufe ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede (weder bei Koexpression des hP2X₄R mit hP2X₇R noch mit His-hP2X₇R) zu den durch reine Addition beider Stromkurvenverläufe theoretisch zu erwartenden Stromkurven.

Bei hohen ATP Konzentrationen dominierte sowohl bei Koexpression des hP2X₄R mit dem His-getagten als auch mit dem nicht-getagten hP2X₇-Rezeptor im Stromkurvenverlauf der hP2X₇R, bei niedrigen Konzentrationen dagegen der hP2X₄R. Dies ist durch die unterschiedlichen Affinitäten der Rezeptoren gegenüber ATP zu erklären, wobei der hP2X₇-Rezeptor eine deutlich

Diskussion

geringere Affinität (EC_{50} 0,2 bis 4 mM (Klapperstück et al., 2000; North, 2002; Tewari und Seth, 2015)) gegenüber ATP als der hP2X₄-Rezeptor (EC_{50} 1 – 10 μ M (Coddou et al., 2011)) aufweist. D.h. bei niedrigen ATP-Konzentrationen wird der hP2X₇R nicht aktiviert. Auch der biphasische Verlauf der ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurven koexprimierter P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren spricht gegen einen neuen Phänotyp. Dies wird weiter untermauert durch die Tatsache, dass bei Koexpression von hP2X₄- und His-hP2X₇-Rezeptoren (im Rahmen der errechneten Konzentration-Wirkungs-Kurven) die Amplitude der ATP-induzierten Antwort immer zwischen denen der isolierten hP2X₄R-Antwort und der der isolierten His-hP2X₇R-Antwort lag. Der Bezugsstrom (im Nenner bei Normierung) ist bei Applikation von 0,1 mM ATP bei Koexpression größer (als bei Expression von hP2X₄R oder hP2X₇R allein), da hier Stromanteile von hP2X₄- und His-hP2X₇-Rezeptoren eingehen. Dies vermindert bei geringen ATP-Konzentrationen den relativen Strom im Vergleich zur isolierten Expression von P2X₄R. Auch bei den großen ATP-Konzentrationen, bei denen die hP2X₇R-Komponente dominiert, spielt dies eine Rolle, d.h. die normierte Stromamplitude der koexprimierten P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren liegt unter dem der isoliert exprimierten P2X₇-Rezeptoren.

Der hP2X₄R zeigt bei repetitiver ATP-Gabe eine bisher noch nicht abschließend geklärte Rezeptordesensitivierung um 80% (Fountain und North, 2006). Bei Koexpression mit dem His-hP2X₇R wurde in Ganzzellströmen bei wiederholter ATP-Gabe ebenfalls eine Abnahme der Stromamplituden beobachtet. Hierbei verringerte sich insbesondere der initiale Stromanteil, wo der hP2X₄R mit seinem desensitivierenden Gipfelstromverlauf dominierte. Während bei der ersten ATP-Applikation noch ein angedeuteter Gipfelstrom zu beobachten war, kam es bei repetitiver ATP-Gabe zur Ausbildung eines Stromkurvenverlaufs, der His-hP2X₇R-abhängigen Strömen ähnelt. Dies spricht für eine unabhängige Expression von hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren.

In der Regel steigert bei heteromeren Rezeptoren die Untereinheit mit der höheren Agonistenaffinität die Sensitivität des Heteromers (Saul et al., 2013). Demzufolge würde man bei P2X₄/P2X₇-Koexpression und Ausbildung von funktionellen Heteromeren mit veränderten pharmakologischen Eigenschaften eine monophasische (d.h. durch eine Hillfunktion beschreibbare) ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) erwarten, die einen geringeren EC_{50} -Wert aufweist, als bei isolierter Expression des hP2X₇-Rezeptors. Wenn auch wegen der fehlenden Sättigung der KWK bei hohen ATP-Konzentrationen auf eine Approximation durch Hill-Funktion verzichtet wurde, ist der biphasische Verlauf der KWK bei koexprimierten hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren deutlich zu erkennen. Der biphasische Verlauf ist auch nicht durch die funktionell hochaffine Aktivierungsstelle des hP2X₇R (Klapperstück et al., 2001) zu erklären, da die hochaffine Komponente der KWK der koexprimierten P2X₄/P2X₇ ein EC_{50} im Bereich von

Diskussion

0,1 μM aufweist, was deutlich unter der EC_{50} der hochaffinen Aktivierungsstelle des hP2X₇R liegt (Klapperstück et al., 2001).

Die KWK des isoliert exprimierten hP2X₄R hätte auch nicht mit einer einfachen Hill-Funktion approximiert werden können. Zudem wurden schon bei sehr kleinen ATP-Konzentrationen von 30 nmol/l desensibilisierende Ströme in P2X₄R sowie P2X₄R/P2X₇R-exprimierenden Oozyten gemessen, die typisch für P2X₄-Rezeptoren sind. Beide Befunde unterscheiden sich von publizierten Untersuchungen des heterolog in *Xenopus*-Oozyten exprimierten hP2X₄R (Garcia-Guzman et al., 1997). Die Gründe hierfür bleiben unklar.

Weder bei Zugabe P2X₄R-spezifischer positiver Modulatoren oder Antagonisten noch bei P2X₇R-spezifischer Antagonisten oder Agonisten kam es bei Koexpression beider Untereinheiten zu Stromkurvenverläufen, die für die Ausbildung von Heterooligomeren mit neuen pharmakologischen Eigenschaften sprechen würden. Zwar zeigten sich bei koexprimierten hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren und Zugabe von Ivermectin (P2X₄R-spezifischer Modulator) und Bz-ATP (P2X₇R-Agonist) signifikant potenzierte Stromkurvenverläufe im Vergleich zur ATP-induzierten Stromantwort, jedoch war diese rein durch die Potenzierung der jeweiligen (homomeren) sensitiven P2X-Rezeptoren erklärbar. Die im Vergleich zum theoretischen (durch reine Addition der Stromantworten beider isoliert exprimierten Rezeptoren) Stromkurvenverlauf beobachtete verstärkte Potenzierung durch Bz-ATP bei Koexpression (10,5 s bis 13,5 s nach Beginn der Applikation) ist sehr gering und nur wenig signifikant ($P = 0,047$ bis $0,048$) und daher skeptisch zu sehen. Die Potenzierung endogen in humanen Makrophagen und heterolog in HEK-293 Zellen exprimierter hP2X₇-Rezeptoren durch Ivermectin (Nörenberg et al., 2012) trat in den hier gezeigten Messungen nicht auf, ebenso nicht die bei in HEK-293 Zellen heterolog koexprimierter hP2X₄ und hP2X₇-Rezeptoren nachgewiesene verstärkte Ivermectinmodulation (Guo et al., 2007).

Der Zusatz von spezifischen P2X₄R- (PSB-15417) oder P2X₇R-Antagonisten (A438079, oATP) bzw. inhibierender P2X₇R- Modulatoren (Mg^{2+}) führte bei Koexpression zu einer signifikanten Verminderung der ATP-induzierten Stromkurvenverläufe. Allerdings ist auch hier diese Reduzierung rein durch die Inhibierung der entsprechenden (homomeren) Rezeptoren erklärbar und spricht nicht für die Ausbildung eines neuen Phänotyps.

Bei Koexpression des hP2X₄R mit den am C-Terminus trunkierten oder in der TM2-Domäne punktmultierten hP2X₇R-Mutanten, die im Vergleich zum Wildtyp stark verminderte Stromantworten aufwiesen, kam es (mit Ausnahme bei Koexpression mit den hP2X₇^{A348C}-Rezeptoren) zur signifikanten Reduktion der Stromkurvenverläufe im Vergleich zur isolierten hP2X₄R-Expression. Hierbei wurde nicht nur die Gipfelstromamplitude reduziert, sondern bei einigen Koexpressionen auch die Kinetik der Ströme leicht, aber signifikant verändert (signifikante Änderung bei Koexpression des hP2X₄R mit (His-)hP2X₇¹⁻⁴³⁶, (His-)hP2X₇¹⁻⁵⁰⁵,

Diskussion

hP2X₇^{G345C} und hP2X₇^{A348C}). Insbesondere die für den hP2X₄-Rezeptor typische Rezeptordesensitivierung wurde dabei signifikant vermindert und zwar stärker, als bei reiner Addition beider Ströme zu erwarten wäre (s.Abb. 22). Eine Ausnahme bildete die Koexpression mit dem hP2X₇^{L505R}, der bei isolierter Expression recht prominente Ströme ausbildete und dessen Anteil bei Koexpression deutlich supprimiert schien. Beim Vergleich des gemittelten Stromkurvenverlaufs mit dem, bei unabhängiger Rezeptorexpression theoretisch zu erwartenden Stromkurvenverlauf, trat bei ersterem eine signifikant verstärkte Desensitivierung auf. Also scheint hier die P2X₄R-Expression die Expression der P2X₇R-Mutante zu vermindern. Bei Koexpression des hP2X₄R mit anderen His-getagten hP2X₇R-Mutanten sowie mit den (His-)hP2X₇-Wildtyprezeptoren wurde die Desensitivierung durch die Koexpression nicht signifikant verändert (s.Abb. 22).

Die veränderten Stromkurvenverläufe bei Koexpression könnten für die Ausbildung von Heteromeren mit einer veränderten Rezeptorkinetik sprechen. Dass trunkierte P2X₇-Rezeptoren in der Lage sind, Heteromere zu bilden, ist nicht neu. So scheinen, z.B. in Tumorzellen trunkierte Splicevarianten mit dem Volllänge P2X₇-Rezeptor Heteromere auszubilden und so die P2X₇R-Eigenschaften zu blockieren (Feng et al., 2006).

