

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

**Bedeutung von Glycin 338 der zweiten Transmembrandomäne für die**  
**Funktion des hP2X<sub>7</sub>-Rezeptors**

**Dissertation**

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

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

von Nancy Zipfel  
geboren am 06.11.1988 in Lauchhammer

Betreuer: Prof. Dr. med. Fritz Markwardt

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Fritz Markwardt  
2. apl. Prof. Dr. rer. nat. Detlef Siemen (Magdeburg)  
3. Prof. em. Dr. Dr. h. c. Peter Illes (Leipzig)

20.09.2016

08.03.2017

## Referat

Der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor gehört zur Familie der Purinorezeptoren, es handelt sich um einen ATP-gesteuerten, Kationen-selektiven Kanal. Seine höchste Expressionsrate besitzt der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor in den Zellen des Immunsystems, sodass dem Kanal eine immunomodulatorische Wirkung zugeschrieben wird. Verschiedene Zellpopulationen, in denen er ebenso vorkommt, sind das respiratorische Epithel, Drüsenepithel, dendritische Zellen und Knochenmarkzellen. Der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor hat Einfluss auf Entzündungsabläufe, Proliferationsvorgänge, Knochenbildung und Knochenresorption, sowie die Elimination von Pathogenen. Der homotrimere Ionenkanal besteht aus einer großen hydrophilen, glykosylierten und Disulfidbrücken-reichen extrazellulären Domäne, zwei transmembranären Domänen und intrazellulären Amino- und Carboxytermini. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche Bedeutung die Aminosäure Glycin 338 der zweiten Transmembrandomäne für die Funktion des hP2X<sub>7</sub>-Rezeptors besitzt. Sämtliche Versuche erfolgten mittels der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemm-Technik an Oozyten der Spezies *Xenopus laevis* (afrikanischer Krallenfrosch). Die sehr ausgeprägten Effekte bei der Mutation des Aminosäurerests G338 auf die Aktivierung, die Leitfähigkeit und die Agonisten- und Antagonistenwirkung lassen vermuten, dass es sich hier um eine funktionell wichtige Aminosäure handelt.

Zipfel, Nancy: Bedeutung von Glycin 338 der zweiten Transmembrandomäne für die Funktion des hP2X<sub>7</sub>-Rezeptors, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 58 Seiten, 2016

# Inhaltsverzeichnis

## REFERAT

### INHALTSVERZEICHNIS I

### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

## 1 EINLEITUNG 1

### 1.1 Purine und Pyrimidine 1

### 1.2 Purinorezeptoren 2

### 1.3 P2X-Rezeptorfamilie 3

#### 1.3.1 Ionenkanal-Funktion von P2X-Rezeptoren 3

#### 1.3.2 Molekulare Struktur von P2X-Rezeptoren 4

### 1.4 P2X<sub>7</sub>-Rezeptor 8

#### 1.4.1 Anfänge 8

#### 1.4.2 Vorkommen und Bedeutung 9

#### 1.4.3 Molekulare Eigenschaften 11

#### 1.4.4 Elektrophysiologische Eigenschaften 12

#### 1.4.5 Antagonisten 14

## 2 ZIELSTELLUNG 16

## 3 MATERIAL UND METHODEN 17

### 3.1 Chemikalien 17

### 3.2 Lösungen 17

#### 3.2.1 Kollagenase-Lösung 17

#### 3.2.2 Narkose-Lösung 17

#### 3.2.3 Aufbewahrungslösungen 17

#### 3.2.4 Badlösungen 17

#### 3.2.5 Messlösungen 17

### 3.3 Methoden 18

#### 3.3.1 Herstellung der cRNA 18

3.3.2	Präparation der <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	18
3.3.3	cRNA-Injektion	19
3.3.4	Elektrophysiologisches Messverfahren	20
3.3.5	Datenverarbeitung	22
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>23</b>
4.1	Einfluss der hP2X <sub>7</sub> <sup>G338X</sup> -R-Konstrukte auf die Leitfähigkeit und das Umkehrpotential	23
4.2	Einfluss der Extrazellulärlösung auf die hP2X <sub>7</sub> <sup>G338X</sup> -R-Konstrukte	30
4.3	Effekte von P2X <sub>7</sub> -R-Agonisten und –Antagonisten an hP2X <sub>7</sub> <sup>G338X</sup> -R-Konstrukten	31
4.4	Effekte der SH-Gruppen-modifizierenden MTS-Derivate am hP2X <sub>7</sub> <sup>G338C</sup> -R-Konstrukt	32
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>34</b>
5.1	Mutagenese	34
5.2	Expressionsraten	38
5.3	Effekte der MTS-Derivate	40
5.4	Kationen- vs. Anionenselektion	43
5.5	Agonisten- und Antagonisteneffekt	44
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>48</b>
	<b>THESEN DER DISSERTATION</b>	<b>57</b>
	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>V</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>VI</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>VII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2-MeS-ATP	2-Methylthioadenosin-5'-O-triphosphat
$\alpha\beta$ -methyl-ATP	$\alpha,\beta$ -methylenadenosin-5'-triphosphat
$\beta\gamma$ -methyl-ATP	$\beta,\gamma$ -methylenadenosin-5'-triphosphat
ACR20 Kriterien	American College of Rheumatology 20 Kriterien
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATP $\gamma$ S	Adenosin 5'-( $\gamma$ -thiotriphosphat)
Bz-ATP	3'-O-benzoyl-4-benzoyl-Adenosin-5'-triphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
Cd <sup>2+</sup>	Cadmiumionen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cl <sup>-</sup>	Chloridionen
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
Co <sup>2+</sup>	Cobaltionen
cRNA	clonierte Ribonukleinsäure
CTP	Cytidintriphosphat
Cu <sup>2+</sup>	Kupferionen
Da	Dalton
DANN	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration, bei dieser Konzentration wird ein halbmaximaler Effekt beobachtet
Fluf	Flufenaminsäure
GlutRi	Glutamat-Ringerlösung
GTP	Guanosintriphosphat
HEK293	humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hP2X <sub>n</sub>	humaner P2X <sub>n</sub>
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IVM	Ivermectin
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
kb	Kilobasenpaare
M	Molar
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
M $\Omega$	Megaohm
mP2X <sub>n</sub>	muriner P2X <sub>n</sub>
mRNA	messenger RNA
MTS	Methanthiosulfonat

MTSEA	2-Aminoethyl-Methanthiosulfonat-Hydrobromid
MTSES	Sodium-(2-Sulfonatoethyl)-Methanthiosulfonat
MTSET	[2-(Trimethylammonium)ethyl] Methanthiosulfonat-Bromid
MTX	Methotrexat
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
N	Anzahl der Messwerte
Na <sup>+</sup>	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
Ni <sup>2+</sup>	Nickelionen
nl	Nanoliter
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
Ori	Oozyten-Ringerlösung
P2X <sub>n</sub> R	P2X <sub>n</sub> -Rezeptor
P2Y <sub>n</sub> R	P2Y <sub>n</sub> -Rezeptor
P2Z	zytolytischer Rezeptor
PCP	Phenylcyclohexylpiperidin
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulphonischesäure
RA	rheumatoide Arthritis
SCAM	Cysteinmutagenese-Scanning-Methode (substituted cysteine accessibility method)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TFP	Trifluoperazin
THP-1-Zellen	humane monozytäre THP Zelllinie 1
TM	Transmembranregion
Tricain	3-Aminobenzoessäureethylester
TrisRi	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Ringerlösung
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
WT	Wildtyp
zfP2X <sub>4</sub> R	Zebrafisch P2X <sub>4</sub> -Rezeptor
Zn <sup>2+</sup>	Zinkionen

# 1 Einleitung

## 1.1 Purine und Pyrimidine

Adenosintriophosphat (ATP) ist ein biologisches Grundmolekül, welches schon früh in der Evolution als ein intrazellulärer Energielieferant und ein extrazellulärer Signalgeber verwendet wurde. Bei der Entstehung des Lebens spielen ATP und Adenosin bereits zu Beginn eine wichtige Rolle, denn für den Moment der Konzeption ist ATP obligatorisch für die Spermienbewegung und ein Trigger für den Reifungsprozess der Samenzellen (Kapazitation). Für viele Jahre lag der Schwerpunkt bei der intrazellulären Rolle von ATP, bis Drury und Szent-Györgyi 1929 über eine potente extrazelluläre ATP-Wirkung am Herzen in Form von Blockbildung und Blutdrucksenkung berichteten (Drury und Szent-Györgyi, 1929). Einige Jahre später gab es Hinweise, dass ATP ein Transmitter von sensorischen und autonomen motorischen Nerven sein könnte (Holton, 1959). Extrazelluläre Purine und Pyrimidine haben wichtige und verschiedene Effekte bei biologischen Prozessen einschließlich der Muskelkontraktion, Neurotransmission im peripheren und zentralen Nervensystem, exokrine und endokrine Sekretion, Immunantwort, Entzündung, Thrombozytenaggregation, Schmerz und Herzfunktion (Burnstock und Wood, 1996; Dubyak und El-Moatassim, 1993; Gordon, 1986; Ralevic und Burnstock, 1991). Die Entfernung von Phosphaten aus dem Molekül hat Einfluss auf die Wirksamkeit und die Art der Zellantwort. Ein Fehlen von Phosphaten bei den Adenosinderivaten führt zu einer Vasodilatation und Hypotension, wohingegen ATP den Blutdruck erhöht (Gillespie, 1934).

Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass viele Zellen in Ruhe ATP freisetzen, einschließlich Endothelzellen, Epithelzellen, Erythrozyten, Thrombozyten, Mastzellen, Mikrogliazellen, Astrozyten, kardiale Myozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Odontoblasten und Osteoblasten und auch Neuronen (Grierson und Meldolesi, 1995). Eine mechanische Stimulierung erhöht die Freisetzung von ATP aus vielen dieser Zellarten (Burnstock, 2001). Während die ATP-Abgabe in Nerven- und Endothelzellen vermutlich durch vesikuläre Exozytose erfolgt, scheint es in einigen Zellen ein zusätzliches ATP-Transportsystem zu geben. Untersuchungen am Herzen haben gezeigt, dass Adenosin während einer Hypoxie freigesetzt wird und damit eine wichtige Rolle bei der reaktiven Hyperämie spielt (Berne, 1963; Gerlach et al., 1963). Kommt es zum Zelltod (Apoptose oder Nekrose) bzw. zu Zelldeformationen, werden vermehrt Adenosin, Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriophosphat freigesetzt, sodass ATP im Extrazellulärraum als pathologisches Zeichen angesehen werden kann.

## 1.2 Purinorezeptoren

Extrazelluläre Purine (Adenosin, ADP und ATP) und Pyrimidine (Uridindiphosphat (UDP) und Uridintriphosphat (UTP)) sind wichtige signalgebende Moleküle, welche eine Vielzahl von biologischen Effekten mittels Oberflächenrezeptoren, genannt P-Rezeptoren, vermitteln. „Purinerge“ Rezeptoren wurden erstmalig offiziell durch Burnstock 1978 benannt. Es gab zwei Hauptfamilien der Purinorezeptoren, Adenosin- oder P1-Rezeptoren und P2-Rezeptoren, reagierend auf ATP und ADP (Burnstock, 1978). Die Einordnung basierte auf Kriterien wie die relative Wirksamkeit von ATP, ADP, AMP und Adenosin, dem selektiven Antagonismus der Adenosineffekte durch Methylxanthin, der Aktivierung der Adenylatcyclase mittels Adenosin und der Stimulierung der Prostaglandinsynthese durch ATP und ADP. Eine Zusammenfassung der Klassifizierung und der dazugehörigen Liganden ist in Tabelle 1 zu sehen.

**Tabelle 1: Rezeptorfamilien für Purine und Pyrimidine (Ralevic und Burnstock, 1998).**

AMP aktiviert nicht P2-Rezeptoren, könnte aber ein Agonist für P1-Rezeptoren sein.

	P1-Rezeptoren	P2-Rezeptoren	
Natürliche Liganden	Adenosin	ATP	ATP ADP UTP UDP Adenindinukleotide
Untergruppe	-	P2XR	P2YR
Typ	G-Protein-gekoppelt	Ionenkanal Nicht-selektive Pore*	G-Protein-gekoppelt
Subtypen	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>	P2X <sub>1-7</sub> R, P2X <sub>n</sub> R	P2Y <sub>1</sub> R, P2Y <sub>2</sub> R, P2Y <sub>4</sub> R, P2Y <sub>6</sub> R, P2Y <sub>11</sub> R, P2Y <sub>ADP</sub> R (oder P <sub>2T</sub> R), P2Y <sub>12,13,14</sub> R

P2X<sub>n</sub>R bedeutet heteromere Rezeptoren solche wie P2X<sub>2/3</sub>R und andere mögliche Untereinheitenkombinationen, die bisher nicht bekannt sind. \* nur der P2X<sub>7</sub>R (oder P2Z).

Die G-Protein-gekoppelten P1-Rezeptoren werden auf der Basis ihrer Molekularstruktur, ihrer Verteilung in verschiedenen Geweben und ihren pharmakologischen Eigenschaften weiter in die 4 Subtypen A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub> unterteilt (Ralevic und Burnstock, 1998).

Die P2-Rezeptoren fungieren als ligandengesteuerte Kationenkanäle oder involvieren eine G-Protein-Aktivierung (Benham und Tsien, 1987; Dubyak, 1991; Dubyak und De Young, 1985). Dies bildet die Grundlage für ihre Unterteilung in zwei Hauptgruppen, genannt P2X-Rezeptoren und P2Y-Rezeptoren (Abbraccio und Burnstock, 1994). Die Subtypen werden durch ihre Molekularstruktur bei klonierten Säuger-P2-Rezeptoren definiert und durch die verschiedenen numerischen Untereinheiten (P2X<sub>n</sub>R oder P2Y<sub>n</sub>R) klassifiziert. P2XR kommen zum Beispiel im *Vas deferens*, in der Harnblase und in glatten Gefäßmuskelzellen vor, um eine Kontraktion zu



bewirken; die P2YR treten unter anderem in den *Taenia coli*, in neuronalem Gewebe und in Gefäßendothelzellen auf, um eine Relaxierung auszulösen.

Aktuell sind sieben P2X-Rezeptoren (P2X<sub>1-7</sub>R) und acht P2Y-Rezeptoren (P2Y<sub>1</sub>R, P2Y<sub>2</sub>R, P2Y<sub>4</sub>R, P2Y<sub>6</sub>R, P2Y<sub>11</sub>R, P2Y<sub>12</sub>R, P2Y<sub>13</sub>R, P2Y<sub>14</sub>R) kloniert, charakterisiert und als Mitglied der P2-Rezeptorfamilie anerkannt. Die Sprünge in der Nummerierung bei der P2Y-Rezeptorfamilie entstanden durch die Erkenntnis, dass bestimmte Rezeptoren fälschlicherweise als P2Y-Mitglieder identifiziert wurden und sich im Laufe der Zeit und mit fortlaufenden Forschungsergebnissen mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren identisch zeigten.

## 1.3 P2X-Rezeptorfamilie

### 1.3.1 Ionenkanal-Funktion von P2X-Rezeptoren

Die P2X-Rezeptoren gehören zur Familie der ATP-gesteuerten Kationenkanäle, welche vorrangig für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> permeabel sind (North, 2002). Die ATP-Bindung verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors und damit die Öffnung der Kanalpore (Baconguis und Gouaux, 2012; Hattori und Gouaux, 2012). Ein aktivierter P2X-Rezeptor löst einen einwärtsgerichteten Strom von Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus, welcher zu einer Membrandepolarisation, einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) und zu weiteren Signaltransduktionen führt. Die Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> erfolgt auf zwei Wegen. Einerseits sind die P2X-Rezeptoren permeabel für Calciumionen und andererseits verursacht die Depolarisation der Plasmamembran durch den Na<sup>+</sup>-Einstrom eine Aktivierung von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen, sofern diese in der entsprechenden Zelle exprimiert werden.

Eine fortdauernde ATP-Applikation führt bei P2X<sub>1-5</sub>-Rezeptoren zu einer Desensibilisierung, wobei zwei Formen zu unterscheiden sind. Desensibilisierung bedeutet ein Rückgang des durch ATP ausgelösten Stromes bei fortdauernder ATP-Verfügbarkeit. Dabei setzt der Stromrückgang bei einigen sehr rasch ein (schnelle Desensibilisierung bei P2X<sub>1</sub>R, P2X<sub>3</sub>R), bei anderen tritt die Desensibilisierung um das 100 bis 1000-fache langsamer auf (langsame Desensibilisierung bei P2X<sub>2</sub>R, P2X<sub>4</sub>R, P2X<sub>5</sub>R). Der P2X<sub>7</sub>R weist kein Desensibilisierungsverhalten auf (North, 2002). Ganzzellmessungen an HEK293-Zellen von Surprenant und Kollegen ergaben hingegen bei wiederholter Stimulation deutlich reduzierte P2X<sub>7</sub>R-Ströme, bedingt durch eine Tyrosinphosphorylierung (Kim et al., 2001). Beim P2X<sub>6</sub>R lassen sich keine ATP-abhängigen Stromantworten generieren (North, 2002). Es wird angenommen, dass jene mRNA translatiert, jedoch der Kanal aufgrund von Faltungsproblemen nicht in die Membran eingebaut werden kann (Aschrafi et al., 2004).

### 1.3.2 Molekulare Struktur von P2X-Rezeptoren

Die Aminosäurekettenlänge der P2X-Rezeptorunterheiten ist sehr variabel in Abhängigkeit von der Spezies und dem Subtyp. Der kürzeste Vertreter ist der P2X<sub>4</sub>R mit 384 Aminosäuren (AS) beim Huhn. Der humane P2X<sub>7</sub>R und der P2X<sub>7</sub>R der Ratte stellen mit 595 AS das größte Protein dar (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). Jeder Subtyp besitzt zwei hydrophobe Domänen, die durch die Plasmamembran verlaufen und deren funktionelle Charakteristiken stark konserviert sind (Verkhatsky und Burnstock, 2014). Unter Beachtung der Proteinregion, welche die zwei transmembranären Domänen und den zwischengeschalteten extrazellulären Bereich beinhaltet, sind die Proteine zu 35 bis 54 % identisch (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). Die C-terminalen Regionen sind sehr unterschiedlich und weichen erheblich in ihrer Sequenz voneinander ab. Die P2X<sub>4</sub>R-Sequenz ist am engsten mit den anderen Vertretern verwandt, wohingegen der P2X<sub>7</sub>R die größte Varianz aufweist (siehe Tabelle 2) (North, 2002).

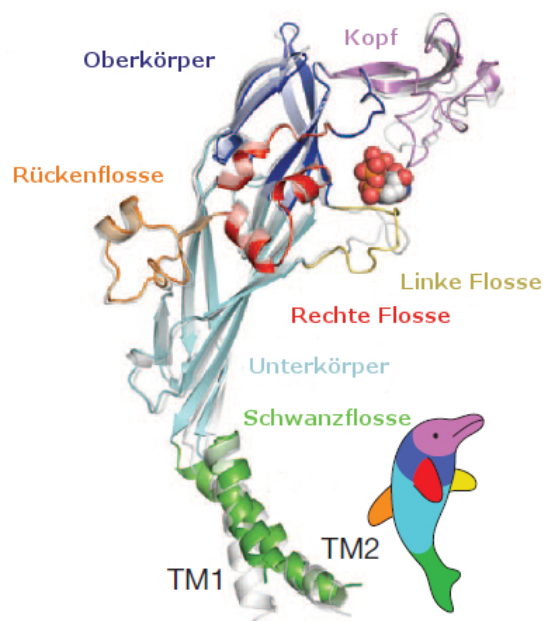
**Tabelle 2: Vergleich der Aminosäuresequenz innerhalb der humanen P2X-Rezeptorfamilie (North, 2002).**

[%]	P2X <sub>1</sub> R	P2X <sub>2</sub> R	P2X <sub>3</sub> R	P2X <sub>4</sub> R	P2X <sub>5</sub> R	P2X <sub>6</sub> R	P2X <sub>7</sub> R
<b>P2X<sub>1</sub>R</b>	100	40,6	47,9	50,3	44,7	46,2	45,1
<b>P2X<sub>2</sub>R</b>	–	100	51,1	50,5	46,9	42,7	41,0
<b>P2X<sub>3</sub>R</b>	–	–	100	48,6	49,3	43,2	44,7
<b>P2X<sub>4</sub>R</b>	–	–	–	100	55,4	47,6	48,6
<b>P2X<sub>5</sub>R</b>	–	–	–	–	100	48,5	42,0
<b>P2X<sub>6</sub>R</b>	–	–	–	–	–	100	41,0
<b>P2X<sub>7</sub>R</b>	–	–	–	–	–	–	100

Anhand Röntgenstrukturanalysen von Kawate und Kollegen konnten weitere Informationen zur Molekularstruktur gewonnen werden. Die Ergebnisse stammen von einem Zebrafisch P2X<sub>4</sub>R-Konstrukt (zfP2X<sub>4</sub>R), dessen Enden stark trunkiert wurden, sodass es schwierig ist, die Daten auf den P2X<sub>7</sub>R zu übertragen. Die Kristallstrukturanalysen am zfP2X<sub>4</sub>-Rezeptor ergaben eine kelchförmige, homotrimere Architektur des Ionenkanals (Kawate et al., 2009). Er besteht aus einer großen hydrophilen, glykosylierten und Disulfidbrücken-reichen extrazellulären Schleife. Diese beinhaltet bei allen Subtypen 10 extrazelluläre Cysteine, die wichtig für die Stabilität der Tertiärstruktur sind. Der Kelch der transmembranären Region erinnert an ein Uhrglas und wird von sechs transmembranären Helices geformt, zwei von jeder der drei Untereinheiten. Die Helices der Transmembranregion (TM) 2 überschneiden sich, engen die transmembranäre Pore ein und bestimmen den geschlossenen, ruhenden Kanalzustand (Kawate et al., 2009). Ergebnisse von Li und Kollegen ergaben, dass die TM2 die zentrale Ionenleitfähigkeitspore auskleidet, die TM1 peripher zur TM2 positioniert ist und der Ionenfluss im geschlossenen Zustand durch ein Gate blockiert wird, welches durch

verschiedene Reste der TM2 gebildet und stabilisiert wird (Li et al., 2008). Beim zfP2X<sub>4</sub>R sind das die Aminosäurereste L340, A344, A347, L351 und I355 und entsprechend beim hP2X<sub>7</sub>R V335, S339, S342, L346 und F350. Im ATP-gebundenen, geöffneten Zustand werden diese Interaktionen unterbrochen, da sich die transmembranären Helices in einer Iris-ähnlichen Bewegung von der Zentralachse entfernen und damit die ionenleitende Pore dilatieren (Hattori und Gouaux, 2012). Der engste Porendurchmesser mit etwa 7 Å bei ATP-Bindung wird beim zfP2X<sub>4</sub>R durch A347 und L351 begrenzt. Beim hP2X<sub>7</sub>R entspricht dies den Aminosäuren S339 und S342. Die Pore besitzt bei Ligandenbindung einen Durchmesser von etwa 8,5 Å (Riedel et al., 2007b). Die N-terminale und C-terminale Domäne sind intrazellulär gelegen (Newbolt et al., 1998; Torres et al., 1998; Verkhratsky und Burnstock, 2014).

Die P2X<sub>4</sub>R-Untereinheit ähnelt in ihrer Form der eines Delfins, mit der transmembranären Helix als Schwanzflosse und die extrazelluläre Region als Körper (siehe Abbildung 1). Die extrazelluläre Körperdomäne scheint strukturell rigide und widerstandsfähig gegenüber konformativen Veränderungen zu sein, da die zwei β-Faltblätter durch stärkste Kontakte zusammengehalten werden. Die oberen Anteile des β-Faltblattinnenteils berühren sich mit benachbarten Untereinheiten, wohingegen es keine Kontakte zwischen angrenzenden Untereinheiten in der Nähe der Basis der extrazellulären Domäne, proximal der transmembranären Domäne gibt. Diese Anordnung könnte den transmembranären Helices, welche direkt mit der Basis der Körperdomäne verbunden sind, nach Liganden-induzierter Neuordnung erlauben, die Breite zu einer offenen Konformation zu verändern (Kawate et al., 2009).

