

**Untersuchungen zur Regulation von rP2X₂ Rezeptoren
durch Phosphoinositide mittels einer heterolog
exprimierten, intrazellulären spannungsgesteuerten
Phosphoinositid-Phosphatase aus *Ciona intestinalis***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Eva-Verena Bongartz
aus Borken/Westf.

Frankfurt 2009
(D 30)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Gutachter: Prof. Dr. Ernst Bamberg
Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 30.10.2009

Meinen Eltern

Je mehr man schon weiß, je mehr hat man noch zu lernen.

Mit dem Wissen nimmt das Nichtwissen in gleichem Grade zu, oder vielmehr das Wissen des Nichtwissens.

Friedrich Schlegel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Membranproteine und Transport	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Ionenkanäle.....	2
1.1.3 Purinerge Rezeptoren.....	3
1.2 P2X Rezeptoren	4
1.2.1 Historisches.....	4
1.2.2 Struktur.....	4
1.2.3 Funktion und Regulation.....	7
1.2.4 P2X ₂ Rezeptoren.....	11
1.3 Ci-VSP	14
1.3.1 Allgemeines	14
1.3.2 Struktur und Funktion	15
1.4 Phosphoinositide	19
1.4.1 Allgemeines, Struktur und Funktion.....	19
1.4.2 PIP ₂ und PIP ₃	21
1.4.3 Regulation von membranären Transportsystemen.....	22
1.5 Aminoglykoside	24
1.5.1 Struktur und Funktion	25
1.5.2 Aminoglykoside und Membranproteine.....	26
1.6 Elektrophysiologie	27
1.6.1 Elektrische Eigenschaften von Membranen	27
1.6.2 Zwei-Elektroden Spannungsklemme.....	28
1.6.3 Membranfleck-Spannungsklemme.....	31
1.6.4 Das <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten Expressionssystem.....	35
1.7 Fragestellung	37
2. Material und Methoden	38
2.1 Chemikalien	38
2.2 Geräte und Software	39
2.2.1 RNA-Injektion	39
2.2.2 Elektrophysiologie	39
2.2.2.2 Membranfleck-Spannungsklemmen-Setup	39
2.2.3 Zellkultur.....	40
2.2.4 Molekularbiologie	40
2.2.5 Software.....	40
2.3 Verwendete Pufferlösungen	41
2.3.1 Aufbewahrung und Präparation der Oozyten.....	41
2.3.2 Elektrophysiologie	41
2.3.2.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Messungen.....	41
2.3.2.2 Membranfleck-Spannungsklemmen-Messungen	42
2.3.3 Phosphoinositid-haltige Lösungen.....	44
2.4 Heterologe Expression von Membranproteinen (rP2X) in <i>Xenopus laevis</i>-Oozyten	45
2.4.1 Tierhaltung	45
2.4.2 Gewinnung der Oozyten.....	45
2.4.3 Präparation und Aufbewahrung der Oozyten.....	46
2.4.4 Injektion von crRNA	47
2.5 Zellkultur	47
2.5.1 Kultivierung von HEK293 Zellen	48
2.5.2 Transiente Transfektion von HEK293 Zellen	48
2.5.3 PC12 Zellen	49
2.5.4 Präparation der zu messenden Zellen.....	49
2.5.5 Langzeitlagerung von Säugerzellen	50

Inhaltsverzeichnis

2.6 Elektrophysiologische Methoden	50
2.6.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	50
2.6.2 Membranfleck-Spannungsklemme.....	52
2.7 Molekularbiologische Methoden	54
2.7.1. Herstellung der cRNA für die Oozyten-Injektion	54
2.7.2 Herstellung der Mutante rP2X ₂ -P451A/P454A	55
2.7.3 Ci-VSP-C363S.....	56
3. Ergebnisse	57
3.1 Aminoglykosid-Block von P2X Rezeptoren	57
3.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehungen.....	57
3.1.2 Spannungsabhängigkeit des Aminoglykosid-Blocks.....	60
3.1.3 ATP-Abhängigkeit des Aminoglykosid-Blocks	62
3.1.4 Aminoglykosid-Wirkung auf die ATP-Dissoziation.....	63
3.2 Coexpression von Ci-VSP und P2X Rezeptoren	65
3.2.1 Grundlegende elektrophysiologische Untersuchungen von Ci-VSP/P2X ₂ - coexprimierenden Zellen.....	65
3.2.2 Herunterregulierung des ATP-vermittelten P2X ₂ -Rezeptorstroms bei Ci-VSP-Aktivierung	69
3.2.2.1 Depolarisation in Abwesenheit von ATP.....	70
3.2.2.2 Depolarisation in Anwesenheit von ATP: Messprotokoll	71
3.2.2.3 Der „Ci-VSP-Effekt“	72
3.2.2.4 Beteiligung der Ci-VS-Phosphatase am „Ci-VSP-Effekt“	73
3.2.2.5 Spannungsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“	75
3.2.2.6 ATP-Konzentrationsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“	78
3.2.2.7 weitere Charakteristika des „Ci-VSP-Effekts“	81
3.2.2.8 Einfluss verschiedener injizierter PIs nach Injektion in <i>Xenopus</i> Oozyten	84
3.2.2.9 PI-Kinase-Beteiligung am Desensibilisierungsverhalten des P2X ₂ Rezeptors	85
3.2.2.10 Paromomycin inhibiert den „Ci-VSP-Effekt“	89
3.2.2.11 Ci-VSP und andere P2X Rezeptoren.....	91
3.3 Patch Clamp-Messungen an P2X Rezeptoren	93
3.3.1 Makroskopische Ströme des P2X ₂ R.....	93
3.3.2 Einzelkanal-Ableitungen des P2X ₂ R.....	97
3.4 P2X Rezeptormutanten: elektrophysiologische Charakterisierung	99
4. Diskussion	107
4.1 Aminoglykosid-Block von P2X Rezeptoren	107
4.2 Einfluss der Ci-VSP auf den P2X₂ Rezeptor	110
4.2.1 Der Ci-VSP-bedingte Phosphoinositid-Umsatz regulierte den P2X ₂ R-Strom herunter	110
4.2.2 Die strukturelle Grundlage des „Ci-VSP-Effekts“ auf den P2X ₂ R	112
4.2.3 Einfluss einer PI-Kinase-Inhibition auf den P2X ₂ R	114
4.2.4 Der Phosphoinositid-Metabolismus wirkt auf die Desensibilisierung des P2X ₂ R.....	116
4.2.5 Der Ci-VSP-Effekt greift an der C _{ATP} -Konformation des P2X ₂ R an.....	117
4.2.6 Ci-VSP und andere P2X Subtypen.....	118
4.2.7 Ganzzell- vs. Einzelkanal-Ableitungen	119
4.3 Patch Clamp-Messungen an P2X Rezeptoren	120
4.3.1 PI3K und PTEN hatten keine Auswirkung auf den P2X ₂ R Rezeptorstrom.....	120
4.3.2 PI _{4,5} P ₂ aktivierte den P2X ₂ R, PI _{3,5} P ₂ und PI _{3,4,5} P ₃ jedoch nicht.....	122
4.3.3 Effekt von PI _{4,5} P ₂ auf Einzelkanalebene	123
4.3.4 Wirkung des PI _{4,5} P ₂	124
4.4 P2X₂-P451A/P454A Rezeptormutante und abschließende Betrachtungen	125
4.4.1 Neutralisation d. distalen SH3-Bindungsmotives verstärkte die P2X ₂ Desensibilisierung	125
4.4.2 Bindung der PI-Kinase an den distalen C-Terminus des P2X ₂ R und Entwicklung eines gating-Modells	126
4.4.3 PI3- oder PI4-Kinase?.....	132
4.5 Ausblick	137

Inhaltsverzeichnis

5. Zusammenfassung.....	138
6. <i>Summary</i>	140
7. Literaturverzeichnis	142
8. Abkürzungen.....	156
9. Danksagung.....	159
Lebenslauf.....	161
Publikationsliste.....	163

1. Einleitung

1.1 Membranproteine und Transport

1.1.1 Allgemeines

Jede Zelle ist von einer Zellmembran umgeben, die die Zelle an sich erst definiert, indem sie sie dem Extrazellulärraum gegenüber abgrenzt, aber auch die wichtige Aufgabe der selektiven Steuerung des Ionen-/Molekültransports übernimmt. Somit befähigt sie die Zelle, „Informationen“ mit dem sie umgebenden Gewebeverband auszutauschen. Diese Fähigkeit zum selektiven Stoffaustausch beruht auf ihrer Semipermeabilität: die Zellmembran besteht aus einer *ca.* 4 nm dicken Lipiddoppelschicht, die eine unüberwindbare Energiebarriere für hydrophile Stoffe darstellt; in sie ein- bzw. aufgelagert sind Membranproteine, die (u. a.) die Funktion des erleichterten und gerichteten Stofftransports übernehmen.

Neben der einfachen **Diffusion**, durch die nur lipophile Substanzen über die Membran diffundieren können, unterscheidet man zwischen den drei folgenden Transporterscheinungen an biologischen Membranen: *a)* **Carriertransport** („erleichterte Diffusion“) beruht auf einem System mit einer oder mehreren Bindungsstellen, die abwechselnd von der einen und von der anderen Seite her zugänglich ist/sind, aber nicht von beiden Seiten gleichzeitig. Ein *b)* **Kanal** stellt dagegen einen Transportweg dar, der nach beiden Seiten offen ist. Er besteht im Regelfall aus einem die Membran völlig durchdringenden Proteinmolekül, das im Innern eine „Pore“ besitzt, die eine hydrophile Umgebung schafft. Sowohl Carrier- als auch Kanal-Transport erfolgen immer entlang des elektrochemischen Gradienten. Diesen beiden passiven Mechanismen gegenüber steht der *c)* **aktive Stofftransport**, der dem Gefälle des elektrochemischen Potentials entgegengesetzt sein kann. Für sich allein genommen, wäre der Transport thermodynamisch gesehen unmöglich, erst durch Kopplung des Transports an einen zweiten, energieliefernden Prozess wird dieser möglich. Die an ihm beteiligten Membranproteine werden auch als „Pumpen“ bezeichnet. Man unterteilt den aktiven Transport in primär aktiven Transport, bei dem die Energie für den Transport des jeweiligen Substrats „direkt“ bezogen wird (z. B. aus der Hydrolyse von ATP zu ADP im Falle der Na^+ - K^+ -ATPase oder durch Licht im Falle von Bacteriorhodopsin) und sekundär aktiven Transport, bei dem eine Ionensorte entlang ihres elektrochemischen Gradienten transportiert wird, wobei dieser energieliefernde Gradient durch einen primär aktiven Transport generiert wird. Sämtliche Transportmechanismen spezifiziert man darüber hinaus in Symport (beide Stoffe werden in die gleiche Richtung transportiert) und Antiport (Stofftransport in entgegengesetzte Richtungen).

1.1.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind, wie zu Anfang schon dargelegt, integrale Membranproteine, die in allen Zellen vorkommen und denen wichtige Aufgaben beim Ionentransport und den damit verbundenen physiologischen Funktionen zukommen. Sie bestehen aus einer oder mehreren, die Pore formenden Untereinheiten und sind oft mit weiteren, akzessorischen Untereinheiten assoziiert. Ionenkanäle sind mehr oder weniger selektiv permeabel für bestimmte Ionen und lassen diese durch ihre Pore passieren, und zwar annähernd so schnell, wie deren freie Diffusion in wässrigem Medium wäre. Sie können nur in 2 distinkten Zuständen vorliegen, dem offenen, leitfähigen und dem geschlossenen, nicht-leitfähigen Zustand. Der Übergang zwischen beiden wird als „*gating*“ bezeichnet und durch elektrische oder chemische Signale, Temperatur oder mechanische Kräfte gesteuert.

Ionenkanäle besitzen wichtige Funktionen in den verschiedensten Prozessen, wie z. B. der Aufrechterhaltung eines Membranpotentials (u. a. homöostatischen Prozessen), der Nerven- und Muskeleerregung, der Hormonsekretion, der Zellproliferation, der Apoptose, der Signaltransduktion *etc.* Daher ist es nur verständlich, dass eine Störung ihrer Funktion oft schwere physiologische Symptome bzw. Krankheitsbilder nach sich zieht und sie dementsprechend attraktive „*drug targets*“ in medizinischen Therapieansätzen darstellen [ASHCROFT, 2006].

Man kann die Fülle der bis heute bekannten Ionenkanäle anhand unterschiedlicher Eigenschaften einordnen (Struktur, Funktion, Spezifität, *gating*), die gängigste ist jedoch die Unterscheidung nach ihrem *gating*-Mechanismus, d. h. nach der Art des Signals, das ihr Öffnen und Schließen reguliert. Die beiden wichtigsten Klassen sind hierbei *a) spannungsabhängige Kanäle*, die in Antwort auf Änderungen des Membranpotentials (De-/Hyperpolarisation) reagieren, wie K_v Kanäle, TRP Kanäle, spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle. Die zweite Klasse wird von *b) ligandengesteuerten Ionenkanälen* repräsentiert, deren Öffnen/Schließen von der Assoziation eines Bindungspartners (Liganden) an den Kanal abhängig ist. Man nennt diese Klasse auch ionotrope Rezeptoren, da Ligandenbindungsstelle und Ionenpore auf einem Proteinmolekül liegen. Die drei großen Superfamilien dieser Klasse sind die *cys-loop*-Familie (nicotinische ACh-, $GABA_A$ - und Glycin-Rezeptoren), die ionotrope Glutamat-Rezeptor-Familie (unterteilt nach ihrer Affinität gegenüber den synthetischen Liganden AMPA, NMDA und Kainat) und die Superfamilie der ATP-gesteuerten P2X Rezeptoren.

1.1.3 Purinerge Rezeptoren

Nukleotide sind die grundlegenden Bausteine des Lebens und somit Träger der genetischen Information. Des Weiteren können Nukleinsäuren auch Bestandteile katalytischer Reaktionen sein, wie z. B. in der snRNA oder der rRNA. Sie sind an der Regulation metabolischer Prozesse über - z. B. - cAMP/cGMP beteiligt und Nukleotidderivate können vielfach als aktiviertes Substrat biosynthetischer Reaktionen fungieren, wie z. B. Nukleotid-Zucker in Glycosylierungsreaktionen. Zusätzlich zu diesen Funktionen können die Nukleotide ATP, ADP, UTP und UDP als extrazelluläre Signalmoleküle fungieren [ZIMMERMANN *et al.*, 1998]. In dieser Rolle nehmen sie im Vergleich zu anderen Signalstoffen eine gesonderte Stellung ein, da sie als Grundbausteine des Lebens ubiquitär vorkommen und kontinuierlich synthetisiert werden. Daneben scheinen nahezu alle Zellen des Körpers unterschiedliche Rezeptoren für Nukleotide aufzuweisen. Darauf soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Adenosin-5'-Triphosphat (ATP), ein Purin-Derivat und der universelle „Energieförderer“ innerhalb der Zelle, kann auch außerhalb von Zellen vorliegen, wohin es durch verschiedene Quellen und Wege gelangt. Es kann zusammen mit anderen Neurotransmittern (Noradrenalin, Acetylcholin) aus Neuronen in sekretorischen/synaptischen Vesikeln freigesetzt werden, aber auch aus verletzten/apoptotischen Zellen oder aus Blutplättchen als Antwort auf einen steigenden Sauerstoffpartialdruck im Blut. Neueste Studien zeigen, dass darüber hinaus *Connexin-gap junctions* an der extrazellulären ATP-Freisetzung beteiligt sein können [ZHAO *et al.*, 2005; DEVUYST *et al.*, 2006]. ATP wirkt dann, neben seiner Funktion im Zellinneren, als extrazelluläres Signalmolekül über eine Reihe von Oberflächenrezeptoren [ABBRACCHIO *et al.*, 1994; NORTH, 2002]. Auf der einen Seite gibt es die **P1 Rezeptoren**, die selektiv für Adenosin sind, das als Abbauprodukt des ATP nach Degradation durch Ectonukleotidasen entsteht. P1 Rezeptoren werden in 4 Subtypen gegliedert (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) und sind Mitglieder der „*rhodopsin-like family of G protein-coupled receptors*“ [BURNSTOCK 2007].“ Auf der anderen Seite stehen die **P2 Rezeptoren**, die durch Purine, einige Subtypen ebenfalls durch Pyrimidine aktiviert werden. Die P2 Rezeptoren sind wiederum in 2 große Klassen unterteilt, den **P2Y und P2X Rezeptoren**. P2Y Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, von denen bis heute insgesamt 8 Subtypen (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) identifiziert und kloniert wurden. P2X Rezeptoren (*s. 1.2*) sind liganden-(ATP)-gesteuerte Ionenkanäle, von denen bisher 7 Subtypen (P2X₁₋₇) bekannt sind [BURNSTOCK 2007].

1.2 P2X Rezeptoren

P2X Rezeptoren (P2XR) sind Ionenkanäle, die für kleine monovalente Kationen, z. T. auch für Anionen, permeabel sind und die in Antwort auf extrazelluläre ATP-Bindung öffnen. Sie werden in sämtlichen Wirbeltier-Zelltypen exprimiert und sind in eine Vielzahl unterschiedlicher physiologischer Prozesse eingebunden [ROBERTS *et al.*, 2006]. Lange Zeit gab es keine Hinweise auf homologe Sequenzen in Invertebraten, bis FOUNTAIN *et al.* 2008 zunächst in *Dictyostelium discoideum* und anschließend in der Grünalge *Ostreococcus tauri* P2X Rezeptoren nachwies. **Purinerge Signaltransduktion** ist sowohl an neuronalen als auch nicht-neuronalen Prozessen, die von sensorischer Wahrnehmung bis zur Kontrolle der glatten Muskulatur reichen, beteiligt. Darüber hinaus ist sie in so diversen Prozessen wie der exo- und endokrinen Sekretion, der Immunantwort, Entzündungsprozessen, der Schmerzentstehung und -wahrnehmung (v. a. P2X₃), der Blutplättchenaggregation, der Zellproliferation, der Apoptose (v. a. P2X₇) *etc.* [BURNSTOCK, 2007] involviert.

1.2.1 Historisches

Im Jahre 1929 wurde zum ersten Mal über mögliche kardiovaskuläre Effekte von Adenin und seinen Derivaten, d. h. über deren vasodilatorische Wirkung auf die Koronargefäße, berichtet [DRURY & SZENT-GYÖRGYI, 1929]. Etliche Jahrzehnte später wurde ATP selbst als Neurotransmitter in Betracht gezogen, und als das verantwortliche Transmittermolekül in der nicht-adrenergen und nicht-cholinergen Signaltransmission im Darm und in der Harnblase postuliert. Dies traf zunächst auf heftigen Widerstand, da ATP bis zu diesem Zeitpunkt lediglich intrazelluläre Aufgaben zugeschrieben wurden. Darüber hinaus wurde angenommen, dass ein derart einfach aufgebautes Molekül nicht als extrazellulärer Botenstoff (*messenger*) dienen könne. Im Zuge dieser Diskussionen führte BURNSTOCK 1972 den Begriff „purinerg“ ein. Weitere 2 Jahre später wurde der Begriff der purinergen Rezeptoren definiert [BURNSTOCK, 1973] und 1978 eine Unterteilung in P1 und P2 Rezeptoren vorgeschlagen [BURNSTOCK, 1978]. 1993 schließlich wurden die ersten metabotropen P2 Rezeptoren kloniert [LUSTIG *et al.*, 1993; WEBB *et al.*, 1993], im Jahr darauf die ersten ionotropen P2 Rezeptoren [BRAKE *et al.*, 1994; VALERA *et al.*, 1994]. Zur gleichen Zeit teilten BURNSTOCK und ABBRACCHIO die P2 Rezeptoren, basierend auf Struktureigenschaften und Transduktionsmechanismen, in P2X- und P2Y-Rezeptoren ein [1994].

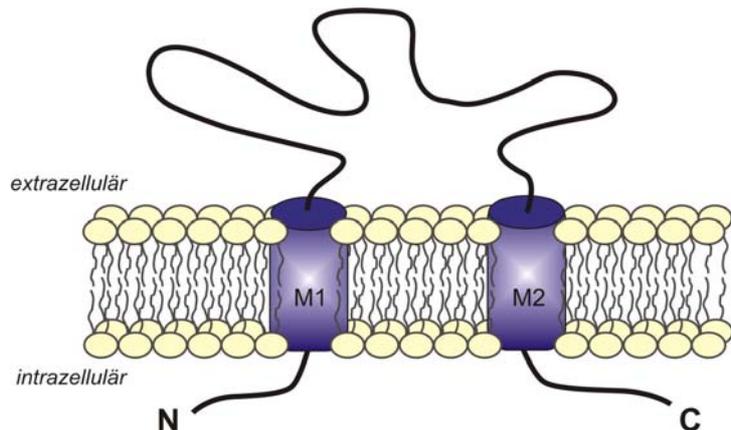
1.2.2 Struktur

Bis heute sind 7 P2X Rezeptor Subtypen bekannt (**P2X₁₋₇R**), die eine einheitliche, übergeordnete Architektur, z. T. aber auch deutliche Unterschiede aufweisen. Alle Subtyp-

1. Einleitung

Untereinheiten bestehen aus 2 Transmembrandomänen, die durch einen außergewöhnlich großen extrazellulären *loop*, der die ATP-Bindungsstelle beinhaltet, miteinander verbunden sind. Folglich befinden sich die N- und C-Termini aller Subtypen im Zellinneren (*s. Abb. 1.1*). Funktionell können die einzelnen Subtypen durch ihre unterschiedlichen Agonisten- und Antagonisten-Sensitivitäten, ihre charakteristischen Stromantworten (Kinetik, Desensibilisierungsverhalten) und ihre Empfindlichkeit gegenüber der Regulation durch Stoffe wie Zink, Protonen *etc.* unterschieden werden [EGAN *et al.*, 2006].

Abb. 1.1: Schematischer Aufbau einer beliebigen P2X-Untereinheit. Zu erkennen sind die zwei Transmembrandomänen (M1 und M2), die durch den großen extrazellulären *loop* verbunden sind sowie N- und C-Termini, der jeweils intrazellulär lokalisiert ist. (nach [SOTO *et al.*, 1997])



Die sieben P2X Rezeptor Subtypen weisen untereinander eine Sequenz-Homologie von 35-50 % auf, die sich fast gänzlich auf die extrazellulären *loops* bezieht [ROBERTS *et al.*, 2006]. Es gibt 7 Gene für die P2X Rezeptor Subtypen, die in ihrer Länge teilweise stark variieren (z. B. mP2X₃: 40 kb, hP2X₆: 12 kb, [NORTH, 2002]). Die daraus kodierte Proteine weisen Größen von 284 (P2X₄) bis 595 Aminosäurereste (P2X₇) auf. Es besteht keinerlei Sequenzhomologie mit anderen bekannten Proteinen, jedoch existieren Ähnlichkeiten zwischen der ATP-Bindungsstelle der P2X Rezeptoren mit der der *class II Aminoacyl-tRNA*-Synthetasen [FREIST *et al.*, 1998].

Die C-Termini der unterschiedlichen Subtypen sind unterschiedlich lang ausgeprägt, der längste ist im P2X₇ Rezeptor zu finden, welcher zudem weitere hydrophobe Regionen beinhaltet, so dass er potentiell noch einmal die Membran passieren könnte [NORTH, 2002]. Der extrazelluläre *loop* besitzt 10 konservierte Cystein-Reste, wodurch man annimmt, dass diese oxidiert vorliegen, also Disulfid-Brücken bilden und somit zur Tertiärstruktur beitragen. Tatsächlich konnte dies sowohl für den P2X₁R [ENNION & EVANS, 2002] als auch für den P2X₂R [CLYNE *et al.*, 2002] mithilfe von Mutationsstudien nachgewiesen werden. Reduzierung und somit Auflösen dieser Bindungen zeigt jedoch überraschenderweise einen nur geringen Effekt auf die Kanalfunktion [CLYNE *et al.*, 2002]. Darüber hinaus sind diese Cysteine in der Lage, promiskuitiv zu interagieren, was die Vermutung aufwirft, dass sie auch an der Ausbildung einer Metall-Bindungsstelle beteiligt sind. Allerdings ist bisher nicht bekannt, um welches Metall es sich dabei handelt, jedoch scheint Zink ausgeschlossen [CLYNE *et al.*, 2002]. Weiterhin

1. Einleitung

besitzen alle 7 Subtypen Konsensus-Sequenzen (Asn-X-Ser/Thr) für N-vermittelte Glykosylierungen, die teilweise essentiell für das *trafficking* an die Zelloberfläche sind [NEWBOLT *et al.*, 1998; RETTINGER *et al.*, 2000].

Funktionelle P2X Rezeptoren bestehen aus einer trimeren Assemblierung der Untereinheiten, was durch *cross-linking*- und native Gelelektrophorese (*Blue Native-PAGE*)-Studien [NICKE *et al.*, 1998; ASCHRAFI *et al.*, 2004] gezeigt werden konnte und bis vor kurzem als einmalig galt [EGAN *et al.*, 2006]. Mittlerweile ist die Struktur von ASIC1 Kanälen aufgeklärt, die ebenfalls aus einer (homo)trimeren Assemblierung von Untereinheiten bestehen [JASTI *et al.*, 2007]. Bei der Multimerisierung von P2X Rezeptoren können nativ wie auch rekombinant sowohl homomere (Zusammenlagerungen gleichen Subtyps) als auch heteromere (Zusammenlagerungen mindestens zweier verschiedener Subtypen) funktionelle Kanäle entstehen. Bis auf den P2X₆ Rezeptor sind alle P2X Subtypuntereinheiten in der Lage, funktionelle Homomere zu bilden. Dahingegen bildet die P2X₆-Untereinheit nur Heteromultimere mit anderen Subtypuntereinheiten aus. P2X₇-Untereinheiten bilden ausschließlich Homomultimere, d. h. sie assemblieren nicht mit anderen Subtypen. Ob es bei einer Multimerisierung, bei der die 2. Transmembrandomäne eine wichtige Rolle zu spielen scheint, auch zu einer Assemblierung von 3 verschiedenen Subtypen kommen kann, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. [NORTH, 2002; ROBERTS *et al.*, 2006]. Schon im Jahre 1999 fanden DING & SACHS Hinweise darauf, dass zur Öffnung der P2X Rezeptoren die Bindung von drei ATP-Molekülen notwendig ist, was mit dem Befund der trimeren Struktur gut übereinstimmt.

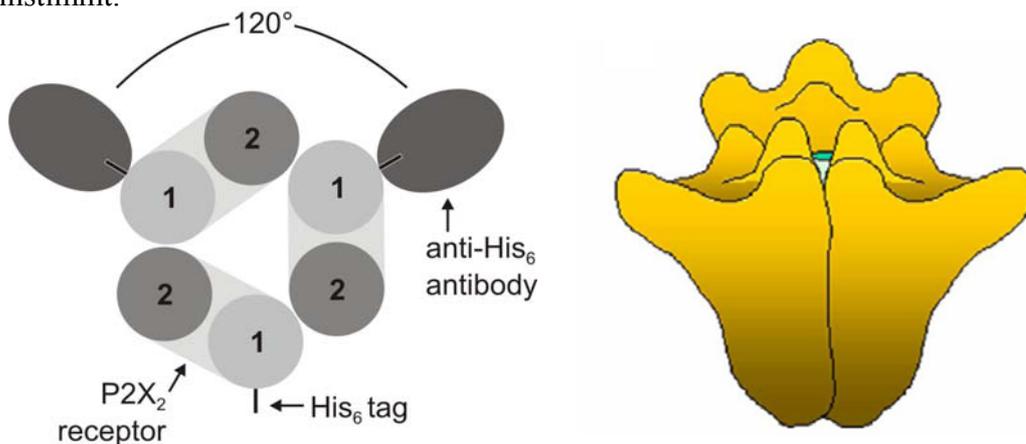


Abb. 1.2: Trimeres Modell des P2X₂ Rezeptors. **Links:** mithilfe von His-tag-Antikörpern konnte ein Bindungswinkel von 120° im funktionellen Kanal bestimmt werden. (aus [BARRERA *et al.*, 2005]) **Rechts:** schematische Zeichnung eines P2X₂ Rezeptors, basierend auf elektronenmikroskopischen Studien. 3 Untereinheiten assemblieren sich zu einer inversen dreiseitigen pyramidalen Struktur und bilden mit den extrazellulären *loops* eine kronenähnliche Struktur. (aus [MIO *et al.*, 2005])

Mithilfe von *Atomic Force Microscopy*-Studien konnten durch BARRERA und Kollegen die Dimensionen einzelner isolierter, unkristallisierter Proteine abgeschätzt werden (Volumen

1. Einleitung

409 nm³). Durch Antikörper-Bindung an die N-terminal gekoppelten His-*tags* konnten sie einen Bindungswinkel von 120° zwischen benachbarten Untereinheiten bestimmen, der ebenfalls mit dem Modell eines trimeren Kanalproteins übereinstimmt [BARRERA *et al.*, 2005] (s. Abb. 1.2, links). Im gleichen Jahr zeigten MIO und Kollegen durch elektronenmikroskopische Studien, dass der P2X₂ Rezeptor eine durch seine extrazellulären *loops* gebildete kronenähnliche Struktur aufweist [MIO *et al.*, 2005] (s. Abb. 1.2, rechts).

Die integrale Ionenpore wird höchstwahrscheinlich von allen Transmembrandomänen gebildet, in einem Trimer tragen also sämtliche Transmembrandomänen der assemblierten Untereinheiten zur Porenbildung bei [RASSENDREN *et al.*, 1998]. Der Durchmesser des engsten Teils der Pore beträgt *ca.* 11 Å, was ausreichend groß ist, um es kleinen monovalenten Kationen zu erlauben, diese Pore passieren zu lassen [EICKHORST *et al.*, 2002].

1.2.3 Funktion und Regulation

Wie eingangs schon erwähnt, stellt der P2X Rezeptor eine transmembranäre Leitfähigkeit dar, die es kleinen monovalenten Kationen (Na⁺, K⁺) ermöglicht, in Antwort auf eine Agonisten-Bindung an das Kanalprotein selber, die Lipidbarriere der Plasmamembran zu überwinden. Sie besitzen eine je nach Subtyp unterschiedlich stark ausgeprägte Ca²⁺-Leitfähigkeit.

Der physiologische Agonist der P2X Rezeptoren ist ATP und alle P2X Subtypen öffnen ihre Kanalpore nach dessen Bindung. Jedoch unterscheiden sich die Subtypen stark in ihrer Sensitivität gegenüber ATP, so beträgt die halb-maximale Aktivierungskonzentration (EC₅₀) für den P2X₁ ~1 µM ATP, für den P2X₂ ~30 µM ATP und für den P2X₇ sogar >100 µM [KHAKH *et al.*, 2001a]. Eine synthetisch hergestellte Rezeptor-Chimäre (P2X_{2/1}) aus dem N-Terminus und der 1. Transmembrandomäne des P2X₂R sowie dem extrazellulären *loop*, der 2. Transmembrandomäne und dem C-Terminus vom P2X₁ [WERNER *et al.*, 1996], die die ATP-Bindungseigenschaften des P2X₁ besitzt, weist eine sehr geringe EC₅₀-Konzentration für ATP von nur 3 nM auf [RETTINGER & SCHMALZING, 2004]. Dies ist auf die an dieser Rezeptorchimäre nicht vorhandene Desensibilisierung zurückzuführen, welche im P2X₁ stark ausgeprägt ist und dadurch die dessen hohe ATP-Affinität maskiert. Demzufolge liegt die tatsächlich messbare, apparente EC₅₀-Konzentration des P2X₁R für ATP bei 1 µM.

Daneben gibt es eine Reihe weiterer Agonisten, die sämtlichst ATP-Derivate (z. B. α,β-meATP) darstellen und die ebenfalls variierende EC₅₀-Konzentrationen an den einzelnen P2X Subtypen zeigen [KHAKH *et al.*, 2001a; BURNSTOCK, 2007]). Als Antagonisten, also inhibitorisch, wirken verschiedene Substanzen auf die P2X Rezeptoren ein, darunter fallen bestimmte ATP-Derivate, die eine kompetitive Hemmung (z. B. TNP-ATP, [STEINBERG *et al.*, 1987; VIRGINIO *et al.*, 1998a]) bewirken oder auch völlig anders strukturierte Moleküle, wie z. B. Suramin [STEINBERG *et al.*, 1987; EVANS *et al.*, 1995; VIRGINIO *et al.*, 1998a], (iso-) PPADS [EVANS *et al.*,

1. Einleitung

1995], Brilliant Blue G [JIANG *et al.*, 2000] oder trivalente Kationen [NAKAZAWA *et al.*, 1997]. Wie für die Agonisten zeigen die einzelnen P2X Subtypen auch für die unterschiedlichen Antagonisten völlig unterschiedliche Empfindlichkeiten. Ferner gibt es einige bisher bekannte positive und negative Effektoren/Modulatoren der P2X Rezeptoren, darunter fallen Makromoleküle wie Ivermectin [KHAKH *et al.*, 1999a] und Cibacron Blue [MILLER *et al.*, 1998, NORTH, 2002], aber auch Ionen wie Zn^{2+} , H^+ [WILDMAN *et al.*, 1999] und Ca^{2+} [VIRGINIO *et al.*, 1997]. *Tabelle 1.1* zeigt eine Übersicht der einzelnen P2X Subtypen mit ihrem hauptsächlichsten physiologischen Vorkommen und ihren Agonisten sowie Antagonisten.

Tab. 1.1: Charakteristika der 7 bekannten P2X Subtypen. (nach [BURNSTOCK, 2007])

Rezeptor	Hauptvorkommen	Agonisten	Antagonisten
P2X₁	glatte Muskulatur, Blutplättchen, Kleinhirn, Spinalneuronen	α, β -meATP = ATP = 2-MeSATP, L- β, γ -meATP; <i>schnell desensibilisierend</i>	TNP-ATP, Ip ₅ I, NF023, NF449
P2X₂	glatte Muskulatur, ZNS, Retina, chromaffine Zellen, autonome und sensorische Ganglien	ATP \geq ATP γ S \geq 2-MeSATP \gg α, β -meATP; <i>Zink- und pH-sensitiv</i>	Suramin, isoPPADS, RB2, NF770, NF279
P2X₃	sensor. Neuronen, NTS, einige sympathische Neuronen	ATP \gg α, β -meATP \geq Ap ₄ A, <i>schnell desensibilisierend</i>	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, IP ₅ I, Phenolrot
P2X₄	ZNS, Hoden, Dickdarm	ATP \gg α, β -meATP, CTP, <i>Ivermectin-Potenzierung</i>	TNP-ATP (schwach), BBG (schwach), Phenolphthalein
P2X₅	proliferierende Hautzellen, Darm, Harnblase, Thymusdrüse, Rückenmark	ATP \gg α, β -meATP, ATP γ S	Suramin, PPADS, BBG
P2X₆	ZNS, motorische Neuronen im Rückenmark	<i>- bildet keine funktionellen Homomere -</i>	/
P2X₇	Zellen des Immunsystems, Pankreas, Haut, etc.)	BzATP $>$ ATP \geq 2-MeSATP \geq α, β -meATP	KN62, KN04, MRS2427, O-ATP, Coomassie Brilliant Blue G

Abkürzungen: **BBG:** Brilliant Blue Green; **BzATP:** 2'-&3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP; **CTP:** Cytosintriphosphat; **Ip₅I:** di-Inosin-Pentaphosphat, **2-MeSATP:** 2-Methylthio-ATP; **NTS:** Nucleus Tractus Solitarius; **ZNS:** Zentralnervensystem

ATP bindet an die Ektodomäne der P2X Rezeptoren, jedoch wurde die genaue Bindungsstelle bisher nicht identifiziert [EGAN *et al.*, 2006]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass dieser Teil des Proteins keine bisher bekannten ATP-Bindungsmotive, wie z. B. das *walker motif* [ROBERTS *et al.*, 2006] besitzt. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei der

1. Einleitung

Bindungsstelle um ein Motiv handelt, das durch die Interaktion von Untereinheiten gebildet wird und nicht auf einer einzelnen Untereinheit an sich vorliegt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass bestimmte konservierte, positiv geladene Aminosäurereste maßgeblich an der ATP-Bindung beteiligt sind (im Falle des P2X₁ z. B. Lys68, Lys79, Lys309) [ROBERTS *et al.*, 2006, MARQUEZ-KLAKA *et al.*, 2007].

Alle P2X Rezeptoren öffnen unmittelbar nach erfolgter ATP-Bindung. Der nachfolgende Zeitverlauf der ATP-vermittelten Stromantwort hängt vom Subtyp und von einer eventuellen Modulation bzw. Regulation des Kanals (*s. Abb. 1.3*), aber auch von dem gewählten Expressionssystem ab [ZHOU *et al.*, 1998; EGAN *et al.*, 2006]. Generell zählen der P2X₁ und der P2X₃ zu den schnell desensibilisierenden Subtypen, deren Stromantwort bei fortwährender Agonisten-Applikation innerhalb von 1-2 s auf < 10 % des initialen Stroms abfällt. Die restlichen Subtypen zeigen einen mehr oder weniger konstanten bzw. sehr langsam desensibilisierenden Stromverlauf [NORTH, 2002; EGAN *et al.*, 2006], deren Desensibilisierungsverhalten auch von Zelle zu Zelle variieren kann [ZHOU *et al.*, 1998]. Einige heteromere P2X Rezeptoren zeigen biphasische Stromantworten, bestehend aus einer schnellen und einer langsamen Komponente (z. B. P2X_{1/2} [BROWN *et al.*, 2002] oder P2X_{1/5}, [EGAN *et al.*, 2006]). Das unterschiedliche Desensibilisierungsverhalten der verschiedenen Subtypen unterliegt mitnichten einem einzigen, mit allen Subtypen vereinbaren Mechanismus und ist bis heute nicht bis ins Detail aufgeklärt.

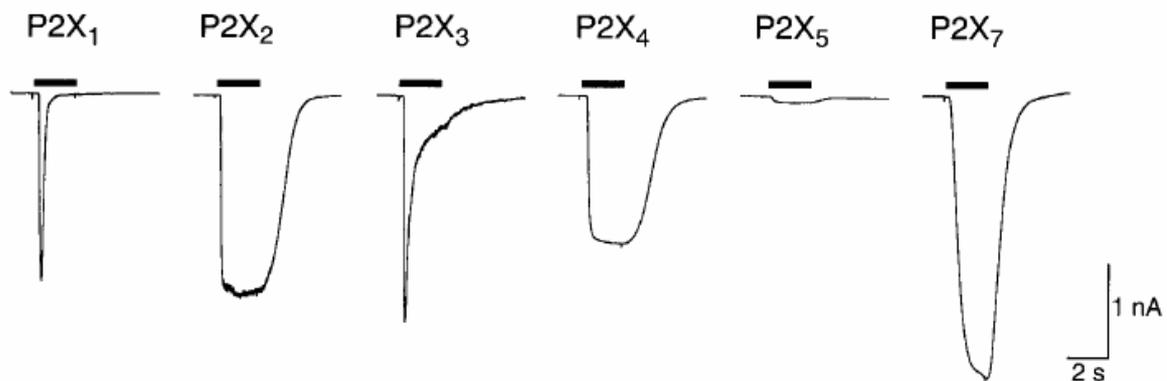


Abb. 1.3: Stromantworten aller unterschiedlicher, homomerer P2X Rezeptoren. Der schwarze Balken symbolisiert die Dauer der ATP-Applikation (halb-maximal). P2X₁ und P2X₃ zählen zu den schnell desensibilisierenden Subtypen, die restlichen zu den langsam bzw. nicht desensibilisierenden. P2X₆ bildet keine funktionellen homomeren Kanäle und ist aus diesem Grund nicht aufgeführt. (aus [NORTH, 2002])

Bei P2X Rezeptoren handelt es sich um Kationenkanäle. Diese sind nicht komplett unselektiv. Wenn dem so wäre, würden die Leitfähigkeiten für verschiedene Kationen ihrer relativen Beweglichkeit in Wasser folgen. Jedoch stellten DING & SACHS eine Leitfähigkeitsreihenfolge auf ($K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$), welche nicht der Reihenfolge steigender Ionenbeweglichkeiten in Wasser gehorcht [1999], so dass vermutet werden kann, dass die permeierenden Kationen mit einer negativ geladenen Bindungsstelle in der Kanalpore

1. Einleitung

interagieren, bzw. kurzzeitig gebunden werden [MIGITA *et al.*, 2001]. Ca^{2+} spielt eine besondere Rolle an P2X Rezeptoren, da es einerseits eine signifikante Permeabilität aufweist [EICKHORST *et al.*, 2002], andererseits aber auch hemmend auf die Rezeptoren wirkt [DING & SACHS, 2000]. Der P2X₅ Rezeptor stellt eine Ausnahme unter den purinergen Rezeptoren dar, da er eine geringe Anionen-(Cl⁻) Permeabilität aufweist [THOMAS & HUME, 1990]. Ob noch weitere Subtypen dieser Rezeptorenfamilie Anionen-Permeabilitäten aufweisen, ist bisher nicht bekannt.

Der native P2X₇ Rezeptor entwickelt bei längerer Agonisten-Applikation eine deutliche Permeabilität für große Anionen, wie z. B. Glutamat oder *Lucifer Yellow* [BUISMAN *et al.*, 1988; STEINBERG *et al.*, 1987]. Dieses Phänomen der Permeabilitätsänderung ist nicht nur auf den P2X₇ Rezeptor begrenzt. Auch die P2X_{2,4,5} Rezeptoren zeigen multiple Leitfähigkeits-Zustände bei lang anhaltender Agonisten-Applikation. Der diesem Phänomen zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt, es wird aber angenommen, dass es sich um eine physikalische Vergrößerung der Kanalpore (*pore dilation*) an sich handelt [VIRGINIO *et al.*, 1999; EICKHORST *et al.*, 2002; NORTH, 2002; EGAN *et al.*, 2006], s. 1.2.4.

P2X Rezeptoren werden durch eine Reihe von Modulatoren oder Signaltransduktionswegen reguliert. Dazu gehören Interaktionen mit anderen liganden-gesteuerten Ionenkanälen, mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren [NAKAZAWA *et al.*, 1994a] und mit einer Reihe anderer Proteine, was eine dynamische Regulation dieser Rezeptorfamilie in Antwort auf verschiedenste zelluläre Stimuli möglich macht [ROBERTS *et al.*, 2006]. Als wichtiger, möglicher Regulationsmechanismus ist die direkte Phosphorylierung des Kanalproteins am N- und C-Terminus zu nennen [ROBERTS *et al.*, 2006]. Letzterer ist zwar bei den einzelnen Subtypen in seiner Länge und Zusammensetzung stark variabel, jedoch besitzen alle N-Termini eine konservierte PKC (Protein Kinase C)-Bindungsstelle [BOUÉ-GRABOT *et al.*, 2000; ENNION *et al.*, 2002]. Mutationsstudien konnten belegen, dass die Phosphorylierung durch die PKC die Kanalaktivität (im P2X₂ Rezeptor) regulieren kann [BOUÉ-GRABOT *et al.*, 2000], diese Phosphorylierungsstelle aber unterschiedliche Aufgaben in unterschiedlichen Subtypen übernimmt [VIAL *et al.*, 2004a]. Weiterhin wird angenommen, dass der C-Terminus die PKC-Bindungsstelle kontrolliert [PAUKERT *et al.*, 2001]. Aber auch Aktivierungen der PKA- (Protein Kinase A, negative Regulation) [CHOW & WANG, 1998] und der Calcium/Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II [XU & HUANG, 2004] haben Effekte auf die Kanaleigenschaften des P2X₂ Rezeptors. Ebenfalls wurde gezeigt, dass P2X Rezeptoren mit ($\alpha_3\beta_4$ -) nicotinischen Rezeptoren [NAKAZAWA, 1994b; SEARL *et al.*, 1998; KHAKH *et al.*, 2000; KHAKH *et al.*, 2005], 5-HT₃-Rezeptoren [BARAJAS-LOPEZ *et al.*, 2002; BOUÉ-GRABOT *et al.*, 2003] und GABA_{A&C} Rezeptoren [SOKOLOVA *et al.*, 2001; BOUÉ-GRABOT *et al.*, 2004a+b] interagieren. Jedoch bleiben auch hier die molekularen Grundlagen dieser Wechselwirkungen noch zu klären. Wie eingangs schon

1. Einleitung

erwähnt, gibt es eine Fülle weiterer Modulatoren, zu denen Ionen (Ca^{2+} , Zn^{2+} [WILDMAN *et al.*, 1999; VIRGINIO *et al.*, 1997]), Protonen und andere Makromoleküle (Ivermectin, Cibacron Blue [MILLER *et al.*, 1998; KHAKH *et al.*, 1999a; NORTH, 2002]) oder Proteine (Fe65, β III Tubulin, *etc.* [GENDREAU *et al.*, 2003; MASIN *et al.*, 2006]) gehören. Diese Modulatoren können eine Potenzierung oder eine Hemmung bis hin zum Block der Kanalfunktion bewirken und dabei an den einzelnen Subtypen der P2X Familie unterschiedliche bzw. unterschiedlich starke Effekte hervorrufen.

1.2.4 P2X₂ Rezeptoren

Der P2X₂ Rezeptor Subtyp, der innerhalb der P2X-Familie strukturell am ehesten mit den P2X₄ und P2X₅ Subtypen verglichen werden kann, ist ein aus 472 Aminosäuren bestehendes Protein (*s. Abb. 1.4*), das einen vergleichsweise langen C-Terminus aufweist. Ursprünglich wurde dieser Subtyp aus einer PC12 Zelllinie (Ratte, Phäochromocytom/Nierentumor) kloniert [BRAKE *et al.*, 1994] und konnte im Anschluss daran ubiquitär im Nervensystem (peripher wie auch zentral bzw. cerebral) und in vielen anderen, nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen werden. Er erfüllt dort unterschiedliche Funktionen, wie die Regulation schneller exzitatorischer und inhibitorischer synaptischer Vorgänge oder Aufgaben in der Signaltransduktion [NORTH, 2002; GEVER *et al.*, 2006].

Bei dem P2X₂ Rezeptor handelt es sich um einen Kanal, der unspezifisch monovalente Kationen passieren lässt ($\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$) und für große Kationen wie Tris, NMDG oder TEA sowie für Anionen nahezu impermeabel ist [NORTH, 2002]. Des Weiteren zeigt er eine hohe Leitfähigkeit für Ca^{2+} , die aber geringer als die des P2X₁ oder des P2X₄ Subtyps ist [NORTH, 2002]. Allerdings gestalten sich Ca^{2+} -Leitfähigkeits-Messungen schwierig, da Ca^{2+} diesen Subtyp gleichzeitig inhibiert (*s. u.*). Die IV-Kennlinie dieses Subtyps zeigt eine einwärts gleichrichtende Charakteristik [BRAKE *et al.*, 1994; DING & SACHS, 1999], die sich in einer Verdopplung der Leitfähigkeit zwischen -60 und -120 mV niederschlägt. Die molekularen Mechanismen dieser Spannungsabhängigkeit sind jedoch bisher nicht aufgeklärt [NORTH, 2002].

Wie bei einigen anderen P2X Subtypen auch, zeigt der P2X₂ (mit Ausnahme des Maus-P2X₂, [EICKHORST *et al.*, 2002]) das Phänomen der *pore dilation*, der zeitabhängigen Erweiterung des „normalen“, sog. I₁-Zustandes der Kanalpore um mind. 3 Å bei lang anhaltender Agonisten-Applikation [EICKHORST *et al.*, 2002]. Dieser Zustand der erweiterten Pore, I₂, erlaubt es auch großen Kationen (Tris, NMDG, TEA), die Pore zu passieren [FISHER *et al.*, 2004; EGAN *et al.*, 2006]. Im Gegensatz zum P2X₅ ist allerdings bisher noch nicht gezeigt worden, dass auch anionische Makromoleküle permeieren können [DING & SACHS, 1999; KHAKH *et al.*, 1999b; VIRGINIO *et al.*, 1999]. Der dieser *pore dilation* zugrunde liegende Mechanismus wurde ebenfalls

1. Einleitung

noch nicht aufgeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass er nicht auf eine inhomogene Verteilung von permeablen Ionen an der Zellmembran zurückzuführen ist [ZHOU & HUME, 1998], aber von der Rezeptordichte in der Membran abhängig ist [FUJIWARA & KUBO, 2004]. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um eine intrinsische Kanaleigenschaft, die aus einer zeitabhängigen Änderung im *gating* oder der Leitfähigkeit resultiert [CLOUES, 1995; ZHOU & HUME, 1998] bzw. durch Änderungen der Transmembran-Domänen-Konformation, die durch Bewegungen des cytoplasmatischen C-Terminus während des *gatings* ausgelöst werden, bedingt ist [KHA KH & LESTER, 1999; FISHER *et al.*, 2004; KHA KH & EGAN, 2005].

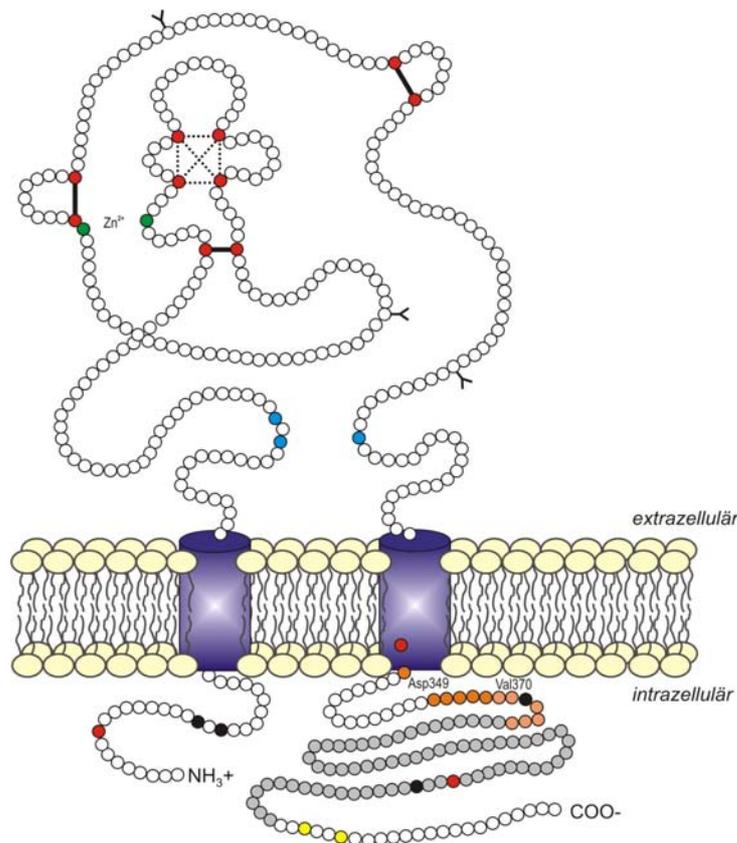


Abb. 1.4: Modell des P2X₂ Rezeptor Subtyps (nach [CLYNE *et al.*, 2002]): Zu sehen sind die intrazellulär lokalisierten N- und C-Termini, die beiden Transmembrandomänen (Phe31-Val51, Ile331-Lys353) und der große extrazelluläre *loop*. **Rote Kreise** zeigen Cys-Reste (**schwarze Linien** geben Disulfidbrücken an, wobei die gepunkteten Linien Disulfidbrücken wiedergeben, die nicht eindeutig zugeordnet werden können), **grüne Kreise** stellen 2 Histidine (His120 und His213) dar, die vermutlich an der Bildung der Zn²⁺-Bindungsstelle beteiligt sind, **blaue Kreise** zeigen die Lysin-Reste 69, 71 und 308, an die vermutlich die Phosphatgruppen des ATP binden [JIANG *et al.*, 2000; ENNION & EVANS, 2002], **Y-Formen** stellen die 3 extrazellulären N-vermittelten Glykosylierungsstellen dar. **Graue Kreise**: alternative *splice site* Val370-Gly348 [BRÄNDLE *et al.*, 1997], **orange Kreise**: Asp349 [ZHOU *et al.*, 1998] sowie proximaler C-Terminus - für die Desensibilisierung essentielle AS. **Schwarze Kreise**: PKC-Phosphorylierungsstellen: Thr18, Lys20 (N-terminal), Thr372 (C-terminal) und PKA-Phosphorylierungsstelle: Ser431 (C-terminal) [BOUE-GRABOT *et al.*, 2000]. **Gelbe Kreise**: Pro451/454 des in der vorliegenden Arbeit mutierten SH3-Bindungsmotives (s. 2.4/3.4/4.4).

Der P2X₂ kommt nativ (Mensch (h), Ratte (r), Meerschweinchen) in 2 verschiedenen Isoformen, sog. *splice variants*, vor, die namentlich mit P2X_{2a} und P2X_{2b} gekennzeichnet werden [BRÄNDLE *et al.*, 1997; SIMON *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1999], und auf unterschiedliches

1. Einleitung

splicing während der Proteinbiosynthese zurückzuführen sind. Während die 2a-Isoform die volle Länge (472 Aminosäuren) aufweist, fehlen in der 2b-Isoform die Reste 370-439 im C-Terminus, der somit deutlich kürzer ausfällt. Die funktionelle Auswirkung dieses strukturellen Unterschiedes manifestiert sich – im rP2X₂, nicht jedoch im hP2X₂ [LYNCH *et al.*, 1999] - in einem veränderten Desensibilisierungsverhalten: während der P2X_{2a} als nicht oder nur gering desensibilisierend gilt, zeigt die *splice*-Variante 2b eine 5-fach stärkere Desensibilisierung bei verlängerter ATP-Applikation sowie verringerte Sensitivitäten gegenüber den Antagonisten Suramin und PPADS [SIMON *et al.*, 1997; LYNCH *et al.*, 1999]. Die physiologische Bedeutung für dieses alternative *splicing* ist unbekannt, genauso wie der für das oben dargelegte, breit variierende Desensibilisierungsverhalten der P2X Rezeptoren; man nimmt aber an, dass dieses Phänomen für Perioden längerer, extrazellulärer ATP-Anwesenheit, z. B. nach Gewebeverletzung o. Ä. dient. Weiterhin wird spekuliert, dass durch Variation der Desensibilisierung die neuronale Erregbarkeit von Neurotransmitter-gesteuerten Kanälen reguliert wird [SMART, 1997]. Jedoch muss hinzugefügt werden, dass in zellfreien *Patches* auch die P2X_{2a}-Isoform schnell desensibilisierend ist, was auf einen oder mehrere intrazelluläre Regulatoren/Modulatoren hinweist, die in zellfreien Messanordnungen schnell ausgewaschen werden [DING & SACHS, 1999 + 2000], aber noch nicht identifiziert werden konnten. Ebenfalls wird vermutet, dass das – z. T. stark variierende – Desensibilisierungsverhalten dieses Subtyps durch den C-Terminus kontrolliert wird [NORTH, 2002], allerdings konnte bisher nicht nachgewiesen werden, in welcher Weise.

Der EC₅₀-Wert für ATP am P2X₂ Rezeptor wird mit 30 µM angegeben [NAKAZAWA & OHNO, 2004; OHTA *et al.*, 2005], an anderen Stellen auch mit ~10 µM [DING & SACHS, 1999; LYNCH *et al.*, 1999], jeweils mit Hill-Koeffizienten über 1 [DING & SACHS, 1999], was dafür spricht, dass zur Kanalaktivierung die Bindung mehrerer Moleküle ATP benötigt wird. Ähnlich potent sind ATP-γ-S und 2-MeSATP [LYNCH *et al.*, 1999; GEVER *et al.*, 2006]. Bis heute sind keine nur für diesen Subtyp spezifischen Agonisten bekannt [NORTH, 2002], und im Gegensatz zum P2X₁ Rezeptor zeigt er nur eine sehr schwache Empfindlichkeit gegenüber dem Agonisten αβ-me-ATP [HAINES *et al.*, 2001]. Potenziert wird die Aktivität der homomeren P2X₂ Rezeptoren durch Protonen [DING & SACHS, 1999; STOOP & QUAYLE, 1998], was ihn von allen anderen P2X Subtypen unterscheidet sowie durch geringe Konzentrationen von Zink und Kupfer [BRAKE *et al.*, 1994; WILDMAN *et al.*, 1999; XIONG *et al.*, 1999; CLYNE *et al.*, 2003]. Ebenso wie es keine spezifischen Agonisten für diesen Subtyp gibt, sind bis heute keine selektiven Antagonisten bekannt. PPADS, TNP-ATP und *reactive blue-2* zeigen gleichwertige Inhibitionen, dabei jedoch sämtlichst weniger potent als an P2X₁ oder P2X₃ Subtypen [GEVER *et al.*, 2006]. Darüber hinaus wird der P2X₂ durch millimolare (1-5 mM, [EVANS *et al.*, 1995; DING & SACHS, 2000]) Konzentrationen divalenter Kationen, mit Ausnahme von Zink (*s. o.*) inhibiert.

1. Einleitung

Sämtliche bisher nachgewiesenen Protein-Protein-Interaktionen der P2X Rezeptoren (s. o., 5-HT₃, $\alpha_3\beta_4$ nicotinischer Rezeptor, GABA_{A&C} Rezeptor) wurden für den P2X₂ Subtyp nachgewiesen.

1.3 Ci-VSP

1.3.1 Allgemeines

Ci-VSP (*Ciona intestinalis*-Voltage Sensing Phosphatase) ist ein kürzlich entdecktes, 65,2 kDa großes Membranprotein aus der Seescheide (*C. intestinalis*, s. Abb.1.5). Es besteht aus einer intrazellulären Phosphatase und einer spannungssensorischen, membran-integralen Domäne, die die Phosphatase-Aktivität kontrolliert [MURATA *et al.*, 2005]. Zu Zeiten seiner Entdeckung war Ci-VSP in seiner Art einzigartig, mittlerweile wurden Beispiele ähnlicher Proteine bekannt (H_v1) [RAMSEY *et al.*, 2006].



Abb. 1.5: Seescheiden (*Ciona intestinalis*) in natürlicher Umgebung.

(Photos: [<http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/110.htm> und <http://dbtgr.hgc.jp/>])

C. intestinalis ist einer der bekanntesten Vertreter der Ordnung der Seescheiden an europäischen Küsten. Sie ist eine einzeln und sessil lebende Schlauchascidie, die 10-15 cm groß werden kann und einen meist birnenförmigen Körper aufweist. Die Tiere sitzen an überhängenden Felsen, unter Steinen oder im Seetang zwischen den Gezeitenmarken, noch häufiger findet man sie in küstennahen seichten Meeresstellen. Ihr Körperbau ist für eine strudelnde Lebensweise geschaffen, der Kiemendarm unter dem gallertartigen Mantel nimmt einen ziemlich großen Teil des Körpers ein. Durch Wimpernschlag wird ein permanenter Wasserstrom durch diesen Kiemendarm aufrechterhalten. Seescheiden sind Zwitter.

Ci-VSP wird v. a. in den Spermien der Seescheiden exprimiert, was zu der Annahme führte, dass es sich auf Physiologie oder Morphologie der Spermien auswirkt. Kürzlich wurde in *C. intestinalis* ein sog. *sperm activating and attracting factor* (Steroid) identifiziert, der zur

1. Einleitung

Beweglichkeit der Spermien beiträgt. Durch seine spannungsabhängige Phosphatase-Aktivität könnte Ci-VSP die Spermienbeweglichkeit nach Hyper-/Depolarisationen regulieren [MURATA *et al.*, 2005] oder gar in Signaltransduktionswege eingreifen, in dem es durch Änderung der zellulären Phospholipidkonzentrationen *messenger*-Moleküle bzw. dadurch membranäre Transportsysteme reguliert [IWASAKI *et al.*, 2008].

1.3.2 Struktur und Funktion

Wie bereits erwähnt, besteht Ci-VSP aus einer spannungsensorischen und einer Phosphatase-Domäne. Nachfolgend werden beide Domänenfunktionen zunächst einzeln erläutert, anschließend wird auf die daraus resultierende Funktion eingegangen.

Alle bisher bekannten spannungsabhängigen Ionenkanäle (ALABI *et al.*, 2007) besitzen eine „Kanal-Domäne“ mit einem zentralen Durchgang, durch den selektiv Ionen diffundieren können, sobald der betreffende Kanal öffnet. Die dafür zuständigen *gates* werden durch 4 spannungsensorische (*voltage sensing*, VS) Domänen, die rund um die Kanalpore angeordnet sind, kontrolliert (s. Abb. 1.6).