Eine negative Beeinflussung durch afunktionelle Rezeptoren wurde zudem bereits von Guo et al. 2007 beschrieben. Hier führte die Koexpression der P2X₇-Rezeptoren mit einer nichtfunktionellen P2X₄R-Mutante zu einer signifikanten Verminderung der ATP-induzierten Stromamplitude. Ob auch hierbei Veränderungen der Rezeptorkinetik festgestellt wurden, ist jedoch nicht beschrieben (Guo et al., 2007).

Warum es insbesondere bei Koexpression mit den His-getagten punktmutierten hP2X₇-Rezeptoren zu keiner Veränderung der Desensitivierungskinetik gekommen ist, bleibt unklar.

Neben den hP2X₇-Rezeptormutanten wurde der hP2X₄R zudem mit Pannexinkanälen bzw. der Glycinrezeptoruntereinheit koexprimiert, um zu untersuchen, ob sich auch hier Veränderungen der ATP-induzierten Stromkurvenverläufe finden.

Bei Pannexinen (Panxs) handelt es sich um eine Kanalfamilie (bestehend aus 3 Mitgliedern (Panx1, Panx2 und Panx3)), welche zusammen mit den Innexinen und Connexinen zu der Superfamilie der Gap-Junction-Proteine gehört (Li et al., 2011b).

Eine Interaktion des P2X₇R mit Pannexinen wurde beschrieben (Hung et al., 2013; Dahl und Muller, 2014), wird aber inzwischen kontrovers diskutiert (Vandenbeuch et al., 2015). Koimmunopräzipitationsstudien legen zudem eine physikalische Interaktion von Pannexin mit P2X₄R in humanen Epithelzellen der Mundschleimhaut nahe, außerdem scheinen P2X₄-, P2X₇-Rezeptoren und Pannexine gemeinsam in der ROS-Produktion dieser Epithelzellen involviert zu sein (Hung et al., 2013). Für in Oozyten exprimierte Pannexin und P2X₇-Rezeptoren allerdings

Diskussion

konnte weder eine physikalische (d.h. direkte Protein-Protein-Bindung) noch eine funktionelle Interaktion nachgewiesen werden (Klapperstück et al., 2013). Isoliert exprimierte Pannexinkanäle bilden in *Xenopus laevis* Oozyten keine ATP-induzierten Stromantworten aus. Bei Koexpression mit den hP2X₄-Rezeptoren kam es zur signifikanten Reduktion der ATP-induzierten hP2X₄R-abhängigen Gipfelstromamplitude. Dabei wurde die für die P2X₄-Rezeptoren typische Rezeptordesensitivierung allerdings nicht signifikant verändert.

Auch die Koexpression mit der, für andere Untersuchungszwecke mit dem Grün fluoreszierenden Protein GFP markierten humanen Glycinrezeptoruntereinheit inhibierte die hP2X₄R-vermittelten Stromkurvenverläufe. Dabei wurden, wie bei Koexpression mit den Pannexinkanälen, die ATP-induzierten hP2X₄R-abhängigen Gipfelstromamplituden signifikant vermindert, ohne dabei die Kinetik der Stromkurvenverläufe zu verändern. Insbesondere die Rezeptordesensitivierung wurde durch die Koexpression nicht beeinflusst.

Bei diesen Anionenkanälen handelt es sich um pentamere liganden-abhängige Ionenkanäle, die wie z.B. die GABA-, außerdem nACh- und HT₃-Rezeptoren zur Superfamilie der Cys-Loop-Rezeptoren gehören (Schaefer et al., 2013). Bisher ist keine Interaktion zwischen den Glycinrezeptoren und den P2X-Rezeptoren beschrieben, allerdings finden sich in der Literatur vergleichbare negative Interaktionen zwischen verschiedenen Rezeptorfamilien. Unter anderem beim hP2X₄R ist eine Suppression ATP-induzierter Ströme durch die Koexpression mit GABA_{Cp1}- und $\alpha_3\beta_4$ nACh-Rezeptoren in HEK293 Zellen beschrieben worden (Xia et al., 2008; Decker und Galligan, 2009). Wie genau dabei die Interaktion zwischen den unterschiedlichen Rezeptoren stattfindet, ist nicht genau geklärt, evtl. ist dabei der C-Terminus der P2X-Rezeptoren involviert (Boué-Grabot et al., 2004b).

Die durch die Koexpression mit den Pannexin-Kanälen, als auch mit den Glycinrezeptor-Untereinheiten beschriebene Suppression der hP2X₄R-abhängigen Ströme ohne Änderung der Rezeptorkinetik sprechen am ehesten für eine unspezifische Hemmung ohne direkte funktionelle Interaktion. Evtl. wird durch eine Überlastung des Oozyten-Expressionssystem die Expressionsrate der hP2X₄-Rezeptoren und damit Ausbildung funktioneller Rezeptoren an der Zelloberfläche reduziert.

Insgesamt kann nicht abschließend geklärt werden, warum die Koexpression mit den hP2X₇-Rezeptormutanten zu einer Änderung der hP2X₄R-Stromantworten führt, die Koexpression mit dem hP2X₇wt dagegen nicht zu einer Ausbildung eines neuen Phänotypen zu führen scheint. Evtl. sind die neu ausgebildeten und (durch die Arbeitsgruppe Prof. Schmalzing) nachgewiesenen hP2X_{4/7}-Heterotrimeren pharmakologisch inaktiv oder unterscheiden sich im Phänotyp nicht von homomeren hP2X₄- oder hP2X₇-Rezeptoren. Beide Erklärungsansätze lassen einige Fragen offen. Bei inaktiven Heterotrimeren würde man eigentlich eine signifikante Minderung der

Diskussion

Stromamplituden in Ganzzellstrommessungen erwarten, da durch die Heteromerbildung weniger homomere hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren gebildet würden. Ebenso würde man bei gleichbleibendem Phänotyp eigentlich verstärkte Antworten auf die entsprechenden Agonisten oder Antagonisten erwarten, da sich vermehrt sensitive Rezeptoren auf der Zelloberfläche fänden. Allerdings scheinen erhöhte Expressionsraten oder sogar auch eine nachgewiesene verstärkte Oberflächenexpression der P2X-Rezeptoren nicht immer mit einer tatsächlichen Hochregulation funktioneller Rezeptoren einher zu gehen: In humanen Endothelzellen der Umbilikalvene fand sich nach inflammatorischen Stimuli eine Hochregulation sowohl der P2X₄- als auch der P2X₇-Rezeptoren, ebenso nach Lipopolysaccharid-Priming in Mikrogliazellen. In Endothelzellen konnten dabei trotz Nachweis der Oberflächenexpression beider Rezeptorproteine nur Ströme der P2X₇R, in Mikrogliazellen dagegen nur Ströme der P2X₄-Rezeptoren detektiert werden (Raouf et al., 2007; Wilson et al., 2007). Möglicherweise spielt diese von der Oberflächenexpression unabhängige bisher nicht genau definierte Regulation funktionaler Rezeptoren auch bei den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit eine Rolle.

Ob als Ursache der bei Koexpression mit den Mutanten sowie Pannexin1-Kanälen und Glycinrezeptoren nachgewiesenen Stromamplitudenreduzierung eine Minderung der Expression durch „Überlastung“ des Expressionssystems der Oozyten infrage kommt ist nicht klar. Eigentlich würde man dann auch bei Koexpression der hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren eine Minderung der Stromamplituden erwarten, da ja auch bei diesen Rezeptoren das Expressionssystem der Oozyten an seine Grenze stoßen müsste. Dies wurde jedoch nicht gefunden.

Tatsächlich scheint die Expressionsmodulation beider Untereinheiten eng miteinander verzahnt zu sein, möglicherweise teilen sich beide Untereinheiten ein gemeinsames Promoter-Element. Dabei scheint eine Expressionshemmung von P2X₄R oder P2X₇R auf DNA-Ebene zu einer gleichzeitigen Suppression des in der Nähe liegenden Genortes des jeweils anderen P2X-Subtyps zu führen. Bei Suppression auf mRNA-Ebene dagegen wird über einen noch nicht näher geklärten Kompensationsmechanismus z.T. der jeweils andere P2X-Subtyp hochreguliert (Weinhold et al., 2010; Craigie et al., 2013). Dass sich eine solche Art der Expressionsmodulation nach Injektion von RNA in Oozyten als Heterologes Expressionssystem findet, ist allerdings eher unwahrscheinlich.

Die Schlussfolgerung, dass nur trunkierte P2X₇-Untereinheiten mit ähnlichen Molekülmassen wie der P2X₄-Rezeptor Heterotrimere ausbilden können (Nicke, 2008; Boumechache et al., 2009) würde erklären, warum es bei Koexpression des hP2X₄R mit den Vollängen-hP2X₇-Rezeptoren (anders als bei Koexpression mit den trunkierten hP2X₇R-Mutanten) zu keiner nachweisbaren signifikanten Veränderung der Stromkurvenverläufe gekommen ist. Dieser Erklärungsansatz steht allerdings kontrovers zu den Ergebnissen der BN-PAGE- und SDS-PAGE-Analysen der Arbeitsgruppe Prof. Schmalzing, bei denen Oberflächen-exprimierte Proteinkomplexe bestehend

Diskussion

aus hP2X₄- und (Vollängen-)His-hP2X₇-Untereinheiten gefunden wurden (Prudic et al., 2016). Ungeklärt bleibt bei diesem Lösungsansatz zudem, warum auch die Koexpression mit den hP2X₇^{G345C}- und hP2X₇^{A348C}-Untereinheiten, welche die gleiche Peptidlänge wie der hP2X₇wt haben und somit deutlich größere Molekülmassen als die hP2X₄-Untereinheit aufweisen, zu einer funktionellen Interaktion mit den hP2X₄R-Subtypen zu führen scheint.