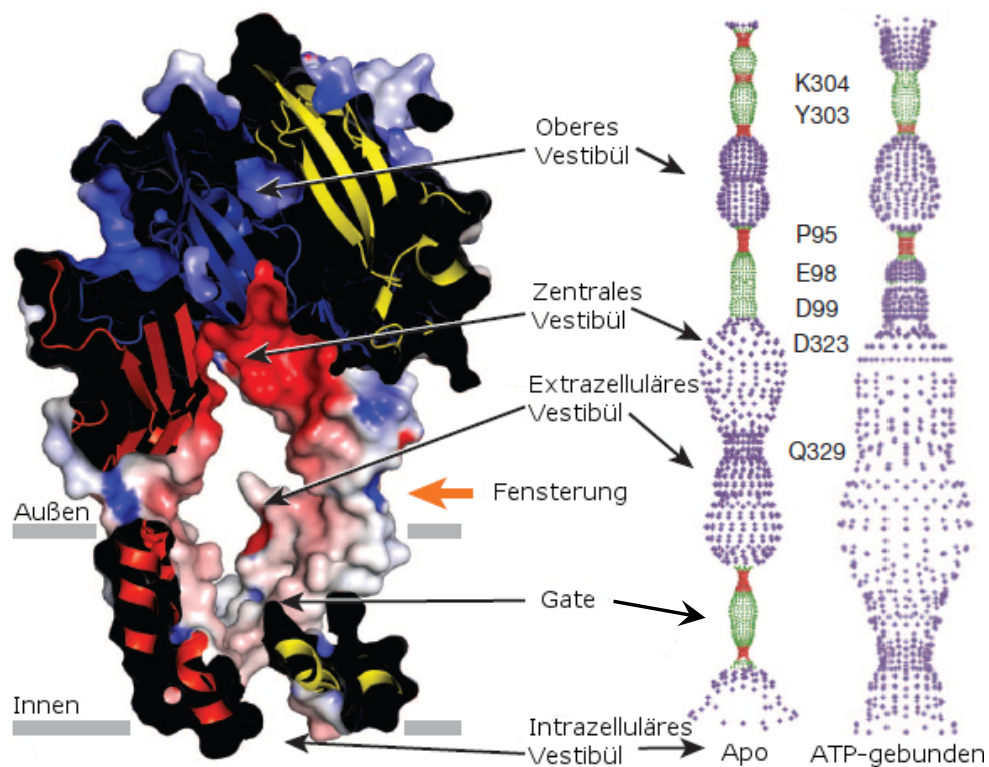


**Abbildung 1: Aufbau des zfP2X<sub>4</sub>-Rezeptors (Hattori und Gouaux, 2012).**

Die Daten der zfP2X<sub>4</sub>R-Struktur lassen vermuten, dass es zwei Wege gibt, wodurch die Ionen aus der extrazellulären Lösung den transmembranären Ionenkanal erreichen können. Die Publikation der geschlossenen zfP2X<sub>4</sub>R-Kanalstruktur offenbarte drei seitliche Portale oder Fensterungen als extrazellulären Zugang zur transmembranären Kanalpore. Der Durchmesser dieser seitlichen Portale im geschlossenen Zustand, etwa 12 Å, ist ausreichend groß für den Durchtritt von Wasser und komplett hydratisierten Ionen. D.h., dass sie selbst als Zugangsweg für extrazelluläre Ionen dienen könnten. Dies wird durch die Möglichkeit untermauert, dass thiolreaktive Agenzien eingebaute Cysteine unterhalb in der TM-Domäne wie T336 (P2X<sub>2</sub>R) erreichen und modifizieren können, auch wenn der Kanal geschlossen ist. Die seitliche Portal-Hypothese wurde auch durch die Publikation von der ATP-gebundenen offenen Kanalstruktur des zfP2X<sub>4</sub>R validiert, wo sich die seitlichen Portale während des Gatings ausdehnen (Hattori und Gouaux, 2012).

Die geschlossene Struktur indiziert auch die Gegenwart von drei Höhlen innerhalb der extrazellulären Rezeptordomäne, welche als oberes, zentrales und extrazelluläres Vestibül bezeichnet werden (siehe Abbildung 2). Diese bilden eine unterbrochene Kette entlang der zentralen Rezeptorachse und stellen einen alternativen Ionenleitungsweg dar. Im offenen Strukturzustand scheint das obere Vestibül isoliert von der Lösung zu bleiben. Das zentrale und extrazelluläre Vestibül gehen vermutlich ineinander über, um eine einzelne große innere Höhle zu bilden, welche sich in den geöffneten, transmembranären Ionenleitungsweg ausdehnt. Die Verschmelzung vom zentralen und extrazellulären Vestibül stimmt mit funktionellen Daten überein, bei denen eingebaute Cysteinsubstitutionen an Positionen innerhalb des zentralen Vestibüls vom P2X<sub>1</sub>R (G60C), P2X<sub>2</sub>R (I317C) und P2X<sub>4</sub>R (S62C, N97C) für wasserlösliche thiolreaktive Agenzien im geöffneten Zustand erreichbar sind (Kawate et al., 2009; Kawate et al., 2011).

Cysteinmutagenese-Scanning-Experimente (SCAM-Studien) am P2X<sub>1</sub>R ergaben, dass lange Inkubationen (5 - 60 min) mit thiolreaktiven Reagenzien eine Modifikation am oberen Vestibül verursachten (Allsopp et al., 2011). Das indiziert, dass diese Region nicht komplett von der wasserlöslichen Umgebung isoliert ist. Die eingebauten Cysteine im oberen Vestibül vom P2X<sub>1</sub>R waren leichter in der Abwesenheit als in der Gegenwart von ATP durch N-Biotinoylaminoethyl-MTSEA erreichbar und modifizierbar (Roberts et al., 2012). Es ist anzunehmen, dass diese Region im offenen Zustand noch weniger Kontakt zur wasserlöslichen Umgebung besitzt.



**Abbildung 2: Transmembranäre Pore beim zfP2X<sub>4</sub>-Rezeptor (Hattori und Gouaux, 2012).**

Die extrazelluläre Domäne beinhaltet die drei ATP-Bindungsstellen. Kawate und Kollegen vermuten, dass tiefe Furchen an der Außenseite des Trimers die ATP-Bindungsstellen darstellen. Diese Furchen ähneln der Gestalt eines geöffneten Kiefers. Die Bindungsstellen werden von der Kopf- und Körperdomäne, der rechten Flosse und der Rückenflosse umgeben. Es wird spekuliert, dass die ATP-Bindung eine Bewegung von Kopf, rechter Flosse und Rückenflosse induziert und gewissermaßen den Kiefer um den Agonisten schließt, und dies wiederum konformative Veränderungen innerhalb und zwischen den Untereinheiten bedingt (Kawate et al., 2009).

Expressionsuntersuchungen lieferten Hinweise für das Vorliegen der P2X-Rezeptoren als Homo- oder Heterotrimere, wobei mindestens zwei verschiedene Untereinheiten bei einem Ionenkanal mitwirken können (Aschrafi et al., 2004; Brown et al., 2002; Murrell-Lagnado und Qureshi, 2008; Nicke et al., 1998; North, 2002). Mittels Coimmunopräzipitation wurde an HEK293-Zellen analysiert, welche Subtypenpaare potenziell in der Lage sind, sich zusammenzulagern (siehe Tabelle 3) (Egan et al., 1998).

**Tabelle 3: Potenzielle Heterotrimere innerhalb der P2X-Rezeptorfamilie (North, 2002).**

[%]	P2X <sub>1</sub> R	P2X <sub>2</sub> R	P2X <sub>3</sub> R	P2X <sub>4</sub> R	P2X <sub>5</sub> R	P2X <sub>6</sub> R	P2X <sub>7</sub> R
<b>P2X<sub>1</sub>R</b>	+	+	+	-	+	+	-
<b>P2X<sub>2</sub>R</b>		+	+	-	+	+	-
<b>P2X<sub>3</sub>R</b>			+	-	+	-	-
<b>P2X<sub>4</sub>R</b>				+	+	+	-
<b>P2X<sub>5</sub>R</b>					+	+	-
<b>P2X<sub>6</sub>R</b>						-	-
<b>P2X<sub>7</sub>R</b>							+

+ = gelungen, - = nicht gelungen

Bezüglich heteromerer Rezeptoren gibt es die meisten Daten für die Kombination P2X<sub>2/3</sub>R. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Heteromer eine Stöchiometrie von einer Untereinheit des P2X<sub>2</sub>R zu zwei Untereinheiten des P2X<sub>3</sub>R besitzt (Jiang et al., 2003; Wilkinson et al., 2006). Native P2X<sub>2/3</sub>R kommen in sensorischen Neuronen, sympathischen Ganglienzellen und zerebralen Neuronen vor (North, 2002). In Astrozyten befindet sich vermutlich ein P2X<sub>1/5</sub>R-Heteromer, das dieselben ATP-abhängigen Ströme, die gleiche Pharmakologie und Kinetik wie der heterolog exprimierte P2X<sub>1/5</sub>R aufweist (Lalo et al., 2008).

Die Wissenschaftler vertraten lange die Annahme, dass der hP2X<sub>7</sub>R keine Heteromere mit Subtypen der P2X-Rezeptorfamilie formt (Torres et al., 1999). Dahingegen lassen Versuche an Parotisdrüsenzellen eine funktionelle Interaktion zwischen mP2X<sub>4</sub>R und mP2X<sub>7</sub>R vermuten. Diese könnte durch heterotrimere P2XR-Kanäle mit neuen Eigenschaften oder durch den Kontakt zwischen homotrimeren Kanälen oder eine Kombination beider Mechanismen hervorgerufen werden. Die meisten Ergebnisse sprechen dafür, dass sich mP2X<sub>4</sub>R und mP2X<sub>7</sub>R in nativen Drüsenzellen und HEK293-Zellen zu heterotrimeren Kanälen mit neuen funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften zusammensetzen können (Casas-Pruneda et al., 2009). Der Zusammenbau von heterotrimeren P2X<sub>4/7</sub>R-Kanälen wird auch durch Coimmunopräzipitation von P2X<sub>7</sub>R mit P2X<sub>4</sub>R in Knochenmarkmakrophagen und durch die Interaktion des P2X<sub>7</sub>R mit einer Vielzahl von Zellmembran-verankerten Proteinen bekräftigt (Kim et al., 2001). Jedoch ist zu bedenken, dass auch eng beieinanderliegende homotrimere Kanäle über Protein-Protein-Kontakte interagieren und so auch zusammen immunopräzipitieren können (Dubyak, 2007; Murrell-Lagnado und Qureshi, 2008).

## 1.4 P2X<sub>7</sub>-Rezeptor

### 1.4.1 Anfänge

Der Beginn der Untersuchungen geht in die 1970er Jahre zurück, als Cockcroft und Gomperts berichteten, dass extrazelluläres ATP eine Degranulation und morphologische Veränderungen

an Mastzellen von Ratten verursachte. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die ATP-getriggerten Zellantworten wie Histaminsekretion und Phosphatidylinositolbildung durch die Aktivierung eines bisher unbekanntes Rezeptors, genannt „ATP-Rezeptor“ auftraten. Die bedingte reversible Permeabilisierung der Zellmembran brachte ihm den Namen „zytolytischer ATP-Rezeptor“ – P2Z ein. Die pharmakologischen und biochemischen Eigenschaften des P2Z wurden in vielen anderen Zellen wie humane Makrophagen und B-Lymphozyten, sowie murinen Mikrogliazellen und aus Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen nachgewiesen (Adinolfi et al., 2005).

Der P2Z wurde zum ersten Mal 1996 aus dem Rattengehirn kloniert und aufgrund seiner Ähnlichkeit zu anderen P2X-Rezeptoren P2X<sub>7</sub>R genannt (Surprenant et al., 1996). Im Jahr darauf folgte die Klonierung der humanen cDNA aus Monozyten (Rassendren et al., 1997b).

#### **1.4.2 Vorkommen und Bedeutung**

Dem P2X<sub>7</sub>-Rezeptor wird eine immunmodulatorische Wirkung zugeschrieben, da er seine höchste Expressionsrate in Zellen des Immunsystems besitzt. Der Kanal wurde im respiratorischen Epithel, in dendritischen Zellen und Lymphozyten, in Knochenmarkzellen, in Makrophagen und Histiozyten (vorkommend in Leber und Milz), in Gangzellen vom exokrinen Pankreas, in laktotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens, in Speicheldrüsen, sowie im skelettalen Gewebe in Osteoblasten und Osteoklasten nachgewiesen (Collo et al., 1997; Di Virgilio et al., 2001; Gartland et al., 2001; Mutini et al., 1999; North, 2002; Surprenant et al., 1996). Der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor hat Einfluss auf Entzündungsabläufe, Proliferationsvorgänge, Knochenbildung und Knochenresorption, sowie die Elimination von Pathogenen (Chen und Brosnan, 2006).

Extrazelluläres ATP ist der endogene Ligand und verursacht an Endotoxin-vorstimulierten Makrophagen oder Mikrogliazellen eine IL-1 $\beta$ -Sekretion (Adinolfi et al., 2005). Das IL-1 $\beta$  gelangt an die Bindungsstellen der Zielzellen und vermittelt eine Hochregulation von Genprodukten (Interleukin-6, Cyclooxygenase-2, Matrix-Metalloproteinasen, zelluläre Adhäsionsmoleküle), die für die inflammatorische Reaktion verantwortlich sind. Es steigert auch die P2X<sub>7</sub>R-Expression, sowie die Sensitivität für den synthetischen weitgehend spezifischen Agonisten Bz-ATP (Humphreys und Dubyak, 1998; Narcisse et al., 2005). Die Stimulierung des Rezeptors führt zur Entfernung von L-Selektin von der Leukozytenoberfläche, wodurch sich die Leukozytenmigration und -adhäsion verändert (Wiley und Gu, 2012). Es können zytoskelettale Veränderungen wie die Polymerisierung von Aktinfilamenten in Makrophagen ausgelöst werden, wodurch der Kanal die Phagozytose und die Fusion von Lysosomen und Phagosomen beeinflusst (Kuehnel et al., 2009a; Kuehnel et al., 2009b).

Eine Inflammation ist mit einer Azidose kombiniert und diese Protonen sind in der Lage, Nozizeptoren zu stimulieren und sensibilisieren (Dray, 1995; Marchand et al., 2005; McCleskey und Gold, 1999; Punnia-Moorthy, 1987; Wemmie et al., 2006). Flittiger und Kollegen haben gezeigt, dass die Protonen die hP2X<sub>7</sub>R-abhängige Kationenstromamplitude reduzieren und die Stromdeaktivierung in Abhängigkeit von der Art und Konzentration des verwendeten Agonisten verlangsamen. Diese Effekte können durch die Protonation von ATP erklärt werden, wodurch die effektive Konzentration vom Agonist ATP<sup>4-</sup> reduziert wird. Außerdem üben H<sup>+</sup>-Ionen einen direkten allosterischen Hemmeffekt auf die hP2X<sub>7</sub>R-Funktion aus (Flittiger et al., 2010).

Extrazelluläres ATP besitzt in hohen Konzentrationen einen permeabilisierenden und zytotoxischen Effekt auf Makrophagen. Es wurde früh vermutet, dass die ATP-vermittelten Antworten von einer Expression zytotoxischer Rezeptoren und nicht nur durch die bloße Störung der Plasmamembranintegrität bedingt sind (Steinberg und Silverstein, 1987). Durch die Blockade des P2X<sub>7</sub>R mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper wurde die ATP-vermittelte Zytotoxizität vollständig aufgehoben. Zellen, die keine Antwort auf die anti-P2X<sub>7</sub>-Antikörper zeigten, waren auch resistent gegenüber der ATP-Permeabilisierung und den zytotoxischen Effekten (Adinolfi et al., 2005). ATP ist folglich nicht nur ein intrazellulärer Energielieferant, sondern auch ein zytotoxisches Molekül. Die sehr hohen extrazellulären ATP-Konzentrationen im millimolaren Bereich treten vermutlich bei massiver Nukleotidfreisetzung durch Zellschädigung oder Lyse, oder durch reduzierte Aktivität der ATP-hydrolysierenden Enzyme auf (Adinolfi et al., 2005). ATP kann den Zelltod entweder durch Apoptose (Zellkernkondensation, DNA-Fragmentation) oder Nekrose (Zellschwellung, Freisetzung von Zellorganellen in den Extrazellulärraum) induzieren, dies ist abhängig von der Inkubationszeit, der ATP-Dosis und dem Zelltyp.

Auch bei der Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten, der Reifung von antigenpräsentierenden Zellen und der Bildung von polynukleären Riesenzellen konnte dem P2X<sub>7</sub>R eine wesentliche Bedeutung zugeschrieben werden (Baricordi et al., 1999; Chiozzi et al., 1997; Di Virgilio et al., 1999; Mutini et al., 1999; Tsukimoto et al., 2006). Die Proliferation wird wahrscheinlich durch autokrine/parakrine Stimulation durch freigesetztes ATP bedingt. P2X<sub>7</sub>R-exprimierende Zellen geben im Vergleich zu Kontrollzellen ungefähr das 4-fache an ATP ab (Baricordi et al., 1996). Es gibt zunehmende Berichte, dass dieses Protein auch mit der vermehrten Tumortransformation korreliert (Adinolfi et al., 2012; Di Virgilio et al., 2009). Die P2X<sub>7</sub>R-Expression und Funktion bei chronisch lymphatischen Leukämie (CLL)-Patienten mit der aggressiven Krankheitsvariante ist größer verglichen mit der indolenten Form. Es gibt weitere

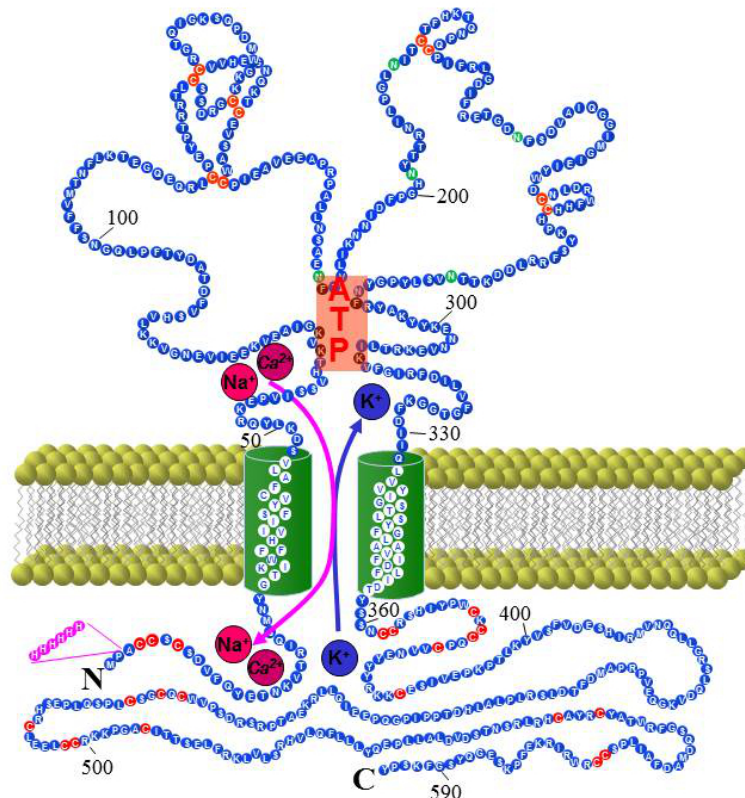


Tumoren, die eine vermehrte P2X<sub>7</sub>R-Expression aufweisen, z.B. der nicht-melanozytäre Hautkrebs, das Prostatakarzinom und das Mammakarzinom (Adinolfi et al., 2005).

Dem P2X<sub>7</sub>R werden weitere physiologische und pathophysiologische Effekte zugeschrieben, so auch eine gustatorische Komponente (nachgewiesene Expression in Geschmacksknospenzellen), bei der Pathogenese des Morbus Alzheimer, der Schmerzwahrnehmung, der Depression und fibrotischen Veränderungen im renalen interstitiellen Gewebe (Labasi et al., 2002; Lucae et al., 2006; McGeraughty und Jarvis, 2006; Parvathenani et al., 2003; Sanz et al., 2009; Shieh et al., 2006; Surprenant und North, 2008; Wilkinson et al., 2014).

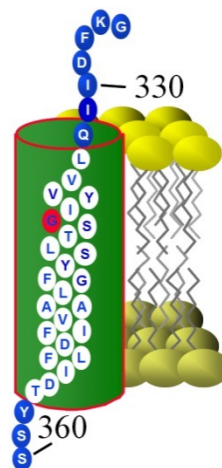
### 1.4.3 Molekulare Eigenschaften

Der P2X<sub>7</sub>R-Proteinkomplex besteht laut aktueller Datenlage aus drei Polypeptidketten, es handelt sich vermutlich wie bei allen P2X-Rezeptoren um ein Trimer (Becker et al., 2008). Er ist der längste P2XR-Vertreter mit zwei transmembranären Domänen und einer sperrigen extrazellulären Cystein-reichen Region (etwa 280 AS), welche konservierte Lysin- und Glycinreste und einige N-Glykosylierungsstellen aufweist (Adinolfi et al., 2005; Ralevic und Burnstock, 1998). Im Bereich der extrazellulären Schleife ist die Ligandenbindungsstelle für ATP lokalisiert. Die N-Terminale und die C-Terminale befinden sich im Zytoplasma (siehe Abbildung 3). Der in dieser Arbeit untersuchte Aminosäurerest G338 befindet sich in der Transmembrandomäne 2. In Abbildung 4 ist seine ungefähre Position innerhalb der Peptidkette farblich hervorgehoben. Die P2X<sub>7</sub>R-Untereinheit besitzt mit 239 AS einen viel längeren COOH-Terminus als die anderen Subtypen (Kaczmarek et al., 2012). Er weist eine zusätzliche hydrophobe Domäne (zwischen den AS 510 und 530) auf, die ausreichend lang ist, um die Plasmamembran zu durchqueren. Die Experimente von Becker et al. bestätigen die intrazelluläre Lage der C-Terminale und belegen ihre Bedeutung für die Funktion des P2X<sub>7</sub>R-abhängigen Ionenkanals (Becker et al., 2008). Dieser Bereich scheint entscheidend für die P2X<sub>7</sub>R-Porenbildung, die Transduktion und die Signalgebung bei Immunantworten und Apoptosegeschehen zu sein (Adinolfi et al., 2005). Die C-Terminale interagiert vermutlich mit assoziierten Membranproteinen (Surprenant und North, 2008). Versuche an Zellen mit einem verkürzten C-terminalen Bereich (etwa 177 AS weniger) zeigten auch eine Rezeptoraktivierung, jedoch blieb bei andauernder ATP-Applikation die Permeabilitätszunahme aus (Smart et al., 2003). Die gemessenen Stromamplituden sind deutlich kleiner als bei Zellen mit vollständigem P2X<sub>7</sub>R-C-Terminus und weisen eine veränderte Kanalkinetik auf (Becker et al., 2008).



**Abbildung 3: Aufbau der P2X<sub>7</sub>-Rezeptoruntereinheit.**

Rot = Cysteine, grün = Asparagine der N-Glykosylierungsstellen, schwarz = relevante Aminosäurereste für die ATP-Bindung.



**Abbildung 4: Vergrößerung der transmembranären Domäne 2.**

Der hier untersuchte Aminosäurerest G338 ist rot markiert.