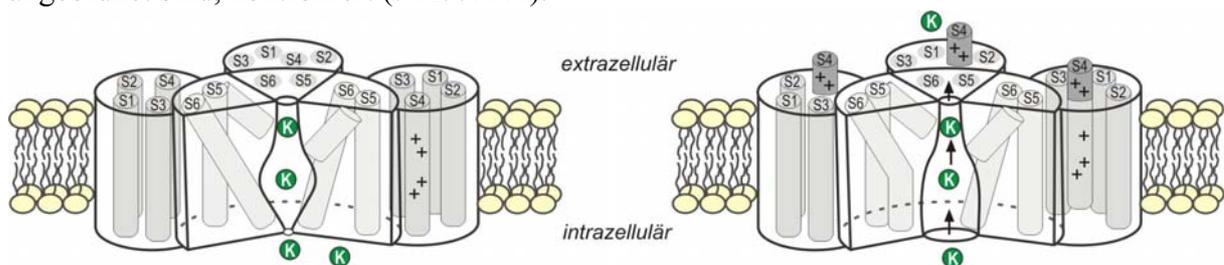


Abb. 1.6: Modell eines spannungsaktivierten Ionenkanals (K_v Kanal). Nur 3 der 4 vorhandenen Untereinheiten sind hier im geschlossenen (A) und geöffneten (B) Zustand gezeigt. Die S5- und S6-Segmente tragen zur Porenbildung bei, die Segmente 1-4 jeder Untereinheit formen die VS-Domänen. Die S4-Ladungen bewegen sich – als Antwort auf eine Depolarisation – in Richtung des Extrazellulärraumes, was eine Öffnung der Kanal-*gates* nach sich zieht. Die Verbindung der S4- und S5-Segmente ist – höchstwahrscheinlich – für die energetische Kopplung dieses Prozesses zuständig. (nach [LARSSON, 2002])

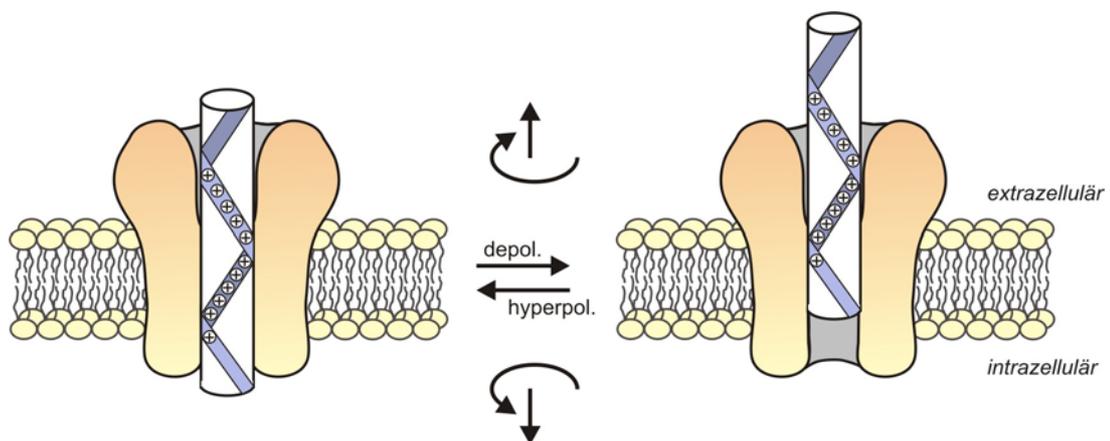


Abb. 1.7: Beispiel einer möglichen, helikalen Bewegung der S4-Segmente von VS-Domänen. (vgl. Abb. 1.6; nach [GANDHI & ISACOFF, 2002])

1. Einleitung

Dieses **Prinzip des spannungsabhängigen *gatings*** ist folgendes: Jede VS-Domäne besteht aus 4 Transmembran-Helices (S1-S4), von denen das S4-Segment überwiegend positiv geladene Aminosäurereste (Arginin) trägt. Das elektrische Feld der Membran fällt über die Arginin-Reste des S4-Segments ab, so dass Änderungen im Membranpotential dazu führen, dass sich eben jenes Segment elektrophoretisch durch die Lipiddoppelschicht der Membran bewegt (s. *Abb. 1.7*). Die daraus resultierenden Konformationsänderungen des Proteins werden auf die *gates* der Pore in der Kanaldomäne übertragen, die daraufhin öffnen bzw. schließen [GANDHI & ISACOFF, 2002; ALABI *et al.*, 2007]. *Shaker*-K⁺-Kanäle, die bekannteste Gruppe der spannungsgesteuerten K⁺-Kanäle, besitzen in jedem der vier S4-Segmente 7 basische Aminosäurereste, die voneinander jeweils durch 2 hydrophobe Reste getrennt sind. Jedoch nur die äußeren (in Richtung extrazellulär) 4 Arginin-Reste sind innerhalb des elektrischen Feldes der Membran lokalisiert. Das homologe S4-Segment von Ci-VSP besitzt lediglich 4 Arginin-Reste (s. *Abb. 1.8*), die dem extrazellulären Anteil des S4-Segments der *Shaker*-Kanäle ähneln. Darüberhinaus finden sich im Ci-VSP-Molekül – ebenfalls wie im *Shaker*-Kanal – 2 hoch-konservierte Aminosäurereste im S2-Segment der VS-Domäne (ein saurer und ein basischer Rest). Eine dritte Gemeinsamkeit zwischen diesen beiden Proteinen findet sich im S3-Segment – beide besitzen einen konservierten Asparat-Rest [HORN, 2005].

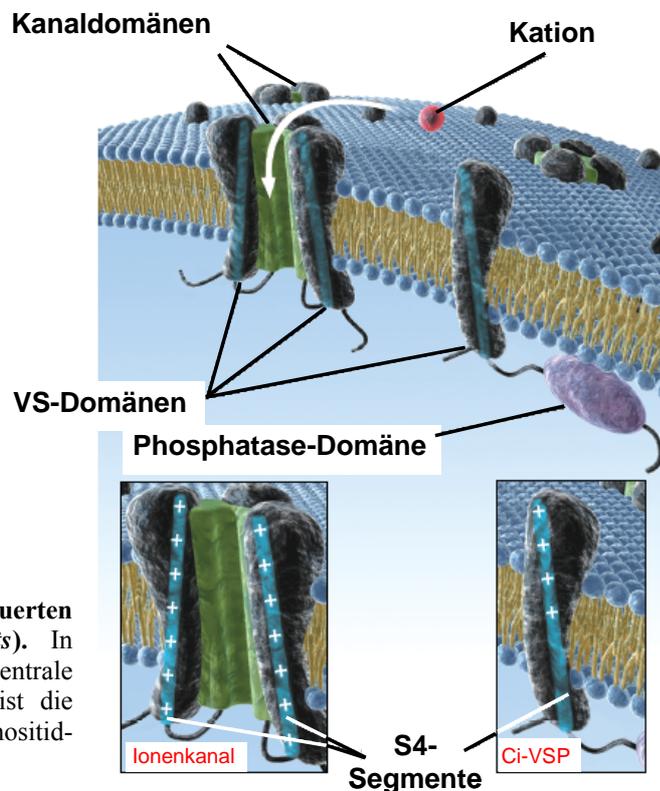


Abb. 1.8: Vergleich von spannungsgesteuerten Ionenkanälen (links) und Ci-VSP (rechts). In Ionenkanälen sind 4 VS-Domänen um eine zentrale Kanalpore angeordnet, im Ci-VSP-Molekül ist die VS-Domäne an eine intrazelluläre Phosphoinositid-Phosphatase gekoppelt. (nach [HORN, 2005])

Eine starke Abweichung des strukturellen Aufbaus der **Ci-VSP-VS-Domäne** konnte jedoch kürzlich von KOHOUT *et al.* [2008] aufgedeckt werden. Sie konnten durch *total internal reflection fluorescence* (TIRF)-Experimente belegen, dass die spannungssensorische Domäne nicht - wie in allen bisher bekannten, spannungsabhängigen Proteinen mit VS-

1. Einleitung

Domänen - tetramer (4 Untereinheiten) aufgebaut ist, sondern nur aus einer einzigen Untereinheit (monomer) besteht. Zudem konnten sie ausschließen, dass es – auch bei sehr hoher Expressionsdichte in der Membran – zu funktionellen Interaktionen zwischen den monomeren Proteinmolekülen kommt, diese also unabhängig voneinander arbeiten, dabei aber die gleiche Spannungsabhängigkeit wie ihre tetrameren „Schwestermoleküle“ in Ionenkanälen aufweisen.

Die herausragendste Eigenschaft des Ci-VSP-Proteins ist die Tatsache, dass an die vorhandene, N-terminale VS-Domäne eine weitere Protein-Domäne energetisch gekoppelt ist, diese jedoch keine Porendomäne, sondern eine intrazelluläre Phosphatase darstellt.

Ci-VSP war das erste bis dahin bekannte Protein, das derartige strukturelle Merkmale aufwies. Ein Jahr später konnten RAMSEY und Kollegen ein ähnliches Protein in Säugern nachweisen, das ebenfalls eine VS-Domäne aufweist, aber keine energetisch daran gekoppelte Kanalpore besitzt (H_v1) [RAMSEY *et al.*, 2006]. 2008 zeigten ebenfalls OKAMURA und Kollegen, dass ein fast identisches Protein auch in Wirbeltieren (*Danio rerio*, Zebrafisch) zu finden ist (DR-VSP [HOSSAIN *et al.*, 2008]).

Die **Phosphatase**, die im Ci-VSP-Molekül an die VS-Domäne gekoppelt ist, ähnelt in ihrer Form und Struktur stark der Phosphoinositid(PI)-Phosphatase der PTEN-Familie. PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*, s. Abb. 1.9) ist eine Phosphoinositid 3-Phosphatase, die zu der Familie der Protein Tyrosin Phosphatasen gehört. Es dephosphoryliert PI_{(3,4,5)P₃} an der 3'-Position des Inositolrings zu PI_{4,5}P₂ und wirkt in direktem Antagonismus zur PI3-Kinase (PI3K) [SIMPSON & PARSONS, 2001]. Auf diese Art und Weise reguliert PTEN die zellulären PI_{3,4,5}P₃- und PI_{4,5}P₂-Level und greift in Signaltransduktionswege ein, die lipidhaltige *second messenger* verwenden [MAEHAMA & DIXON, 1999]. PTEN ist die wichtigste Phosphatase, die den PI3K/Akt-Stoffwechselweg negativ reguliert [MOCANU & YELLON, 2007], indem sie die Akt-Aktivität (Akt = Protein Kinase B, (Serin/Threonin-Kinase, die durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie Insulin und IGF-1 aktiviert wird)) steuert und somit auf wichtige metabolische Funktionen wie Zellzyklus, Translation und Apoptose einwirkt [SIMPSON & PARSONS, 2001; LESLIE & DOWNES, 2002]. PTEN ist in einigen Tumorarten inaktiviert und fungiert demnach als Tumor-Suppressor [GERICKE *et al.*, 2006]. Der Name PTEN stammt von der hohen Aminosäure-Analogie zu sowohl der Gruppe der Protein Tyrosin Phosphatasen als auch zum Phosphoprotein Tensin [LO, 2004].

Auffällige gemeinsame Strukturmerkmale zwischen PTEN und der kürzlich entdeckten Ci-VSP sind **1)** die N-terminale Konsensus-Sequenz HCXXGXXR (*active site motif*, Reste 123-130), die für die Aktivität der Tyrosinphosphatase- als auch der PI-Phosphatase-Aktivität erforderlich ist [SIMPSON & PARSONS, 2001], **2)** drei basische Aminosäure-Reste (His332, und

1. Einleitung

Lys364/367), die mit den Phosphatgruppen des Substrats interagieren und **3**) eine sog. C2 Lipidbindungsdomäne am C-Terminus, die für die Bindung der Phosphoinositide an das Enzym sorgt sowie **4**) ein konservierter Cys-Rest in der katalytischen Domäne, der für die PI-Phosphatase-Aktivität essentiell ist. Ein Austausch dieses Cysteins durch Serin (Ci-VSP-C363S) bewirkt einen völligen Verlust der Phosphatase-Aktivität von Ci-VSP [MURATA *et al.*, 2005].

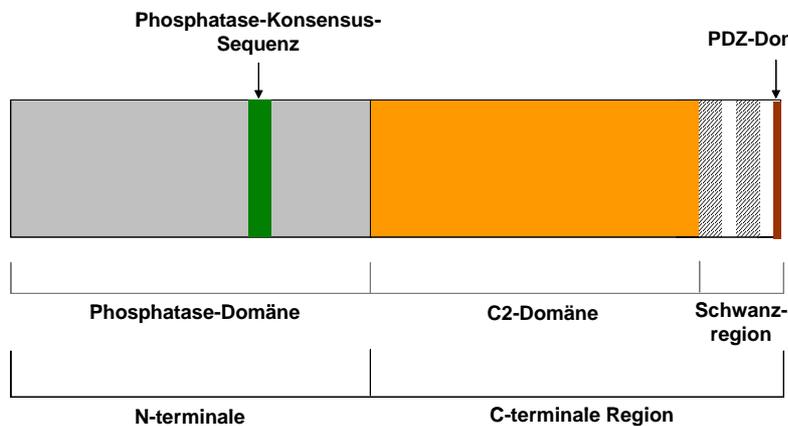


Abb 1.9: Protein-Domänen von PTEN. PTEN ist ein aus 403 Aminosäuren bestehendes Protein, das eine Phosphatase-Domäne (Reste 1-185) in der N-terminalen Region besitzt (enthält die Phosphatase-Sequenz, s. Text). Ebenfalls zu erkennen sind C-terminal die Ca^{2+} -unabhängige C2-Domäne (Bindung PTEN an Phospholipide), die PDZ-Domäne (unterstützt Protein-Protein-Interaktionen, benannt nach den ersten drei Proteinen, in denen sie gefunden wurde) sowie CK2-Phosphorylierungs-Stellen und PEST-Domänen (reich an Pro, Glu, Ser, Thr), zu erkennen an den gestreiften Bereichen (die für die Stabilität des Proteins wichtig sind). (nach [SIMPSON & PARSONS, 2001; WAITE & ENG, 2002])

Im Unterschied zu PTEN ist Ci-VSP nicht nur in der Lage, $\text{PI}_{3,4,5}\text{P}_3$ als Substrat zu nutzen, sondern auch $\text{PI}_{4,5}\text{P}_2$ [MURATA & OKAMURA, 2007; IWASAKI *et al.*, 2008], was zunächst – nach reiner Strukturanalyse und dementsprechenden Vergleich mit PTEN – nicht erwartet wurde. Diese (bisher nur *in vitro* nachgewiesene) Phosphatase-Aktivität gegenüber $\text{PI}_{4,5}\text{P}_2$ greift die Phosphatgruppe am 5'-C-Atom an, so dass das Produkt dieser Reaktion PI_4P ist. Daraus kann weiterführend geschlossen werden, dass die 5'-Phosphatase-Aktivität auch am $\text{PI}_{3,4,5}\text{P}_3$ angreifen kann, resultierend in einer $\text{PI}_{3,4}\text{P}_2$ -Produktion. Eben dies wurde durch HALASZOVICH und Kollegen gezeigt [2008], die darüber hinaus sogar eine 3'-Phosphatase-Aktivität gänzlich ausschließen. Dieser kleine, jedoch bedeutende Unterschied in der Substratspezifität dieser Phosphatase scheint auf eine einzige Aminosäure (Gly-365) zurückzugehen, die sich im aktiven Zentrum (*active site motif*) befindet und in der PTEN Phosphatase gegen ein Alanin ausgetauscht ist [IWASAKI *et al.*, 2008]. Im Fall von PTEN wirkt $\text{PI}_{4,5}\text{P}_2$ nur als allosterischer Effektor auf die Enzymaktivität, kann aber nicht als Substrat umgesetzt werden [CAMPBELL *et al.*, 2003]. Im Zuge dieser Erkenntnis muss die Tatsache in Betracht gezogen werden, dass die Ci-VSP nicht nur – wie PTEN – antagonistisch zur PI3K arbeitet, sondern auch zur PI4-Kinase (PI4K), die aus PI das monophosphorylierte PI_4P synthetisiert und somit die essentielle Vorstufe für $\text{PI}_{4,5}\text{P}_2$ in dessen Anabolismus generiert.

Bis heute konnte - indirekt wie direkt - nachgewiesen werden, dass die Ci-VSP durch Depolarisation aktiviert wird: zum einen weisen $PI_{4,5}P_2$ -abhängige K^+ -Kanäle (GIRK/IRK/KCNQ) reduzierte Stromamplituden nach Depolarisation in Ci-VSP coexprimierenden Oozyten auf, zum anderen konnte mithilfe von Fluoreszenz-Mikroskopie-Studien eine Verringerung der $PI_{4,5}P_2$ - und $PI_{3,4,5}P_3$ -Konzentrationen an der Zellmembran von Ci-VSP exprimierenden Oozyten nach Depolarisation beobachtet werden. Diese Änderungen der PI-Konzentration durch Ci-VSP-Aktivität konnten in Untersuchungen der GIRK2-Ströme in einem Zeitbereich von 0,5 s beobachtet werden, wenn die Membran auf 0 mV depolarisiert wurde. Bei stärkerer Depolarisation bis zu +40 mV war dieser Zeitbereich sogar noch geringer [MURATA *et al.*, 2005; MURATA & OKAMURA, 2007]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese Phosphatase auch funktionell ist und dass die VS-Domäne autonom, also auch ohne das Vorhandensein der Phosphatase, auf Änderungen des Membranpotentials reagieren kann, wie Messungen der Tor-/gating-Ströme [ULBRICHT, 1977] ergaben [MURATA *et al.*, 2005]. Diese gating-Bewegungen der VS-Domäne zeigen in Säugerzellen deutlich schnellere Kinetiken als in *Xenopus* Oozyten (1 ms vs. 100 ms), was auf die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der jeweiligen Membranen zurückgeführt wird [LUNDBY *et al.*, 2008]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese gating-Ströme auf die oben erwähnten basischen Aminosäurereste zurückgehen, da diese nach deren Neutralisation (Arg → Gln) nicht mehr nachweisbar waren [MURATA *et al.*, 2005]. Es wird angenommen, dass die energetische Kopplung zwischen Spannungssensor und Phosphatase-Aktivität durch einen engen Kontakt vom Ende des S4-Segments und Teilen der Phosphatase herrührt, der genaue Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt [HORN, 2005; IWASAKI *et al.*, 2008]. Allerdings gibt es Hinweise, dass die Bewegung der VS-Domäne die Aktivität der Phosphatase beeinflusst [HOSSAIN *et al.*, 2008].

1.4 Phosphoinositide

1.4.1 Allgemeines, Struktur und Funktion

Phosphoinositide (Phosphatidylinositole) sind membranständige Inositol-Phospholipide, denen wichtige Aufgaben im Ablauf zellulärer Signalwegen von Eukaryonten zukommen. Strukturell gesehen sind sie Diacylglycerole, die über eine Phosphodiesterbindung mit einem Inositol(-Ring) verbunden sind. Es gibt 8 natürlich vorkommende Subtypen, die sich lediglich im Phosphorylierungszustand der Inositol-Kopfgruppe unterscheiden. Eine Phosphorylierung kann an den 3-, 4- und 5-Hydroxylgruppenpositionen stattfinden (*s. Abb. 1.10*), was, ausgehend von Phosphatidylinositol (PtdIns/PI), zu folgenden Spezies führt: Phosphatidylinositol-Monophosphat (PtdInsP/PIP), Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PtdInsP₂/PIP₂) und Phosphatidylinositol-Triphosphat (PtdInsP₃/PIP₃), wobei es von PIP und PIP₂ jeweils 3 Isomere gibt. Alle PIs unterliegen einem schnellen Metabolismus, werden

1. Einleitung

durch spezialisierte Kinasen bzw. Phosphatasen ineinander umgewandelt und durch Phospholipasen abgebaut [PRESTWICH, 2004; SUH & HILLE, 2005; DIPAOLO & DECAMILLI, 2006]. Abnorme Expression oder Aktivität dieser Enzyme ist die Ursache vieler Krankheiten (Krebs, Diabetes *etc.*) [ZHAO *et al.*, 2007a].

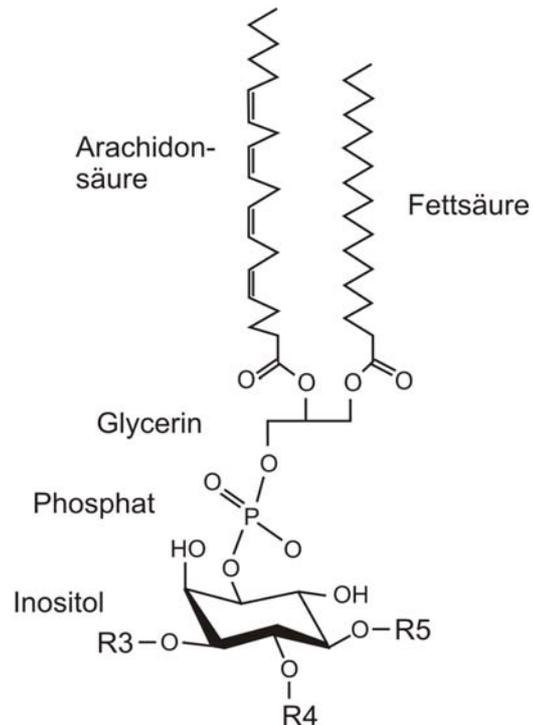


Abb. 1.10: Allgemeine Struktur der Phosphoinositide. Phosphoinositide sind Diacylglycerole, die über eine Phosphodiesterbindung an einen Inositol-Ring gebunden sind. Der Inositol-Ring kann durch Kinasen an den Hydroxylgruppenpositionen 3, 4 und 5 phosphoryliert werden, so dass Mono-, Bis- und Triphosphate entstehen. Insgesamt gibt es 8 verschiedene Isomere, die sich lediglich in dem Phosphorylierungszustand der Kopfgruppe unterscheiden. (nach [SUH & HILLE, 2005])

PIs sind an den unterschiedlichsten zellulären Funktionen beteiligt, unter anderem auch Signalfunktionen, die auf Interaktionen mit anderen Proteinen zurückzuführen sind: Da die Plasmamembranen und die intrazellulären Organellenmembranen unterschiedliche, d. h. charakteristische PI-Kompositionen aufweisen und eine Vielzahl von (Membran-)Proteinen spezifische PI-Bindungsdomänen besitzen, bestimmen u. a. diese Lipide, welche Proteine von der entsprechenden Membran rekrutiert und aktiviert werden [SUH & HILLE, 2005]. Generell werden 2 Klassen von Proteinen unterschieden, die mit Phospholipiden interagieren können. Die erste Klasse beinhaltet cytoplasmatische Proteine, die spezifische Bindungsdomänen besitzen, die wiederum mit der Kopfgruppe der Phospholipide interagieren [LEMMON, 2003; DIPAOLO & DECAMILLI, 2006] und somit durch Konzentrationsänderungen dieser membranären Lipide zur Plasmamembran hin oder von ihr weg befördert werden. Die zweite Klasse wird von integralen Membranproteinen gebildet, zu denen auch Transporter und Ionenkanäle gehören, deren Aktivität durch o. g. Phospholipide reguliert wird. Die ersten Studien hierzu wurden von HILGEMANN am $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und einem ATP-sensitiven K^+ -Kanal (Kir6.2) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der *rundown* der Kanalaktivität durch Änderungen der membranären PIP_2 -Konzentration beeinflusst wird [HILGEMANN & BALL, 1996; BAUKROWITZ *et al.*, 1998]. Später konnte zudem nachgewiesen werden, dass diese Phospholipid-bestimmten Regulationsmechanismen innerhalb von Sekunden ablaufen können [HILGEMANN

1. Einleitung

et al., 2001]. Synthesort der Phospholipide ist überwiegend das endoplasmatische Reticulum (ER), von wo sie anschließend entweder über vesikulären Transport oder durch cytosolische PI-Transfer-Proteine an ihren Bestimmungsort transportiert werden [DIPAOLLO & DECAMILLI, 2006]. Im Nachfolgenden soll auf die zwei physiologisch wichtigsten Vertreter der Phosphoinositide, PIP₂ und PIP₃ näher eingegangen werden.

1.4.2 PIP₂ und PIP₃

PI_{4,5}P₂ ist das am häufigsten vorkommende Isomer des gesamten zellulären PIP₂, wobei es nur 1-3 % der Membran-Phospholipide in eukaryotischen Zellen ausmacht. Es ist überwiegend an der cytosolischen Seite der Plasmamembran und nicht in internen Organellenmembranen anzutreffen. Wegen seines überwiegenden Vorkommens wird PI_{4,5}P₂ oft einfach nur als PIP₂ bezeichnet. Die beiden anderen Isomere kommen ebenfalls überwiegend intrazellulär vor, wobei PI_{3,5}P₂ erst kürzlich in Fibroblasten [WHITEFORD *et al.*, 1997] und in Hefen [DOVE *et al.*, 1997] entdeckt wurde. Die absolute, zelluläre PIP₂-Konzentration beträgt 5-25 µmol pro Liter Zellwasser, was an HEK293- und COS-Zellen (Fibroblasten) nachgewiesen wurde [NASUHOGLU *et al.*, 2002]. Die Menge von PIP₂ in einer Oozyte von *Xenopus laevis* wird in der Literatur mit 0,8 pmol angegeben. Dabei konnte innerhalb der Plasmamembran kein Unterschied der PIP₂-Verteilung bezüglich vegetativer und animaler Hemisphäre der Oozyte gemacht werden [SNOW *et al.*, 1996]. PIP₂ ist an der Verankerung zahlreicher Signalmoleküle und Cytoskelett-Bestandteile an die Plasmamembran beteiligt. Darüber hinaus spielt es eine Rolle in der Regulation des Cytoskeletts, im *protein trafficking*, und es dient als Cofaktor, als Modulator von membranassoziierten Signalmolekülen *etc.* [CZECH, 2000]. Bis heute steigt die Zahl der bekannten Prozesse, an denen PIP₂ beteiligt ist, stetig [DIPAOLLO & DECAMILLI, 2006].

1958 lieferten HOKIN & HOKIN erste Hinweise auf eine Beteiligung von PIs an zellulären Signalwegen. In den 80-iger Jahren wurde PI_{4,5}P₂ stark diskutiert, als bekannt wurde, dass es ein Vorläufer der bedeutenden *second messenger* Inositol-Triphosphat (Ins_{-1,4,5}-P₃/IP₃; Ca²⁺-Freisetzung [STREB *et al.*, 1983]) und Diacylglycerol (DAG) ist. Beide Substanzen entstehen durch Phospholipase C (PLC)-vermittelte Hydrolyse des PI_{4,5}P₂. Die Möglichkeit, dass PIP₂ selbst auch regulatorische Eigenschaften besitzen könnte, wurde lange Zeit aufgrund der Komplexität dieses Moleküls negiert, waren doch alle bis *dato* bekannten Signalmoleküle deutlich einfacher aufgebaut [HILGEMANN *et al.*, 2001]. Erst seit kurzem ist es allgemein akzeptiert, dass auch PIP₂ als eigenständiges Molekül Signalfunktionen sowie regulatorische Aktivitäten in Bezug auf membranäre Transportsysteme innehat [TOKER, 1998; RAUCHER *et al.*, 2000]. Durch sein – verglichen mit anderen Membranlipiden - relativ geringes Vorkommen in der Membran kann es durch Konzentrationsänderungen (bedingt durch Wachstumsfaktoren, GTPasen, Zell-Zell-Interaktionen, Änderungen des Zellvolumens, Stress *etc.*) zelluläre

1. Einleitung

Aktivitäten lokal regulieren [SUH & HILLE, 2005]. Genaue Mechanismen dieser Regulation sind allerdings noch nicht grundlegend verstanden. Bisher konnten sog. *lipid rafts* (Phospholipid-Mikrodomänen) in Membranen nachgewiesen werden, die reich an Cholesterin und Sphingomyelin sind und in denen Phospholipide, v. a. PIP₂, akkumuliert vorliegen [LIU *et al.*, 1998; PIKE *et al.*, 1998; HILGEMANN *et al.*, 2001; NASUHOGLU *et al.*, 2002]. Der physikalische Zustand der PIs in der Membran ist aber noch weitestgehend unbekannt [MCLAUGHLIN & MURRAY, 2005], d. h., es ist unbekannt, ob diese Lipide frei oder gebunden vorliegen, wo sie gebunden werden und wie schnell sie im zellulären/membranären Milieu diffundieren können. Ebenfalls wurden *pools* von PIs im Zellkern vorgefunden [HAMMOND *et al.*, 2004].

PIP₃ entsteht durch Phosphorylierung des PIP₂ mittels PI3-Kinase an der dritten, noch freien Hydroxylgruppe des Inositolrings, und weist, wie PIP₂, ebenfalls zahlreiche regulatorische Aktivitäten in der Zelle auf. So ist es z. B. an der Zellproliferation und Zelldifferenzierung, am Zellwachstum, an der Apoptose, an Vesikelfusionen und Zellbewegungen beteiligt [CZECH, 2000; HILGEMANN *et al.*, 2001]. Die Konzentration an intrazellulärem PIP₃ ist deutlich geringer als die des PIP₂; unter physiologischen Bedingungen liegt sie bei wenigen Prozent des PIP₂-Gehaltes [HILGEMANN *et al.*, 2001], kann jedoch vorübergehend als Antwort auf Wachstumsfaktor-vermittelte Stimulierung dramatisch in seiner Konzentration steigen [DIPAULO & DECAMILLI, 2006]. PIP₃ wirkt v. a. durch Rekrutierung anderer Effektoren, die synergistische Signalwege regulieren. Es wird von zwei unterschiedlichen Enzymen dephosphoryliert, was konträre Wirkungen zur Folge hat: Dephosphorylierung an der 3-Position des Inositolrings durch PTEN (*phosphatase and tensin homologue*-Phosphatase) wirkt als „off“-Signal [WISHART & DIXON, 2002], wohingegen die Dephosphorylierung an der 5'-Position durch 5'-Phosphatasen wie SHIP-1 und -2 PI_{3,4}P₂ generiert, was nicht nur weitere Signalfunktionen erschließt, sondern auch offenbar die Wirkung des PIP₃ verlängert [MAJERUS *et al.*, 1999]. Diese vielfältigen metabolischen Wege von PIP₃ sind wichtige Ansatzpunkte in der Medizin, da sie als *drug targets* dienen können [DIPAULO & DECAMILLI, 2006].

1.4.3 Regulation von membranären Transportsystemen

Mittlerweile ist es, wie schon erwähnt, allgemein akzeptiert, dass PIP₂ Transporter und Ionenkanäle regulieren kann. Dabei hat es allerdings keineswegs immer die gleiche, sondern völlig konträre regulative Wirkungen. Systeme, die durch PIP₂ aktiviert werden, sind Plasmalemma-Ca²⁺-Pumpen (PMCA), Ca²⁺-Austauscher im Herz (NCX1) [HILGEMANN *et al.*, 2001], Na⁺,H⁺-Austauscher (NHE1-4) [AHARONOVITZ *et al.*, 2000], Na⁺,Mg²⁺-Austauscher [RASGADO-FLORES *et al.*, 2000], sämtliche einwärts gleichrichtenden K⁺-Kanäle (K_{ATP}, IRK, GIRK, ROMK Kanäle) [HUANG *et al.*, 1998; FAN & MAKIELSKI, 1997; HARVEY *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 1999; ROHÀCS *et al.*, 1999; SOOM *et al.*, 2001], epitheliale Na⁺-Kanäle (ENaC) [YUE *et al.*, 2001a], der

1. Einleitung

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) [HIMMEL & NAGEL, 2004] und Ryanodin-sensitive Ca^{2+} Kanäle (RyR) [CHU & STEFANI, 1991]. Membranäre Systeme, bei denen es durch PIP_2 -Einwirkung zu einer Inhibition oder Deaktivierung kommt sind cNukleotid-gesteuerte Kanäle in Stäbchenzellen (CNG) [WOMACK *et al.*, 2000], *transient receptor potential-like Drosophila* Kanäle (TRPL) [ESTACION *et al.*, 2001], Capsaicin-aktivierte TRP-Kanäle (VR1) [CHUAN *et al.*, 2001] sowie IP_3 -gesteuerte Ca^{2+} Kanäle (IP_3R) [GLOUCHANKOVA *et al.*, 2000]. Im Fall von spannungs-gesteuerten Na^+ -Kanälen, den meisten spannungsgesteuerten K^+ -Kanälen, Na^+ -Pumpen sowie den meisten Neurotransmitter-Transportern konnte weder eine stimulierende noch eine inhibierende Wirkung des PIP_2 nachgewiesen werden [HILGEMANN *et al.*, 2001].

Bisher sind keine Konsensus-Sequenzen bekannt, die die Identifizierung von Membranproteinen, die mit PIs interagieren, ermöglichen. Sämtliche bisher gefundenen Bindungsdomänen an membranären Transportsystemen zeigen keinerlei Ähnlichkeiten mit bisher bekannten PIP_2 -Bindungsdomänen, wie sie z. B. PH- (*Pleckstrin Homology*), PX- (*Phox Homology*), FYVE-Domänen *etc.* darstellen ([KAVRAN *et al.*, 1998; LEMMON, 1999; CULLEN *ET AL.*, 2001; HILGEMANN *et al.*, 2001; VANHAESEBROECK *et al.*, 2001]). Allerdings basieren diese Wechselwirkungen in den meisten Fällen auf elektrostatischen Wechselwirkungen der negativen Ladungen der Phosphate am Inositolring mit positiv geladenen Proteindomänen. So bestehen die meisten der bisher identifizierten PI-Bindungsdomänen in Transportsystemen aus einer Akkumulierung kationischer Aminosäurereste mit teilweise integrierten hydrophoben Resten, da PIP_2 unter physiologischen Bedingungen 3-fach negativ geladen vorliegt. Diese Bindungsdomänen können relativ unstrukturiert vorliegen, wie es z. B. im Profilin der Fall ist, oder aber ganze, eigenständig gefaltete Module darstellen, wie es auch PH-Domänen sind [DiPAOLO & DECAMILLI, 2006]. Jedoch sind diese identifizierten Bindungsdomänen in den meisten Fällen weniger selektiv als PH-Domänen, d. h. andere Phospholipide können – wenn in ausreichend hoher Konzentration vorhanden – ebenfalls an diese Domänen binden [HILGEMANN *et al.*, 2001]. Aus diesem Grund basieren entsprechende Versuchsansätze zunächst nur auf Beobachtungen von Änderungen der Protein-/Kanal-Aktivität, wenn sich die Phospholipid-Konzentrationen ändern. Der Nachteil dieser Methodik besteht darin, dass eine direkte Interaktion mit dem zu untersuchenden Protein nicht nachgewiesen werden kann, da die Studien meist an intakten Zellen durchgeführt werden, in denen noch andere regulative Komponenten zum Tragen kommen [SUH & HILLE, 2005]. Bis heute wird in den meisten Fällen, in denen PIP_2 -Konzentrationsänderungen modulierend in das membranäre Transportgeschehen eingreifen, angenommen, dass zudem Phospholipasen oder –kinasen beteiligt sind [HILGEMANN *et al.*, 2001], da sie primäre Regulatoren dieses Phospholipids sind.

1. Einleitung

Da PIs vorwiegend in – oben bereits angesprochenen - *lipid rafts* in intakten Zellen vorliegen, wäre es darüber hinaus denkbar, dass Ionenkanäle und Transporter, die PIP₂-Bindungsstellen besitzen, überwiegend in diesen Regionen lokalisiert sind und in erster Linie dort entsprechender Regulation unterliegen. Weiterhin könnten auch ternäre Komplexe zwischen PIP₂ und 2 Phosphoinositid-bindenden Proteinen möglich sein, in denen das Phospholipid dann die physikalische Aneinanderlagerung dieser Proteine übernimmt [HILGEMANN *et al.*, 2001]. Ein weiterer wichtiger Punkt, der noch aufzuklären ist, ist die Kontrolle der „freien“ Phosphoinositide durch PI-immobilisierende Proteine wie „Pipmoduline“ (z. B. MARCKS, *myristoylated alanine rich C kinase substrate*). Diese „puffern“ die PIP₂-Konzentration an der Plasmamembran und setzen PIP₂ auf adäquate Stimuli hin (z. B. Proteinphosphorylierung) frei [MCLAUGHLIN *et al.*, 2005].

Im Falle der P2X₂ Rezeptoren liegen erste Studien vor, die eine Regulation durch Phosphoinositide nahe legen. FUJIWARA & KUBO zeigten 2006, dass eine Wortmannin-Behandlung zu einer Beschleunigung der P2X₂ Rezeptor-Desensibilisierung führt und vermuteten, nach Durchführung von Fluoreszenz-Bindungsassays, dass die beteiligten Phospholipide höchstwahrscheinlich PI₃P und PI_{3,5}P₂ sind [FUJIWARA & KUBO, 2006], was als ungewöhnlich gilt, da PI_{3,5}P₂ bis vor kurzem als nicht nativ vorkommend galt und erst 1997 in Fibroblasten, Hefen und einigen andern Zelltypen entdeckt wurde [WHITEFORD *et al.*, 1997; DOVE *et al.*, 1997]. Darüber hinaus zeigten sie, dass das Phänomen der *pore dilation* (s. o.) am P2X₂ Rezeptor von der Desensibilisierung desselbigen abhängt und somit auch einer Regulation durch Phosphoinositide unterworfen ist [FUJIWARA & KUBO, 2006].

1.5 Aminoglykoside

Aminoglykoside stellen eine Gruppe der Antibiotika dar. Bei letzteren handelt es sich, im ursprünglichen Sinn, um niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die in geringer Konzentration (< 200 µg/ml) andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum hemmen oder sie abtöten. Bei den Produzenten handelt es sich in erster Linie um Bakterien und Pilze. Heutzutage ist der ursprüngliche Begriff eines Antibiotikums erweitert worden, da mittlerweile sowohl synthetische als auch pflanzliche Substanzen zu dieser Stoffgruppe gezählt werden, bzw. auch Peptid-Antibiotika bekannt wurden, die nicht mehr als niedermolekular angesehen werden können.

Antibiotika werden hauptsächlich zur Bekämpfung bakterieller und pilzlicher, aber auch viraler Krankheitserreger von Mensch und Tier eingesetzt. Weiterhin finden sie Anwendung als Immunsuppressiva oder als Cytostatika bei der Behandlung von Tumorerkrankungen. Pflanzenschutz-Antibiotika werden vorwiegend zur Pilzbekämpfung (Fungizide) eingesetzt.

1.5.1 Struktur und Funktion

Die Gruppe der bakterizid wirkenden Aminoglykoside beinhaltet die **Vertreter** Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Netilmicin, Paromomycin, Streptomycin, Kasugamycin, Spectinomycin, Geneticin und Tobramycin, wobei der Suffix *-mycin* für Aminoglykoside, die von der Gattung *Streptomyces* stammen, verwendet wird, der Suffix *-micin* für Aminoglykoside, die aus der Gattung *Micromonospora* gewonnen werden.

Ihre chemische **Struktur** zeichnet sich dadurch aus, dass zwei oder mehrere Aminozucker glykosidisch an eine Aminocyclitolkomponente (aminosubstituiertes Hydroxycyclohexan), dem sog. Aglycon, gebunden sind (s. *Abb. 1.11*). Sie sind aufgrund ihrer Amino- und Hydroxylfunktionen hochpolare, sehr gut wasserlösliche Verbindungen, die unter physiologischen Bedingungen bei pK_s -Werten zwischen 7 und 8,8 überwiegend positiv geladen vorliegen [BECKER, 2005]. Die zur Herstellung der Aminoglykoside verwendeten Mikroorganismen produzieren häufig eine Vielzahl von strukturell ähnlichen Verbindungen, weshalb die therapeutischen Produkte Mischungen sein können. So ist z. B. Gentamicin ein Komplex von 5 Substanzen (Gentamicin C_{1,1a,2,2a,2b}) [BECKER, 2005].

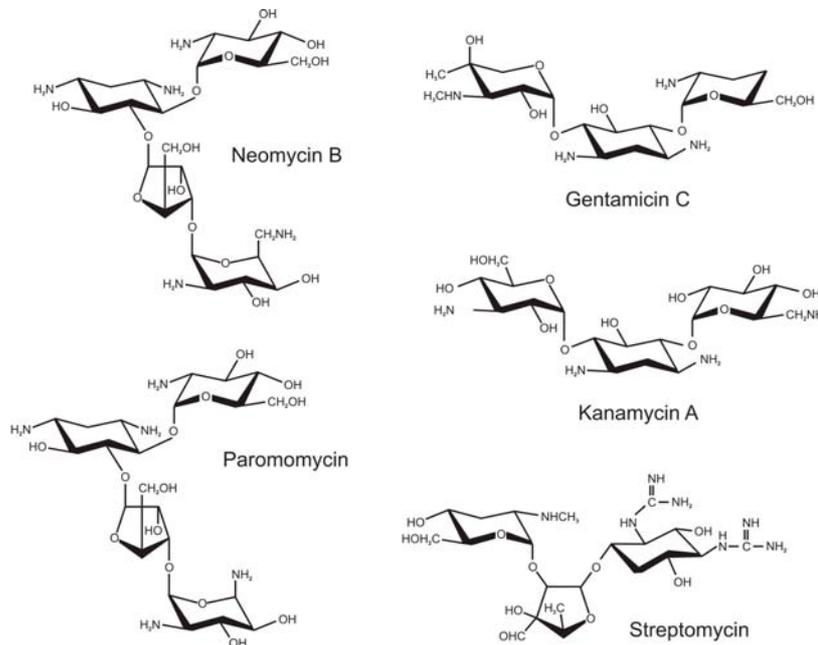


Abb. 1.11: Strukturformeln der hier verwendeten Aminoglykoside.

Ihre **antibiotische Wirkung** geht auf ihre Bindung an die bakterielle 30S-Untereinheit von Ribosomen (bedingt durch ihre positive Ladung) zurück, was zu einem fehlerhaften Ablesen der tRNA führt (*misreading*). Somit wird dem Bakterium die Fähigkeit zur korrekten Synthese essentieller Proteine, v. a. integraler Membranproteine, genommen, und letztlich die Barriereigenschaften der Bakterienmembran beeinträchtigt [BECKER, 2005]. Aminoglykoside

1. Einleitung

werden vorwiegend gegen Infektionen mit aeroben, gram-negativen Bakterien eingesetzt, wie *Pseudomonas*, *Acinetobacter* oder *Enterobacter*. Ebenfalls in ihrem Wachstum gehemmt werden einige Mycobakterien, u. a. auch *M. tuberculosis*, den Erreger der Tuberkulose, die 1944 zum ersten Mal erfolgreich durch das zu diesem Zeitpunkt erst kürzlich entdeckte Streptomycin behandelt werden konnte [SCHATZ *et al.*, 1944]. Aufgrund ihrer potentiellen Oto- und Nephrotoxizität [RYBAK & WHITWORTH, 2005; SELIMOGLU, 2007] werden diese Antibiotika nach Körpergewicht dosiert und während der Behandlung Blutdruck und Creatinin-Spiegel im Urin (Test der Nierenfunktion und Überwachung des Nierenschadigungsgrads) überprüft. Da sie aufgrund ihrer hochpolaren Struktur nicht membrangängig [FORGE & SCHACHT, 2000] sind und somit nicht im Magen-Darm-Trakt absorbiert werden, werden sie intravenös oder –muskulär verabreicht. Einige Aminoglykoside können auch lokal an Wunden angewendet werden.

1.5.2 Aminoglykoside und Membranproteine

Während Nephro- und Ototoxizität der Aminoglykoside scheinbar abhängig von einer intrazellulären Akkumulierung und anschließenden metabolischen Abbauprozessen sind [BLANCHET *et al.*, 2000; SCHACHT, 1993], konnten andere Studien zeigen, dass Aminoglykoside außerdem in der Lage sind, direkt ins synaptische Geschehen einzugreifen und dort die Signaltransmission deutlich zu beeinflussen - und zwar offenbar durch Block der präsynaptischen spannungs-gesteuerten Ca^{2+} -Kanäle [VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI, 1969]. Diese polykationischen Therapeutika inhibieren darüber hinaus eine Vielzahl anderer Ionenkanäle, wie z. B. mechanosensitive Ionenkanäle [OHMORI, 1985], nicotinsche ACh-Rezeptoren [OKAMOTO & SUMIKAWA, 1991; AMICI *et al.*, 2005], mechanosensitive Ionenkanäle in Muskelfasern [WINEGAR *et al.*, 1996] und TRPV1-Rezeptoren (*transient receptor potential vanilloid 1 receptor*) [RAISINGHANI & PREMKUMAR, 2005]. In den meisten Fällen ist der Mechanismus, der diesen Inhibitionen zugrunde liegt, noch nicht detailliert untersucht worden [BLANCHET *et al.*, 2000]. LIN *et al.* konnten im Jahre 1993 einen sowohl konzentrations- als auch spannungsabhängigen Block von ATP-abhängigen Ganzzell-Strömen an isolierten cochlearen äußeren Haarzellen (Meerschweinchen) durch Neomycin und einige andere Aminoglykoside nachweisen. Sie schlugen für diese nicht-kompetitive Inhibition den Mechanismus des *open pore blocks* vor. Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen ATP-abhängigen Leitfähigkeiten in den Haarzellen um P2X₂-Rezeptoren [THORNE & HOUSLEY, 1999], bzw. um einen vielfältigen „Mix“ aus verschiedenen P2X Subtypen und P2Y Subtypen handelt [SZÜCS *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2005]. Im Falle der *N*-Methyl-*D*-Aspartat Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) konnte verschiedenen Aminoglykosiden sogar sowohl inhibitorische, als auch stimulatorische Wirkungen nachgewiesen werden. [MASUKO *et al.*, 1999].

1.6 Elektrophysiologie

1.6.1 Elektrische Eigenschaften von Membranen

Biologische Membranen können vereinfacht im Ersatzschaltbild als sog. RC-Glied dargestellt werden (s. Abb. 1.12),

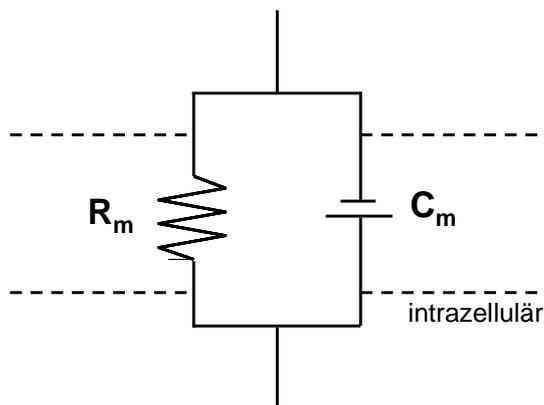


Abb. 1.12: Ersatzschaltbild einer biologischen Membran, Darstellung als RC-Glied.
(R_m = Membranwiderstand, C_m = Membrankapazität).

wobei die Lipiddoppelschicht ein Medium mit hohem elektrischem Widerstand R beschreibt, das zwei Elektrolytlösungen niedrigeren Widerstandes voneinander trennt.

$$R = \frac{U}{I} \quad \text{Ohm'sches Gesetz,}$$

mit U = Spannung und I = Strom

Die reinen Lipidbezirke einer Plasmamembran tragen zur elektrischen Leitfähigkeit nur wenig bei, da die reine Lipidmembran einen um einen Faktor 10^4 - 10^9 höheren Widerstand als eine gleich dicke wässrige Lösung hat und daher wie eine elektrische Isolatorschicht wirkt. Der tatsächliche Widerstand einer Plasmamembran wird durch die porenartigen Ionenkanäle bestimmt und kann daher in weiten Bereichen variieren: die R_m -Werte (spezifischer Widerstand, bezogen auf eine Einheitsfläche) verschiedener Plasmamembranen liegen bei 1 - $10^5 \Omega \text{ cm}^2$. Geläufiger als die Angabe des Widerstandes R bzw. R_m einer Membran ist die Angabe des reziproken Wertes, der sog. Leitfähigkeit G bzw. G_m (spezifische Leitfähigkeit).

Wie eingangs schon erwähnt, trennt die Plasmamembran 2 Elektrolytlösungen voneinander und kann somit im Ersatzschaltbild als Plattenkondensator beschrieben werden, wobei die beiden elektrisch leitenden Lösungen die Metallplatten darstellen, das Membraninnere das Dielektrikum niedriger Leitfähigkeit. Demnach besitzt jede Membran eine elektrische Kapazität C bzw. C_m (spezifische Kapazität), die proportional von der Fläche und reziprok proportional von der Dicke der Membran abhängig ist:

1. Einleitung

$$C = \epsilon_0 \epsilon \frac{A}{d} \quad (\text{mit } \epsilon = \text{Dielektrizitätskonstante, } \epsilon_0 = \text{elektrische Feldkonstante, } A = \text{Membranfläche, } d = \text{Membrandicke})$$

Da hier nur geometrische und Materialeigenschaften eingehen, ist die Membrankapazität unterschiedlicher Zelltypen ganz im Gegensatz zum Widerstand R nahezu identisch und liegt bei *ca.* $C_m = 1 \mu\text{F cm}^{-2}$.

Mithilfe elektrophysiologischer Methoden können nun verschiedene Parameter von Membranen bzw. Membranproteinen untersucht und ganz unterschiedliche Fragestellungen bearbeitet werden. Neben der Möglichkeit, das Membranpotential zu messen, wird in der Elektrophysiologie aber hauptsächlich die Änderung der Leitfähigkeit durch Ionenkanäle untersucht, wobei die hier gewählten Methoden die der *Two Electrode Voltage Clamp* (*s. u.*) bzw. deren Weiterentwicklung, die *Patch Clamp*-Technik, sind. Beiden Methoden liegt die Konstanthaltung und somit die Kontrolle des Membranpotentials zugrunde, so dass der aus der Leitfähigkeit resultierende transmembranäre Strom die Messgröße darstellt. Davon ausgehend können dann Parameter wie Membranwiderstand, -kapazität, Leitfähigkeit, I/V-Kennlinien, Spannungs-, Konzentrationsabhängigkeiten des untersuchten Proteins bestimmt werden. Prinzipiell kann man allen elektrophysiologischen Messungen, wie sie nachfolgend vorgestellt werden, das Ohm'sche Gesetz zugrunde legen (*s. o.*), jedoch gilt es zu beachten, dass die auftretenden Widerstände (Ionenkanäle) in der Regel nicht spannungsunabhängig sind.

1.6.2 Zwei-Elektroden Spannungsklemme

Um zunächst nur die an der Zellmembran anliegende elektrische Spannung („Membranpotential“) messen zu können, benötigt man lediglich eine intrazelluläre Elektrode (Potentialelektrode) sowie eine im äußeren Medium befindliche, sog. Referenz- oder Badelektrode. Die Potentialelektrode misst mit sehr hohem Eingangswiderstand des Verstärkers die an der Zellmembran anliegende elektrische Spannung im Vergleich zur Badelektrode, deren Potential als 0 mV definiert ist. Der hohe Eingangswiderstand am Vorverstärker der Potentialelektrode ist unabdingbar, damit über diesen Widerstand kein nennenswerter Strom fließt und es demnach nicht zu einem, dem Ohm'schen Gesetz folgenden Spannungsabfall kommt, die Spannungsmessung also fehlerfrei ist.

Durch diese Spannungsmessungen lassen sich erste Rückschlüsse auf vermutete Leitfähigkeiten an biologischen Membranen ziehen, wobei eine genauere Charakterisierung der Leitfähigkeiten mit einer Spannungsmessung allein nicht durchgeführt werden kann. Zur exakten Untersuchung wird die Methode der sog. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (*two electrode voltage clamp*, TEVC) verwendet.

1. Einleitung

Diese Methode geht auf Kenneth Cole, Howard Curtis und George Marmount zurück, die in den 1940-er Jahren erstmals das Potential von Zellmembranen mithilfe von intrazellulären Elektroden und Rückkopplungs-Schaltkreisen konstant halten konnten. Die erste *Voltage Clamp*-Anordnung wurde für das Riesenaxon des Tintenfisches entwickelt [COLE, 1949]. Alan Hodgkin und Andrew Huxley entwickelten diese Methodik weiter und konnten im Jahre 1948 erstmals transiente Ionenströme über Membranen nachweisen. Ein Jahr später konnten sie die dem Aktionspotential an erregbaren Membranen zugrunde liegenden elektrochemischen Vorgänge aufklären und veröffentlichten diese Daten zusammen mit einem mathematischen Modell, das die Zeitverläufe eines Aktionspotentials interpretiert. 1963 erhielten sie für ihre wegweisenden Versuche den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Das Prinzip des *Voltage Clamps* basiert nun auf der Anordnung einer bzw. zweier intrazellulärer Elektroden, mit deren Hilfe das Membranpotential der betreffenden Zellmembran zunächst gemessen und dann mithilfe eines Rückkopplungsmechanismus auf einem, vom Experimentator vorgegebenen, Sollwert konstant gehalten („Spannungsklemme“) werden kann. Der Strom über der Membran kann dann gemessen werden als Maß für die Leitfähigkeit der Zellmembran. Soll an größeren, intakten Zellen wie den Oozyten (*s. u.*) von *X. laevis* *Voltage Clamp* durchgeführt werden, muss die TEVC eingesetzt werden, da hier die *single electrode voltage clamp*-Technik nicht mehr ausreicht: man benötigt eine weitere, intrazelluläre Elektrode, um Strom- und Spannungsmessung unabhängig voneinander durchführen zu können. Beide intrazellulären Elektroden besitzen in dem die Zelle umgebenden Bad jeweils eine Referenzelektrode, wobei die der intrazellulären Stromelektrode geerdet ist, damit über sie die Ströme abfließen können. Die Badelektrode der intrazellulären Potentialelektrode ist nicht geerdet, da sie nur zur Potentialmessung dient, und wird somit als virtuelle Erde bezeichnet. Der Einsatz von zwei Badelektroden ist zwar nicht zwingend notwendig, hat aber den Vorteil, dass nur über die geerdete Elektrode große Ströme fließen und die Potential-Badelektrode nicht aufgrund von Stromflüssen polarisieren kann. Außerdem können so Fehler verhindert werden, die der Serienwiderstand der Badlösung bei großen Strömen potentiell mit sich bringt.

In dieser TEVC-Anordnung misst das Potentialelektroden-Paar die an der Zellmembran tatsächlich anliegende Spannung, das Stromelektroden-Paar verändert aktiv, durch Anlegen einer Spannung das Membranpotential. Die Spannungsquelle wird dabei so geregelt, dass das Membranpotential genau dem gewünschten Kommandopotential V_C entspricht:

Um die Zellmembran auf ein bestimmtes Membranpotential V_m klemmen zu können, ist es notwendig, ein Potential V_C vorzugeben, das groß genug ist, um den Spannungsabfall an dem Stromelektrodenwiderstand R_{CE} zu kompensieren. Da sich der Membranwiderstand R_M und gelegentlich auch R_{CE} sowie V_m während eines Experimentes ändern können, ist es

1. Einleitung

notwendig, V_m permanent (mithilfe der Potentialelektrode) mit dem Kommandopotential V_C zu vergleichen und das Klemmpotential V_{Cl} dementsprechend nachzuregeln. Hierfür verwendet man Operationsverstärker (*operation amplifier*, OpAmp), deren wesentliches Charakteristikum darin besteht, die Differenz zwischen seinen beiden Eingängen mit einem Faktor A (*gain*) zu verstärken. Operationsverstärker können auch als Spannungsfolger eingesetzt werden, dazu wird der negative Eingang mit dem Ausgang verbunden – das Ausgangssignal ist also immer gleich dem Signal am negativen Eingang (s. *Abb. 1.13*).

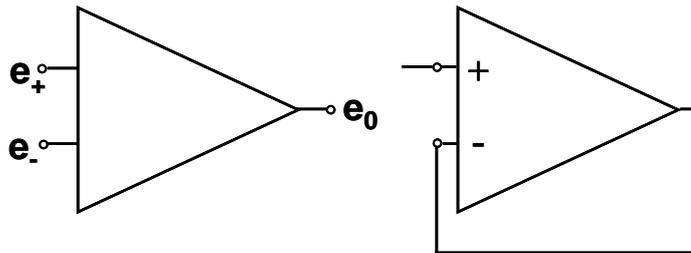


Abb. 1.13: Schematische Zeichnung der beiden Operationsverstärker-Anordnungen. *Links*: klassischer Operationsverstärker, *rechts*: Spannungsfolger (Erklärung s. *Text*).

In der TEVC finden beide Varianten des Operationsverstärkers Anwendung. Der Spannungsfolger wird benutzt, um das hochohmige Signal der Potentialelektrode von den folgenden Geräten mit niederohmigem Eingang (z. B. Oszilloskop oder Aufzeichnungsgeräte) zu entkoppeln und um den Eingangswiderstand der Potentialelektrode so hochohmig zu machen, dass Ströme über sie minimiert werden (s. *o.*). Die andere Variante des Operationsverstärkers wird als negativer Rückkopplungsverstärker (*feedback amplifier*) mit hoher Verstärkung eingesetzt. An den positiven Eingang wird hierbei das Kommandopotential angelegt, an den negativen Eingang das Ausgangssignal des Spannungsfolgers, das dem Membranpotential entspricht. Diese beiden Eingangssignale definieren das Potential am Ausgang, der zur Stromelektrode führt. So kann V_m schnell und genau auf das vorgegebene Potential geklemmt werden (s. *Abb. 1.14*).

Der Strom, der vom Rückkopplungsverstärker über die Stromelektrode in die Zelle fließt, entspricht nun dem Strom, der über die Membran fließt, und kann entweder am Ausgang des Rückkopplungsverstärkers oder an der geerdeten Badelektrode gemessen werden.

Der Vollständigkeit halber soll hier noch die Methode des *Current Clamp* erwähnt werden, die ebenfalls in der Elektrophysiologie Anwendung findet und bei der, im Gegensatz zur TEVC, der Strom konstant gehalten wird und das Membranpotential die zu messende Größe darstellt.

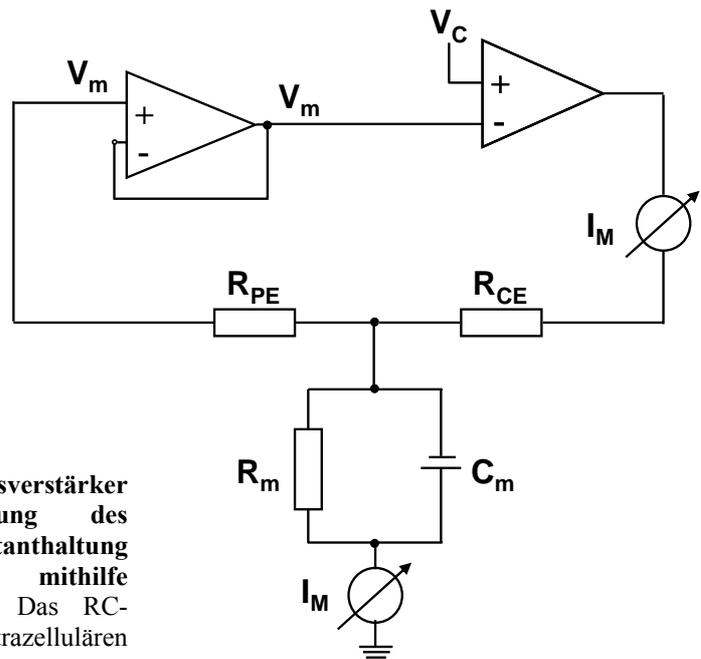


Abb. 1.14: TEVC-Schaltung mit Operationsverstärker und Spannungsfolger zur Messung des Membranpotentials und zur Konstanthaltung („Klemmen“) des Membranpotentials mithilfe negativer Rückkopplungsmechanismen. Das RC-Glied stellt die Zelle dar, R_{PE} und R_{CE} die intrazellulären Elektroden.

Die hier verwendeten intrazellulären Elektroden sind Glasmikroelektroden, die mit einem Elektrodenziehgerät (*Puller*) fein (μm) ausgezogen werden. Mit diesen Pipetten lässt sich die Zellmembran ohne große Schädigung durchstechen. Nach Füllung mit 3 M KCl-Lösung wird der elektrische Kontakt zur Elektronik dann über einen chlorierten Silberdraht, der in die KCl-Lösung eintaucht, hergestellt (Ag/AgCl-Elektrode). Es wird KCl verwendet, da K^+ und Cl^- in wässrigem Medium gleiche Diffusionsgeschwindigkeiten aufweisen und somit Diffusionspotentiale an der Elektrodenspitze gering gehalten werden. Zudem sind durch den Einsatz einer hochmolaren Salzlösung potentielle Diffusionspotentiale unabhängig vom Aussenmedium. Die Widerstände dieser Elektroden liegen im $\text{M}\Omega$ -Bereich. [SCHWARZ & RETTINGER, 2004; HILLE, 2001; AXON INSTR., 1993].

1.6.3 Membranfleck-Spannungsklemme

Während es mit der TEVC-Methode nur möglich ist, makroskopische Ströme (Ganzzelleableitungen) zu messen, ist es mithilfe der *Patch Clamp*-Technik (Saugpipetten-Technik oder auch „Membranfleck-Spannungsklemme“) möglich, Einzelkanalströme in biologischen Membranen abzuleiten. Diese Methode ist eine Weiterentwicklung der oben erläuterten (*Single Electrode*) *Voltage Clamp*-Technik und wurde erstmals im Jahre 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann vorgestellt [HAMILL *et al.*, 1981]. 1991 erhielten sie für die Entwicklung dieser Methode und dem erstmaligen direkten Nachweis von Ionenkanälen den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Messtechnisch (s. *Abb. 1.15*) betrachtet erfolgen im *Patch Clamp*-Setup die Spannungsmessung und die „Strominjektion“ (Anlegen der Spannung für die Spannungsklemme) mit nur einer Elektrode. Dies geschieht durch einen Strom-

1. Einleitung

Spannungswandler, der sich im Vorverstärker der Elektrode befindet. Auch von dem *Patch Clamp*-Verstärker wird die Differenz zwischen Pipetten- und Sollspannung gemessen, wobei der Eingangswiderstand des Operationsverstärkers (OpAmp) so hoch ist, dass praktisch kein Strom fließt. Bei einer Differenz zwischen dem Pipettenpotential (U_{pip}) und der Sollspannung (U_{soll}) entsteht am Ausgang des Operationsverstärkers (OpAmp 1) eine Spannung, die wesentlich größer ist als die eingespeiste Spannungsdifferenz. Vermittelt durch einen Rückkopplungsmechanismus, fließt ein Strom durch den Rückkopplungswiderstand R_f in die Pipette, solange eine Spannungsdifferenz zwischen Pipetten- und Sollspannung vorliegt, also eine Differenz zwischen den beiden Eingängen besteht. Da der Eingangswiderstand des OpAmp unendlich hoch ist, kann der Strom nur in die Pipette, nicht aber zurück in den Verstärker fließen. Ein zweiter OpAmp (OpAmp 2) misst den Spannungsabfall an dem Rückkopplungswiderstand; gemessen wird letztlich die Differenz zu der Kommandospannung, aus der anhand der bekannten Größe von R_f auf den Strom, der gleichzeitig die Messgröße darstellt, geschlossen werden kann. [SCHWARZ & RETTINGER, 2004; NUMBERGER & DRAGUHN, 1996; ADAM *et al.*, 2003].