Evtl. bildeten sich bei den verwendeten RNA-Konzentrationen auch nur sehr wenige Heterotrimere aus. Die Neigung zur Heteromerbildung, aber auch die genaue Zusammensetzung der Heterooligomere scheint von der angebotenen Menge an Untereinheiten im endoplasmatischen Retikulum abzuhängen. Dies ist z.B. bei den P2X_{2/3}- und den P2X_{2/6}-Rezeptoren beschrieben. Hier kommt es zum Beispiel bei konstanter Expression der P2X₃ durch stufenweise Erhöhung der P2X₂R Expression vermehrt zur Ausbildung der Heteromere (Liu et al., 2001), zudem sind bei dominanter P2X₂-Expression vermehrt P2X(2)₂/(6)₁ dagegen bei dominanter P2X₆-Expression vermehrt P2X(2)₁/(6)₂-Heteromere nachweisbar (Barrera et al., 2007). Auch bei den hP2X_{4/7}-Heteromeren könnte die Expressionsrate eine Rolle spielen. Möglicherweise bilden sich bei den verwendeten RNA-Konzentrationen nur so geringe Mengen an Heteromeren aus, dass sie in Ganzzellstrommessungen zu keiner signifikanten Änderung der Kinetik oder pharmakologischen Eigenschaften führen. Dass die Koexpression mit den deutlich funktionsgeminderten P2X₇-Rezeptoren dagegen zu signifikanten Änderungen der Stromkurvenverläufe in Ganzzellstrommessungen führt, könnte möglicherweise an einer Akkumulation der (evtl. transportdefizienten) Mutanten im endoplasmatischen Retikulum liegen, die dadurch nachfolgend vermehrt für die Heteromerbildung zur Verfügung stehen. Der Transport des P2X₇ zur Zelloberfläche wird über Bereiche der C-terminalen Domäne des Rezeptors reguliert. Hier scheint die u.a. die Palmitoylierung von Cysteinresten für den Transport an die Plasmamembran wichtig zu sein (Denlinger et al., 2003; Smart et al., 2003; Gonnord et al., 2009; Robinson und Murrell-Lagnado, 2013). Dabei führen z.B. Rezeptormutationen, die eine Palmitoylierung unmöglich machen, zum Abfall der Membranexpression und zum vermehrten Verbleib der Rezeptorproteine im endoplasmatischen Retikulum (Gonnord et al., 2009). Ob es bei den verwendeten, insbesondere den in der Transmembrandomäne punktmultierten hP2X₇-Mutanten, allerdings zu einer verminderten Oberflächenexpression mit Anhäufung der Untereinheiten im ER kommt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und bleibt daher bislang offen. Die hier verwendeten C-terminal trunkierten P2X₇R-Konstrukte werden in der Zellmembran von *Xenopus*-Oozyten stark exprimiert (Becker et al., 2008). Zum Einfluss der Koexpression auf den Einbau der P2X-Rezeptoren in die Zellmembran müssten noch zusätzliche biochemische Expressionsstudien durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Neben seiner Rolle als ubiquitärer Energielieferant wird das in gesunden Geweben überwiegend intrazellulär vorkommende Adeninnukleotid ATP durch verschiedene auf die Zelle einwirkende Stressoren freigesetzt und kann als sogenanntes Gefahrensignal extrazellulär über eine Reihe von Oberflächenrezeptoren eine ganze Reihe unterschiedlicher physiologischer als auch pathologischer Vorgänge beeinflussen (u.a. Thrombozytenaggregation, Immunmodulation). ATP-gesteuerte ionotrope P2X-Rezeptoren liegen dabei als Trimere aus drei Untereinheiten vor. Bisher konnten sieben verschiedene P2XR-Untereinheiten (P2X₁₋₇) voneinander differenziert werden, wobei die bekannten Rezeptoren meist als Homomere, bestehend aus drei Proteinen derselben Untereinheit, vorliegen. Ebenso wie andere bekannte ionotropen Rezeptoren scheinen aber auch die P2X-Rezeptoren ihre Diversität durch die Bildung von Heterooligomeren zu vergrößern. Bisher sind verschiedene P2XR-Heteromere identifiziert worden. Ob auch die P2X₄- und P2X₇-Untereinheiten Heterooligomere ausbilden können, wurde wiederholt kontrovers diskutiert. Trotz in nativen Geweben überlappender Expression, Nachweis von endogen exprimierter P2X-Rezeptoren mit kombinierten Eigenschaften beider Untereinheiten, bei heterolog exprimierten Rezeptoren nachgewiesener funktioneller Beeinflussung und enger räumlicher Assoziation gelang es bis 2015 wiederholt nicht, den direkten Nachweis einer Heterooligomerbildung zu erbringen. Es wurde geschlussfolgert, dass die nachgewiesene gegenseitige Beeinflussung durch eine Interaktion zwischen den homomeren P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren hervorgerufen wird. Tatsächlich liegt nun durch die Arbeitsgruppe Prof. Schmalzing der erste direkte Nachweis einer Heterooligomerbildung von heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimierten humanen P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels heterologer Expression von humanen P2X₄- und P2X₇-Rezeptorkonstrukten in *Xenopus laevis* Oozyten unter Anwendung der Voltage-clamp-Technik Zellmembranströme untersucht, um herauszufinden, ob eine mögliche Heteromerbildung die Kinetik und das pharmakologische Verhalten koexprimierter hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren verändert und welchen Einfluss die Koexpression mit dysfunktionellen P2X₇-Mutanten auf die hP2X₄-R-vermittelten Stromkurvenverläufe hat. Weiterhin wurde zum Vergleich der Einfluss von koexprimierten Pannexin1-Untereinheiten oder Glycinrezeptoren auf die ATP-induzierten hP2X₄-R-vermittelten Ströme untersucht, bei denen eine Wechselwirkung als unwahrscheinlich erschien.

Insgesamt zeigten sich bei koexprimierten Wildtyp hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren keine Hinweise auf die Ausbildung eines Phänotyps mit distinktiven kinetischen oder pharmakologischen Eigenschaften. Die Koexpression führte zu keiner Änderung des Stromkurvenverlaufs oder zu veränderter Modulation durch P2X₄-R- und P2X₇-R-spezifische

Zusammenfassung

Modulatoren, die nicht durch das Vorliegen von ausschließlich homomeren Rezeptoren erklärt werden könnte.

Die Koexpression mit funktionell fast inaktiven hP2X₇R-Mutanten oder mit anderen Kanalproteinen wie Pannexin 1 und der α 1-Untereinheit des GFP-markierten Glycinrezeptors führte zu einer deutlichen Suppression der hP2X₄R-abhängigen Ströme. Die Koexpression des hP2X₄R mit den dysfunktionellen hP2X₇R-Mutanten führte außerdem in einigen Fällen zur Verminderung der für die P2X₄-Rezeptoren typischen Desensitivierung, was für eine funktionelle Interaktion der koexprimierten hP2XR-Untereinheiten spricht.

Die genaue Ursache der beschriebenen kontroversen Ergebnisse kann leider nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise sind die formierten Heterooligomere nicht funktionell oder zeigen einen im Vergleich zum hP2X₄- oder hP2X₇-Rezeptor sehr ähnlichen Phänotyp und werden daher in Ganzzellstrommessungen nicht dargestellt. Die Suppression der P2X₄-medierten Ströme durch Koexpression sowohl mit hP2X₇-Mutanten, als auch mit Pannexin1 und dem Glycinrezeptor könnte evtl. auf eine Minderung der Expressionsrate zurückzuführen sein, erklärt allerdings nicht die veränderte Kinetik bei Koexpression mit den hP2X₇-Mutanten. Möglicherweise wird bei Koexpression mit den inaktiven hP2X₇R-Mutanten die Menge der zur Heteromerbildung zur Verfügung stehenden Proteine im ER durch die (zum Transportdefizit führenden) Mutation erhöht, weshalb sich dabei vermehrt Heteromere mit tatsächlich veränderten kinetischen Eigenschaften ausbilden könnten.

7 Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G (1994) Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64:445-475.

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32:19-29.

Acuna-Castillo C, Coddou C, Bull P, Brito J, Huidobro-Toro JP (2007) Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X₇ purinergic receptor. *J Neurochem* 101:17-26.

Acuna-Castillo C, Morales B, Huidobro-Toro JP (2000) Zinc and copper modulate differentially the P2X₄ receptor. *J Neurochem* 74:1529-1537.

Adinolfi E, Capece M, Franceschini A, Falzoni S, Giuliani A, Rotondo A, Sarti A, Bonora M, Syberg S, Corigliano D, Pinton P, Jørgensen NR, Abelli L, Emionite L, Raffaghello L, Pistoia V, Di VF (2015) Accelerated tumor progression in mice lacking the P2X₇ receptor. *Cancer Res* 75:635-644.

Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, Pellegatti P, Callegari MG, Sandona D, Markwardt F, Schmalzing G, Di Virgilio F (2010) Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X₇ receptor. *FASEB J* 24:3393-3404.

Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, Bianchi G, Kroemer G, Pistoia V, Di Virgilio F (2012) Expression of P2X₇ receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res* 72:2957-2969.

Antonio LS, Stewart AP, Varanda WA, Edwardson JM (2014) Identification of P2X₂/P2X₄/P2X₆ heterotrimeric receptors using atomic force microscopy (AFM) imaging. *FEBS Lett* 588:2125-2128.

Antonio LS, Stewart AP, Xu XJ, Varanda WA, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2011) P2X₄ receptors interact with both P2X₂ and P2X₇ receptors in the form of homotrimers. *Br J Pharmacol* 163:1069-1077.

Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J, Schmalzing G (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X₂ and heteromeric P2X₁₊₂ receptor subtypes. *J Mol Biol* 342:333-343.

Ase AR, Honson NS, Zaghdane H, Pfeifer TA, Seguela P (2015) Identification and characterization of a selective allosteric antagonist of human P2X₄ receptor channels. *Mol Pharmacol* 87:606-616.

Balázs B, Dankó T, Konvács G, Köles L, Hediger MA, Zsembery A (2013) Investigation of the inhibitory effects of the benzodiazepine-derivative, 5-BDBD on P2X₄ purinergic receptors by two complementary methods. *Cell Physiol Biochem* 32:11-24.

Barrera NP, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2007) The stoichiometry of P2X₂/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. *Biophys J* 93:505-512.

Literaturverzeichnis

Bartlett R, Stokes L, Sluyter R (2014) The P2X₇ receptor channel: recent developments and the use of P2X₇ antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev* 66:638-675.

Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, Markwardt F (2008) The P2X₇ carboxyl tail is a regulatory module of P2X₇ receptor channel activity. *J Biol Chem* 283:25725-25734.

Bernier LP, Ase AR, Boue-Grabot E, Seguela P (2012) P2X₄ receptor channels form large noncytolytic pores in resting and activated microglia. *Glia* 60:728-737.

Bernier LP, Ase AR, Chevallier S, Blais D, Zhao Q, Boue-Grabot E, Logothetis D, Seguela P (2008) Phosphoinositides regulate P2X₄ ATP-gated channels through direct interactions. *J Neurosci* 28:12938-12945.

Bhattacharya A, Wang Q, Ao H, Shoblock JR, Lord B, Aluisio L, Fraser I, Nepomuceno D, Neff RA, Welty N, Lovenberg TW, Bonaventure P, Wickenden AD, Letavic MA (2013) Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X₇ receptor antagonist: JNJ-47965567. *Br J Pharmacol* 170:624-640.

Bo XN, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G, North RA (2003) Tissue distribution of P2X₄ receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res* 313:159-165.

Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD (2002) P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 22:4814-4824.

Bodin P, Burnstock G (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26:959-969.

Boeynaems JM, Communi D, Tobaye B (2012) Overview of the pharmacology and physiological roles of P2Y receptors. *WIREs Membr Transp Signal* 1:581-658.

Boison D (2008) Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol* 8:2-7.

Boué-Grabot E, Emerit MB, Toulme E, Seguela P, Garret M (2004a) Cross-talk and co-trafficking between ρ 1/GABA receptors and ATP-gated channels. *J Biol Chem* 279:6967-6975.

Boué-Grabot E, Toulmé E, Emerit MB, Garret M (2004b) Subunit-specific coupling between gamma-aminobutyric acid type A and P2X₂ receptor channels. *J Biol Chem* 279:52517-52525.

Boumechache M, Masin M, Edwardson JM, Gorecki DC, Murrell-Lagnado R (2009) Analysis of assembly and trafficking of native P2X₄ and P2X₇ receptor complexes in rodent immune cells. *J Biol Chem* 284:13446-13454.

Bowler JW, Bailey RJ, North RA, Surprenant A (2003) P2X₄, P2Y₁ and P2Y₂ receptors on rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 140:567-575.

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

Literaturverzeichnis

- Broom DC, Matson DJ, Bradshaw E, Buck ME, Meade R, Coombs S, Matchett M, Ford KK, Yu W, Yuan J, Sun SH, Ochoa R, Krause JE, Wustrow DJ, Cortright DN (2008) Characterization N-(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-amino-pyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chloro-benzamide (AACBA), a P2X₇ antagonist in animal models of pain and inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 327:620-633.
- Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF (2002) Heteromultimeric P2X_{1/2} receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* 300:673-680.
- Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, Antonarakis SE (1998) Gene structure and chromosomal localization of the human P2X₇ receptor. *Recept Channel* 5:347.
- Burow P, Klapperstück M, Markwardt F (2014) Activation of ATP secretion via volume-regulated anion channels by sphingosine-1-phosphate in RAW macrophages. *Pflügers Arch.* 467:1215-1226.
- Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27:166-176.
- Burnstock G (2012) Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *Br J Pharmacol* 167:238-255.
- Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:31-304.
- Casanovas A, Hernandez S, Tarabal O, Rossello J, Esquerda JE (2008) Strong P2X₄ purinergic receptor-like immunoreactivity is selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 506:75-92.
- Casas-Pruneda G, Reyes JP, Perez-Flores G, Perez-Cornejo P, Arreola J (2009) Functional interactions between P2X₄ and P2X₇ receptors from mouse salivary epithelia. *J Physiol (Lond)* 587:2887-2901.
- Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, Fusco FR, Viscomi MT, D'Ambrosi N, Vacca F, Sancesario G, Bernardi G, Molinari M, Volonte C (2003) Up-regulation of P2X₂, P2X₄ receptor and ischemic cell death: Prevention by P2 antagonists. *Neuroscience* 120:85-98.
- Chakfe Y, Seguin R, Antel JP, Morissette C, Malo D, Henderson D, Seguela P (2002) ADP and AMP induce interleukin-1 beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X₇ receptor channels. *J Neurosci* 22:3061-3069.
- Cheewatrakoolpong B, Gilchrest H, Anthes JC, Greenfeder S (2005) Identification and characterization of splice variants of the human P2X₇ ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332:17-27.
- Chen K, Zhang J, Zhang W, Zhang J, Yang J, Li K, He Y (2013) ATP-P2X₄ signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: a novel pathway of diabetic nephropathy. *Int J Biochem Cell Biol* 45:932-943.

Literaturverzeichnis

- Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CBA, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN (2005) Disruption of the P2X₇ purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114:386-396.
- Coddou C, Morales B, Huidobro-Toro JP (2003) Neuromodulator role of zinc and copper during prolonged ATP applications to P2X₄ purinoceptors. *Eur J Pharmacol* 472:49-56.
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 63:641-683.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X₇ receptor. *Neuropharmacology* 36:1277-1283.
- Compan V, Ulmann L, Stelmashenko O, Chemin J, Chaumont S, Rassendren F (2012) P2X₂ and P2X₅ subunits define a new heteromeric receptor with P2X₇-like properties. *J Neurosci* 32:4284-4296.
- Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves KM, Elde R, McCleskey EW (1997) Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature* 387:505-508.
- Corriden R, Insel PA (2010) Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 3:re1.
- Craigie E, Birch RE, Unwin RJ, Wildman SS (2013) The relationship between P2X₄ and P2X₇: a physiologically important interaction? *Front Physiol* 4:216.
- Dahl G, Muller KJ (2014) Innexin and pannexin channels and their signaling. *FEBS Lett* 588:1396-1402.
- Darville T, Welter-Stahl L, Cruz C, Sater AA, Andrews CW, Jr., Ojcius DM (2007) Effect of the purinergic receptor P2X₇ on *Chlamydia* infection in cervical epithelial cells and vaginally infected mice. *J Immunol* 179:3707-3714.
- Decker DA, Galligan JJ (2009) Cross-inhibition between nicotinic acetylcholine receptors and P2X receptors in myenteric neurons and HEK-293 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*
- Denlinger LC, Fisette PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, Proctor RA, Bertics PJ (2001) The nucleotide receptor P2X₇ contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167:1871-1876.
- Denlinger LC, Sommer JA, Parker K, Gudipaty L, Fisette PL, Watters JW, Proctor RA, Dubyak GR, Bertics PJ (2003) Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X₇ nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J Immunol* 171:1304-1311.
- Deuticke HJ (1932) Über den Einfluss von Adenosin und Adenosinphosphorsäuren auf den isolierten Meerschweinchenuterus. *Pflügers Arch* 230:555.

Literaturverzeichnis

Di Virgilio F (2003) Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X₇ receptor is not the only target. *Br J Pharmacol* 140:441-443.

Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC (2009a) Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol* 9:507-513.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, Baricordi OR (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* 5:191-199.

Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E (2009b) P2X₇: a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal* 5:251-256.

Di Virgilio F, Solini A (2002) P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 135:831-842.

Diaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, Leon-Otegui M, Hontecillas-Prieto L, Del Puerto A, Trejo JL, Lucas JJ, Garrido JJ, Gualix J, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M (2012) In vivo P2X₇ inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiol Aging* 33:1816-1828.

Diaz-Hernandez M, Diez-Zaera M, Sanchez-Nogueiro J, Gomez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, Miras-Portugal MT, Lucas JJ (2009) Altered P2X₇-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J* 23:1893-1906.

Donnelly-Roberts D, McGaraughty S, Shieh CC, Honore P, Jarvis MF (2007) Painful purinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 324:409-415.

Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF (2007) Discovery of P2X₇ receptor-selective antagonists offers new insights into P2X₇ receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 151:571-579.

Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR, Jarvis MF (2004) Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X₇ receptor (P2X₇R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1053-1061.

Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, Jarvis MF (2009) Mammalian P2X₇ receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X₇ receptors. *Br J Pharmacol* 157:1203-1214.

Dunn PM, Blakeley AGH (1988) Suramin: a reversible P₂-purinoceptor antagonist in the mouse *vas deferens*. *Br J Pharmacol* 93:243-245.

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461:282-286.

Literaturverzeichnis

- Fan C, Zhao X, Guo X, Cao X, Cai J (2013) P2X₄ promotes interleukin1 β production in osteoarthritis via NLRP1. *Mol Med Rep*
- Feng YH, Li X, Wang LQ, Zhou LY, Gorodeski GI (2006) A truncated P2X₇ receptor variant (P2X_{7-j}) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X₇ receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem* 281:17228-17237.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dalsusino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F (1997) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 159:1451-1458.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Forchap S, Sitta B, Turchet L, Falzoni S, Minelli M, Baricordi R, Di Virgilio F (2004) The antibiotic polymyxin B modulates P2X₇ receptor function. *J Immunol* 173:4652-4660.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F (2006) The P2X₇ receptor: A key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176:3877-3883.
- Fischer R, Kalthof B, Rank E, Stelte-Ludwig B, Wuttke M (2004) Preparation of benzofuro-1,4-diazepin-2-ones as P2X₄ receptor antagonists for the treatment of arteriosclerosis and restenosis. *DE 10312969A1*:1-14.
Ref Type: Report
- Flittiger B, Klapperstück M, Schmalzing G, Markwardt F (2010) Effects of protons on macroscopic and single-channel currents mediated by the human P2X₇ receptor. *Biochim Biophys Acta Biomembranes* 1798:947-957.
- Fountain SJ (2013) Primitive ATP-activated P2X receptors: discovery, function and pharmacology. *Front Cell Neurosci* 7:247.
- Fountain SJ, North RA (2006) A C-terminal lysine that controls human P2X₄ receptor desensitization. *J Biol Chem* 281:15044-15049.
- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Adén U, Svenningsson P (2001) Adenosine receptor signaling *in vitro* and *in vivo*. *Drug Dev Res* 52:274-282.
- Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE, Stühmer W (1997) Characterization of recombinant human P2X₄ receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol Pharmacol* 51:109-118.
- Gargett CE, Wiley JS (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 120:1483-1490.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford APDW (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflügers Arch* 452:513-537.
- Gillespie JH (1934) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol (Lond)* 80:345-349.

Literaturverzeichnis

Glass R, Townsend-Nicholson A, Burnstock G (2000) P2 receptors in the thymus: expression of P2X and P2Y receptors in adult rats, an immunohistochemical and in situ hybridisation study. *Cell Tissue Res* 300:295-306.

Gonnord P, Delarasse C, Auger R, Benihoud K, Prigent M, Cuif MH, Lamaze C, Kanellopoulos JM (2009) Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB J* 23:795-805.

Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233:309-319.

Gourine AV (2005) On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol (Lond)* 568:715-724.

Gu BJ, Rathsam C, Stokes L, McGeachie AB, Wiley JS (2009) Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from the P2X7 complex: This dissociation regulates P2X7 pore formation. *Am J Physiol* 297:C430-C439.

Gu BJ, Saunders BM, Petrou S, Wiley JS (2011) P2X7 is a scavenger receptor for apoptotic cells in the absence of its ligand, extracellular ATP. *J Immunol* 187:2365-2375.

Gu BJ, Zhang WY, Bendall LJ, Chessell IP, Buell GN, Wiley JS (2000) Expression of P2X₇ purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: Evidence for nonfunctional P2X₇ receptors. *Am J Physiol* 279:C1189-C1197.

Guerra AN, Gavala ML, Chung HS, Bertics PJ (2007) Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signal* 3:39-51.

Gum RJ, Wakefield B, Jarvis MF (2012) P2X receptor antagonists for pain management: examination of binding and physicochemical properties. *Purinergic Signal* 8:41-56.

Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD (2007) Evidence for functional P2X₄/P2X₇ heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 72:1447-1456.

Guo LH, Schluesener HJ (2005) Lesional accumulation of P2X₄ receptor⁺ macrophages in rat CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 134:199-205.

Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ (2004) Expression of P2X₄ receptor in rat C6-glioma by tumor-associated macrophages and activated microglia. *J Neuroimmunol* 152:67-72.

Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ (2005) Expression of P2X₄ receptor by lesional activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 163:120-127.

Hattori M, Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485:207-212.

Hausmann R, Bodnar M, Woltersdorf R, Wang H, Fuchs M, Messemer N, Qin Y, Gunther J, Riedel T, Grohmann M, Nieber K, Schmalzing G, Rubini P, Illes P (2012) ATP binding site mutagenesis reveals different subunit stoichiometry of functional P2X_{2/3} and P2X_{2/6} receptors. *J Biol Chem*

Literaturverzeichnis

He ML, Zemkova H, Stojilkovic SS (2003) Dependence of purinergic P2X receptor activity on ectodomain structure. *J Biol Chem* 278:10182-10188.

Hernandez-Olmos V, Abdelrahman A, El Tayeb A, Freudendahl D, Weinhausen S, Müller CE (2012) N-substituted phenoxazine and acridone derivatives: structure-activity relationships of potent P2X₄ receptor antagonists. *J Med Chem* 55:9576-9588.

Hickman SE, Elkhoury J, Greenberg S, Schieren I, Silverstein SC (1994) P2Z adenosine triphosphate receptor activity in cultured human monocyte-derived macrophages. *Blood* 84:2452-2456.

Homolya L, Steinberg TH, Boucher RC (2000) Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 150:1349-1359.

Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic M, Zhong C, Wade C, Chandran P, Zhu C, Carroll W, Perez-Medrano A, Iwakura Y (2009) The antihyperalgesic activity of a selective P2X₇ receptor antagonist, A-839977, is lost in IL-1 α knockout mice. *Behav Brain Res* 204:77-81.

Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong CM, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF (2006) A-740003 [N-(1-{Honore, 2006 17686 /id}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X₇ receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1376-1385.

Hu B, Mei QB, Yao XJ, Smith E, Barry WH, Liang BT (2001) A novel contractile phenotype with cardiac transgenic expression of the human P2X₄ receptor. *FASEB J* 15:NIL.

Hu B, Senkler C, Yang A, Soto F, Liang BT (2002) P2X₄ receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP. *J Biol Chem* 277:15752-15757.

Hu Y, Fisette PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ (1998) Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 273:27170-27175.

Huang P, Zou Y, Zhong XZ, Cao Q, Zhao K, Zhu MX, Murell-Lagnado R, Dong XP (2014) P2X₄ forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *J Biol Chem*

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.

Hung SC, Choi CH, Said-Sadier N, Johnson L, Atanasova KR, Sellami H, Yilmaz O, Ojcius DM (2013) P2X₄ assembles with P2X₇ and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PLoS ONE* 8:e70210.

Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC, Jr., Lambrecht BN (2007) Extracellular ATP

Literaturverzeichnis

triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 13:913-919.

Inoue K, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H (2007) Modification of neuropathic pain sensation through microglial ATP receptors. *Purinergic Signal* 3:311-316.

Jelinkova I, Vavra V, Jindrichova M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, Stojilkovic SS (2008) Identification of P2X₄ receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflügers Arch* 456:939-950.

Jelinkova I, Yan ZH, Liang ZD, Moonat S, Teisinger J, Stojilkovic SS, Zemkova H (2006) Identification of P2X₄ receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 349:619-625.

Jiang LH (2009) Inhibition of P2X₇ receptors by divalent cations: old action and new insight. *Eur Biophys J* 38:339-346.

Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo XN, Surprenant A, North RA (2003) Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 23:8903-8910.

Kaczmarek-Hájek K, Lörinczi E, Hausmann R, Nicke A (2012) Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal* 8:375-417.

Kawano A, Tsukimoto M, Mori D, Noguchi T, Harada H, Takenouchi T, Kitani H, Kojima S (2012a) Regulation of P2X₇-dependent inflammatory functions by P2X₄ receptor in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 420:102-107.

Kawano A, Tsukimoto M, Noguchi T, Hotta N, Harada H, Takenouchi T, Kitani H, Kojima S (2012b) Involvement of P2X₄ receptor in P2X₇ receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 419:374-380.

Kawano S, Hiraoka M (1991) Transient Outward Currents and Action Potential Alterations in Rabbit Ventricular Myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 23:681-693.

Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state. *Nature* 460:592-598.

Ke HZ, Qi H, Weidema AF, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford DT, Grasser WA, Paralkar VM, Li M, Audoly LP, Gabel CA, Jee WSS, Dixon SJ, Sims SM, Thompson DD (2003) Deletion of the P2X₇ nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol* 17:1356-1367.

Kerr D, Krantis A (1979) A new class of ATP antagonist. *Proc Aust Physiol Pharmacol* 10:156.

Khakh BS (2001) Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* 2:165-174.

Literaturverzeichnis

Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999a) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci* 2:322-330.

Khakh BS, Fisher JA, Nashmi R, Bowser DN, Lester HA (2005) An Angström scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X₂ and $\alpha_4\beta_2$ nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Neurosci* 25:6911-6920.