#### 1.4.4 Elektrophysiologische Eigenschaften

Der hP2X<sub>7</sub>-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Kationenkanal. Seine Aktivierung durch niedrige ATP-Konzentrationen führt zu einer reversiblen Öffnung eines Membrankanals, welcher für kleine Kationen (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) durchlässig ist und dadurch zu einer

Membrandepolarisation (Ralevic und Burnstock, 1998). Eine Stimulation mit hohen Konzentrationen oder wiederholten Applikationen von ATP induziert in einigen Zellen die Bildung einer Pore, die permeabel für große Moleküle wie Cholin (100 Da), Ethidium (314 Da), YO-PRO-1 (376 Da) und Propidium (414 Da) ist (Adinolfi et al., 2005; Wiley et al., 1993). Diese Permeabilitätssteigerung bedingt die Zytotoxizität (Nekrose und/oder Apoptose) durch P2X<sub>7</sub>R-Aktivierung (Ralevic und Burnstock, 1998). Bisher ist nicht bekannt, ob die Permeabilitätszunahme durch eine Erweiterung des Ionenkanals oder durch die Verknüpfung des P2X<sub>7</sub>R mit einem kanalausbildenden Protein verursacht wird (North, 2002). Während der progredienten Permeabilitätszunahme bleibt der Kanal Kationen-selektiv (Virginio et al., 1999). Bz-ATP ist 10 - 30-fach aktiver als ATP und aktuell der potenteste Agonist für den P2X<sub>7</sub>R. Mit abnehmender Effektivität stehen weitere Aktivatoren zur Verfügung: ATP, 2-MeS-ATP, ATP $\gamma$ S und ADP (Surprenant et al., 1996). In Einzelkanalmessungen wurde allerdings keine aktivierende Wirkung von ADP und GTP beim hP2X<sub>7</sub>R gesehen (Markwardt et al., 1997; Riedel et al., 2007a). A $\beta$ -methyl-ATP, B $\gamma$ -methyl-ATP, UTP und Adenosin stellten sich als wirkungslos heraus (Surprenant et al., 1996). Zur Aktivierung des P2X<sub>7</sub>R sind mikromolekulare Konzentrationen von ATP notwendig. Als aktive Form des Liganden wird das freie, 4-fach negativ geladene ATP (ATP<sup>4-</sup>) angenommen (North, 2002). Dieser Zustand ist abhängig vom pH-Wert der Umgebungslösung und ihrem Ionenmilieu, sodass nicht das komplette gelöste ATP als Ligand in Frage kommt und womöglich deshalb hohe ATP-Konzentrationen benötigt werden (Jacobson et al., 2002). Ein erhöhter Anteil von freien Hydroniumionen verringert sowohl an der hochaffinen als auch an der niedrigaffinen Bindungsstelle die Potenz der Agonisten (Flittiger et al., 2010). Bereits 1997 zeigten Virginio und Kollegen, dass auch bei Bz-ATP eine Zunahme der Hydroniumionenkonzentration zum Abfall des maximalen Ionenstroms und einer verringerten YO-PRO-1-Aufnahme führt (Virginio et al., 1997). Die Entfernung von Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> vergrößert die Konzentration von freiem ATP, dem eigentlichen Agonisten (Flittiger et al., 2010).

Untersuchungen an humanen P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren deuten darauf hin, dass es hoch- und niedrigaffine ATP-Bindungsstellen gibt. Es wurde beobachtet, dass die Stromamplitude eine Zweiphasenkinetik bei der Aktivierung und Deaktivierung aufweist und somit zwei funktionell verschiedene ATP-Bindungsstellen vorliegen. Es wird angenommen, dass die initiale ATP-Bindung an die hochaffine Bindungsstelle zu einer Affinitätsverschiebung der beiden weiteren ATP-Bindungsstellen in den hoch mikromolaren Bereich führt. Die erste ATP-Bindung löst bereits einen kleinen Einzelkanalstrom aus. Die weiteren Bindungen an den geringaffinen Bindungsstellen bedingen den maximalen Einzelkanalstrom (Klapperstück et al., 2001b; North, 2002).

### 1.4.5 Antagonisten

Metallionen wie  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  hemmen konzentrationsabhängig die P2X<sub>7</sub>-abhängigen Ströme. Zum einen könnten die bivalenten Kationen an eine andere Stelle des Rezeptors binden und eine allosterische Inhibition auslösen und/oder die Konzentration an freiem ATP durch Komplexbildung ( $\text{CaATP}^{2-}$ ,  $\text{MgATP}^{2-}$ ) verringern (Klapperstück et al., 2001a; Virginio et al., 1997). Es gibt auch Hinweise für eine  $\text{Mg}^{2+}$ -Bindungsstelle in der extrazellulären P2X<sub>7</sub>-Schleife, die einen Einfluss auf die Inhibition nimmt (Acuna-Castillo et al., 2007). Chloridionen hemmen den P2X<sub>7</sub>R (Kubick et al., 2011).

Die P2X<sub>7</sub>R-Ströme sind relativ unempfindlich gegenüber Suramin (> 300  $\mu\text{M}$ ) und PPADS (50  $\mu\text{M}$ ), wohingegen das Suraminanalogon NF279 deutlich potenter ist (10  $\mu\text{M}$ ) (Klapperstück et al., 2000b; Surprenant, A., 1996). Der effektivste Antagonist scheint Brilliant Blue G zu sein, er blockt den rP2X<sub>7</sub>R bei 10 nM und den hP2X<sub>7</sub>R bei 200 nM (Donnelly-Roberts und Jarvis, 2007; Jiang et al., 2000). Oxidiertes ATP blockt irreversibel die Ströme, wenn eine 1–2 stündige Vorinkubation erfolgte, ähnliche Effekte wurden aber auch bei Strömen von P2X<sub>1</sub>R und P2X<sub>2</sub>R beobachtet (Evans et al., 1995; Seyffert et al., 2004). Calmidazolium (10 nM) blockt Bz-ATP-induzierte Ströme von rP2X<sub>7</sub>R, aber nicht von rP2X<sub>2</sub>R oder rP2X<sub>2/3</sub>R (Virginio et al., 1997). Es ist weniger effektiv beim hP2X<sub>7</sub>R (Michel et al., 2000). Weitere P2X<sub>7</sub>R-Antagonisten sind Pyrazole, Adamantanamide, Tetrazole, Dihydroimidazole, zyklische Imide, Benzoxazinone, Piperazine, Amindine, Gaunidine und KN-62 Derivate (Guile et al., 2009).

Klinische Studien erfolgten bislang bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) mit den Antagonisten CE-224,535 und AZD9056. Die Phase II b Studie von AZD9056 hat gezeigt, dass der Antagonist keine signifikant bessere Effizienz als das Placebo aufweist, gemessen an den ACR20 Kriterien. Diese Studie verdeutlicht, dass erworbene Daten von *ex vivo* Kultursystemen und Tiermodellen, welche einen positiven Effekt von AZD9056 bei der RA suggerieren, nicht zwingendermaßen mit erfolgreichen klinischen Outcomes einhergehen (Alves et al., 2013; Keystone et al., 2012). Die Studie von Stock und Kollegen ergab, dass die Gabe von CE-224,535 im Vergleich zum Placebo bei der Behandlung von Patienten mit MTX-therapierefraktärer RA nicht wirksam ist (Stock et al., 2012).

Es gibt Studien zur Behandlung von neuropathischen Schmerzen, wobei P2X<sub>7</sub>R-Antagonisten im Tiermodell einen antiinflammatorischen und analgetischen Effekt zeigten. In der *in vivo*-Elektrophysiologie am Rattenmodell reduzierte die Injektion von A438079 die schädliche Aktivität von verschiedenen Neuronen und damit die gesteigerte neuropathische Schmerzempfindlichkeit (Carroll et al., 2009; Honore et al., 2006; Hughes et al., 2007; Romagnoli et al., 2008). *In vitro* blockierte A438079 (1  $\mu\text{M}$ ) den Bz-ATP-induzierten Strom. Der Antagonist senkte auch Dosis-abhängig die IL-1 $\beta$ -Freisetzung aus peripheren Makrophagen

(McGaraughty et al., 2007). A-740003 blockierte die Agonisten-bedingte IL-1 $\beta$ -Freisetzung und die Porenformation in differenzierten humanen THP-1 Zellen. Die systemische Gabe von A-740003 führte im Spinalnervenmodell an Ratten dosisabhängig zu einer Antinozizeption (Honore et al., 2006).

Da P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren auch an der Pathophysiologie von neuropsychiatrischen Erkrankungen beteiligt sein könnten, erfolgten Analysen mit trizyklischen Antipsychotika TFP und PCP (Perazine). Beide Substanzen hemmen die P2X<sub>7</sub>R-getriggerte Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration, behindern die Porendilatation mit geringerer YO-PRO-1-Permeabilität in P2X<sub>7</sub>R-exprimierenden HEK293-Zellen, sowie humanen Makrophagen. Weder Experimente an Mäusen und Ratten mit rekombinant exprimierten P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren, noch Rattenastrozyten mit nativen P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren oder an Makrophagen von Mäusen aus dem Knochenmark zeigten eine Hemmung durch TFP oder PCP. Die Perazine wirken somit speziesspezifisch auf den humanen P2X<sub>7</sub>-Rezeptor (Hempel et al., 2013).

## 2 Zielstellung

In der Literatur der P2X-Rezeptorfamilie gibt es bereits zahlreiche Experimente, um die beteiligten Aminosäuren, welche das Schaltverhalten und die Ionenselektivität bestimmen, zu entschlüsseln (Egan et al., 1998; Jiang et al., 2001; Rassendren et al., 1997a; Yan et al., 2006).

Mit gezielten Punktmutationen wurden in der zweiten Transmembranregion des humanen P2X<sub>7</sub>R einzelne Aminosäuren gegen Cystein ersetzt und ihre Ionenkanalfunktion im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Bei diesen Vorversuchen ergab sich hierbei eine Besonderheit der hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Mutante. Oozyten, welche dieses Konstrukt exprimierten, zeigten auf ATP-Applikation im Gegensatz zum Wildtyp und allen anderen Konstrukten eine Abnahme des Ionenstroms (Pippel, A., 2009). Die zugrundeliegenden Mechanismen und damit die Bedeutung des Aminosäurerestes Glycin 338 sollten in dieser Arbeit untersucht werden, um die Funktionsweise des hP2X<sub>7</sub>R-Ionenkanals auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, so wurden Chemikalien von Sigma-Aldrich verwendet. Die eingesetzten MTS-Derivate lieferte Anatrace Affymetrics (Maumee, OH, USA).

### 3.2 Lösungen

Für die Herstellung der Lösungen wurde deionisiertes Wasser genutzt.

#### 3.2.1 Kollagenase-Lösung

15 mg Kollagenase auf 10 ml Barth-Medium 1'Ca (siehe 3.2.3)

#### 3.2.2 Narkose-Lösung

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

#### 3.2.3 Aufbewahrungslösungen

**Barth-Medium 0'Ca:** 84 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 7,5 mM Tris, 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,82 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, pH 7,4

**Barth-Medium 1'Ca:** 84 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 7,5 mM Tris, 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,82 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, pH 7,4

**Barth-Medium 1'Ca 10 µM A438079:** 84 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 7,5 mM Tris, 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,82 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01 mM A438079, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, pH 7,4

Nach der Herstellung wurden die Lösungen steril filtriert und im Kühlbrutschrank bei 19 °C aufbewahrt.

#### 3.2.4 Badlösungen

**ORi 112,5:** 100 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7,4

**ORi 002,5:** 100 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM HEPES, pH 7,4

**ORi 002,5 10 µM A438079:** 100 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM HEPES, 0,01 mM A438079, pH 7,4

**GlutRi 002,5:** 100 mM NaGlutamat, 2,5 mM KCl, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM HEPES, pH 7,4

**TrisRi 002,5:** 100 mM Tris, 2,5 mM KCl, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM HEPES, pH 7,4

#### 3.2.5 Messlösungen

**ORi 000:** 100 mM NaCl, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM HEPES, pH 7,4

**ORi 000 0,1'ATP:** 100 mM NaCl, 0,1 mM ATP, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM HEPES, pH 7,4

**GlutRi 000:** 100 mM NaGlutamat, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM Hepes, pH 7,4

**GlutRi 000 0,1'ATP:** 100 mM NaGlutamat, 0,1 mM ATP, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM Hepes, pH 7,4

**TrisRi 000:** 100 mM Tris, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM Hepes, pH 7,4

**TrisRi 000 0,1'ATP:** 100 mM Tris, 0,1 mM ATP, 0,1 mM Flufenaminsäure, 5 mM Hepes, pH 7,4

Die oben genannten Lösungen wurden für die Experimente am Wildtyp und der jeweiligen Mutante (G338C, G338A, G338S, G338E, G338K, G338H, G338L) verwendet. Zur Untersuchung der Agonistenwirkung an G338C, G338A und G338S wurden in ORi 000 je 30  $\mu$ M Bz-ATP bzw. 0,1 mM UTP in ORi 000 gelöst.

Je nach Protokoll wurden bei weiteren Messungen eines der drei MTS-Derivate (MTSEA, MTSET oder MTSES) in ORi 000/GlutRi 000/TrisRi 000 bzw. ORi 000 0,1'ATP/GlutRi 000 0,1'ATP/TrisRi 000 0,1'ATP gelöst und deren Einfluss auf den hP2X<sub>7</sub>R untersucht.

Zur Untersuchung der Blockerwirkung wurden 10  $\mu$ M A438079 in ORi 000 bzw. ORi 000 0,1'ATP gelöst.

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Herstellung der cRNA

Die verwendete cRNA (in 5 mM Tris/HCl, bei pH 7,4 gelöst) wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Günther Schmalzing (RWTH-Aachen) bereitgestellt.

#### 3.3.2 Präparation der *Xenopus laevis*-Oozyten

Die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) stellen das heterologe Expressionssystem für die cRNA vom humanen P2X<sub>7</sub>-Rezeptor dar. Die verwendeten Frösche wurden von der Arbeitsgruppe Stemmann der Universität Bayreuth gekauft. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 19 °C in mehreren Wasserbecken gehalten, unter gleichen Bedingungen erfolgte auch die Präparation und Lagerung der gewonnen Eizellen.

Die Frösche wurden mittels einer 0,2 %igen Tricain-Lösung anästhesiert. Mittels Schere wurde eine kleine Bauchinzision gesetzt, dabei wurden Haut- und Muskelschichten durchtrennt, um an das Ovar zu gelangen. Ein Teil dessen wurde reseziert und in einer Glaspetrischale mit Barth-Medium 1'Ca aufbewahrt. Um die Oberfläche und damit die Angriffsfläche zu vergrößern, wurde das Präparat auseinandergezupft. Das Resektat beinhaltete neben den Oozyten auch bindegewebige und folliculäre Elemente, von denen es durch die Kollagenaselösung getrennt wurde. Abhängig von der Oozytenanzahl, der Ovardichte und der bereits durchgeführten Operationen an dem gewählten Frosch dauerte der Kollagenaseverdau 4 - 6 h. Während dieser Zeit befanden sich die Oozyten in einem Inkubator bei 19 °C, wo sie



fortlaufend und gleichbleibend bewegt wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension mehrmals mit Barth-Medium 0'Ca Lösung gewaschen und in letzterer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Lösung  $\text{Ca}^{2+}$ -frei war, wurden hier die Zell-Zell-Kontakte (gap-junctions) zwischen den Eizellen und dem Follikelgewebe aufgebrochen. Hiernach folgte die mehrmalige Spülung mit Barth-Medium 1'Ca-Lösung. Die gewonnenen Oozyten wurden in Petrischalen in letztgenannter Lösung bis zum weiteren Gebrauch im Inkubator bei 19 °C verwahrt.

Nach gelungener Teilresektion des Ovars wurden die Schnittträger mit selbstverdauenden Fäden und Rundnadel versorgt. Die Naht wurde mit Leitungswasser gereinigt und anschließend wurde der noch betäubte Frosch in einem Aufwachbecken mit 0,5 %iger Meersalzlösung untergebracht. Bei der Lagerung war darauf zu achten, dass sich der Kopf nicht unterhalb der Wasseroberfläche befand, um ein Ertrinken des Tieres zu vermeiden. Nach Abklingen der Narkose konnte der Frosch in einem Quarantänebecken für etwa vier Wochen beherbergt werden, bis seine Wunden verheilt waren.

### 3.3.3 cRNA-Injektion

Die untersuchten Konstrukte hatten verschiedene Ursprungskonzentrationen, demnach ergab sich bei einem Injektionsvolumen von 23 nl je Oozyte eine spezifisch injizierte cRNA-Menge (siehe Tabelle 4).

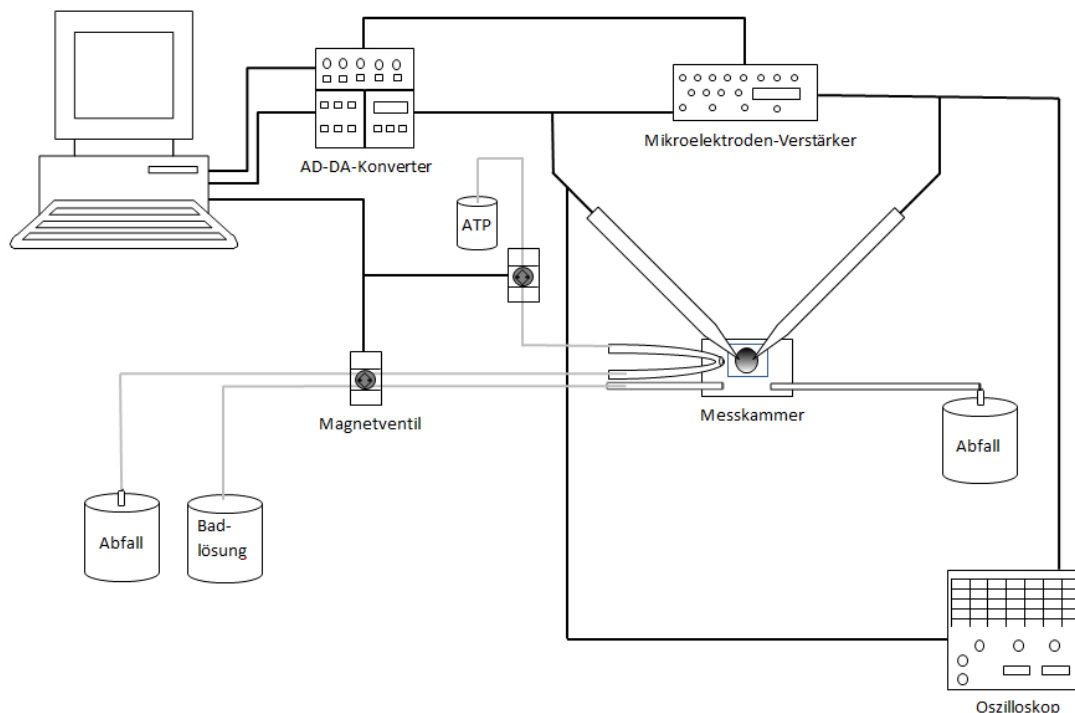
**Tabelle 4: Spezifisch injizierte cRNA-Menge.**

cRNA-Konstrukt	Konstrukt-nummer	Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	Verdünnung	injizierte Masse an cRNA [ng]
hP2X <sub>7</sub> -WT	4041	0,72	1:1	16,56
hP2X <sub>7</sub> -G338C	4249	1,28	1:1	29,44
his-hP2X <sub>7</sub> -G338A	5040	0,69	1:1	15,87
his-hP2X <sub>7</sub> -G338S	5041	0,72	1:1	16,56
his-hP2X <sub>7</sub> -G338E	5042	0,63	1:1	14,49
his-hP2X <sub>7</sub> -G338K	5043	0,69	1:1	15,87
his-hP2X <sub>7</sub> -G338H	5044	0,67	1:1	15,41
his-hP2X <sub>7</sub> -G338L	5045	0,65	1:1	14,95
hP2X <sub>7</sub> -G338E	5194	0,66	1:1	15,18
hP2X <sub>7</sub> -D197A-G338H	5208	0,69	1:1	15,87
hP2X <sub>7</sub> -G338K	5213	0,68	1:1	15,64
hP2X <sub>7</sub> -G338A	5752	0,70	1:1	16,10
hP2X <sub>7</sub> -G338S	5753	0,61	1:1	14,03
hP2X <sub>7</sub> -G338L	5754	0,69	1:1	15,87

Mithilfe einer an einen Mikromanipulator gekoppelten Mikroinjektionspumpe wurde jede Zelle separat injiziert. Nach einer Verweildauer von meist zwei Tagen im Inkubator bei 19 °C wurden die Messungen an den Oozyten durchgeführt.

### 3.3.4 Elektrophysiologisches Messverfahren

Sämtliche Daten wurden an den Oozyten mittels der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemm-Technik (Voltage-Clamp-Methode, Cole 1949) (Schwarz, W. and Rettinger, J., 2004) (siehe Abbildung 5) erhoben. Bei dieser Methode wird das Zellmembranpotential auf einen festgelegten Wert stabil gehalten. Durch Ionenkanäle bedingte Ströme, welche das transmembranäre Potential verändern würden, werden mithilfe eines Gegenstroms des Spannungsklemmverstärkers kompensiert, der somit das Maß für den Ionenkanal-abhängigen Strom ist.



**Abbildung 5: Schema Messanlage.**

Die Daten von den Elektroden werden mittels AD-DA-Konverter und Mikroelektroden-Verstärker auf den Rechner übertragen. Mittels Oszilloskop lassen sich die Signale zeitgleich beobachten. Das Öffnen und Schließen des U-Rohres erfolgt Computer-gesteuert mit Hilfe der Magnetventile. Nach Abbildung 1b aus (Becker et al., 2008).

Für den elektrischen Kontakt zu den Mikroelektroden wurden Silber/Silberchlorid-Elektroden verwendet, welche für die Versuche in Kapillaren eingeführt wurden. Diese bestanden aus Borosilicatglas und wurden mittels eines Ziehgerätes in Form von Mikroelektroden gebracht und mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. Der Eigenwiderstand der verwendeten Elektroden lag zwischen 1,0 und 1,8 MΩ. Dabei bestimmte eine der Messelektroden die Membranspannung. Die zweite Elektrode diente der Verabreichung des Gegenstroms, um bei den Messungen das Membranpotential trotz auftretender Zellmembranströme konstant zu halten. Bevor die Mikroelektroden in die Oozyten eingestochen wurden, erfolgte ein Abgleich der

Elektrodenpotentiale in ORi-Lösung (ORi 112,5). Bei Messungen in glutamathaltigen Lösungen wurden die Badelektroden über KCl-Agarbrücken an die Badlösung gekoppelt, um eine Verschiebung des Elektrodenpotentials zu verhindern. Mithilfe eines Oozyten-Spannungsklemmverstärkers (OC-725A, Hamdon, USA) wurden die Spannungsklemme erzeugt und die aufgenommenen Ströme verstärkt.

Die Strommessungen erfolgten in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Extrazellulärlösungen, um die durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bedingten Ströme zu verhindern und die Komplexbildungen des ATP mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und der damit verbundenen Abnahme des wirksamen Agonisten ATP zu vermeiden (Falzoni et al., 1995; Markwardt et al., 1997). Das Fehlen von bivalenten Kationen verursacht in *Xenopus laevis* Oozyten einen Leckstrom. Um diesen Effekt zu unterdrücken, wurde der Lösung 0,1 mM Flufenaminsäure beigelegt (Klapperstück et al., 2000a; Weber et al., 1995). Dabei ist zu beachten, dass es durch die Zugabe von Flufenaminsäure zu einer leichten Verstärkung der ATP-induzierten  $\text{hP2X}_7\text{R}$ -abhängigen Ströme um den Faktor  $1,25 \pm 0,14$  kommt (Klapperstück et al., 2000a).

Während der Versuche befanden sich die Oozyten bei Raumtemperatur in einer Badkammer mit 0,1 ml Fassungsvermögen. Für die Messungen waren rasche Lösungswechsel notwendig, welche durch zwei Computer-gesteuerte Magnetventile und ein modifiziertes U-Rohr-System ermöglicht wurden (Bretschneider und Markwardt, 1999). Mittels dieser Methode wurde eine Durchflussgeschwindigkeit der Extrazellulärflüssigkeit von ca.  $75 \mu\text{l/s}$  aufrechterhalten, die Einwaschzeit betrug dabei  $1210 \pm 70 \text{ ms}$  und die Auswaschzeit  $1770 \pm 170 \text{ ms}$  (Bretschneider und Markwardt, 1999; Klapperstück et al., 2000a). Eine Applikation der Messlösungen dauerte 12 s. Die Mindestzeit zwischen den einzelnen Applikationen lag bei 3 min. In dieser Zeit wurden die Zellen von ORi-Lösung (ORi 112,5) umspült.