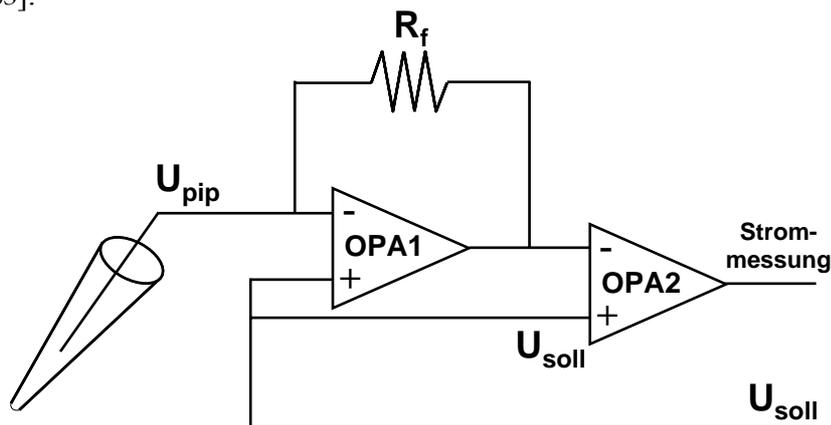


Abb. 1.15: Schaltkreis eines *Patch Clamp*-Verstärkers. Erläuterungen s. Text.

Bei *Patch Clamp*-Messungen wird die hitzepolierte Spitze einer Glasmikropipette, deren innerer Durchmesser lediglich 1-5 μm beträgt (bis zu 20 μm für makroskopische Ströme aus *excised Patches*, s. u.), auf die Zellmembran aufgesetzt und durch leichten Unterdruck in der Pipette ein kleiner Fleck (*Patch*) der Membran in die Pipettenöffnung gesaugt. Auf diese Weise entsteht ein enger Kontakt zwischen Membranoberfläche und Glas, was letztlich oft zu einem extrem hohen Abdichtwiderstand (sog. *Seal*) führt, der zwischen 10^9 - $10^{11} \Omega$ („Gigaseal“) liegt. Um diesen hohen Abdichtwiderstand zu erreichen, müssen eine Reihe von Vorkehrungen bezüglich der Pipettenform und der Oberflächenreinheit getroffen werden. Die Pipettenspitze sollte eine Öffnung mit glattem Rand besitzen und frei von Verunreinigungen sein. Zudem muss sie – im Unterschied zur TEVC –, vor jeder Messung frisch hergestellt werden, um die Sauberkeit der Pipette garantieren zu können. Der hohe Abdichtwiderstand wird durch direkte Wechselwirkung auf atomarer Ebene zwischen der Glasoberfläche und der

1. Einleitung

Zellmembran erreicht. Die wichtigsten Wechselwirkungen beruhen vermutlich auf der Bildung von Wasserstoffbrücken und Salzbrücken zwischen negativen Ladungen des Glases und der Membranoberfläche [NUMBERGER & DRAGUHN, 1996].

Die Pipette selbst ist mit einer wässrigen Elektrolytlösung (die, je nach Messkonfiguration, *s. u.*, entweder dem intra- oder dem extrazellulären Milieu angepasst ist) gefüllt, und über eine Ag/AgCl-Elektrode im Inneren der Mikropipette mit dem Messverstärker verbunden. Auf diese Weise können nun Ionenströme über die Membran detektiert werden, die nur in diesem *Patch* stattfinden.

Die auf diese Weise messbaren Einzelkanalströme liegen im Bereich von einigen pA. Eine Stromamplitude von 1 pA entspricht nach der Gleichung

$$i = \frac{n}{t} z e_0 \quad \text{mit } i = \text{Stromamplitude; } n = \text{Anzahl der Ionen (mit der Ladung } ze_0), t = \text{Zeit.}$$

einem Fluss von $i/ze_0 = 10^{-12} \text{ A}/1.6 \times 10^{-19} \text{ C} \approx 5 \times 10^6$ einwertigen Ionen pro Sekunde. Bei Stromamplituden von 1 pA können kurzzeitige Kanalöffnungsereignisse bis herab zu etwa 0,1 ms Dauer registriert werden. Diese Methode gestattet es also, bereits den Durchtritt von etwa 500 Ionen durch einen Kanal nachzuweisen.

Neben den Amplituden der Einzelkanalströme liefert die *Patch Clamp*-Technik Informationen über das statistische Öffnungs- und Schließverhalten von Ionenkanälen. Aus einer möglichst großen Zahl von Einzelereignissen bestimmt man statistische Parameter, wie z. B. die mittlere Offenzeit t des Kanals, oder die Wahrscheinlichkeit $f(t) dt$, dass die Offenzeit t eines Kanals in einem vorgegebenen Intervall $(t, t+dt)$ liegt. Aus den statistischen kann man schließlich kinetische Parameter ableiten.

Die *Patch Clamp*-Technik kann in verschiedenen Konfigurationen angewendet werden. Voraussetzung für alle Konfigurationen ist die Ausbildung eines *Gigaseals* in der *cell attached/on cell*-Konfiguration (oben beschrieben). Diese ermöglicht Messungen, bei denen die intrazellulären Gegebenheiten aufrechterhalten werden. Durchbricht man die Membran innerhalb des *Patches* ausgehend von der *on cell*-Konfiguration mit einem Spannungs- oder Druckpuls, so gelangt man in die *whole cell*-Konfiguration, wobei nicht mehr nur der *Patch*, sondern die gesamte Zellmembran in die Messung eingeht. Diese Konfiguration kann nur bei kleinen Zellen, wie Säugerzellen, nicht jedoch bei Oozyten angewendet werden. Ausgehend von der *on cell*-Konfiguration kann zudem die Zellmembran, ebenfalls nur bei kleinen Zellen, durch Zugabe von z. B. Nystatin in die Pipettenlösung für kleine Ionen permeabel gemacht werden (*perforated Patch*).

1. Einleitung

Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit der *excised Patches*, bei denen ein Stück der Zellmembran aus der Zelle herausgerissen wird und demnach die Messung zellfrei von statten geht. Dies ist möglich, da es nach Ausbildung des *Gigaseals* neben der elektrischen ebenfalls zu einer hohen mechanischen Stabilität des *Patches* kommt. Um eine *inside out*-Konfiguration im zellfreien *Patch* zu erhalten, wird nach Ausbildung des *Gigaseals* in der *on cell*-Konfiguration die Pipette von der Zelle zurückgezogen und der *Patch* damit aus der Zellmembran herausgerissen. Die innere Membranseite zeigt nun nach außen, die äußere Membranseite zeigt in das Innere der Pipette. Dabei wird die Badlösung frei von Ca^{2+} -Ionen gehalten, da es ansonsten unter Umständen zur Bildung eines geschlossenen Lipidvesikels kommen kann, was den *Patch* unbrauchbar macht. Um in die *outside out*-Konfiguration zu gelangen, muss, ausgehend von der *whole cell*-Konfiguration (s. o.) die Pipette vorsichtig zurückgezogen werden, so dass sich die herausgerissenen Membranstücke über der Pipettenöffnung wieder zusammenfügen, jedoch invers, so dass das Membranäußere nach außen und die Membraninnenseite ins Innere der Pipette weist (s. Abb. 1.16). In diesem Fall ist das Vorhandensein von Ca^{2+} -Ionen in der Badlösung von Vorteil, da es die Stabilität der Membran erhöht (s. 2.3.2).

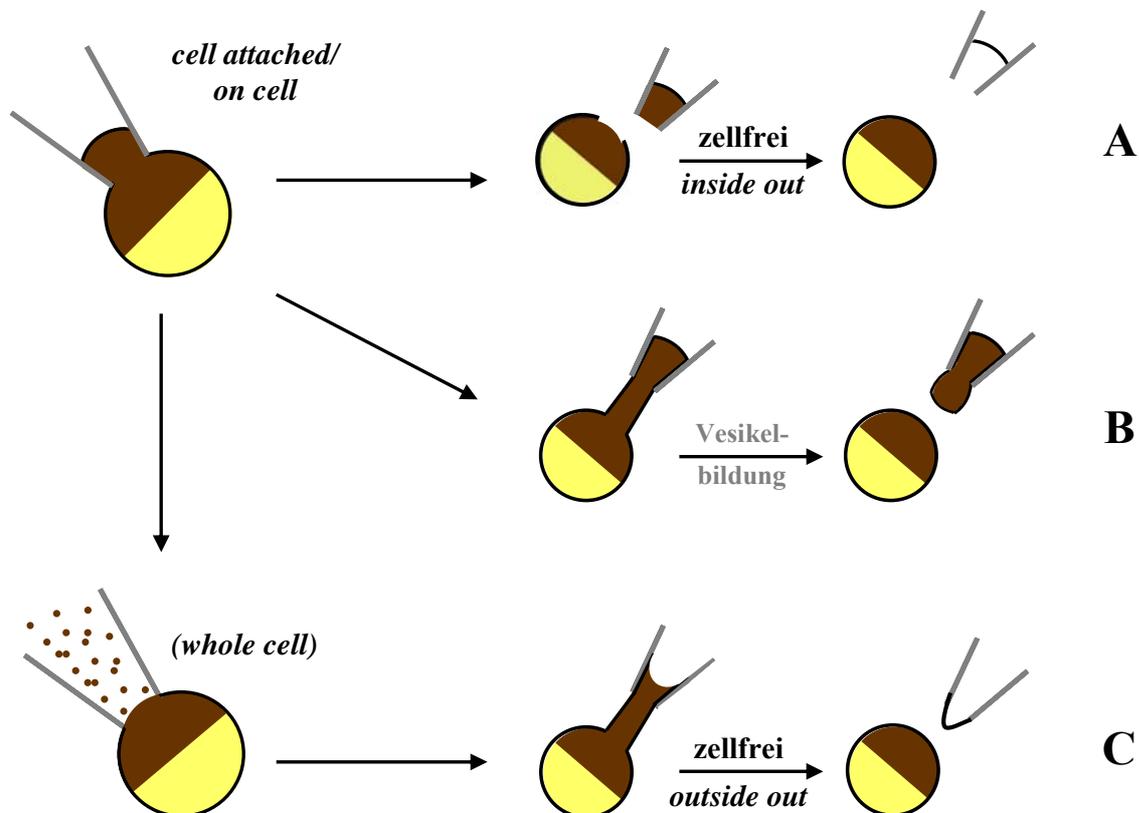


Abb. 1.16: Die verschiedenen möglichen Messkonfigurationen der *Patch Clamp*-Methodik an Oozyten: ausgehend von der *on cell*-Konfiguration **A)** *inside out*; **B)** Vesikelbildung nach *inside out*-Patch in Anwesenheit von Ca^{2+} sowie ausgehend von der *on cell*- und anschließenden *whole cell*-Konfiguration (nicht messbar an Oozyten, nur in kleineren, z. B. Säugerzellen) in die **C)** *outside out*-Konfiguration. Details s. Text. (nach [SCHWARZ & RETTINGER, 2004])

1. Einleitung

Konventionelle *Patch*-Pipetten haben einen Spitzendurchmesser von wenigen μm (*s. o.*). Um Multikanalphänomene zu analysieren, wie z. B. *gating* Ströme, kann der Pipettendurchmesser erhöht werden (*Makro-Patch*). Durch spezielle Behandlung (Abbrechen der Pipettenspitze in einer Mikroschmiede/*micro forge* und anschließendes Hitzepolieren [HILGEMANN, 1990]) können *Gigaseals* mit Pipettendurchmesser von bis zu 50 μm erreicht werden. In diesen Fällen spricht man von *Giant Patches*, wobei auch hier *on cell-*, *inside out-* sowie *outside out-*Konfigurationen möglich sind. Mit dieser Variante ist es auch möglich, durch Pumpen und Carrier generierte Ströme zu untersuchen.

1.6.4 Das *Xenopus laevis*-Oozyten Expressionssystem

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist eine von 18 Arten aus der Gattung der Krallenfrösche (*Xenopus*) innerhalb der Klasse der Lurche (*Amphibia*). Sie stellen das afrikanische „Gegenstück“ zu den südamerikanischen Wabenkröten (Gattung *Pipa*) dar. Weibliche Exemplare werden 10-13 cm lang (*s. Abb. 1.17, links*), die Männchen bleiben deutlich kleiner. Die Rückenfarbe ist vorwiegend oliv-braun, der Bauch wesentlich heller gefärbt. Die auffallend muskulösen Hinterbeine tragen je fünf Zehen, wobei die drei inneren mit kräftigen, schwarzen Hornkrallen versehen, die der Gattung ihren Namen gaben. *Xenopus laevis* findet seit vielen Jahrzehnten massenhaft Anwendung als Labortier, früher (bis 1960) als sog. „Apothekerfrosch“, wobei sie als Indikator-Organismen für Schwangerschaftstests dienten [POLLACK, 1949], heute in der Entwicklungsbiologie und der Elektrophysiologie.

1971 wurden die Oozyten (*s. Abb. 1.17, rechts*) des Krallenfroschs erstmals zur heterologen Proteinexpression genutzt [GURDON *et al.*, 1971], 12 Jahre später konnte dann die funktionelle Expression heterologer Ionenkanäle, -pumpen und Rezeptoren gezeigt werden ([MILEDI *et al.*, 1983; GUNDERSEN *et al.*, 1983a+ b]).



Abb. 1.17: *Links:* weibliches Tier der Gattung *Xenopus laevis*. *Rechts:* Oozyten des Stadiums V von *Xenopus laevis* nach Collagenase-Behandlung. Die Oozyten liegen vereinzelt vor, deutlich erkennbar die Unterteilung in animalen (dunkel) und vegetativen (hell) Pol.

1. Einleitung

Für elektrophysiologische Methoden werden Oozyten des Stadiums V verwendet, dabei handelt es sich um nicht ausgereifte Eier, die eine Größe von *ca.* 1,2 mm im Durchmesser aufweisen. In diesem Stadium lassen die Oozyten eine charakteristische Pigmentierung erkennen - die Unterteilung in eine animale und eine vegetative Hemisphäre, die auf die unterschiedliche Verteilung von Zellinhalten zurückgeht. Während der vegetative, hell gefärbte Pol v. a. Dotterproteine beinhaltet, findet man im animalen, durch einen hohen Melaninanteil unter der Membran dunkel gefärbten Pol den Zellkern, Mitochondrien und Ribosomen. Die Grenze zwischen beiden Hemisphären wird Äquator genannt.

Um Oozyten zur heterologen Expression von Membranproteinen zu veranlassen, bringt man entsprechend modifizierte RNA (5'-*cap*, Poly-A-Schwanz, s. 2.7.1) des betreffenden Proteins per Mikroinjektion in die Zelle ein, bzw. DNA in den Zellkern.

Das oozytäre Expressionssystem weist, neben der einfachen Gewinnung (s. 2.4.2) und der langen Haltbarkeit der Zellen, eine Reihe zusätzlicher Vorteile auf [Bossi *et al.*, 2007]. Zum einen ist die Translationseffizienz hoch, es kommt zu einer „Überexpression“ der Fremd-Proteine, zum anderen sorgen endogene Systeme für eine korrekte posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung *etc.*). Dadurch führt die heterologe Proteinexpression zu funktionellen, korrekt lokalisierten und ausgerichteten Proteinen. Oozyten weisen selber nur eine geringe Anzahl von aktiven endogenen Kanälen auf, was die Untersuchung heterolog exprimierter Membranproteine begünstigt. Durch ihre Größe sind Oozyten nicht nur einfach zu handhaben, sondern eignen sich auch hervorragend für die Ableitung makroskopischer Ganzzellströme im *Two Electrode Voltage Clamp*-Experiment. Darüber hinaus können sie auch im *excised Patch Clamp*-Experiment verwendet werden.

1.7 Fragestellung

In den letzten Jahren häuften sich die Berichte, dass $PI_{4,5}P_2$ neben seinen zellulären Funktionen als Cofaktor, Membrananker, Cytoskelett-Regulator, Vorläufer von *second messengern* und vielen mehr auch regulierend in die Funktion von Ionenkanälen eingreifen kann. Dieser Befund war zunächst erstaunlich, da diesem Molekül aufgrund seiner Komplexität derartige Fähigkeiten nahezu abgesprochen wurden. Um so unerwarteter war es, dass – wie mittlerweile feststeht – $PI_{4,5}P_2$ eine Wirkung auf fast alle membranären Transportsysteme besitzt, nur wenige von ihnen bleiben durch dieses Phosphoinositid unbeeinflusst. Zudem kann $PI_{4,5}P_2$ ganz konträre Effekte auf unterschiedliche Ionenkanäle haben. Jedoch konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ob und in welcher Weise auch der $P2X_2$ Rezeptor, ein nicht-desensibilisierender Vertreter der 7 Subtypen umfassenden $P2X$ Rezeptorfamilie durch Phospholipide reguliert wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte dies nun mithilfe einer erst kürzlich entdeckten Phosphoinositid-Phosphatase aus der Seescheide (Ci-VSP) untersucht werden. Herausragendes Merkmal dieses Enzyms ist seine Spannungs-Sensitivität, die auf eine spannungssensorische Protein-Untereinheit zurückgeht, wie sie z. B. auch in spannungsgesteuerten K^+ -Kanälen zu finden ist. Erste Coexpressions-Studien dieser Ci-VSP mit diversen $PI_{4,5}P_2$ -sensitiven K^+ -Kanälen konnten zeigen, dass Ci-VSP die zellulären PI-Level moduliert und somit indirekt Einfluss auf PI-regulierte K^+ -Kanäle nimmt. Dieser Ansatz diente hier als *in vivo*-Werkzeug, um eine potentielle Regulation des $P2X_2R$ durch Phosphoinositide zu untersuchen. Im Anschluss daran wurden weitergehende Experimente durchgeführt, um die gefundenen Effekte der durch Ci-VSP bedingten PI-Konzentrationsänderungen auf den $P2X_2R$ zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

In Fällen, in denen es eine Fülle verschiedener Typen des jeweiligen Reagenzes (z. B. Collagenase) gab sowie in den Angaben der Zellkultur-Agenzien, wie Medien *etc.*, wurde nicht nur der Hersteller/Vertreiber, sondern auch die Produktnummer angegeben.

ACh	Sigma-Aldrich, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, Deutschland
ATP Dinatriumsalz Hydrat	Fluka, Deutschland
C ₂ H ₄ O ₂ (Ethansäure/“Essigsäure“)	Merck, Deutschland
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deutschland
Collagen Typ IV	Sigma-Aldrich C5533, Deutschland
CsCl	Sigma-Aldrich, Deutschland
CsF	Sigma-Aldrich, Deutschland
CsOH	Sigma-Aldrich, Deutschland
DMEM+	DMEM+GlutaMAX™-I, 1X, + 4,5 g/l Glucose, -Pyruvate, GIBCO 61965, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Deutschland
DPBS	1X, - CaCl ₂ , - MgCl ₂ ; GIBCO 14190, USA
Effectene Kit	Quiagen, USA
EGTA	Fluka, Deutschland
EtBr	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>FastPlasmid Mini-Prep Kit</i>	Eppendorf, Deutschland
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , SH30071.03, HyClone, USA
Gentamicin	Fluka, 48760, Deutschland
C ₆ H ₁₂ O ₆ (Glucose)	Sigma-Aldrich, Deutschland
HCl	Merck, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche, Deutschland
Kanamycin	Fluka, 60615, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich, Deutschland
KF	Sigma-Aldrich, Deutschland
KOH	Merck, Deutschland
LiCl	(aus Ambion Kit, <i>s. u.</i>)
Methanol	Fluka, Deutschland
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>mMessage Machine</i>	Ambion, USA
Multi Sanostol	Nycomed, Deutschland (Apotheke)
NaCl	Sigma-Aldrich, Deutschland
NaOH	Merck, Deutschland
Neomycin	Sigma-Aldrich, N1876, Deutschland
NMDG	Sigma-Aldrich, Deutschland
PAO	Sigma-Aldrich, Deutschland
Paromomycin	Fluka, 76261, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Zellkultur)	+ Glutamine, 100X, GIBCO 3398, USA
PI3K-α, katalyt. Untereinheit	Jena Bioscience, Deutschland
PI _{3,5} P ₂	Jena Bioscience, Deutschland
PI _{4,5} P ₂	Jena Bioscience, Deutschland
diC ₈ -PI _{4,5} P ₂	echelon Biosciences, USA
PIP ₃	Jena Bioscience, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Deutschland
PTEN	Jena Bioscience, Deutschland
<i>Quiagen Plasmid Midi Prep</i>	Quiagen, USA
<i>QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene, USA

2. Material & Methoden

RPMI-1640	+ L-Glutamin, + NaHCO ₃ , Sigma R8758, Deutschland
Streptomycin	Fluka, 85880, Deutschland
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ (Sucrose)	Sigma-Aldrich, Deutschland
T4 Ligase	Invitrogen, USA
MS-222 („Tricain“)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Wortmannin	Sigma-Aldrich, Deutschland

2.2 Geräte und Software

2.2.1 RNA-Injektion

Injektionsapparatur	Mikroinjektor Nanoliter Injector A203XVZ, WPI; Drummond Scientific Company, USA
Pipettenziehgerät	Vertical Pipette Puller Model 700D, David Kopf Instruments, USA
Glaskapillaren	3,5“, Drummond #3-000-203-G/X, Drummond Scientific Company, USA

2.2.2 Elektrophysiologie

2.2.2.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Setup:

Mikroskop	Binokular Zoom 20000, Leica, Deutschland
Verstärker	Turbo Tec-03X, mit Interface INT-20, npi electronic GmbH, Deutschland
Pipettenziehgerät	vertikaler <i>Puller</i> , eigene Herstellung
Glaskapillaren	GB150-8P, Science Products, Deutschland (Borosilikatglas)

2.2.2.2 Membranfleck-Spannungsklemmen-Setup:

Oozyten Setup:

inverses Mikroskop	Axiovert 40CFL, Zeiss, Deutschland
Verstärker	EPC 7, HEKA, Deutschland; mit Interface: DigiData 1200, Axon Instruments, USA
Filter	model 3200 filter, Krohn-Hite, USA

HEK293/PC12 Setup:

inverses Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Deutschland
Verstärker	EPC 10, HEKA, Deutschland (mit integriertem Interface und Filter)

Pipettenziehgerät/<i>Puller</i>	PP-83, Narishige, Japan (Borosilikatglas); Model P-2000, SutterInstr., USA (Quarzglas)
Glaskapillaren	GB150-8P, GB150T-8P und GB150ETF-8, npi electronic GmbH, Deutschl. (Borosilikatglas); Q100-70-7.5, SutterInstr., USA (Quarzglas)

2.2.3 Zellkultur

Sterilbänke	HERA <i>safe</i> HS12, Heraeus, Deutschland
Brutschränke	HERA <i>cell</i> 150, Heraeus, Deutschland
Kulturschalen	Nunc Flasks Nunclon™ Δ , <i>vent/close cap</i> , 25-75 cm ² , Nunc, Deutschland
Cover Slips	Roth, Deckgläser rund, 12 mm, Deutschland
Petrischalen für Transfektion	greiner bio-one, CELLSTAR, 3,5 mm mit Nocken, Deutschland

2.2.4 Molekularbiologie

Vakuum-Konzentrator	Concentrator 5301, Eppendorf, Deutschland
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R, Eppendorf, Deutschland
Schüttler	Thermoshaker, Schuttron, UK aerotron Inkubator, infors-HT, Schweiz
Gel-Apparatur	Min-Sub CellGT mit Power Pac 300, BioRad, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland; Sigma 3-18K, Sigma-Aldrich, Deutschland
UV-Transilluminator	UV-solo, Biometra, Deutschland
Photospektrometer	RNA/DNA Calculator GeneQuantII, Amersham, Pharmacia Biotech, UK
Thermocycler	TGradient, biometra, Deutschland

2.2.5 Software

Die Erfassung der Messdaten sowie die Regulation der Sollspannungen, Spannungssprünge und –rampen und die Steuerung der Ventile des angeschlossenen Perfusionssystems wurde während der TEVC-Experimente mithilfe des Programms *CellWorks* 3.6 (npi, Tamm, Deutschland) durchgeführt. Die anschließende Auswertung der Messdaten erfolgte mithilfe des Programms *CellWorks Reader* 3.6, bzw. mithilfe des Programms *Origin 7G* (OriginLab, USA) nach Umwandlung der Rohdaten in ASCII-files.

Im Falle der *Patch Clamp*-Experimente erfolgte die Steuerung der Messung sowie die Aufzeichnung der Messdaten über das Programm *ClampEx* 6.0, deren Auswertung über das entsprechende Programm *ClampFit* 6.0 (*pClamp* 6.0, Molecular Devices, Axon, USA) bzw. mithilfe des Programms *Origin 7G*. Die Auswertung der Einzelkanal-Messungen wurde des Weiteren über *TAC* und *TACFit*-Software (Bruxton, USA) durchgeführt.

2.3 Verwendete Pufferlösungen

2.3.1 Aufbewahrung und Präparation der Oozyten

Direkt nach der operativen Entnahme der Ovarsäckchen wurden diese in eine Oozyten-Ringer-Lösung (ORi+Ca²⁺), die mit dem Antibiotikum Gentamicin (0,05 mg/ml) versetzt war, überführt. Zur weiteren Verwendung wurde das Ovar mit Collagenase verdaut, um die Oozyten aus ihrem natürlichen Gewebeverband herauszulösen und zu vereinzeln. Die Collagenase wurde frisch abgewogen (1-2 mg/ml für Kurzzeitverdau, 3 h; 0,5-0,1 mg/ml für Übernacht-Verdau, 12-14 h) und in ORi+Ca²⁺ gelöst.

Oozyten, die in Messungen zur Charakterisierung des Aminoglykosid-Blocks an P2X₂-Rezeptoren verwendet wurden, wurden in Gentamicin-freiem ORi aufbewahrt, um eventuelle Einflüsse des Antibiotikums vor der jeweiligen Messung zu verhindern. Die Zusammensetzung der verwendeten ORi-Lösungen war folgende:

	ORi + Ca²⁺		ORi – Ca²⁺
NaCl	110 mM	NaCl	110 mM
KCl	5 mM	KCl	5 mM
CaCl ₂	2 mM		
MgCl ₂	1 mM	MgCl ₂	1 mM
HEPES	5 mM	HEPES	5 mM
pH 7,6 (NaOH)		pH 7,6 (NaOH)	
Osmolarität	~290 mOsm/kg	Osmolarität	~290 mOsm/kg

2.3.2 Elektrophysiologie

2.3.2.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Messungen:

Die TEVC-Experimente an heterolog exprimierenden Oozyten wurden sämtlichst mit MgORi durchgeführt, dem unterschiedliche Mengen Agonist bzw. Antagonist zugesetzt wurden. In den Messlösungen wurde Ca²⁺ durch Mg²⁺ ersetzt, da Ca²⁺ ab einer millimolaren Konzentration die P2X Rezeptoren hemmt [EVANS *et al.*, 1996; DING & SACHS, 2000]. Zudem würde das durch die P2XR einströmende Ca²⁺ endogene kalziumaktivierte Chloridkanäle aktivieren [MILEDI *et al.*, 1989; WEBER, 1999], so dass die dann gemessenen ATP-aktivierten Ströme nicht mehr ausschließlich den P2XR zugeordnet werden könnten. Jedoch ist die Anwesenheit von 2-wertigen Kationen im Extrazellulärraum für die Stabilität der Oozytenmembran notwendig [NUMBERGER & DRAGUHN, 1996]. Wenn die eingesetzte ATP- oder ATP-Derivat-Konzentration in den Messlösungen 1 mM überstieg, wurde MgCl₂ in äquimolarer Konzentration zugegeben, um zu verhindern, dass das ATP sämtliches vorhandene MgCl₂ in der MgORi-Lösung komplexiert. Im Falle eines Aminoglykosid-

2. Material & Methoden

Zusatzes zur Badlösung wurde der pH-Wert im Anschluss kontrolliert und readjustiert. Die Zusammensetzung der „Basis“-MgORi-Lösung war folgende:

MgORi	
NaCl	90 mM
KCl	1 mM
MgCl ₂	2 mM
HEPES	5 mM
pH 7,4 (NaOH)	

Wenn während der TEVC-Experimente Substanzen in die Oozyten injiziert wurden (s. *Ergebnisse*), wurden diese in einer Lösung, die den intrazellulären Bedingungen der Oozyten entsprach [WEBER, 1999] (ORi-90K), gelöst und anschließend mit dem am Messplatz fixierten Mikroinjektor injiziert. Die Zusammensetzung dieser „Hoch-Kalium-Lösung“ war folgende:

ORi-90K	
KCl	90 mM
NaCl	1 mM
MgCl ₂	2 mM
HEPES	5 mM
pH 7,4 (KOH)	

2.3.2.2 Membranfleck-Spannungsklemmen-Messungen:

Alle Lösungen, die in den *Patch Clamp*-Experimenten eingesetzt wurden, wurden zuvor sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µM), um zu verhindern, dass Kleinstteilchen wie Staub o. Ä. die feinen Glaselektroden spitzen kontaminierten, was die Ausbildung eines *Gigaseals* verhindert und somit die Messung unmöglich gemacht hätte.

Oozyten, *outside-out*-Konfiguration

In Messungen an Membran-*Patches* (*excised Patch*, *outside out*-Konfiguration) wurden die unter “TEVC-Messungen” bereits erwähnten MgORi-Lösungen als Badlösung verwendet. Diesen wurden ebenfalls, entsprechend des Messprotokolls, Agonisten bzw. Antagonisten zugesetzt. Zum „*Sealen*“ (Herstellung eines genügend hohen Abdichtwiderstands im GΩ-Bereich zwischen Elektrodenglas und Membran) wurde eine Ca²⁺-haltige ORi-Lösung (s. 2.3.1) verwendet; Ca²⁺ stabilisiert als zweiwertiges Kation die Plasmamembran [NUMBERGER & DRAGUHN, 1996] und erhöht die Adhäsionskräfte zwischen Glas und Membran [PRIEL *et al.*, 2007]. Die Pipettenlösung wurde den intrazellulären Bedingungen/Ionenkonzentrationen angepasst, wobei jedoch K⁺ gegen Cs⁺ ausgetauscht wurde, um endogene K⁺-Leitfähigkeiten zu unterdrücken. Zusätzlich wurde EGTA

2. Material & Methoden

hinzugesetzt, um eventuell vorhandenes Ca^{2+} zu chelatieren, und somit die Gefahr der Vesikelbildung zu unterdrücken [NUMBERGER & DRAGUHN, 1996].

Pipettenlösung

CsCl	80 mM
MgCl ₂	5 mM
EGTA	10 mM
HEPES	10 mM
pH 7,4 (CsOH)	

HEK293-Zellen, *whole cell*-Konfiguration

In den *Patch Clamp*-Messungen (*whole cell*-Konfiguration) an HEK-Zellen wurde ebenfalls zwischen der eigentlichen Messlösung, die – je nach Bedarf – mit Agonisten bzw. Antagonisten versetzt wurde und einer Badlösung, in der der *Gigaseal* hergestellt wurde, unterschieden:

Badlösung (<i>Sealen und Aufbewahren</i>)		Badlösung (<i>Basis-Lösung f. Ant-/agonisten</i>)	
NaCl	135 mM	NaCl	135 mM
KCl	4,5 mM	KCl	4,5 mM
CaCl ₂	2 mM	MgCl ₂	2 mM
HEPES	10 mM	HEPES	10 mM
Glucose	10 mM		
pH 7,4 (NaOH)		pH 7,4 (NaOH)	

Auch in der hier verwendeten Pipettenlösung wurde K^+ zum Teil durch Cs^+ ersetzt, um eventuelle endogene K^+ -Leitfähigkeiten zu unterdrücken und Fluorid statt Chlorid verwendet, was zusätzlich zur Stabilität der Membran-*Patches* beiträgt [METHFESSEL *et al.*, 1986].

Pipettenlösung

CsCl	70 mM
KF	70 mM
MgCl ₂	1,5 mM
CaCl ₂	1,5 mM
EGTA	5,5 mM
HEPES	10 mM
pH 7,5 (KOH)	

PC12-Zellen, *whole cell*-Konfiguration

In den *Patch Clamp*-Messungen (*whole cell*-Konfiguration) an PC12-Zellen wurde wie mit HEK293-Zellen verfahren, allerdings unterschieden sich die Lösungen von den oben beschriebenen wie folgt:

2. Material & Methoden

Badlösung (Sealen und Aufbewahren)		Badlösung (Basis-Lösung f. Ant-/agonisten)	
NaCl	145 mM	NaCl	145 mM
CaCl ₂	2 mM		
MgCl ₂	1 mM	MgCl ₂	2 mM
HEPES	10 mM	HEPES	10 mM
Glucose	10 mM		
pH 7,4 (NaOH)		pH 7,4 (NaOH)	

Pipettenlösung	
CsCl	65 mM
CsF	65 mM
MgCl ₂	2 mM
CaCl ₂	1 mM
EGTA	11 mM
HEPES	10 mM
pH 7,2 (CsOH)	

2.3.3 Phosphoinositid-haltige Lösungen

Für die PI_{4,5}P₂-Injektion in Oozyten während der TEVC-Messungen wurde PI_{4,5}P₂-Dipalmitoyl (Jena Bioscience, Deutschland) in der Lösungsmittel-Mischung Chloroform : Methanol : Wasser : HCl (20 : 9 : 1 : 0,1; Löslichkeit 5 mg/ml) aufgenommen. Die PI_{4,5}P₂-Endkonzentration betrug 10 mM (HIMMEL, Diss., 2005). Diese Mischung konnte in Aliquots von 10 µl über längere Zeit bei -20°C aufbewahrt werden. Für den Einsatz als Injektionsagens in TEVC-Messungen wurde diese PI_{4,5}P₂-Stammlösung zunächst mit Ultraschall behandelt, um die Lipidvesikel wieder in Lösung zu bringen und anschließend im Verhältnis 1:50 in ORi-90-K (*s. o.*) aufgenommen. Die Lösung wurde erneut mit Ultraschall behandelt und anschließend in die Oozyte injiziert (*s. 3.2.2.8*). Mit den verwendeten Injektionsagenzien PI_{3,4,5}P₃ und PI_{3,5}P₂ (beides Jena Bioscience, Deutschland) wurde in identischer Weise verfahren.

In *Patch Clamp*-Messungen an Oozyten, die den P2X₂R exprimierten, wurde teilweise PI_{4,5}P₂ der Pipettenlösung zugesetzt. Hierfür wurde diC₈-PI_{4,5}P₂ (echelon Biosciences, USA) verwendet, ein synthetisches Phosphoinositid, das in beiden Fettsäuren nur 8 statt 17 (Stearat) bzw. 20 (Arachidonat) C-Atome besitzt und somit deutlich hydrophiler als das natürlich vorkommende Phospholipid ist [SUH & HILLE, 2005; ZHAO *et al.*, 2007b]. Die Löslichkeit in Wasser beträgt 1 mg/ml, für die Messungen wurde es mit einer Konzentration von 1 mM in Wasser (*A. bidest*) als Stammlösung gelöst und anschließend mit Pipettenlösung auf die gewünschte Konzentration (10 µM) verdünnt. Aufbewahrt wurde diese Stammlösung bei -20°C.

Die Phosphoinositide PI_{3,5}P₂ und PI_{3,4,5}P₃ wurden ebenfalls in *Patch Clamp*-Messungen der Pipettenlösung zugesetzt, diese wurden ebenfalls in dem *o. g.* Lösungsmittel in einer Endkonzentration von 10 mM aufgenommen und anschließend den Versuchsanforderungen entsprechend verdünnt.

2.4 Heterologe Expression von Membranproteinen (rP2X) in *Xenopus laevis*-Oozyten

2.4.1 Tierhaltung

Weibliche Tiere der Gattung *Xenopus laevis* wurden in Gruppen zu jeweils 20-25 Individuen in 200 l-Kunststoff-Becken gehalten, die mit Tonröhren als Unterschlupfmöglichkeit ausgestattet waren. Die Raumtemperatur wurde durch eine Klimaanlage auf 17-18°C [Bossi *et al.*, 2007] gehalten, wodurch auch die Wassertemperatur in diesem Bereich lag. Die Tiere wurden in Leitungswasser gehalten, das jedoch zuvor in einem Vorratsbecken gesammelt wurde und so einige Stunden „abgestanden“ war, bevor es in den Wasserzulauf der Becken eingespeist wurde. Die Tiere wurden im Dämmerlicht gehalten, der Hell-/Dunkel-Rhythmus betrug 12:12 h.

Die Krallenfrösche wurden 1 x wöchentlich mit gesäubertem und entfettetem Rinderherz, das in kleine Würfel geschnitten und dem zusätzlich Multivitamin-Konzentrat („Multi-Sanostol“, Nycomed, Deutschland, aus der Apotheke) zugesetzt wurde, gefüttert. Einen Tag nach der Fütterung wurden die Becken manuell von eventuellen Futterresten und Kot befreit.

2.4.2 Gewinnung der Oozyten

Der zu operierende Frosch wurde für 10-15 Minuten in ein Narkosebad (0,2 % Tricain, Sigma-Aldrich, Deutschland) überführt und anschließend mit klarem Wasser abgespült, um die Reizwirkung des Narkosemittels gering zu halten. Der Frosch war ausreichend betäubt, wenn die Muskeler schlaffung vollständig war und er sich in Rückenlage nicht mehr bewegte. Ein weiteres Anzeichen für eine ausreichende Betäubung des Frosches war der fehlende Schluckreflex bei Berührung der Halsregion. Das Tier wurde dann in eine mit Eis gefüllte Operationsschale gelegt, um einerseits die Narkosewirkung noch zu verstärken und andererseits eventuell auftretende Blutungen zu minimieren. Zusätzlich wurde das Tier mit einem feuchten Tuch abgedeckt, um ein Austrocknen der Haut zu verhindern. Dabei blieb das Operationsfeld jedoch unbedeckt [Bossi *et al.*, 2007].

Anschließend wurden mit einer feinen Operationsschere im caudalen Abdominalbereich zunächst das Bauchfell und anschließend Fascie und Muskulatur mit einem *ca.* 1 cm langen Schnitt durchtrennt. Die sich unmittelbar unter der Muskelschicht frei im Bauchraum befindenden Ovarsäckchen wurden vorsichtig mit einer gebogenen, stumpfen Pinzette

herausgezogen und anschließend abgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass nicht das gesamte Ovar entfernt wurde und dass es möglichst zu keinem Kontakt zwischen Haut und entnommenen Ovarien kam, da die auf der Froschhaut vorhandenen Substanzen (Schleim, Enzyme u. a.) die Oozytenqualität negativ beeinflussen können. Die entnommenen Oozyten wurden sofort in eine mit Gentamicin versetzte Oozyten-Ringer-Lösung gelegt. (s. 2.3.1).

Nach der Ovarentnahme wurde die Wunde mit 3 Stichen und resorbierbarem Nahtmaterial (VICRYL, 4-0, V366H, Ethicon, Deutschland) verschlossen und der Frosch zugedeckt mit einem feuchten Tuch zur Beobachtung in ein Plexiglas-Becken gesetzt. Nach dem Aufwachen wurde dieses mit artifiziell Seewasser aufgefüllt, um das Schließen der Wundränder durch dessen adstringierende Wirkung zu unterstützen. Falls es zu keinen Komplikationen kam, wurde der Frosch am nächsten Tag zu seinen Artgenossen zurück in das Kunststoff-Becken gesetzt.

Es waren zu jeder Zeit genügend Tiere vorhanden, so dass sichergestellt werden konnte, dass jedes Tier nur max. 2 x pro Jahr operiert wurde und dementsprechend genügend Zeit zur Regeneration und zum Heranreifen neuer Oozyten gegeben war.

2.4.3 Präparation und Aufbewahrung der Oozyten

Nach Entnahme der Ovarsäckchen wurden diese in Collagenase verdaut: Das zu verdauende Ovar wurde vorsichtig mithilfe zweier Feinpinzetten (Dumont # 5, INOX, Fine Science Tools, USA) zerkleinert, in die Collagenase-Lösung (s. 2.3.1) überführt und für 2-3 h auf dem Schüttler bei 17-18°C inkubiert. Anschließend wurden die nun vereinzelt Oozyten in eine Ca^{2+} -freie ORi-Lösung überführt, mehrmals mit dieser Lösung gewaschen und für ca. 15 min in dieser Umgebung belassen, um eine nahezu vollständige Ablösung der eventuell noch an der Oozytenoberfläche anhaftenden Follikelzellen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Oozyten erneut kurz in ORi+ Ca^{2+} +Gentamicin gewaschen und dann zur weiteren Verwendung in ebendieser Lösung bei 17-18°C aufbewahrt. Qualitativ „gute Oozyten“ konnten so bis zu 10 Tagen aufbewahrt werden.

In manchen Oozyten-batches stellte sich ein Übernacht-Verdau der Oozyten als vorteilhaft heraus, in diesem Fall wurde die Hälfte der Collagenase-Konzentration eingesetzt und die Zellen ohne Schütteleinwirkung über Nacht bei 17-18°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die gleichen Wasch-Schritte wie bei dem Kurzzeit-Verdau durchgeführt.

Für elektrophysiologische Messungen der in Oozyten exprimierten P2XR war es unabdingbar, dass die Zellen vollständig von der sie umgebenden Follikelzellschicht befreit waren, da sonst der Agonist ATP nur schlecht, bzw. deutlich verlangsamt an die extrazellulär lokalisierte Bindungsstelle gelangt, was sich in artifiziellen Öffnungs- und Schließungskinetiken des Kanals äußert. Für die Injektion von cRNA in die Oozyten war es darüber hinaus hilfreich,

2. Material & Methoden

wenn diese von Follikelzellen befreit vorlagen. Falls dies nicht schon durch die Collagenase-Behandlung geschehen war, wurden die Oozyten vorsichtig manuell „defollikuliert“, indem sie langsam durch eine lange Glaspasteurpipette, die an der Spitze mit Nassschleifpapier angeraut war und deren innerer Durchmesser etwas kleiner als der der Oozyte war, hoch- und herunterpipettiert wurden. Zusätzlich begünstigt wurde das Ablösen der Follikelzellschicht, wenn diese Prozedur in Ca^{2+} -freier ORi-Lösung durchgeführt wurde.

Oozyten, die im *Patch Clamp*-Versuch eingesetzt werden sollten, mussten darüber hinaus noch von der sie umgebenden, direkt der Lipidmembran aufsitzenden, *ca.* 1 μm dicken Vitellinhülle befreit werden [STÜHMER & PAREKH, 1995]. Dies wurde ebenfalls manuell und unmittelbar vor Versuchsbeginn durchgeführt. Dafür wurden die Oozyten in eine hyperosmotische „*shrinking solution*“ überführt, die aus einer 300 mM Sucrose-Lösung (in ORi+ Ca^{2+}) bestand, und die die Zellen langsam schrumpfen ließ. Nach nur wenigen Minuten hob sich die Vitellinhülle von der Plasmamembran der Oozyten ab und konnte nun vorsichtig mithilfe eines Binokulars und zweier Feinpinzetten (*s. o.*) entfernt werden [METHFESSEL *et al.*, 1986].

2.4.4 Injektion von cRNA

Für die Injektion der cRNA (rP2X₂, rP2X₂-P451A/P454A und rP2X_{2/1}, jeweils in pNKS2-; Ci-VSP in pFROG3-Vektoren) wurden die mit Hilfe einer weitlumigen und an der Öffnung hitzepolierten Glaspasteurpipette vorsortierten Oozyten in eine Petrischale überführt, die einen Rechen enthielt, in dem die Oozyten positioniert und somit fixiert werden konnten. Die cRNA wurde mithilfe eines automatischen Mikroinjektors (Nanoject, Drummond Scientific, USA), mittels einer feinen Glaskapillare (20-30 μm Spitzendurchmesser), injiziert. Eine motorgetriebene Pumpe gewährleistete, dass die zuvor eingestellte Injektionsmenge (abhängig von der eingesetzten cRNA-Menge zwischen 10 und 50 nl, 0,25-500 ng/ μl) exakt in die Oozyte injiziert werden konnte. Dabei wurde die Injektionskanüle vorsichtig mit leichtem Druck in die Zelle eingestochen und mit Hilfe des Mikroinjektors die gewünschte Menge an cRNA injiziert. Positioniert wurde die Injektionsspitze am Äquator der Zelle, um eine Injektion der cRNA in den Zellkern, der sich in der animalen Hälfte der Oozyte befindet, zu vermeiden. Zur Expression der injizierten cRNA erfolgte die Lagerung der Oozyten wie oben beschrieben in ORi+ Ca^{2+} +Gentamicin für etwa 1 bis 3 Tage bei einer Temperatur von 17 - 18°C.

2.5 Zellkultur

Sämtliche nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

2.5.1 Kultivierung von HEK293 Zellen

Bei HEK293-Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenepithelzellen, die adhären wachsen [GRAHAM *et al.*, 1977]. Sie wurden im Brutschrank bei 37°C, 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Die Zellen wurden in DMEM(+)-Medium (GIBCO, USA), dem Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin, 10.000 U/ml bzw. 10 mg/ml, GIBCO; USA) sowie 10 % FBS (HyClone, USA) zugesetzt wurden, kultiviert. Zur Zellvermehrung wurden 2 x wöchentlich die konfluent bewachsenen Kulturflaschen (Nunc, 25-75 mm²) im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, anschließend die Zellen mit DPBS (1X, GIBCO, USA) gewaschen und vorsichtig manuell mit einem Zellschaber abgelöst. Frisches, vorgewärmtes Medium wurde hinzugesetzt, die Zellen durch mehrmaliges, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und schließlich auf neue, bereits mit Medium befüllte Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden bis zu einer Passagezahl von 25 verwendet.

2.5.2 Transiente Transfektion von HEK293 Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in das Genom eukaryotischer Kulturzellen. Die Gene, die auf dem eingeführten Plasmid liegen, werden in der Säugierzelle durch deren Enzyme transkribiert und translatiert. Dabei unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transient) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabil). Bei der transienten Transfektion kann das entsprechende Protein mehrere Tage bis zu einer Woche exprimiert werden. Die Plasmide können mithilfe verschiedenster Methoden in die Zellen eingebracht werden (chemische, physikalische, biologische Verfahren). Im vorliegenden Fall wurde das chemische Prinzip der Lipofektion mithilfe kationischer Lipidvesikel angewendet (Effectene, Quiagen, USA). Diese positiv geladenen Liposomen binden an die negativ geladene Plasmid-DNA, wobei größere Komplexe entstehen, die von den Zielzellen aufgenommen werden. Zusätzlich zum Gen des entsprechenden Proteins wird eine weitere Gensequenz mit in die Zelle eingebracht („co-transfiziert“). Diese wird als Reportergen bezeichnet und stellt meist ein fluoreszierendes Protein dar, mit dem anschließend die Transfektions-Effizienz mittels Fluoreszenz-Mikroskopie überprüft wird. Diese Art der Transfektion stellt einen vergleichsweise starken Stress für die Zellen dar, so dass die Transfektions-Bedingungen sorgfältig angepasst und optimiert werden müssen.

Vorliegend wurden HEK293-Zellen mit rP2X₂-DNA (zwischen 4-250 ng) in pcDNA3.1-Vektor transfiziert. Das Protokoll zur Durchführung der Transfektion richtete sich nach den Angaben des Herstellers (Effectene, Quiagen, USA), an dieser Stelle wird nur auf die

veränderten bzw. variablen Parameter eingegangen. Die eingesetzte Menge P2X₂-DNA war sehr gering; als Standard-Menge wird vom Hersteller des verwendeten *Kits* (*s. o.*) 1 µg DNA empfohlen. Diese Menge stellte sich jedoch als zu groß heraus, da die anschließend gemessenen Rezeptorströme im *Patch Clamp*-Experiment (*whole cell*) teilweise bis an zweistellige [nA]-Werte heranreichten, was durch Serienwiderstands-Kompensation des Messverstärkers nicht mehr hinreichend kompensiert werden kann. Als Reportergen fungierte YFP (*yellow fluorescent protein*), eine Mutante des GFP (*green fluorescent protein*) aus *Aequorea victoria*, einer biolumineszenten Quallenart aus dem Pazifischen Ozean. Der Exzitationspeak des YFP liegt bei 514 nm, sein Emissionspeak bei 527 nm. Die eingesetzte DNA-Menge des Reportergens wurde an die der P2X₂-DNA angepasst. Die verwendeten kationischen Lipidvesikel besitzen eine nur gering ausgeprägte Toxizität, wodurch die Durchführung der Transfektion vereinfacht wird, da ein Mediumwechsel einige Stunden später nicht mehr nötig ist. Aus diesem Grund konnten die Aussaat der Zellen und die Transfektion gleichzeitig vollzogen werden. Das letztendlich verwendete, optimale DNA:Effectene-Reagenz-Verhältnis lag bei 1:35, die erzielte Transfektions-Effizienz zwischen 40 und 60 %.

2.5.3 PC12 Zellen

Bei PC12-Zellen handelt es sich um Nebennierentumorzellen aus der Ratte, die unter anderem den P2X₂-Rezeptor nativ exprimieren [GREENE & TISCHLER, 1976; BRAKE *et al.*, 1994; RAYBOULD & HOUSLEY, 1997; FUJITA *et al.*, 2000]. Aus diesem Grund wurden sie für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Die Zellen wachsen in Suspension. Sie wurden ebenfalls im Brutschrank bei 37°C, 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium (Sigma-Aldrich, Deutschland), dem Antibiotikum (*s. o.*) sowie 10 % FBS (*s. o.*) zugesetzt wurden, kultiviert. Zur Zellvermehrung wurden die Zellen, die in 25 mm² großen Kulturflaschen gehalten wurden (*s. o.*) 3 x wöchentlich im Verhältnis 1:3 gesplittet. Dazu wurden sie manuell durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und anschließend auf neue, bereits mit Medium befüllte Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden bis zu einer sehr hohen Passagezahl verwendet [TOZAKI-SAITOH *et al.*, 2006], im Durchschnitt bis zu P70.

2.5.4 Präparation der zu messenden Zellen

Die Zellen, die in *Patch Clamp*-Experimenten eingesetzt werden sollten, mussten auf Glas-*CoverSlips* ausgesät werden, die später in die Messkammer überführt werden konnten. Die Zellen mussten zwar am *CoverSlip* haften, damit ein Umsetzen in die Messkammer möglich war, mussten sich aber später im Experiment auch wieder ohne Komplikationen lösen lassen, um die Zelle in der Messkammer zum Perfusionsschlauch bewegen zu können.

2. Material & Methoden

Obwohl HEK293-Zellen in der Regel von sich aus gut an die Glasoberfläche der *CoverSlips* haften, variierte ihr Haftverhalten teilweise von *batch* zu *batch*. Daher wurden auch Poly-L-Lysin-beschichtete oder durch Übernacht-Inkubation in rauchender HCl angeätzte *CoverSlips* verwendet. Für die Beschichtung mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Deutschland) wurden die vorher in 70%-igem Alkohol und 0,1 N HCl gesäuberten und somit angerauten *CoverSlips* für 10 Minuten mit 100 µl Poly-L-Lysin überschichtet, anschließend die überschüssige Flüssigkeit abgenommen und bei 37°C für 2-3 h getrocknet.

PC12-Zellen sind Suspensionskulturen und hafteten daher deutlich schlechter auf den verwendeten *CoverSlips*. Aus diesem Grund wurden die verwendeten *CoverSlips* mit Collagen Typ IV (Sigma-Aldrich, Deutschland) beschichtet, und die Zellen *ca.* 3 h vor Messbeginn auf ihnen ausgesät. Zur Beschichtung wurde eine Collagen-PBS-Stamm-Lösung angesetzt, deren Konzentration 250 µg/ml betrug. Diese wurde zum Gebrauch im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und anschließend Eisessig in einer Endkonzentration von 20 mM hinzugegeben. Von dieser Lösung wurden 100 µl auf die gesäuberten und angerauten (*s. o.*) *Coverslips* pipettiert, diese dann für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend in PBS gewaschen und erneut bei 37°C getrocknet.

2.5.5 Langzeitlagerung von Säugerzellen

Waren mehr Zellen vorhanden, als in dem jeweiligen Versuchszeitraum benötigt, wurden die überzähligen Zellen zur Langzeitlagerung eingefroren. Dazu wurden die Zellen 5 min bei 300 g pelletiert und in Einfriermedium (entspr. Kulturmedium, *s. o.* mit 10 % DMSO und 40 % FBS) aufgenommen. Anschließend wurden sie zügig in Kryoröhrchen (Nunc *Cryotubes*, 1,0 ml, Deutschland) aliquotiert und in einem dafür vorgesehenen Behälter (Qualifreeze, Qualilab, Nalgene, USA) langsam auf -80°C (1°C/min) abgekühlt. Am nächsten Tag wurden sie zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.6 Elektrophysiologische Methoden

2.6.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Um transmembranäre Ströme der Oozyten, die heterolog Membrankanäle exprimierten, abzuleiten und zu untersuchen, mussten, wie unter 1.6.2 beschrieben, 2 Elektroden in die Oozyte eingestochen werden. Nach Herstellung feiner Glasmikroelektroden mithilfe eines vertikalen *Pullers*, wurde die Spitze manuell mit einer feinen Pinzette abgebrochen, bis sie den gewünschten Durchmesser aufwies. Anschließend wurde die Mikroelektrode vollständig und luftblasenfrei mit einer 3 M KCl-Lösung befüllt. Diese Elektroden wiesen Widerstände von 0,3-2,0 MΩ auf, wobei darauf geachtet wurde, dass die Stromelektrode nicht höherohmig als 1 MΩ war, um Messfehler zu vermeiden, da bei zu hohem Widerstand - dem Ohmschen

2. Material & Methoden

Gesetz folgend - die angelegte Spannung sehr hoch sein müsste, was dann zu Artefakten führen kann.

Zur Messung wurde die Oozyte in die dafür vorgesehene und mit MgORi gefüllte Bohrung der Messkammer gelegt und so positioniert, dass der animale Pol nach oben zeigte, da die animale Hemisphäre eine höhere Rezeptordichte aufweist als die vegetative [BOSSI *et al.*, 2008]. Anschließend wurden die Elektroden mithilfe des Mikromanipulators in die Nähe der Oozyte gebracht, ihr Potential auf 0 mV abgeglichen, um sämtliche Potentialbeiträge, die nicht von der Membran stammen, auszuschalten. Sodann wurden die Elektrodenspitzen im rechten Winkel und in einer Linie zueinander in die Oozyte eingestochen. Das Ruhemembranpotential konnte nun am Verstärker abgelesen werden und lag typischerweise zwischen -20 und -40 mV.

Nach Einschalten des *Voltage Clamp*-Modus (VC) wurde die Oozytenmembran, wenn nicht anders vom auszuführenden Messprotokoll vorgegeben, auf -60 mV geklemmt und der zugehörige transmembranäre Strom detektiert. Da durch das Einstechen der Elektroden die Integrität der Oozytenmembran beeinträchtigt werden kann, wurde in manchen Fällen bis zum Messbeginn kurze Zeit gewartet, um der Oozytenmembran ein „Abdichten“, d. h. eine Regeneration rund um die Einstichstelle, zu ermöglichen. Nachvollzogen werden konnte dies am geringer werdenden Leckstrom.

Während der Messungen erfolgten mehrere Badlösungswechsel, wodurch die Oozyten unterschiedlichen extrazellulären Bedingungen bzw. Agonisten/Antagonisten des zu untersuchenden Membrankanals ausgesetzt wurden, was zu einer Aktivierung (bzw. Deaktivierung), in diesem Fall zum Öffnen (bzw. Schließen) des Kanals führte. Aufgrund des vorherrschenden chemischen Konzentrationsgradienten über der Oozytenmembran und der angelegten negativen Sollspannung führte diese zu messbaren Veränderungen der Ströme. Die Applikation der angeschlossenen Lösungen wurde über Magnetventile gesteuert, die durch das Messprogramm *CellWorks* (s. 2.2.5) kontrolliert wurden, und in dem unterschiedlichste Messprotokolle vordefiniert werden konnten. Im Falle von spannungsaktivierten Membranproteinen führte eine Änderung der angelegten Sollspannung zu deren Aktivierung.

Da es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten P2X Rezeptoren um Kanäle handelt, die z. T. sehr schnelle Desensibilisierungsverhalten aufweisen (z. B. P2X₁ und P2X₃, vollständige Desensibilisierung innerhalb 1-2 s [NORTH, 2002; EGAN *et al.*, 2006]), war ein schneller Lösungswechsel für reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse unabdingbar. Jedoch bedarf es aufgrund der Größe einer Oozyte besonderer Maßnahmen, um einen ausreichend schnellen Lösungswechsel zu garantieren. Man kann dies erreichen, indem man ein kleines Messkammervolumen (vorliegend 10 µl) mit einem hohen Lösungsdurchfluss (vorliegend

200 $\mu\text{l/s}$) kombiniert. Auf diese Art und Weise konnte ein Lösungswechsel realisiert werden, der innerhalb von 0,3-0,5 s abgeschlossen war (s. *Abb. 2.1*).

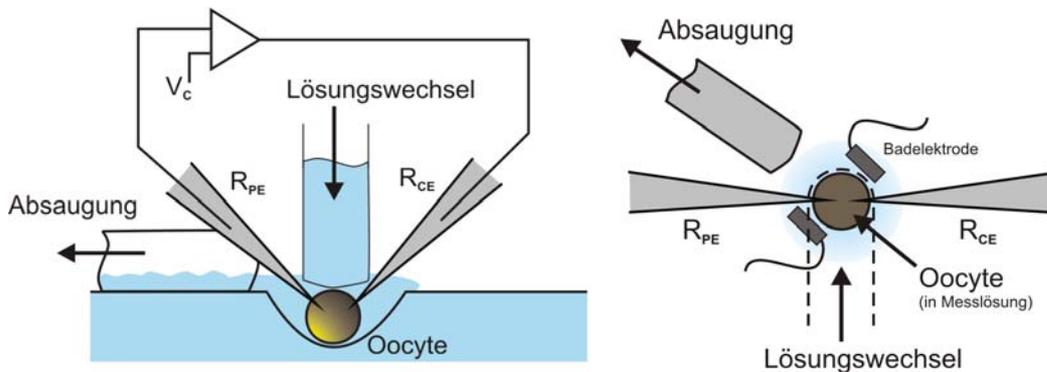


Abb. 2.1: Schema des hier verwendeten, schnellen Lösungswechsels für *Two Electrode Voltage Clamp* - Messungen an *Xenopus* Oozyten. (*Links*: vertikaler Schnitt durch die Messkammer, *rechts*: Aufsicht auf die Messkammer; nach [RETTINGER & SCHMALZING, 2003])

In diesem Versuchsaufbau vereinigten sich 8 Lösungsschläuche in einem *manifold*, der an der vorderen Spitze nur ein sehr geringes Totvolumen aufwies und somit, in Verbindung mit dem schnellen Lösungsdurchfluss (200 $\mu\text{l/s}$), einen schnellen Lösungswechsel garantierte. Der *manifold* selber war an einem Mikromanipulator fixiert. Die gebogene Spitze des *manifolds* (Durchmesser 1,2 mm) wurde so nahe an die Oozyte herangeführt, dass sie ihr fast auflag. Da die Messkammer an sich ebenfalls nur ein sehr kleines Volumen besaß (10 μl), und die Absaugung (Vakuumpumpe) während der Messung permanent eingeschaltet war, war auch der Lösungswechsel in der Kammer schnell vollzogen.

Der Messverstärker war über einen A/D-D/A-Wandler (*Interface*) mit einem *Personal Computer* verbunden, wodurch es möglich war, die Steuerung der einzelnen Messparameter über den PC durchzuführen und die Messgrößen digital aufzuzeichnen. Die Messprotokolle, die für jedes Experiment neu angelegt bzw. angepasst wurden und die Sollspannung sowie die Lösungswechsel automatisch ausführten, wurden in der Steuersoftware (*CellWorks 3.6*) definiert und gespeichert. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte ebenfalls über diese Steuersoftware. Die Filterfrequenz bei kontinuierlicher Datenaufzeichnung betrug 100 Hz (Samplingfrequenz 400 Hz) und 1 kHz (Samplingfrequenz 10 kHz), wenn Spannungssprünge oder -rampen ausgeführt wurden. Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.6.2 Membranfleck-Spannungsklemme

In *Patch Clamp*-Experimenten ist, wie in 1.6.3 dargelegt, nur eine einzige Glas-Mikroelektrode vonnöten, um transmembranäre Ströme zu detektieren, und aufgrund der Größe des herausgerissenen Membranflecks ist es möglich, einzelne Kanäle zu isolieren und deren Ströme zu messen.

2. Material & Methoden

Die Glas-*Patch*-Pipetten wurden jeweils kurz vor den Messungen gezogen, um eine Kontamination der fein ausgezogenen Spitze durch Staub o. a. Kleinstteilchen zu verhindern. Die verwendeten Elektroden wiesen nach Befüllen Widerstände zwischen 2-4 M Ω im Falle von Makro-*Patches/whole cell*-Messungen und 5-11 M Ω im Falle von *single channel*-Messungen auf und wurden, je nach Versuchsobjekt (Oozyten/HEK293-/PC12-Zellen) mit entsprechender Pipettenlösung, die den jeweiligen intrazellulären Gegebenheiten entsprach, befüllt (s. 2.3.2). Anders als in TEVC-Messungen konnten die hier verwendeten Glas-Mikroelektroden lediglich für eine einzige Messung verwendet werden. Im Falle von Einzelkanal-Messungen an Oozyten wurde Quarzglas verwendet, da es deutlich bessere elektrische Eigenschaften besitzt und der Abdichtwiderstand zwischen Glas und Membran wesentlich höhere Werte annimmt als mit herkömmlichem Glas [LEVIS & RAE, 1993; NUMBERGER & DRAGUHN, 1996]. Für alle anderen Messungen wurde Borosilikatglas verwendet.