Khakh BS, Henderson G (2000) Modulation of fast synaptic transmission by presynaptic ligand-gated cation channels. *J Auton Nerv Syst* 81:110-121.

Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA (1999b) Allosteric control of gating and kinetics at P2X₄ receptor channels. *J Neurosci* 19:7289-7299.

Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X₇ receptor signalling complex. *EMBO J* 20:6347-6358.

King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G (2000) Coexpression of rat P2X₂ and P2X₆ subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 20:4871-4877.

Kirkup AJ, Booth CE, Chessell IP, Humphrey PP, Grundy D (1999) Excitatory effect of P2X receptor activation on mesenteric afferent nerves in the anaesthetised rat. *J Physiol (Lond)* 520:551-563.

Klapperstück M, Büttner C, Böhm T, Schmalzing G, Markwardt F (2000) Characteristics of P2X₇ receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1467:444-456.

Klapperstück M, Büttner C, Schmalzing G, Markwardt F (2001) Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X₇ receptor. *J Physiol (Lond)* 534:25-35.

Klapperstück M, Woltersdorf R, Schmalzing G, Markwardt F (2013) No physical or functional interaction of pannexin-1 and the P2X₇ receptor co-expressed in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Acta Physiol* 207:242.

Ku HH (1966) Notes on the Use of Propagation of Error Formulas. *NBS J Research* 70C:263-273.

Kubick C, Schmalzing G, Markwardt F (2011) The effect of anions on the human P2X₇ receptor. *Biochim Biophys Acta Biomembranes* 1808:2913-2922.

Lalo U, Pankratov Y, Wichert SP, Rossner MJ, North RA, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2008) P2X₁ and P2X₅ subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 28:5473-5480.

Lambrecht G, Friebe T, Grimm U, Windscheif U, Bungardt, E., Hildebrandt C, Bäumert HG, Spatz-Kümbel G, Mutschler E (1992) PPADS, a novel functionally selective antagonist of P₂ purinoceptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol* 217:217-219.

Literaturverzeichnis

- Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne DS (1997) ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z (P2X₇) receptors. *Immunity* 7:433-444.
- Lê KT, Babinski K, Seguela P (1998) Central P2X₄ and P2X₆ channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 18:7152-7159.
- Lê KT, Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P (1999) Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X₁ and P2X₅ subunits. *J Biol Chem* 274:15415-15419.
- Lenertz LY, Gavala ML, Zhu Y, Bertics PJ (2011) Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X₇, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. *Immunol Res* 50:22-38.
- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995) Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377:432-435.
- Lewis CJ, Evans RJ (2001) P2X receptor immunoreactivity in different arteries from the femoral, pulmonary, cerebral, coronary and renal circulations. *J Vasc Res* 38:332-340.
- Li A, Banerjee J, Leung CT, Peterson-Yantorno K, Stamer WD, Civan MM (2011a) Mechanisms of ATP release, the enabling step in purinergic dynamics. *Cell Physiol Biochem* 28:1135-1144.
- Li M, Silberberg SD, Swartz KJ (2013) Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and Mg²⁺. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E3455-E3463.
- Li Q, Luo X, Muallem S (2005) Regulation of the P2X₇ receptor permeability to large molecules by extracellular Cl⁻ and Na⁺. *J Biol Chem* 280:26922-26927.
- Li S, Tomic M, Stojilkovic SS (2011b) Characterization of novel Pannexin 1 isoforms from rat pituitary cells and their association with ATP-gated P2X channels. *Gen Comp Endocrinol* 174:202-210.
- Limapichat W, Dougherty DA, Lester HA (2014) Subtype-specific mechanisms for functional interaction between $\alpha 6\beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptors and P2X receptors. *Mol Pharmacol* 86:263-274.
- Lister MF, Sharkey J, Sawatzky DA, Hodgkiss JP, Davidson DJ, Rossi AG, Finlayson K (2007) The role of the purinergic P2X₇ receptor in inflammation. *J Inflamm (Lond)* 4:5-20.
- Liu M, King BF, Dunn PM, Rong WF, Townsend-Nicholson A, Burnstock G (2001) Coexpression of P2X₃ and P2X₂ receptor subunits in varying amounts generates heterogeneous populations of P2X receptors that evoke a spectrum of agonist responses comparable to that seen in sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 296:1043-1050.

Literaturverzeichnis

- Liu X, Ma W, Surprenant A, Jiang LH (2009) Identification of the amino acid residues in the extracellular domain of rat P2X₇ receptor involved in functional inhibition by acidic pH. *Br J Pharmacol* 156:135-142.
- Lord B, Aluisio L, Shoblock JR, Neff R, Varlinskaya EI, Ceusters M, Lovenberg TW, Carruthers N, Bonaventure P, Letavic MA, Deak T, Drinkenburg W, Bhattacharya A (2014) Pharmacology of a novel CNS penetrant P2X₇ antagonist JNJ-42253432. *J Pharmacol Exp Ther* DOI:10.1124/jpet.114.218487:
- Ma WY, Korngreen A, Weil S, Cohen EBT, Priel A, Kuzin L, Silberberg SD (2006) Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *J Physiol (Lond)* 571:503-517.
- Marcoli M, Cervetto C, Paluzzi P, Guarnieri S, Alloisio S, Thellung S, Nobile M, Maura G (2008) P2X₇ presynaptic receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals: a role in ATP-induced glutamate release. *J Neurochem* 105:2330-2342.
- Markwardt F, Löhn M, Böhm T, Klapperstück M (1997) Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *J Physiol (Lond)* 498:143-151.
- McNamara N, Khong A, McKemy D, Caterina M, Boyer JL, Julius D, Basbaum C (2001) ATP transduces signals from ASGM1, a glycolipid that functions as a bacterial receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9086-9091.
- Mehta VB, Hart J, Wewers MD (2001) ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1 β and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 276:3820-3826.
- Michel AD, Fonfria E (2007) Agonist potency at P2X₇ receptors is modulated by structurally diverse lipids. *Br J Pharmacol* 152:523-537.
- Miller CM, Bolter NR, Fuller SJ, Zakrzewski AM, Lees MP, Saunders BM, Wiley JS, Smith NC (2011) The role of the P2X₇ receptor in infectious diseases. *PLoS Pathog* 7:e1002212.
- Moore SF, MacKenzie AB (2008) Species and agonist dependent zinc modulation of endogenous and recombinant ATP-gated P2X₇ receptors. *Biochem Pharmacol* 76:1740-1747.
- Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Ripa M, Di Virgilio F (1993) Oxidized ATP - an irreversible inhibitor of the macrophage purinergic-P2Z receptor. *J Biol Chem* 268:8199-8203.
- Nagata K, Imai T, Yamashita T, Tsuda M, Inoue K, Tozaki-Saitoh H (2009) Antidepressants inhibit P2X₄ receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain* 5:20.
- Nakanishi M, Mori T, Nishikawa K, Sawada M, Kuno M, Asada A (2007) The effects of general anesthetics on P2X₇ and P2Y receptors in a rat microglial cell line. *Anesth Analg* 104:1136-1144.
- Nakazawa K, Hess P (1993) Block by calcium of ATP-activated channels in pheochromocytoma cells. *J Gen Physiol* 101:377-392.

Literaturverzeichnis

Nakazawa K, Ohno Y (1997) Effects of neuroamines and divalent cations on cloned and mutated ATP-gated channels. *Eur J Pharmacol* 325:237-243.

Negulyaev YA, Markwardt F (2000) Block by extracellular Mg^{2+} of single human purinergic P2X₄ receptor channels expressed in human embryonic kidney cells. *Neurosci Lett* 279:165-168.

Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, Grayson G, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Niforantos W, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA (2006) Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X₇ antagonists. *J Med Chem* 49:3659-3666.

Nelson DW, Sarris K, Kalvin DM, Namovic MT, Grayson G, Donnelly-Roberts DL, Harris R, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA (2008) Structure-activity relationship studies on N'-aryl carbohydrazide P2X₇ antagonists. *J Med Chem* 51:3030-3034.

Nicke A (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X₇ subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 377:803-808.

Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F (2005) Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X₁ and P2X₄ subunits. *J Neurochem* 92:925-933.

Nörenberg W, Sobottka H, Hempel C, Plotz T, Fischer W, Schmalzing G, Schaefer M (2012) Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X₇ receptors. *Br J Pharmacol* 167:48-66.

North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.

North RA, Jarvis MF (2013) P2X Receptors as drug targets. *Mol Pharmacol* 83:759-769.

Novak I (2003) ATP as a signaling molecule: The exocrine focus. *News Physiol Sci* 18:12-17.

Ostrovskaya O, Asatryan L, Wyatt L, Popova M, Li K, Peoples RW, Alkana RL, Davies DL (2011) Ethanol is a fast channel inhibitor of P2X₄ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 337:171-179.

Oury C, Toth-Zsomboki E, Vermylen J, Hoylaerts MF (2006) The platelet ATP and ADP receptors. *Curr Pharm Design* 12:859-875.

Perez-Flores G, Levesque SA, Pacheco J, Vaca L, Lacroix S, Perez-Cornejo P, Arreola J (2015) The P2X₇/P2X₄ interaction shapes the purinergic response in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 467:484-490.

Pippel A, Beßler B, Klapperstück M, Markwardt F (2015) Inhibition of antigen receptor-dependent Ca^{2+} signals and NF-AT activation by P2X₇ receptors in human B lymphocytes. *Cell Calcium* 57:275-289.