Die Applikation von Spannungsrampen und die Auswertung des Gesamtstroms über die Zellmembran in Abhängigkeit von der geklemmten Spannung erlauben eine exakte Erfassung von Umkehrpotentialen und die Bestimmung von Eigenschaften wie Auswärts- oder Einwärtsleitfähigkeit oder Gleichrichtung. Die Gesamtleitfähigkeiten werden an den jeweiligen Umkehrpotentialen durch die Anstiege der Tangenten definiert. Das jeweilige Umkehrpotential ( $I = 0$ ) stellt die Spannung am Schnittpunkt des Graphen mit der Abszisse dar. Beim verwendeten Rampenmodus ändert sich jede Sekunde das Haltepotential für 300 ms rampenförmig von  $-80 \text{ mV}$  auf  $+40 \text{ mV}$ , um anschließend zum Haltepotential von  $-40 \text{ mV}$  zurückzukehren (siehe Abbildung 6). Die Bestimmung der Leitfähigkeit für das führende Außenion und das intrazellulär vorherrschende Kaliumion erfolgte anhand des Anstiegs der

Strom-Spannungskurve. Hierzu wurde während der Rampe bei der Applikation die Stromstärke gegen die Spannung aufgetragen, wodurch sich auch das Umkehrpotential des Stroms bemessen ließ. Die Permeationseigenschaften wurden anhand der Veränderungen der ermittelten Umkehrpotentiale in den verschiedenen calciumfreien Badlösungen untersucht. Um den Einfluss von Kationen zu untersuchen, wurde  $\text{Na}^+$  der ORI-Lösung durch das größere organische Kation  $\text{Tris}^+$  ersetzt. Der Einfluss von Anionen wurde durch den Austausch von  $\text{Cl}^-$  durch das größere organische Anion  $\text{Glutamat}^-$  analysiert. Wenn nicht anders angegeben erfolgten die Messungen unter Standardbedingungen nach Injektion von 23 nl cRNA-Lösung und zweitägiger Inkubation. Die Ausgangsleitfähigkeiten wurden 5 s vor Applikation der Messlösung, die induzierten Leitfähigkeitsänderungen wurden nach 5 s andauernder Applikation gemessen.

### 3.3.5 Datenverarbeitung

Die Messungen wurden mittels der Computerprogramme „SP\_Multi“ und „SP\_Analyzer“ aufgezeichnet bzw. sortiert und exportiert (beides im Julius Bernstein Institut für Physiologie entwickelte Software) und mittels „Microsoft Excel“ statistisch ausgewertet. Die graphische Umsetzung der Messergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Sigma Plot 8.0 (SPSS, Chicago, USA). Die errechneten Mittelwerte (MW) von jeweils 11 Oozyten pro Konstrukt wurden jeweils  $\pm$  entsprechendem Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mittels „Sigmaplot“ ausgeführt. Zur statistischen Datenanalyse diente ANOVA mit anschließendem multiplen t-Test. Die Signifikanz für die maximale Irrtumswahrscheinlichkeit wurde bei 5 % festgesetzt ( $p < 0,05$ ).

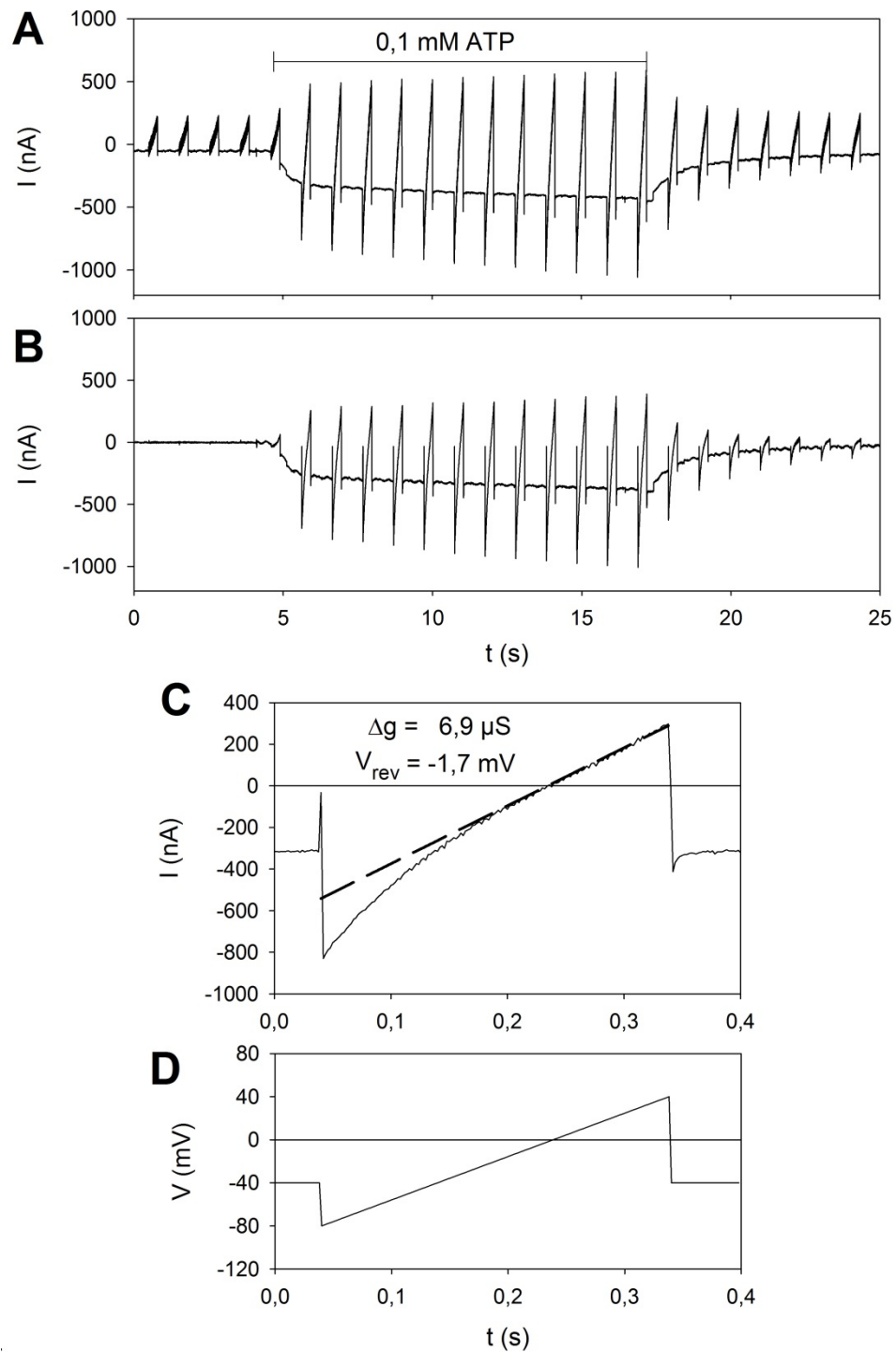
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Konstrukte auf die Leitfähigkeit und das Umkehrpotential

Zunächst wurde geprüft, wie sich die Oozytenleitfähigkeit nach Applikation des P2X<sub>7</sub>R-Agonisten ATP verändert und welche Werte das Umkehrpotential der ATP-induzierten (bzw. ATP-verminderten) Leitfähigkeit besaß.

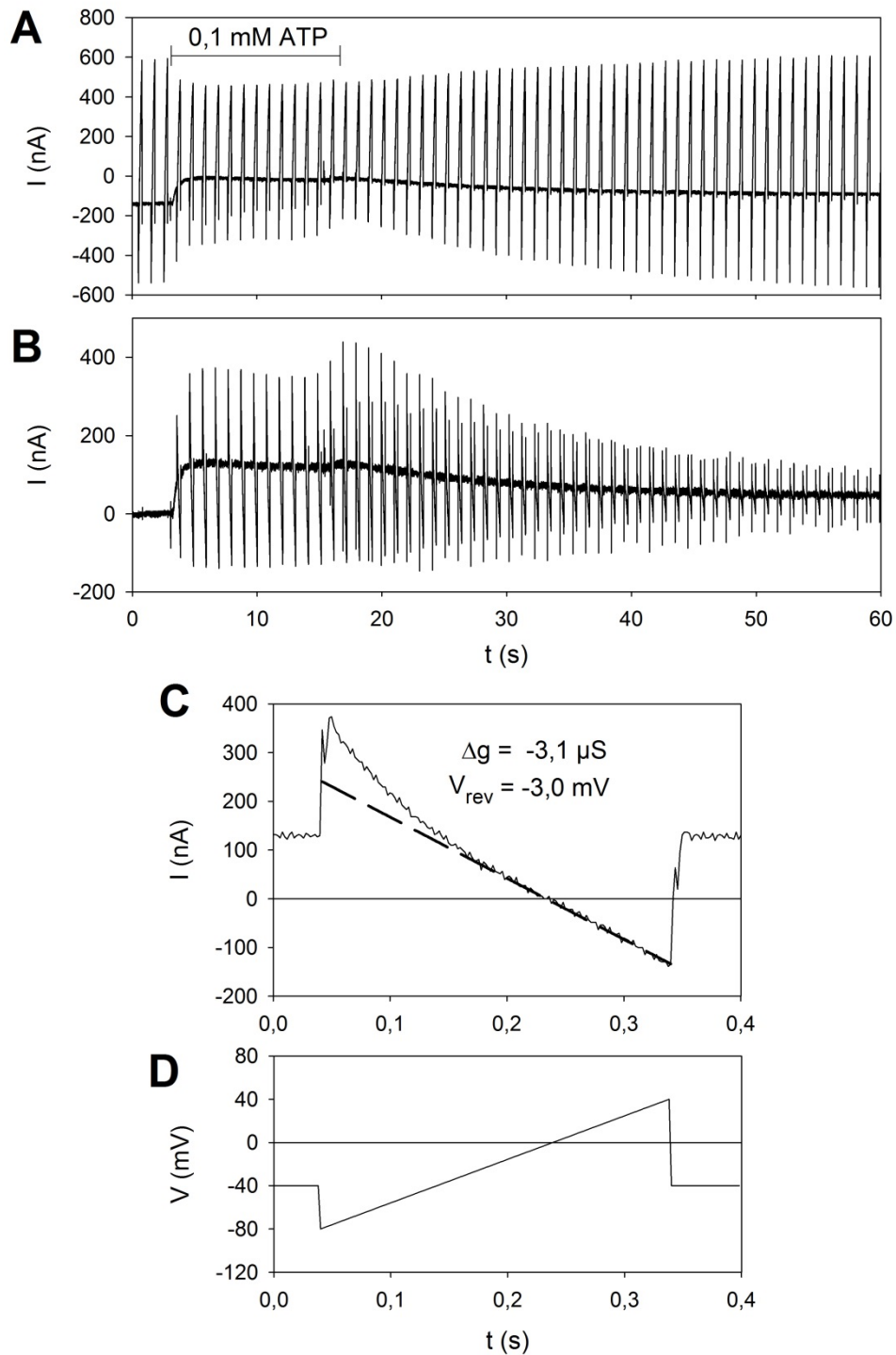
Die Differenz zwischen den Rampenströmen vor der ATP-Applikation (Leckstrom) und während der ATP-Applikation ergibt die ATP-induzierten bzw. ATP-verminderten Rampenströme und wurde als Maß für die hP2X<sub>7</sub>R-abhängige Ionenkanalaktivität betrachtet. In der Elektrophysiologie bedeutet ein positiver Strom einen Einstrom negativer oder einen Ausstrom positiver Ladungen in die bzw. aus der Zelle.

Die Leitfähigkeit der Zellmembran von hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp-exprimierenden Oozyten erhöhte sich nach Zugabe von 0,1 mM ATP. Nach Beendigung der Agonistengabe ist ein sofortiger Rückgang der Ströme zu verzeichnen (siehe Abbildung 6). Im Vergleich dazu nimmt die Leitfähigkeit von hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-exprimierenden Oozyten nach ATP-Applikation ab (siehe Abbildung 7). In der Abbildung 7 B und C sind somit die durch ATP-Applikation verminderten Rampenströme dargestellt.



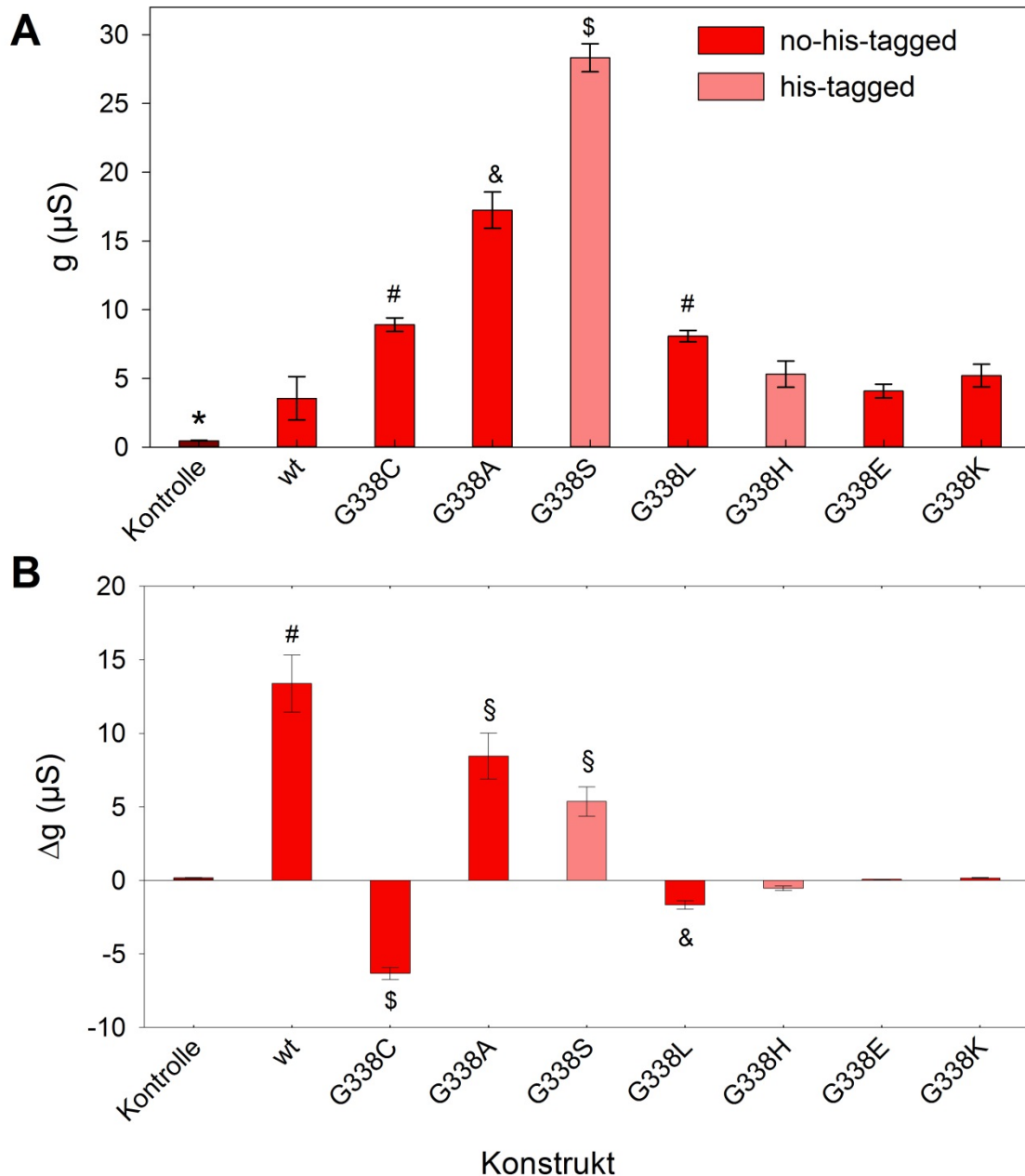
**Abbildung 6: Beispiele für Stromkurven während der Applikation von 0,1 mM ATP bei einer hP2X<sub>2</sub>-wtR-exprimierenden Oozyte.**

Die Zellen wurden auf ein Ruhepotential von -40 mV geklemmt, unterbrochen durch die unten gezeigte Spannungsrampe (D). (A) stellt den Originalstrom vor und (B) den Strom nach Subtraktion des mittleren Rampenstromes vor der Applikation der ATP-haltigen Messlösung dar. (C) zeigt eine Vergrößerung des 5. Rampenstromes mit linearer Approximation der Spannungsabhängigkeit. Messung in ORi 002,5.



**Abbildung 7: Beispiele für Stromkurven während der Applikation von 0,1 mM ATP bei einer hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>-R-exprimierenden Oozyte.**

Die Zellen wurden auf ein Ruhepotential von -40 mV geklemmt, unterbrochen durch die unten gezeigte Spannungsrampe (D). (A) stellt den Originalstrom vor und (B) den Strom nach Subtraktion des mittleren Rampenstromes vor der Applikation der ATP-haltigen Messlösung dar. (C) zeigt eine Vergrößerung des 5. Rampenstromes mit linearer Approximation der Spannungsabhängigkeit. Messung in ORi 002,5.



**Abbildung 8: Einfluss der hP2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>R-Konstrukte auf die Leitfähigkeit.**

Membranleitfähigkeit  $g$  vor ATP-Applikation (A), durch Applikation von 0,1 mM ATP induzierte Leitfähigkeitsänderung  $\Delta g$  (B) von hP2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>R-Konstrukten in NaCl-haltiger Extrazellulärlösung (signifikante Veränderungen werden durch verschiedene Symbole markiert, Werte mit gleichen Symbolen sind nicht signifikant voneinander verschieden). Das G338S-Konstrukt war N-terminal his-getagt. Als Kontrolle dienen nicht injizierte Oozyten. Messung in ORI 002,5. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Der Einfachheit halber werden die hP2X<sub>7</sub>R-Konstrukte im Folgenden meist nur nach ihrer Mutation benannt, also z.B. hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R als G338C bezeichnet. Aus Abbildung 8 A geht hervor, dass die Ausgangsleitfähigkeiten der hP2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>R-Konstrukt-exprimierenden Oozyten größtenteils verschieden von denen der hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp-exprimierenden Oozyten waren. Besonders starke, signifikante Unterschiede ergaben sich für die Konstrukte G338C, G338A,



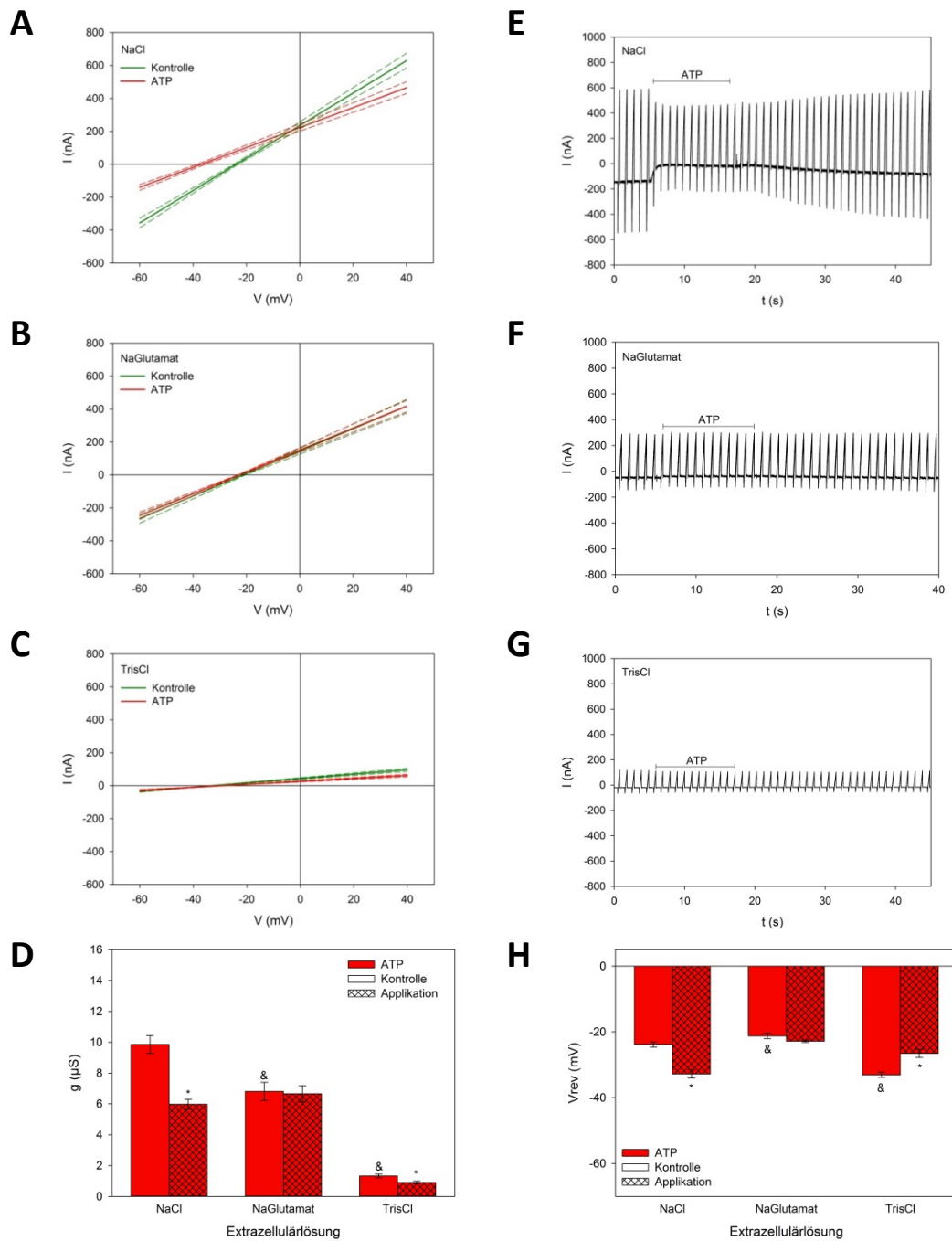
his-G338S sowie G338L. Bei den Messungen mit dem Konstrukt G338S waren die Oozyten bereits vor der Durchführung abgestorben, sodass an ihnen keine Daten erhoben werden konnten.

Die ATP-induzierten Leitfähigkeiten der  $\text{hP2X}_7^{\text{G338X}}$ -Konstrukte in  $\text{Na}^+$ -haltiger Extrazellulärlösung sind in der Abbildung 8 B dargestellt. Der erwartete Effekt, eine Zunahme der Ionenleitfähigkeit wie vielfach für den hP2XR beschrieben, wurde nur bei den Konstrukten  $\text{hP2X}_7^{\text{G338A}}$ R und  $\text{his-hP2X}_7^{\text{G338S}}$ R beobachtet. Abweichend hiervon zeigten die  $\text{hP2X}_7^{\text{G338C}}$ R- und  $\text{hP2X}_7^{\text{G338L}}$ R-Mutanten eine Reduktion der Leitfähigkeit durch die ATP-Applikation. Das his-getagte Konstrukt G338H, sowie die G338E- und G338K-Konstrukte zeigten nur geringe Veränderungen in der Leitfähigkeit, die nicht signifikant verschieden von den nicht injizierten Oozyten waren. Ursache hierfür könnte die niedrige Expression in der Oozytenzellmembran sein. Diese Konstrukte wurden im Folgenden nicht weiter untersucht.

Beispielhaft für G338-Konstrukte, die ATP-abhängig eine Leitfähigkeitsab- bzw. -zunahme zeigten, wurden die Konstrukte G338C und G338A näher untersucht und hier die entsprechenden I-V-Diagramme (Abbildung 9 A-C) und Rampenströme (Abbildung 9 E-G), die durch die Spannungsrampen ausgelöst wurden, im Detail dargestellt.