Nach Überführung der entsprechend vorbereiteten Zellen (s. 2.5.4) wurde eine Mikroelektrode vorbereitet, diese an den Elektrodenhalter/Vorverstärker („*headstage*“) luftdicht angeschlossen und ein geringer Überdruck angelegt, um eine Verschmutzung der Pipettenspitze beim Eintauchen in die Badlösung zu verhindern. Anschließend wurde die Elektrode in die die Zelle umgebende Badlösung eingetaucht und der Potentialabgleich zwischen Elektrode und Badlösung durchgeführt. Dann wurde der Kontakt zwischen Elektrodenspitze und Zelle hergestellt - bei Oozyten war es sogar nötig, so nah an die Zelle heranzufahren, dass man eine leichte Eindellung der Membran wahrnehmen konnte - und ein Unterdruck an die Pipette angelegt. Bei PC12 Zellen musste ein vergleichsweise hoher Unterdruck angelegt werden. In dieser *on cell*-Konfiguration wurden die kapazitiven Ströme, die aufgrund des Test-Spannungspulses (in der Regel 5 mV), der permanent an die Elektrode angelegt wurde, um den Abdichtwiderstand zu messen, und die von Kapazität des Glases und der Membrankapazität des *Patches* stammten, durch den Messverstärker kompensiert. Nach Erreichen eines ausreichend hohen *seals* („*Gigaseal*“, >1 G Ω , s. 1.6.3) musste, um in die *whole cell*-Konfiguration zu gelangen, ein hoher Spannungspuls (500 mV) angelegt werden, der die Membran zerstört („elektrischer Durchbruch“). Der dabei immer noch an die Elektrode angelegte Unterdruck war beim Durchbrechen der Membran hilfreich. Nachvollzogen werden konnte das Durchbrechen der Membran im Falle von HEK293- bzw. PC12-Zellen an einer spontanen Zunahme der kapazitiven Ströme, die nun vom Umladen der Membran der gesamten Zelle stammten. Sobald die Membran durchbrochen war, wurde der Pipetten-Unterdruck entfernt, die kapazitiven Ströme erneut mithilfe des Verstärkers kompensiert und anschließend die Zelle vorsichtig vom *CoverSlip* gelöst, um sie in der Messkammer vor den Perfusionsschlauch zu bringen, was mithilfe des Mikromanipulators geschah. Sodann wurde die Messung gestartet, indem die Zellmembran auf ein bestimmtes

Sollpotential (-70 bis -100 mV) geklemmt und die ATP-vermittelten P2X-Membranströme aufgezeichnet wurden.

Im Falle von Oozyten wurden *Patch Clamp*-Messungen in der *outside out*-Konfiguration ausgeführt. Dazu wurde nach Erreichen eines ausreichend hohen Abdichtwiderstandes die Zellmembran ebenfalls mit einem kurzzeitigen, hohen Spannungspuls durchbrochen. Allerdings wurde dieser Vorgang dadurch gekennzeichnet, dass, im Gegensatz zu HEK293-/PC12-Zellen, der vom Verstärker gemessene Widerstand spontan wieder auf etwas mehr als den ursprünglichen, reinen Elektrodenwiderstand absank, da nun der Widerstand der Oozyte gemessen wird, der aufgrund der Größe der Zelle $< 1\text{M}\Omega$ ist. Somit wird nach Durchbruch der Oozytenmembran praktisch nur noch der Pipettenwiderstand gemessen. Anschließend wurde die Elektrode vorsichtig von der Oozyte weggezogen, um ein Stück Membran (*Patch*) aus der Oozyte herauszuziehen. Dieses schließt sich über der Pipettenöffnung derart, dass die Außenseite der Membran in Richtung Badlösung zeigt und die Innenseite der Membran in Richtung Pipetteninneres. Dieser Vorgang konnte durch ein erneutes Ansteigen des Widerstandes nachvollzogen werden, der dann Werte bis zu $50\text{G}\Omega$ erreichte (bei Verwendung von Quarzglas). Die nun auch hier auftretenden, jedoch deutlich geringeren kapazitiven Ströme wurden kompensiert, der Unterdruck von der Pipette entfernt und der *Patch* in der Messkammer direkt vor den Perfusionsschlauch gebracht. Der *Patch* wurde auf ein Sollpotential von -100 mV (Einzelkanal-Messungen) bzw. -60 mV (makroskopische Ströme) geklemmt und die Messung gestartet.

Auch hier war der Messverstärker über einen A/D-D/A-Wandler mit einem *Personal Computer* verbunden, wodurch es möglich war, die Steuerung der einzelnen Messparameter über den PC durchzuführen und die Messgrößen direkt abzuspeichern. Die Filterfrequenz betrug 1,5 kHz, die Messdaten wurden mit 10 kHz (100 μs) digitalisiert. Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1. Herstellung der cRNA für die Oozyten-Injektion

Nach der Linearisierung der Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (P2X₂: Xho, P2X₁ und P2X_{2/1}: EcoRI; Ci-VSP: HpaI), der folgenden Reinigung (*High Pure PCR Product Purification Kit*, Roche, Deutschland) und der Einengung der Probe erfolgte die cRNA-Synthese mit dem *mMessage mMachine* SP6-System (Ambion, USA) im Falle sämtlicher P2X Subtypen bzw. dem T7-System (Ambion, USA) im Falle von Ci-VSP. Daraufhin wurde die RNA über Nacht mit LiCl gefällt und anschließend aufgereinigt. Eine quantitative Analyse der gewonnenen cRNA erfolgte über eine photometrische Bestimmung mittels *RNA/DNA Calculator GeneQuantII* (Amersham Pharmacia Biotech, UK), die

qualitative Analyse über Aufschluss durch Elektrophorese in einem Agarose-Ethidiumbromid-Gel mit entsprechenden Größenmarkern. Die cRNA konnte anschließend für die Injektion in Oozyten verwendet werden.

2.7.2 Herstellung der Mutante rP2X₂-P451A/P454A

Zur Herstellung der *o. g.* Mutante wurden mit der sog. *Site Directed Mutagenesis-Methode* Mutationen der DNA des rP2X₂-Wildtyps hergestellt. Die cDNA vom Wildtyp war bereits vorhanden und in den Vektor pNKS2 (GLOOR *et al.*, 1995) von Prof. Dr. Schmalzing, Aachen, kloniert worden. Dieser Vektor ist ein zirkuläres Plasmid mit einer Länge von 2,8 kb. Neben einem Ampicillinresistenzgen für die selektive DNA-Replikation in Bakterien enthält der Vektor auch eine Gensequenz für einen SP6-Promotor. Die cDNA des Wildtyp-P2X₂ befindet sich in der *multiple cloning site* des Vektors zwischen den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und AscI.

Es wurden Mutationen zweier Prolin-Reste im distalen Bereich des C-Terminus hergestellt. Zu diesem Zweck wurde 1 Oligonukleotid-Paar („*primer*“), welches die jeweiligen gewünschten Mutationen enthielt, entworfen und erworben (MWG Biotech, Martinsried, Deutschland). Bei der Methode der *QuikChange Site Directed Mutagenesis* (Stratagene, USA) wird das wtP2X₂-Vektor-Konstrukt zusammen mit dem synthetischen Oligonukleotid-Paar, einem Nukleotid-Gemisch und einer DNA-Polymerase (Pfu Turbo, aus *Pyrococcus furiosus*) dem PCR-Verfahren unterworfen. Dieses Verfahren erhitzt den kompletten Ansatz auf *ca.* 95°C, dadurch lösen sich die DNA-Doppelstränge und es entstehen Einzelstränge. Anschließend wird die Temperatur abgesenkt (*T_m*-abhängig, *ca.* zwischen 55-68°C), so dass die Oligonukleotide an die einzelsträngige wt-DNA binden können (*annealing*). Bei der nachfolgenden Erwärmung auf *ca.* 68°C füllt die DNA-Polymerase mithilfe der Nukleotide aus dem Ansatz einen neuen DNA-Strang auf (*elongation*), wobei sie das Oligonukleotid als *primer*/Startsequenz und die einzelsträngige wt-DNA als *template* bzw. „Muster“ nutzt. Der neu entstandene DNA-Strang enthält nun die gewünschte Mutation. Dieser Vorgang wird in *PCR-Cyclern* (hier: TGradient, biometra, Deutschland) mehrmals wiederholt („Amplifizierung“). Anschließend wird die nicht-mutierte *template*-wt-cDNA, die Methylierungen enthält, da sie in Bakterien hergestellt und anschließend extrahiert wurde, durch das Restriktionsenzym DpnI 1 h bei 37°C verdaut, so dass im PCR-Ansatz nur noch die amplifizierte, mutierte DNA vorhanden ist.

Nach erfolgreicher Transformation von kompetenten Zellen (*E. coli* XL1-blue, Stratagene, USA) mit der mutierten DNA und Inkubation über Nacht bei 37°C, wurden einzelne Klone „gepickt“ und erneut über Nacht in 50 ml-Kulturen herangezogen (Vorbereitung „*Mini-* und *Midi-Prep*“). Anschließend wurde die DNA präpariert (*FastPlasmid Mini-Prep*, Eppendorf,

2. Material & Methoden

Deutschland), d. h. extrahiert und aufgereinigt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung (MWG Biotech, Martinsried, Deutschland) überprüft. Abschließend wurde eine „Midi-Prep“ (*Quiagen Plasmid Midi Prep*, Quiagen, USA) von einem erfolgreich mutierten Klon durchgeführt, um ausgehend von der daraus gewonnenen DNA eine cRNA-Synthese (s. 2.7.1) durchzuführen, um diese anschließend in Oozyten exprimieren zu können.

Bei der Mutante rP2X₂-P451A/P454A wurden die polaren Aminosäurereste Prolin an den Positionen 451 und 454 jeweils gegen ein nicht-polares, aliphatisches Alanin ausgetauscht:

	Pos.											Pos.
wt-DNA	1408-	GGA	CAA	AGA	CCT	CCC	GTC	CCT	GAG	CCT	TCC	-1437
AS-Ebene	448-	G	Q	R	P	P	V	P	E	P	S	-457
mut. DNA	1408-	GGA	CAA	AGA	GCT	CCC	GTC	GCT	GAG	CCT	TCC	-1437
AS-Ebene	448-	G	Q	R	A	P	V	A	E	P	S	-457

(Pos. = Position; wt = Wildtyp, mut. = mutiert; AS = Aminosäure)

verwendete Oligonukleotide, Länge jeweils 50 Nukleotide:

forward, $T_m > 75^\circ\text{C}$:

CCAGCATATGGGA CAAAGAGCTCCCGTCGCTGAGCCTTCCCAACAGGACT

reverse, $T_m > 75^\circ\text{C}$:

AGTCCTGTTGGGAAGGCTCAGCGACGGGAGCTCTTTGTCCCATATGCTGG

(verwendete *annealing*-Temperatur: 73°C)

2.7.3 Ci-VSP-C363S

Die Ci-VSP-C363S Mutante wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Thomas Friedrich, TU Berlin, zur Verfügung gestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Aminoglykosid-Block von P2X Rezeptoren

Im Zuge der näheren Untersuchungen einer möglichen Regulation des P2X₂ Rezeptors durch Phosphoinositide wurde in TEVC Experimenten u. a. das Aminoglykosid Neomycin eingesetzt, das aufgrund seiner mehrfach positiven Ladung spezifisch an PI_{4,5}P₂ bindet [WANG *et al.*, 1984]. Bei einer extrazellulären Verwendung des Neomycins konnte eine Inhibition des ATP-vermittelten P2X₂-Rezeptorstroms in Oozyten beobachtet werden, die daraufhin, unabhängig vom Schwerpunkt dieser Arbeit eingehender untersucht wurde und sich als wertvolles Hilfsmittel zur Charakterisierung des „Ci-VSP-Effekts“ (*s. u.*) auf den P2X₂ Rezeptor (P2X₂R) herausstellte. Die Inhibition von P2X Rezeptoren durch Aminoglykoside soll im Folgenden näher erläutert werden.

3.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Da sämtliche hier verwendeten Aminoglykoside als Sulfat-Salz vorlagen, wurde vor Beginn der Messreihen zunächst überprüft, ob Sulfat an sich einen Einfluss auf die Oozyten oder das Verhalten der beiden verwendeten P2X Rezeptortypen hat. Dafür wurden sämtliche Dosis-Wirkungs-Bestimmungen unter identischen Bedingungen mit einer Natriumsulfat-Substitution durchgeführt. Ein Effekt des Sulfats auf die Zellen oder Rezeptoren konnte hierbei nicht festgestellt werden (*nicht gezeigt*).

Es wurden neben Neomycin noch folgende andere 4 Aminoglykosid-Antibiotika untersucht: Streptomycin, Gentamicin, Kanamycin und Paromomycin. Bei allen Vertretern dieser Substanzklasse konnte eine inhibitorische Wirkung sowohl auf den P2X₂ Rezeptor als auch auf den chimären P2X_{2/1} Rezeptor festgestellt werden, jedoch in sehr unterschiedlichen Wirkstärken. Der chimäre Rezeptor wurde aufgrund seiner ATP-Bindungseigenschaften, die die des P2X₁R repräsentieren, und der langsamen, P2X₂R-entsprechenden ATP-Dissoziation vom Rezeptor verwendet.

Zunächst wurden Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit aufsteigenden Aminoglykosid (AG)-Konzentrationen von 10 µM bis 3 mM ermittelt, um pharmakologische Parameter wie IC₅₀-Konzentrationen, maximale Inhibitionsraten und Hill-Koeffizienten der AG-Inhibition bestimmen zu können. *Abb. 3.1* zeigt beispielhaft Originalmessungen der TEVC Experimente an *Xenopus* Oozyten, die den P2X₂R (0,05 ng cRNA, *links*) bzw. P2X_{2/1}R (12,5 ng cRNA, *rechts*) exprimierten und deren Ströme durch Streptomycin bzw. Gentamicin in zunehmendem Maße durch steigende Antagonist-Konzentrationen gehemmt wurden. Das Haltepotential betrug in allen Messungen -60 mV. Agonist und Antagonist wurden

3. Ergebnisse

extrazellulär (i. d. Badlösung) appliziert. Im Falle des P2X₂R wurde, ermöglicht durch die schnelle Deaktivierung nach Wechsel zu ATP-freier Lösung, zwischen den einzelnen Messungen der Leckstrom in ATP-freier Lösung überprüft. Die ATP-Konzentrationen betragen im Falle von P2X₂ Rezeptoren 30 µM (EC₅₀), im Falle des chimären P2X_{2/1} Rezeptors 100 nM (sättigend). Es wurde eine sättigende ATP-Konzentration am P2X_{2/1}R verwendet, da dieser eine sehr geringe EC₅₀-Konzentration von 3 nM aufweist, und die Aktivierung des Rezeptors durch diese geringen Agonisten-Konzentrationen sehr langsam verläuft.

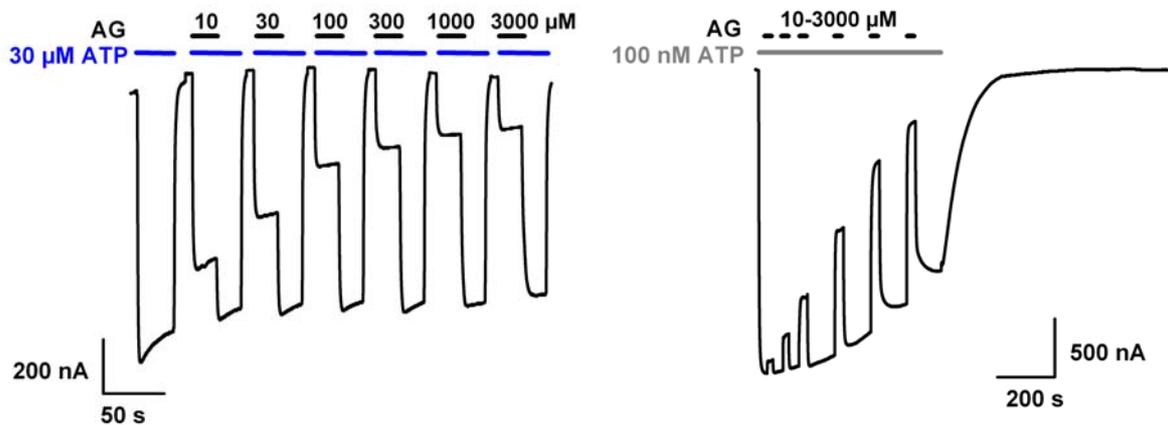


Abb. 3.1: Inhibition von P2X Rezeptorströmen durch Aminoglykoside. Originalmessungen ATP-vermittelter P2X₂- (*links*) bzw. P2X_{2/1}-Rezeptorströme (*rechts*), induziert durch 30 µM ATP (P2X₂) bzw. 100 nM ATP (P2X_{2/1}), und deren Inhibition durch steigende Konzentrationen (10-3000 µM) von Aminoglykosid-Antibiotika; V_m = -60 mV. Beispielhaft gezeigt sind die Inhibition des P2X₂ Rezeptors durch Streptomycin und die Inhibition des chimären Rezeptors durch Gentamicin. Die Inhibition zeigte an beiden Rezeptor Subtypen ein schnelles „on set“ und „off set“-Verhalten. Mit steigender AG-Konzentration nahm die Inhibition des ATP-vermittelten Rezeptorstroms zu, erreichte jedoch nur im Falle der Paromomycin-Inhibition am P2X₂ Rezeptor eine nahezu vollständige Hemmung (vgl. Abb. 3.1. und 3.2).

Die Inhibition der P2X Rezeptorströme durch verschiedene Aminoglykoside zeigte in allen Fällen ein schnelles „on set“ und „off set“-Verhalten, d. h., dass unmittelbar nach der Antagonisten-Applikation eine gesättigte Hemmung des Rezeptorstroms beobachtet wurde, die anhielt, solange der Antagonist extrazellulär vorhanden war, und sofort nach Wegnahme des AGs zurückging. Mit steigender Aminoglykosid-Konzentration nahm die Inhibition des ATP-vermittelten Rezeptorstroms zu, jedoch wurde auch mit hohen AG-Konzentrationen in den meisten Fällen keine vollständige Hemmung erzielt. Den gemittelten Werten wurde eine Hill-Gleichung angepasst (s. Abb. 3.2 und 3.3) und mit der folgenden Gleichung die IC₅₀-Konzentration und der Hill-Koeffizient (n_H) bestimmt (Werte s. Tab. 3.1 und 3.2):

$$I = \frac{I_{max}}{1 + ([AG]/IC_{50})^n}$$

3. Ergebnisse

Tab. 3.1: Übersicht über die Parameter der durch Aminoglykosid-Antibiotika verursachten Inhibition am P2X₂ Rezeptor: IC₅₀-Werte sowie Hill-Koeffizienten (n_H). (Mittelwerte ± Standardfehler, s. Abb. 3.2, n = s. Abb. 3.2); * = Werte aus Hill-fit, Erläuterungen s. Text.

P2X ₂	IC ₅₀ [μM]*	n _H *
Streptomycin	110 ± 23	0,6 ± 0,1
Gentamicin	405 ± 75	0,6 ± 0,1
Neomycin	437 ± 33	0,7 ± 0,1
Paromomycin	1380 ± 200	0,7 ± 0,1
Kanamycin	2700 ± 230	0,9 ± 0,1

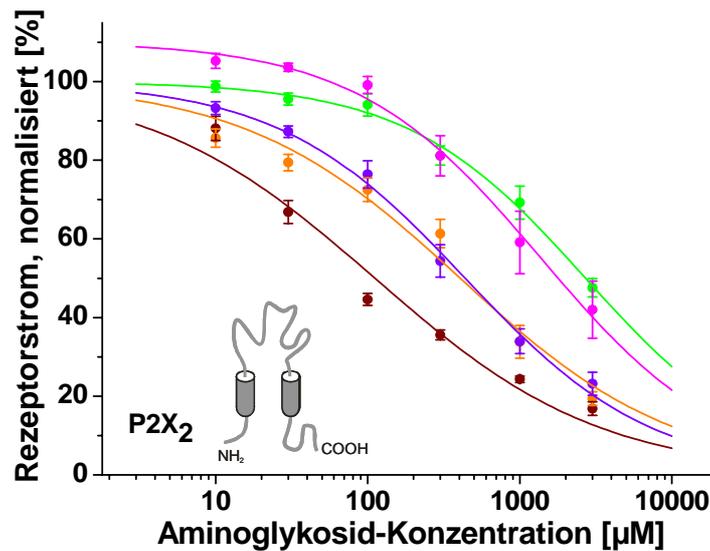


Abb. 3.2: Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Aminoglykosid-Inhibition des P2X₂ Rezeptors. Getestet wurden 5 verschiedene Aminoglykosid-Antibiotika (Streptomycin, n = 14 (●); Gentamicin, n = 14 (●); Neomycin, n = 12 (●); Paromomycin, n = 10 (●); Kanamycin, n = 9 (●)), V_m = -60 mV, ATP = 30 μM. Streptomycin war mit einer IC₅₀-Konzentration von 110 μM am wirksamsten, Kanamycin am wenigsten wirksam (ca. 2,7 mM). Nur im Falle von Paromomycin und Gentamicin wurde eine nahezu vollständige Inhibition erreicht (mit Konzentrationen > 3 mM, nicht gezeigt, s. Text), im Falle der anderen getesteten AGs erreichte die Inhibition Werte um ca. 80 %. Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler.

Im Falle des P2X₂R (Tab. 3.1; Abb. 3.2) wurde die wirksamste Hemmung durch Streptomycin erzielt, die schwächste konnte mit Kanamycin beobachtet werden. Mit fast allen AGs konnte eine maximale Inhibition von ca. 80-90 % erreicht werden, nur im Falle von Paromomycin handelte es sich um eine vollständige Inhibition (mit Konzentrationen > 3 mM, nicht gezeigt). Jedoch besaß dieses AG den zweithöchsten IC₅₀-Wert. Die Hill-Koeffizienten, die ebenfalls aus den nicht-linearen Kurven-fits ermittelt wurden, lagen dabei zwischen 0,6 und 1,0; die Wirksamkeitsreihenfolge (rank order of potency) war folgende: Streptomycin > Gentamicin > Neomycin > Paromomycin > Kanamycin. Die Werte der einzelnen Parameter des AG-Blocks an P2X₂ Rezeptoren können der Tab. 3.1 entnommen werden.

3. Ergebnisse

Tab. 3.2: Übersicht über die Parameter der durch Aminoglykosid-Antibiotika verursachten Inhibition am P2X_{2/1} Rezeptor: IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten (n_H). (Mittelwerte ± Standardfehler, s. Abb. 3.2, n = s. Abb. 3.3), * = Werte Hill-fit, Erläuterungen s. Text.

P2X _{2/1}	IC ₅₀ [μM]*	n _H *
Neomycin	336 ± 24	0,6 ± 0,1
Gentamicin	444 ± 47	0,6 ± 0,1
Streptomycin	670 ± 36	0,7 ± 0,1
Kanamycin	2100 ± 60	0,9 ± 0,1
Paromomycin	3000 ± 360	0,6 ± 0,1

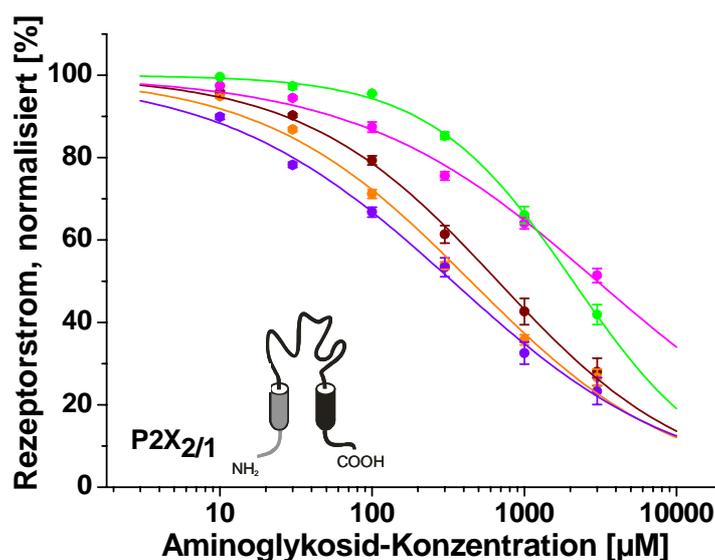


Abb. 3.3: Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Aminoglykosid-Inhibition des chimären P2X_{2/1} Rezeptors. Getestet wurden 5 verschiedene Aminoglykosid-Antibiotika (Streptomycin, n = 16 (●); Gentamicin, n = 14 (●); Neomycin, n = 17 (●); Paromomycin, n = 12 (●); Kanamycin, n = 7 (●)), V_m = -60 mV, ATP = 100 nM. Neomycin war mit einer IC₅₀-Konzentration von 336 μM am wirksamsten, Kanamycin am wenigsten wirksam (ca. 2,1 mM). Nur im Falle von Neomycin handelte es sich um eine nahezu vollständige Inhibition, im Falle der anderen getesteten AGs erreichte die Inhibition Werte um ca. 60-80 % (vgl. Tab. 3.2). Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler.

An der Rezeptorchimäre P2X_{2/1} (Abb. 3.3, Werte s. Tab. 3.2) wurden die wirksamsten Hemmungen durch Neomycin und Gentamicin erzielt. Zudem verursachte letzteres eine fast vollständige Inhibition im Vergleich zu den anderen 4 AGs, deren Hemmwirkung lediglich zwischen ca. 60-90 % lag. Die schwächste Inhibition (IC₅₀-Wert) wurde mit Paromomycin beobachtet. Die Hill-Koeffizienten lagen, wie beim P2X₂R auch, zwischen 0,6 und 0,9. Die Wirksamkeitsreihenfolge war folgende: Neomycin > Gentamicin > Streptomycin > Kanamycin > Paromomycin.

3.1.2 Spannungsabhängigkeit des Aminoglykosid-Blocks

Um die Spannungsabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung von Aminoglykosiden zu untersuchen, wurden IV-Kennlinien des P2X₂R in An- und Abwesenheit von AGs generiert. Dazu wurden Spannungen (Haltepotentiale) von -120 bis +60 mV (Dauer jew. 500 ms)

3. Ergebnisse

angelegt und die Rezeptorströme gemessen. Die ATP-Konzentration entsprach hierbei der EC_{50} -Konzentration ($30 \mu M$), die Konzentration der einzelnen AGs entsprach ebenfalls der zuvor ermittelten IC_{50} -Konzentration (vgl. Tab. 3.1). Als Kontrolle wurde die nicht-inhibierte IV-Messung des $P2X_2$ Rezeptors in ATP-Anwesenheit herangezogen. Sämtliche IV-Kurven sind Leckstrom-korrigiert, d. h., Ströme im nicht-Rezeptor-aktivierten und nicht-inhibierten Zustand wurden von den Messwerten abgezogen, so dass der reine, ATP-vermittelte und ggfs. durch AGs inhibierte Rezeptorstrom dargestellt ist.

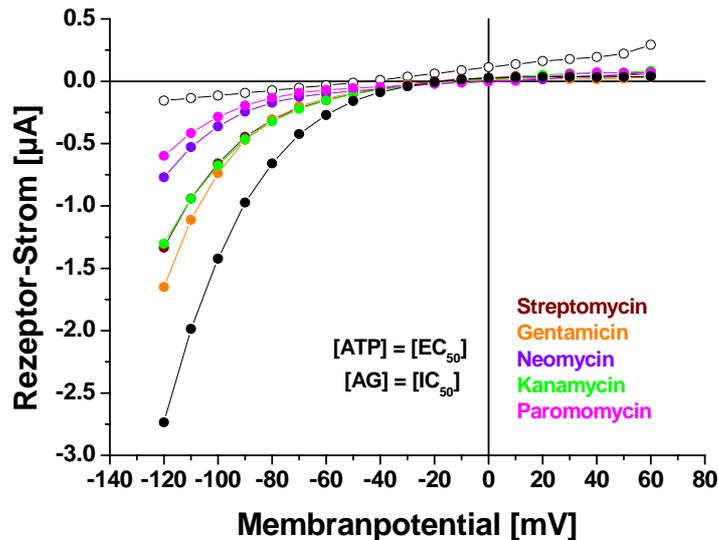


Abb. 3.4.a: Spannungsabhängigkeit der Aminoglykosid-Inhibition am $P2X_2$ Rezeptor. IV-Kurven einer einzelnen Oozyte, die den $P2X_2$ Rezeptor exprimiert: (○) ATP- und AG-freie Messung („Leckstrom“), (●) nicht-inhibierter ATP-vermittelter Rezeptorstrom, (●)(●)(●)(●)(●) durch AGs inhibierte Rezeptorströme, Farbcodierung siehe Graphik. Dargestellt ist der reine, Leckstrom-korrigierte $P2X_2$ Rezeptorstrom.

Abb. 3.4.a zeigt beispielhaft die Messungen der *o. g.* IV-Kennlinien an einer einzelnen Oozyte. Die schwarze Kurve zeigt die charakteristische, nicht-inhibierte IV-Relation des $P2X_2$ R. Deutlich erkennt man die einwärts gleichrichtende Charakteristik des $P2X_2$ Rezeptorstroms. Das Umkehrpotential (U_{rev} ; $I = 0$) betrug *ca.* -20 mV und in positiven Spannungsbereichen wurden nur sehr kleine Auswärtsströme gemessen.

Um zu untersuchen, ob die AG-Hemmung spannungsabhängig ist, wurde das Verhältnis zwischen gehemmtem und ungehemmtem Rezeptorstrom berechnet. In Abb. 3.4.b sind diese Verhältnisse bei den gemessenen Potentialen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Inhibition des $P2X_2$ R im stark negativen Haltepotential-Bereich deutlicher ausgeprägt war als im positiveren.

3. Ergebnisse

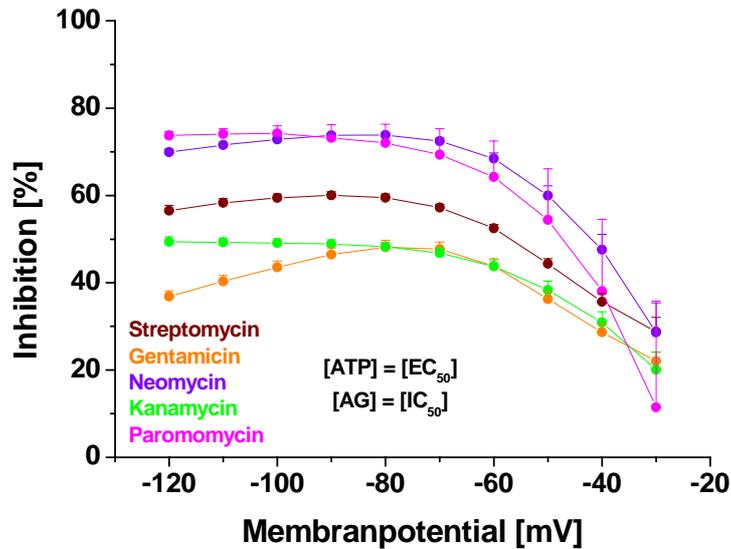


Abb. 3.4.b: Spannungsabhängigkeit der Aminoglykosid-Inhibition am P2X₂ Rezeptor. Dargestellt ist das Verhältnis zwischen gehemmtem und ungehemmtem Strom. Die Inhibition des ATP-vermittelten Rezeptorstroms durch AGs zeigte eine deutliche Spannungsabhängigkeit im Potentialbereich von -70 bis -30 mV und nahm mit steigenden Membranpotentialen ab (Werte dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler; n = 7).

3.1.3 ATP-Abhängigkeit des Aminoglykosid-Blocks

Um zu untersuchen, ob die AG Hemmung von der verwendeten ATP-Konzentration abhängt, wurde die Hemmung bei unterschiedlich starker Rezeptoraktivierung verglichen. Dazu wurde der Rezeptorstrom mit halb-maximal (30 μ M) und maximal (300 μ M) aktivierender ATP-Konzentration ausgelöst und dieser anschließend mit 1 mM Neomycin ($IC_{50} = 437 \mu$ M, s. Tab. 3.1) inhibiert (s. Abb. 3.5).

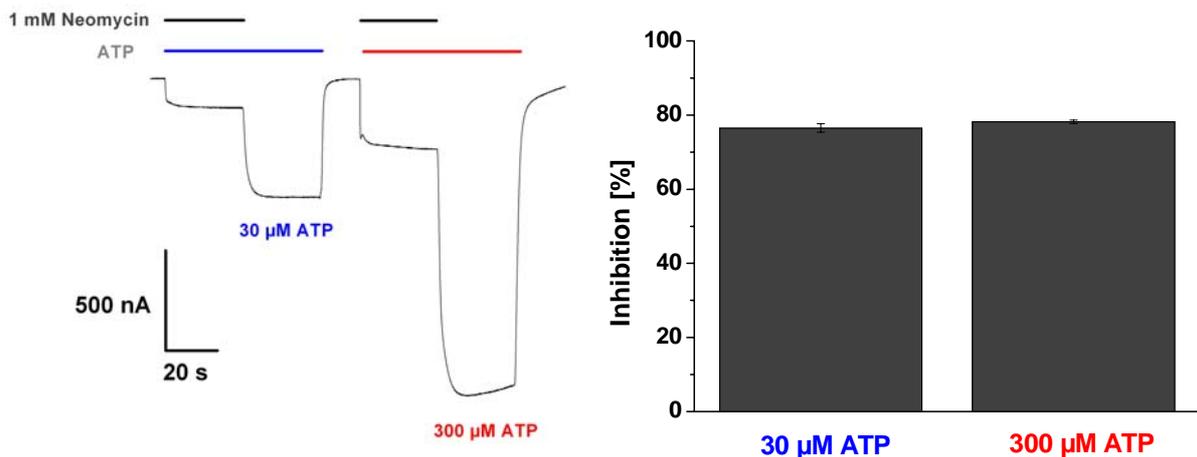


Abb. 3.5: ATP-Abhängigkeit der Aminoglykosid-Inhibition des P2X₂ Rezeptors. *Links:* Original-Stromspur einer P2X₂R-exprimierenden Oozyte, $V_m = -60$ mV. *Rechts:* Die Inhibition des Rezeptorstroms durch 1 mM Neomycin war im Falle von halb-maximaler (30 μ M) und maximaler (300 μ M) Rezeptoraktivierung gleich groß und betrug im Mittel ca. 75 % (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 6).

In beiden Fällen erreichte die Inhibition Werte um ca. 75 % (30 μ M: 76 %, 300 μ M: 78 %), sie war demnach völlig unabhängig von der eingesetzten Agonisten-Konzentration am P2X₂

Rezeptor. *Abb. 3.5, links* zeigt die Original-Messungen an einer einzelnen Oozyte, *Abb. 3.5, rechts* die Mittelwerte der an 6 Oozyten ermittelten Hemmung.

3.1.4 Aminoglykosid-Wirkung auf die ATP-Dissoziation

Die Aminoglykosid-Inhibition am chimären P2X_{2/1} Rezeptor zeigte ebenfalls, wie am P2X₂R, ein schnelles „on set“ und „off set“-Verhalten (*vgl. Abb. 3.1*). Schlussfolgernd gelten folgende Überlegungen: die Deaktivierung dieser Rezeptorchimäre nach Entfernen des Agonisten aus dem Bad ist langsam und erst nach 240 s abgeschlossen (*s. Abb. 3.6, oben*). Sie folgt einem monoexponentiellen Zeitverlauf mit einer Zeitkonstanten $\tau = 63$ s. Die EC₅₀-Konzentration ist sehr klein und liegt bei 3 nM. Daraus kann geschlossen werden, dass die Affinität zum Agonisten ATP sehr hoch und die ATP-Dissoziation vom Rezeptor dementsprechend langsam ist [RETTINGER & SCHMALZING, 2004]. Der AG-Block der Rezeptorchimäre jedoch war schnell und direkt, war also ein von der ATP-Dissoziation vom Rezeptor unabhängiger Prozess, d. h., Aminoglykoside blockieren den P2X_{2/1}R auch, wenn ATP noch gebunden ist.

Um nun auch den umgekehrten Fall zu untersuchen, ob die ATP-Dissoziation vom Rezeptor durch einen Aminoglykosid-Block beeinflusst wird, wurden TEVC-Experimente an P2X_{2/1}R exprimierenden Oozyten hinsichtlich der Deaktivierung nach ATP-Wegnahme durchgeführt.

In der in *Abb. 3.6* dargestellten Messung wurde 20 s vor ATP-Wegnahme aus dem extrazellulären Medium der P2X_{2/1} Rezeptorstrom mit einer sättigenden Konzentration von Gentamicin (3 mM, IC₅₀ = 444 μ M, *vgl. Tab. 3.2*) inhibiert (V_m : -60 mV). Nach Entfernen des Agonisten aus dem Bad wurde diese Inhibition 240 s lang aufrechterhalten - der Zeitraum, der in Abwesenheit von Aminoglykosiden zur vollständigen Deaktivierung ausreicht (*obere Abb.*). Anschließend wurde das Gentamicin aus der Badlösung entfernt, was zu einer transienten Rezeptoraktivierung führte (*untere Abb.*).

Während am nicht-inhibierten P2X_{2/1} nach Agonisten-Wegnahme aus dem extrazellulären Medium nach 240 s kein Rezeptorstrom mehr zu verzeichnen war, wurde am durch Gentamicin inhibierten P2X_{2/1} Rezeptor 240 s nach ATP-Wegnahme noch ein deutlicher Rezeptorstrom (Einwärtsstrom) gemessen (*s. Abb. 3.6, unten, roter Pfeil*), der anschließend, in Abwesenheit von Gentamicin der für diesen Rezeptor Subtyp normalen Deaktivierungskinetik folgte. Dieser Befund zeigt somit, dass der AG-Block der P2X_{2/1} Rezeptorchimäre die ATP-Dissoziation vom Rezeptor verlangsamt. Daraus kann weiterführend geschlossen werden, dass der AG-Block den P2X_{2/1}R im offenen Zustand arretierte, da die Agonisten-Dissoziation vom geöffneten Rezeptor langsamer ist [DILGER, 2002].

3. Ergebnisse

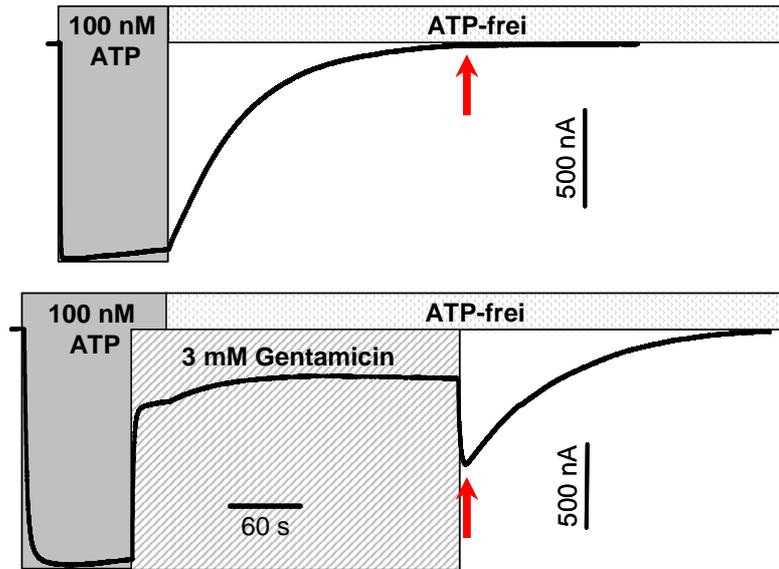


Abb. 3.6: Die ATP-Dissoziation von der P2X_{2/1} Rezeptorchimäre war in Anwesenheit von Aminoglykosiden verlangsamt, da diese den Rezeptor im offenen Zustand arretierten. Zu sehen sind die Deaktivierungskinetiken des P2X_{2/1}R (Original-Stromspuren einer einzelnen Oozyte, V_m = -60 mV) in Ab- und Anwesenheit von 3 mM Gentamicin nach maximaler Aktivierung durch 100 nM ATP. Die Deaktivierung dieses Rezeptor Subtyps ist im nicht-inhibierten Zustand nach 240 s in ATP-freier Lösung abgeschlossen (s. obere Abbildung, roter Pfeil). In Anwesenheit hoher, sättigender Gentamicin-Konzentrationen war diese Deaktivierung nur unvollständig - zu erkennen an dem sich schnell entwickelnden, transienten Einwärtsstrom nach Gentamicin-Wegnahme, s. untere Abbildung roter Pfeil.

An dieser Stelle kann zusammenfassend festgehalten werden, dass die hier untersuchte Inhibition des Rezeptorstroms von P2X₂ und P2X_{2/1} Rezeptoren (letztere als Modell für den P2X₁R) durch Aminoglykoside unmittelbar war und schnelle „on set“- und „off set“-Kinetiken aufwies. Beide Rezeptor Subtypen wiesen unterschiedlich starke Inhibitionen ihrer Ströme durch die 5 verschiedenen getesteten AGs auf. Der AG-Block war zudem spannungsabhängig, mit schwächer werdenden Hemmwirkungen bei zunehmend depolarisierenden Membranpotentialen, jedoch unabhängig von der eingesetzten Agonisten-Konzentration. Mithilfe der Rezeptorchimäre konnte nachgewiesen werden, dass Gentamicin die ATP-Dissoziation vom Rezeptor verlangsamt und ihn demnach im offenen Zustand arretiert. All diese Befunde sind mit einem nicht-kompetitiven Wirkmechanismus und darüber hinaus mit dem Modell eines physikalischen Verstopfens der geöffneten Kanalpore (*open pore block*) vereinbar.

3.2 Coexpression von Ci-VSP und P2X Rezeptoren

Um zu untersuchen, ob P2X Rezeptoren, und speziell der P2X₂R, einer Regulation durch Phosphoinositide unterliegen, wurden diese Ionenkanäle zusammen mit einer PI-Phosphatase aus der Seescheide (Ci-VSP) in *Xenopus* Oozyten coexprimiert. Anschließend wurden die Auswirkungen der durch Ci-VSP-Aktivität bedingten Änderung der membranständigen Phosphoinositid-Konzentrationen auf die P2XR elektrophysiologisch untersucht.

3.2.1 Grundlegende elektrophysiologische Untersuchungen von Ci-VSP/P2X₂-coexprimierenden Zellen

Vor Einsatz der Ci-VSP/P2X₂ coexprimierenden Oozyten (25 bzw. 0,05 ng cRNA) in TEVC-Experimenten wurde die erfolgreiche Expression des Ci-VSP-Proteins überprüft, indem die Ladungsbewegungen (Tor-/gating-Ströme) der spannungssensitiven Domäne in Antwort auf Änderungen des Membranpotentials gemessen wurden. Eine andere, elektrophysiologische Möglichkeit besteht nicht, da Ci-VSP keine Kanalpore, wie z. B. der P2X₂R, besitzt, und daher die Expression nicht durch einen Leitfähigkeitstest nachgewiesen werden kann.

Die gating-Ströme wurden über das P/n-Protokoll gemessen [ARMSTRONG & BEZANILLA, 1973; ULBRICHT, 1977; HEINEMANN *et al.*, 1992; MURATA *et al.*, 2005]. Dafür wurden Spannungssprünge im TEVC-Experiment an die Oozytenmembran von -80 bis +160 mV (Δ 10 mV) angelegt und die jeweils zugehörigen Halteströme gemessen. Um lediglich die gating-Ströme aufzuzeichnen, wurden vor jedem „großen“ depolarisierenden Spannungssprung 8 kleine, hyperpolarisierende („sub-sweeps“) durchgeführt. Diese entsprachen in ihrem Wert 1/8 der anzulegenden Spannungsdifferenz (Bsp.: V-Sprung von -80 mV auf +120 mV, entspricht Δ = 200 mV, 8 sub-sweeps à -25 mV) und wurden ausgehend von -110 mV (im Beispiel: -135 mV) angelegt. Aus diesen kleinen, hyperpolarisierenden V-Sprüngen wurden die membranären, kapazitiven Ströme (I_c) er- und gemittelt und anschließend auf den Wert des anzulegenden, depolarisierenden Haltepotentials extrapoliert (im Beispiel auf +120 mV). Der daraus resultierende Wert wurde dann vom gemessenen Strom beim jeweiligen V-Sprung abgezogen, so dass letztlich nur noch die gating-Ströme dargestellt wurden. Durchgeführt wurden die Messungen in einer (extrazellulären) Badlösung, in der Na⁺ durch das impermeable NMDG⁺ ersetzt wurde, um endogene Leitfähigkeiten gering zu halten (*nicht gezeigt*).

Abb. 3.7, links zeigt beispielhaft die gating-Ströme einer rein Ci-VSP coexprimierenden Oozyte in Antwort auf Spannungssprünge im Bereich von -80 bis +160 mV im Abstand von 10 mV. Halteströme (lineare Ströme) wurden subtrahiert, so dass allein die Ströme, die aus der Bewegung des Spannungssensors resultieren, dargestellt wurden. Das dazugehörige Spannungsprotokoll dieser Messungen ist ebenfalls dieser Abbildung zu entnehmen. Abb. 3.7,

3. Ergebnisse

rechts fasst diese Messungen zusammen und gibt die Q/V -Relationen der Ci-VSP-gating-Ströme wieder, unterteilt in *ON*- und *OFF*-Ströme einer einzelnen Oozyte sowie die gemittelten *OFF*-Ströme von 10 Oozyten [MURATA *et al.*, 2005].

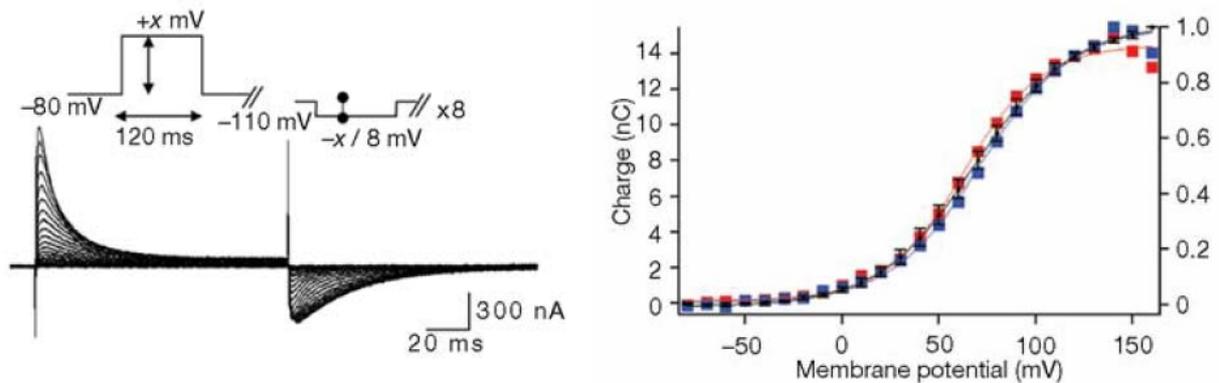


Abb. 3.7: Tor-/Gating-Ströme von Ci-VSP exprimierenden Oozyten. (aus [MURATA *et al.*, 2005]. **Links:** *gating*-currents einer einzelnen Oozyte nach Abzug der Halteströme und Darstellung des dazugehörigen Spannungsprotokolls. **Rechts:** Q/V -Relationen der *gating*-Ströme von Ci-VSP (■ = *ON*-Ströme, ■ = *OFF*-Ströme, jeweils Einzelzellen; ■ = gemittelte *OFF*-Ströme, $n = 10$). Die rechte Achse gibt die normalisierte, bewegte Ladung der spannungssensorischen Ci-VSP-Untereinheit an.

Um den potentiellen Einfluss der reinen Coexpression von Ci-VSP auf den $P2X_2$ Rezeptorstrom zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven (TEVC) mit aufsteigenden Agonisten-Konzentrationen von 1-1000 μM ATP aufgenommen. Originalstromspuren dieser Messungen sind in *Abb. 3.8.a* (rechts: $P2X_2$ R exprimierende Oozyte (Kontrolle), links: Ci-VSP/ $P2X_2$ R coexprimierende Oozyte) dargestellt. Das Haltepotential betrug während der gesamten Messungen -60 mV, bei dem Ci-VSP inaktiv ist. Die gemittelten Dosis-Wirkungs-Beziehungen von 6 bzw. 4 Oozyten sind in *Abb. 3.8.b* dargestellt. Durch die Daten wurde ein Hill-*fit* gelegt, um charakteristische Werte wie EC_{50} -Konzentration und Hill-Koeffizient (n_H) berechnen zu können.

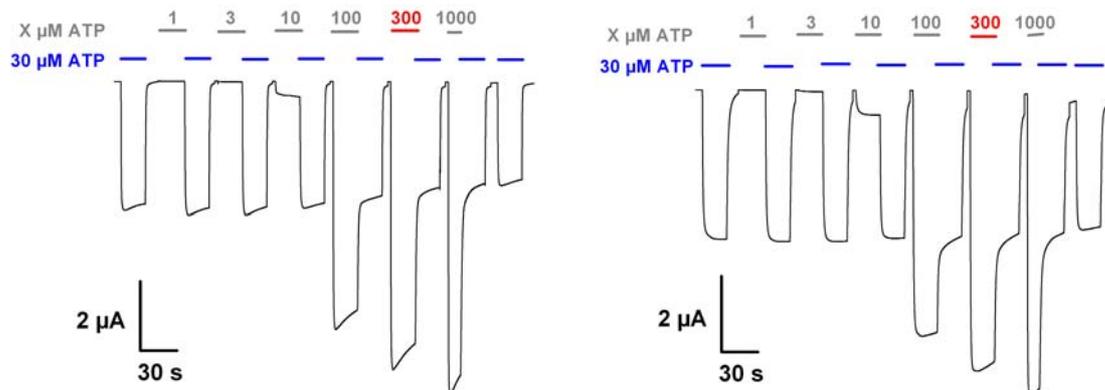
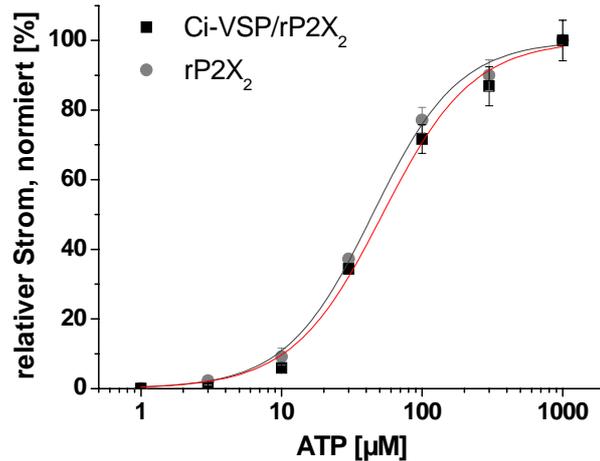


Abb. 3.8.a: Dosis-Wirkungs-Messungen an $P2X_2$ R exprimierenden (rechts) und Ci-VSP/ $P2X_2$ R coexprimierenden Oozyten (links) mit steigenden ATP-Konzentrationen (1-1000 μM). Originalstromspuren, $V_m = -60$ mV. Als Referenzwert wurde jeweils der Literaturwert der EC_{50} -Konzentration für ATP (30 μM) verwendet, auf den die gemittelten Werte im Anschluss normiert wurden (s. *Abb. 3.8.b*).

3. Ergebnisse

Abb 3.8.b: Dosis-Wirkungs-Beziehungen an P2X₂R exprimierenden und Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten mit steigenden ATP-Konzentrationen (1-1000 μ M). Hill-fit der gemittelten Dosis-Wirkungs-Messungen (V_{\max} jeweils 100 %, P2X₂R (n = 6): $EC_{50} = 44 \pm 2 \mu$ M; $n_H = 1,4$; Ci-VSP/P2X₂R (n = 4): $EC_{50} = 52 \pm 3 \mu$ M, $n_H = 1,4$. Das Haltepotential betrug -60 mV. Die Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen coexprimierenden und Kontroll-Zellen unterschieden sich nicht signifikant (Mittelwerte \pm Standardfehler; *student's t-Test*).



Es konnte kein Unterschied in den Dosis-Wirkungs-Beziehungen der beiden Versuchsgruppen festgestellt werden, der P2X₂ Rezeptorstrom verhielt sich unter Ci-VSP Coexpressions-Bedingungen identisch zu dem der Kontrollgruppe. Die ermittelten EC_{50} -Konzentrationen lagen im gleichen Größenbereich (44 bzw. 52 μ M), die Hill-Koeffizienten waren identisch ($n_H = 1,4$). Die reine Coexpression der beiden Proteine und die anschließende Rezeptoraktivierung mit variierenden Agonisten-Konzentrationen bei einem „üblichen“ und physiologischen Haltepotential im TEVC-Experiment von -60 mV hatte demnach keinerlei Auswirkung auf die P2X₂ Rezeptorantwort.

Es wurde weiterführend untersucht, ob die Coexpression beider Proteine Auswirkungen auf die Strom-Spannungs-Relationen des P2X₂R hatte. Dazu wurden IV-Kennlinien von Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden und P2X₂R exprimierenden (Kontroll-) Oozyten bei halbmaximaler Rezeptoraktivierung ($EC_{50} = 30 \mu$ M, Abb. 3.9) verglichen. Es wurden Spannungssprünge von -120 bis +60 mV ($\Delta = 10$ mV, Dauer jeweils 500 ms) angelegt und der dazugehörige Strom gemessen. Dieser wurde anschließend Leckstrom-korrigiert, d.h., der Rezeptorstrom in ATP-Abwesenheit („Leckstrom“) wurde von dem in ATP-Anwesenheit abgezogen, um den reinen Rezeptorstrom darzustellen.

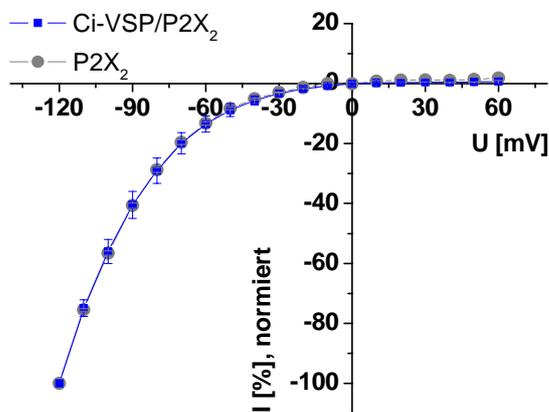


Abb. 3.9: IV-Beziehungen von P2X₂R exprimierenden (Kontrollen, ●) und Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten (■) in Anwesenheit von 30 μ M ATP. Es wurden Haltepotentiale von -120 bis +60 mV in Abständen von 10 mV (Dauer 500 ms) angelegt. Alle Messwerte wurden auf den Maximalstrom normiert, um die IV-Beziehungen vergleichbar zu machen. Es war kein Unterschied in der Spannungsabhängigkeit des P2X₂ Rezeptorstroms durch Coexpression von Ci-VSP zu erkennen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3).

3. Ergebnisse

Damit die IV-Kennlinien beider Versuchsgruppen besser zu vergleichen sind, wurden die Werte auf den Maximalwert normiert und gegeneinander aufgetragen. In den IV-Relationen konnte ebenfalls keinerlei Einfluss einer Ci-VSP Coexpression auf den P2X₂R festgestellt werden, die IV-Kennlinien der coexprimierenden und Kontroll-Oozyten waren identisch und zeigten das charakteristische, einwärts gleichrichtende Verhalten.

Um zu überprüfen, ob und in welcher Weise Ci-VSP die Expressionsrate des P2X₂R, sein *trafficking* zur Zellmembran oder die Offenwahrscheinlichkeit p_o des Rezeptors beeinflusst, wurden die initialen, ATP-vermittelten Rezeptorströme bei -60 mV in P2X₂ exprimierenden und coexprimierenden Oozyten miteinander verglichen (s. Abb. 3.10, TEVC). In diesen Messungen wurde ebenfalls keine Beeinflussung des P2X₂R durch eine Ci-VSP Coexpression beobachtet. Sowohl halb-maximale (30 μ M) als auch maximale (300 μ M) Rezeptoraktivierung erzielten in coexprimierenden und in P2X₂ (Kontroll-)Oozyten Rezeptorströme (s. Abb. 3.10), die sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Während mit 30 μ M in beiden Versuchsgruppen Rezeptorströme von 4 μ A gemessen wurden, lagen diese bei maximaler Rezeptoraktivierung bei 11 (Coexpression) bzw. 12 μ A (P2X₂R). Die elektrischen Kapazitäten der Oozytenmembranen in coexprimierenden und P2X₂R-exprimierenden Zellen unterschieden sich ebenfalls nicht voneinander (*nicht gezeigt*).

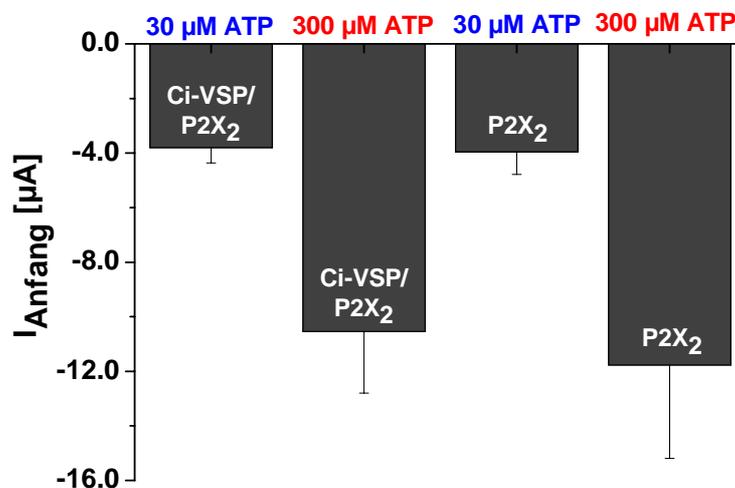


Abb 3.10: Auswirkungen der Ci-VSP Coexpression auf die initialen ATP-vermittelten P2X₂ Rezeptorströme im Vergleich zu P2X₂ exprimierenden Oozyten. ($V_m = -60$ mV) Eingesetzt wurden halb-maximale (30 μ M) und maximale (300 μ M) Aktivierungskonzentrationen. Die Ci-VSP Coexpression wirkte sich nicht auf die anfänglichen ATP-vermittelten Rezeptorantworten aus, die gemessenen Stromwerte lagen für beide getesteten ATP-Konzentration in vergleichbaren Dimensionen und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (jeweils $n = 10$; Mittelwerte \pm Standardfehler; *student's t-Test*, $p < 0,05$).

Der P2X₂R gilt als nicht oder nur gering desensibilisierend. Die Ausprägung eben jener Desensibilisierung, also der Abnahme des makroskopischen Rezeptorstroms bei lang anhaltender Agonisten-Applikation, ist mit sättigenden ATP-Konzentrationen stärker als mit halb-maximaler Rezeptoraktivierung. Jedoch kann auch mit 30 μ M ATP ein Rückgang des Stroms beobachtet werden, wenn der Agonist länger als 30 s appliziert wird. Im Zuge der hier

3. Ergebnisse

durchgeführten Untersuchungen zum potentiellen Einfluss der reinen Coexpression von Ci-VSP auf den P2X₂R wurde weiterhin untersucht, ob sich das Desensibilisierungsverhalten des Rezeptors unter Ci-VSP Coexpressionsbedingungen änderte. *Abb. 3.11* zeigt den Verlauf des P2X₂ Rezeptorstroms bei lang anhaltender ATP-Applikation (300 s) in Kontroll- und coexprimierenden Oozyten während halb-maximaler Rezeptoraktivierung. Es konnte kein Unterschied im Ausmaß der Depolarisation des Rezeptorstroms, lediglich die oben schon angesprochene, leichte Desensibilisierung, beobachtet werden. Die reine Coexpression beider Proteine wirkte sich demzufolge nicht auf das – ohnehin nur gering ausgeprägte – Desensibilisierungsverhalten des P2X₂R aus.

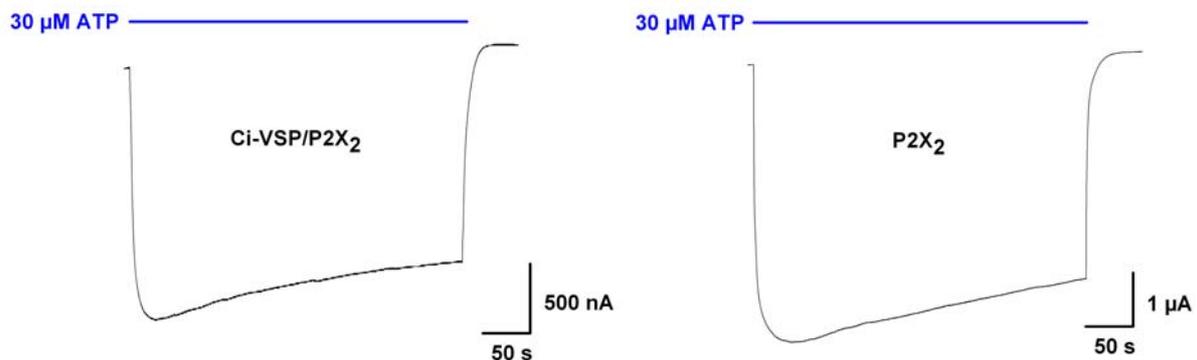


Abb 3.11: Desensibilisierungsverhalten des halb-maximalen P2X₂ Rezeptorstroms bei lang anhaltender Agonisten-Applikation in rein P2X₂ (*rechts*) und P2X₂/Ci-VSP coexprimierenden (*links*) Oozyten. (Dauer der ATP-Applikation: 300 s, ATP = 30 µM, V_m = -60 mV. Darstellung zweier beispielhafter Originalmessungen.) Die Ci-VSP Coexpression beeinflusste die Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptorstroms nicht, in beiden Versuchsgruppen war die Desensibilisierung gleich stark ausgeprägt.

Sämtliche hier dargestellten Experimente wurden bei physiologischen Haltepotentialen von -60 mV durchgeführt, bei diesen Werten ist Ci-VSP inaktiv. Somit kann zunächst festgehalten werden, dass die reine Coexpression von (inaktivem) Ci-VSP keinen Einfluss auf das Verhalten des P2X₂ Rezeptorstroms hatte, weder in seinem Dosis-Wirkungs-Verhalten in Bezug auf seinen physiologischen Agonisten ATP, noch auf die Strom-Spannungs-Relationen. Die initialen Stromamplituden der Rezeptorantworten blieben unter Ci-VSP Coexpressionsbedingungen ebenso unbeeinflusst, wie sein Desensibilisierungsverhalten bei permanenter ATP-Anwesenheit.