Piskuric NA, Nurse CA (2012) Expanding role of ATP as a versatile messenger at carotid and aortic body chemoreceptors. *J Physiol (Lond)*

Literaturverzeichnis

- Priel A, Silberberg SD (2004) Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X₄ receptor channels. *J Gen Physiol* 123:281-293.
- Prudic K, Pippel A, Stolz M, Braam U, Müller C, Schmalzing G, Markwardt F (2016) Investigation of functional interaction of purinergic P2X₄ and P2X₇ receptors. *Acta Physiol* 216:707, P115 (A).
- Pupovac A, Geraghty NJ, Watson D, Sluyter R (2014) Activation of the P2X₇ receptor induces the rapid shedding of CD23 from human and murine B cells. *Immunol Cell Biol* 93:77-85.
- Qu Y, Dubyak GR (2009) P2X₇ receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal* 5:163-173.
- Qureshi OS, Paramasivam A, Yu JC, Murrell-Lagnado RD (2007) Regulation of P2X₄ receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci* 120:3838-3849.
- Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA, Kawashima E (1997) Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X₂ and P2X₃ receptors. *J Neurosci* 17:6529-6533.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Raouf R, Chabot-Dore AJ, Ase AR, Blais D, Seguela P (2007) Differential regulation of microglial P2X₄ and P2X₇ ATP receptors following LPS-induced activation. *Neuropharmacology* 53:496-504.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X₇ - Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272:5482-5486.
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F (2007) Kinetics of P2X₇ receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 92:2377-2391.
- Robinson LE, Murrell-Lagnado RD (2013) The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front Cell Neurosci* 7:233.doi: 10.3389/fncel.2013.00233.
- Royle SJ, Qureshi OS, Bobanovic LK, Evans PR, Owen DJ, Murrell-Lagnado RD (2005) Non-canonical YXXGΦ endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X₄ receptors. *J Cell Sci* 118:3073-3080.
- Rubio ME, Soto F (2001) Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21:641-653.
- Ryu JK, McLarnon JG (2008) Block of purinergic P2X₇ receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *NeuroReport* 19:1715-1719.
- Sabirov RZ, Okada Y (2005) ATP release via anion channels. *Purinergic Signal* 1:311-328.

Literaturverzeichnis

Sakaki H, Fujiwaki T, Tsukimoto M, Kawano A, Harada H, Kojima S (2013) P2X4 receptor regulates P2X7 receptor-dependent IL-1 β and IL-18 release in mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 432:406-411.

Samways DS, Li Z, Egan TM (2014) Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front Cell Neurosci* 8:6.

Sathanoori R, Sward K, Olde B, Erlinge D (2015) The ATP receptors P2X7 and P2X4 modulate high glucose and palmitate-induced inflammatory responses in endothelial cells. *PLoS ONE* 10:e0125111.

Saul A, Hausmann R, Kless A, Nicke A (2013) Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front Cell Neurosci* 7:250.

Schaefer N, Langlhofer G, Kluck CJ, Villmann C (2013) Glycine receptor mouse mutants: model systems for human hyperekplexia. *Br J Pharmacol* 170:933-952.

Schwab JM, Guo LH, Schluesener HJ (2005) Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X₄ receptor expression. *J Neuroimmunol* 163:185-189.

Schwarz W, Rettinger J (2004) *Foundations of electrophysiology*. Shaker Verlag: Aachen.

S  ror C, Melki MT, Subra F, Raza SQ, Bras M, Saidi H, Nardacci R, Voisin L, Paoletti A, Law F, Marins I, Amedola A, Abdul-Sater AA, Ciccocanti F, Delelis O, Niedergang F, Thierry S, Said-Sadier N, Lamaze C, M  tivier D, Estaquier J, Fimia GM, Falsca L, Casetti R, Modjtahedi N, Kanellopoulos J, Mouscadet JF, Ojcius DM, Piacentini M, Gougeon ML, Kroemer G, Perfettini JL (2011) Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *JEM* 2008:1823-1834.

Seyffert C, Schmalzing G, Markwardt F (2004) Dissecting individual current components of co-expressed human P2X₁ and P2X₇ receptors. *Curr Top Med Chem* 4:1719-1730.

Sluyter R, Barden JA, Wiley JS (2001) Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. *Cell Tissue Res* 304:231-236.

Sluyter R, Stokes L (2011) Significance of P2X7 receptor variants to human health and disease. *Recent Pat DNA Gene Seq* 5:41-54.

Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, 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.

Smith NC, Burnstock G (2004) Mechanisms underlying postjunctional synergism between responses of the vas deferens to noradrenaline and ATP. *Eur J Pharmacol* 498:241-248.

Soltoff SP, McMillian MK, Talamo BR (1989) Coomassie Brilliant Blue G is a more potent antagonist of P2 purinergic responses than Reactive Blue 2 (Cibacron Blue 3Ga) in rat parotid acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun* 165:1279-1285.

Literaturverzeichnis

Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez JM, Hollmann M, Karschin C, Stühmer W (1996) P2X₄: An ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3684-3688.

Soto F, Lambrecht G, Nickel P, Stühmer W, Busch AE (1999) Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology* 38:141-149.

Sperlágh B, Haskó G, Németh Z, Vizi ES (1998) ATP released by LPS increased nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X₇ receptors. *Neurochem Int* 33:209-215.

Sperlágh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P (2006) P2X₇ receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78:327-346.

Stojilkovic SS, Tomic M, He ML, Yan ZH, Koshimizu TA, Zemkova H (2005) Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels. *Ann N Y Acad Sci* 1048:116-130.

Stokes L, Jiang LH, Alcaraz L, Bent J, Bowers K, Fagura M, Furber M, Mortimore M, Lawson M, Theaker J, Laurent C, Braddock M, Surprenant A (2006) Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X₇ receptors, AZ11645373. *Br J Pharmacol*

Suh BC, Kim JS, Namgung U, Ha HJ, Kim KT (2001) P2X₇ nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J Immunol* 166:6754-6763.

Sun C, Chu J, Singh S, Salter RD (2009) Identification and characterization of a novel variant of the human P2X₇ receptor resulting in gain of function. *Purinergic Signal*

Surprenant A, North RA (2008) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* 71:333-359.

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

Takenouchi T, Sugama S, Iwamaru Y, Hashimoto M, Kitani H (2009) Modulation of the ATP-Induced release and processing of IL-1beta in microglial cells. *Crit Rev Immunol* 29:335-345.

Tewari M, Seth P (2015) Emerging role of P2X₇ receptors in CNS health and disease. *Ageing Res Rev*

Tian M, Abdelrahman A, Weinhausen S, Hinz S, Weyer S, Dosa S, El-Tayeb A, Müller CE (2014) Carbamazepine derivatives with P2X₄ receptor-blocking activity. *Bioorg Med Chem* 22:1077-1088.

Tomioka A, Ueno S, Kohama K, Goto F, Inoue K (2000) Propofol potentiates ATP-activated currents of recombinant P2X₄ receptor channels expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Neurosci Lett* 284:167-170.

Literaturverzeichnis

- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits - Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274:6653-6659.
- Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM (1998) Co-expression of P2X₁ and P2X₅ receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* 54:989-993.
- Toulmé E, Blais D, Leger C, Landry M, Garret M, Seguela P, Boué-Grabot E, Boué-Grabot E (2007) An intracellular motif of P2X₃ receptors is required for functional cross-talk with GABA_A receptors in nociceptive DRG neurons. *J Neurochem* 102:1357-1368.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K (2003) P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424:778-783.
- Vandenbeuch A, Anderson CB, Kinnamon SC (2015) Mice lacking pannexin 1 release ATP and respond normally to all taste qualities. *Chem Senses* 40:461-467.
- Varma R, Chai Y, Troncoso J, Gu J, Xing H, Stojilkovic SS, Mattson MP, Haughey NJ (2009) Amyloid-beta induces a caspase-mediated cleavage of P2X₄ to promote purinotoxicity. *Neuromolecular Med*
- Vial C, Owen P, Opie LH, Posel D (1987) Significance of release of adenosine triphosphate and adenosine induced by hypoxia or adrenaline in perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 19:187-197.
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor. *Neuropharmacology* 36:1285-1294.
- Virginio C, Robertson G, Surprenant A, North RA (1998) Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_{2/3} receptors. *Mol Pharmacol* 53:969-973.
- Weinhold K, Krause-Buchholz U, Rodel G, Kasper M, Barth K (2010) Interaction and interrelation of P2X₇ and P2X₄ receptor complexes in mouse lung epithelial cells. *Cell Mol Life Sci* 67:2631-2642.
- Wiley JS, Sluyter R, Gu BJ, Stokes L, Fuller SJ (2011) The human P2X₇ receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens* 78:321-332.
- Wilson HL, Varcoe RW, Stokes L, Holland KL, Francis SE, Dower SK, Surprenant A, Crossman DC (2007) P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells. *Br J Pharmacol* 151:115-127.
- Xia R, Mei ZZ, Milligan C, Jiang LH (2008) Inhibitory interaction between P2X₄ and GABA_C ρ1 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 375:38-43.
- Xiong KM, Li CY, Weight FF (2000) Inhibition by ethanol of rat P2X₄ receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* 130:1394-1398.