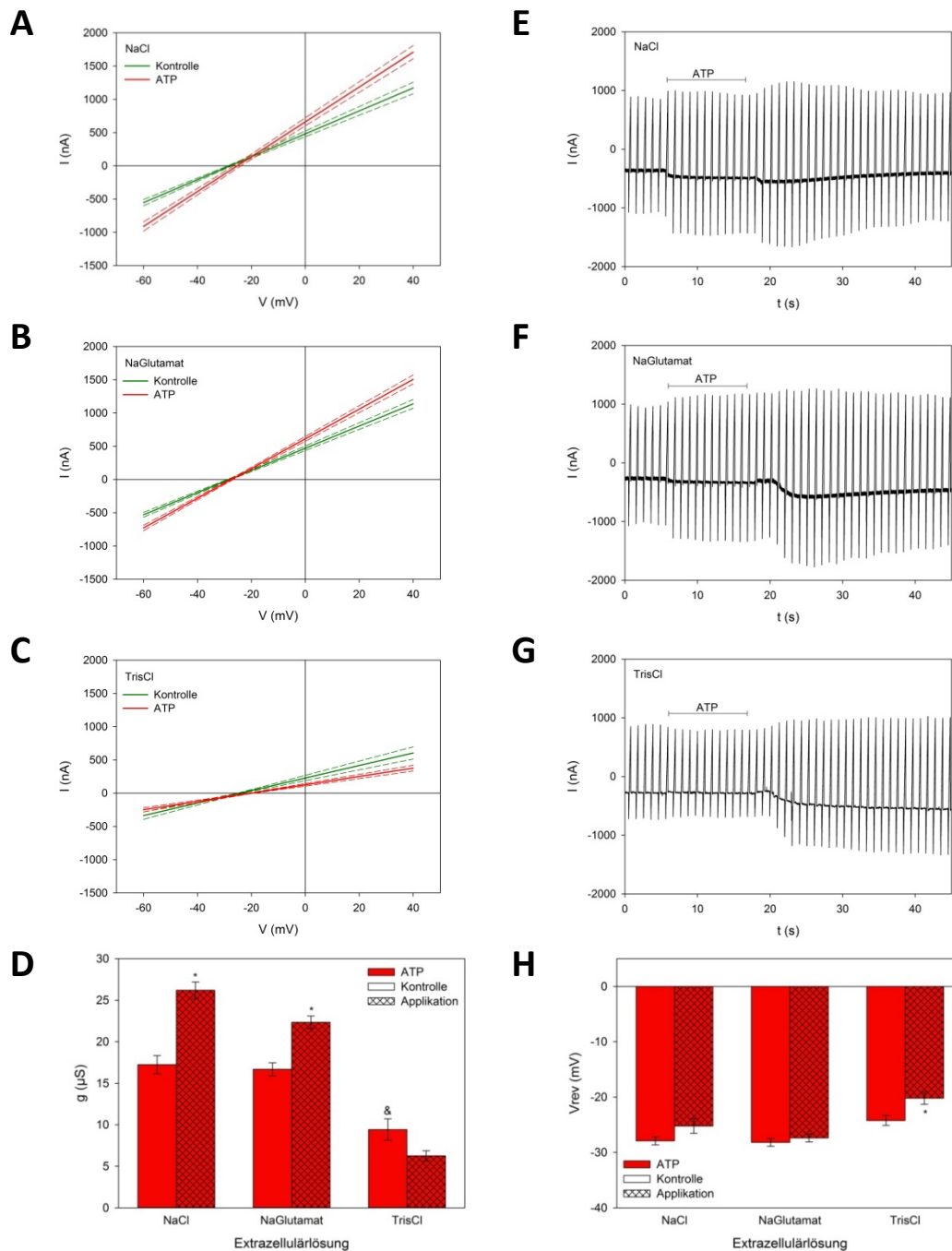
Aus der Abbildung 9 D geht hervor, dass die ATP-Applikation beim  $\text{hP2X}_7^{\text{G338C}}$ R-Konstrukt in NaCl und TrisCl zu einer signifikanten Reduktion der Leitfähigkeit führt. Bei Glutamat-haltiger Extrazellulärlösung zeigt die ATP-Applikation keinen signifikanten Effekt.

Abbildung 9 H zeigt, dass die ATP-Applikation in  $\text{Cl}^-$ -haltiger extrazellulärer Lösung eine signifikante Negativierung des  $V_{\text{rev}}$ 's induziert, wohingegen es in TrisCl zu einer signifikanten Positivierung kommt. Diese Veränderungen des Umkehrpotentials lassen sich aus den I-V-Kurven (siehe Abbildung 9 A) erklären. Liegt das Umkehrpotential des ATP-blockierten Stroms (=Schnittpunkt der roten und der grünen Linie) positiver als das Ausgangspotential vor der ATP-Applikation (Schnittpunkt der roten Linie mit der Abszisse), kommt es zu einer Negativierung des Membranpotentials durch die Applikation (Schnittpunkt der roten Linie in Abbildung 9 A mit der Abszisse). Liegt das Umkehrpotential des ATP-blockierten Stroms negativer als das Ausgangspotential (wie in  $\text{Tris}^+$ -haltiger Extrazellulärlösung), ist eine Positivierung des Membranpotentials durch ATP zu erwarten. Dieses Ergebnis deutet auf eine Verschiebung des Umkehrpotentials des ATP-blockierten Stroms bei Austausch von  $\text{Na}^+$  durch  $\text{Tris}^+$  und somit auf eine Kationenleitfähigkeit des G338C-induzierten Leckstroms (siehe auch Abbildung 11).



**Abbildung 9: Charakterisierung der Ionenleitfähigkeit von hP2X<sub>7</sub><sup>G338R</sup>-exprimierenden Oozyten.**

A, B, C: I-V-Diagramme der Leitfähigkeiten vor und während ATP-Applikation, E, F, G: entsprechende fortlaufende Beispielregistrierungen der Oozytenströme, die Dauer der Applikation von 0,1 mM ATP ist angegeben. Die Messungen wurden in NaCl- (E), NaGlutamat- (F) bzw. TrisCl- (G) haltiger Ringerlösung durchgeführt. D, H: Statistik der Leitfähigkeiten (G) bzw. Umkehrpotentiale (H) vor und während ATP-Applikation (\* signifikante ATP-induzierte Änderung, & signifikant verschieden von Konstrukten in NaCl).



**Abbildung 10: Charakterisierung der Ionenleitfähigkeit von hP2X<sub>7</sub><sup>G338A</sup>-R-exprimierenden Oozyten.**

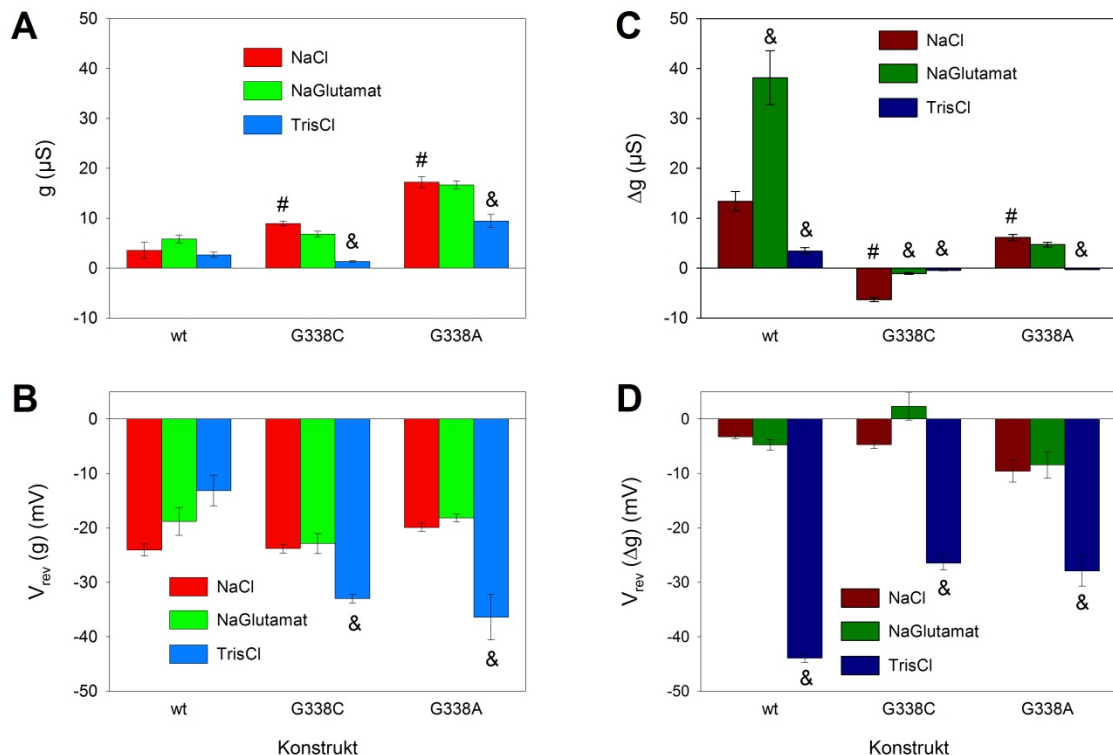
A, B, C: I-V-Diagramme der Leitfähigkeiten vor und während ATP-Applikation, E, F, G: entsprechende fortlaufende Beispielregistrierungen der Oozytenströme, die Dauer der Applikation von 0,1 mM ATP ist angegeben. Die Messungen wurden in NaCl- (E), NaGlutamat- (F) bzw. TrisCl- (G) haltiger Ringerlösung durchgeführt. D, H: Statistik der Leitfähigkeiten (D) bzw. Umkehrpotentiale (H) vor und während ATP-Applikation (\* signifikante ATP-induzierte Änderung, & signifikant verschieden von Konstrukten in NaCl).

Die Abbildung 10 D veranschaulicht, dass die ATP-Applikation bei der hP2X<sub>7</sub><sup>G338A</sup>-R-Mutante in NaCl- und Glutamat-haltiger Extrazellulärlösung zu einer signifikanten Zunahme der

Leitfähigkeit führt. Bei TrisCl-haltiger Extrazellulärlösung induziert die ATP-Zugabe keine signifikante Leitfähigkeitsänderung.

Abbildung 10 H zeigt lediglich bei TrisRi eine signifikante ATP-induzierte Positivierung des Umkehrpotentials bei G338A-exprimierenden Oozyten. Die Umkehrpotentiale der Ausgangsleitfähigkeiten weisen bei der G338A-Mutante innerhalb der verschiedenen extrazellulären Lösungen keinen signifikanten Unterschied auf.

## 4.2 Einfluss der Extrazellulärlösung auf die $hP2X_7^{G338X}R$ -Konstrukte



**Abbildung 11: Einfluss von extrazellulären Kationen und Anionen auf die  $hP2X_7^{G338X}R$ -Konstrukte.**

Statistischer Effekt der verschiedenen Oozytenringerlösungen auf die Ausgangsleitfähigkeit (A), das Umkehrpotential der Ausgangsleitfähigkeit  $V_{rev}(g)$  (B), die Leitfähigkeitsänderung induziert durch die Applikation von 0,1 mM ATP ( $\Delta g$ ), wobei negative  $\Delta g$ -Werte eine Leitfähigkeitsabnahme anzeigen (C) und das Umkehrpotential der ATP-induzierten Leitfähigkeit  $V_{rev}(\Delta g)$  (D). (# signifikant verschieden vom Wildtyp, & signifikant verschieden von Messungen in NaCl (ORI 002,5)).

Abbildung 11 A zeigt, dass die Ausgangsleitfähigkeiten von G338C- und G338A-exprimierenden Oozyten in extrazellulärer NaCl-Lösung signifikant größer als die, der  $hP2X_7R$ -Wildtyp-exprimierenden Oozyten sind. Beim Wechsel zu TrisCl als Extrazellulärlösung wird bei diesen Konstrukten die Ausgangsleitfähigkeit signifikant verkleinert.

In Abbildung 11 B werden die Umkehrpotentiale der  $hP2X_7^{G338X}R$ -Konstrukte in der jeweiligen Extrazellulärlösung dargestellt. Beim G338C- und G338A-Konstrukt führt der Wechsel der extrazellulären Lösungen von NaCl zu TrisCl zu einer signifikanten Negativierung des

Umkehrpotentials. Diese Befunde deuten darauf hin, dass durch die Expression dieser zwei Konstrukte eine Ruhe-Kationenleitfähigkeit entsteht.

Abbildung 11 C stellt den Einfluss der Extrazellulärlösung auf die ATP-induzierte Leitfähigkeit dar. Beim hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp kommt es durch die Substitution von Cl<sup>-</sup> durch Glutamat<sup>-</sup> zu einer bereits bekannten Erhöhung der ATP-induzierten Leitfähigkeit (Kubick et al., 2011), deren Mechanismus allerdings unklar ist. Die Cl<sup>-</sup>-Substitution vermindert die ATP-induzierte Leitfähigkeitsverminderung beim Konstrukt G338C. Auch hier bleibt der zugrundeliegende Mechanismus unklar. Die Na<sup>+</sup>-Substitution durch das größere Kation Tris<sup>+</sup> führt bei allen drei untersuchten Konstrukten zu einer Verminderung der ATP-induzierten Leitfähigkeitsveränderung. Zusammen mit den signifikanten Negativierungen des Umkehrpotentials der ATP-induzierten Leitfähigkeitsveränderungen in Tris<sup>+</sup>-haltiger Extrazellulärlösung (siehe Abbildung 11 D) deutet dies für alle drei Konstrukte auf eine Kationenleitfähigkeit hin.

#### **4.3 Effekte von P2X<sub>7</sub>R-Agonisten und -Antagonisten an hP2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>R-Konstrukten**

Um den Einfluss von P2X<sub>7</sub>-Agonisten und -Antagonisten auf die Leitfähigkeit bei hP2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>R-exprimierenden Oozyten besser zu verstehen, werden hier die entsprechenden Rampenströme, die durch die Spannungsrampen ausgelöst wurden, im Detail dargestellt.

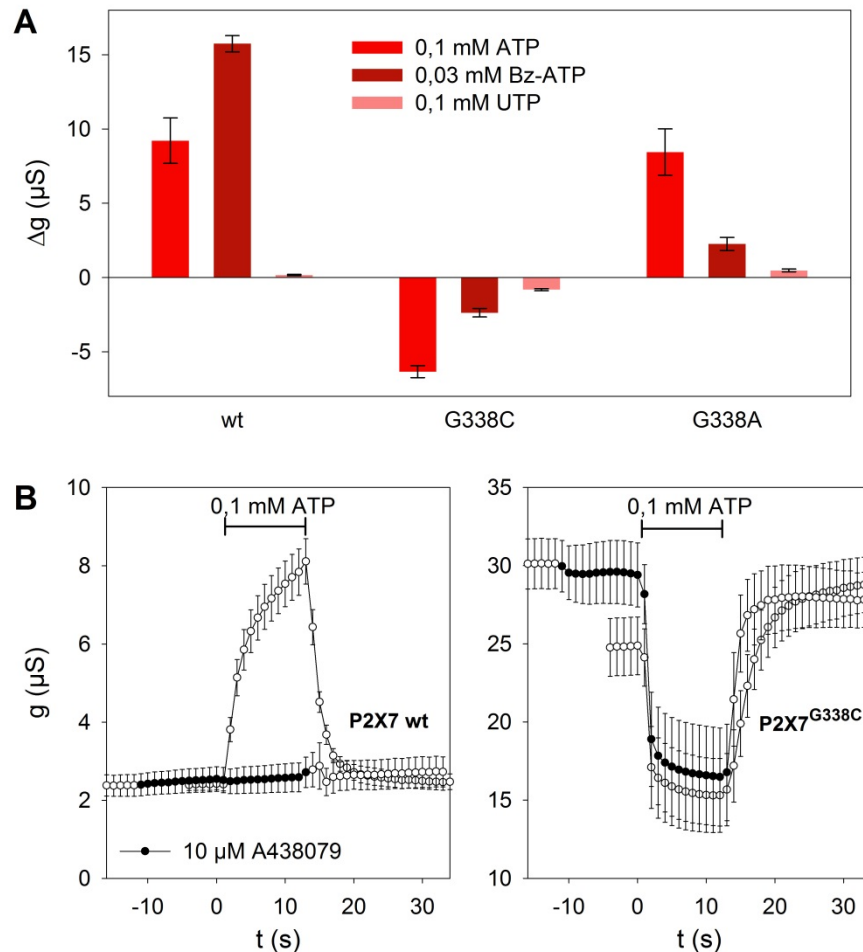
Aus der Abbildung 12 A geht hervor, dass beim Wildtyp die Bz-ATP-Applikation im Vergleich zu ATP eine etwa doppelte Zunahme der Leitfähigkeit bewirkt. Die Zugabe von UTP führt zu keiner signifikanten Veränderung der Leitfähigkeit.

Beim Konstrukt G338C führen alle Nukleotid-Applikationen zu einer signifikanten Leitfähigkeitsverminderung. Im Vergleich der Agonisten-induzierten Leitfähigkeitsänderungen ist ATP potenter als Bz-ATP. Auch UTP verursacht eine geringe, signifikante Leitfähigkeitsabnahme.

Untersuchungen am G338A-Konstrukt ergaben nur bei ATP und Bz-ATP eine signifikante Zunahme der Leitfähigkeit. Die Applikation von Bz-ATP besitzt nur eine etwa 25 %ige Wirksamkeit gegenüber ATP.

Der ATP-Effekt an den hP2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>R-Konstrukten kann demnach auch durch deutlich geringere (30 µM) Bz-ATP-Konzentrationen ausgelöst werden. Ein Effekt, durch die gleiche (0,1 mM) UTP-Konzentration konnte dagegen kaum gesehen werden. Dies spricht dafür, dass die gemessenen Effekte durch die Bindung der Nukleotide an den hP2X<sub>7</sub>-Rezeptor ausgelöst wurden.

Aus der Abbildung 12 B links wird deutlich, dass der Blocker A438079 bei den Wildtyp-exprimierenden Oozyten die ATP-induzierte Leitfähigkeitszunahme sehr gut hemmen kann, wohingegen bei der G338C-Mutante keine Beeinflussung des Effekts der ATP-Applikation durch die Blockerzugabe zu verzeichnen ist (siehe Abbildung 12 B rechts).



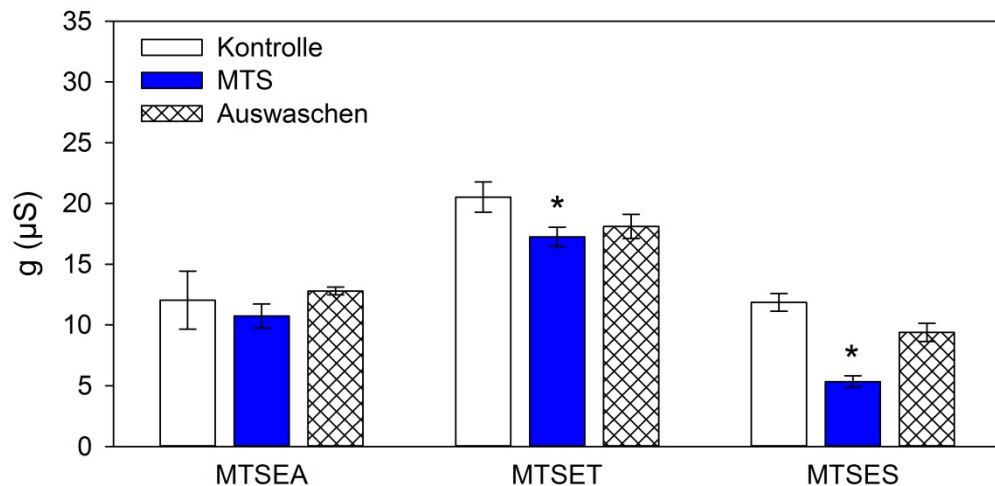
**Abbildung 12: Effekt von Purinorezeptoragonisten und -antagonisten auf ATP-induzierte Leitfähigkeitsänderungen von hP2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>R-Konstrukten.**

Leitfähigkeitsänderung  $\Delta g$  induziert durch verschiedene Nukleotide (A). Effekte des P2X<sub>7</sub>R-Blockers A438079 auf ATP-induzierte Veränderungen der hP2X<sub>7</sub>R-abhängigen Leitfähigkeit  $g$  (B). Links: Effekt beim hP2X<sub>7</sub>wtR, Rechts: Effekt beim hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R.

Die Zeit der Nukleotidapplikation (0,1 mM ATP, 30 μM Bz-ATP, 0,1 mM UTP) betrug 12 s. Die Nukleotid-induzierten Leitfähigkeitsänderungen wurden nach 3 s dauernder Applikation gemessen. Bei der Messung mit dem Antagonisten betrug die Applikationszeit für 0,1 mM ATP bzw. 0,1 mM ATP + 10 μM A438079 12 s.

#### 4.4 Effekte der SH-Gruppen-modifizierenden MTS-Derivate am hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Konstrukt

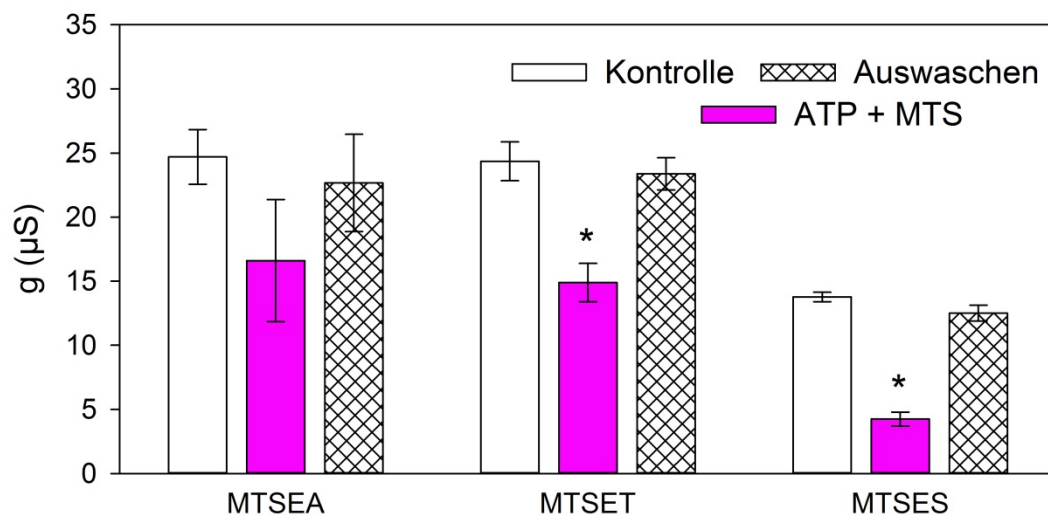
Um die Effekte der SH-Gruppen-modifizierenden Methanthiosulfonat-Applikationen auf die Leitfähigkeit zu verdeutlichen, werden hier die entsprechenden Messungen gegenüber gestellt.



**Abbildung 13: Effekt von MTS-Derivaten MTSEA, MTSET und MTSES auf die Leitfähigkeit von  $hP2X_7^{G338C}$ -exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten.**

Die Messungen erfolgten bei einem Rampenpotentialverlauf von -80 mV bis +40 mV in calciumfreier Lösung. Die Zeit der Applikation von 0,75 mM MTSEA bzw. MTSET bzw. MTSES betrug 12 s. Die Ausgangsleitfähigkeiten wurden 5 s vor Applikation, die Methanthiosulfonat-Leitfähigkeiten wurden nach 3 s dauernder Applikation von Methanthiosulfonatderivaten gemessen.

Aus der Abbildung 13 geht hervor, dass die Methanthiosulfonatderivate MTSET und MTSES eine signifikante, reversible Abnahme der Oozytenleitfähigkeit von  $hP2X_7^{G338C}$ -exprimierenden Oozyten hervorrufen.



**Abbildung 14: Effekt von ATP + MTS-Derivaten auf die Leitfähigkeit von  $hP2X_7^{G338C}$ -exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten.**

Die Abbildung 14 zeigt, dass auch die Applikation der Methanthiosulfonatderivate zusammen mit dem P2X<sub>7</sub>R-Agonisten ATP eine reversible Abnahme der Oozytenleitfähigkeit bedingen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Mutagenese

Alle P2XR-Untereinheiten besitzen eine relativ hohe Homologie innerhalb ihrer Aminosäuresequenz von den N-Termini bis zu den TM2-Domänen, wobei die P2X<sub>7</sub>R-Sequenz am stärksten mit dem P2X<sub>4</sub>R (48,6 % paarweise Aminosäureübereinstimmung) verwandt ist (North, 2002). Ein Sequenzabgleich der sieben rP2XR transmembranären Domänen ergab, dass die Positionen Y40, G345 und D352 vollkonserviert entlang aller Säugetier-P2XR-Subtypen sind. Der Rest G338 ist in fünf von sieben P2XRs präsent (siehe Abbildung 15). Beim P2X<sub>7</sub>R der Spezies Mensch, Ratte, Schopffaffe, Hund und Maus befindet sich an der Stelle TM2 338 ein Glycin (Jiang et al., 2013).