3.2.2 Herunterregulierung des ATP-vermittelten P2X₂Rezeptorstroms bei Ci-VSP-Aktivierung

Die intrazelluläre PI-Phosphatase des Ci-VSP Proteins wird durch Membrandepolarisation aktiviert [MURATA & OKAMURA, 2007]. In den ersten, grundlegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die reine Coexpression dieses Proteins mit dem P2X₂R keinerlei Auswirkungen auf die P2X₂ Rezeptorfunktion und Oberflächenexpression zeigte. Im Folgenden wurde der Einfluss des Ci-VSP Proteins nach Membrandepolarisation (Phosphatase-Aktivierung) auf die Rezeptorfunktion untersucht.

3. Ergebnisse

Als depolarisierende Membranpotentiale zur Ci-VSP-Aktivierung wurden in den folgenden, hier angewandten TEVC-Messungen 3 verschiedene Werte verwendet, **0, -20 und +20 mV**. Diese, und nicht deutlich höhere, wurden aus dem Grund ausgesucht, da MURATA und Kollegen [2005] zeigten, dass die spannungsabhängige Ci-VSP-Aktivität in GIRK2(Kir3.2)/Ci-VSP-Coexpressions-Studien bei Werten um $V_m = +20$ mV gesättigt war. Sie wiesen dies durch Sättigung der Kanalstrom-Verminderung der $PI_{4,5}P_2$ -sensitiven K^+ -Kanäle nach, wenn Ci-VSP mit diversen, depolarisierenden Membranpotentialen aktiviert wurde (s. Abb. 3.12). Dieser Befund steht im Gegensatz zur gefundenen Q/V -Relation (s. Abb. 3.7) von Ci-VSP, da im Bereich von +20 mV lediglich 10-15 % der gesamten Ladung seiner VS-Domäne bewegt werden. MURATA und Kollegen nennen dieses Phänomen „Spannungs-Lücke“ (*voltage gap*) und vermuten, dass diese in den intrinsischen Kopplungseigenschaften zwischen Ladungsbewegung der VS-Domäne und der Phosphatase-Domäne begründet ist.

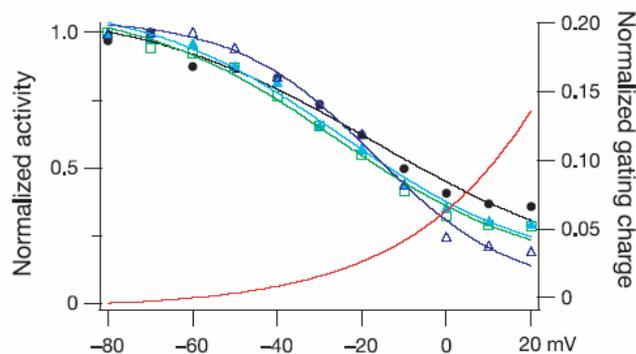


Abb. 3.12: Verminderung der GIRK2 (Kir3.2)-Aktivität in Ci-VSP coexprimierenden Oozyten mit zunehmender Stärke der Depolarisation zwischen den Testpuls. (aus [MURATA *et al.*, 2005]) Dargestellt sind die Spannungsabhängigkeiten von 4 einzelnen Messungen (*verschieden blaue Symbole u. Linien*). *rote Linie*: Q/V -Relationen von Ci-VSP, vgl. Abb. 3.7. Die Ci-VSP-Aktivität ist bei $V_m = +20$ mV gesättigt, wie die Sättigung des Kanalstrom-Rückgangs zeigt.

3.2.2.1 Depolarisation in Abwesenheit von ATP

Vorerst wurde ein potentieller Einfluss der Ci-VSP auf den $P2X_2R$ durch Depolarisation zeitlich vor der ATP-Applikation getestet. Dafür wurde zunächst der halb-maximale ATP-vermittelte Strom bei -60 mV aufgezeichnet, um diesen später mit dem Rezeptorstrom nach Depolarisation vergleichen zu können. Anschließend wurde Membran in Abwesenheit des Agonisten auf 0 mV depolarisiert. Nach 300 s Depolarisation wurde erneut der halb-maximale, ATP-vermittelte Strom bei -60 mV überprüft. Wie Abb. 3.13 zeigt, konnte keinerlei Einfluss einer Depolarisation auf den Rezeptorstrom in Ci-VSP/ $P2X_2R$ coexprimierenden Oozyten erkannt werden, wenn ATP-Applikation und Depolarisation zeitlich voneinander getrennt waren. Gleiches galt für den maximalen Rezeptorstrom, ausgelöst mit 300 μ M ATP (*nicht gezeigt*).

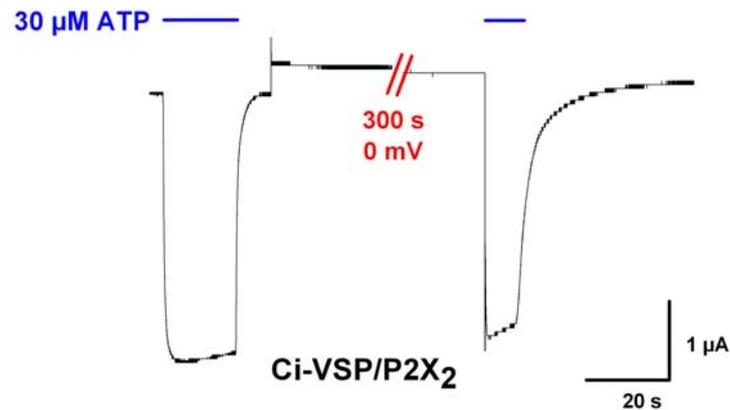


Abb. 3.13: Ci-VSP-Aktivierung in Abwesenheit von ATP hatte keinen Einfluss auf den P2X₂ Rezeptorstrom: Originalmessung der halb-maximalen Rezeptorströme von Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten vor und nach einer 300 s anhaltenden Membrandepolarisation auf 0 mV, die in Abwesenheit des Agonisten durchgeführt wurde. Der ATP-vermittelte Rezeptorstrom bei -60 mV nach 300 s Depolarisation zeigte keine Beeinflussung seiner Größe.

3.2.2.2 Depolarisation in Anwesenheit von ATP: Messprotokoll

Die Ci-VSP(-Phosphatase) ist lediglich bei depolarisierenden Membranpotentialen aktiv, ein hinreichend großer P2X₂ Rezeptorstrom kann aufgrund seiner einwärts gleichrichtenden Eigenschaft (vgl. Abb. 3.4.a) und seines Umkehrpotentials ($U_{rev} = -20$ mV) indes nur bei negativeren Potentialen (-60 bis -80 mV; im TEVC-Experiment üblicherweise -60 mV) beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurde ein Messprotokoll verwendet, in dem zwischen länger andauernden, depolarisierenden Haltepotentialen und einem physiologischen Potential von -60 mV alternierend gemessen wurde. Das letztendlich verwendete Messprotokoll ist Abb. 3.14.a zu entnehmen.

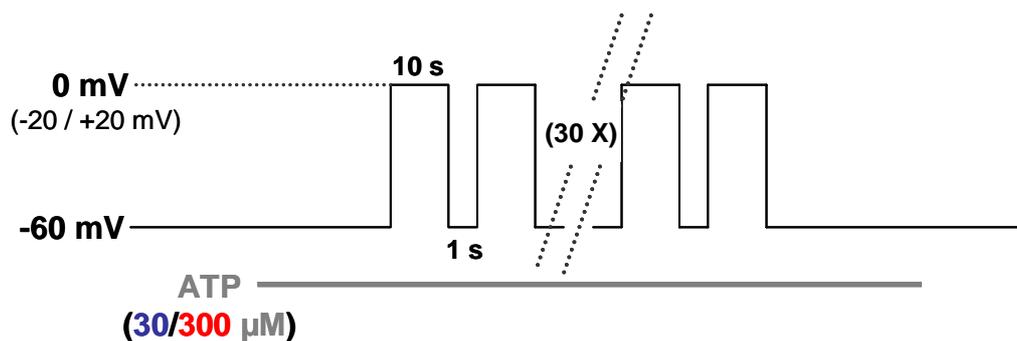


Abb. 3.14.a: TEVC-Spannungsprotokoll zur Messung des herunterregulierenden Effekts der Ci-VSP-Aktivität auf P2X₂ Rezeptorströme: Das anfängliche Haltepotential betrug -60 mV, es wurde zunächst der ATP-vermittelte Rezeptorstrom bei -60 mV gemessen (halb-max. (30 µM) oder max. (300 µM)). Anschließend wurde, in Anwesenheit von ATP, das Haltepotential 300 s lang auf 0 mV (bzw. -20 und +20 mV) depolarisiert, um die Ci-VS-Phosphatase zu aktivieren. Während dieser Depolarisation wurde in 10 s-Abständen der verbleibende, ATP-vermittelte Strom bei -60 mV gemessen, um den Verlauf des Rezeptorstroms während der Messung aufzuzeichnen. Am Ende der Messung wurde der ATP-vermittelte Rezeptorstrom für 20 s bei -60 mV aufgezeichnet, bevor das ATP aus der Badlösung entfernt und der „Leckstrom“ überprüft wurde.

3. Ergebnisse

Abb. 3.14.b zeigt dementsprechend beispielhaft originale Messwerte (P2X₂ Rezeptorströme) nach Anwendung des oben beschriebenen und in Abb. 3.14.a erläuterten Messprotokolls für eine Ci-VSP/P2X₂ coexprimierende Oozyte und depolarisierenden Spannungssprüngen auf 0 mV bei halb-maximaler Rezeptoraktivierung.

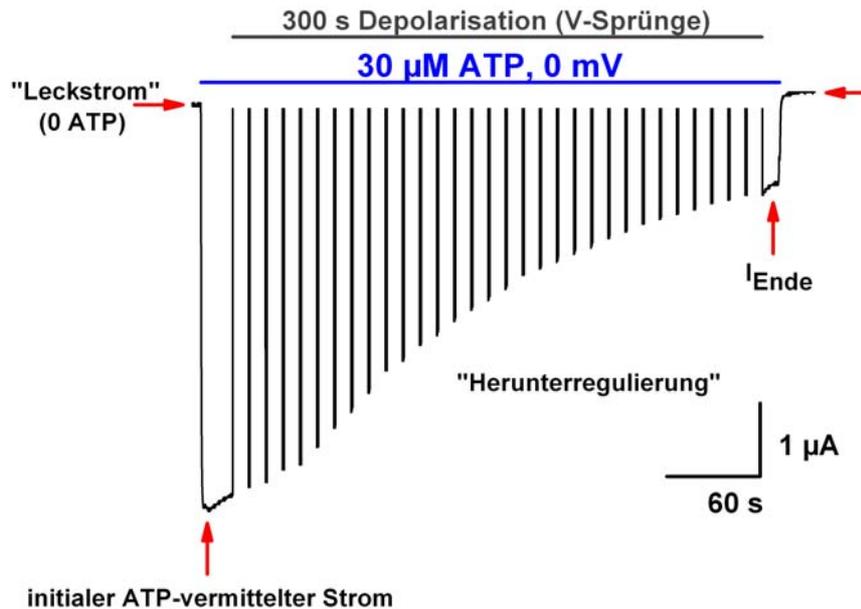


Abb 3.14.b: Beispiel einer Originalmessung im TEVC-Experiment nach Anlegen des in Abb. 3.14.a erläuterten Messprotokolls (Ci-VSP/P2X₂R coexprimierende Oozyte, Depolarisation auf 0 mV, ATP-Konzentration 30 µM). Man erkennt den initialen ATP-vermittelten Rezeptorstrom, der im Verlauf der Messung durch Ci-VSP-Aktivierung deutlich herunterreguliert wurde (s. I_{Ende}). Nicht zu sehen sind die kapazitiven Ströme, die aus den Spannungssprüngen resultierten.

3.2.2.3 Der „Ci-VSP-Effekt“

Coexpression und anschließende Aktivierung der Ci-VSP in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Zellen mithilfe des oben beschriebenen Messprotokolls führte zu einer hochsignifikanten Abnahme des halb-maximalen, ATP-vermittelten P2X₂ Rezeptorstroms bei -60 mV. Die Messungen wurden zunächst mit einem depolarisierenden Haltepotential von 0 mV (mit periodischem Wechsel zu -60 mV) durchgeführt. Der initial gemessene, ATP-vermittelte Rezeptorstrom nahm innerhalb von 5 min in Antwort auf die Depolarisation um ca. 2/3 des Anfangswertes (70-80 %) ab, wie es in den Original-Stromspuren der Messungen beispielhaft in Abb. 3.15.a und in der Zusammenfassung der Messungen in Abb 3.15.b zu sehen ist. Der Verlauf der Abnahme des Rezeptorstroms zeigte annähernd eine Sättigungskinetik, d. h. nach ca. 5 min erreichte der verbliebene Rezeptorstrom ein Plateau.

Kontroll-Zellen (nur P2X₂R exprimierend) zeigten unter gleicher Behandlung ein völlig anderes Verhalten, der Rezeptorstrom blieb von Membrandepolarisationen auf 0 mV in Anwesenheit von 30 µM ATP unbeeinflusst.

3. Ergebnisse

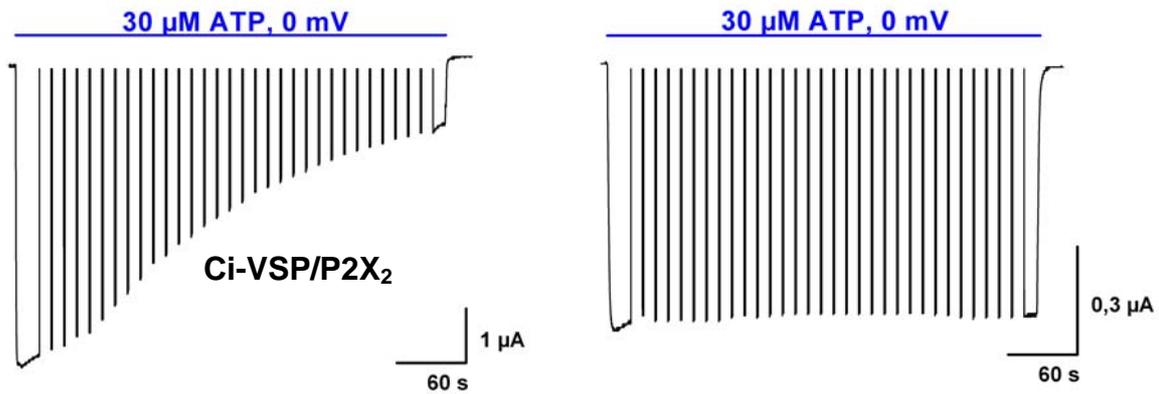


Abb 3.15.a: Original-Stromspuren aus TEVC-Messungen zur Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch Ci-VSP-Aktivierung nach Depolarisation auf 0 mV in Anwesenheit von 30 μM (EC₅₀) ATP. *Links:* Ci-VSP/P2X₂ coexprimierende Zelle, *rechts:* P2X₂R exprimierende Zelle (Kontrolle). (Erläuterungen s. Text, vgl. Abb. 3.14.a und b). Der P2X₂ Rezeptorstrom wurde durch die Aktivierung der Ci-VSP im Gegensatz zu Kontroll-Zellen deutlich vermindert.

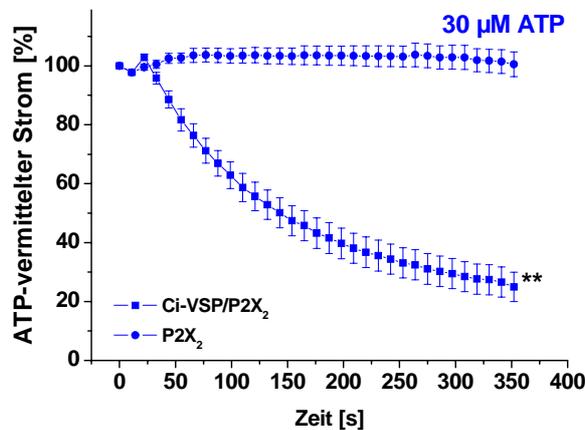


Abb. 3.15.b: Der „Ci-VSP-Effekt“: Herunterregulierung des ATP-vermittelten P2X₂ Rezeptorstroms nach Ci-VSP-Aktivierung durch Membrandepolarisation auf 0 mV. Dargestellt ist die Entwicklung des halb-maximalen Rezeptorstroms mit der Zeit in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden (■, n = 18) und Kontroll-(P2X₂)-Oozyten (●, n = 8). Mittelwerte ± Standardfehler, ** student's t-Test, p < 0,01.

3.2.2.4 Beteiligung der Ci-VS-Phosphatase am „Ci-VSP-Effekt“

Um diesen „Ci-VSP-Effekt“ näher zu untersuchen und die Rolle der intrazellulären Ci-VS-Phosphatase zu klären, wurde das Depolarisations-Messprotokoll an Oozyten durchgeführt, die neben des P2X₂R die Ci-VSP-Punktmutante C363S coexprimierten, deren Phosphatase-Aktivität nicht mehr vorhanden ist [MURATA *et al.*, 2005] und die freundlicherweise von Prof. T. Friedrich (TU Berlin) zur Verfügung gestellt wurde. Die erfolgreiche Expression dieses „defekten“ Ci-VSP-Proteins in Oozyten wurde, wie unter 3.2.1 beschrieben, mithilfe der Überprüfung der Tor-/gating-Ströme untersucht. Abb. 3.16 zeigt die Entwicklungen der P2X₂ Rezeptorströme in Ci-VSP-C363S/P2X₂R coexprimierenden Oozyten nach Anwendung des Depolarisations-Messprotokolls (Depolarisation auf 0 mV) im Vergleich zu Kontroll-Zellen (P2X₂R exprimierend), die sich weder bei maximaler noch bei halb-maximaler

3. Ergebnisse

Rezeptoraktivierung voneinander unterschieden. In beiden Versuchsgruppen konnte bei halb-maximaler Rezeptoraktivierung keine Abnahme des Rezeptorstroms beobachtet werden, bei maximaler Aktivierung lediglich eine leichte, intrinsische Desensibilisierung.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit Wildtyp-(wt)-Ci-VSP coexprimierenden Oozyten kann der *Abb. 3.16 (rechts)* entnommen werden. Während die intakte Phosphatase in der Lage war, unter depolarisierenden Bedingungen den ATP-vermittelten P2X₂ Rezeptorstrom innerhalb weniger Minuten hochsignifikant zu beeinflussen, blieb dieser Effekt mit dem mutierten Protein aus.

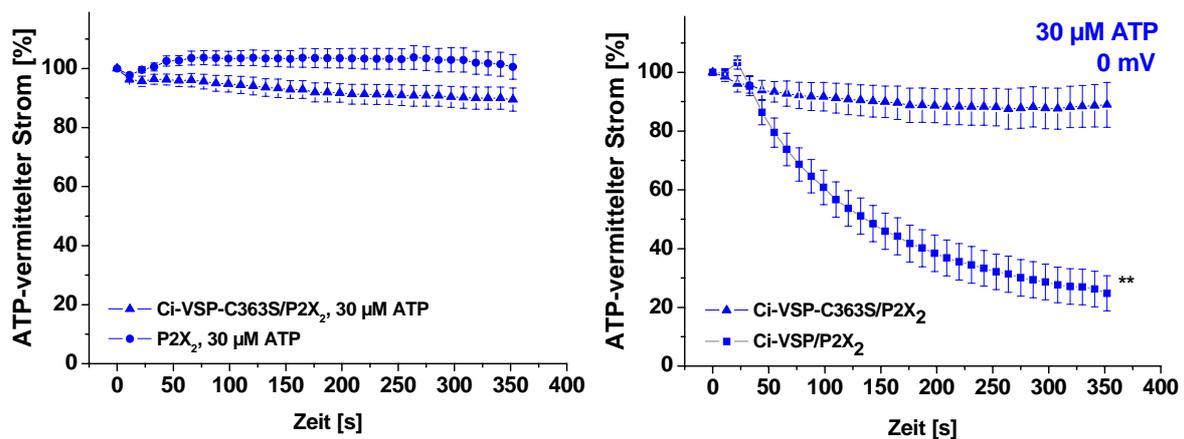


Abb 3.16: Die Beteiligung der PI-Phosphatase des Ci-VSP-Proteins am „Ci-VSP-Effekt“: Coexpression der Phosphatase-defizienten Ci-VSP-Mutante C363S (▲) mit dem P2X₂R verhinderte den „Ci-VSP-Effekt“, der P2X₂ Rezeptorstrom wurde nicht durch Depolarisation auf 0 mV herunterreguliert. **Links:** die Rezeptorströme der C363S-coexprimierenden Oozyten verhielten sich wie die der Kontroll-Oozyten (P2X₂R exprimierende Oozyten (●)), sowohl bei halb-maximaler (30 μM ATP) als auch maximaler (300 μM ATP, nicht gezeigt) Rezeptoraktivierung, n = 6. **Rechts:** Vergleich der zeitlichen Verläufe der halb-maximalen Rezeptorströme in coexprimierenden Oozyten (wt-Ci-VSP und Ci-VSP-C363S) bei einem Membranpotential von 0 mV. Die Phosphatase-defiziente Mutante (▲, n = 10) zeigte keinerlei Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms im Vergleich zum Wildtyp (■, n = 8; Mittelwerte ± Standardfehler, ** student's t-Test, p < 0,01).

Ein anderer Versuchsansatz war die Inhibition der Wildtyp-Ci-VS-Phosphatase durch Phenylarsenoxid (PAO), ein Phosphatase-Inhibitor [DECKERT *et al.*, 1994], dem die Oozyten 1 Stunde vor der Messung in einer Konzentration von 50 μM ([TONG *et al.*, 2001] in ORI+Ca²⁺, IC₅₀ = 18 μM [PELASSY *et al.*, 2000]) ausgesetzt wurden. Die Inkubation fand bei 11°C statt, da sich diese Temperatur als optimal für eine PAO-Behandlung von Oozyten herausstellte (Y. BHARGAVA, *persönliche Mitteilung*). War die Temperatur zu hoch, verloren die Oozytenmembranen aufgrund der recht hohen PAO-Konzentration oft ihre Integrität, was eine Messung unmöglich machte. Nach dieser Inkubation wurde sowohl mit coexprimierenden als auch mit Kontroll-Zellen das Depolarisations-Messprotokoll angewandt, das verwendete Potential betrug 0 mV, die eingesetzte Agonistenkonzentration war sättigend (300 μM ATP).

3. Ergebnisse

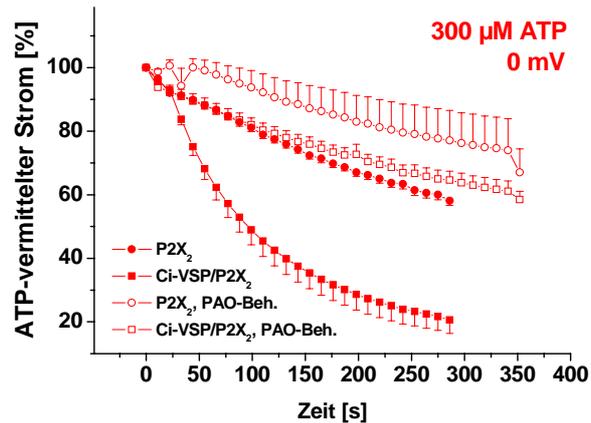


Abb. 3.17: Phenylarsenoxid (PAO) hob den „Ci-VSP-Effekt“ auf. Inhibition der Ci-VSP durch vorangehende 1-stündige Inkubation in 50 μM PAO ließ die Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms in coexprimierenden Oozyten verschwinden (\square). Die Kontroll-Zellen (P2X₂, \bullet) zeigten eine leichte Abnahme der intrinsischen Desensibilisierung, jedoch unterschieden sich die Werte beider Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 7$; *student's t-Test*, $p < 0,05$).

Die Inhibition der Ci-VS-Phosphatase durch die PAO-Behandlung unterdrückte ebenfalls den „Ci-VSP-Effekt“. Es konnte keine Herunterregulierung des ATP-vermittelten Rezeptorstroms nach Depolarisation mehr beobachtet werden, der Strom der coexprimierenden Zellen verhielt sich wie der der Kontroll-Zellen (s. Abb. 3.17). Diese zeigten im Mittel eine leicht verminderte Desensibilisierung ihres Rezeptorstroms im Vergleich zu nicht PAO-behandelten Oozyten, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

3.2.2.5 Spannungsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“

Das oben beschriebene Depolarisations-Messprotokoll wurde, wie eingangs schon erwähnt, nicht nur mit einem depolarisierenden Haltepotential von 0 mV durchgeführt, sondern auch mit folgenden anderen Potentialen: -100 mV, -40 mV, -20 mV und +20 mV.

Hyperpolarisation der Oozytenmembran auf -100 mV veränderte den ATP-vermittelten Rezeptorstrom bei -60 mV in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten nicht, lediglich konnte eine Stromzunahme während der Hyperpolarisation beobachtet werden, die auf die einwärts gleichrichtenden Eigenschaften (Spannungsabhängigkeit) dieses Rezeptors zurückzuführen war, keinesfalls jedoch auf die Anwesenheit von Ci-VSP, da dieses Verhalten sowohl in coexprimierenden als auch in Kontroll-Zellen zu beobachten war. Depolarisation auf -40 mV hatte ebenfalls keinerlei Effekt auf den Rezeptorstrom, wie es mit stärkeren depolarisierenden Haltepotentialen zu sehen war (*beides nicht gezeigt*).

Abb. 3.18 – 3.20 zeigen die Ergebnisse der unter 3.2.2.2 erläuterten „Ci-VSP-Effekt“-Messungen bei Haltepotentialen von -20 und +20 mV.

Man kann – sowohl in den Original-Stromspuren (Abb. 3.18.a und Abb. 3.19.a) als auch in den statistischen Auswertungen (Abb. 3.18.b und Abb. 3.19.b) - erkennen, dass der sog. „Ci-VSP-Effekt“ am stärksten bei einem Potential von +20 mV ausgeprägt war. Während bei

3. Ergebnisse

einem depolarisierenden Membranpotential von -20 mV der $P2X_2$ Rezeptorstrom lediglich auf die Hälfte der initialen Rezeptorantwort abfiel (Abb. 3.18 und 3.20) verschwand er bei einer starken Depolarisation auf $+20$ mV nahezu vollständig (Rückgang auf 5 %, Abb. 3.19 und 3.20). In beiden Versuchsreihen (-20 mV und $+20$ mV) waren die Rezeptorströme unter Coexpressions-Bedingungen im Vergleich zu den $P2X_2R$ exprimierenden Oozyten (Kontrolle) hochsignifikant verringert, wie es die statistische Auswertung zeigt.

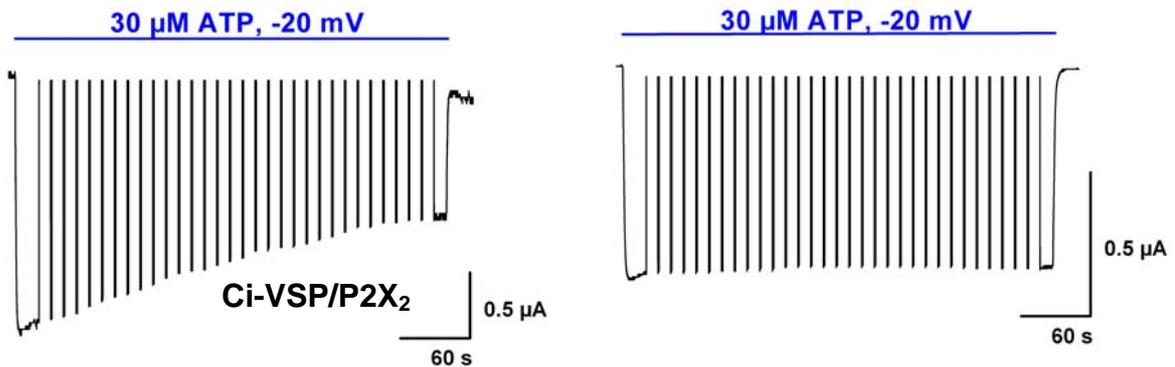


Abb 3.18.a: Original-Stromspuren aus TEVC-Messungen zur Herunterregulierung des $P2X_2$ Rezeptorstroms durch Ci-VSP-Aktivierung nach Depolarisation auf -20 mV in Anwesenheit von $30 \mu\text{M}$ (EC_{50}) ATP. Links: Ci-VSP/ $P2X_2$ coexprimierende Zelle, rechts: $P2X_2R$ exprimierende Zelle (Kontrolle). Mit Membranpotentialen vom -20 mV war der „Ci-VSP-Effekt“ schwächer ausgeprägt als mit stärkeren Depolarisationen (vgl. Abb. 3.19 und 3.15).

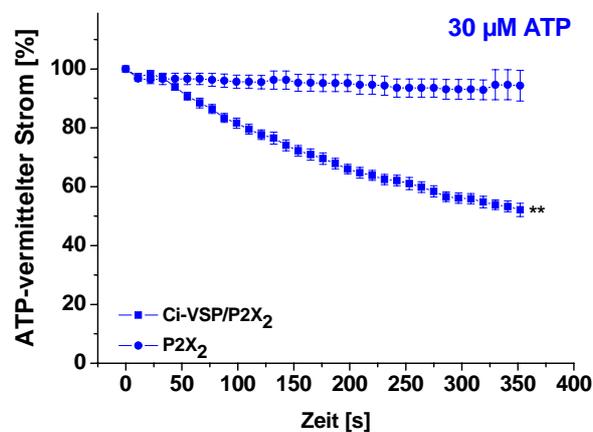


Abb. 3.18.b: Herunterregulierung des ATP-vermittelten $P2X_2$ Rezeptorstroms nach Ci-VSP-Aktivierung durch Membrandepolarisation auf -20 mV. Dargestellt ist die Entwicklung des halbmaximalen Rezeptorstroms mit der Zeit in Ci-VSP/ $P2X_2R$ coexprimierenden (\blacksquare , $n = 6$) und Kontroll- ($P2X_2$)-Oozyten (\bullet , $n = 7$). Mit -20 mV war die Herunterregulierung des Rezeptorstroms schwächer als in Messungen mit 0 mV, vgl. Abb. 3.15 (Mittelwerte \pm Standardfehler, ** student's t-Test, $p < 0,01$).

Wie auch während der Messungen mit Depolarisationen auf 0 mV zeigten die Kontroll-Oozyten hier keinerlei Beeinflussung ihres Rezeptorstroms durch die 5-minütige Membranpotential-Veränderung. In einigen Zellen konnte die von Zelle zu Zelle variierende, natürliche und nur gering ausgeprägte Desensibilisierung erkannt werden (z. B. Abb. 3.19.a), bei der es sich im Durchschnitt nur um eine Abnahme von wenigen Prozent des initialen Rezeptorstroms handelte (s. Abb. 3.18.b und Abb. 3.19.b).

3. Ergebnisse

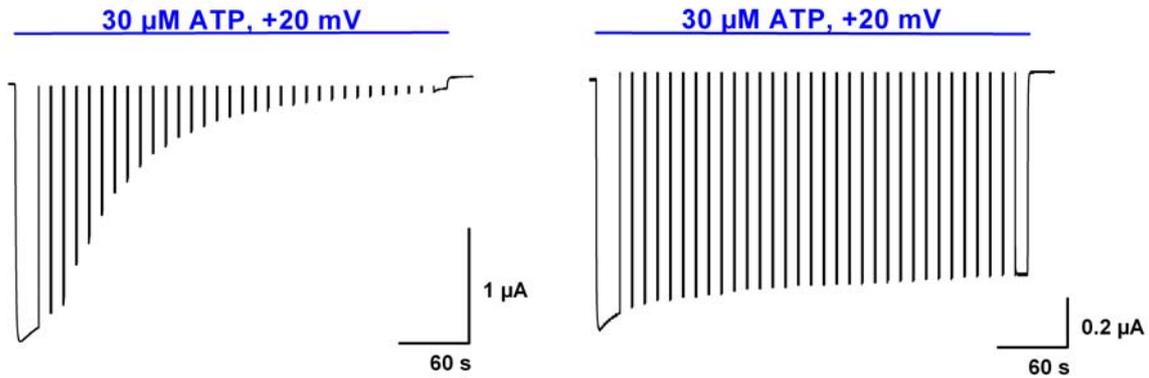


Abb 3.19.a: Original-Stromspuren aus TEVC-Messungen zur Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch Ci-VSP-Aktivierung nach Depolarisation auf +20 mV in Anwesenheit von 30 μM ATP. *Links:* Ci-VSP/P2X₂ coexprimierende Zelle, *rechts:* P2X₂R exprimierende Zelle (Kontrolle). Mit einem Membranpotential von +20 mV war die Herunterregulierung des Rezeptorstroms durch die Ci-VSP am deutlichsten ausgeprägt (vgl. Abb. 3.18 und 3.15).

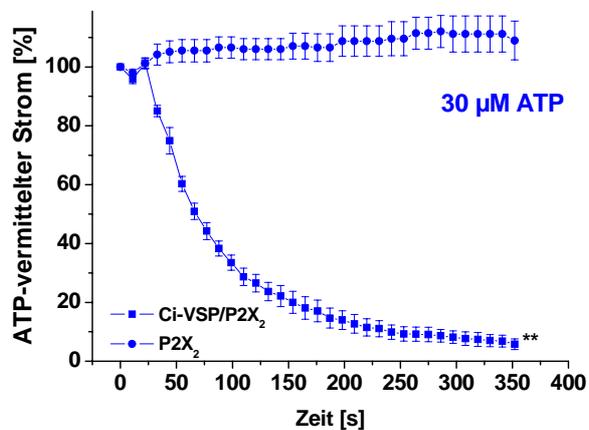


Abb. 3.19.b: Herunterregulierung des ATP-vermittelten P2X₂ Rezeptorstroms nach Ci-VSP-Aktivierung durch Membrandepolarisation auf +20 mV. Dargestellt ist die Entwicklung des halb-maximalen (30 μM ATP) Rezeptorstroms mit der Zeit in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden (■, n = 6) und Kontroll-(P2X₂)-Oozyten (●, n = 6). Aktivierung der Ci-VSP mit +20 mV regulierte den Rezeptorstrom stärker herunter als in Messungen mit -20 und 0 mV, vgl. Abb. 3.15 (Mittelwerte ± Standardfehler, ** student's t-Test, p < 0,01).

Nach Vergleich der vorangegangenen Messungen, in denen ein Membranpotential von 0 mV angelegt wurde (s. Abb. 3.15, Rückgang des Rezeptorstroms auf ca. 30 %), mit den hier durchgeführten, veränderten Membranpotentialen zeigte sich, dass der „Ci-VSP“-Effekt deutlich spannungsabhängig war. Er nahm mit der Stärke der Depolarisation zu, sowohl im Zeitverlauf als auch in der Stärke der Stromabnahme des P2X₂ Rezeptors. Eine Zusammenfassung dieser Messungen zur Spannungsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“ kann der Abb. 3.20 entnommen werden. Dargestellt sind die Verläufe der halb-maximalen Rezeptorströme (30 μM) unter verschieden starken Depolarisationen.

3. Ergebnisse

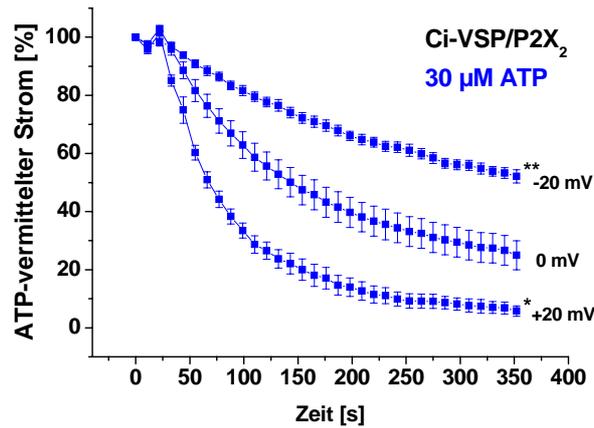


Abb. 3.20: Spannungsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“ auf den halb-maximalen P2X₂ Rezeptorstrom. Die Graphen zeigen die Zusammenfassung der zeitlichen Verläufe der Rezeptorströme während der 300 s andauernden Depolarisation auf verschiedene Haltepotentiale bei halb-maximaler Rezeptoraktivierung (30 μ M). Die unterschiedlich starken Depolarisationen riefen unterschiedlich starke „Ci-VSP-Effekte“ hervor, die sich signifikant ($p < 0,05$) bzw. hoch-signifikant ($p < 0,01$) vom Ergebnis einer intermediären Depolarisation auf 0 mV unterschieden und die mit zunehmender Depolarisation stärker wurden (Mittelwerte \pm Standardfehler, */** student's t-Test).

3.2.2.6 ATP-Konzentrationsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“

Nachdem – wie vorangehend erläutert – eine Spannungsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“ bei halb-maximaler Rezeptoraktivierung festgestellt werden konnte, wurde weitergehend untersucht, wie sich die Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch die Ci-VSP unter maximaler Rezeptoraktivierung, d. h. sättigenden ATP-Konzentrationen verhielt. Für diese Zwecke wurde das unter 3.2.2.2 beschriebene Depolarisations-Messprotokoll mit Haltepotentialen von -20, 0 und +20 mV verwendet, die ATP-Konzentration betrug 300 μ M.

Abb. 3.21.a zeigt die Original-Stromspuren von Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden (*links*) und Kontroll-Oozyten (*rechts*), korrespondierend zu den in den Abb. 3.15.a, 3.18.a und 3.19.a. gezeigten Original-Daten. Auch in diesen Messungen mit maximaler Rezeptoraktivierung war eine deutliche Herunterregulierung des P2X₂R durch die Ci-VSP zu beobachten, die in Kontroll-Oozyten nicht auftrat. Diese blieben durch eine Membrandepolarisation unbeeinflusst. Lediglich war in diesen Zellen zu erkennen, dass die intrinsische Rezeptor-Desensibilisierung mit sättigenden ATP-Konzentrationen stärker ausgeprägt war, was jedoch nicht auf die Membrandepolarisationen zurückgeführt werden konnte. Es handelte sich, wie oben bereits dargelegt, um eine natürliche Rezeptoreigenschaft, die von Zelle zu Zelle variiert und mit sättigenden Agonisten-Konzentrationen stärker ausgeprägt ist als mit halb-maximalen (vgl. Messungen in 3.2.2.5).

3. Ergebnisse

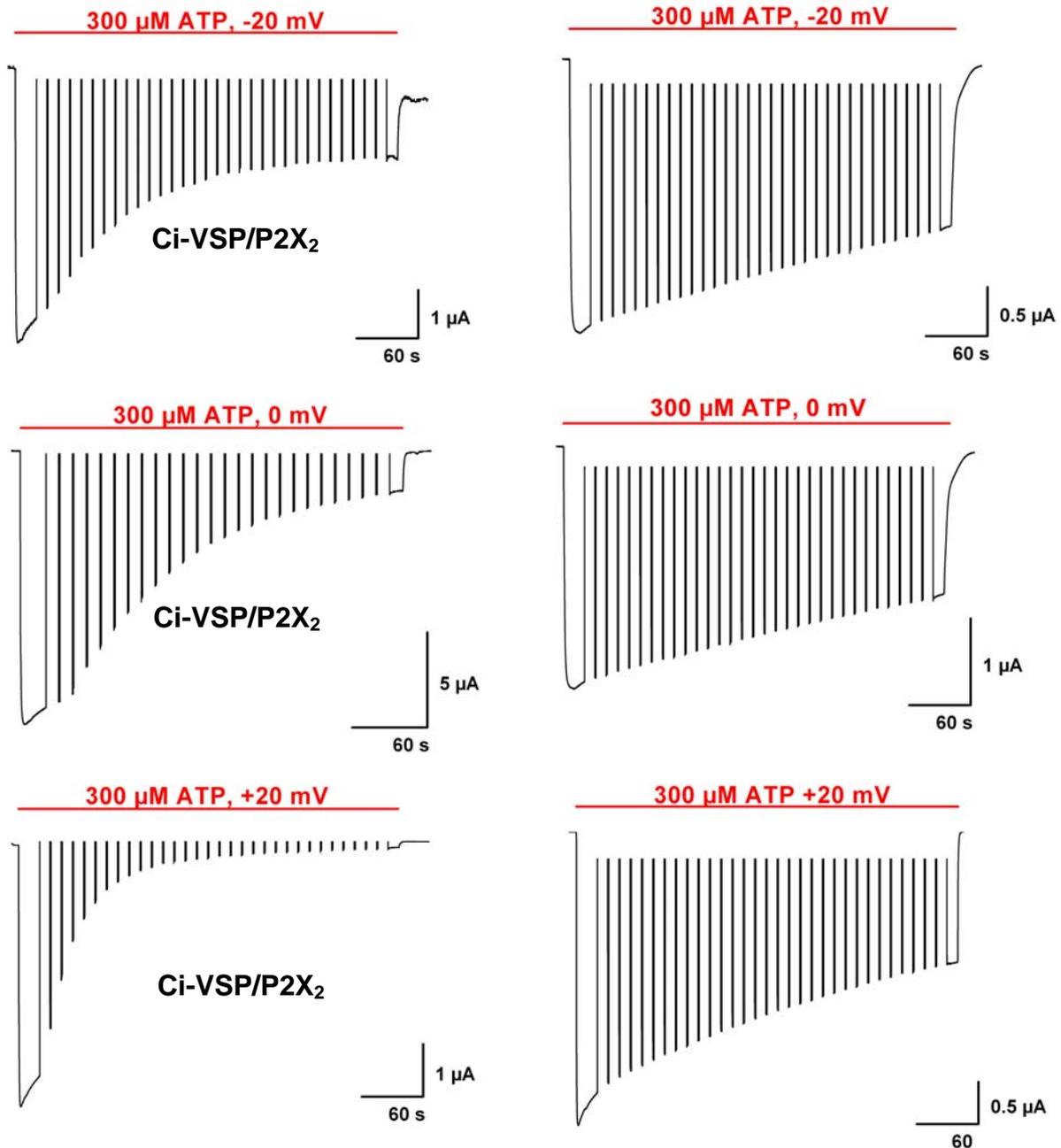


Abb. 3.21.a: Original-Stromspuren aus Messungen zur Konzentrations- und Spannungsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“ auf den P2X₂R. Links: Ci-VSP/P2X₂R coexprimierende Oozyten, rechts: P2X₂R exprimierende (Kontroll-)Oozyten. Die eingesetzte ATP-Konzentration betrug 300 μM (vgl. 3.2.2.2 und 3.2.2.5). Die angelegten, depolarisierenden Membranpotentiale betragen -20 mV (*oben*), 0 mV (*mittig*) und +20 mV (*unten*). Die coexprimierenden Oozyten zeigten eine deutliche Herunterregulierung ihres maximalen Rezeptorstroms nach Ci-VSP-Aktivierung, diese war in den Kontroll-Zellen nicht zu erkennen. Zudem war dieser „Ci-VSP-Effekt“ ebenso spannungsabhängig wie mit halb-maximaler Rezeptoraktivierung.

Die statistische Auswertung dieser Messreihen ist in den Abbildungen in *Abb. 3.21.b* zu finden. A-C zeigen die Verläufe der „Ci-VSP-Effekte“ auf die maximalen Rezeptorströme bei unterschiedlich starker Depolarisation im Vergleich zu den jeweils entsprechenden Kontroll-Oozyten. In allen Messungen unterschieden sich die „I_{Ende}-Werte“ der coexprimierenden Oozyten hochsignifikant von denen der Kontrollgruppen. Zudem konnte die gleiche

3. Ergebnisse

Spannungsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“ wie mit 30 μM ATP gemessen werden: während mit -20 mV der Rezeptorstrom um *ca.* 70 % bei Ci-VSP-Aktivität abnahm, sank er bei 0 mV um *ca.* 80 % und mit +20 mV um *ca.* 97 % ab, verschwand demnach also fast vollständig (Abb. 3.21.b D).

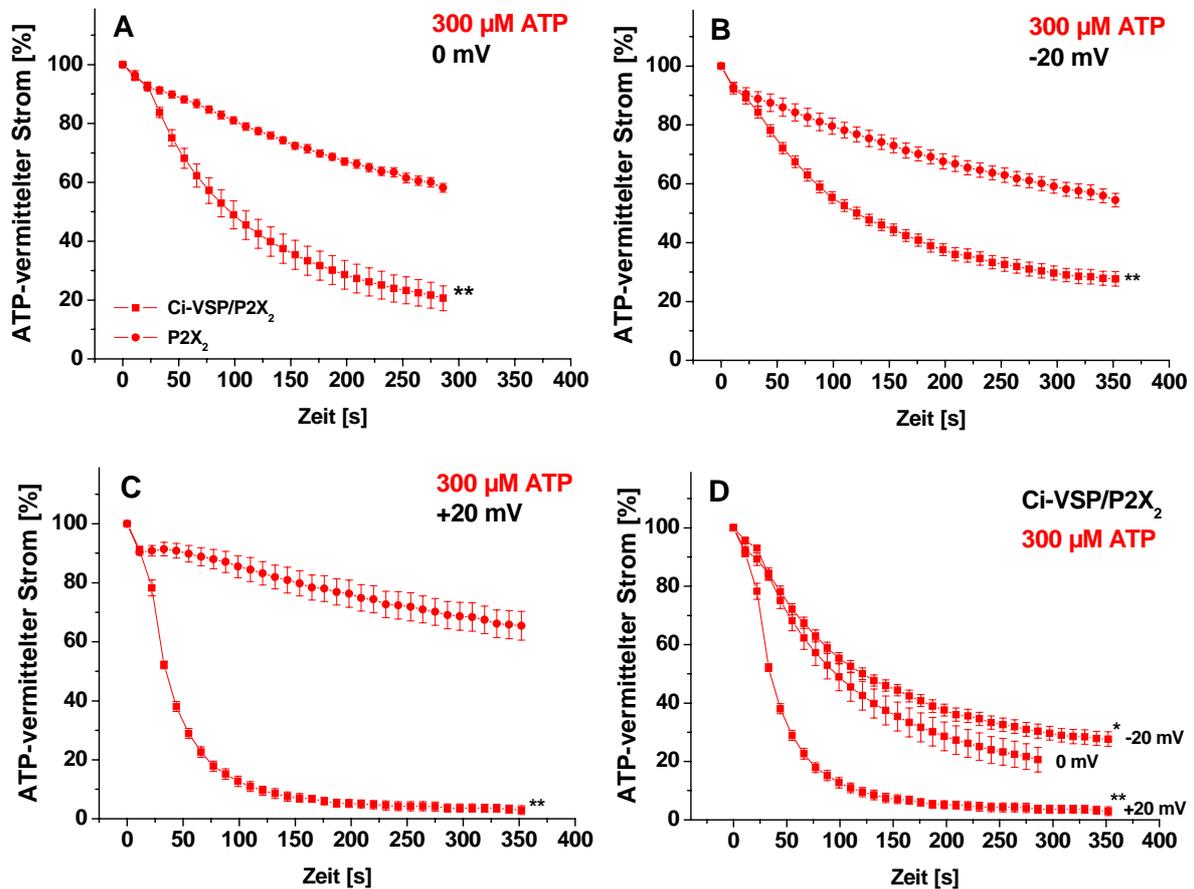


Abb. 3.21.b: Herunterregulierung des ATP-vermittelten, maximalen P2X₂ Rezeptorstroms nach Ci-VSP-Aktivierung durch verschieden starke Membrandepolarisationen. **A-C:** Dargestellt sind die Entwicklungen der Rezeptorströme mit der Zeit in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden (■) und Kontroll-(P2X₂)-Oozyten (●) bei unterschiedlichen V_m (**A:** 0 mV (n = 10 bzw. 5); **B:** -20 mV (n = 7 bzw. 6); **C:** +20 mV (n = 6)), die sich jeweils hochsignifikant voneinander unterschieden (** *student's t-test*, $p < 0,01$). **D:** Spannungsabhängigkeit des „Ci-VSP-Effekts“ auf den maximalen P2X₂ Rezeptorstrom. Aktivierung der Ci-VSP mit +20 mV regulierte den Rezeptorstrom stärker herunter als in Messungen mit -20 und 0 mV (Mittelwerte \pm Standardfehler, */** *student's t-Test*, vgl. Abb. 3.20).

Zunächst schien es – vergleicht man die Ergebnisse dieser Messungen mit den Ergebnissen aus Messungen mit halb-maximaler Rezeptoraktivierung -, dass der Effekt der Ci-VSP-Aktivierung auf den maximalen P2X₂R-Strom höher als auf den halb-maximalen Rezeptorstrom war. Jedoch zeigte sich nach Berücksichtigung der rezeptor-eigenen Desensibilisierung bei maximaler Aktivierung des P2X₂R in Kontroll-Oozyten, dass es keinerlei Unterschiede in der Stärke des „Ci-VSP-Effekts“ auf den P2X₂R bezüglich der Agonisten-Konzentration gab. Hierfür wurden die Ergebnisse der Messungen mit coexprimierenden Zellen auf die jeweiligen Werte der Kontroll-Zellen normiert ($I_{\text{Ci-VSP/P2X}_2}/I_{\text{P2X}_2}$), bzw. sozusagen „Desensibilisierungs-bereinigt“. Die Abbildungen in

3. Ergebnisse

Abb. 3.22 A-C zeigen eine Übersicht über die Auftragungen dieser normierten Verläufe des „Ci-VSP-Effekts“ unter verschieden starken Depolarisationen und unterschiedlich starker Rezeptoraktivierung.

Somit kann abschließend festgehalten werden, dass die Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch die Ci-VSP nicht abhängig von der eingesetzten Agonistenkonzentration war. Die Spannungsabhängigkeit dieses Effekts war jedoch sowohl mit halbmaximaler als auch mit maximaler Rezeptoraktivierung vorhanden.

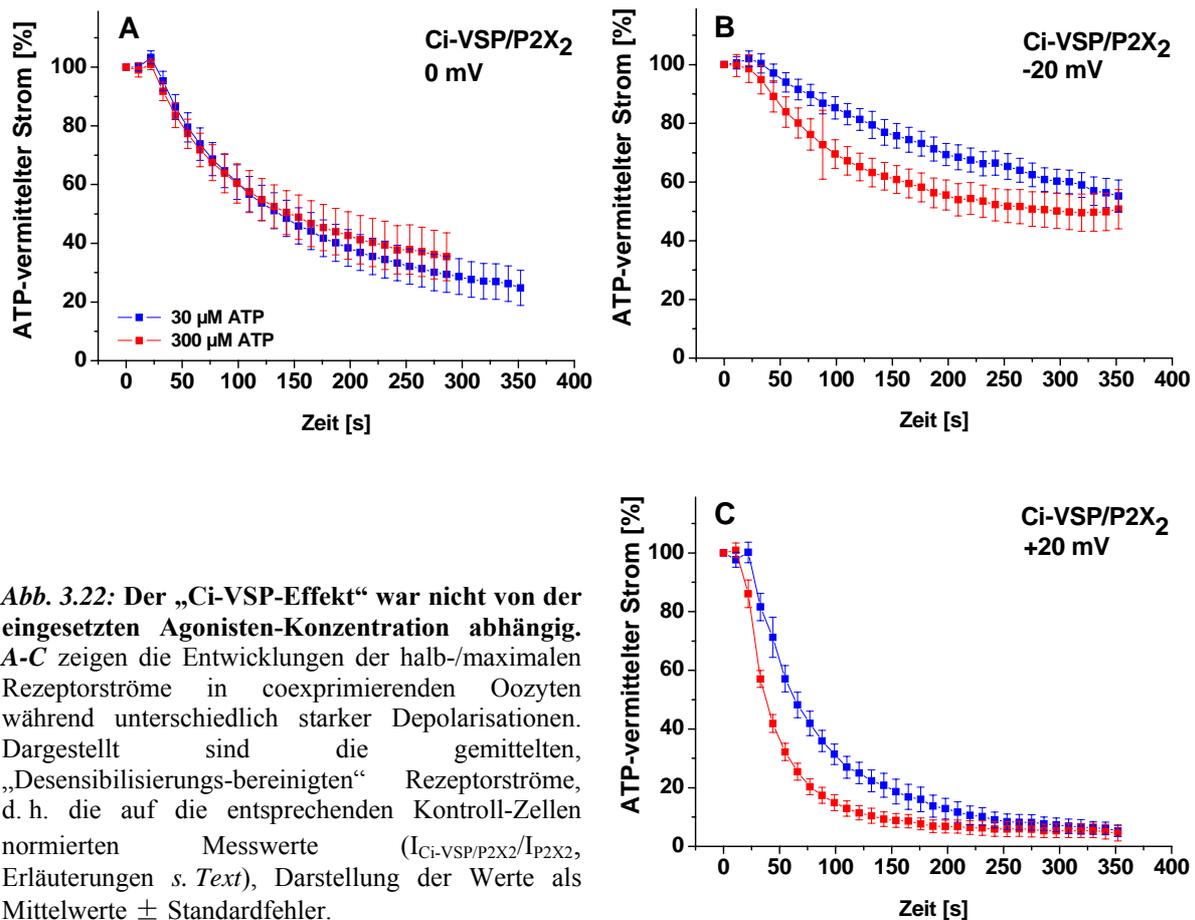


Abb. 3.22: Der „Ci-VSP-Effekt“ war nicht von der eingesetzten Agonistenkonzentration abhängig. A-C zeigen die Entwicklungen der halb-/maximalen Rezeptorströme in coexprimierenden Oozyten während unterschiedlich starker Depolarisationen. Dargestellt sind die gemittelten, „Desensibilisierungs-bereinigten“ Rezeptorströme, d. h. die auf die entsprechenden Kontroll-Zellen normierten Messwerte ($I_{\text{Ci-VSP/P2X}_2}/I_{\text{P2X}_2}$, Erläuterungen s. Text), Darstellung der Werte als Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.2.2.7 weitere Charakteristika des „Ci-VSP-Effekts“

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch die Ci-VSP spannungs- aber nicht ATP-Konzentrationsabhängig war, wurden weitere Eigenschaften dieses „Ci-VSP-Effekts“ untersucht. Des Weiteren wurde geprüft, ob die Größe des initialen, ATP-vermittelten Rezeptorstroms die Stärke des „Ci-VSP-Effekts“ beeinflusste. Die anfänglich ermittelten P2X₂ Rezeptorströme (s. Abb. 3.14.b) wurden hierfür den entsprechend nach 300 s Depolarisation auf 0 mV ermittelten, verbliebenen und normierten Rezeptorströmen („I_{Ende}“, s. Abb. 3.14.b; Normierung: $I_{\text{Ci-VSP/P2X}_2}/I_{\text{P2X}_2}$) gegenübergestellt (Abb. 3.23).

3. Ergebnisse

Es konnte keine eindeutige Korrelation der Größe der initialen Rezeptorantwort auf den darauf folgenden „Ci-VSP-Effekt“, also die Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms erkannt werden. Dies galt sowohl für den „Ci-VSP-Effekt“ in coexprimierenden Zellen als auch für die intrinsische, rezeptor-eigene Desensibilisierung des Rezeptorstroms in Kontroll-Oozyten.

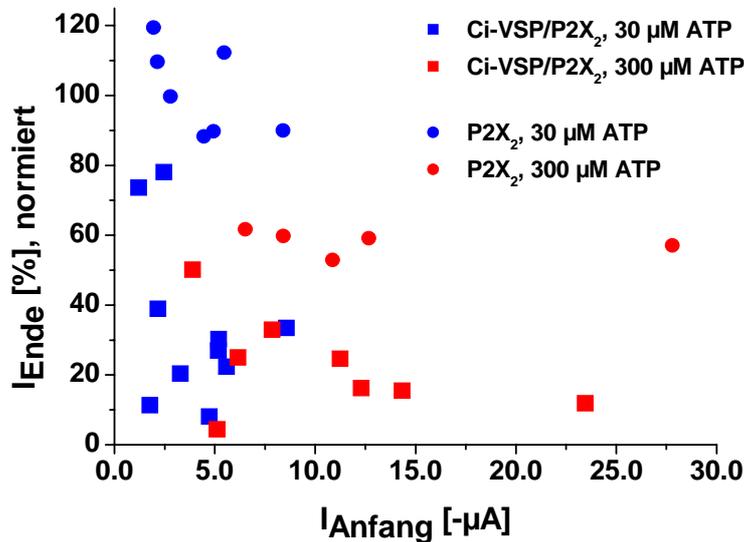


Abb. 3.23: Die Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch die Ci-VSP-Aktivierung war nicht abhängig von der Größe der initialen, ATP-vermittelten Rezeptorströme - weder mit 30 noch mit 300 µM ATP. Darstellung von Werten aus Einzelmessungen, im Falle von coexprimierenden Oozyten von normierten Werten (Erläuterungen *s. Text*).

Weitergehend stellte sich die Frage, ob der hier untersuchte „Ci-VSP-Effekt“ reversibel war, oder ob es sich um eine nicht-umkehrbare Wirkung der Ci-VSP auf den P2X₂R handelte. Im Verlaufe unterschiedlicher Versuchsbedingungen zeigte sich, dass sich der Rezeptorstrom innerhalb von Minuten „erholte“, wenn erneut physiologische Membranpotentiale an die Oozytenmembran angelegt wurden und der Agonist aus dem Bad entfernt wurde (*s. Abb. 3.24*). Anhaltende Depolarisation oder Agonisten-Applikation verlangsamten diese „Erholung“. Damit war der „Ci-VSP-Effekt“ reversibel, und zwar in gleichen Zeitdimensionen wie die seiner Entwicklung.

Diese „Erholung“ aus der Herunterregulierung des Rezeptorstroms wurde während aller Messungen überwacht. Dafür wurde der Rezeptorstrom in Abständen von 60 s mit 5-sekündigen, 30 µmolaren ATP-Applikationen bestimmt. Während der ganzen Zeit wurde die Oozytenmembran auf -60 mV geklemmt. *Abb. 2.24* zeigt die Original-Stromspur aus einer solchen „Erholungs“-Messung, der das Depolarisations-Messprotokoll vorangegangen war (30 µM, 0 mV).

3. Ergebnisse

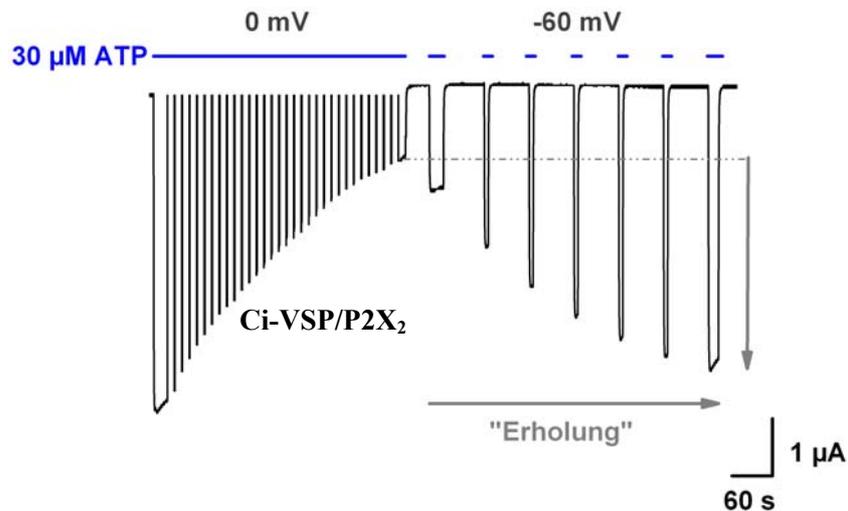


Abb. 3.24: Der „Ci-VSP-Effekt“ war reversibel innerhalb weniger Minuten. Original-Stromspur aus einer TEVC-Messung an einer Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyte, die dem in Abb. 3.14 beschriebenen Depolarisations-Messprotokoll unterzogen wurde. Im Anschluss daran wurde die „Erholung“ aus der Ci-VSP-bedingten Herunterregulierung des Rezeptorstroms überwacht, indem das Membranpotential bei -60 mV gehalten wurde und der ATP-vermittelte Rezeptorstrom alle 60 s durch 5-sekündige Agonisten-Applikationen (30 µM) überprüft wurde.

Zusammenfassend muss an dieser Stelle wiederholt und festgehalten werden, dass der „Ci-VSP-Effekt“ nur in Anwesenheit von ATP beobachtet werden konnte, wie den Abb. 3.13 und 3.14 zu entnehmen ist. Die Abwesenheit des Agonisten verhinderte demnach die Herunterregulierung des Rezeptorstroms durch die Ci-VS-Phosphatase. In Analogie dazu war die „Erholung“ aus dem „Ci-VSP-Effekt“ in Abwesenheit von ATP beschleunigt. Jedoch war die Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch Ci-VSP bei maximalen und halbmaximalen ATP-Konzentrationen nicht unterschiedlich. Ebenso hatte eine reine, lang andauernde Agonisten-Applikation (ohne Depolarisation), wie sie in den o. g. Messprotokollen verwandt wurde, keine vergleichbaren Auswirkungen auf den P2X₂ Rezeptorstrom in coexprimierenden Oozyten (s. Abb. 3.11). Die Abnahme des P2X₂ Rezeptorstroms fand folglich nur nach Depolarisation, also Ci-VSP-Aktivierung, statt.

Um darüber hinaus ausschließen zu können, dass es sich bei dem oben beschriebenen „Ci-VSP-Effekt“ um ein Phänomen handelt, das auf endo- oder exocytotische Ereignisse an der Oozytenmembran zurückgeführt werden kann, wurde die elektrische Kapazität der Oozytenmembran vor und nach Durchführung des Depolarisations-Messprotokolls (Abb. 3.14) bestimmt. Hierfür wurden Spannungssprünge von -120 bis +60 mV (Dauer 100 ms, s. Abb. 3.25) an die Zellmembran angelegt, die zugehörigen Stromantworten gegen die Zeit aufgetragen und anschließend die kapazitiven Ströme, die aus der Umladung der Membran resultierten, über die Zeit integriert. Die durch die Integration berechneten Ladungen wurden gegen die jeweiligen Spannungen aufgetragen und aus der Steigung der resultierenden Geraden nach der Gleichung $C = Q/U$ die Kapazität berechnet. Sollte sich, aufgrund von Endo-/Exocytose an der Membran die Membranoberfläche ändern, sollte sich dies in einer

3. Ergebnisse

veränderten Membrankapazität äußern ($C = I_C (dU/dt)^{-1} = \epsilon_0 \epsilon_r A/d$). Dies war jedoch nicht der Fall, die Kapazitäten der Oozytenmembranen blieben vor und nach Ci-VSP-Aktivierung in weiten Bereichen gleich (um 200 nF, *nicht gezeigt*) und unterschieden sich nicht voneinander (*student's t-Test*).