Literaturverzeichnis

- Xu J, Chai H, Ehinger K, Egan TM, Srinivasan R, Frick M, Khakh BS (2014) Imaging P2X₄ receptor subcellular distribution, trafficking, and regulation using P2X₄-pHluorin. *J Gen Physiol* 144:81-104.
- Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J (2000a) Fluid shear stress activates Ca²⁺ influx into human endothelial cells via P2X₄ purinoceptors. *Circ Res* 87:385-391.
- Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Qi Z, Sokabe M, Ando J (2000b) P2X₄ receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 279:H285-H292.
- Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Kobayashi M, Kawamura K, Masuda H, Kamiya A, Ando J (2006) Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X₄-deficient mice. *Nat Med* 12:133-137.
- Yang SM, Cheek DJ, Westfall DP, Buxton ILO (1994) Purinergic axis in cardiac blood vessels - agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. *Circ Res* 74:401-407.
- Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RP, Anand P (2006) COX-2, CB2 and P2X₇-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 6:DOI: 10.1186/1471-2377-6-12.
- Yoshida K, Ito M, Matsuoka I (2015) P2X₇ receptor antagonist activity of the anti-allergic agent oxatomide. *Eur J Pharmacol* 767:41-51.
- Zhang Z, Zhang ZY, Fauser U, Schuesener HJ (2008) Mechanical allodynia and spinal up-regulation of P2X₄-receptor in experimental autoimmune neuritis rats. *Neuroscience* 152:495-501.
- Zhang ZR, Artelt M, Bernet M, Trautmann K, Schluesener HJ (2006) Lesional accumulation of P2X₄ receptor⁺ monocytes following experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 197:252-257.
- Zhou SY, Mamdani M, Qanud K, Shen JB, Pappano AJ, Kumar TS, Jacobson KA, Hintze T, Recchia FA, Liang BT (2010) Treatment of heart failure by a methanocarba derivative of adenosinemonophosphate: Implication for a role of cardiac purinergic P2X receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 333:920-928.

8 Thesen

1. Bei den P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren handelt es sich um zwei Subtypen ATP-gesteuerter ionotroper Rezeptoren, die auf einer Vielzahl von Zellen zu finden sind. Funktionsfähige P2X-Rezeptoren liegen dabei als Trimere zumeist mit drei gleichen, zum Teil mit unterschiedlichen Untereinheiten vor.
2. Die hP2X₇- und hP2X₄-Rezeptoren überlappen sowohl in ihrer Gewebeverteilung als auch in ihrer Funktion. Die enge Nähe der kodierenden Gene auf Repetitionssequenzen sowie die im Vergleich zu den anderen Untereinheiten größte Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz legen zudem eine Verwandtschaft beider Rezeptoren nahe.
3. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Prof. Schmalzing (RWTH Aachen) mittels BN-PAGE und SDS-PAGE-Analyse lieferten erstmalig direkte Hinweise auf eine Heteromerbildung heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimierter hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren.
4. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels heterologer Expression von humanen P2X₄- und P2X₇-Rezeptorkonstrukten in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht, ob eine mögliche Heteromerbildung die Kinetik und das pharmakologische Verhalten koexprimierter hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren verändert.
5. Die Datenerhebung erfolgte durch Messung ATP-abhängiger Ganzzellströme mittels Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmmethode an *Xenopus laevis* Oozyten, denen zwei bis drei Tage zuvor gelöste cRNA der zu untersuchenden humanen Rezeptorsubtypen injiziert wurde.
6. In *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimierte hP2X₄- und (His-)hP2X₇-Rezeptoren zeigen bei Koexpression ATP-induzierte Stromkurvenverläufe, die durch eine unabhängige Expression der jeweiligen Homomere erklärt werden konnten, was auf eine fehlende Ausbildung heteromerer P2X-Rezeptoren mit veränderter Rezeptorkinetik hindeutet.
7. Der biphasische Verlauf der ATP-Konzentrations-Wirkungskurve heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimierter hP2X₄- und (His-)hP2X₇-Rezeptoren, außerdem die fehlende durch die Koexpression verursachte verstärkte (oder verminderte) Wirkung P2X₄- und P2X₇-spezifischer Modulatoren sprechen gegen die Ausbildung heteromerer P2X-Rezeptoren mit veränderten pharmakologischen Eigenschaften.

Thesen

8. Insgesamt scheinen heterolog koexprimierte hP2X₄- und hP2X₇-Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten keinen Rezeptor mit verändertem funktionellen Phänotyp auszubilden. Die durch die AG Prof. Schmalzing nachgewiesenen Heterooligomere sind also entweder dysfunktionell oder es dominiert, evtl. je nach Stöchiometrie, der hP2X₄- oder der hP2X₇-Phänotyp.
9. Die Koexpression der hP2X₄-Rezeptoren mit dysfunktionellen hP2X₇R-Mutanten führt zu einer deutlichen Repression der hP2X₄R-abhängigen Ströme mit Änderung der Kinetik. Insbesondere das im Vergleich zum hP2X₇R charakteristische Desensitivierungsverhalten des hP2X₄R wird verändert, die Desensitivierungsrate z.T. deutlich reduziert.
10. Bei Koexpression des hP2X₄R mit Pannexin bzw. Glycinrezeptoren kommt es zum Absinken des ATP-induzierten Rezeptorstroms ohne jedoch die Kinetik zu verändern. Hier unterdrücken möglicherweise die koexprimierten Proteine die Expression des P2X₄-Rezeptors aufgrund einer Überforderung der Expressionskapazität der Oozyten.

Selbstständigkeitserklärung

„Hiermit erkläre ich ausdrücklich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „Charakterisierung koexprimierter humaner puriniger P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren in *Xenopus Laevis* Oozyten“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Zudem versichere ich, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich sämtliche in der oben genannten Arbeit verwendeten fremden Quellen, auch aus dem Internet, als solche kenntlich gemacht habe. Insbesondere bestätige ich, dass ich ausnahmslos sowohl bei wörtlich übernommen Aussagen, als auch bei in eigenen Worten wiedergegebenen Aussagen anderer Autoren die Quelle angegeben habe. Des Weiteren habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, auch erhielten keine Dritten Geldwerte für Leistungen, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

Mir ist bewusst, dass Verstöße gegen die Grundsätze der Selbstständigkeit als Täuschung betrachtet und entsprechend geahndet werden.“

Würzburg, den 27.07.2016

Kirsten Prudic

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich in der Vergangenheit keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Würzburg, den 27.07.2016

Kirsten Prudic

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	09.02.1987
Geburtsort	Detmold
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig
Mutter	Karin Prudic, geborene Stich, geb. 17.01.1959 Dipl.Ingenieurin, Hausfrau
Vater	Uwe Prudic, geb. 07.03.1956 Dipl. Architekt

Schulausbildung

1993 – 1997	Besuch der Grundschule An der Pappelallee, Lippstadt
1997 – 2005	Besuch des evangelischen Gymnasiums, Lippstadt
11.06.2005	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife, Lippstadt

Bundeswehr

01.07.2005	Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter, Sanitätslehrregiment Feldkirchen
2006	Absolvierung des Sanitätsoffizierlehrgang mit Abschlussprüfung, Sanitätsakademie München
23.05.2008	Ernennung zum Leutnant
29.09.2011	Ernennung zum Stabsarzt
2011 – 2013	Assistenzarzt Abt. Innere Medizin, Bundeswehrkrankenhaus Berlin
2013 – 2014	Assistenzarzt Abt. Anästhesie/Notfallmedizin, Bundeswehrkrankenhaus Berlin
12.03.2014	Ernennung zum Oberstabsarzt
Seit 2014	Truppenarzt, Sanitätsversorgungszentrum Veitshöchheim, Außenstelle des Sanitätsunterstützungszentrum Hammelburg

Universitäre Ausbildung

30.08.2005	Immatrikulation an der Martin Luther Universität für Humanmedizin, Halle (Saale)
21.08.2007	Schriftlicher Teil des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung, Halle (Saale)

14.09.2007	Mündlich-praktischer Teil des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung, Halle (Saale)
2010 – 2011	Durchführung praktisches Jahr
1. Abschnitt	Abt. Gefäßchirurgie, Diakoniekrankenhaus Halle (Saale)
2. Abschnitt	Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Halle (Saale)
3. Abschnitt	Abt. Innere Medizin, Paul-Gerhard Stift Lutherstadt Wittenberg
06.10.2011	Schriftlicher Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung, Halle (Saale)
29.11.2011	Mündlich-praktischer Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung, Halle (Saale)
30.11.2011	Erteilung der Approbation als Ärztin durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Landesprüfungsamt für Gesundheitsberufe
2008 – 2016	Arbeit mit Unterbrechung an meiner Promotion

Würzburg, den 27.07.2016

Kirsten Prudic

Danksagung

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

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Fritz Markwardt, der auch nach Jahren stets ein interessiertes und freundliches offenes Ohr für mich hatte. Nie wurde er müde mit mir Sachverhalte persönlich, via Telefon oder auch Mail durchzugehen. Dabei konnte ich mich immer auf seine schnelle Rückmeldung und Diskussionsbereitschaft verlassen. Und tatsächlich hat er durch seine enthusiastische Art Lehre zu gestalten mit dazu beigetragen, dass ich früh die Dissertationsthematik in der Physiologie wählte.

Zudem bedanke ich mich herzlich bei der medizinisch-technischen Assistentin Frau Monika Schmidt, die mich mit viel Mühe durch den Laboralltag gebracht, mich an unzähligen Tagen mit ihrer Arbeitskraft und gutem Geist unterstützt hat.

Dank gebührt zudem meiner gesamten Familie, ohne deren stoische Antriebskraft diese Arbeit sicherlich noch viele weitere Jahre zu keinem Ende gefunden hätte.