		TM2																								
P2X <sub>7</sub>	333	L	V	V	Y	I	G	S	T	L	S	Y	F	G	L	A	T	V	C	I	D	L	I	I	N	356
P2X <sub>1</sub>	331	M	T	T	T	I	G	S	G	I	G	I	F	G	V	A	T	V	L	C	D	L	L	L	L	354
P2X <sub>2</sub>	330	T	T	I	N	L	A	T	A	L	T	S	I	G	V	G	S	F	L	C	D	W	I	L	L	353
P2X <sub>3</sub>	317	T	T	I	S	S	V	A	A	F	T	S	V	G	V	G	T	V	L	C	D	I	I	L	L	340
P2X <sub>4</sub>	335	T	M	I	N	V	G	S	G	L	A	L	L	G	V	A	T	V	L	C	D	V	I	V	L	358
P2X <sub>5</sub>	336	T	V	I	N	I	G	S	G	L	A	L	M	G	A	G	A	F	F	C	D	L	V	L	I	359
P2X <sub>6</sub>	329	T	A	I	T	V	G	T	G	A	A	W	L	G	M	V	T	F	L	C	D	L	L	L	L	352

#### Abbildung 15: Sequenzabgleich von rP2X<sub>1-7</sub>Rs (North, 2002).

Es beinhaltet die Aminosäurereste, welche homolog für die TM2-Domänen der rP2XRs sind.

Das rP2X<sub>7</sub>R-Homologiemodell ergab, dass die Position G338 in einem Bereich lokalisiert ist, wo sich die TM2-Helices gegenseitig überkreuzen und die TM-Pore am engsten ist. Die Aminosäure G338 befindet sich in der vermuteten Gate-Region (zwischen den Aminosäuren Y336 und S342), sofern das zP2X<sub>4</sub>-Rezeptormodell auf den hP2X<sub>7</sub>R übertragen werden kann (Kawate et al., 2009).

Jindrichova und Kollegen führten Alaninsubstitutionen an Aminosäureresten der ersten Transmembrandomäne (TM1) durch, um deren Einfluss auf die Porenöffnung und Agonistensensitivität beim P2X<sub>7</sub>R-Kanal zu untersuchen. Ihre Messungen ergaben, dass die aromatischen Reste Y40 und F43 entscheidend für die große Porenöffnung und die Rezeptorsensitivität sind. Die Reste bei oder nahe dem Schnittpunkt der TM2-Helices (also auch in der Nähe des Aminosäurerests G338) kontrollieren die Porenformation beim rP2X<sub>7</sub>R (Jindrichova et al., 2015).

Der rP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp antwortet auf eine 60 s Applikation 100 µM Bz-ATP mit einem biphasischen Strom, der sich aus einem initialen Spitzenstrom (I<sub>1</sub>) und einem zweiten, anhaltend zunehmenden Strom (I<sub>2</sub>) bis zum Erreichen eines Plateaus, zusammensetzt. Die



rP2X<sub>7</sub><sup>G338A</sup>-Mutante zeigte keine oder eine kleine, zweite Stromzunahme als Antwort auf eine anhaltende Applikation von 100 µM Bz-ATP. Verglichen mit dem Wildtyp wies die G338A-Mutante eine signifikant niedrigere, maximale Stromamplitude auf. Die Deaktivierung war sehr langsam, sodass der Strom nie ein Grundlevel für eine erneute Agonistengabe erreichte. Dies impliziert, dass sich diese Kanäle nicht schließen können. Die reduzierte, maximale Stromamplitude lässt sich durch eine signifikant, geringere Expression der Rezeptoren in der Plasmamembran erklären (Jindrichova et al., 2015) (siehe Abbildung 17 A). Damit scheint die Alaninsubstitution den Rezeptoreinbau und folglich auch deren Funktion zu beeinflussen. Das überrascht, da Glycin und Alanin beinahe die gleiche Größe, sowie gleiche relative Hydrophobie haben und zuverlässig alle anderen in der Mutagenese ersetzen. Der Unterschied ist, dass das Glycin eine größere konformative Freiheit als das unflexible Alanin besitzt, sodass bei einem Wechsel von Glycin zu Alanin eine Zunahme der Rigidität der Peptide zu erwarten ist (Hattori und Gouaux, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte der verringerte Bz-ATP-Effekt gegenüber dem Wildtyp beim hP2X<sub>7</sub>R bestätigt werden (siehe Abbildung 12), was auch dafür spricht, dass das Aktivierungsverhalten bzw. das Agonistenprofil durch die G338-Mutation verändert ist.

Es folgten weitere Experimente an rP2X<sub>7</sub>R-exprimierenden HEK293-Zellen, um genaueres zur Bz-ATP-Sensitivität der Alaninmutanten zu erfahren. Dabei ergab sich für die G338A-Mutante eine 13-fache Bz-ATP-Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz zum Wildtyp, wo Bz-ATP wirksamer ist als ATP, ist Bz-ATP beim G338A-Konstrukt genauso wirksam wie ATP. Auch andere, beim Wildtyp kaum wirksame Agonisten, können die G338A-Mutante aktivieren (ähnlich den Effekten dieser Arbeit). Von einem Leckstrom wie in hiesigen Experimenten wurde nicht berichtet. Das Konstrukt G338A wurde ebenso, wie in dieser Arbeit, schlecht in die Zellmembran exprimiert (Jindrichova et al., 2015).

Damit ergab die Substitution von G338 durch Alanin oder Serin einen rP2X<sub>7</sub>R, welcher den geöffneten Kanalzustand favorisiert, da die Bz-ATP-Sensitivität zunahm und ATP, 2-MeS-ATP, αβ-meATP und βγ-meATP zu effektiven Agonisten wurden (Hattori und Gouaux, 2012; Kawate et al., 2009). Prolin hat mit seinem Ring auf alpha-Helices eine Helix-brechende Wirkung, unterbindet die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und schränkt somit das Protein in seiner Konformation ein (Jindrichova et al., 2015). In Übereinstimmung damit ergab die G338P-Mutante einen nicht-funktionalen Kanal. Hieraus wurde geschlossen, dass der P2X<sub>7</sub>R an der Position G338 einen durch bisher unbekannte Mechanismen eingeschränkten Flexibilitätsgrad aufweist (Jindrichova et al., 2015).

Zhiyuan Li und Kollegen führten Funktionsanalysen mit Alaninsubstitution in transmembranären Segmenten beim P2X<sub>2</sub>-Rezeptor der Ratte an HEK293-Zellen durch. Beim rP2X<sub>2</sub>R befindet sich an der zur P2X<sub>7</sub><sup>G338</sup>-äquivalenten Position (P2X<sub>2</sub><sup>A335</sup>) bereits ein Alanin. Die Substitution der weiter zytoplasmatisch gelegenen Aminosäurereste G342 oder G344 beim P2X<sub>2</sub>R zu Alanin führte zu vielen Effekten, einschließlich eines drastischen Abfalls der ATP-Wirksamkeit, eine schnellere Deaktivierung und ein Rückgang der Bz-ATP-Effektivität (Li et al., 2004). Es wird angenommen, dass die Aminosäure G344 in der Mitte der zweiten TM-Helix gelegen ist und als Gelenkstück das Kanal gating vermittelt. Dabei stellt eine gerade zweite TM-Helix die geöffnete Konformation dar, wohingegen eine gebogene Helix bei der geschlossenen Konformation vorliegt (Fujiwara et al., 2009). Angeblich verändern sich die Schnittstellen zwischen den zwei TM-Helices während des Kanal gating (Khakh und Egan, 2005). Glycin formt bei einigen Kanälen einen Teil der Kanalpore und damit ist es möglich, dass die Alaninsubstitution an den Positionen G342 und G344 beim P2X<sub>2</sub>-Rezeptor die ATP-Wirksamkeit verändert, indem es die Fähigkeit die Konformation der TM2-Gating-Domäne zu ändern, unterbricht (Fujiwara et al., 2009; Li et al., 2004). Auch bei der in dieser Arbeit untersuchten hP2X<sub>7</sub><sup>G338A</sup>-Mutante könnte die Alaninsubstitution zu einer Abnahme der Fähigkeit zwischen den Konformationen zu wechseln, führen. Glycine sind dafür bekannt, an Regionen von mutmaßlicher Flexibilität vorzukommen (Khakh und Egan, 2005).

Ivermectin (IVM) ist dafür bekannt, dass es durch die Interaktion mit Resten der transmembranären Helices im offenen Kanalzustand die P2X<sub>4</sub>-Rezeptorkanalfunktion verbessert. Ganzzellmessungen haben gezeigt, dass IVM die Sensitivität für ATP und αβ-meATP beim P2X<sub>4</sub>R erhöht, die Stromamplitude als Antwort auf supramaximale Agonistenkonzentrationen um das zweifache verstärkt und die Stromdeaktivierung nach dem Agonistenauswaschen verlangsamt (Khakh et al., 1999). Einzelkanalmessungen ergaben, dass IVM den offenen Kanalzustand stabilisiert (Priel und Silberberg, 2004). Jelinkova und Kollegen identifizierten und lokalisierten mittels Cysteinmutagenese-Scanning-Experimenten an rP2X<sub>4</sub>R-TMs, exprimiert in HEK293-Zellen, Reste, welche für das Kanal gating und die Interaktion mit IVM wichtig sind. Dabei wies die Mutante G340C (äquivalent zu hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R) beim Fehlen von IVM eine verstärkte ATP-Sensitivität, sowie eine signifikant verzögerte Deaktivierung im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Zugabe von IVM bedingt beim rP2X<sub>4</sub><sup>G340C</sup>R keine Änderung beim EC<sub>50</sub>-Wert und I<sub>max</sub>, wohingegen beim Wildtyp IVM den EC<sub>50</sub>-Wert für ATP nach links (9,2-fach) verschiebt und der I<sub>max</sub>-Wert ansteigt (1,75-fach). Demnach ist die Position G340 nicht an der Erkennung von IVM beteiligt (Jelinkova et al., 2008).

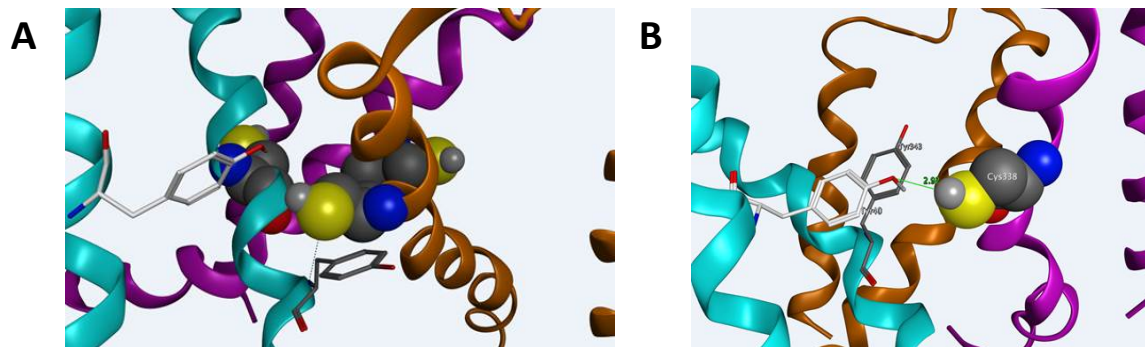
Die festgestellte Periodizität von IVM-induzierten Störungen in der Rezeptorfunktion bei Substitutions-resistenten Mutanten, bei der jede dritte oder vierte Aminosäure durch die Substitution beeinflusst wurde, stimmt mit der  $\alpha$ -helikalen Topologie beider TM-Domänen überein. Aus den gewonnenen Daten wurde eine helikale Projektion generiert, bei der die IVM-sensitiven Reste auf der gleichen Seite der Helices liegen und die IVM-unabhängigen Treffer M31, Y42, G45, V49, G340, L343, A344, G347, T350, D354 und V357 auf der gegenüberliegenden Seite der Helices lokalisiert sind. Diese Verteilung suggeriert, dass die IVM-sensitiven Reste im geöffneten Kanalzustand zur Lipidschicht gerichtet sind und die Bindungstasche für IVM bilden, wohingegen die IVM-unempfindlichen Reste die hydrophile Pore oder das Protein auskleiden und eine wichtige Rolle beim Schaltverhalten des Kanals spielen (Jelinkova et al., 2008).

Silberberg und Kollegen führten Experimente mit Tryptophan-Scanning-Mutagenese am P2X<sub>4</sub>R durch. Um IVM-Effekte an den Mutanten zu erfassen und die Reste zu identifizieren, welche veränderte Effekte auf die IVM-Applikation zeigen, verwendeten die Autoren die EC<sub>50</sub>-Konzentration von ATP und eine gesättigte IVM-Konzentration (3  $\mu$ M). Ihre Untersuchungen ergaben u.a. einen abgeschwächten IVM-Effekt bei der G340W-Mutante (Silberberg et al., 2007).

Frühere Tryptophan-Scanning-Mutagenese-Experimente an TMs vom rP2X<sub>4</sub>R identifizierten Bereiche, welche während des Gatings einer Neuordnung unterliegen. Dabei wies die G340W-Mutante bei einer Applikation von 300  $\mu$ M ATP kleine Ströme und eine gesteigerte ATP-Sensitivität auf ( $EC_{50}(WT)/EC_{50}(Mutante) = 39,3$ ). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, vermuten auch Sie, dass die erhöhte Sensitivität weniger aufgrund einer Beeinflussung der Bindungsstelle, sondern vielmehr durch eine Veränderung des geschlossen-offen-Gleichgewichts des Kanals zugunsten des offenen Zustandes bedingt ist (Silberberg et al., 2005).

Auf der Grundlage vom kürzlich veröffentlichten Zebrafisch P2X<sub>4</sub>-Rezeptormodell wurde beim Modellieren der strukturellen Veränderungen während der ATP-Applikation am hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>-Rezeptor herausgefunden, dass der Aminosäurerest G338 im geschlossenen Zustand an der engsten Stelle der Ionenkanalpore lokalisiert ist und das der Ersatz durch ein Cystein (insbesondere durch den Van-der-Waals-Radius des Schwefels) mit erhöhtem Platzbedarf die TM2 von den drei Untereinheiten auseinanderdrückt, wodurch ein inkompletter Kanalverschluss bedingt wird. ATP führt zu einer Konformationsänderung am hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R, welche eine Interaktion von Y40 und Y343 erlaubt, wodurch der Durchmesser der

Ionenkanalpore abnimmt und es damit zu einem verminderten Ionenstrom kommt (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: Effektmodell der hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Mutation am Gate des humanen P2X<sub>7</sub>-Rezeptors.**  
 A: hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Porenregion im ATP-ungebundenen Zustand. Der Aminosäurerest G338 ist im geschlossenen Zustand an der engsten Stelle der Ionenkanalpore lokalisiert. Die Substitution von Glycin durch ein größeres Cystein schließt einen kompletten Kanalverschluss aus. B: hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Porenregion im ATP-gebundenen Zustand. In der „ATP-geöffneten“ hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Konformation interagiert Y40 mit Y343, welches die Pore begrenzt und den Ionenstrom reduziert, verglichen mit dem ATP-ungebundenen hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Zustand.

Die Effekte sind stark von der Art der Mutation abhängig und bei kleineren Seitenketten (Alanin, Serin, Leucin) weniger ausgeprägt (Dr. A. Kless, Grünenthal GmbH, persönliche Mitteilung).

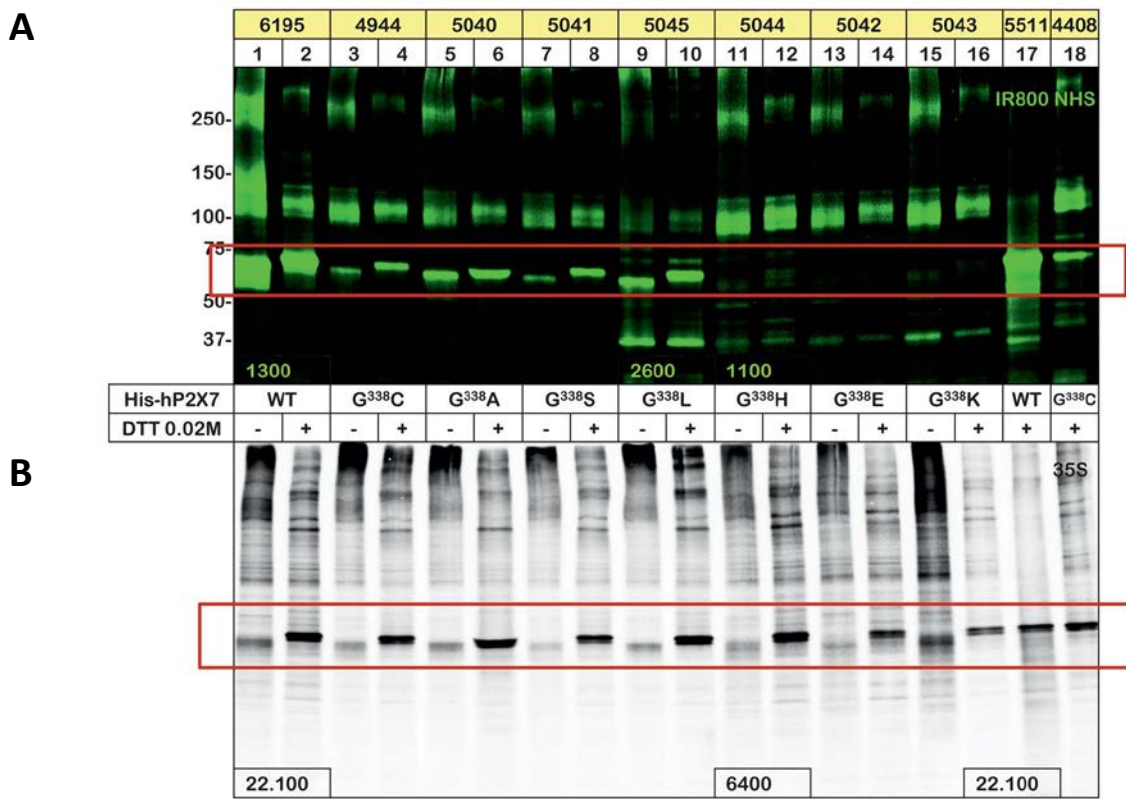
Die sehr ausgeprägten Effekte bei der Mutation der G338 auf die Aktivierung, die Leitfähigkeit und die Agonisten- und Antagonistenwirkung lassen vermuten, dass es sich hier um eine funktionell wichtige Aminosäure handelt.

## 5.2 Expressionsraten

Die folgenden Daten wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Günther Schmalzing (RWTH-Aachen) gewonnen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Abbildung 17 A stellt die Oberflächenexponiertheit aller hP2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>R-Mutanten in der Zellmembran der Oozyten dar. Anhand dieser Grafik sind Rückschlüsse auf den Kanaleinbau in die Lipiddoppelmembran möglich. Es fällt auf, dass die G338-Konstrukte deutlich schlechter als der Wildtyp in die Zellmembran eingebaut wurden. Ein Einbau der Konstrukte G338H, G338E, G338K ist nur schwach bis gar nicht nachweisbar. Die Gesamtzellexpression der im Detail untersuchten Mutanten ist jedoch gegenüber dem Wildtyp hP2X<sub>7</sub>R nicht wesentlich verändert (siehe Abbildung 17 B). Dies deutet darauf hin, dass die mutierten hP2X<sub>7</sub>R zwar gebildet, aber nur vermindert oder gar nicht in die Zellmembran eingebaut werden. Möglicherweise schützen

sich die Zellen auf diese Weise vor dem dauerhaften Einstrom von Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen, welcher durch die konstitutiv offenen Ionenkanalporen verursacht ist.

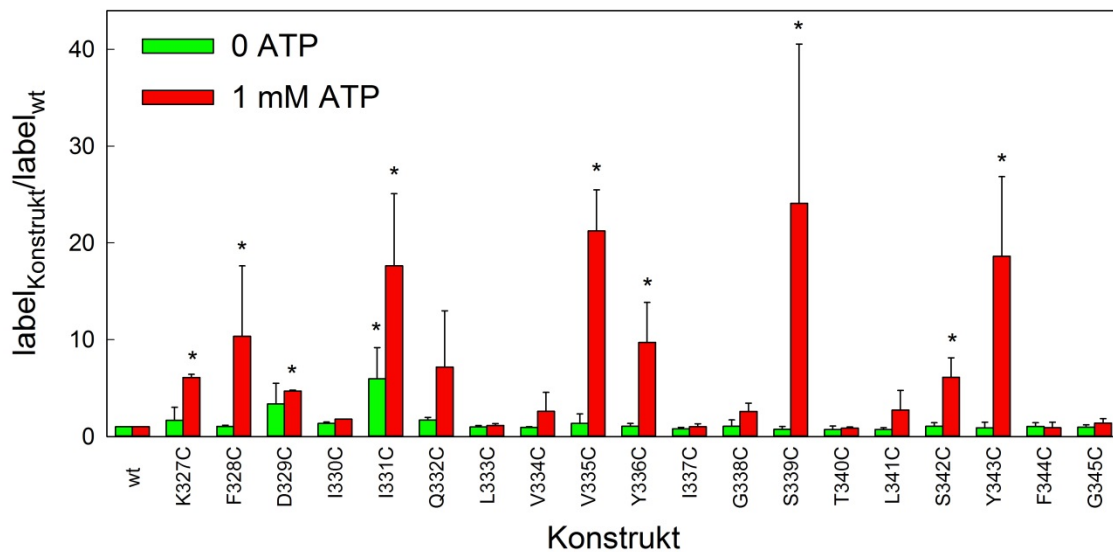


**Abbildung 17: Oberflächen (A)- und Gesamtexpression (B) verschiedener hP2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>-R-Konstrukte.**

Die Proteinbanden wurden aus verschiedenen Gelen gewonnen und für dieses Bild digital zusammengefasst. Die Oberflächenexponiertheit wurde mittels fluoreszierenden Cy5-Mono-NHS-Esters bestimmt. Die Gesamtexpression wurde mittels L-[<sup>35</sup>S]-Methionin bestimmt. Die Bande eines Monomers der hP2X<sub>7</sub>-Konstrukte liegt bei 75 kDa. Die rote Box kennzeichnet die Position der vereinzelt hP2X<sub>7</sub>-Untereinheiten. Die Grafik wurde freundlicherweise von Dr. Michaela Stolz (RWTH-Aachen) zur Verfügung gestellt.

In der Abbildung 18 wurde u.a. für das Konstrukt G338C das Fluoreszenzsignal von Cy5-Monomaleimid ATP-abhängig dargestellt, wobei das Signal vom Wildtyp als Referenzwert gilt. Da der Farbstoff mit den Thiolgruppen der Mutanten interagieren kann, lässt sich damit die Erreichbarkeit der Cysteinseitenketten beurteilen. Der Farbstoff ist nicht in der Lage die Lipiddoppelmembran zu durchqueren. Die Zugänglichkeit der Thiolgruppe, der in dieser Arbeit untersuchten Mutante hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>, für den Farbstoff Cy5-Monomaleimid lässt sich durch die Anwesenheit von ATP nicht signifikant erhöhen. Im Gegensatz zu anderen Konstrukten (in Abbildung 18 mit „\*“ markiert) unterscheidet sich die Cy5-Fluoreszenz von hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup> nicht signifikant von der des hP2X<sub>7</sub>-Wildtyps, der keine freien Thiolgruppen besitzt. Dies weist, wie auch die hier dargestellten Messungen mit MTS-Reagenzien, darauf hin, dass die Thiolgruppe des hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup> nicht in die Ionenkanalpore ragt und somit nicht von extrazellulär applizierten

wasserlöslichen Substanzen erreicht wird. Auch die durch Applikation von ATP verursachte Konformationsänderung zum offenen Ionenkanal ändert daran nichts.