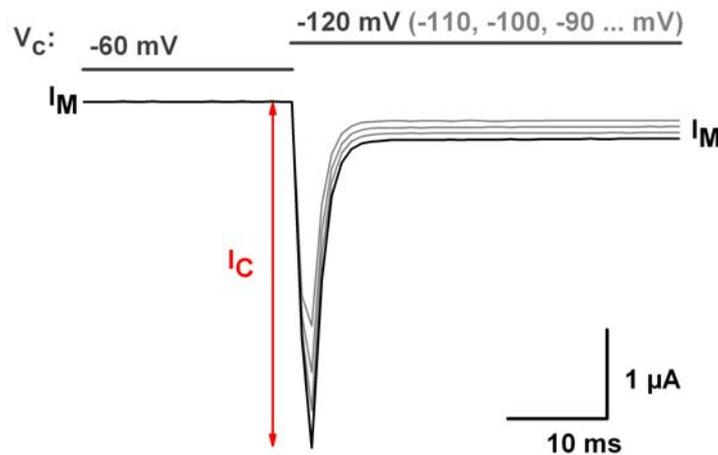


Abb. 3.25: Beispielhafte Original-Stromspuren aus Messungen zur Membrankapazität. Es wurden Spannungssprünge (-120 bis +60 mV, Δ 10 mV, Dauer 100 ms) an die Oozytenmembran angelegt und die daraus resultierenden kapazitiven Ströme (I_C) gemessen. I_M = Membranstrom; gezeigt sind die ersten 40 ms.

3.2.2.8 Einfluss verschiedener injizierter PIs nach Injektion in Xenopus Oozyten

Um einen möglichen und wahrscheinlichen Einfluss von PIP_2 und/oder verwandten Substanzen auf die beobachteten Effekte in Ganzzell-Ableitungen näher eingrenzen zu können, wurden diese während TEVC-Messungen in die Oozyten injiziert ($PI_{4,5}P_2$, $PI_{3,5}P_2$, $PI_{3,4,5}P_3$, Neomycin (bindet spezifisch an Phosphoinositide [WANG *et al.*, 1984]). Die Injektion wurde mithilfe eines in der Nähe der Messkammer fixierten Mikroinjektors durchgeführt. Die *o. g.* Agenzien wurden dazu in ORi-90K-Lösung in einer Konzentration von 200 μM aufgenommen. Ausgehend von einem Oozytenvolumen von 0,5 μl und einer Injektionsmenge von 50 nl erreichte die Konzentration des injizierten Agens in der Oozyte einen Wert von 20 μM [MCLAUGHLIN & MURRAY, 2005]. Lediglich Neomycin wurde in einer Konzentration von 1 mM injiziert, resultierend in einer Endkonzentration in der Oozyte von 100 μM [DING *et al.*, 2004].

Die Injektion wurde während verlängerter, halb-maximal aktivierender ATP-Applikationen sowie während des oben beschriebenen Depolarisations-Messprotokolls (3.2.2.2) durchgeführt. Abb. 3.26 zeigt beispielhaft Originalströme von $P2X_2R$ exprimierenden Oozyten, denen $PI_{4,5}P_2$ (*links*) sowie – als Kontrollmessung – nur das „Lösungsmittel“ (*rechts*), in dem das PI vorlag, injiziert wurde. Es konnte zunächst eine deutliche Zunahme des ATP-vermittelten Rezeptorstroms beobachtet werden, und zwar ohne Veränderung des Leckstroms nach ATP-Wegnahme aus dem Bad.

3. Ergebnisse

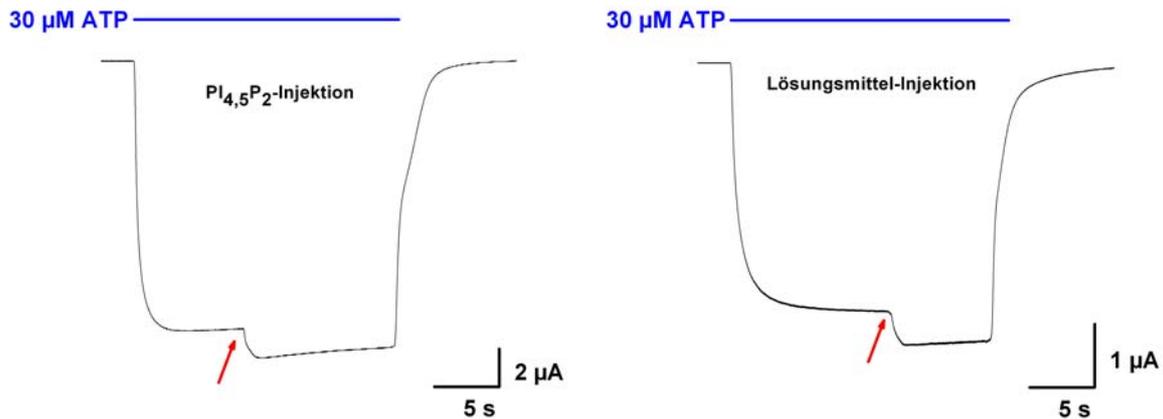


Abb. 3.26: PI_{4,5}P₂-Injektion in P2X₂R exprimierende Oozyten während der Rezeptoraktivierung im TEVC-Versuch mit einer halb-maximalen Aktivierungskonzentration von 30 μM ATP (Original-Stromspur). Das Haltepotential betrug -60 mV. Nach Rezeptor Aktivierung wurde ca. 5 s gewartet, bevor die zu testende Substanz injiziert wurde (s. roter Pfeil). **Links:** PI_{4,5}P₂-Injektion. **Rechts:** Lösungsmittel-Injektion (Kontrolle).

Nach Durchführung der Kontrollversuche mit reinem „Lösungsmittel“ zeigte sich jedoch, dass auch in diesen Fällen eine Stromzunahme zu verzeichnen war, die PI-Injektion während der TEVC-Messungen offenbar keinen Effekt aufwies. Der Grund hierfür war vermutlich in der langsamen Diffusion der injizierten Agenzien zu suchen. Aus diesem Grund wurden diese Messungen nicht weiter verfolgt, und die Applikation verschiedener PIs und verwandter Substanzen im *Patch Clamp*-Experiment durchgeführt (s. 3.3).

3.2.2.9 PI-Kinase-Beteiligung am Desensibilisierungsverhalten des P2X₂-Rezeptors

FUJIWARA & KUBO zeigten 2006, dass eine Inkubation von P2X₂R exprimierenden Oozyten in 30 μM Wortmannin 1-2 h vor der Messung einen starken Einfluss auf das Desensibilisierungsverhalten des P2X₂R Stroms hat. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt bestätigt werden, der Rezeptorstrom (ausgelöst durch 100 μM ATP) zeigte nach 1-stündiger Vorinkubation in 30 μM des membrangängigen [VANHAESEBROECK *et al.*, 2001] Wortmannins (in ORi+Ca²⁺) eine starke Desensibilisierung innerhalb von 100 s auf im Mittel weniger als 30 % des initialen, ATP-vermittelten Stroms (s. Abb. 3.27). Dahingegen zeigten die unbehandelten P2X₂R (Kontroll-)Zellen lediglich eine leichte Desensibilisierung bei anhaltender ATP-Applikation. Diese verbleibenden ATP-vermittelten Rezeptorströme beider Gruppen unterschieden sich hochsignifikant voneinander. Es wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit *o. g.* Studien auf eine 100-sekündige (statt wie unter 3.2.2.2 verwendete 300-sekündige) Agonisten-Applikation mit 100 μM ATP zurückgegriffen, was sich zudem als vorteilhaft herausstellte, da die Oozytenqualität durch Wortmannin negativ beeinflusst wurde, was längere Messungen, wie sie im Verlauf dieser Arbeit oft eingesetzt wurden, kaum möglich gemacht hätte.

3. Ergebnisse

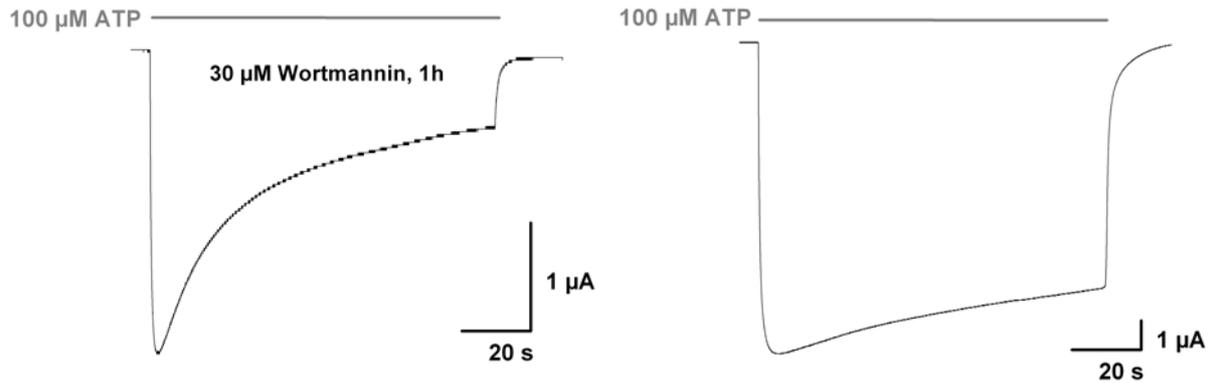
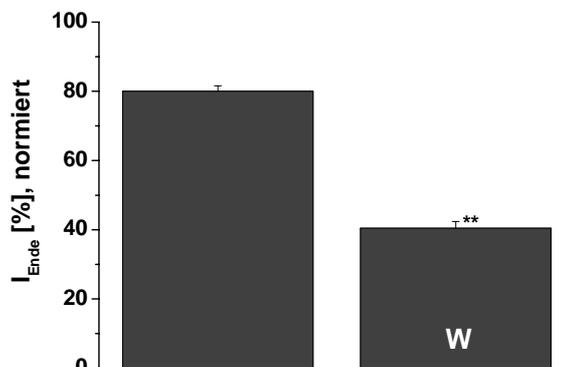


Abb. 3.27.a: Wortmannin-Behandlung der Oozyten beschleunigte die Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptorstroms. Inkubation P2X₂R exprimierender Oozyten in Wortmannin vor der Messung (1 h, 30 μM) führte zu einer Verstärkung und Beschleunigung der endogenen Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptorstroms (*rechts*: PI-Kinase nicht inhibiert, *links*: PI-Kinase durch Wortmannin-Inkubation inhibiert), die auch von FUJIWARA & KUBO, 2006, gezeigt wurde; $V_m = -60$ mV. Die eingesetzte ATP-Konzentration betrug 100 μM, dargestellt sind beispielhafte Original-Messungen.

FUJIWARA & KUBO [2006] interpretieren diesen Desensibilisierungs-fördernden Effekt als Hemmung der PI3-Kinase (PI3K). Die IC₅₀-Konzentration für eine Wortmannin-bedingte PI3K-Hemmung liegt bei 5 nM [OKADA *et al.*, 1994]. Die irreversible Hemmwirkung des Wortmannins ist begründet in einer kovalenten Modifikation des Lys802 der PI3K, das an der Phosphattransfer-Reaktion beteiligt ist [WYMAN *et al.*, 1996]. Sie stützen ihre Hypothese aus weitergehenden Untersuchungen mit einem spezifischen PI3K-Inhibitor, der jedoch weniger potent ist: LY294002 (IC₅₀ = 1 μM, [VANHAESEBROECK *et al.*, 2001]). Durch 12-stündige Inkubation der Oozyten in 30 μM LY294002 konnten sie ähnliche Verstärkungen der Rezeptor-Desensibilisierung hervorrufen. Jedoch muss in Betracht gezogen werden, dass es sich möglicherweise um keine reine PI3K-Inhibition handelte, da Wortmannin in höheren Dosen auch die PI4-Kinase (PI4K) hemmt (IC₅₀ = 50-140 nM [NAKANISHI *et al.*, 1995; BALLA *et al.*, 1997; CUTLER *et al.*, 1997; XIE *et al.*, 1999; GUO *et al.*, 2003; GAMPER & SHAPIRO, 2007]). Aus diesem Grund wird im weiteren – trotz der eindeutigen Auslegung FUJIWARAS UND KUBOS – von einer PI-Kinase-Inhibition gesprochen, um die Spezifizierung, ob es sich um die PI3K oder die PI4K handelt, zunächst außen vor zu lassen.

Abb. 3.27.b: Wortmannin verstärkte die Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptors. Inkubation P2X₂R exprimierender Oozyten (*rechts*, „W“) in Wortmannin vor der Messung (*s. o.*) führte zu einer Verstärkung und Beschleunigung der endogenen Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptorstroms im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (*links*), $V_m = -60$ mV, ATP = 100 μM, „I_{Ende}“ = verbleibender Strom nach 100 s Rezeptoraktivierung, Mittelwerte ± Standardfehler, n = 5, ***student's t-Test*, p < 0,01).

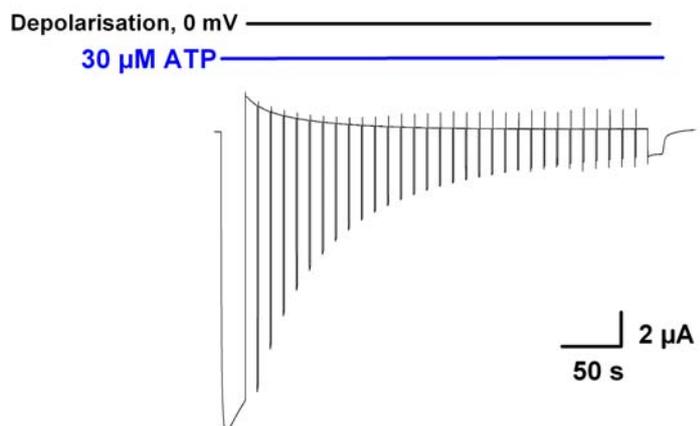


3. Ergebnisse

In vielen Wortmannin-behandelten Zellen konnte eine generelle Verringerung des anfänglichen Rezeptorstroms beobachtet werden, was auch schon durch FUJIWARA [2006] und Kollegen gefunden wurde und von ihnen mit einer möglichen Internalisierung der Rezeptoren nach Wortmannin-Inkubation in Verbindung gebracht wurde. Im Zuge dessen wurde vorliegend die elektrische Kapazität der Oozytenmembranen bestimmt (vgl. 3.2.2.7), jedoch kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt (*nicht gezeigt*). Somit konnten endocytotische Prozesse an der behandelten Oozytenmembran nicht bestätigt werden. Die Tatsache, dass eine PI-Kinase-Inhibition durch Wortmannin die Desensibilisierung des P2X₂R beschleunigt, ist auch für die vorliegende Arbeit von großem Interesse, da PI-Kinasen in direktem Antagonismus zu PI-Phosphatasen in der Zelle arbeiten. Ci-VSP stellt ebenfalls eine PI-Phosphatase dar, von der bekannt ist, dass sie sowohl PI_{4,5}P₂ als auch PI_{3,4,5}P₃ dephosphorylieren kann. Die Aktivierung dieser Ci-VSP in Oozyten führte ebenfalls zu einer Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms. Zwar ist an dieser Stelle noch unklar, ob es sich dabei um eine Beschleunigung der Rezeptor-Desensibilisierung handelte oder um einen hemmenden Effekt. Falls jedoch sowohl PI-Kinase-Inhibition als auch Ci-VSP-Aktivierung auf das gleiche System in der Oozyte wirken, so sollte in coexprimierenden Oozyten eine Wortmannin-Inkubation 1 h vor der Messung eine Verstärkung des „Ci-VSP-Effekts“ hervorrufen.

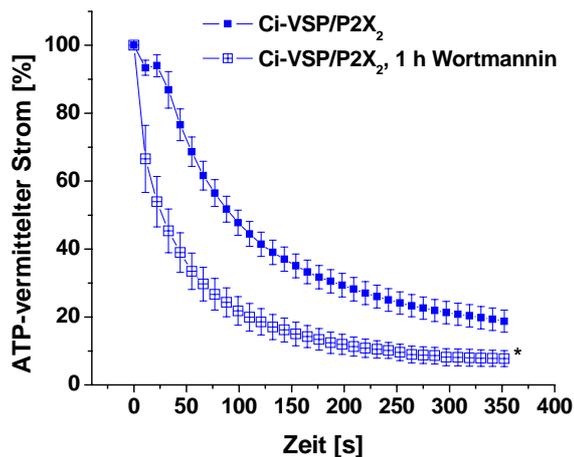
Tatsächlich war in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Zellen genau dies zu beobachten. Die Herunterregulierung des Rezeptorstroms durch Ci-VSP war nach Wortmannin-Inkubation und anschließender Durchführung des Depolarisations-Messprotokolls (0 mV, 30 μM) deutlich verstärkt (s. Abb. 3.28.a). Während in Oozyten, die nicht mit Wortmannin behandelt wurden, der Rezeptorstrom auf ca. 20 % der initialen Größe absank (vgl. Abb. 3.15), fiel er im Mittel in PI-Kinase-inhibierten Oozyten auf ca. 5 % ab, unterschied sich somit signifikant von den unbehandelten, coexprimierenden Zellen (Abb. 3.28.b).

Abb. 3.28.a: Inhibition der PI-Kinase verstärkte den „Ci-VSP-Effekt“ auf den P2X₂ Rezeptorstrom. Inkubation der Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten in Wortmannin vor der Messung (1 h, 30 μM) führte zu einer Verstärkung der Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch die Ci-VSP-Aktivierung nach einer Membrandepolarisation auf 0 mV (vgl. Abb. 3.15). Die eingesetzte ATP-Konzentration betrug 30 μM (EC₅₀), dargestellt ist eine beispielhafte Original-Messung.



3. Ergebnisse

Abb. 3.28.b: Wortmannin-Inkubation der Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten verstärkte den „Ci-VSP-Effekt“. Die Herunterregulierung des halb-maximalen (30 μM) ATP-vermittelten P2X₂ Rezeptorstroms nach Ci-VSP-Aktivierung durch Depolarisation auf 0 mV war durch PIK-Inhibition (☒, 1 h 30 μM Wortmannin) im Vergleich zur Kontrollgruppe (■) sowohl verstärkt als auch beschleunigt. (Mittelwerte ± Standardfehler, Kontrolle: n = 5, Wortmannin-behandelte Oozyten: n = 4; * *student's t-Test*, p < 0,05).



Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass nicht nur die Herunterregulierung des Rezeptorstroms durch Ci-VSP-Aktivierung beschleunigt und verstärkt war, sondern dass Ci-VSP/P2X₂R coexprimierende Zellen auch ohne eine Aktivierung dieser PI-Phosphatase (d. h. bei -60 mV) eine Verstärkung des durch Wortmannin-Inkubation induzierten Effekts im Vergleich zu rein P2X₂R exprimierenden Zellen aufwiesen. Die in *Abb. 3.27* erläuterten TEVC-Messungen wurden in identischer Weise an coexprimierenden Oozyten durchgeführt. Original-Stromspuren daraus können der *Abb. 3.29.a* entnommen werden, die gemittelten Daten mehrerer Messungen der *Abb. 3.29.b*. Die Abbildungen zeigen, dass die Desensibilisierung in nicht-behandelten, coexprimierenden Oozyten nur gering ausgeprägt war und der Desensibilisierung in rein P2X₂R exprimierenden Oozyten ähnelte (*vgl. Abb. 3.27*).

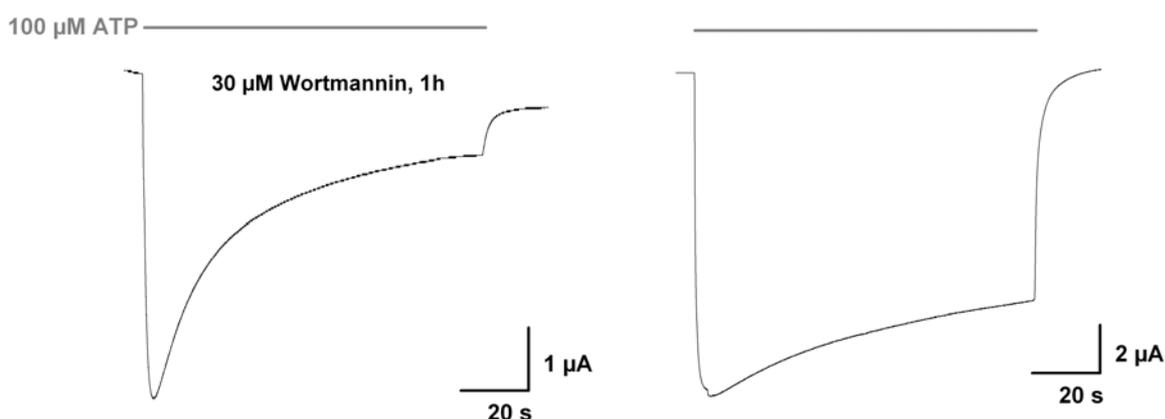


Abb. 3.29.a: Die Beschleunigung der Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch eine Wortmannin-Behandlung war in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten noch verstärkt. Inkubation coexprimierender Oozyten in Wortmannin vor der Messung (1 h, 30 μM) führte zu einer weiteren Verstärkung und Beschleunigung der endogenen Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptorstroms (*rechts*: PI-Kinase nicht inhibiert, *links*: PI-Kinase durch Wortmannin-Inkubation inhibiert). ATP-Konzentration: 100 μM (100 s), V_m = -60 mV. Dargestellt sind beispielhafte Original-Messungen; *vgl. Abb. 3.27*.

Nach einer 1-stündigen Wortmannin-Inkubation zeigte sich eine Desensibilisierung (Abnahme auf 16 % des initialen Stroms; *Abb. 3.29.a, rechts; Abb. 3.29.b*), die sich nicht nur

3. Ergebnisse

hochsignifikant von unbehandelten, coexprimierenden Oozyten (76 %; *Abb. 3.29.a, links; Abb. 3.29.b*) unterschied, sondern auch von rein P2X₂R exprimierenden, Wortmannin-behandelten Oozyten (40 %; *Abb. 3.27, rechts; Abb. 3.29.b*).

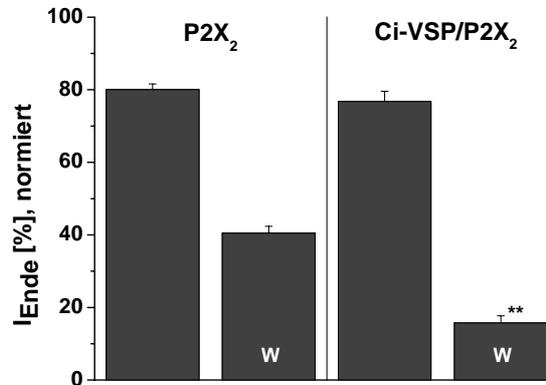


Abb. 3.29.b: Einfluss von Wortmannin auf das Desensibilisierungsverhalten von P2X₂ Rezeptorströmen in P2X₂R bzw. Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten. ATP = 100 μM (100 s, V_m = -60 mV). Die Wortmannin-behandelten Zellen wurden 1 h vor der Messung in 30 μM Wortmannin inkubiert. Während Wortmannin die Desensibilisierung des P2X₂R (*links*) um das Doppelte vergrößerte (80 bzw. 40 %), wurde die Desensibilisierung des Rezeptorstroms in coexprimierenden Oozyten (*rechts*) noch wesentlich stärker, um ca. das 5-fache (76 bzw. 15 %) beeinflusst („W“ = Wortmannin-Behandlung; Mittelwerte ± Standardfehler, jeweils n = 5, ** *student's t-Test*, p < 0,01, Wert unterschied sich hochsignifikant von allen anderen Versuchsgruppen).

3.2.2.10 Paromomycin inhibiert den „Ci-VSP-Effekt“

Wie in 3.1 dargestellt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Aminoglykoside einen *open pore block* am P2X₂R verursachten und darüber hinaus die ATP-Dissoziation vom Rezeptor verlangsamten (3.1.4), ihn demnach im offenen Zustand „arretieren“. Dieser Umstand wurde in den nachfolgend dargestellten Versuchen genutzt, um die Wirkweise der Ci-VS-Phosphatase und deren Einfluss auf den P2X₂ Rezeptorstrom näher zu untersuchen.

In Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten wurde während des Depolarisations-Messprotokolls (*vgl. 3.2.2.2*) der halb-maximale Rezeptorstrom durch sättigende Konzentrationen (10 mM) von Paromomycin gehemmt, d. h., der Rezeptor während der gesamten Depolarisationsphase (0 mV) im offenen Zustand gehalten. Es wurde aus dem Grund Paromomycin verwendet, da es am P2X₂R eine nahezu vollständige Hemmung zeigte, obwohl der IC₅₀-Wert vergleichsweise hoch lag (*vgl. Tab.3.1*). *Abb. 3.30.a* zeigt beispielhafte Originalströme aus diesen Versuchen. In der *linken* Abbildung ist zu erkennen, dass der „Ci-VSP-Effekt“ durch Paromomycin-Block des P2X₂ Rezeptorstroms stark abgeschwächt war, der verbleibende ATP-vermittelte Rezeptorstrom war nach 5-minütiger Depolarisation, d. h. Aktivierung der Ci-VS-Phosphatase wesentlich höher (*roter Pfeil*) als in coexprimierenden Zellen, die diesem Messprotokoll ohne Paromomycin-Einwirkung unterworfen wurden (*Abb. 3.30.a, rechts*).

3. Ergebnisse

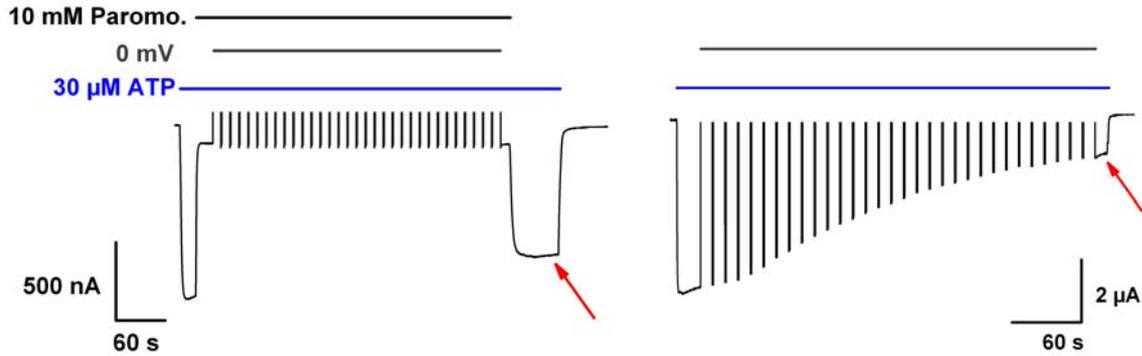


Abb. 3.30.a: Paromomycin-Block des P2X₂ Rezeptors verhinderte den „Ci-VSP-Effekt“. Paromomycin inhibierte den P2X₂R nicht-kompetitiv und arretierte ihn im offenen, ATP-gebundenen Zustand (vgl. 3.1). Depolarisation auf Haltepotentiale von 0 mV und gleichzeitige Inhibition des halb-maximalen (30 μM ATP) Rezeptorstroms in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Zellen durch sättigende Konzentrationen von Paromomycin (10 mM) reduzierte den herunterregulierenden Effekt der Ci-VSP-Aktivierung auf den P2X₂ Rezeptorstrom merklich (s. rote Pfeile). Der verbleibende ATP-vermittelte Rezeptorstrom war im inhibierten Zustand (*links*) größer als im nicht inhibierten (*rechts*). Gezeigt sind beispielhafte Original-Stromspuren.

Abb. 3.30.b fasst schließlich die Ergebnisse dieser Messungen aus jeweils 6 Zellen, sowohl an halb-maximalen (30 μM) als auch maximalen (300 μM ATP) Rezeptorströmen, zusammen. Im Vergleich zu den coexprimierenden Zellen, deren Rezeptorstrom nicht durch Paromomycin inhibiert wurde, war der verbleibende, ATP-vermittelte Rezeptorstrom in behandelten Oozyten nach 5-minütiger Ci-VSP-Aktivierung noch doppelt so groß (*links*). Der „Ci-VSP-Effekt“ auf den P2X₂R durch den AG-Block war demnach um die Hälfte abgeschwächt. Rein P2X₂R exprimierende Oozyten blieben in ihrem prozentualen „I_{Ende}“-Wert durch eine 300-sekündige Paromomycin-Inhibition unbeeinflusst (*rechts*).

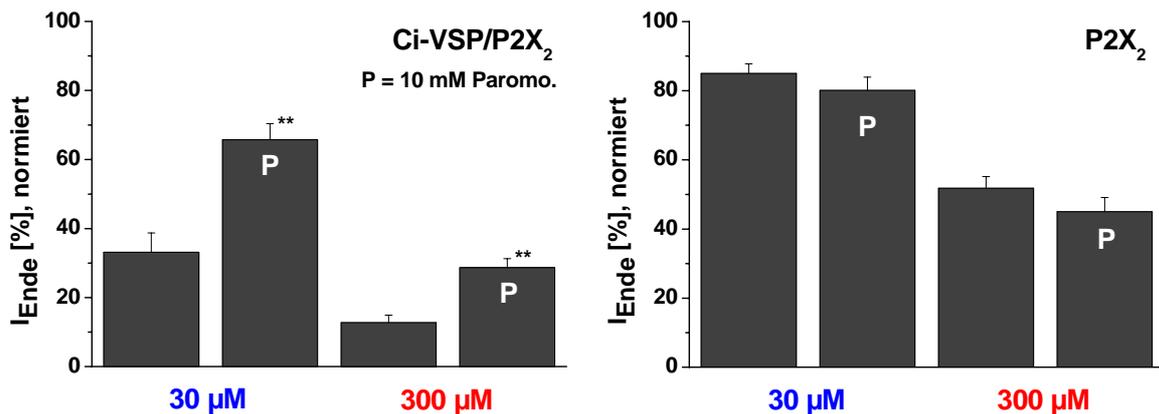


Abb. 3.30.b: Paromomycin reduzierte die Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms durch Ci-VSP in Ci-VSP/P2X₂ coexprimierenden Oozyten. Inhibition des P2X₂ Rezeptorstroms durch sättigende Paromomycin-Konzentrationen (10 mM, „P“) während der 300 s Membrandepolarisation (0 mV) hemmte den Einfluss von Ci-VSP auf den P2X₂ Rezeptorstrom. Die Herunterregulierung war abgeschwächt und der finale, ATP-vermittelte Rezeptorstrom hochsignifikant größer als in nicht inhibierten, coexprimierenden Oozyten (*links*). Auf die Kontroll-Zellen, die lediglich den P2X₂R exprimierten, hatte eine Paromomycin-Inhibition während der Depolarisation keinen signifikanten Einfluss (*rechts*). Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler, jeweils n = 6, **student's t-Test, p < 0,01).

3.2.2.11 Ci-VSP und andere P2X Rezeptoren

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass Ci-VSP einen starken Einfluss auf K⁺-Kanäle (Kir2.1 (IRK1), Kir3.2 (GIRK2), KCNQ2/3 [MURATA *et al.*, 2005]) besitzt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch der P2X₂R durch die Aktivierung der *o. g.* Phospholipid-Phosphatase moduliert wird. Aufgrund dieser Tatsache wurde ein möglicher Einfluss auch auf den P2X₁R sowie die Rezeptorchimäre P2X_{2/1} untersucht. Stellvertretend für schnell-desensibilisierende Subtypen wurde der P2X₁R herangezogen. Da die synthetische P2X_{2/1} Rezeptorchimäre – als nicht-desensibilisierendes Modell für den P2X₁R - in dieser Arbeit ebenfalls Verwendung fand, wurde auch ihr Verhalten unter Ci-VS-Phosphatase-Aktivierung untersucht.

Die reine Coexpression der beiden Proteine beeinflusste die P2X Rezeptorströme, wie auch schon in 3.2.1 dargelegt, nicht. Im Folgenden werden die Ergebnisse als beispielhafte Originalströme aus den Messungen mit oben bereits beschriebenem Messprotokoll (3.2.2.2) zur potentiellen Beeinflussung anderer P2X Subtypen durch Ci-VSP dargestellt.

P2X₁

Der P2X₁R ist ein schnell desensibilisierender Subtyp dieser Rezeptorfamilie, seine EC₅₀-Konzentration für ATP liegt bei 1 µM [VALERA *et al.*, 1994; EVANS *et al.*, 1995]. *Abb. 3.31, rechts (vor den roten Pfeilen)* zeigt beispielhaft die typischen Rezeptorantworten auf kurzzeitige Agonisten-Applikationen. Die Erstantwort ist, im Vergleich zu den folgenden deutlich größer, sie zeigt einen Einwärtsstrom, der innerhalb weniger Sekunden desensibilisiert und auf einen Bruchteil des initialen Stroms abfällt. Eine weitere ATP-Applikation nach wenigen Minuten erzeugt nicht mehr den anfänglich erreichten Spitzenstrom, sondern lediglich *ca.* 1/3 bis 1/4, da eine *ca.* 1-stündige Inkubation in ATP-freier Lösung notwendig ist, um eine vollständige Regeneration aus der Desensibilisierung zu bewirken.

In den hier durchgeführten Messungen wurden Oozyten verwendet, die mit je 25 ng P2X₁R- und Ci-VSP-cRNA injiziert wurden, die Expressionszeit betrug 2 Tage. Das angelegte Potential betrug während der Depolarisationen 0 mV, während der ATP-Applikationen zum Überprüfen des ATP-vermittelten Rezeptorstroms -60 mV. *Abb. 3.31, links* zeigt die Originalströme coexprimierender Oozyten als Antwort auf 5 s dauernde halb-maximale ATP-Applikationen. Zwischen den einzelnen Applikationen lagen jeweils 3 Minuten (ATP-frei). Die ersten 4 Applikationen wurden ohne Depolarisationen durchgeführt, anschließend wurde die Membran in der 3-minütigen „Wartezeit“ zwischen den ATP-Applikationen auf 0 mV depolarisiert (*Stromantworten nach Depolarisationen mit roten Pfeilen gekennzeichnet*).

3. Ergebnisse

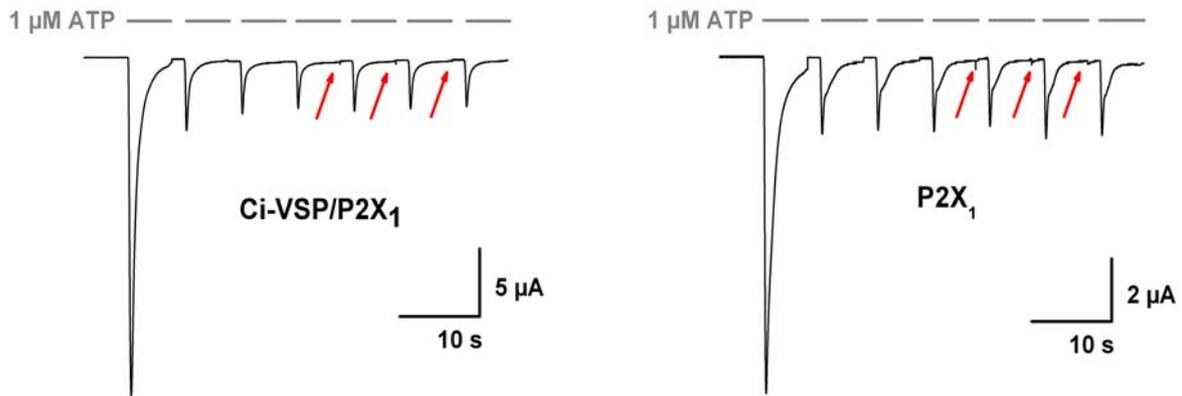


Abb. 3.31: Beispielhafte TEVC-Messungen an Ci-VSP/P2X₁R coexprimierenden Oozyten zur Messung einer möglichen Beeinflussung des P2X₁R Stroms durch Ci-VSP. Original-Stromspuren aus TEVC-Messungen an Oozyten, V_m der hier gezeigten Ströme: -60 mV. Der P2X₁R wurde mehrfach 5 s lang mit 1 μ M ATP (EC_{50}) aktiviert, jeweils im Abstand von 3 min. Wartezeit. Nach den ersten 4 ATP-Applikationen wurde während der 3-minütigen Wartezeit zwischen den Agonisten-Applikationen auf 0 mV depolarisiert, um Ci-VSP zu aktivieren (Wartezeit *nicht gezeigt*, *Pfeile* deuten Repolarisierung auf -60 mV an). **Rechts:** P2X₁R exprimierende Oozyten (Kontrollen) zeigten keine Beeinflussung des Rezeptorstroms durch 3-minütige Depolarisation auf 0 mV vor einer Rezeptoraktivierung. **Links:** Ci-VSP/P2X₁ coexprimierende Oozyten zeigten ebenfalls keinen Einfluss einer Depolarisation auf 0 mV, demnach war ein „Ci-VSP-Effekt“ auf den P2X₁R wie am P2X₂R nicht zu beobachten.

Es konnte keinerlei Einfluss einer Depolarisation und somit einer Aktivierung von Ci-VSP auf den Rezeptorstrom des P2X₁R beobachtet werden, die coexprimierenden Zellen verhielten sich in den oben beschriebenen Messungen wie die Kontroll-Zellen, die nur den P2X₁R exprimierten (*rechts*).

P2X_{2/1}

Die P2X_{2/1}R Chimäre besteht aus dem N-Terminus sowie der ersten Transmembrandomäne des P2X₂R und dem extrazellulären *loop*, der zweiten Transmembrandomäne und dem C-Terminus des P2X₁R. Sie besitzt die ATP-Bindungseigenschaften des P2X₁R, desensibilisiert jedoch nicht - ähnlich wie der P2X₂R. Die Rezeptordeaktivierung nach ATP-Wegnahme ist jedoch wesentlich langsamer als an anderen P2X Subtypen, sie verläuft mit einer Zeitkonstanten von $\tau = 63$ s und ist damit erst nach *ca.* 240 s abgeschlossen. Die EC_{50} -Konzentration für ATP liegt bei 3 nM [RETTINGER & SCHMALZING, 2004]. *Abb. 3.32.a* zeigt beispielhaft den typischen Kanalstrom dieses chimären Rezeptors nach maximaler Aktivierung mit 1 μ M ATP und die langsame Deaktivierung nach ATP-Wegnahme.

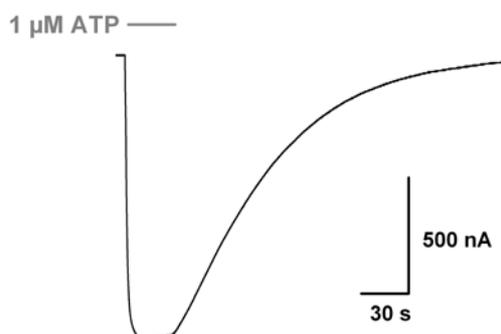


Abb. 3.32.a: Typischer Stromverlauf des chimären P2X_{2/1} Rezeptors nach maximaler Aktivierung mit 1 μ M ATP ($EC_{50} = 3$ nM) im TEVC-Experiment ($V_m = -60$ mV). Die Rezeptorantwort ist direkt, d. h. mit Beginn der Agonisten-Applikation öffnet der Kanal, was in einem Einwärtsstrom beobachtet werden kann. Dieser chimäre Rezeptor zeigt keine Desensibilisierung seines Stroms bei anhaltender Agonisten-Applikation. Nach Wegnahme beginnt die relativ langsame Deaktivierung, die einem monoexponentiellen Verlauf folgt (*s. Text*).

3. Ergebnisse

Da dieser Rezeptor Subtyp schon nach 24 h Expression ausreichende Ströme im TEVC-Experiment lieferte, wurden im Falle der coexprimierenden Oozyten die cRNAs an aufeinanderfolgenden Tagen injiziert, so dass das Ci-VSP-Protein (25 ng cRNA) eine Expressionsdauer von 2 Tagen, der P2X_{2/1}R (12,5 ng cRNA) von 1 Tag besaß. In coexprimierenden und in Kontroll-Zellen (P2X_{2/1}R exprimierend) wurde das identische, wie in 3.2.2.2 beschriebene Depolarisations-Messprotokoll angewandt (depolarisierende Haltepotentiale: 0 mV, ATP-Konzentration: 0,1 µM).

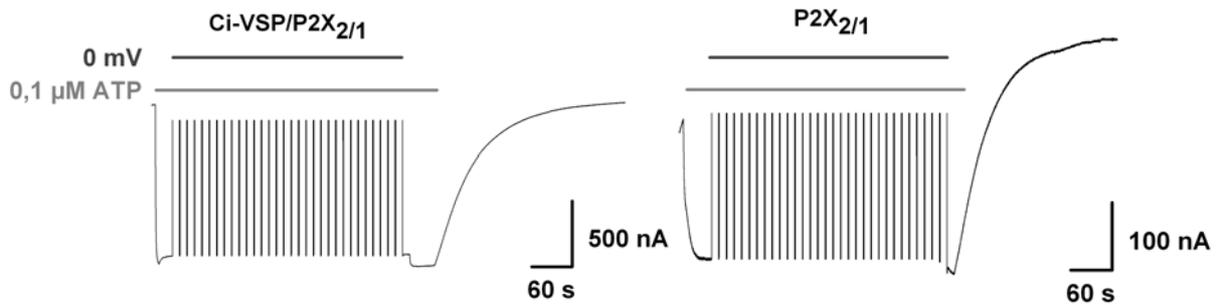


Abb. 3.32.b: Beispielhafte Original-Messungen an P2X_{2/1}R-(Kontrolle, *rechts*) und Ci-VSP/P2X_{2/1} coexprimierenden Oozyten (*links*) nach o. g. beschriebenem TEVC-Messprotokoll (vgl. Abb. 3.14). Die eingesetzte ATP-Konzentration war sättigend und betrug 0,1 µM, die Depolarisation zur Ci-VSP-Aktivierung erfolgte auf 0 mV. Im Vergleich zum P2X₂R konnte an dem chimären Rezeptor P2X_{2/1} keine Beeinflussung des Rezeptorstroms durch die Ci-VS-Phosphatase beobachtet werden

Abb. 3.32.b, *links* zeigt, dass Ci-VSP keinerlei Auswirkungen auf den chimären Rezeptorstrom hatte, der ATP-vermittelte Rezeptorstrom am Ende der Messung war in seiner Größe identisch zum initialen Rezeptorstrom. Auch die Kontroll-Zellen zeigten keine Beeinflussung ihres Rezeptorstroms durch die lang anhaltende Membrandepolarisation (*rechts*).

Es bleibt somit festzuhalten, dass der „Ci-VSP-Effekt“, der am P2X₂R einen starken Einfluss auf den Rezeptorstrom nahm, weder am schnell-desensibilisierenden P2X₁R noch an der nicht-desensibilisierenden P2X_{2/1} Rezeptorchimäre zu beobachten war. Die Rezeptorströme dieser beiden Subtypen blieben durch eine Ci-VSP-Aktivierung gänzlich unbeeinflusst.

3.3 Patch Clamp-Messungen an P2X Rezeptoren

3.3.1 Makroskopische Ströme des P2X₂R

Im Zuge der näheren Charakterisierung des „Ci-VSP-Effekts“ auf den P2X₂ Rezeptor und des Desensibilisierungsverhalten dieses Rezeptors sollten *Patch Clamp*-Messungen durchgeführt werden, da die Bandbreite der potentiellen Versuchsansätze deutlich höher ist als die von TEVC-Ansätzen. Es können z. B. auch in *whole cell*-Konfigurationen die intrazellulären Gegebenheiten verändert werden bzw. liegen definiert vor, was an „intakten“ Zellen bei *Voltage Clamp*-Messungen nicht der Fall ist.

3. Ergebnisse

Zunächst wurde auf HEK-Zellen zurückgegriffen, die transient mit P2X₂R-DNA und YFP-DNA (Reporterfunktion) transfiziert wurden. Allerdings war es schwierig, geeignete Transfektionsbedingungen festzusetzen, da die Transfektionseffizienz und auch die Qualität der Säugerzellen permanent schwankten, somit keine reproduzierbaren und stabilen Ergebnisse produziert werden konnten. Hinzu kam die Tatsache, dass die P2X₂R-DNA stark verdünnt werden musste (bis auf 1 ng DNA), da es - mit vom Hersteller empfohlenen und in der Literatur gängigen DNA-Mengen – zu sehr hohen Strömen in HEK-Zellen kam. Teilweise waren diese bis zu -10 nA groß, und somit nicht mehr fehlerfrei messbar, da der Spannungsabfall über den Serienwiderstand bei derart hohen Strömen nicht ausreichend kompensiert werden kann. Bei noch stärkerer Verdünnung der DNA konnte teilweise keinerlei Expression bzw. Signal des zu untersuchenden Rezeptors mehr detektiert werden, so dass die transiente Transfektion von P2X₂R in HEK293-Zellen nahezu einem „Alles-oder-Nichts“-Ereignis glich.

Schließlich wurden noch PC12-Zellen getestet, da sie den zu untersuchenden Rezeptor nativ exprimieren. Mit diesen Zellen konnten – mehr oder weniger – stabile und reproduzierbare Stromantworten gewonnen werden, jedoch war es – ganz im Gegensatz zu den HEK-Zellen – nur selten möglich, gute, d. h. ausreichend hochohmige *seals* und vor allem langlebige *Patches* (es wurde sowohl in der *whole cell*- als auch *outside out*-Konfiguration gemessen) zu bekommen. Es konnten keine Bedingungen (z. B. Kulturmedium, Antibiotika, Beschichtung der *CoverSlips*, Behandlung der Zellmembran mit Trypsin, unterschiedliche Elektroden, *etc.*) gefunden und dementsprechend angepasst werden, die auf die Membraneigenschaften der PC12-Zellen einen derart positiven Einfluss genommen hätten, dass sie sich zu *Patch Clamp*-Messreihen eigneten.

Daher wurden die *Patch Clamp*-Messungen schließlich mit Oozyten (*excised Patch*) durchgeführt. Die Ligandenbindungsstelle des P2X₂R befindet sich extrazellulär, daher wurden die Messungen im *outside out*-Modus durchgeführt, um den Rezeptor mithilfe der schnell austauschbaren extrazellulären Badlösung definiert aktivieren zu können.

Abb. 3.33.a, links zeigt eine typische makroskopische Stromantwort des P2X₂ Rezeptors in *Patch Clamp*-Messungen. Man erkennt deutlich das – im Vergleich zu Ganzzell-Ableitungen im *Voltage Clamp*-Experiment – starke Desensibilisierungsverhalten. Innerhalb weniger Sekunden fiel der initiale Strom, ausgelöst durch sättigende 300 µM ATP auf wenige Prozent, in manchen Fällen sogar auf Null ab. Dieses Verhalten ist bekannt und wird auf einen oder mehrere intrazelluläre Regulatoren/Modulatoren zurückgeführt [DING & SACHS, 1999 + 2000], die in der intakten Zelle – möglicherweise über den C-Terminus [NORTH, 2002] – mit dem Rezeptor interagieren und ihn nur gering desensibilisieren lassen. In zellfreien *Patches* ist dieser Regulator offenbar nicht mehr vorhanden, da er ausgewaschen wurde.

3. Ergebnisse

Um den Einfluss verschiedener Substanzen, vor allem Phosphoinositide, auf den P2X₂R zu untersuchen, wurden makroskopische Ströme dieses Rezeptors in der *outside-out*-Konfiguration untersucht. Sättigende Agonisten-Konzentrationen (300 μM ATP) wurden 10 s lang appliziert ($V_m = -60$ mV), anschließend wurden der noch verbleibende, prozentuale Rezeptorstrom bestimmt und die Zeitkonstante τ aus exponentiellen *fits* der Stromspuren (*ClampFit 6.0*, *pClamp 6.0*, Molecular Devices, Axon, USA) berechnet. Folgende Substanzen wurden der Pipettenlösung zugesetzt, um ihre Wirkung an der intrazellulären Membranseite der Oozyten-*Patches* zu untersuchen: 10 μM PI_{4,5}P₂, 10 μM PI_{3,5}P₂, 10 μM PI_{3,4,5}P₃, 10 μM PI3K-IA-p110 α (+ 1 mM ATP), 1 μM PTEN [LU *et al.*, 2005].

In diesen Messungen konnte nur im Falle des PI_{4,5}P₂ ein Unterschied im Verhalten, speziell dem Desensibilisierungsverhalten, des P2X₂R festgestellt werden. Dieser äußerte sich in einem signifikant verlangsamten (Zeitkonstante τ) und einem um die Hälfte geringeren Abfall des Rezeptorstroms („I_{Ende}“-Wert) (s. *Abb. 3.33.b* und *3.33.c*). Eine beispielhafte Originalmessung dieser Versuchsreihe mit diC₈-PI_{4,5}P₂-versetzter Pipettenlösung ist in *Abb. 3.33.a* (*rechts*) gezeigt. Hier wird auch deutlich, dass zusätzlich das elektrische Rauschen des Kanals verändert war: durch eine PI_{4,5}P₂-Applikation über die Pipettenlösung wurde das Rauschen des offenen P2X₂ Kanals offenbar verstärkt. Sämtliche anderen untersuchten und applizierten Komponenten zeigten keinerlei Einfluss auf den Rezeptorstrom bzw. sein Verhalten (s. *Abb. 3.33.b* und *3.33.c*).

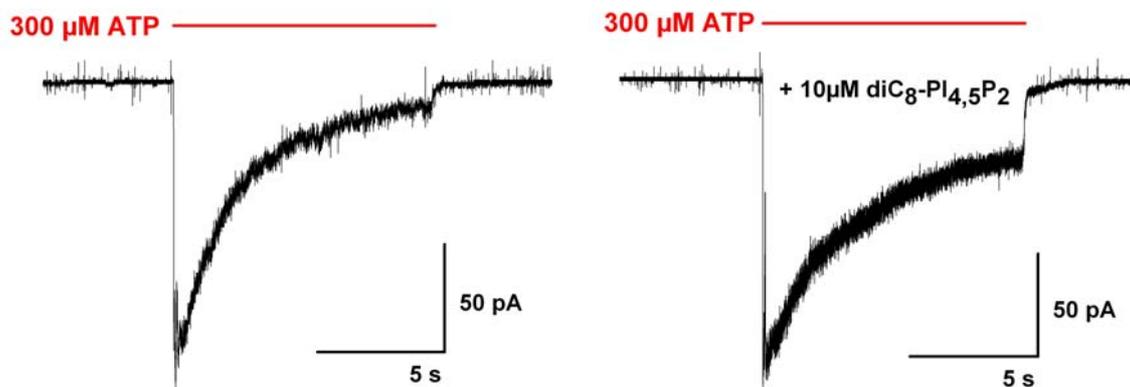


Abb. 3.33.a: Beispielhafte Original-Stromspuren aus *outside out-Patch Clamp*-Messungen an P2X₂R exprimierenden Oozyten. Es handelte sich um maximale Rezeptoraktivierungen (300 μM ATP), die Dauer der Aktivierung betrug jeweils 10 s. Das Haltepotential lag bei -60 mV. **Links:** Kontroll-Messungen mit reiner Pipettenlösung, **rechts:** Messungen in Anwesenheit von 10 μM PI_{4,5}P₂, intrazellulär appliziert durch die Pipettenlösung. Die Anwesenheit des Phospholipids verlangsamte die Desensibilisierung, was sich in einer größeren Zeitkonstante τ sowie einem prozentual größeren, nach 10-sekündiger Aktivierung verbleibenden Rezeptorstrom äußerte. Ebenso war das Offen-Kanal-Rauschen verstärkt.

3. Ergebnisse

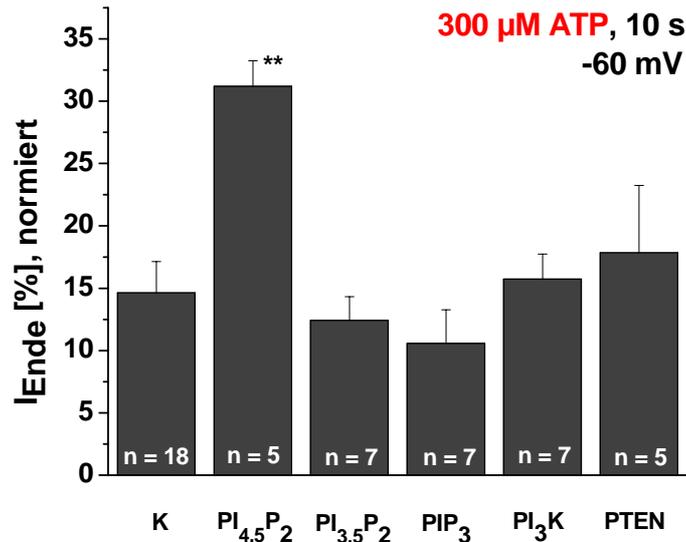


Abb. 3.33.b: PI_{4,5}P₂, intrazellulär appliziert, führte zu einer signifikant geringer ausgeprägten Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptorstroms bei maximaler Rezeptoraktivierung (300 μM ATP, V_m = -60 mV). Aufgetragen sind die verbleibenden, ATP-vermittelten Rezeptorströme nach 10-sekündiger Agonisten-Applikation relativ zur initialen Stromantwort („I_{Ende}“ = I_{t=10 s}/I_{t=0 s}). Während in den Kontroll-Zellen („K“, reine Pipettenlösung) und auch sämtlichen anderen getesteten Substanzen (s. Text) der Rezeptorstrom innerhalb von 10 s auf ca. 15-17 % der initialen Stromantwort abfiel, konnte mit PI_{4,5}P₂ ein verbleibender Rezeptorstrom von im Mittel 31 % beobachtet werden (Mittelwerte ± Standardfehler, student's t-Test, p < 0,05).

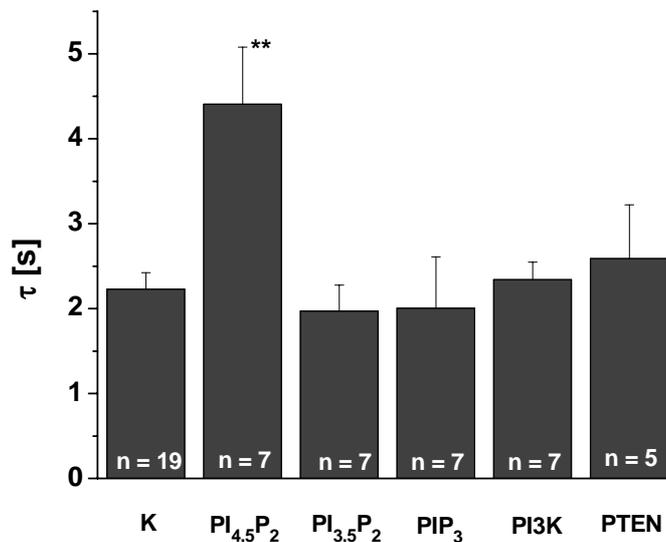


Abb. 3.33.c: PI_{4,5}P₂, intrazellulär appliziert, führte zu einer signifikant verlangsamten Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptorstroms bei maximaler Rezeptoraktivierung (300 μM ATP, 10 s, V_m = -60 mV). Dargestellt sind die Zeitkonstanten τ aus exponentiellen fits der Originalströme. In Übereinstimmung mit den in Abb. 3.33.b dargestellten, größeren „I_{Ende}“-Werten zeigte sich die desensibilisierungs-hemmende Wirkung des PI_{4,5}P₂ auf den P2X₂ Rezeptorstrom ebenfalls in der Kinetik: die Desensibilisierung des Rezeptorstroms in Anwesenheit dieses Phosphoinositids besaß eine doppelt so große Zeitkonstante (4,4 s) wie die der Kontroll-Messungen („K“, 2,2 s). Sämtliche anderen getesteten Substanzen (s. Text), die intrazellulär über die Pipettenlösung appliziert wurden, zeigten keinerlei Beeinflussung dieses Parameters (Mittelwerte ± Standardfehler, student's t-Test, p < 0,05).

Nicht gezeigt sind weitere Kontrollmessungen mit 1 mM ATP (Kontrolle bezüglich der PI3K-Messungen, ATP diente hier als Substrat) sowie mit dem unter 2.3.3 beschriebenen PI-

Lösungsmittels, in dem $\text{PI}_{3,5}\text{P}_2$ und $\text{PI}_{3,4,5}\text{P}_3$ gelöst vorlagen. Diese Substanzen zeigten keinerlei Einfluss auf den $\text{P2X}_2\text{R}$.

3.3.2 Einzelkanal-Ableitungen des $\text{P2X}_2\text{R}$

Zusätzlich wurden erste vorläufige Einzelkanal-Messungen durchgeführt, ebenfalls mit unterschiedlichen, intrazellulär über die Pipettenlösung applizierten Substanzen. Mithilfe von Quarzglas und einem gut abgeschirmten *Setup* war es möglich, sehr rauscharme Messungen von Einzelkanalaktivitäten des $\text{P2X}_2\text{R}$ aufzunehmen. Die applizierte ATP-Konzentration betrug jeweils $3\ \mu\text{M}$, das Haltepotential $-100\ \text{mV}$. *Abb. 3.34.a* zeigt eine beispielhafte Original-Messung von Einzelkanälen des $\text{P2X}_2\text{R}$. Die Signalamplitude betrug im Mittel $1\ \text{pA}$, summierte sich bei gleichzeitiger Öffnung mehrerer Kanäle dementsprechend auf. Darüber hinaus konnte man das für diesen Rezeptor typische starke „Rauschen“ im offenen Zustand beobachten [DING & SACHS, 1999].

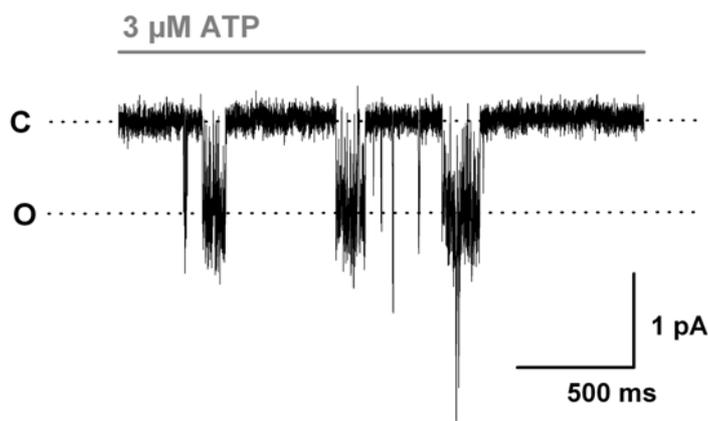


Abb. 3.34.a: Beispielhafte Original-Stromspuren aus *outside out*-Einzelkanal-Patch Clamp-Messungen an $\text{P2X}_2\text{R}$ exprimierenden Oozyten (ATP-Konzentration = $3\ \mu\text{M}$, $V_m = -100\ \text{mV}$, Quarzglas). Markiert sind der geschlossene (C) und der offene (O) Zustand (Details s. *Text*).

Jedoch war es bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht möglich, eine ausreichend hohe Anzahl an Mehrfachbestimmungen dieser Art von Messungen durchzuführen, aufbauend auf den o. g. Ergebnissen, was unter anderem in der saisonbedingten, weniger guten Qualität der Oozyten als auch an den hohen (sommerlichen) Temperaturen im Labor begründet war, die stabile Messungen nahezu unmöglich machten (vgl. [Weber, 1999]).

Es konnte jedoch mehrfach beobachtet werden, dass über die Pipettenlösung appliziertes $(\text{diC}_8\text{-})\text{PI}_{4,5}\text{P}_2$ ($10\ \mu\text{M}$) offenbar eine stimulierende Wirkung auf den $\text{P2X}_2\text{R}$ hatte, wie nachfolgende Abbildungen zeigen (*Abb. 3.34.b*):

3. Ergebnisse

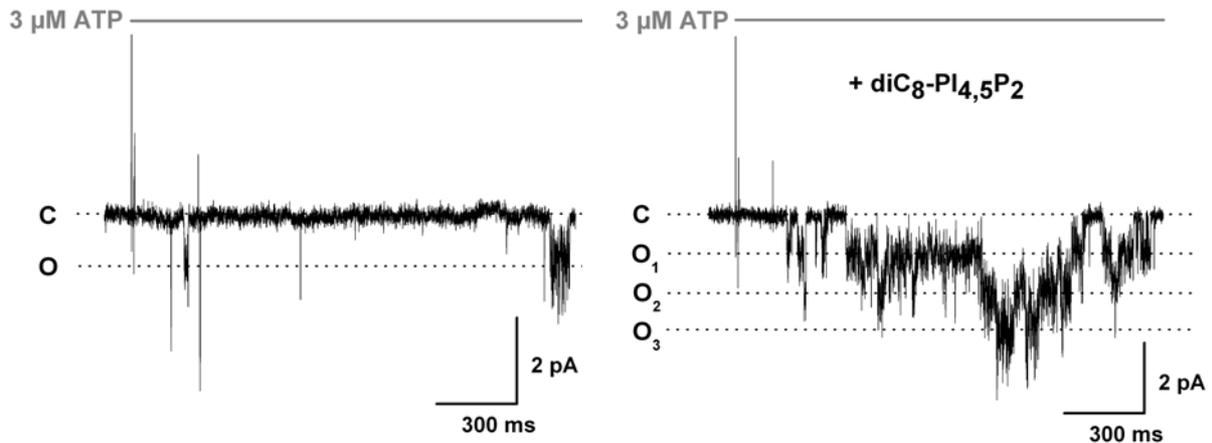


Abb. 3.34.b: Beispielhafte Original-Stromspuren aus *outside out*-Einzelkanal-Patch Clamp-Messungen an P2X₂R exprimierenden Oozyten (ATP-Konzentration = 3 μM, $V_m = -100$ mV, Quarzglas). *Links:* Messung mit reiner Pipettenlösung, *rechts:* Messung mit 10 μM PI_{4,5}P₂, intrazellulär appliziert über die Pipettenlösung. Beide *Patches* stammten von einer einzigen Oozyte, zudem aus derselben Region. Die Messungen wurden direkt hintereinander durchgeführt. PI_{4,5}P₂ schien eine „aktivierende“ Wirkung auf den P2X₂R zu besitzen, da die Stromantworten unter identischen Bedingungen (erste 1,7 s nach Agonisten-Applikation) stark unterschiedlich ausfielen. Dieses Verhalten wurde mehrfach beobachtet. C und O markieren die geschlossen (C) und Offen-(O)-Zustände, O₁ bis O₃ die Anzahl geöffneter Kanäle.