**Abbildung 18: ATP-abhängige Erreichbarkeit der SH-Ketten der TM2.**

Es erfolgte zunächst eine Anfärbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5-Monomaleimid, anschließend eine Aufreinigung und schließlich die Auftrennung mit SDS-Page. Die Signale wurden mithilfe von Typhoon-Fluoreszenzimaging erfasst und deren quantitative Fluoreszenz bestimmt. Der Wildtyp dient als Referenzwert.

\* - signifikante Abweichung vom WT-Niveau ( $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. N = 3 - 8 Oozyten.

### 5.3 Effekte der MTS-Derivate

Die Transmembranregion 2 sowie einige Aminosäuren in deren Nähe wurden mittels Cysteinmutagenese-Scanning-Experimenten und MTS-Gaben bereits in früheren Versuchen untersucht (Browne et al., 2010; Rassendren et al., 1997a). Rassendren und Kollegen untersuchten die Effekte von Cystein-modifizierenden Agenzien (MTSEA, MTSET und MTSES) an P2X<sub>2</sub>R-Mutanten und fanden heraus, dass die Rezeptormutante A335C (äquivalent zur G338C beim P2X<sub>7</sub>R) nicht signifikant modifiziert wird (Rassendren et al., 1997a). Auch in früheren Untersuchungen wurde keine signifikante Stromhemmung durch MTSEA, MTSET und MTSES am P2X<sub>2</sub><sup>A335C</sup>R gesehen (Rassendren et al., 1997a). Bei Li und Kollegen zeigte der P2X<sub>2</sub><sup>A335C</sup>R-Strom an *Xenopus laevis* Oozyten weder in An- noch in Abwesenheit von ATP einen Modifizierungseffekt durch die MTSET-Applikation (Li et al., 2008). Wenn kein Effekt zu sehen ist, könnte es sein, dass das Cystein nicht erreichbar ist, es erreichbar ist aber nicht reagiert, oder aber es modifiziert wird, jedoch die Modifikation nicht zu einem veränderten, makroskopischen Strom führt (Rassendren et al., 1997a). Beim P2X<sub>2</sub>R ist an der Stelle 335 (äquivalent zu 338 beim hP2X<sub>7</sub>R) ein Alanin. Hier gibt es aber nicht, wie bei der G338A-Mutante des hP2X<sub>7</sub>R einen großen Leckstrom. Offensichtlich führen weitere

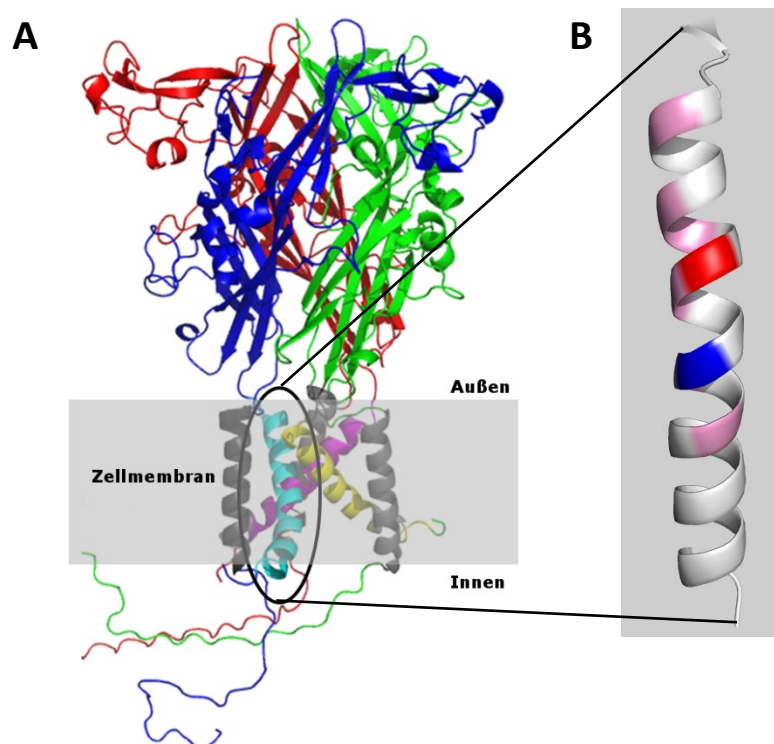
Unterschiede zwischen P2X<sub>2</sub>R und P2X<sub>7</sub>R in der Aminosäuresequenz und damit der räumlichen Struktur zu unterschiedlichen Gating-Effekten.

Weitere SCAM-Experimente an HEK293-Zellen, die entweder den Wildtyp oder funktionelle Mutanten des P2X<sub>2</sub>-Rezeptors exprimierten, untersuchten im Bereich der TM2 zwischen L327 und M356 die Erreichbarkeit von substituierten Cysteinen für Silber, fokussiert auf den geöffneten Kanalzustand in der Anwesenheit von ATP. Ag<sup>+</sup>-Ionen sind kleine thiolreaktive Ionen, welche schnell und kovalent die in wasserhaltiger Umgebung freiliegenden Sulfhydrylseitenketten modifizieren können. Egan und Kollegen fanden heraus, dass der Strom der A335C-Mutante von einer 5 s andauernden Applikation mit 500 nM Silberionen in der Anwesenheit von ATP nicht beeinflusst wurde (Egan et al., 1998). Bei späteren Untersuchungen wurde eine Ag<sup>+</sup>-Modifikation der Ströme in der Anwesenheit von ATP auch bei der A335C beobachtet (Li et al., 2010). Es konnte hier kein Effekt detektiert werden, als 67 nM Ag<sup>+</sup> für 2 min bei ATP-Abwesenheit gegeben wurden. Dies spricht dafür, dass die Position A335 durch die konformative Veränderung der Kanalpore beim Öffnungsmechanismus einen Kontakt zum Extrazellulärraum erhält, sodass der Kanal während der Öffnung einer weitreichenden Neuordnung unterliegt. Es scheint nicht überraschend, dass Ag<sup>+</sup> so viele Seitenketten mehr erreichen und modifizieren kann als die MTS-Derivate. Das relativ kleine Ion kann möglicherweise in enge Lücken zwischen Proteinverbindungen gelangen, welche für große thiolreaktive Reagenzien wie MTSET nicht erreichbar sind.

Li und Kollegen stellten fest, dass die Mehrheit der P2X<sub>2</sub>R-Reste in der TM1 und TM2 ohne ATP keinen signifikanten funktionellen Beeinflussungen durch Silberionen unterliegen. Dies stimmt auch mit der zfp2X<sub>4</sub>R-Röntgenstrukturanalyse von Kawate und Kollegen überein, wo die meisten dieser Reste nur einen begrenzten Kontakt zum Extrazellulärraum haben (Li et al., 2010). Sie untersuchten an den Ag<sup>+</sup>-zugänglichen Mutanten auch, ob sich nicht-kovalente Cd<sup>2+</sup>-Brücken zwischen den Cysteinresten ausbilden können. An der Position A335C in der äußeren Region der TM2 führten kurzzeitige Applikationen (300 ms) in der Gegenwart von ATP zu keinem detektierbaren Effekt. Jene Reste in der TM2, die die schnellste Ag<sup>+</sup>-Modifikationsrate im geöffneten Zustand zeigen, sind auch an der Zentralachse der Pore im geschlossenen Strukturzustand positioniert, dies indiziert, dass die TM2-Helix während der Öffnung keiner großen Rotation unterliegt (Li et al., 2010).

In dieser Arbeit sind die MTS-Effekte in der Abwesenheit von ATP am hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R alle reversibel. Dies spricht für einen unspezifischen blockierenden Effekt der MTS-Derivate und gegen eine kovalente Modifikation. Der blockierende Effekt der kationischen MTS-Derivate MTSEA und MTSET könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie die Ionenkanalpore schlechter

permeieren als das kleinere  $\text{Na}^+$ -Ion. Ein leicht hemmender reversibler Effekt von 0,75 mM MTSET wurde auch beim  $\text{hP2X}_7^{\text{G388C}}$  beobachtet (siehe Abbildung 13, Abbildung 19). Das bedeutet, dass die Position C338 (und somit wahrscheinlich auch die Position G338) nicht in die Kanalpore zeigt und demzufolge nicht von den MTS-Reagenzien erreicht wird. In der Abbildung 19 ragt die Position G338 (rot) von den Aminosäuren, die einen funktionellen MTSEA-Effekt (rosa und blau) aufweisen, weg. Auch in Anwesenheit von ATP haben die MTS-Reagenzien reversible Effekte, was ebenso für einen Porenblock spricht.

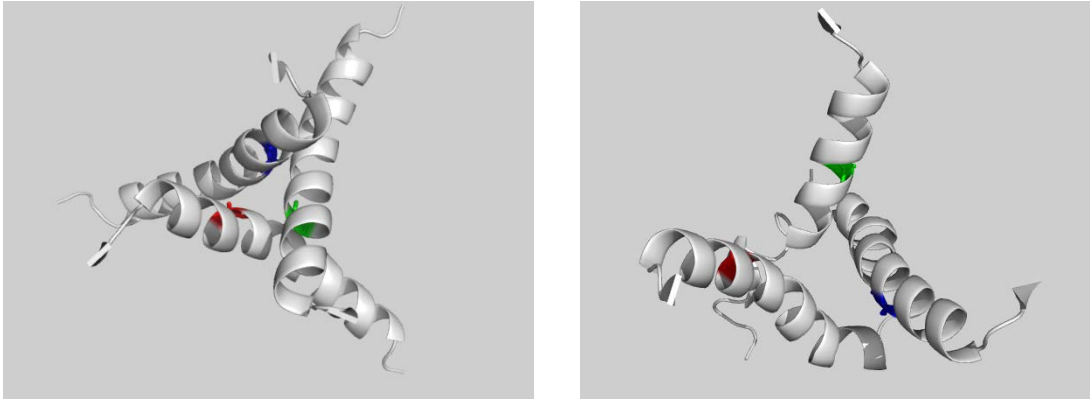


**Abbildung 19: Effekte von einzelnen Cysteinmutationen in der zweiten transmembranären Domäne auf die  $\text{hP2X}_7\text{R}$ -Funktion.**

A: Modell des verkürzten  $\text{hP2X}_7\text{R}$ , entsprechend dem veröffentlichten Modell des C-terminal verkürzten  $\text{zP2X}_4\text{R}$ , mit dem intrazellulären N-terminalen Ende für jede der drei Untereinheiten, zwei transmembranären Helices (TM1, TM2) und die große extrazelluläre Domäne, welche die ATP-Bindungsstellen beinhaltet (Kawate et al., 2009). Die TM2-Regionen sind türkis, violett und gelb gefärbt. B: Vergrößerung einer zweiten transmembranären Region mit Angabe der Aminosäure-Cysteinmutanten, welche zunehmende (rosa) oder abnehmende (blau) Ströme nach MTSEA-Applikation anzeigen. Der G338-Rest ist rot markiert.

Bei der schematischen Ansicht von oben auf den geschlossenen und offenen Rezeptor wird ferner deutlich, dass der Rest G338 nicht in die Kanalpore reicht (siehe Abbildung 20).





**Abbildung 20: Geschlossener (links) und offener (rechts) hP2X<sub>7</sub><sup>G338R</sup>, Ansicht von oben.**  
Transmembrandomänen 2 der drei Untereinheiten mit farblicher Markierung der Position G338.

#### 5.4 Kationen- vs. Anionenselektion

Die P2X-Rezeptoren werden weitestgehend als nicht-selektive Kationenkanäle beschrieben, welche die Leitung von positiv geladenen Ionen wie Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> gegenüber negativ geladenen Ionen wie Cl<sup>-</sup> favorisieren (North, 2002). Wie genau die überwiegend Kationen-selektiven P2X-Rezeptoren zwischen Kationen und Anionen unterscheiden, ist bisher nicht geklärt. Einige Studien suggerieren, dass die P2X-Rezeptoren besonders nach langer ATP-Applikation für große organische Kationen wie N-Methyl-D-Glucamine (NMDG) durchgängig sind (Virginio et al., 1999). Die P2X<sub>4</sub>R-Kristallstruktur ergab, dass das extrazelluläre Vestibül eine netto-negative Oberflächenladung trägt, hauptsächlich aufgrund der Gegenwart der Reste E56 und D58 und in diese Domäne Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> relativ zu Cl<sup>-</sup> bevorzugt eintreten (Kawate et al., 2011). Experimente in diesem Bereich bei verschiedenen Subtypen der P2X-Rezeptorfamilie ergaben jedoch, dass die Ladungsselektion nicht allein durch die lateralen Portale/die extrazellulären Vestibüle verursacht wird. Es wird angenommen, dass es eine Ladungsselektionsbarriere innerhalb des typischen P2X-Rezeptors gibt, wahrscheinlich im Bereich der TM2 innerhalb oder intrazellulär zum Kanalgate (Samways et al., 2014). Es wurde gezeigt, dass die sukzessive Substitution von T339 durch Lysin in den drei TM2 des P2X<sub>2</sub>R (entspricht S342 beim hP2X<sub>7</sub>R) die Selektivität für Kationen verringert und die für Anionen erhöht (Browne et al., 2010). Obwohl für T339 eine Selektion zwischen mono- und bivalenten Kationen impliziert wurde, ist es eine sehr schwach konservierte Position innerhalb der P2XR-Familie. Sie wird zum Beispiel durch Glycin beim P2X<sub>1</sub>R und Alanin im P2X<sub>4</sub>R besetzt (Egan und Khakh, 2004).

Beim P2X<sub>7</sub>R führte die Substitution von intrazellulär zur Gating-Region gelegenen Aminosäureresten auch zu einer Veränderung der Ionenselektivität. Durch die Substitution von Lysin an den Positionen T348 und N352 stieg P<sub>Cl</sub>/P<sub>Na</sub> signifikant an, aber auch hier ist nicht klar,

ob diese Positionen bei der Ladungserkennung besonders für extrazelluläre Kationen eine wichtige Rolle spielen (Browne et al., 2013).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, senkt beim hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R und beim hP2X<sub>7</sub><sup>G338A</sup>R der Ersatz von extrazellulären Na<sup>+</sup>-Ionen durch das größere, organische Tris<sup>+</sup>-Ion signifikant die Leck-Ionenleitfähigkeit und verschiebt das Umkehrpotential des ATP-induzierten Stromes zu negativeren Potentialen. Das lässt vermuten, dass bei beiden Mutanten der Leckstrom sowie der durch ATP-Applikation induzierte Strom durch Kationen getragen werden. Die signifikante Verminderung des Effekts von ATP auf die Ionenleitfähigkeit beim hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R, wenn Cl<sup>-</sup> durch Glutamat ersetzt wurde, ist hierbei schwierig zu erklären. Möglicherweise überlagern sich hier zwei gegensätzliche Effekte. Zum einen die Verminderung der Offenwahrscheinlichkeit der G338C-Mutante durch ATP und zum anderen die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit durch die Substitution von Cl<sup>-</sup> durch Glutamat, die auch beim hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp beobachtet wird (siehe Abbildung 11 C) (Kubick et al., 2011).

## 5.5 Agonisten- und Antagonisteneffekt

Insgesamt ist es schwierig zu beurteilen, inwieweit der mutierte hP2X<sub>7</sub>R selbst die durch ATP modifizierbare Leckleitfähigkeit bedingt oder ob sekundäre Leckleitfähigkeiten, die durch die P2X<sub>7</sub><sup>G338X</sup>R-Leckleitfähigkeit induziert werden, eine Rolle spielen. So könnte es sein, dass ATP nicht auf die P2X<sub>7</sub>R-Mutante, sondern auf solche sekundären Leckleitfähigkeiten wirkt. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Effekt des bekannten P2X<sub>7</sub>R-Agonisten Bz-ATP sowie von UTP untersucht, dass den P2X<sub>7</sub>R nicht aktiviert.

Für den P2X<sub>7</sub>R ist ATP der natürliche Ligand. Bz-ATP ist derzeit der potenteste Agonist. Mit abnehmender Effektivität stehen weitere Agonisten zur Verfügung: ATP, 2-meS-ATP, ATP $\gamma$ S und ADP (Surprenant et al., 1996). In Einzelkanalmessungen wurde beim hP2X<sub>7</sub>R allerdings kein Effekt durch ADP und GTP detektiert (Markwardt et al., 1997; Riedel et al., 2007a). A $\beta$ -methyl-ATP,  $\beta\gamma$ -methyl-ATP, UTP und Adenosin blieben ohne Wirkung (Surprenant et al., 1996).

CTP und ATP besitzen ähnliche Amidin-Gruppen innerhalb ihrer Basenringstruktur, wodurch sie Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rezeptor ausbilden können. Die Base von CTP ist kleiner als die von ATP und füllt damit nicht die Agonistenbindungstasche. Die resultierende Lücke verringert möglicherweise das Ausmaß, dass CTP binden und somit die P2X-Rezeptoren aktivieren kann. GTP und UTP besitzen beinahe umgekehrte Wasserstoffbrückenbindungsgruppen in ihren Basenringen und sind damit nicht in der Lage, erfolgreich Interaktionen mittels Wasserstoffbrückenbindungen zu formen (Hattori und Gouaux, 2012). Dies bestätigt frühere Messungen der Agonistenaktivität am P2X<sub>7</sub>R, wonach außer ATP nur Bz-ATP und

2-MeS-ATP eine nennenswerte Aktivierung des P2X<sub>7</sub>R hervorrufen können (Markwardt et al., 1997; North und Surprenant, 2000; Riedel et al., 2007a; Surprenant, A., 1996; Surprenant et al., 1996; Wiley et al., 1994).

In dieser Arbeit führten die Nukleotid-Applikationen an der G338C-Mutante zu einer signifikanten Leitfähigkeitsverminderung. Bz-ATP besitzt, anders als beim hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp, gegenüber ATP eine schwächere Wirksamkeit. UTP verursachte eine geringe, signifikante Leitfähigkeitsabnahme, die beim hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp nicht auftritt. Beim Konstrukt G338A wurden ähnliche Effekte der Agonisten wie bei der G338C-Mutante beobachtet, nur kam es hier immer zu einer Vergrößerung des Stroms. Die Nachahmung des ATP-Effektes durch kleinere Konzentrationen von Bz-ATP und deutlich geringere Effekte durch UTP sprechen dafür, dass zumindest ein Teil der Effekte direkt durch den mutierten hP2X<sub>7</sub>R vermittelt werden. Die Daten sprechen dafür, dass die Mutation in der P2X<sub>7</sub>R-Porenregion Einflüsse auf die Aktivität von Agonisten und Antagonisten hat. Da die Bindungsstelle für die Agonisten weit entfernt von der Porenregion im extrazellulären Teil des P2X<sub>7</sub>R liegt und der Antagonist A438079 kompetitiv wirkt (Nelson et al., 2006), also wahrscheinlich auch an der Agonistenbindungsstelle bindet, spricht dies dafür, dass die G338-Mutationen zu einer weitreichenden Konformationsänderung des P2X<sub>7</sub>R führen, die auch die Agonistenbindungsstelle beeinflusst. Andererseits ist es auch möglich, dass eine allosterische Erhöhung der ATP-Effektivität die scheinbare ATP-Sensibilität (EC<sub>50</sub>) erhöht (Colquhoun, 1998). Um dies zu klären, müssten Konzentrations-Wirkungs-Kurven gemessen werden.

Beim rP2X<sub>7</sub>R führte die G338A-Substitution zu einem Rezeptor, dessen Bz-ATP-Sensitivität um das 6- bis 13-fache anstieg und ATP, 2-MeS-ATP,  $\alpha\beta$ -meATP und  $\beta\gamma$ -meATP zu Agonisten mit fast gleicher Effektivität wurden. Es ist aber auch möglich, dass die höhere Sensitivität der G338-Mutanten eine höhere Stabilität der Agonistenbindung im geöffneten relativ zum geschlossenen Kanal widerspiegelt (Jindrichova et al., 2015).

## 6 Zusammenfassung

Der homotrimere hP2X<sub>7</sub>R gehört zur Gruppe der ATP-gesteuerten P2X-Rezeptoren mit vorwiegender Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Leitfähigkeit. Er ist strukturell gekennzeichnet durch intrazellulär gelegene C- und N-Termini, zwei Transmembranregionen und einer großen extrazellulären Domäne mit ATP-Bindungsstellen. Der trimere Kanal wird v.a. in Zellen des Immunsystems exprimiert, sodass ihm eine wichtige Funktion bei Immun- und Entzündungsgeschehen zugesprochen wird.

Die Mutagenese-Effekte beeinflussen u.a. den Rezeptoreinbau und deren Funktion. Die G338-Konstrukte werden deutlich schlechter als der Wildtyp in die Zellmembran eingebaut. Der Einbau der Konstrukte G338H, G338E, G338K ist nur schwach bis gar nicht nachweisbar. Die Gesamtzellexpression der im Detail untersuchten Mutanten ist jedoch gegenüber dem hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp nicht wesentlich verändert. Die mutierten hP2X<sub>7</sub>R werden gebildet, aber nur vermindert oder gar nicht in die Zellmembran eingebaut. Möglicherweise schützen sich die Zellen auf diese Weise vor dem dauerhaften Einstrom von Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen, welcher durch die konstitutiv offenen Ionenkanalporen verursacht ist.

Die Konstrukte G338A und G338C weisen eine Leck-Ionenleitfähigkeit auf, welche durch den Ersatz von extrazellulären Na<sup>+</sup>-Ionen durch das größere, organische Tris<sup>+</sup>-Ion signifikant gesenkt werden kann. Das lässt vermuten, dass bei beiden Mutanten der Leckstrom sowie der durch ATP-Applikation induzierte Strom durch Kationen getragen werden.

Applikation von Methanthiosulfonaten, die kovalent Cysteinreste modifizieren können, führten beim G338C-Konstrukt nur zu reversiblen Verringerungen des Leckstroms, was für einen unspezifischen blockierenden Effekt und gegen eine kovalente Modifikation spricht. Die Thiolgruppe des hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R ragt demzufolge nicht in die Ionenkanalpore und wird damit nicht von extrazellulär applizierten wasserlöslichen Substanzen erreicht. Dies wird durch Modellierungen der Ionenkanalpore bestätigt.

Die Position G338 liegt im geschlossenen Zustand an der engsten Stelle der Ionenkanalpore. Modellierungen des hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Konstrukts zeigen, dass der Ersatz durch ein Cystein mit seinem erhöhten Platzbedarf die TM2 der drei Untereinheiten auseinanderdrückt, wodurch in Abwesenheit des Agonisten ein inkompletter Kanalverschluss bedingt wird. Die Bindung von ATP an der Agonistenbindungsstelle führt zu einer Konformationsänderung am hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R, welche eine Interaktion der Aminosäurereste Y40 und Y343 erlaubt, wodurch der Durchmesser der Ionenkanalpore abnimmt und es damit zu einem verminderten Ionenstrom kommt.

Der typische P2X<sub>7</sub>R-Agonist hat bei den Konstrukten G338C und G338A im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Wirkung. Das am Wildtyp unwirksame UTP ruft bei diesen Konstrukten einen kleinen Effekt hervor. Beim Konstrukt G338C hat die Applikation des P2X<sub>7</sub>R-Antagonisten A438079 keinen Effekt auf die Rezeptoraktivität, jedoch wie erwartet auf den hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp.

Die veränderten Effekte der Agonisten und Antagonisten sprechen dafür, dass die Agonistenbindungsstelle und das Aktivierungsverhalten durch die G338-Mutation verändert sind.

Die sehr ausgeprägten Effekte bei der Mutation der G338 auf die Aktivierung, die Leitfähigkeit und die Agonisten- und Antagonistenwirkung lassen vermuten, dass es sich hier um eine funktionell wichtige Aminosäure handelt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbracchio MP, Burnstock G (1994) Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64:445-475.
- 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 P2X<sub>7</sub> purinergic receptor. *J Neurochem* 101:17-26.
- Adinolfi E, Pizzirani C, Idzko M, Panther E, Norgauer J, Di Virgilio F, Ferrari D (2005) P2X<sub>7</sub> receptor: Death or life? *Purinergic Signal* 1:219-227.
- Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, Bianchi G, Kroemer G, Pistoia V, Di Virgilio F (2012) Expression of P2X<sub>7</sub> receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res* 72:2957-2969.
- Allsopp RC, El Ajouz S, Schmid R, Evans RJ (2011) Cysteine scanning mutagenesis (residues E52-G96) of the human P2X<sub>1</sub> receptor for ATP; mapping agonist binding and channel gating. *J Biol Chem* 286:29207-29217.
- Alves LA, Bezerra RJ, Faria RX, Ferreira LG, da Silva Frutuoso V (2013) Physiological roles and potential therapeutic applications of the P2X<sub>7</sub> receptor in inflammation and pain. *Molecules* 18:10953-10972.
- Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J, Schmalzing G (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X<sub>2</sub> and heteromeric P2X<sub>1+2</sub> receptor subtypes. *J Mol Biol* 342:333-343.
- Baconguis I, Gouaux E (2012) Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature* 489:400-405.
- Baricordi OR, Ferrari D, Melchiorri L, Chiozzi P, Hanau S, Chiari E, Rubini M, Di Virgilio F (1996) An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood* 87:682-690.
- Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buell G, Di Virgilio F (1999) Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X<sub>7</sub> ATP receptor. *J Biol Chem* 274:33206-33208.
- Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, Markwardt F (2008) The P2X<sub>7</sub> carboxyl tail is a regulatory module of P2X<sub>7</sub> receptor channel activity. *J Biol Chem* 283:25725-25734.
- Benham CD, Tsien RW (1987) A novel receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 328:275-278.
- Berne RM (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204:H317-H322.
- Bretschneider F, Markwardt F (1999) Drug-dependent ion channel gating by application of concentration jumps using U-tube technique. *Methods Enzymol* 294:180-189.

- Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF (2002) Heteromultimeric P2X<sub>1/2</sub> receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* 300:673-680.
- Browne LE, Cao L, Broomhead HE, Bragg L, Wilkinson WJ, North RA (2010) P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. *Nat Neurosci* 14:17-18.
- Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA (2013) P2X<sub>7</sub> receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J Neurosci* 33:3557-3566.
- Burnstock, G. (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*, pp. 107-118. Eds L. Bolis, R. W. Straub. New York.
- Burnstock G (2001) Overview of P2 receptors: Possible functions in immune cells. *Drug Dev Res* 53:53-59.
- Burnstock G, Wood JN (1996) Purinergic receptors: Their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* 6:526-532.
- Carroll WA, Donnelly-Roberts D, Jarvis MF (2009) Selective P2X<sub>7</sub> receptor antagonists for chronic inflammation and pain. *Purinergic Signal* 5:63-73.
- Casas-Pruneda G, Reyes JP, Perez-Flores G, Perez-Cornejo P, Arreola J (2009) Functional interactions between P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors from mouse salivary epithelia. *J Physiol (Lond)* 587:2887-2901.
- Chen LF, Brosnan CF (2006) Regulation of immune response by P2X<sub>7</sub> receptor. *Crit Rev Immunol* 26:499-513.
- Chiozzi P, Sanz JM, Ferrari D, Falzoni S, Aleotti A, Buell G, Collo G, Di Virgilio F (1997) Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X<sub>7</sub> receptor. *J Cell Biol* 138:697-706.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X<sub>7</sub> receptor. *Neuropharmacology* 36:1277-1283.
- Colquhoun D (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol* 125:924-947.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97:587-600.
- Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E (2009) P2X<sub>7</sub>: a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal* 5:251-256.
- Di Virgilio F, Sanz JM, Chiozzi P, Falzoni S (1999) The P2Z/P2X<sub>7</sub> receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor. *Prog Brain Res* 120:355-368.

- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF (2007) Discovery of P2X<sub>7</sub> receptor-selective antagonists offers new insights into P2X<sub>7</sub> receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 151:571-579.
- Dray A (1995) Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 75:125-131.
- Drury AN, Szent-Györgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon mammalian heart. *J Physiol (Lond)* 68:213-237.
- Dubyak GR (1991) Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:295-300.
- Dubyak GR (2007) Go it alone no more - P2X<sub>7</sub> joins the society of heteromeric ATP-gated ion channel receptors. *Mol Pharmacol* 72:1402-1405.
- Dubyak GR, De Young MB (1985) Intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization activated by extracellular ATP in Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 260:10653-10661.
- Dubyak GR, El-Moatassim C (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265:577-606.
- Egan TM, Haines WR, Voigt MM (1998) A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X<sub>2</sub> receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J Neurosci* 18:2350-2359.
- Egan TM, Khakh BS (2004) Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci* 24:3413-3420.
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* 48:178-183.
- Falzoni S, Munerati M, Ferrari D, Spisani S, Moretti S, Di Virgilio F (1995) The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *J Clin Invest* 95:1207-1216.
- Flittiger B, Klapperstück M, Schmalzing G, Markwardt F (2010) Effects of protons on macroscopic and single-channel currents mediated by the human P2X<sub>7</sub> receptor. *Biochim Biophys Acta Biomembranes* 1798:947-957.
- Fujiwara Y, Keceli B, Nakajo K, Kubo Y (2009) Voltage- and [ATP]-dependent gating of the P2X<sub>2</sub> ATP receptor channel. *J Gen Physiol* 133:93-109.
- Gartland A, Hippskind RA, Gallagher JA, Bowler WB (2001) Expression of a P2X<sub>7</sub> receptor by a subpopulation of human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16:846-856.
- Gerlach E, Deuticke B, Dreisbach RH (1963) Der Nukleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Coronardurchblutung. *Naturwissenschaften* 50:228-229.
- Gillespie JH (1934) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol (Lond)* 80:345-349.



- Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233:309-319.
- Grierson JP, Meldolesi J (1995) Shear stress-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients and oscillations in mouse fibroblasts are mediated by endogenously released ATP. *J Biol Chem* 270:4451-4456.
- Guile SD, Alcaraz L, Birkinshaw TN, Bowers KC, Ebden MR, Furber M, Stocks MJ (2009) Antagonists of the P2X<sub>7</sub> receptor. From lead identification to drug development. *J Med Chem* 52:3123-3141.
- Hattori M, Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485:207-212.
- Hempel C, Nörenberg W, Sobottka H, Urban N, Nicke A, Fischer W, Schaefer M (2013) The phenothiazine-class antipsychotic drugs prochlorperazine and trifluoperazine are potent allosteric modulators of the human P2X<sub>7</sub> receptor. *Neuropharmacology* 75:365-379.
- Holton P (1959) The liberation of ATP on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol (Lond)* 145:494-504.
- 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-((cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X<sub>7</sub> receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1376-1385.
- Hughes J, Hatcher J, Chessell I (2007) The role of P2X<sub>7</sub> in pain and inflammation. *Purinergic Signal* 3:163-169.
- Humphreys BD, Dubyak GR (1998) Modulation of P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J Leukoc Biol* 64:265-273.
- Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M (2002) Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem* 45:4057-4093.
- Jelinkova I, Vavra V, Jindrichova M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, Stojilkovic SS (2008) Identification of P2X<sub>4</sub> receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflügers Arch* 456:939-950.
- Jiang LH, Baldwin JM, Roger S, Baldwin SA (2013) Insights into the molecular mechanisms underlying mammalian P2X<sub>7</sub> receptor functions and contributions in diseases, revealed by structural modeling and single nucleotide polymorphisms. *Front Pharmacol* 4:1-17.
- Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo XN, Surprenant A, North RA (2003) Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 23:8903-8910.
- Jiang LH, MacKenzie AB, North RA, Surprenant A (2000) Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X<sub>7</sub> receptors. *Mol Pharmacol* 58:82-88.
- Jiang LH, Rassendren F, Spelta V, Surprenant A, North RA (2001) Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X<sub>2</sub> receptor. *J Biol Chem* 276:14902-14908.

- Jindrichova M, Bhattacharya A, Rupert M, Skopek P, Obsil T, Zemkova H (2015) Functional characterization of mutants in the transmembrane domains of the rat P2X<sub>7</sub> receptor that regulate pore conductivity and agonist sensitivity. *J Neurochem* 133:815-827.
- Kaczmarek JS, Riccio A, Clapham DE (2012) Calpain cleaves and activates the TRPC5 channel to participate in semaphorin 3A-induced neuronal growth cone collapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7888-7892.
- 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.
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X<sub>4</sub> ion channel in the closed state. *Nature* 460:592-598.
- Kawate T, Robertson JL, Li M, Silberberg SD, Swartz KJ (2011) Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *J Gen Physiol* 137:579-590.
- Keystone EC, Wang MM, Layton M, Hollis S, McInnes IB (2012) Clinical evaluation of the efficacy of the P2X<sub>7</sub> purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann Rheum Dis* 71:1630-1635.
- Khakh BS, Egan TM (2005) Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X<sub>2</sub> channel permeability dynamics. *J Biol Chem* 280:6118-6129.
- Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA (1999) Allosteric control of gating and kinetics at P2X<sub>4</sub> receptor channels. *J Neurosci* 19:7289-7299.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X<sub>7</sub> receptor signalling complex. *EMBO J* 20:6347-6358.
- Klapperstück M, Büttner C, Böhm T, Schmalzing G, Markwardt F (2000a) Characteristics of P2X<sub>7</sub> receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1467:444-456.
- Klapperstück M, Büttner C, Nickel P, Schmalzing G, Lambrecht G, Markwardt F (2000b) Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 387:245-252.
- Klapperstück M, Büttner C, Schmalzing G, Markwardt F (2001a) Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X<sub>7</sub> receptor. *J Physiol (Lond)* 534:25-35.
- Klapperstück M, Schmalzing G, Markwardt F (2001b) Characteristics of binding sites for ATP<sup>4-</sup> at the human P2X<sub>7</sub> receptor. *Drug Dev Res* 53:77-82.
- Kubick C, Schmalzing G, Markwardt F (2011) The effect of anions on the human P2X<sub>7</sub> receptor. *Biochim Biophys Acta Biomembranes* 1808:2913-2922.
- Kuehnel MP, Reiss M, Anand PK, Treede I, Holzer D, Hoffmann E, Klapperstueck M, Steinberg TH, Markwardt F, Griffiths G (2009a) Sphingosine-1-phosphate receptors stimulate macrophage plasma-membrane actin assembly via ADP release, ATP synthesis and P2X<sub>7</sub>R activation. *J Cell Sci* 122:505-512.

- Kuehnel MP, Rybin V, Anand PK, Anes E, Griffiths G (2009b) Lipids regulate P2X<sub>7</sub>-receptor-dependent actin assembly by phagosomes via ADP translocation and ATP synthesis in the phagosome lumen. *J Cell Sci* 122:499-504.
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA (2002) Absence of the P2X<sub>7</sub> receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 168:6436-6445.
- Lalo U, Pankratov Y, Wichert SP, Rossner MJ, North RA, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2008) P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>5</sub> subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 28:5473-5480.
- Li M, Chang TH, Silberberg SD, Swartz KJ (2008) Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 11:883-887.
- Li M, Kawate T, Silberberg SD, Swartz KJ (2010) Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. *Nat Commun* 1:DOI: 10.1038/ncomms1048.
- Li ZY, Migita K, Samways DSK, Voigt MM, Egan TM (2004) Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X<sub>2</sub> receptor. *J Neurosci* 24:7378-7386.
- Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagne B, Labbe M, Binder EB, Uhr M, Paez-Pereda M, Sillaber I, Ising M, Bruckl T, Lieb R, Holsboer F, Muller-Myhsok B (2006) P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet* 15:2438-2445.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6:521-532.
- Markwardt F, Löhn M, Böhm T, Klapperstück M (1997) Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *J Physiol (Lond)* 498:143-151.
- McCleskey EW, Gold MS (1999) Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* 61:835-856.
- McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Harris RR, Zhang XF, Shieh CC, Wismer CT, Zhu CZ, Gauvin DM, Fabiyi AC, Honore P, Gregg RJ, Kort ME, Nelson DW, Carroll WA, Marsh K, Faltynek CR, Jarvis MF (2007) P2X<sub>7</sub>-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* 146:1817-1828.
- McGaraughty S, Jarvis MF (2006) Purinergic control of neuropathic pain. *Drug Dev Res* 67:376-388.
- Michel AD, Kaur R, Chessell IP, Humphrey PPA (2000) Antagonist effects on human P2X<sub>7</sub> receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br J Pharmacol* 130:513-520.
- Murrell-Lagnado RD, Qureshi OS (2008) Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors. *Mol Membr Biol* 25:321-331.
- Mutini C, Falzoni S, Ferrari D, Chiozzi P, Morelli A, Baricordi OR, Collo G, Ricciardicastagnoli P, Di Virgilio F (1999) Mouse dendritic cells express the P2X<sub>7</sub> purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol* 163:1958-1965.

- Narcisse L, Scemes E, Zhao YM, Lee SC, Brosnan CF (2005) The cytokine IL-1 $\beta$  transiently enhances P2X<sub>7</sub> receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 49:245-258.
- 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 P2X<sub>7</sub> antagonists. *J Med Chem* 49:3659-3666.
- Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F (1998) Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273:15177-15182.
- Nicke A, Bäumer HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors form stable trimers: A novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17:3016-3028.
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.
- North RA, Surprenant A (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:563-580.
- Parvathenani LK, Tertysnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R (2003) P2X<sub>7</sub> mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278:13309-13317.
- Pippel, A. (2009) Struktur-Funktionsbeziehungen des humanen P2X<sub>7</sub>-Rezeptors - Untersuchungen mittels Cysteinmutagenese und Patch-Clamp-Technik. In: *Diplomarbeit*, Halle (Saale).
- Priel A, Silberberg SD (2004) Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X<sub>4</sub> receptor channels. *J Gen Physiol* 123:281-293.
- Punna-Moorthy A (1987) Evaluation of pH changes in inflammation of the subcutaneous air pouch lining in the rat, induced by carrageenan, dextran and *Staphylococcus aureus*. *J Oral Pathol* 16:36-44.
- Ralevic V, Burnstock G (1991) Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation* 84:1-14.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA, Surprenant A (1997a) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J* 16:3446-3454.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A (1997b) The permeabilizing ATP receptor, P2X<sub>7</sub> - Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272:5482-5486.
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F (2007a) Kinetics of P2X<sub>7</sub> receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 92:2377-2391.

- Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F (2007b) Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X<sub>7</sub> receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 93:846-858.
- Roberts JA, Allsopp RC, El Ajouz S, Vial C, Schmid R, Young MT, Evans RJ (2012) Agonist binding evokes extensive conformational changes in the extracellular domain of the ATP-gated human P2X<sub>1</sub> receptor ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:4663-4667.
- Romagnoli R, Baraldi PG, Cruz-Lopez O, Lopez-Cara C, Preti D, Borea PA, Gessi S (2008) The P2X<sub>7</sub> receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 12:647-661.
- Samways DS, Li Z, Egan TM (2014) Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front Cell Neurosci* 8:6.
- Sanz JM, Chiozzi P, Ferrari D, Colaianna M, Idzko M, Falzoni S, Fellin R, Trabace L, Di Virgilio F (2009) Activation of microglia by amyloid  $\beta$  requires P2X<sub>7</sub> receptor expression. *J Immunol* 182:4378-4385.
- Schwarz, W. and Rettinger, J. (2004) *Foundations of electrophysiology*. Shaker Verlag: Aachen.
- Seyffert C, Schmalzing G, Markwardt F (2004) Dissecting individual current components of co-expressed human P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors. *Curr Top Med Chem* 4:1719-1730.
- Shieh CC, Jarvis MF, Lee CH, Perner RJ (2006) P2X receptor ligands and pain. *Expert Opin Ther Patents* 16:1113-1127.
- Silberberg SD, Chang TH, Swartz KJ (2005) Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X<sub>4</sub> receptor channels. *J Gen Physiol* 125:347-359.
- Silberberg SD, Li M, Swartz KJ (2007) Ivermectin interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. *Neuron* 54:263-274.
- Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, Petrou S (2003) P2X<sub>7</sub> receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem* 278:8853-8860.
- Steinberg TH, Silverstein SC (1987) Extracellular ATP<sup>4-</sup> promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J Biol Chem* 262:3118-3122.
- Stock TC, Bloom BJ, Wei N, Ishaq S, Park W, Wang X, Gupta P, Mebus CA (2012) Efficacy and safety of CE-224,535, an antagonist of P2X<sub>7</sub> receptor, in treatment of patients with rheumatoid arthritis inadequately controlled by methotrexate. *J Rheumatol* 39:720-727.
- Surprenant, A. (1996) Functional properties of native and cloned P2X receptors. In: *P2 Purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms*, pp. 208-222. Eds D. J. Chadwick, J. A. Goode. Wiley: Chichester.
- 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<sub>2Z</sub> receptor for extracellular ATP identified as a P<sub>2X</sub> receptor (P2X<sub>7</sub>). *Science* 272:735-738.

- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998) Topological analysis of the ATP-gated ionotropic P2X<sub>2</sub> receptor subunit. *FEBS Lett* 425:19-23.
- 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.
- Tsukimoto M, Maehata M, Harada H, Ikari A, Takagi K, Degawa M (2006) P2X<sub>7</sub> receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by dual signalling pathways. *J Immunol* 177:2842-2850.
- Verkhatsky A, Burnstock G (2014) Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *Bioessays* 36:697-705.
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X<sub>7</sub> receptor. *Neuropharmacology* 36:1285-1294.
- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2:315-321.
- Weber WM, Liebold KM, Reifarth FW, Uhr U, Clauss W (1995) Influence of extracellular Ca<sup>2+</sup> on endogenous Cl<sup>-</sup> channels in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* 429:820-824.
- Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ (2006) Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci* 29:578-586.
- Wiley JS, Chen JR, Snook MB, Jamieson GP (1994) The P<sub>2Z</sub>-Purinoceptor of human lymphocytes: Actions of nucleotide agonists and irreversible inhibition by oxidized ATP. *Br J Pharmacol* 112:946-950.
- Wiley JS, Chen R, Jamieson GP (1993) The ATP<sup>4-</sup> receptor-operated channel (P<sub>2Z</sub> class) of human lymphocytes allows Ba<sup>2+</sup> and ethidium<sup>+</sup> uptake: inhibition of fluxes by suramin. *Arch Biochem Biophys* 305:54-60.
- Wiley JS, Gu BJ (2012) A new role for the P2X<sub>7</sub> receptor: a scavenger receptor for bacteria and apoptotic cells in the absence of serum and extracellular ATP. *Purinergic Signal* 8:579-586.
- Wilkinson SM, Gunosewoyo H, Barron ML, Boucher A, McDonnell M, Turner P, Morrison DE, Bennett MR, McGregor IS, Rendina LM, Kassiou M (2014) The first CNS-active carborane: A novel P2X receptor antagonist with antidepressant activity. *ACS Chem Neurosci* 5:335-339.
- Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, North RA (2006) Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X<sub>2/3</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 70:1159-1163.
- Yan ZH, Liang ZD, Obsil T, Stojilkovic SS (2006) Participation of the Lys<sup>313</sup>-Ile<sup>333</sup> sequence of the purinergic P2X<sub>4</sub> receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. *J Biol Chem* 281:32649-32659.

## Thesen der Dissertation

1. Der homotrimerere hP2X<sub>7</sub>R gehört zur Gruppe der ATP-gesteuerten P2X-Rezeptoren mit vorwiegender Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Leitfähigkeit. Er ist strukturell gekennzeichnet durch intrazellulär gelegene C- und N-Termini, zwei Transmembranregionen und einer großen extrazellulären Domäne mit ATP-Bindungsstellen.
2. Die Mutagenese-Effekte beeinflussen u.a. den Rezeptoreinbau und deren Funktion. Die G338-Konstrukte werden deutlich schlechter als der Wildtyp in die Zellmembran eingebaut. Der Einbau der Konstrukte G338H, G338E, G338K ist nur schwach bis gar nicht nachweisbar. Die Gesamtzellexpression der im Detail untersuchten Mutanten ist jedoch gegenüber dem hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp nicht wesentlich verändert. Die mutierten hP2X<sub>7</sub>R werden gebildet, aber nur vermindert oder gar nicht in die Zellmembran eingebaut. Möglicherweise schützen sich die Zellen auf diese Weise vor dem dauerhaften Einstrom von Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen, welcher durch die konstitutiv offenen Ionenkanalporen verursacht ist.
3. Die Konstrukte G338A und G338C weisen eine Leck-Ionenleitfähigkeit auf, welche durch den Ersatz von extrazellulären Na<sup>+</sup>-Ionen durch das größere, organische Tris<sup>+</sup>-Ion signifikant gesenkt werden kann. Das lässt vermuten, dass bei beiden Mutanten der Leckstrom sowie der durch ATP-Applikation induzierte Strom durch Kationen getragen werden.
4. Applikation von Methanthiosulfonaten, die kovalent Cysteinreste modifizieren können, führten beim G338C-Konstrukt nur zu reversiblen Verringerungen des Leckstroms, was für einen unspezifischen blockierenden Effekt und gegen eine kovalente Modifikation spricht. Die Thiolgruppe des hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R ragt demzufolge nicht in die Ionenkanalpore und wird damit nicht von extrazellulär applizierten wasserlöslichen Substanzen erreicht. Dies wird durch Modellierungen der Ionenkanalpore bestätigt.
5. Die Position G338 liegt im geschlossenen Zustand an der engsten Stelle der Ionenkanalpore. Modellierungen des hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R-Konstrukts zeigen, dass der Ersatz durch ein Cystein mit seinem erhöhten Platzbedarf die TM2 der drei Untereinheiten auseinanderdrückt, wodurch in Abwesenheit des Agonisten ein inkompletter Kanalverschluss bedingt wird. Die Bindung von ATP an der Agonistenbindungsstelle

führt zu einer Konformationsänderung am hP2X<sub>7</sub><sup>G338C</sup>R, welche eine Interaktion der Aminosäurereste Y40 und Y343 erlaubt, wodurch der Durchmesser der Ionenkanalpore abnimmt und es damit zu einem verminderten Ionenstrom kommt.

6. Der typische P2X<sub>7</sub>R-Agonist hat bei den Konstrukten G338C und G338A im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Wirkung. Das am Wildtyp unwirksame UTP ruft bei diesen Konstrukten einen kleinen Effekt hervor.
7. Beim Konstrukt G338C hat die Applikation des P2X<sub>7</sub>R-Antagonisten A438079 keinen Effekt auf die Rezeptoraktivität, jedoch wie erwartet auf den hP2X<sub>7</sub>R-Wildtyp.
8. Die sehr ausgeprägten Effekte bei der Mutation der G338 auf die Aktivierung, die Leitfähigkeit und die Agonisten- und Antagonistenwirkung lassen vermuten, dass es sich hier um eine funktionell wichtige Aminosäure handelt.



## **Selbständigkeitserklärung**

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

Weiterhin beede ich, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderen Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Abschließend versichere ich, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe. Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Ort, Datum

Unterschrift

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name: Nancy Zipfel  
Geburtsdatum: 06.11.1988  
Geburtsort: Lauchhammer

### Bildungsweg:

#### Schule:

1995 – 2001 Gesamtschule Senftenberg  
2001 – 2008 Friedrich-Engels Gymnasium Senftenberg

#### Studium:

10/2008 Immatrikulation im Studiengang Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg  
09/2010 Absolvierung des 1. Staatsexamens  
11/2014 Absolvierung des 2. Staatsexamens  
12/2014 Ärztliche Approbation

### Beruflicher Werdegang:

Seit 03/2015 Beginn der Facharztausbildung in der Klinik für Innere Medizin II der Universitätsklinik Halle AÖR

## **Danksagung**

Besonderer Dank geht an meinen Betreuer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Fritz Markwardt, für seine langjährige Betreuung und Einführung in die Elektrophysiologie.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Fritz Markwardt, für die fachliche Unterstützung bei der Laborarbeit, motivierenden Worte und nicht zuletzt Teilhabe an musikalischen Abenden im Kreise der Forschungsgruppe. Frau Monika Schmidt danke ich für die unermüdliche Vorbereitung der Oozyten und Messlösungen und Frau Dr. Anja Pippel für die geduldige Unterweisung in die Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemm-Technik.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Günther Schmalzing für die Bereitstellung der Expressionsdaten, die Anfertigung der cRNA-Konstrukte und den Austausch über molekularbiologische Erkenntnisse auf dem Gebiet der Purinorezeptoren bedanken.

Ich danke meinen Eltern für ihre Geduld und hoffe nun nach Vollendung der Arbeit auf einen baldigen Besuch.