In diesen Messungen wurde bei einem Haltepotential von -100 mV eine ATP-Konzentration von 3 μM appliziert und für die folgenden 30 s die Einzelkanalereignisse aufgezeichnet. *Abb. 3.34.b* zeigt die originalen Stromspuren der Rezeptorantworten (erste 1,7 s) zweier unterschiedlicher *Patches* einer Zelle (identischer Membranbereich), die zeitlich direkt nacheinander aufgenommen wurden. *Links* sind die Einzelkanalereignisse mit reiner Pipettenlösung aufgezeichnet, direkt nach Starten der Agonisten-Applikation. Man kann lediglich 2 Öffnungsereignisse erkennen, während unter gleichen Bedingungen, jedoch mit intrazellulär präsentem PI_{4,5}P₂ die Einzelkanalaktivität spontan zunahm (*rechts*), wodurch die Differenzierung in einzelne Ereignisse fast nicht mehr möglich war.

Es muss an dieser Stelle noch einmal wiederholt werden, dass es sich bei diesen Einzelkanal-Messungen lediglich um vorläufige Ergebnisse handelt, da es bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht möglich war, ausreichend und qualitativ verwendbare Mehrfachbestimmungen durchzuführen. Diese offensichtlich stimulierende Wirkung des intrazellulär verabreichten PI_{4,5}P₂ auf die Einzelkanal-Leitfähigkeit P2X₂R konnte jedoch mehrfach an unterschiedlichen Zellen beobachtet werden. Damit unterstützen diese vorläufigen Einzelkanal-Messungen die an makroskopischen Rezeptorströmen im *Patch Clamp*-Versuch gewonnenen Ergebnisse einer signifikant aktivierenden Wirkung dieses Phosphoinositids. Alle anderen untersuchten Substanzen (PI_{3,5}P₂, PI_{3,4,5}P₃, PI3K (+ATP), PTEN) zeigten ein derartiges Verhalten nicht (*nicht gezeigt*).

3.4 P2X Rezeptormutanten: elektrophysiologische Charakterisierung

Da FUJIWARA & KUBO [2006] zeigen konnten, dass Wortmannin einen Einfluss auf das Desensibilisierungsverhalten des P2X₂R hat, und auch in dieser Arbeit die Inhibition der PI3K/PI4K mit Wortmannin (vgl. 3.2/Abb. 3.27) die Desensibilisierung des P2X₂R wie auch den „Ci-VSP-Effekt“ deutlich verstärkte, wurde nach potentiellen Interaktionsregionen des P2X₂ Rezeptormoleküls mit der PI3/PI4-Kinase und anderen, verwandten Enzymen (z.B. *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK), *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK), PI4K, etc.) gesucht, und zwar vorwiegend im C-Terminus, von dem ohnehin schon bekannt ist, dass sein proximaler Abschnitt die Desensibilisierung stark beeinflusst [NORTH, 2002]. Zudem ist der C-Terminus des P2X₂ Subtyps deutlich länger als bei den meisten anderen Subtypen (lediglich der des P2X₇R ist noch größer) und mit keinem der anderen Subtypen konnte – bisher – eine Interaktion mit der Ci-VS-Phosphatase gezeigt werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass der distale Teil des P2X₂R C-Terminus eine bedeutendere Rolle in der Regulation der Rezeptordesensibilisierung und auch im „Ci-VSP-Effekt“ spielt als bisher in der Literatur angenommen.

In eben diesem Teil des C-Terminus befindet sich die Konsensus-Sequenz eines SH3-Bindungs-Motivs (XPpXP, [WITTER *et al.*, 1998], wobei X eine aliphatische AS und p vorzugsweise ebenfalls ein Prolin ist, Details s. 2.7), einer prolinreichen Region [MASIN *et al.*, 2006], die bevorzugt mit SH3-Epitopen interagiert. An anderen Stellen in der Literatur werden Konsensus-Sequenzen von SH3-Bindungs-Motiven lediglich mit PXXP angegeben [SHIN *et al.*, 2007]. *Src-homology-3*-(SH3)-Epitope sind kleine Proteinmodule, die sich in einigen zellulären Proteinen finden und die Protein-Protein-Interaktionen in vielen essentiellen zellulären Signal-Transduktionswegen bedingen. Die konservierten AS-Sequenzen der SH3-Domänen beinhalten 50-100 Aminosäurereste und binden an prolinreiche Bindungspartner über flache hydrophobe Lücken in der SH3-Domänen-Oberfläche. Diese Liganden tragen sämtlichst *o. g.* Konsensus-Sequenz. Die PI3K, wie auch die PI4K sind ebenfalls Proteine, die ein SH3-Epitop tragen, worüber sie mit anderen Zellproteinen, u. a. auch Membranproteinen [GEHRMANN & HEILMEYER, 1998; YUDOWSKI *et al.*, 2000], wechselwirken können. So bindet z. B. die PI3K- α über SH3-Epitop-Bindung an die prolinreiche Region in der katalytischen Domäne der Na⁺-K⁺-ATPase und bedingt somit eine Aktivierung derselben [YUDOWSKI *et al.*, 2000].

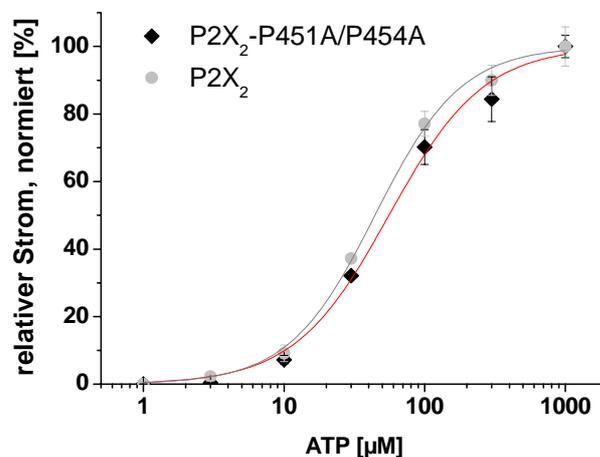
In der prolinreichen, potentiellen Bindungsdomäne (R450-P454, s. Abb. 1.4) des distalen C-Terminus des P2X₂R wurden in dieser Arbeit das 1. und das 4. Prolin gegen jeweils ein neutrales Alanin ausgetauscht (P2X₂-P451A/P454A-Rezeptor; s. 2.7, [vgl. SHIN *et al.*, 2007]),

3. Ergebnisse

was ein SH3-Bindungs-Motiv als solches zerstört [CANDEL *et al.*, 2008]. Die möglichen Auswirkungen dieses synthetisch herbeigeführten Defekts auf die Funktion bzw. Regulation/Desensibilisierung des P2X₂ Rezeptors wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht. Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Mutante eine deutlich höhere Expressionsrate zeigte als der Wildtyp, da nach gleichen Injektionsmengen (0,05 ng) Rezeptorströme gemessen wurden, die *ca.* das 20-fache des Wildtyp-Rezeptors betragen. Aus diesem Grund wurde die injizierte RNA-Menge auf 0,025 und 0,013 ng reduziert.

Bestimmungen der Dosis-Wirkungs-Beziehungen (*vgl.* 3.2.1; Bestimmung durch Hill-plots, Origin 7G (OriginLab, USA)) für den Wildtyp und die Rezeptormutante zeigten keine Unterschiede, weder im EC₅₀-Wert für ATP (wt-P2X₂R = 44 ± 2 μM ATP, P2X₂-P451A/P454A = 56 ± 4 μM), noch im Hill-Koeffizienten (n_H = 1,4 bzw. 1,3), *s. Abb. 3.35* (*student's t-Test*).

Abb. 3.35: Dosis-Wirkungs-Beziehungen der P2X₂-P451A/P454A-Rezeptormutante (◆) im Vergleich zum Wildtyp (●). V_m = -60 mV. Die Werte wurden auf den Maximalstrom normiert und anschließend durch die Kurve ein Hill-plot gelegt (Details *s. Text*). Es konnte kein Unterschied in den Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen den beiden Versuchsgruppen beobachtet werden. Mittelwerte ± Standardfehler, n = 6.



Auch die IV-Kennlinien beider untersuchter Rezeptoren zeigten keine auffälligen Unterschiede (*s. Abb. 3.36, vgl. 3.2.1*). Beide wiesen die typische, starke Einwärtsrektifizierung auf. Da unterschiedliche RNA-Konzentrationen eingesetzt wurden und leicht unterschiedliche Stromwerte erzielt wurden, wurden die Ergebnisse zudem auf den Maximalwert (bei -120 mV) normiert, um die ermittelten Graphen besser vergleichen zu können (*s. Abb. 3.36, rechts*).

3. Ergebnisse

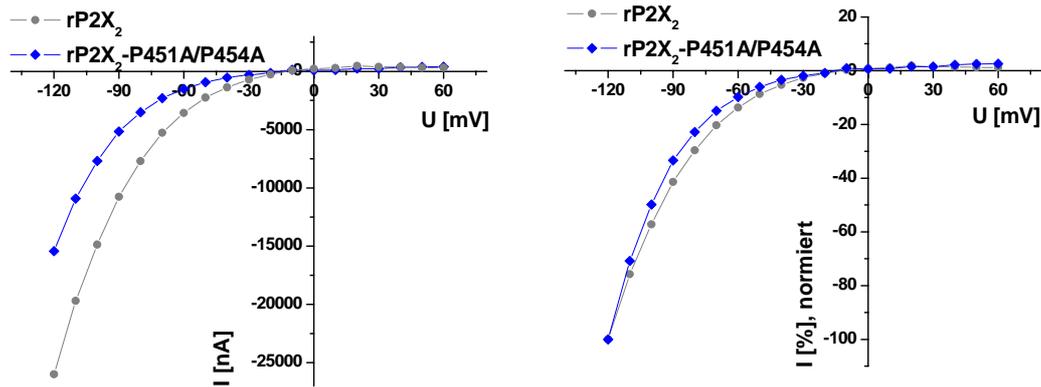


Abb. 3.36: IV-Beziehungen von P2X₂R exprimierenden (Kontrollen, ●) und P2X₂-P451A/P454A exprimierenden Oozyten (◆) in Anwesenheit von 30 μM ATP (Einzelzellen). Angelegt wurden Haltepotentiale von -120 bis +60 mV in Abständen von 10 mV, die Dauer der Spannungssprünge betrug 500 ms. **Links:** Die Graphen zeigen den reinen, ATP-vermittelten Strom (Leckstrom-korrigiert). Es war kein Unterschied in den Strom-Spannungs-Beziehungen zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen. **Rechts:** Auftragung der auf den Maximalstrom normierten Werte, um die IV-Beziehungen vergleichbar zu machen.

Im weiteren Verlauf wurde das Desensibilisierungsverhalten der P2X₂-P451A/P454A-Mutante überprüft. Hierfür wurden sowohl halb-maximal (30 μM) als auch maximal aktivierende (300 μM) ATP-Konzentrationen appliziert und der verbleibende, ATP-vermittelte Strom nach 300 s gemessen.

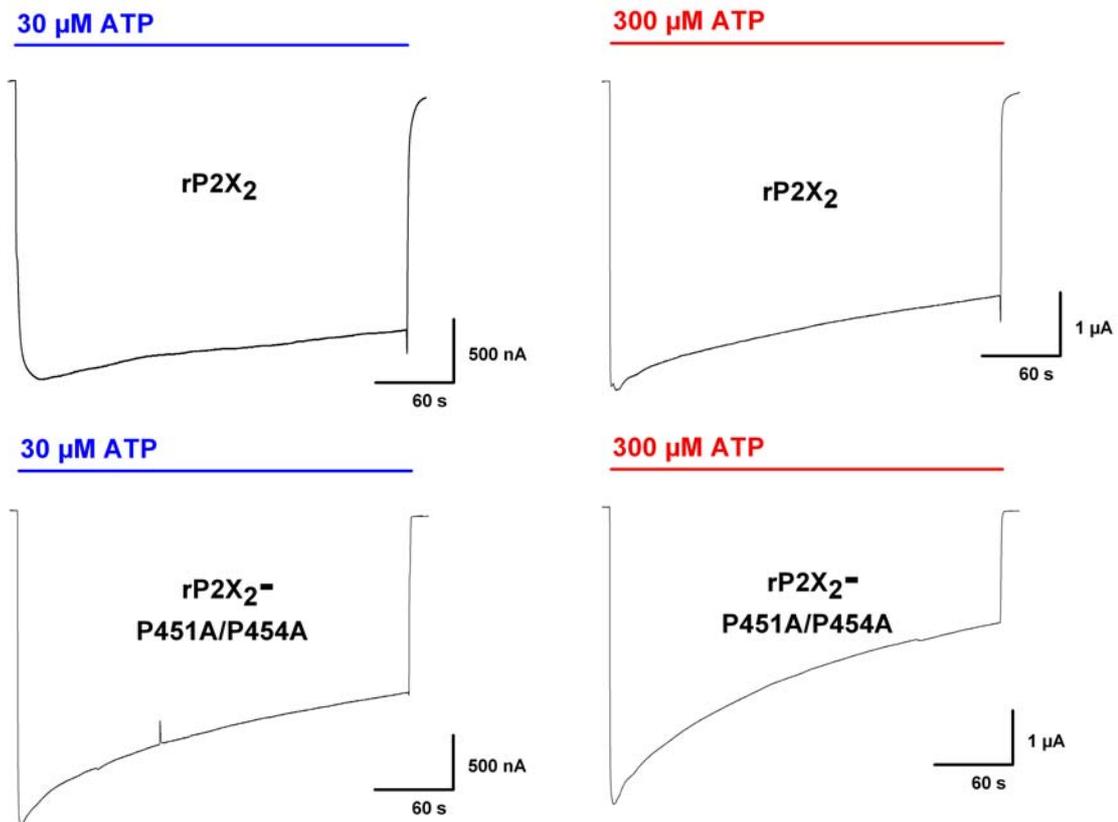


Abb. 3.37.a: Beispielhafte Originalströme von wt-P2X₂R exprimierenden (Kontrolle, oben) und P2X₂-P451A/P454A-Rezeptor exprimierenden Oozyten (unten) in Antwort auf halb-maximale (30 μM, links) sowie maximale (300 μM ATP, rechts) Aktivierungskonzentrationen. Die Applikationsdauer betrug 300 s, das Haltepotential -60 mV. Die Rezeptormutante zeigte unter beiden ATP-Konzentrationen ein hochsignifikant verstärktes Desensibilisierungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp.

3. Ergebnisse

Während der Wildtyp unter beiden Agonisten-Konzentrationen lediglich eine sehr geringe Desensibilisierung zeigte („I_{Ende}“ = 80 bzw. 56 %), war diese bei der Mutante hochsignifikant stärker ausgeprägt, die verbleibenden, prozentualen Stromantworten betragen nach 300-sekündiger Aktivierung nur noch 64 % (30 μ M) bzw. 41 % (300 μ M), also jeweils *ca.* 3/4 des entsprechenden Kontrollwertes des Wildtyps (s. Abb. 3.37.a und 3.37.b).

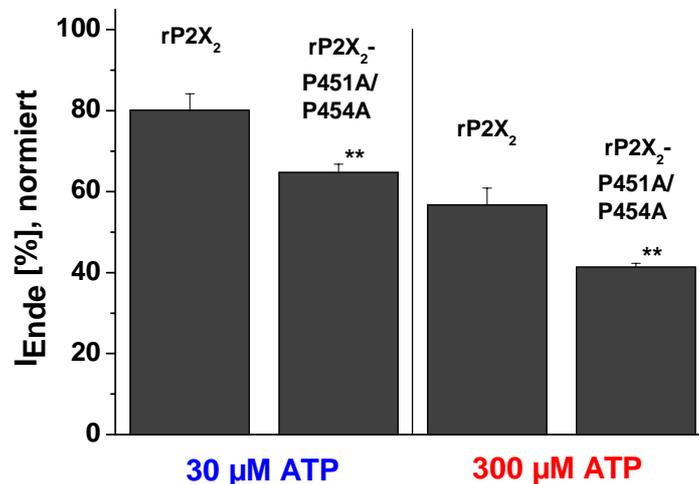


Abb. 3.37.b: Der P2X₂-P451A/P454A-Rezeptor desensibilisierte stärker als der Wildtyp, sowohl unter halb-maximalen (30 μ M) als auch maximalen (300 μ M ATP) Aktivierungskonzentrationen. Dargestellt sind die normierten, prozentual verbleibenden Rezeptorströme nach 300-sekündiger Aktivierung („I_{Ende}“, s. o.). V_m = -60 mV, Mittelwerte \pm Standardfehler, Wildtyp: n = 7, Mutante: n = 6; ***student's t*-Test, p < 0,01)

Da der P2X₂-P451A/P454A-Rezeptor eine verstärkte Desensibilisierung bei anhaltender Agonisten-Applikation zeigte, wurde das Depolarisations-Messprotokoll (TEVC) in Verbindung mit einer synchronen Ci-VSP-Expression auch an dieser Mutante getestet (vgl. 3.2), jedoch nur mit maximalen Aktivierungs-Konzentrationen (300 μ M), um einen größtmöglichen Effekt zu erzielen. Die Depolarisations-Potentiale betragen 0 mV. Im Anschluss an die jeweiligen Messungen wurde ebenfalls das „Erholungs“-Messprotokoll (s. o.) durchgeführt, um eine potentiell veränderte Erholung des Rezeptorstroms nach Herunterregulierung durch Ci-VSP detektieren zu können.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zum Verhalten der Mutante und Ci-VSP Coexpressions- und Aktivierungsbedingungen sind in Abb. 3.38.a dargestellt. Der herunterregulierende Effekt von Ci-VSP auf die Mutante war – im Vergleich zum wt-P2X₂R - hochsignifikant verstärkt, die Desensibilisierungs-Kinetik zudem beschleunigt: der verbleibende ATP-vermittelte Strom am wt-Rezeptor betrug nach 5-minütiger Depolarisation in Anwesenheit von maximalen Aktivierungskonzentrationen von ATP 26,6 %, der der Mutante lediglich 10,8 %. Damit glich der Verlauf der Desensibilisierung des P2X₂R-Mutantenstroms bei Ci-VSP-Aktivierung stark dem der Desensibilisierung des wt-

3. Ergebnisse

Rezeptorstroms unter Wortmannin-Inkubations-Bedingungen (ca. 5 %) was in der *Abb. 3.38.b* (bzw. *vgl. 3.28*) noch einmal verdeutlichend gegenüber gestellt wurde.

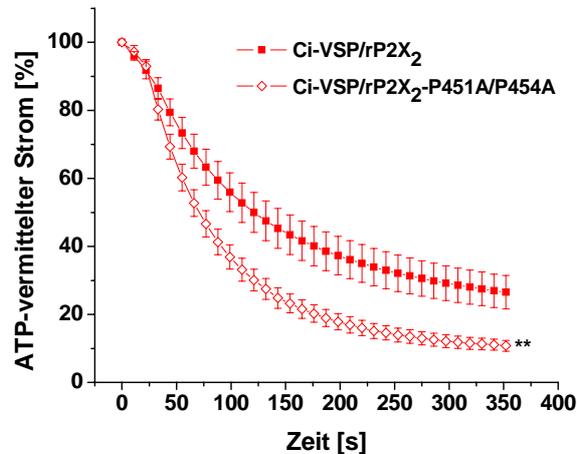


Abb. 3.38.a: Herunterregulierung des ATP-vermittelten P2X₂-P451A/P454A Rezeptorstroms (◇) nach Ci-VSP-Aktivierung durch Depolarisation auf 0 mV im Vergleich zum Wildtyp (■). Die eingesetzte ATP-Konzentration betrug 300 μM. Der „Ci-VSP“-Effekt war bei der Mutante stärker ausgeprägt als beim wt-Rezeptor, und ähnelte in seinem Verlauf dem des Wildtyps unter PIK-Inhibitor-Einfluss (Wortmannin), *vgl. 3.27.b* (Mittelwerte ± Standardfehler, WT: n = 7, Mutante : n = 6, **student's t-Test, p < 0,01).

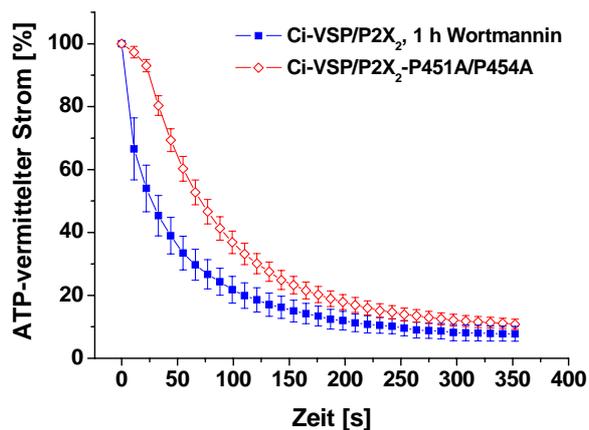
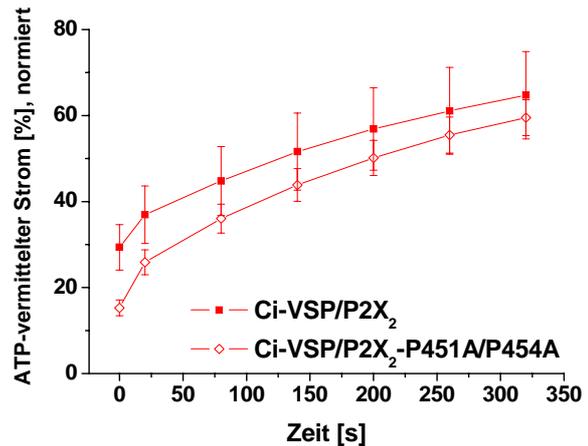


Abb. 3.38.b: Der „Ci-VSP-Effekt“ auf den mutierten P2X₂R glich dem „Ci-VSP-Effekt“ auf den wt-P2X₂R unter PIK-Inhibitions-Bedingungen. Vergleich des „Ci-VSP-Effekts“ auf Ci-VSP/wt-P2X₂R coexprimierende Oozyten (■, 30 μM ATP, *vgl. Abb. 3.27*), die 1 h vor Messbeginn mit 30 μM Wortmannin behandelt wurden und auf Ci-VSP/P2X₂R-P451A/P454A coexprimierende Oozyten (◇, 300 μM ATP, *vgl. Abb. 3.37.a*). Darstellung von Mittelwerten ± Standardfehlern nach Durchführung des Depolarisations-Messprotokolls (*Abb. 3.14*, 0 mV).

In den dort gezeigten Messungen wurden zwar unterschiedliche ATP-Konzentrationen verwendet, jedoch konnte an anderer Stelle dieser Arbeit (s. 3.2.2.6) gezeigt werden, dass der „Ci-VSP-Effekt“ bei halb- und bei maximalen ATP-Konzentrationen gleich war, so dass ein Vergleich von Messungen unterschiedlicher Agonisten-Konzentrationen an dieser Stelle zulässig ist.

3. Ergebnisse

Abb. 3.39: „Erholung“ aus der Desensibilisierung nach Durchführung des Depolarisations-Messprotokolls (Abb. 3.42a) an Ci-VSP/P2X₂R (Kontrolle, ■) bzw. Ci-VSP/P2X₂-P451A/P454A – Rezeptor coexprimierenden (◇) Oozyten. Es wurde in Abständen von 60 s der ATP-vermittelte Rezeptorstrom ($V_m = -60$ mV) getestet und so die Rückkehr aus der Desensibilisierung über 6 min beobachtet. Es konnte kein Unterschied der „Erholung“ zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (Mittelwerte \pm Standardfehler, WT: n = 7; Mutante: n = 6).



Während im Depolarisations-Protokoll deutliche Unterschiede zwischen den Wildtyp- und mutiertem Rezeptor beobachtet werden konnten, zeigten sie im „Erholungs“-Messprotokoll keine Differenzen (Abb. 3.39, vgl. Abb. 3.24). Die Erholung aus dem desensibilisierten Zustand war in gleichen Maßen ausgeprägt.

Wie aus den vorangegangenen Messungen entnommen werden kann, war die Herunterregulierung der Mutante verstärkt und die Messungen mit coexprimiertem Ci-VSP ähnelten stark denen unter Wortmannin-Einfluss. Aus diesem Grund lag es nahe, den Einfluss von Wortmannin, dem schon unter 3.2.2.9 eingesetzten PIK-Inhibitor, ebenfalls an der Mutante zu untersuchen. Es wurden Messungen durchgeführt, die identisch zu den unter 3.2.2.9/Abb. 3.27 aufgeführten Messungen waren (100 μ M ATP, 100 s, $V_m = -60$ mV; 30 μ M Wortmannin-Inkubation 1 h vor der Messung), um die Vergleichbarkeit (auch mit den Studien von FUJIWARA & KUBO, 2006) zu wahren. In diesen Messungen konnte wiederholt der Einfluss einer PIK-Hemmung auf den Wildtyp gezeigt werden, jedoch hatte der Einsatz von 30 μ M Wortmannin überhaupt keinen Einfluss mehr auf die Rezeptorströme der Mutante, wie Abb. 3.40 zeigt. Der Wildtyp desensibilisierte unter Kontroll-Bedingungen auf *ca.* 80 % des initialen Stroms, nach Wortmannin-Behandlung auf das doppelte, *ca.* 40 %. Die Mutante desensibilisierte in beiden Fällen auf Werte um 60 %, und unterschied sich somit sowohl unter halb-maximalen als auch unter maximalen Rezeptoraktivierungs-Bedingungen hochsignifikant vom Wildtyp.

3. Ergebnisse

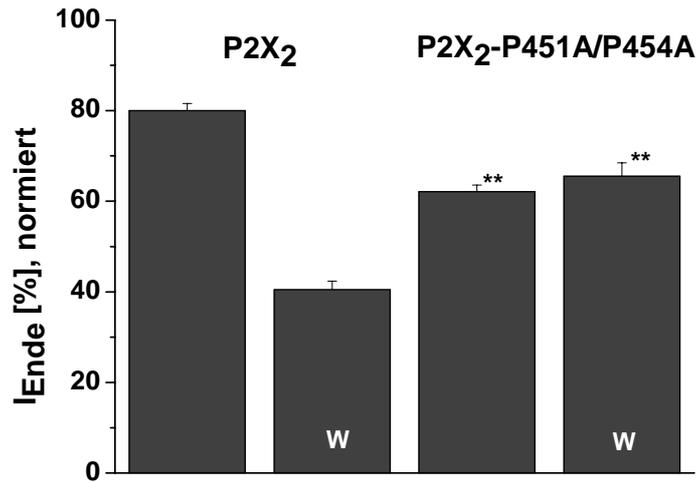
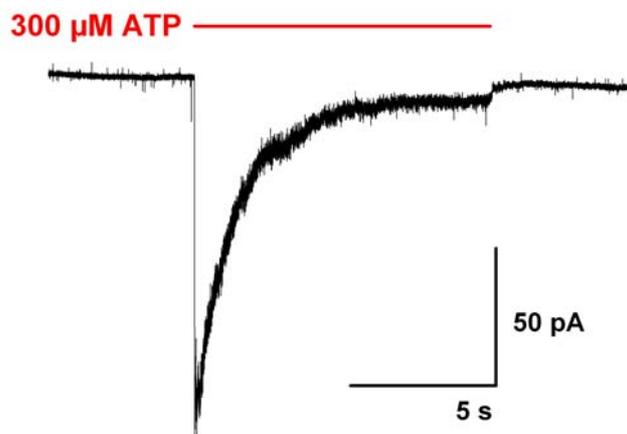


Abb. 3.40: Einfluss einer PIK-Inhibition von Wortmannin auf das Desensibilisierungsverhalten der P2X₂-P451A/P454A-Rezeptormutante im Vergleich zum Wildtyp. ATP-Konzentration = 100 μM , Applikationsdauer 100 s, $V_m = -60$ mV. Die Wortmannin-behandelten Zellen wurden eine Stunde vor der Messung in 30 μM Wortmannin (in ORI + Ca^{2+}) inkubiert. Dargestellt sind die normierten, nach 100-sekündiger Aktivierung verbleibenden Rezeptorströme. Während Wortmannin großen Einfluss auf die Desensibilisierung des Wildtyps (*links*) hatte, und sie um das doppelte verstärkte, hatte eine PIK-Inhibition auf den mutierten Rezeptor (*rechts*) keinerlei Auswirkung, die Desensibilisierung war in beiden Fällen gleich stark ausgeprägt (62 bzw. 65 %), und unterschied sich somit jeweils hochsignifikant vom Kontrollwert (Wildtyp), Mittelwerte \pm Standardfehler, jeweils $n = 5$; ***student's t-Test*, $p < 0,001$.

Da bekannt ist, dass sich der P2X₂R im zellfreien *Patch* anders verhält als unter Ganzzell-Ableitungen (s. 3.3), sollte die hier hergestellte Rezeptormutante ebenfalls daraufhin untersucht werden, ob und wie sie sich in *Patch Clamp*-Messungen vom Wildtyp unterscheidet. Aus diesem Grunde wurden *outside out-Patch Clamp*-Experimente an der P2X₂-P451A/P454A-Rezeptormutante herangezogen, die in ihrer Durchführung den in 3.3 (Abb. 3.33.b und 3.33.c) beschriebenen glichen. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden anschließend mit denen des Wildtyps verglichen. Der Abb. 3.41.a kann eine beispielhafte Messung der makroskopischen Ströme der Rezeptormutante im *outside out-Patch* entnommen werden.

Abb. 3.41.a: Beispielhafte Originalmessung des P2X₂-P451A/P454A-Rezeptors im *outside out-Patch Clamp*-Experiment an einer Oozyte. Die ATP-Konzentration war sättigend und betrug 300 μM . Die Applikationsdauer betrug 10 s, $V_m = -60$ mV. Der mutierte Rezeptor verhielt sich im zellfreien *Patch* nicht anders als der Wildtyp (vgl. Abb. 3.33.a, *links*); auch hier konnte die, anders als im TEVC-Experiment, starke Desensibilisierung beobachtet werden. Nach 10-sekündiger Agonisten-Applikation war nur noch ein Bruchteil bzw. kein verbleibender Rezeptorstrom vorhanden.



Es wurden ebenfalls, wie unter 3.3 beschrieben, die nach 10-sekündiger ATP-Applikation (300 μM) verbleibenden, prozentualen Rezeptorströme ($I_{\text{Ende}}^{\text{normiert}}$) sowie die Zeitkonstanten τ

3. Ergebnisse

aus den exponentiellen *fits* bestimmt (s. Abb. 3.41.b, vgl. Abb. 3.33). Im Gegensatz zu den deutlich erkennbaren Unterschieden im TEVC-Experiment zeigte die Mutante in *Patch Clamp*-Messungen im Vergleich zum Wildtyp kein verändertes Verhalten, sowohl die „ I_{Ende} “-Werte (12,5 bzw. 14,5 %) als auch die Zeitkonstanten τ waren nahezu identisch (2,1 s im Falle der Rezeptormutante, 2,2 s im Falle des wt-Rezeptors).

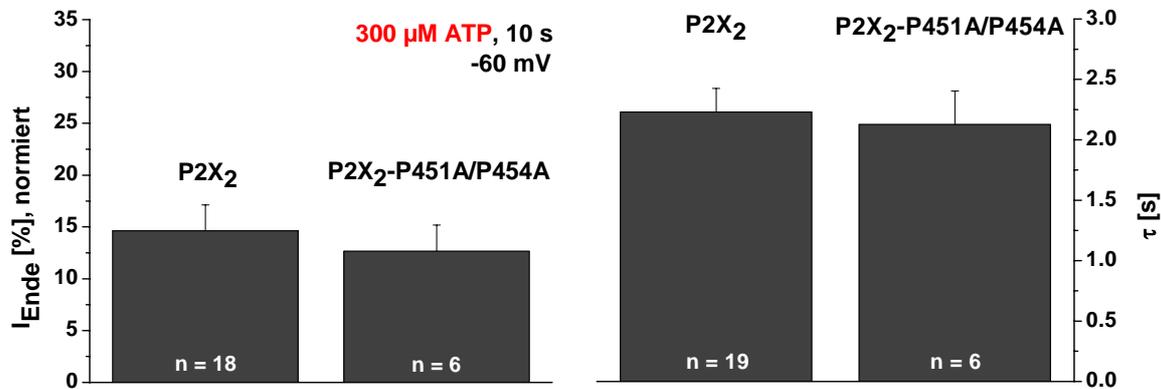


Abb. 3.41.b: Der mutierte P2X₂-P451A/P454A-Rezeptor zeigte im zellfreien (*outside out*-) *Patch* ein zum Wildtyp identisches Verhalten. Die ATP-Konzentration war sättigend (300 μM), die Applikationsdauer betrug 10 s, $V_m = -60$ mV. **Links:** nach 10-sekündiger ATP-Applikation verbleibende, normierte Rezeptorströme („ I_{Ende} “, s. o.), **rechts:** Zeitkonstanten τ der Desensibilisierungs-Kinetiken, berechnet durch exponentielle *fits* der Original-Stromspuren (Mittelwerte \pm Standardfehler, *student's t*-Test, $p < 0,05$).

Somit konnten für die Rezeptormutante in Ganzzell-Ableitungen signifikante Unterschiede in ihrem Desensibilisierungsverhalten beobachtet werden, das deutlich ausgeprägter gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor war. Jedoch gab es in *Patch Clamp*-Messungen bezüglich dieser Parameter keinerlei Unterschiede zum Wildtyp, beide desensibilisierten vergleichbar schnell und auf identische „ I_{Ende} “-Werte. Da das bei der P2X₂-P451A/P454A-Mutante verstärkte Desensibilisierungsverhalten nur in intakten Zellen zum Tragen kam, kann an dieser Stelle bereits angenommen werden, dass es sich bei dem hier durch gerichtete Mutagenese zerstörten SH3-Bindungsmotiv im distalen Bereich des C-Terminus um eine für die Rezeptor-Desensibilisierung essentielle Interaktionsregion mit zellulären Modulatoren/Proteinen handelt, die im zellfreien *Patch* ausgewaschen waren. Ob es sich dabei um eben jenen – unbekanntes – Modulator handelt, von dem auch DING & SACHS [1999/2000] berichten, wird unter anderem im folgenden Kapitel näher beleuchtet und diskutiert werden.

4. Diskussion

4.1 Aminoglykosid-Block von P2X Rezeptoren

Ein Nebenaspekt der vorliegenden Dissertation war die elektrophysiologische Untersuchung der hemmenden Wirkung von Aminoglykosiden auf den P2X Rezeptor. Die Diskussion dieser Ergebnisse wird nun, wie auch im Ergebnisteil, unter *Kapitel 3*, vorgezogen und gesondert abgehandelt.

Bereits 1993 zeigten LIN und Kollegen, dass Aminoglykoside ATP-vermittelte Leitfähigkeiten in Haarzellen (*outer hair cells, OHC*) von Meerschweinchen inhibieren. Kurze Zeit später wurde durch andere Arbeitsgruppen belegt, dass diese Leitfähigkeiten auf Rezeptoren der P2X Familie basieren. Zunächst schien es, dass es sich dabei ausschließlich um P2X₂ Rezeptoren handelt [THORNE & HOUSLEY, 1999]. Jedoch wurde später gezeigt, dass diese *OHCs* eine ganze Reihe von P2X Rezeptor Subtypen exprimieren, P2X_{1,2,4,7} und darüber hinaus auch P2Y Rezeptoren wie P2Y_{1,2,4} [SZÜCS *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2005]. Aus diesem Grund wurde hier die durch AG verursachte Inhibition an heterolog in Oozyten exprimierten P2X₂ Rezeptoren näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass AG sowohl den P2X₂R als auch den chimären Rezeptor P2X_{2/1} reversibel und konzentrationsabhängig inhibieren. Der chimäre Rezeptor wurde in die Untersuchungen eingeschlossen, weil die ATP-Dissoziation von diesem Kanal deutlich langsamer von statten geht als am P2X₂R (*s. u.*).

Die am P2X₂R ermittelten Wirkstärken der AG-Inhibition (Wirksamkeitsreihenfolge: Streptomycin > Gentamicin > Neomycin > Paromomycin > Kanamycin) unterschieden sich beträchtlich von denen, die für *OHCs* gefunden wurden [LIN *et al.*, 1993]. An diesen Zellen war der AG-Block durch Neomycin (IC₅₀ 90 µM) deutlich stärker als der durch Streptomycin (IC₅₀ 169 µM) oder Gentamicin (IC₅₀ 190 µM; Kana- und Paromomycin wurden nicht getestet). Diese Differenz der AG-Wirkstärken aus der vorliegenden Arbeit und derer von LIN und Kollegen gefundenen erklärt sich durch die Tatsache, dass *OHCs* mitnichten nur den P2X₂R exprimieren (*s. o.*): unterschiedliche P2X Subtypen weisen unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber AG-Antibiotika auf, wie es hier am P2X₂R und der Rezeptorchimäre P2X_{2/1} gezeigt wurde.

Die Inhibition der P2X Rezeptoren durch Aminoglykoside zeigte schnelle *on set*- und *off set*-Kinetiken, sowohl am P2X₂R als auch am P2X_{2/1}R, von welchem bekannt ist, dass die Agonisten-Dissoziation von der Liganden-Bindungsstelle sehr langsam ist [RETTINGER & SCHMALZING, 2004]. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass der AG-Block an P2X Rezeptoren keine freien ATP-Bindungsstellen benötigt, also kein kompetitiver Wirkmechanismus vorliegt. Dies wurde auch dadurch bestätigt, dass eine Erhöhung der

4. Diskussion

Agonisten-Konzentration (30 (EC_{50}) auf 300 μ M ATP) bei gleicher AG-Konzentration (1 mM Neomycin) keinen Einfluss auf die Stärke der Inhibition hatte. Handelte es sich um einen kompetitiven Inhibitor, der mit dem Agonisten ATP um die gleiche Bindungsstelle konkurrierte, so wäre die Hemmwirkung von der Agonisten-Konzentration abhängig gewesen, wie es sich z. B. an der $P2X_{2/1}$ Rezeptorchimäre mit den kompetitiven Inhibitoren NF449 (Suramin-Analogon, [BRAUN *et al.*, 2001]) und TNP-ATP verhält, wie *Abb. 4.1* zeigt.

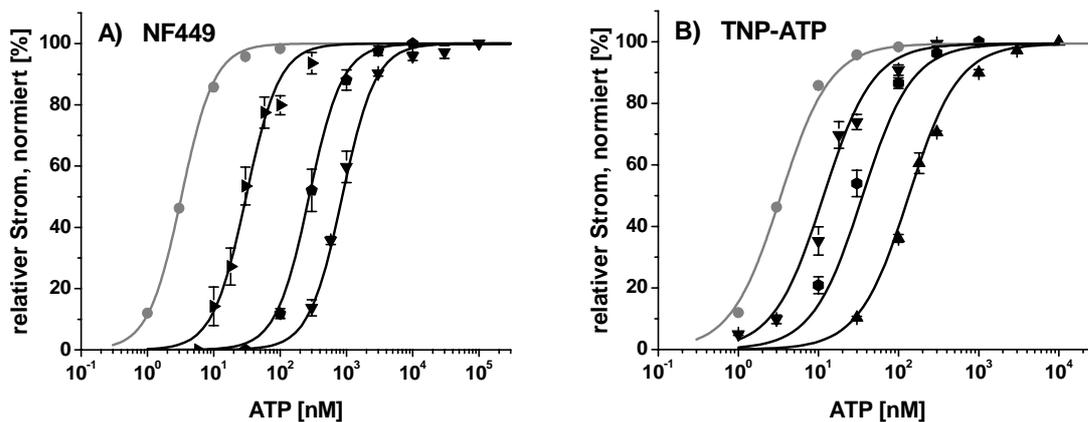


Abb. 4.1: Inhibition des chimären $P2X_{2/1}$ Rezeptors durch NF449 (A, links) und TNP-ATP (B, rechts). Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Abwesenheit (●) und Anwesenheit von 3 (▶), 30 (◆) und 100 nM (▼) NF449, bzw. 100 (▼), 300 (◆), und 1000 (▲) nM TNP-ATP. Ein simultaner Hill-*fit* ergab eine IC_{50} -Konzentration für NF449 von 0,29 nM mit einem Hill-Koeffizienten $n_H = 1,7$, was den Inhibitionscharakteristika von NF449 am $P2X_1R$ entspricht ($IC_{50} = 0,28$ nM) [RETTINGER *et al.*, 2005]; bzw. einen IC_{50} -Wert von 40 nM für TNP-ATP ($n_H = 1,6$), was dem 40-fachen Wert des TNP-ATP- IC_{50} -Wertes am $P2X_1R$ entspricht [VIRGINIO *et al.*, 1998b]. Diese Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Anwesenheit unterschiedlicher NF449/TNP-ATP-Konzentrationen zeigen die Konzentrationsabhängigkeit kompetitiver Inhibitionsmechanismen.

Im Falle von kompetitiven Inhibitoren führt eine Erhöhung der Agonisten-Konzentration zu einer Reduzierung der Hemmwirkung des betreffenden Inhibitors auf den Rezeptorstrom, bzw. *vice versa* eine Erhöhung der Inhibitor-Konzentration zu einer Reduzierung des Rezeptorstroms. Das klassische Experiment, um einen kompetitiven Wirkmechanismus aufzuzeigen ist die Aufnahme von Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Anwesenheit aufsteigender Antagonisten-Konzentrationen. Ein kompetitiver Inhibitor verursacht eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven ohne Erniedrigung des Maximalstroms bei hohen Agonisten-Konzentrationen (*s. Abb. 4.1*). Im Umkehrschluss bedeutet das, dass die Entwicklung („*on set*“) der Inhibition durch einen kompetitiven Inhibitor in Anwesenheit des Agonisten nicht schneller stattfinden kann als die Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor (*s. Abb. 4.2*). Da diese an der $P2X_{2/1}$ Rezeptorchimäre sehr langsam ist, zeigen die schnellen *on set*- und *off set*-Kinetiken des AG-Block an der Chimäre direkt den nicht-kompetitiven Wirkmechanismus.

4. Diskussion

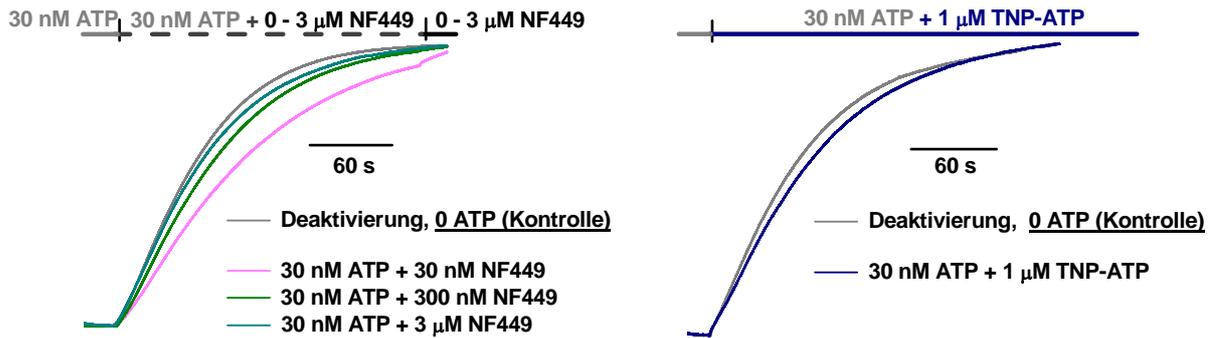


Abb. 4.2: Inhibition des chimären P2X_{2/1} Rezeptors durch die kompetitiven Inhibitoren NF449 (*links*) und TNP-ATP (*rechts*) in Anwesenheit von 30 nM ATP im Vergleich zur Deaktivierungskinetik in ATP-freier Lösung (*graue Kurve*). Mit steigender Inhibitor-Konzentration (30 nM, 300 nM, 3 μM NF449) näherte sich die Entwicklung der Inhibition („*on set*“) der Deaktivierungskinetik in ATP-freier Lösung an. Dieses Beispiel zeigt, dass die Inhibition durch einen kompetitiven Inhibitor (hier NF449) nicht schneller stattfinden kann als die Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor. Gleiches galt für TNP-ATP (Verwendung maximaler Inhibitorkonzentrationen (hier: 1 μM TNP-ATP, IC₅₀ = 40 nM, s. *Abb. 4.1*)).

Eine weitere Charakteristik der AG-Inhibition war die deutliche Spannungsabhängigkeit, die sich in einer verstärkenden Inhibition im negativen Potentialbereich äußerte. Diese Eigenschaft wurde bereits durch LIN und Kollegen [1993] an cochlearen Haarzellen gezeigt. Eine wahrscheinliche Erklärung für die Spannungsabhängigkeit des AG-Blocks an P2X Rezeptoren ist, dass AG unter physiologischen Bedingungen mehrfach positiv geladen vorliegen und dadurch bei negativen Potentialen, stärker in den offenen Kanal „gezogen“ wurden. Ein derartiger (rein physikalischer) Mechanismus wird gemeinhin als „*open pore block*“ bezeichnet.

Ein *open pore block* durch Aminoglykoside konnte auch für andere Ionenkanäle nachgewiesen werden, so z. B. durch Neomycin an mechanosensitiven Ionenkanälen in Skelettmuskelfasern [WINEGAR *et al.*, 1996] oder an Typ 2 Ryanodin Rezeptoren (RyR2) und Typ 3 Ryanodin Rezeptoren (RyR3) [MEAD *et al.*, 2002; PUGH *et al.*, 2005].

In den hier zugrunde liegenden Untersuchungen sprechen sämtliche, *o. g.* Ergebnisse für einen *open pore block* der P2X Rezeptoren durch Aminoglykoside. In dieser Arbeit wurde die AG-Inhibition explizit für heterolog exprimierte homomere P2X₂R bzw. P2X_{2/1}R demonstriert. Sie liefert damit die ersten, fundierten Beispiele für einen *open pore block* an P2X Rezeptoren; bis *dato* sind keine anderen Inhibitoren bekannt, die an dieser Rezeptorfamilie mit einem vergleichbaren Mechanismus arbeiten.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die ATP-Dissoziation vom chimären P2X_{2/1} Rezeptor in Anwesenheit von Aminoglykosiden verlangsamt war (s. *Abb. 3.6*). Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Aminoglykoside den P2X Rezeptor im offenen Zustand arretieren und die ATP-Dissoziation von diesem im Vergleich zum geschlossenen verlangsamt ist. Dies ist gleichbedeutend mit einer erhöhten Agonisten-Affinität des offenen

Zustands, eine Eigenschaft, die auch für andere Liganden-aktivierte Kanäle angenommen wird [DILGER, 2002]. Die Tatsache, dass AG den P2X Rezeptor im Offen-Zustand arretierten, stellte sich im Verlaufe dieser Arbeit als wertvolles Werkzeug für die nähere Untersuchung der Phosphoinositid-Wirkung auf P2X Rezeptoren heraus (s. 3.2/4.2).

4.2 Einfluss der Ci-VSP auf den P2X₂ Rezeptor

4.2.1 Der Ci-VSP-bedingte Phosphoinositid-Umsatz regulierte den P2X₂ Rezeptorstrom herunter

Die potentielle Regulation des P2X₂R durch Phosphoinositide (PI) sollte in dieser Arbeit mittels einer erst kürzlich entdeckten, spannungsgesteuerten PI-Phosphatase aus *C. intestinalis* untersucht werden. Während des praktischen Teils dieser Studien wurden erste Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen veröffentlicht, die ebenfalls eine Regulation dieses Rezeptors durch PIs untersuchten [FUJIWARA & KUBO, 2006; ZHAO *et al.*, 2007a+b]. Obwohl diese Arbeiten auf eine Beeinflussung des P2X₂R durch diese Phospholipide hinwiesen, konnten deren zum Teil kontroverse Ergebnisse die zugrunde liegenden Mechanismen nicht aufklären. Im Folgenden werden die eigenen Ergebnisse dargelegt, diskutiert und in den bestehenden Literaturzusammenhang eingeordnet, wobei dieser kritisch beleuchtet wird.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die reine und erfolgreiche Coexpression von Ci-VSP und P2X₂R keinerlei Einfluss auf Expression, IV-Kennlinien, ATP-Empfindlichkeit und Desensibilisierung des P2X₂R hatte, wurde die Auswirkung der Phosphatase-Aktivität von Ci-VSP auf den P2X₂R untersucht. Es zeigte sich, dass innerhalb von Sekunden nach Ci-VSP-Aktivierung durch Depolarisation der Rezeptorstrom (gemessen bei -60 mV) schnell und annähernd exponentiell abnahm und nach *ca.* 5 Minuten näherungsweise in eine Sättigung überging. Dieses Phänomen wird hier zunächst als „Herunterregulierung“ bezeichnet, da zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt war, ob es die unter Kontrollbedingungen langsame Desensibilisierung beschleunigte, oder ein anderer, von der Desensibilisierung unabhängiger Mechanismus vorlag.

Diese Abnahme des Rezeptorstroms konnte nur in Anwesenheit des Agonisten ATP beobachtet werden. Die Herunterregulierung war innerhalb weniger Minuten reversibel, die Reversibilität wurde durch negative Membranpotentiale (-60 mV) und Abwesenheit von ATP begünstigt. Der „Ci-VSP-Effekt“ unterschied sich bei halb-maximaler und maximaler Agonisten-Konzentration nicht, war jedoch deutlich spannungsabhängig, mit stärkeren Stromabnahmen bei zunehmend stärker depolarisierenden Membranpotentialen, sprich stärkerer Ci-VSP-Aktivität [MURATA & OKAMURA, 2007]. Die Herunterregulierung des Rezeptorstroms war zudem unabhängig von der Expressionsdichte des P2X₂R, exo- und endocytotische Prozesse konnten ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Aktivierung der Ci-

4. Diskussion

VSP und anschließende Rezeptor-Herunterregulierung hatten keine Auswirkungen auf die ATP-Konzentrationsabhängigkeit des P2X₂R, weder direkt im Anschluss an den „Ci-VSP-Effekt“, noch nach der Erholung des Rezeptorstroms daraus.

Diese ersten Ergebnisse gleichen in ihrer qualitativen Aussage den bisher in der Literatur bekannten Auswirkungen der Ci-VSP auf andere PI_{4,5}P₂-sensitive Kanäle (GIRK2/Kir3.2; IRK1/Kir2.1 und KCNQ2/3 - sämtlichst K⁺-Kanäle). Sie alle bleiben durch zwischenzeitliche Depolarisation der Oozytenmembran ohne Coexpression von Ci-VSP unbeeinflusst, nach Coexpression und anhaltender Ci-VSP-Aktivierung durch Membrandepolarisation zeigt sich jeweils eine Veränderung des Kanalstroms, die in ihrer Stärke spannungsabhängig ist. Der sensitive Bereich des Membranpotentials, in dem diese Auswirkungen – sowohl von MURATA als auch in dieser Arbeit - beobachtet werden können, stimmt mit dem sensitiven Bereich der Ci-VSP-VS-Domänen-Bewegungen (nicht-lineare Tor-/gating-Ströme) überein [MURATA *et al.*, 2005]. Diese Bewegungen gehen auf die Spannungs-/Depolarisations-Reaktion der VS-Domäne zurück, die anschließend die konformativen Veränderungen nach Bewegung im elektrischen Feld auf die Phosphatase-Domäne übertragen: je stärker die Membran (und mit ihr das Ci-VSP-Protein) depolarisiert wird, desto stärker ist die konformative Veränderung, desto stärker die Phosphatase-Aktivität. Jedoch ist der molekulare Kopplungsmechanismus bisher nicht aufgeklärt worden [HORN, 2005; IWASAKI *et al.*, 2008].

Da die Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms nur nach Depolarisation auftrat und unabhängig von der Expression war, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um eine direkte, Ci-VS-Phosphatase-unabhängige Interaktion der beiden beteiligten Proteine handelte. Allerdings bestand weiterhin die Möglichkeit, dass es zu einer direkten Protein-Protein-Interaktion kam, die erst nach Depolarisation möglich wurde, sprich nach Konformationsänderung des Ci-VSP-Proteins. Aus diesem Grund wurden weitere Experimente durchgeführt, die die Verantwortlichkeit des „Ci-VSP-Effekts“ unumstößlich der enzymatischen Phosphatase-Aktivität zuschreiben:

Dazu wurde die Ci-VSP-C363S-Mutante, die eine intakte VS-Domäne, aber eine nicht funktionelle Phosphatase-Domäne [MURATA *et al.*, 2005] ausbildet, mit dem P2X₂R coexprimiert. Das mutierte Protein vollzog dementsprechend sämtliche Konformationsänderungen infolge einer Membrandepolarisation (gating-Ströme), besaß jedoch keine Phosphatase-Aktivität mehr. Nach Coexpression in Oozyten und anschließender Depolarisation konnte die Herunterregulierung des P2X Rezeptorstroms nicht mehr beobachtet werden, der Rezeptorstrom verhielt sich wie der der Kontroll-Zellen, die nur den P2X₂R exprimierten. Eine direkte Protein-Protein-Interaktion nach Depolarisation kann somit ausgeschlossen und die alleinige Verantwortung des „Ci-VSP-Effekts“ der enzymatischen Ci-VSP-Aktivität (und deren Katalyse-Produkte) zugeschrieben werden.

Ein weiterer Ansatz, diesen Befund zu bestätigen, war, im (intakten) Wildtyp-Ci-VSP-Protein die Phosphatase mit einem spezifischen Inhibitor zu hemmen und das Verhalten coexprimierender Oozyten unter Depolarisationsbedingungen zu untersuchen. Nach Einsatz des Phosphatase-Inhibitors Phenylarsenoxid (PAO) [DECKERT *et al.*, 1994] konnte ebenfalls kein „Ci-VSP-Effekt“ mehr detektiert werden, der P2X₂ Rezeptorstrom verhielt sich, wie auch mit der Ci-VSP-C363S-Mutante gezeigt, wie der der Kontroll-Zellen.

PAO hatte auf den P2X₂ Rezeptorstrom an sich nur einen geringen Einfluss. Die PAO-behandelten Kontroll-Zellen zeigten nur eine leichte Verringerung ihrer ohnehin schon gering ausgeprägten Desensibilisierung, was darauf schließen lässt, dass in Zellen, die allein den P2X₂R exprimierten, schon andere, endogene PI-Phosphatasen auf das Desensibilisierungsverhalten dieses Rezeptors regulierend einwirkten und den Rezeptor im PAO-inhibierten Zustand weniger stark desensibilisieren ließen. Dieser Befund ist zudem ein wichtiger Hinweis darauf, dass es sich beim „Ci-VSP-Effekt“ um eine Verstärkung der P2X₂ Rezeptor-Desensibilisierung handelte und nicht um einen unabhängigen Mechanismus.

Somit war die aktivierte, intrazellulär lokalisierte Phosphatase des Ci-VSP-Proteins für das veränderte Verhalten des P2X₂R unter den gegebenen Bedingungen verantwortlich. Außerdem kann an dieser Stelle der Schluss gezogen werden, dass Ci-VSP einen Einfluss auf das Kanal-*gating* an sich besaß. Das heißt, makroskopisch konnte eine Verringerung des Kanalstroms bei anhaltender Agonisten-Applikation beobachtet werden, auf Einzelkanalebene wurden Parameter wie die Offenwahrscheinlichkeit (p_o), bzw. mittlere Offen- oder Geschlossenzeiten beeinflusst oder aber das Gleichgewicht zwischen Offen-, Geschlossen- und desensibilisiertem Rezeptorzustand zugunsten des Letzteren verschoben. Welcher *gating*-Parameter durch Ci-VSP verändert wurde, bleibt im Verlauf der Diskussion noch zu klären. Weitere Indizien für ein durch Ci-VSP verändertes Kanal-*gating* waren die Tatsache, dass dieser Effekt sowohl bei halb- als auch bei maximaler ATP-Aktivierungskonzentration die gleichen Ausmaße besaß sowie die unveränderten Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach Phosphatase-Aktivierung.

4.2.2 Die strukturelle Grundlage des „Ci-VSP-Effekts“ auf den P2X₂R

Bei Ci-VSP handelt es sich um eine PI-Phosphatase, die als natürliche Substrate sowohl PI_{3,4,5}P₃ (wie PTEN, mit der sie strukturell starke Verwandtschaft zeigt [MURATA *et al.*, 2005; IWASAKI *et al.*, 2008]) als auch PI_{4,5}P₂ umsetzen kann [MURATA & OKAMURA, 2007; IWASAKI *et al.*, 2008]. Es kann also angenommen werden, dass ein Umsatz dieser PIs direkt oder indirekt regulierend auf den P2X₂R wirkt. Zusätzlich zu einer Depletion der Phosphatase-Substrate PI_{4,5}P₂ und PI_{3,4,5}P₃ könnten also auch die verschiedenen möglichen Reaktionsprodukte, resultierend aus der Dephosphorylierungsreaktion der Ci-VSP, für diesen Effekt

4. Diskussion

verantwortlich sein. Zunächst schien es, dass Ci-VSP sowohl 3'- als auch 5'-Phosphatase-Aktivität besitzt, jedoch veröffentlichten HALASZOVICH *et al.* kürzlich [2008] Daten, die belegen, dass Ci-VSP ausschließlich die 5'-Position des Inositolrings dephosphoryliert, so dass als Ci-VSP-Reaktionsprodukte lediglich PI_{3,4}P₂ bzw. PI₄P verbleiben. Allerdings darf man daneben auch andersartige, nicht-PI-haltige Substanzen/Moleküle nicht außer Acht lassen, die nur durch den – in diesem Fall durch Ci-VSP-Aktivierung – veränderten PI-Metabolismus des betreffenden PIs aktiviert bzw. inhibiert/depletiert wurden. Eine Übersicht über den hier angesprochenen, sehr komplexen PI-Metabolismus in der Zelle gibt *Abb. 4.3* wieder.

Jedoch liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei den für den „Ci-VSP-Effekt“ verantwortlichen Faktoren um PIs an sich handelte, da der herunterregulierende Einfluss der Phosphatase relativ langsam nach Ci-VSP-Aktivierung zu beobachten war. Diese Zeitverläufe sind typisch für direkt PI-abhängige Regulationsmechanismen an z. B. membranären Transportsystemen [HILGEMANN *et al.*, 2001; SUH & HILLE, 2005] und stehen damit im Gegensatz zu PI-Metabolismus-abhängigen Signaltransduktionswegen, in denen PIs lediglich ein Glied in der „Signalkette“ darstellen (z. B. PI_{4,5}P₂ → IP₃ → Ca²⁺, [BERRIDGE *et al.*, 1985], *vgl. Abb. 4.3*).

Zieht man nun in Betracht, dass PI_{4,5}P₂ ein – wie mittlerweile anerkannt – üblicher Regulator von Ionenkanälen [SUH & HILLE, 2005] ist, liegt es als erste Hypothese nahe, diese Isoform als das verantwortliche Phosphoinositid des „Ci-VSP-Effekts“ zu betrachten. Die Aktivierung von Ci-VSP würde den zellulären PI_{4,5}P₂-Gehalt senken (was MURATA & OKAMURA durch Fluoreszenzmessungen 2007 zeigten), und somit den P2X₂ Rezeptorstrom herunterregulieren. Im Laufe dieser Überlegungen stellt sich zudem die Frage nach Art, Lokalisierung und zeitlicher Abfolge der Interaktion zwischen PI und Rezeptor. Aktuelle Studien an P2X Rezeptoren mit PIs berichten von einer generellen Aktivierung sämtlicher P2X Subtypen durch PI_{4,5}P₂ im zellfreien *Patch* [ZHAO *et al.*, 2007a+b], mit Ausnahme des P2X₆R, der keine funktionellen Homomere bildet [NORTH, 2002]. In guter Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten ZHAO *et al.* zeigen, dass eine PI_{4,5}P₂-Hydrolyse durch Phospholipase C (PLC) die P2X₇R Kanalaktivität reduziert. Sie führen diese Aktivierung durch PI_{4,5}P₂ auf eine Interaktion mehrerer positiv geladener Aminosäurereste im proximalen C-Terminus mit diesem PI zurück, nachdem sie zeigen konnten, dass Mutationen dieser Reste die Empfindlichkeit der Rezeptoren für PI_{4,5}P₂ reduzieren. BERNIER *et al.* [2008] veröffentlichten kürzlich ähnliche Ergebnisse für den P2X₁R. Im Widerspruch hierzu stehen die Ergebnisse von FUJIWARA & KUBO [2006], die eine Regulation des P2X₂R durch PI_{4,5}P₂ ausschlossen. Sie führten Bindungsassays mit verschiedenen PIs am proximalen C-Terminus des P2X₂R durch und fanden, dass PI₃P, PI₄P, PI₅P sowie die 2-fach phosphorylierten Isoformen PI_{3,4}P₂ und PI_{3,5}P₂, nicht jedoch PI_{4,5}P₂ (bzw. in nur geringem Ausmaße) binden.

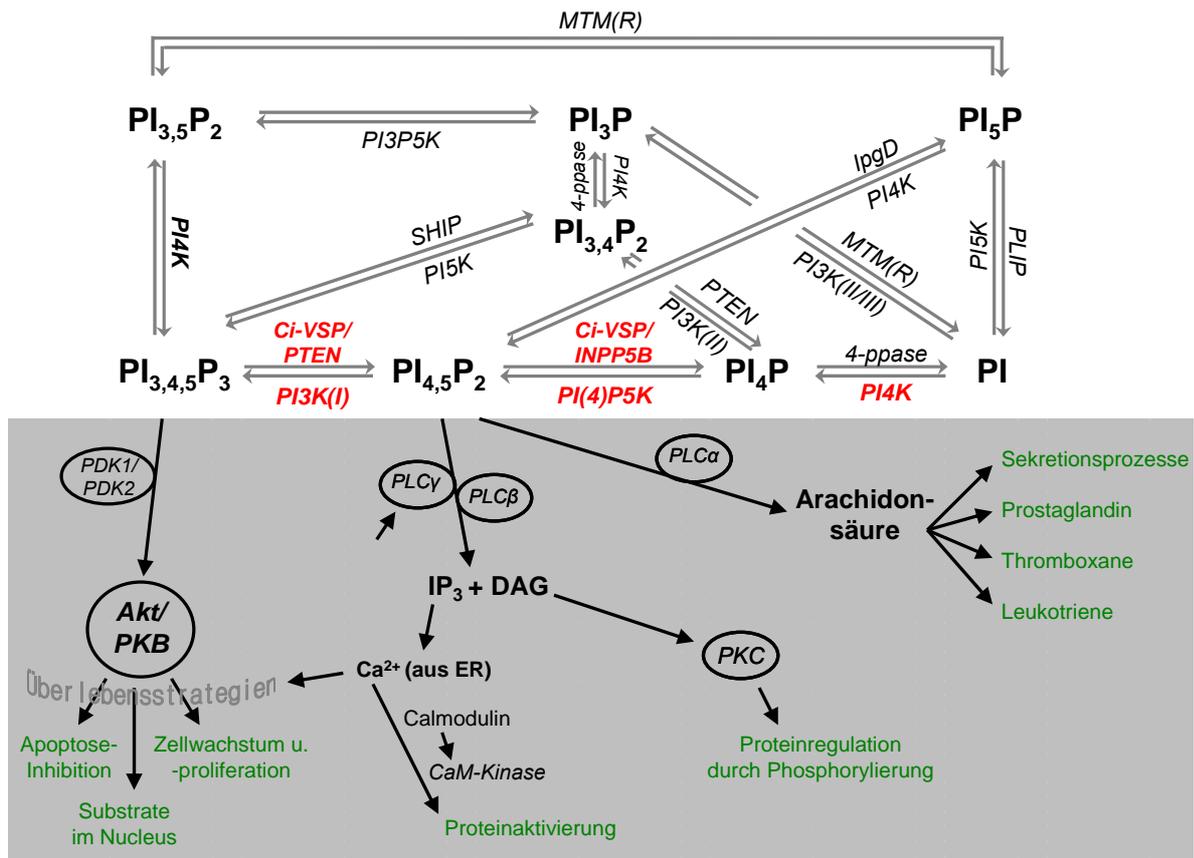


Abb. 4.3: Übersicht über ausgewählte Abschnitte des zellulären PI-Metabolismus. Erläuterungen s. Text. (Abkürzungen soweit bisher nicht erwähnt: 4-ppase = PI-4-phosphatase, IpgD = PI_{4,5}P₂-4-phosphatase, MTM(R) = myotubularin-related 3'-phosphatase; PDK = Pyruvat Dehydrogenase Kinase, PLA = Phospholipase A; PLIP = PTEN-like phosphatase).

Die Annahme, dass die ubiquitäre PI-Isoform PI_{4,5}P₂ einen Einfluss auf den P2X₂R haben könnte, wird des weiteren durch ihre hohe zelluläre Konzentration gestützt - PI_{4,5}P₂ ist das am häufigsten vorkommende PI. Der cytosolische PI_{3,4,5}P₃-Gehalt, der, wie oben bereits dargelegt, ebenfalls durch Ci-VSP beeinflusst werden könnte, beträgt nur wenige Prozent des PI_{4,5}P₂-Gehalts [HILGEMANN *et al.*, 2001]. Es ist daher fraglich, ob für derartige Auswirkungen der Ci-VSP auf den P2X₂R eine solch geringe PI_{3,4,5}P₃-Konzentration ausreichend ist, oder ob nicht prominentere, stärker in der Zelle vorkommende Phospholipide an einer solchen Rezeptorregulation beteiligt sind. Selbiges gilt für die PI_{3,4}P₂-Isoform, ebenfalls ein potentielles Ci-VSP-Produkt. Der zelluläre PI₄P-Gehalt wiederum liegt im gleichen Größenbereich wie der des PI_{4,5}P₂ [MÜLLER, 2007].

4.2.3 Einfluss einer PI-Kinase-Inhibition auf den P2X₂R

FUJIWARA & KUBO [2006] untersuchten die Effekte von Phosphoinositiden auf P2X₂ Rezeptoren über einen anderen Weg. Sie konnten eine Beschleunigung und Verstärkung der rezeptoreigenen Desensibilisierung nach Wortmannin- und LY294002-Behandlung beobachten, was in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden konnte. FUJIWARA & KUBO interpretierten dies als PI3-Kinase-(PI3K)-Inhibition. Diese Kinase arbeitet in direktem

4. Diskussion

Antagonismus zur PTEN Phosphatase [LESLIE & DOWNES, 2002; GERICKE *et al.*, 2006], welche eine hohe Ähnlichkeit zu der hier verwendeten Ci-VSP aufweist [MURATA *et al.*, 2005; IWASAKI *et al.*, 2008]. Somit steht der Befund, dass die Inhibition der PI3K die Desensibilisierung des P2X₂R verstärkt, zunächst in guter Übereinstimmung mit dem hier gefundenen Resultat, dass eine Aktivierung der Ci-VSP ebenfalls einen herunterregulierenden Effekt, vergleichbar mit eben jenem einer PI3K-Inhibition, auf den P2X₂ Rezeptorstrom hatte.

Bei der Studie von FUJIWARA & KUBO muss man aber folgendes kritisch in Betracht ziehen: Wortmannin ist zwar ein im nanomolaren Konzentrationsbereich (IC₅₀ = 5 nM, [OKADA *et al.*, 1994]) wirksamer Klasse IA-PI3K-Inhibitor, jedoch inhibieren höhere Konzentrationen ebenfalls die PI4K (verschiedene Klassen) mit in der Literatur angegebenen IC₅₀-Werten von 50-140 nM, teilweise auch im µM Bereich [NAKANISHI *et al.*, 1995; BALLA *et al.*, 1997; CUTLER *et al.*, 1997; XIE *et al.*, 1999; GUO *et al.*, 2003; GAMPER & SHAPIRO, 2007]. Sowohl in den Studien FUJIWARAS & KUBOS also auch in dieser Arbeit wurden die zu messenden Oozyten vor der Messung 1 h mit 30 µM Wortmannin inkubiert. Welche Konzentration letztlich intrazellulär erreicht und welche Kinase(n) gehemmt wurden, ist dabei völlig unklar. Allerdings ist die Annahme begründet, dass eine deutlich höhere Wortmannin-Konzentration als für eine reine PI3K-Inhibition nötig, erreicht wurde. Daher kann eine Beteiligung der PI4K keinesfalls ausgeschlossen werden, eine Reduzierung der Interpretation alleinig auf die PI3K ist somit unzulässig. BERNIER und Kollegen führten 2008 ähnliche Versuche am P2X₁R durch und setzten 35 µM Wortmannin ein, um die PI4K zu inhibieren. FUJIWARA & KUBO nutzten zwar zusätzlich zum Wortmannin noch den – wie sie darlegen - PI3K-spezifischen Inhibitor LY294002, der ebenfalls einen (wenn auch geringeren) Effekt auf die Desensibilisierung des P2X₂R zeigte. Allerdings gibt es Berichte, die belegen, dass auch die PI4K durch LY294002 inhibiert werden kann [SORENSEN *et al.*, 1998], so dass weiterhin die Frage im Raum steht, welche PI-Kinase tatsächlich mit dieser Wortmannin-Behandlung inhibiert wurde. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, müssten weiterführende Studien mit spezifischeren Inhibitoren, die jeweils nur eine der beiden Kinasen hemmen, durchgeführt werden (z. B. mit monoklonalen Antikörpern im Falle der PI4K [YUE *et al.*, 2001b]).

Falls sich eine PI4K-Beteiligung an der Herunterregulierung des P2X₂ Rezeptorstroms bewahrheitet, muss jedoch beachtet werden, dass dann als „Gegenspieler“ dieses Enzyms (und des „Ci-VSP-Effekts“) nicht mehr die PTEN in Frage kommen kann, da PI4K und PTEN nicht den gleichen Reaktionsweg katalysieren, wie es die PI3K und die PTEN tun.

Wie bereits erwähnt, konnte auch in der vorliegenden Arbeit die Desensibilisierungsfördernde Wirkung einer PIK-Inhibition auf P2X₂ Rezeptoren bestätigt werden. Die Inkubation P2X₂R exprimierender Oozyten in 30 µM Wortmannin 1 h vor der Messung führte zu einer Abnahme des Rezeptorstroms (aktiviert durch 100 µM ATP) nach 100 Sekunden um

ca. 60 %, wohingegen die nicht behandelten Zellen einen Stromrückgang von lediglich ca. 20 % aufwiesen. Eine Rezeptorinternalisierung nach Wortmannin-Behandlung als kausale Ursache hierfür, wie sie FUJIWARA & KUBO vorschlagen, konnte jedoch nicht bestätigt werden, da sich die Membrankapazitäten von Kontroll- und Versuchsgruppen nicht unterschieden. Zudem waren die initialen Stromantworten der Rezeptoren gleich groß – ein Ergebnis, das im Widerspruch zu den Befunden von FUJIWARA & KUBO stand. Überraschenderweise konnte in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten (ohne Depolarisation) eine noch stärkere (um ca. 80 %) Desensibilisierung beobachtet werden, wenn diese vor der Messung einer Wortmannin-Behandlung unterzogen wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die (geringe) Restaktivität der Ci-VSP beim negativen Ruhepotential der Oozyte (-40 bis -60 mV) in Abwesenheit von Wortmannin durch die endogene PI-Kinase, des Gegenspielers der Phosphatase, kompensiert wurde. Nach Wortmannin-Behandlung verschob sich dann dieses Gleichgewicht und führte zu dem beschriebenen Effekt. Das Gleichgewicht PIK/Phosphatase wurde demnach sowohl durch Ci-VSP-Aktivierung als auch durch PIK-Inhibition gestört, der Phosphoinositid-Haushalt der Zelle dadurch moduliert und ein verändertes, sprich verstärktes Desensibilisierungsverhalten des P2X₂ Rezeptor beobachtet.

Gleiches galt für den „Ci-VSP-Effekt“ (Depolarisations-Messprotokolls), der durch eine Wortmannin-Behandlung noch verstärkt wurde. Verständlich wird dies wiederum durch die Zugrundelegung eines – hypothetischen – zellulären PIK/Ci-VSP-Antagonismus: sowohl jeweils Aktivierung der Ci-VSP als auch Inhibition der PIK führten zu einer stärkeren und beschleunigten Desensibilisierung des Rezeptorstroms, ein synchrones Herbeiführen beider Phänomene führte zu demselben Ergebnis, jedoch intensiviert.

4.2.4 Der Phosphoinositid-Metabolismus wirkt auf die Desensibilisierung des P2X₂R

Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass die Ci-VSP in den PI-Metabolismus der Oozyte eingreift und unterstreicht das Zusammenspiel der beteiligten zellulären Komponenten (Ci-VSP und PIK) und deren Auswirkung als Regulativ auf das Desensibilisierungsverhalten des P2X₂ Rezeptors. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass es auch nativ zu einer Regulation des P2X₂R durch einen PIK-PI-Phosphatase-Antagonismus/Metabolismus kommt. In Anbetracht der bisher diskutierten Ergebnisse kann an dieser Stelle auch der vorerst gewählte, und lediglich umschreibende Begriff der „Herunterregulierung“ des Rezeptorstroms durch Ci-VSP in den deutenden und kausalen Begriff „Desensibilisierung“ des Rezeptorstroms geändert werden. Somit führte eine Aktivierung der Ci-VSP in Ci-VSP/P2X₂R coexprimierenden Oozyten zu sowohl einer Verstärkung als auch einer Beschleunigung der rezeptoreigenen Desensibilisierung und stellt demnach keinen eigenständigen, zusätzlichen Effekt auf den P2X₂R dar, was anfänglich nicht ausgeschlossen werden konnte.

4.2.5 Der Ci-VSP-Effekt greift an der C_{ATP} -Konformation des $P2X_2R$ an

Durch Blockieren des $P2X_2$ Rezeptorstroms mittels sättigender Konzentrationen Paromomycin konnte, wie unter 3.1/4.1 dargelegt, nicht nur ein *open pore block* des $P2X_2R$ herbeigeführt werden, sondern der Rezeptor im offenen, ATP-gebundenen Zustand arretiert werden. Diese Tatsache wurde benutzt, um zu untersuchen, ob die Ausprägung des „Ci-VSP-Effekts“ von der Rezeptor-Konformation abhängt. Für die Überlegungen wurde ein vereinfachtes Reaktionsmodell zugrunde gelegt:



Der Rezeptor geht vom nicht-ATP-gebundenen, geschlossenen und nicht-desensibilisierten Zustand (**C**) nach ATP-Applikation zunächst in den geschlossenen, ATP-gebundenen Zustand (**C_{ATP}**) über, bevor er öffnet (**O_{ATP}**). Danach folgt der Übergang in den desensibilisierten Zustand (**D_{ATP}**), in dem ATP immer noch gebunden ist (kann als inaktiver Zustand angesehen werden, vergleichbar mit dem von spannungsgesteuerten Ionenkanälen [DILGER, 2002]). Nach Dissoziation des Agonisten ATP folgt der ATP-freie, desensibilisierte Zustand (**D**), bevor erneut der geschlossene, ATP-freie und wieder ATP-sensible Zustand (**C**) erreicht wird („*recovery*“ [ROBERTS *et al.*, 2006]).

Da gezeigt werden konnte, dass in Abwesenheit von ATP kein Effekt detektiert werden konnte, können die Rezeptorzustände C und D als am „Ci-VSP-Effekt“ beteiligt ausgeschlossen werden. Weiterhin kann der **D_{ATP}**-Zustand ebenfalls ausgeschlossen werden, da dieser den desensibilisierten Zustand bereits darstellt, ein Status, zu dem der „Ci-VSP-Effekt“ auf den $P2X_2R$ erst hinführte. Somit bleiben nur die **C_{ATP}**- und die **O_{ATP}**-Konformationen als die an dem Effekt potentiell beteiligte übrig. Mithilfe von Paromomycin sollte der Rezeptor im offenen, ATP-gebundenen (**O_{ATP}**) Zustand gehalten werden, während die Ci-VSP 5 Minuten lang aktiviert wurde. Es zeigte sich, dass die Paromomycin-behandelten Zellen einen verminderten „Ci-VSP-Effekt“ aufwiesen: der am Ende der 5-minütigen Depolarisation verbleibende, ATP-vermittelte Rezeptorstrom war sowohl mit halb- als auch mit maximalen ATP-Aktivierungskonzentrationen noch *ca.* doppelt so groß wie in den Kontroll-Zellen, die die „normale“, oben beschriebene Herunterregulierung/Desensibilisierung des $P2X_2$ Rezeptorstroms nach Ci-VSP-Aktivierung zeigten. Auf rein $P2X_2$ exprimierende Oozyten hatte Paromomycin – wenn überhaupt – sogar eher einen gegenteiligen Effekt, nämlich eine geringfügig verstärkte Desensibilisierung - ein Effekt, der jedoch nicht signifikant war. Aufgrund der Tatsache, dass nach Arretieren des $P2X_2R$ im offenen, ATP-gebundenen Zustand während der Ci-VSP-Aktivierung der von eben jener

Phosphatase bedingte Effekt deutlich abgeschwächt wurde, kann nun auch die O_{ATP} -Rezeptorkonformation als am „Ci-VSP-Effekt“ beteiligt ausgeschlossen werden. Demzufolge kann der „Ci-VSP-Effekt“ offensichtlich nur an den geschlossenen, ATP-gebundenen und nicht-desensibilisierten Zustand angreifen:



Verständlich wird dies, wenn man sich die Wirkung einer Paromomycin-Behandlung auf den $P2X_2R$ vor Augen führt. Das AG verschob das Gleichgewicht von C_{ATP} und O_{ATP} , in dem sich der Rezeptor während der ATP-Anwesenheit befindet, zugunsten des O_{ATP} -Zustandes. An diesem war, wie oben dargelegt, der „Ci-VSP-Effekt“ deutlich verringert.

Vor kurzem wurde für K^+ -Kanäle ein analoger Mechanismus verifiziert (Kir(1.1), [RAPEDIUS *et al.*, 2007]: das *gating* dieser Kanäle ist $PI_{4,5}P_2$ -sensitiv und abhängig von einer Interaktion der Transmembrandomänen 1 und 2 (Wasserstoffbrücke zwischen Lysin und Aspartat). Für eine Öffnung des Kanals ist der Bruch dieser Wechselwirkung vonnöten, wodurch es zu intramolekularen Konformationsänderungen kommt, die dann die $PI_{4,5}P_2$ -vermittelten Kinetiken (im *gating*) beeinflussen, so dass durch Änderungen im $PI_{4,5}P_2$ -Level zwar der Offen-Geschlossen-Übergang beeinflusst wird, nicht jedoch der umgekehrte Übergang, so dass $PI_{4,5}P_2$ den Offen-Zustand stabilisiert. Hinzu kommt der Fakt, dass die $PI_{4,5}P_2$ -Bindung an den Kanal und die für das $PI_{4,5}P_2$ -*gating* notwendigen Konformationsänderungen des Kanals distinkte, also voneinander unabhängige Prozesse sind. Das heißt, dass eine H-Brücke das $PI_{4,5}P_2$ -*gating* des Kir(1.1) kontrolliert, diese jedoch nur im geschlossenen Zustand vorhanden ist.

4.2.6 Ci-VSP und andere P2X Subtypen

Überzeugend wurde bislang nur für den $P2X_2R$ und den $P2X_7R$, vor kurzem auch für den $P2X_1R$, gezeigt, dass eine Regulation durch PIs stattfindet. $P2X_2R$ und $P2X_7R$ besitzen relativ lange C-Termini, der $P2X_1R$ einen kürzeren. Der proximale Teil eben dieses C-Terminus wird als Träger der Aminosäurereste für die Protein-PI-Interaktionen angesehen und diese wiederum – in Verbindung mit der C-Terminus-Länge - als verantwortlich für die Ausprägung der Desensibilisierung [FUJIWARA & KUBO, 2006; ZHAO *et al.*, 2007a+b; BERNIER *et al.*, 2008], die beim $P2X_2R$ und $P2X_7R$ sehr langsam ist.

In dieser Arbeit konnte kein Effekt der Ci-VSP (d.h. keine Desensibilisierungsverstärkung) nach Coexpression und Aktivierung auf andere P2X Subtypen ($P2X_{1,2/1}$), deren C-Termini kürzer ausfallen, beobachtet werden. Dies ist für die unterschiedlichen, untersuchten P2X Subtypen nicht verwunderlich, wenn man die Wirkung der Ci-VSP auf den $P2X_2R$ noch

einmal genauer betrachtet: Ci-VSP-Aktivierung führte sowohl zu einer Verstärkung als auch zu einer Beschleunigung der P2X₂ Rezeptordesensibilisierung, ausgehend von einer sehr langsamen Desensibilisierung. Der P2X₁R (wie auch der P2X₃R) desensibilisiert jedoch um Größenordnungen schneller als sich der „Ci-VSP-Effekt“ am P2X₂R ausbildete, so dass eine Beeinflussung durch Ci-VSP an diesem Rezeptor nicht erwartet wurde.

Im Falle des P2X₁ Subtyps muss zunächst auf die Schwierigkeiten in den Messungen an Ci-VSP/P2X₁R coexprimierenden Oozyten eingegangen werden. Aufgrund der sehr schnellen Desensibilisierung war es nicht möglich, ein Messprotokoll wie am P2X₂R anzuwenden, das eine gleichzeitige Depolarisation und Agonisten-Applikation mit noch nicht desensibilisiertem Rezeptor ermöglichte. Dennoch wurden verschiedenste, mögliche Messprotokolle an Ci-VSP/P2X₁R coexprimierenden Oozyten durchgeführt, so auch mit Depolarisationen zeitlich vor der Agonisten-Applikation. In keinem der Fälle konnte eine Beeinflussung des P2X₁ Rezeptorstroms detektiert werden. Vorerst kann also folgendes festgehalten werden: Bei dem P2X₁R handelt es sich um einen sehr schnell desensibilisierenden Rezeptor Subtyp, dieser erreicht schon ohne Einwirkung exogener Einflüsse den nicht-aktivierbaren, desensibilisierten Zustand innerhalb einiger 100 ms. Ein Einfluss der Ci-VSP auf diesen Subtyp war demnach nicht zu beobachten, da mit Erreichen des D_(ATP)-Zustandes aller in der Zelle vorhandener Rezeptoren eine weitere (Ci-VSP-bedingte) Desensibilisierung nicht mehr erzielt werden konnte.

In Messungen mit der Rezeptorchimäre P2X_{2/1} konnte ebenfalls kein „Ci-VSP-Effekt“ auf den Rezeptorstrom beobachtet werden. Dieser Befund fügt sich nahtlos an den des P2X₁R, auf den Ci-VSP ebenfalls keinen Einfluss hatte, da der chimäre Rezeptor zum Großteil aus Proteinbereichen des P2X₁R (extrazellulärer *loop*, 2. Transmembrandomäne und C-Terminus) besteht [WERNER *et al.*, 1996; RETTINGER & SCHMALZING, 2004]. Die fehlende Wirkung von Ci-VSP auf den P2X_{2/1}R ist auch insofern nicht überraschend, da der P2X_{2/1}R nicht desensibilisiert (auch nicht in zellfreien *Patch Clamp*-Messungen [RETTINGER & SCHMALZING, 2004]), und es somit auch keinen Angriffspunkt für die Desensibilisierungs-verstärkende Wirkung der Ci-VSP an diesem Rezeptor gibt.

4.2.7 Ganzzell- vs. Einzelkanal-Ableitungen

Ein nicht unwichtiger Punkt bezüglich der näheren Betrachtung der möglichen Regulationswege der P2X₂-Desensibilisierung ist die Tatsache, dass der P2X₂R in zellfreien *Patch Clamp*-Messungen (und nach einer gewissen Zeit auch im *whole cell*-Modus) eine sehr schnelle und teilweise vollständige Desensibilisierung zeigt. Dies wird in der Literatur einem oder mehreren – bislang unbekanntem - intrazellulären Regulatoren zugesprochen, die unter eben diesen zellfreien Bedingungen offenbar schnell ausgewaschen werden und die

Rezeptoren nicht mehr vor einer Desensibilisierung „schützen“ können [DING & SACHS, 1999+2000]. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit, scheint es sich dabei tatsächlich um Phosphoinositide bzw. um Regulatoren des Phosphoinositid-Metabolismus zu handeln. Unterstützt wird diese Hypothese aus den Ergebnissen der *Patch Clamp*-Untersuchungen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

4.3 *Patch Clamp*-Messungen an P2X Rezeptoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Patch Clamp*-Messungen an zellfreien *Patches* von Oozytenmembranen durchgeführt, die den P2X₂R exprimierten. *Whole cell*-Messungen an HEK293-/PC12-Zellen mussten aus den in 3.3 dargelegten Gründen vernachlässigt werden, eine verlässliche Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte nicht erreicht werden.

Es wurden zunächst mithilfe von *outside out*-*Patches* durch sättigende ATP-Konzentrationen ausgelöste makroskopische Ströme des P2X₂ Rezeptors aufgenommen. Nach Injektion von 0,25 ng cRNA und einer Expressionszeit von 3 Tagen konnten maximale Ströme von ca. 100 bis 150 pA aufgezeichnet werden. Hier konnte deutlich das im zellfreien *Patch* veränderte Desensibilisierungsverhalten des P2X₂R beobachtet werden [DING & SACHS, 1999 + 2000], der Rezeptorstrom ging innerhalb von 10 s ganz oder auf einen Bruchteil des initialen Stroms zurück, der Zeitverlauf der Abnahme des Rezeptorstroms konnte mithilfe eines exponentiellen Kurven-*fits* beschrieben werden. Es ist bekannt, dass diese beschleunigte Desensibilisierung in Abwesenheit von 2-wertigen Kationen in der Badlösung geringer ausgeprägt [ZHOU & HUME, 1998] ist – allerdings konnte in den vorliegenden Messungen nicht auf den Zusatz von Mg²⁺ im Bad verzichtet werden, da die Membranstabilität und somit die *Patch*-Stabilität eindeutig unter Mg²⁺-freien Bedingungen litt. Auf Ca²⁺ wurde verzichtet, weil es die Desensibilisierung noch stärker fördert als Mg²⁺ und darüber hinaus in mM-Konzentrationen den P2X₂R inhibiert [MILEDI *et al.*, 1989].

4.3.1 PI3K und PTEN hatten keine Auswirkung auf den P2X₂R Rezeptorstrom

In den *Patch Clamp*-Messungen wurde der Pipettenlösung, die das intrazelluläre Milieu „ersetzt“, verschiedene Substanzen (Phosphoinositide oder deren regulierende Enzyme) zugesetzt, um deren Einfluss auf den P2X₂ Rezeptorstrom zu untersuchen. Verglichen wurden die erzielten Ströme jeweils mit denen aus Messungen mit PI-freier Pipettenlösung (Kontrolle, „K“). Alle aufgezeichneten Rezeptorströme wurden auf Kinetik der Desensibilisierung (Zeitkonstante τ) sowie Stärke der Desensibilisierung (verbleibender, ATP-vermittelter Strom nach 10-sekündiger ATP-Applikation, „I_{Ende}“) hin untersucht. Im Falle der Phosphoinositide PI_{3,4,5}P₃ sowie PI_{3,5}P₂ konnte kein Einfluss auf den P2X₂R beobachtet werden, die Kinetiken (τ) des Rezeptorstroms blieben unverändert, gleiches galt

4. Diskussion

für den verbleibenden Rezeptorstrom nach 10 s. Zusatz von PI3K (und gleichzeitig des Kinase-Substrats ATP) bzw. PTEN hatten ebenfalls keinen Effekt. Ausschließlich unter Zusatz von $PI_{4,5}P_2$ konnte eine starke Beeinflussung beobachtet werden: die Desensibilisierung war abgeschwächt, was durch einen höheren „I_{Ende}“-Rezeptorstrom und einer etwa doppelt so hohen Desensibilisierungs-Zeitkonstante gekennzeichnet war. Die Ursache für ein derartiges Verhalten des Rezeptorstroms kann entweder eine langsamere Desensibilisierung sein oder aber eine beschleunigte Rückkehr des Rezeptors aus dem desensibilisierten Zustand. Um dies eindeutig aufzuklären, sind weitergehende Einzelkanalanalysen vonnöten.

PTEN und PI3K wurden verwendet, da einerseits Ci-VSP und PTEN große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen und andererseits FUJIWARA & KUBO [2006] die P2X₂R-Desensibilisierung als PI3K-abhängig darstellen, was in dieser Arbeit noch kritisch diskutiert wird. Darüber hinaus arbeiten die PI3K und PTEN in der Zelle in direktem Antagonismus zueinander. Obwohl sowohl PI3K-(Klasse IA, p110 α -Untereinheit, katalytische Domäne [VANHAESEBROECK *et al.*, 2001]) als auch PTEN-Zusatz zu keiner Veränderung des Rezeptorstroms unter *o. g.* Bedingungen führten, kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass beide Enzyme in intakten Zellen einen Einfluss auf den P2X₂R besitzen. (Im Falle des PI3K-Zusatzes ist gleichzeitig auch das Kinase-Substrat ATP hinzugesetzt worden, das allein zugesetzt ebenfalls keinerlei Beeinflussung des Rezeptors zeigte.) Wohl aber kann ausgeschlossen werden, dass es allein durch direkte Interaktion der katalytischen Untereinheit der PI3K mit dem P2X₂R zu einer Beeinflussung der Desensibilisierung kam. Die regulatorische Untereinheit wurde bisher nicht in *Patch Clamp*-Messungen eingesetzt (beide Untereinheiten besitzen SH3-Domänen [KOYAMA *et al.*, 1993; VANHAESEBROECK *et al.*, 2001; GOUGH, 2006], die für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind, *s. 4.4*). Auf einen Zusatz des PIK-Inhibitors Wortmannin (*vgl. 4.2.3*) in die Pipette wurde aus dem Grund verzichtet, da es sich um zellfreie Messungen handelte, in denen die PIK ohnehin ausgewaschen und demnach nicht mehr am/im *Patch* vorhanden war, so dass ein Wortmannin-Zusatz keine zusätzlichen Veränderungen durch eine PIK-Inhibition mehr verursacht hätte.

Für die PTEN Phosphatase gilt Ähnliches wie für die PI3K, wobei hier noch in Frage gestellt werden sollte, ob die PTEN tatsächlich – wie Ci-VSP – einen Einfluss auf den P2X₂R hat. Die zwei PI-Phosphatasen weisen zwar starke strukturelle Ähnlichkeiten auf, jedoch ist die Substratspezifität der Ci-VSP offensichtlich geringer als die der PTEN [MURATA *et al.*, 2005; MURATA & OKAMURA, 2007; IWASAKI *et al.*, 2008]. Ci-VSP besitzt zusätzlich eine 5'-Phosphatase-Aktivität, was die Palette möglicher, in der Desensibilisierungs-Regulation des P2X₂R involvierter Phosphoinositide und somit auch möglicher, nativer PI-Phosphatasen, die auf den P2X₂R einwirken, verbreitert. Weiterhin ist noch nicht einwandfrei nachgewiesen worden,

dass die PI3K (bzw. deren Metabolite) direkt auf den P2X₂R wirkt, so dass im Umkehrschluss eine notwendige PTEN-Beteiligung aufgrund des Antagonismus beider Enzyme zugrunde gelegt werden könnte. Erst nach Abschluss dieser Arbeit wurde eine Studie von HALASZOVICH und Kollegen [2008] publik, die eine 3'-Phosphatase-Aktivität der Ci-VSP sogar gänzlich ausschließt, was die regulative Wirkung der PTEN auf den P2X₂R noch weiter in Frage stellt.

4.3.2 PI_{4,5}P₂ aktivierte den P2X₂R, PI_{3,5}P₂ und PI_{3,4,5}P₃ jedoch nicht

Zugabe von PI_{3,4,5}P₃ und PI_{3,5}P₂ hatte keinen Effekt auf den Rezeptorstrom in zellfreien *Patch Clamp*-Messungen. Dies scheint im Widerspruch zu FUJIWARA & KUBO [2006] zu stehen. Sie beriefen sich auf Berichte, die die Wichtigkeit des C-Terminus in der Regulation der P2X Desensibilisierung herausstellen, wie z. B. die Tatsache, dass große Deletionen des C-Terminus zu nicht funktionellen Rezeptoren führen [BOUÉ-GRABOT *et al.*, 2000]. Sie zeigten, dass PI₃P (und PI₄P, PI₅P) und PI_{3,5}P₂ (sowie PI_{3,4}P₂) die stärksten Bindungen an den proximalen C-Terminus aufweisen und schlossen daraus, dass diese 3'-phosphorylierten PIs in die Regulation des P2X₂R involviert sind. PI_{4,5}P₂, PI₄P, PI₅P und PI_{3,4}P₂ fanden – trotz Bindung an den P2X₂R - keinerlei weitere Beachtung in ihren Studien, da diese nicht durch die PI3K umgesetzt werden, der sie eine essentielle Rolle in der P2X₂R Regulation zusprechen (*s. o.*). Dabei stützen sie sich auf die Studien von SRIVASTAVA *et al.* [2005], die von einer PI3K- und PI_{3,5}P₂-Regulation von *small conductance* Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanälen berichten.

Die Annahme, dass lediglich PI₃P und PI_{3,5}P₂ den P2X₂R regulieren sollen, erscheint jedoch überraschend, da die PI_{3,5}P₂-Isoform lange Zeit als nicht physiologisch relevant galt, bis sie kürzlich in einigen, stark spezialisierten Zelltypen (Fibroblasten, Hefe) gefunden wurde [WHITEFORD *et al.*, 1997; DOVE *et al.*, 1997; BANFIC *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; SRIVASTAVA *et al.*, 2005]. Die Übertragbarkeit der Bindungsassays von FUJIWARA & KUBO in die tatsächliche Physiologie des P2X₂R ist daher fraglich, da PI_{3,5}P₂ nicht ubiquitär vorkommt, in Oozyten bisher nicht nachgewiesen wurde (die Messungen jedoch sämtlichst an Oozytenmembranen durchgeführt wurden) und darüber hinaus der Befund anderer, starker PI-Bindungen an den proximalen C-Terminus unbeachtet gelassen wurde.

So konnte in der vorliegenden Arbeit überhaupt keine Auswirkung einer intrazellulären PI_{3,5}P₂-Anwesenheit auf den P2X₂R beobachtet werden. Dieses Ergebnis schließt allerdings nicht aus, dass eine Interaktion/Assoziation dieses Phosphoinositids mit dem P2X₂R stattgefunden hat, wie es FUJIWARA & KUBO an den proximalen C-Terminus nachgewiesen haben; es konnte lediglich kein Effekt einer intrazellulären PI_{3,5}P₂-Anwesenheit (Bindung) auf die Kanalfunktion bzw. die Desensibilisierung beobachtet werden.

Ganz anders war der Effekt des PI_{4,5}P₂ auf den P2X₂R - eine deutliche Beeinflussung in Richtung einer Rezeptor-Aktivierung konnte beobachtet werden, so dass *oben angestellte*

Vermutung, diese PI-Isoform sei am wahrscheinlichsten an der Rezeptor-Regulation beteiligt, konkreter wird. Man kann nun darüber hinaus die Vermutung anstellen, dass es sich bei diesem PI um eben jenen diffusiblen Faktor handelt [DING & SACHS, 1999; NORTH, 2002], der in zellfreien *Patches* ausgewaschen ist (*s. o.*). Jedoch scheint es unwahrscheinlich, dass PI_{4,5}P₂ allein verantwortlich ist, da die Desensibilisierung in den *Patch Clamp*-Messungen in PI_{4,5}P₂-Anwesenheit zwar deutlich verlangsamt, aber immer noch nicht mit denen in TEVC-Ableitungen an intakten Zellen zu vergleichen war.

4.3.3 Effekt von PI_{4,5}P₂ auf Einzelkanalebene

Im Zuge der *Patch Clamp*-Untersuchungen wurden auch Einzelkanal-Experimente am P2X₂R in Oozytenmembranen durchgeführt, um weiteren Aufschluss über die Desensibilisierungsregulation dieses Rezeptors zu erlangen. Obwohl eine Beeinflussung des P2X₂R durch PI_{4,5}P₂ auch auf Einzelkanalebene beobachtet werden konnte, müssen diese Messungen als vorläufig bezeichnet werden, bzw. geben nur erste Hinweise. Der Grund dafür ist, dass es bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht möglich war, eine ausreichend hohe Anzahl von Mehrfachbestimmungen an einem einzigen Oozyten-*batch* durchzuführen, da die Oozytenqualität saisonbedingt schwankte und zudem die sommerlichen Temperaturen im Labor die *Patch*-Stabilität beeinflussten [NASCO'S ANIMAL PROTOCOL FOR XENOPUS OOCYTES, WWW; ELSNER *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 2008].

Zunächst kann festgehalten werden, dass die hier aufgezeichneten Einzelkanalströme eine mittlere Stromamplitude von *ca.* 1 pA bei einem angelegten V_m von -100 mV (um möglichst gut abgegrenzte, große Signale zu erzielen, da der P2X₂R einwärts gleichrichtende Eigenschaften besitzt (*s. 3.1*)) aufwiesen. Dies erscheint relativ gering, wenn man Studien von DING & SACHS [1999] oder WHITLOCK und Kollegen [2001] zum Vergleich heranzieht, die eine mittlere Stromamplitude von 3,2 pA (Einzelkanal-Leitfähigkeit *ca.* 30 pS) fanden – sowohl an HEK293-Zellen als auch an Oozyten. Allerdings konnte in dieser Arbeit das in der Literatur beschriebene starke Rauschen des offenen Kanals/der Einzelkanalströme beobachtet werden. DING & SACHS [1999] berichten von einer Rausch-Amplitude von 30 % der mittleren Stromamplitude, was vergleichsweise hoch ist, wenn man sie mit der Rauschamplitude von z. B. Acetylcholin Rezeptoren (2-5 %) vergleicht [AUERBACH & SACHS, 1984; SIGWORTH, 1985]. Es wird vermutet, dass dieses Rauschen auf schnelle Konformationsänderungen des Kanals [WERNER *et al.*, 1996], die die Leitfähigkeit des offenen Kanals modulieren (*subconductance levels*), zurückgeführt werden kann und nicht auf externe Faktoren, wie etwa eine Inhibition durch z. B. divalente Kationen, wie es an Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanälen durch Na⁺ der Fall ist [YELLEN, 1984]. Die weiteren Charakteristika der Einzelkanalströme des P2X₂R (Einzelkanal-Leitfähigkeit, Dosis-Wirkungsbeziehungen, Spannungsabhängigkeit, pH-Abhängigkeiten *etc.*)

konnten in dieser Arbeit ebenfalls aufgrund *o. g.* Gründe nicht aussagekräftig ausgewertet werden.

Dennoch konnte vorliegend vermehrt eine stark aktivierende Wirkung des PI_{4,5}P₂ beobachtet werden, teilweise sogar derart stark, dass nicht mehr zwischen einzelnen Kanälen unterschieden werden konnte. Es schien, als bewahrte diese PI-Isoform den offenen Kanal vor dem Eintreten in den desensibilisierten Zustand bzw. als stabilisierte sie den Offen-Zustand. Sämtliche anderen getesteten Substanzen zeigten, wie in den makroskopischen Strom-Untersuchungen auch, keinerlei Beeinflussung des Rezeptorstroms auf Einzelkanalebene. Diese ersten Ergebnisse bestätigen den Einfluss des PI_{4,5}P₂ auf den P2X₂ Rezeptor, wie ZHAO *et al.* es ebenfalls kürzlich [2007a+b] zeigten, bedürfen aber noch weiterer, detaillierter Messungen.

4.3.4 Wirkung des PI_{4,5}P₂

Bisher konnten keine Konsensus-Sequenzen in membranären Transport-Proteinen gefunden werden, die PI-Bindungen vermitteln, wie es für andere, zelluläre Proteine, die nicht membranverankert sind, der Fall ist (z. B. PH- oder FYVE-Domänen, *s. 1.4.3*). Sämtlichst basieren diese Interaktionen zwischen PI-sensitiven Ionenkanälen und eben jenen PIs auf elektrostatischen Wechselwirkungen der entgegengesetzt geladenen, interagierenden Bereiche [HILGEMANN *et al.*, 2001]. Der P2X₂R besitzt ebenfalls keine PH-, FYVE- oder andere PI-bindenden Domänen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei der PI_{4,5}P₂-vermittelten Aktivierung des Kanals ebenfalls um elektrostatische Wechselwirkungen handelt, wie es bereits von anderen Gruppen angenommen wurde [FUJIWARA & KUBO, 2006].

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann von einer Beeinflussung des P2X₂R durch Phosphoinositide, speziell durch PI_{4,5}P₂ ausgegangen werden: PI_{4,5}P₂ verstärkte die Aktivität des P2X₂R, wie es für die meisten PIP₂-regulierten Ionenkanäle bekannt ist [HILGEMANN *et al.*, 2001]. Eine weitere Gemeinsamkeit vieler PI_{4,5}P₂-sensitiver Ionenkanäle ist das Phänomen der Desensibilisierung, wobei PI_{4,5}P₂ vor einer (starken) Desensibilisierung „schützt“ [HUANG *et al.*, 1998] und in den meisten Fällen den Offen-Zustand des Kanals stabilisiert [HILGEMANN & BALL, 1996; BAUKROWITZ *et al.*, 1998]. Die meisten dieser Kanäle weisen basische AS-Reste in ihrem proximalen, also meist membran-nahen C-Terminus auf, die dann mit diesem PI interagieren [KAVRAN *et al.*, 1998; LOPES *et al.*, 2002]. LOPES und Kollegen [2002] halten zudem fest, dass in PI_{4,5}P₂-sensitiven Kanälen die Größe der Ganzzell-Ströme abhängig von der PI-Kanal-Interaktionsstärke ist: je stärker die Wechselwirkung des Kanals mit dem PI, desto höher die Ströme.

Die nun nachgewiesene Tatsache, dass der P2X₂R durch PI reguliert wird, wirft die Frage auf, welche Regulatoren (Kinasen/Phosphatasen) physiologisch für den PI-Haushalt wichtig sind.

Vor allem stellt sich die Frage, ob es sich dabei tatsächlich um einen einzigen Faktor/Regulator handelt oder eher – wie auch schon von HE und Kollegen [2002] angenommen - um ein empfindliches Zusammenspiel diverser Faktoren und Regelkreise, die im zellfreien *Patch* zusammenbrechen. Dass hierbei der (proximale) C-Terminus eine übergeordnete Rolle spielt, wie es *oben bereits dargelegt* wurde, scheint mittlerweile festzustehen. Allerdings beeinflusst offensichtlich auch die Länge des C-Terminus das Desensibilisierungsgeschehen, P2X₂R und P2X₇R besitzen die längsten C-Termini und die geringsten Desensibilisierungsraten. Diesbezüglich berichten SMITH und Kollegen [1999], dass der distale C-Terminus höchstwahrscheinlich mit dem proximalen interagiert, und diese Interaktion das Ausmaß der Desensibilisierung bestimmt. Jedoch wurde der distale C-Terminus bisher in der Literatur weitgehend unbeachtet gelassen, ganz im Gegensatz zum proximalen, der detailliert studiert wurde. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der distale C-Terminus auf potentielle Interaktionsregionen mit anderen Proteinen hin durchsucht. Tatsächlich befindet sich in diesem Bereich eine prolinreiche Region, die ein SH3-Bindungsmotiv trägt (*s. Abb. 1.4*). Der folgende Abschnitt befasst sich mit den Ergebnissen aus Mutationsstudien eben dieses prolinreichen Abschnittes.

4.4 P2X₂-P451A/P454A Rezeptormutante und abschließende Betrachtungen

4.4.1 Neutralisation des distalen SH3-Bindungsmotives verstärkte die P2X₂R Desensibilisierung

Aus *o. g.* Gründen wurde eine P2X₂ Rezeptormutante hergestellt, in deren distalem C-Terminus die Konsensus-Sequenz PXXP eines SH3-Bindungs-Motivs zu AXXA mutiert wurde, um dieses Motiv zu eliminieren (*s. 3.4*). SH3-Epitope kommen in einigen zellulären Proteinen vor, so auch in der PI3K [VANHAESEBROECK *et al.*, 2001] und der PI4K [GEHRMANN & HEILMEYER, 1998]. Da es mittlerweile als gesichert gilt, dass die PI3K [FUJIWARA & KUBO, 2006] bzw. die PI4K einen regulierenden Einfluss auf die Desensibilisierung des P2X₂R hat/haben, wurden 2 Proline in eben jener Konsensus-Sequenz neutralisiert und das Bindungs-Motiv somit unbrauchbar gemacht - trotz der Tatsache, dass in der Literatur davon ausgegangen wird, dass nur der proximale Teil des C-Terminus an dem Desensibilisierungsverhalten des Rezeptors beteiligt ist [KOSHIMIZU *et al.*, 1998a + b; ZHOU *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 1999; BOUÉ-GRABOT *et al.*, 2000; NORTH, 2002; FUJIWARA & KUBO, 2006; *etc.*].

Nach ersten elektrophysiologischen Messungen zeigte sich, dass der mutierte P2X₂-P451A/454A Rezeptor weder eine veränderte Spannungsabhängigkeit, noch ein verändertes Dosis-Wirkungsverhalten in Bezug auf den Agonisten ATP aufwies, was im übrigen auch für andere Punktmutanten des P2X₂R, die ein verändertes Desensibilisierungsverhalten an den Tag legen, gefunden wurde [FUJIWARA & KUBO, 2006]. Auffällig waren jedoch Rezeptorströme,

die – bei gleicher cRNA-Injektionsmenge – um bis 20-fach größer als die des Wildtyps waren. Dieses Phänomen kann nur auf eine erhöhte Expression, d. h. vermehrtes *trafficking* zur Zellmembran, zurückgeführt werden. Eine Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit, ebenso wie eine Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit, erscheint aufgrund des oben beschriebenen Ausmaßes unwahrscheinlich. Um dennoch vergleichbare Ströme, d. h. Expressionsdichte in den Experimenten zu erhalten, wurden die cRNA-Injektionsmengen dementsprechend angepasst.

Eine signifikante Änderung konnte für das Desensibilisierungsverhalten der Mutante gezeigt werden. Die Desensibilisierung war ausgeprägter und ähnelte in ihrem zeitlichen Verlauf stark dem des Wildtyps unter Wortmannin-Bedingungen (PI3K/PI4K-Inhibition, s. Abb. 3.26 und 3.37), was darauf hinweist, dass das gleiche System durch die Mutation beeinflusst wurde wie durch eine vorhergehende Wortmannin-Behandlung des Wildtyp-Rezeptors. Ein in die gleiche Richtung gehender Effekt zeigte sich nach Coexpression mit Ci-VSP: der „Ci-VSP-Effekt“ auf den mutierten P2X₂R war verstärkt, ähnlich wie unter Wortmannin-Behandlung (s. Abb. 3.27 und 3.38). Die Erholung aus dem Ci-VSP-bedingten Desensibilisierungszustand war hingegen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

Bestätigt werden konnte die *oben gemachte* Annahme, dass es sich um ein und denselben Effekt handelte, durch eine Wortmannin-Behandlung des mutierten Rezeptors: falls sowohl das veränderte Desensibilisierungsverhalten der Mutante, als auch das veränderte Desensibilisierungsverhalten des Wildtyp-Rezeptors nach Wortmannin-Behandlung durch dieselben, regulativen Mechanismen beeinflusst wurden, sollte die Wortmannin-Behandlung des mutierten Rezeptors keine Auswirkungen mehr haben, da der hier beteiligte Regulationsweg bereits durch die Mutation im distalen C-Terminus des P2X₂R negativ beeinflusst bzw. ausgeschaltet wurde. In der Tat bewirkte eine Wortmannin-Behandlung des mutierten Rezeptors keine weitere Veränderung der Rezeptor-Desensibilisierung.

4.4.2 Bindung der PI-Kinase an den distalen C-Terminus des P2X₂R und Entwicklung eines gating-Modells

Die vorgenannten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die PI3K bzw. PI4K über SH3-Bindung an den distalen C-Terminus des P2X₂R assoziiert ist, um dann lokal die membranären Phosphoinositide zu phosphorylieren und somit Einfluss auf den Rezeptor zu üben. Allerdings müssten für den endgültigen Beweis dieser Hypothese weiterführende Untersuchungen, z. B. Bindungsassays, wie *oben bereits dargelegt*, durchgeführt werden. Jedoch kann man davon ausgehen, dass der distale C-Terminus des P2X₂R eine höhere Bedeutung in Bezug auf das Desensibilisierungsverhalten des Rezeptors hat als bisher angenommen. Offenbar scheint er an der Regulation des Kanal-gatings und somit auch der

4. Diskussion

Desensibilisierung beteiligt zu sein, wobei die PI3K oder PI4K eine zentrale Stellung einzunehmen scheint.

Auch an dieser Stelle muss erneut auf die Länge des P2X₂R-C-Terminus zurückgekommen werden; neben dem des P2X₇R weist dieser Subtyp den längsten C-Terminus dieser Rezeptorfamilie auf. Ein vergleichbarer Einfluss der Ci-VSP konnte im P2X₁R (*s. o.*), der die hier mutierte Region (P451/P454) aufgrund der Kürze seines C-Terminus nicht besitzt, nachgewiesen werden, so dass auch diese Befunde Hinweise auf die Wichtigkeit des distalen C-Terminus im Desensibilisierungsgeschehen geben.

FUJIWARA & KUBO stellten nach ihren Studien [2006] ein Modell des PI-abhängigen *gatings* des P2X₂R auf, das *Abb. 4.4* zu entnehmen ist. Darin gehen sie davon aus, dass eine Bindung von PIP_ns an den proximalen C-Terminus eine Schlüsselrolle in der Desensibilierungs-Regulation spielt und den Kanal vor einer Desensibilisierung schützt. Sie identifizierten in diesem Bereich 3 positiv geladene Aminosäurereste, die essentiell für die Interaktion mit PIs (K365, K366, K369) scheinen, da eine Neutralisierung dieser Reste das Desensibilisierungsverhalten dieses Rezeptors jeweils verstärkt.

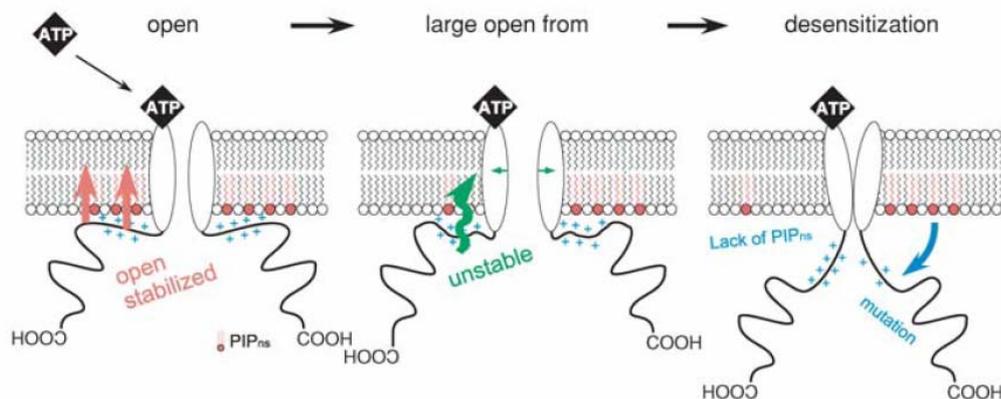


Abb. 4.4: Modell der PIP_n-abhängigen Konformationsänderungen des P2X₂R [FUJIWARA & KUBO, 2006] (extrazellulärer *loop* und N-Terminus weggelassen). Am Anfang steht ein geöffneter Kanal, der nur für monovalente Kationen durchlässig ist (*links*); sobald die PI-P2X₂R-Interaktionen an der Membran nicht mehr aufrecht erhalten werden können, geht der Kanal in einen NMDG⁺-permeablen Zustand (*Mitte*) mit vergrößerter Pore über. Wenn die PI-Interaktionen völlig verschwinden, geht der Kanal in den desensibilisierten Zustand über (*rechts*); Details *s. Text*.

Des Weiteren nehmen sie eine Verbindung zwischen Desensibilisierung und dem Phänomen der *pore dilation* an, da diese in gleichem Maße wie die Desensibilisierung des Kanals durch eine Wortmannin-Behandlung beschleunigt wird. Daraus schlossen sie, dass die Beendigung des dilatierten Zustandes (*pore dilation*) eng an die Desensibilisierung geknüpft ist. Zur Beschreibung dieser Befunde legen sie 3 distinkte Zustände des Kanals nach dessen Öffnung zugrunde: offen mit einer kleinen Pore (Na⁺-permeabel), offen mit einer erweiterten Pore (NMDG⁺-permeabel) und desensibilisiert. Da die Beendigung der *pore dilation* zeitlich mit der Desensibilisierung korreliert war, gehen sie hier davon aus, dass der Kanal ausschließlich

4. Diskussion

vom Zustand der erweiterten Pore aus desensibilisiert, dementsprechend eine Voraussetzung für das Erreichen des desensibilisierten Zustandes ist.

Der offene Zustand des Kanals wird also durch Interaktion des proximalen C-Terminus mit PIP_ns in der Membran stabilisiert, die Desensibilisierung verlangsamt. Wenn der membranäre PIP_ns -Gehalt (aus welchen Gründen auch immer) reduziert wird, löst sich dieser „Membrananker“ und die Interaktionen werden instabil. Daraus resultieren Konformationsänderungen, die im weiteren Verlauf zum Erreichen des desensibilisierten Zustandes führen. Es wird angenommen, dass sich die C-terminalen Konformationen während des Zustandes der kleinen Pore und des der erweiterten Pore voneinander unterscheiden, wie ihre Ergebnisse sowie auch FRET-Studien durch FISHER *et al.* [2004] nahe legen.

Legt man dieses Modell den Ergebnissen dieser Arbeit zugrunde, so lässt sich dieses wie folgt erweitern bzw. abändern (s. Abb. 4.5):

Im ATP-freien Zustand, in dem der Kanal des $\text{P2X}_2\text{R}$ geschlossen ist, gibt es weder Interaktionen des proximalen C-Terminus mit membranären Phosphoinositiden, noch eine Bindung des distalen C-Terminus mit der PI3K/PI4K. Nach Agonisten-Bindung an den Rezeptor (3 ATP-Moleküle pro funktionellem Kanal [DING & SACHS, 1999; NAKAZAWA & OHNO, 2004]) öffnet dieser und befindet sich fortan in einem Gleichgewicht zwischen Offen- und Geschlossen-Zustand, bis er den desensibilisierten Zustand erreicht. In diesem *gating*-Verlauf kann nun folgendes angenommen werden:

Nach ATP-Bindung, die eine positive Kooperativität aufweist, kommt es nach und nach zu sowohl einer Rezeptor-PI-Interaktion (proximaler C-Terminus/Membran) als auch zu einer Bindung der PIK an den distalen C-Terminus. Erstere stabilisiert die Offen-Konformation des Rezeptors [FUJIWARA & KUBO, 2006], letztere bedingt nun die Phosphorylierung von membranständigen (nicht an den Rezeptor assoziierten) Phosphoinositiden, die sich in der näheren Umgebung des Rezeptors befinden.

Da bekannt ist, dass die zellulären Phosphoinositide einem hohen Umsatz in der Zelle unterliegen, und der $\text{P2X}_2\text{R}$ zwischen O_{ATP} und C_{ATP} -Zustand hin- und herwechselt, kann angenommen werden, dass im C_{ATP} -Zustand die Bindung an die Phosphoinositide unterbrochen oder zumindest gelockert wird, und diese anionischen Lipide durch Lipasen, Phosphatasen oder Kinasen umgesetzt werden und dementsprechend nicht mehr mit dem Rezeptor interagieren können. Somit können sie auch nicht mehr zur Stabilisierung des Offen-Zustandes beitragen. Jedoch phosphoryliert die PI-Kinase die umgesetzten Phosphoinositide und macht sie somit wieder einer Interaktion mit dem Rezeptor zugänglich, wenn dieser wieder in die Offen-Konformation übergeht – stabilisiert also diese Kanal-Konformation und

4. Diskussion

erhöht die Offenwahrscheinlichkeit (p_0). Die an den distalen C-Terminus gebundene PI-Kinase stellt somit sicher, dass zu jeder Zeit genügend Phosphoinositide in der Membran um den Rezeptor vorhanden sind, um weiterhin mit dem proximalen C-Terminus interagieren zu können und so die Offen-Konformation (I_1 , kleine Pore, monovalente Kationen permeieren) stabilisieren und den Rezeptor vor einer (schnellen) Desensibilisierung schützen zu können. Sobald diese Interaktionen instabil werden (*s. u.*), weil nicht genügend Phosphoinositide nachgebildet werden können, geht der Rezeptor in den I_2 -Zustand über (*pore dilation*, Vorstufe zur Desensibilisierung), der nun auch große Moleküle wie NMDG^+ passieren lässt [FUJIWARA & KUBO, 2006], bevor er dann schnell in den desensibilisierten Zustand (D_{ATP} und D) übergeht, was in erster Linie von vollständig Liganden-beladenen Rezeptoren aus geschieht [DILGER, 2002] und im Falle von fehlenden PI- $\text{P2X}_2\text{R}$ -Interaktionen an der Membran beschleunigt wird [FUJIWARA & KUBO, 2006].

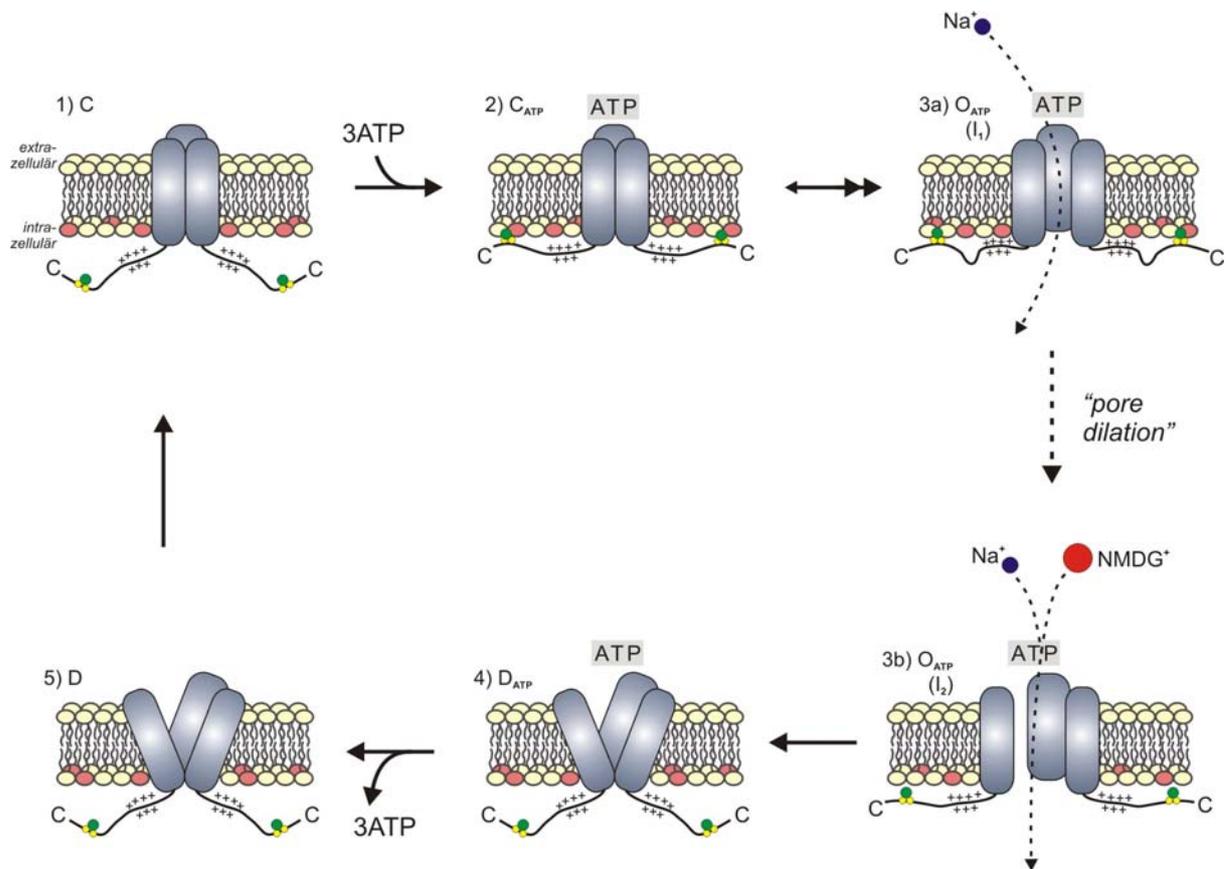


Abb. 4.5: Schematisches *gating*-Modell des P2X_2 Rezeptors, aufgestellt nach den Ergebnissen dieser Arbeit, basierend auf den Modellen von DING & SACHS [1999] und FUJIWARA & KUBO [2006]. Erläuterungen *s. Text* (gelbe Kreise: SH3-Bindungsmotiv, grüne Kreise: PI-Kinase; rote Kreise: Phosphoinositide, + = positive Ladungen im proximalen C-Terminus; $C_{\text{ATP}}/O_{\text{ATP}}/D_{\text{ATP}}$: Rezeptorzustände).

Die Tatsache, warum diese – schon von FUJIWARA & KUBO postulierten Phosphoinositid-Rezeptor-Interaktionen instabil werden, kann nun unterschiedliche Gründe haben, diese sind

4. Diskussion

jedoch mit sämtlichen hier gefundenen Ergebnissen wie auch früheren Studien anderer Arbeitsgruppen kompatibel:

Die Interaktionen des proximalen C-Terminus mit einer Anzahl verschiedener Phosphoinositide wurden 2006 (*s. o.*) erstmals postuliert, jedoch gab es keine Erklärung für das unterschiedliche Desensibilisierungsverhalten der unterschiedlichen P2X Subtypen oder aber auch nur von P2X₂R in unterschiedlichen Zelltypen bzw. Zell-*batches* gleichen Typs gefunden werden. FUJIWARA & KUBO lieferten zudem keinerlei Erklärung für das plötzliche „Verschwinden“ der Phosphoinositid-Rezeptor-Interaktionen an der Membran, sie führten lediglich die Beschleunigung der Desensibilisierung auf eine PI3K-Inhibition zurück. Legt man nun die hier aufgestellte Hypothese zugrunde, dass der distale C-Terminus mit der PIK interagiert und somit deren Phosphorylierungsaktivität an Membranbereiche nahe des jeweiligen Rezeptors „dirigiert“ (wie es für die PI3K an anderen Proteinen berichtet wird [VANHAESEBROECK *et al.*, 2001]), so wird verständlich, warum die PI-Kinase so zielgerichtet auf die Desensibilisierung des P2X₂R wirken kann.

Das erklärt auch, warum es in unterschiedlichen Zelltypen und auch in verschiedenen *batches* des gleichen Zelltyps unterschiedlich stark ausgeprägte Desensibilisierungsverhalten des P2X₂R [ZHOU *et al.*, 1998] geben kann – jede Zelle weist unterschiedliche PI-Kinase- (wie auch Phosphatase-, *etc.*) Aktivitäten und dementsprechend unterschiedliche PI-Level auf. Auch die Tatsache, dass in *outside out-Patches* an P2X₂R exprimierenden Membranen eine schnelle Desensibilisierung beobachtet werden kann, hat unter diesem Modell einen Sinn, da die PIK ausgewaschen wird und somit die Offen-Konformation des Rezeptors durch ihre PI-Phosphorylierungsaktivität nicht stabilisieren kann.

Die Untersuchung der Rezeptormutante P2X₂R-P451A/P454A gab endgültigen Aufschluss über die bisher diskutierten Zusammenhänge. P2X₂R-P451A/P454A besitzt kein funktionelles SH3-Bindungs-Motiv mehr, die PI3-/4-Kinase kann somit nicht mehr an den Rezeptor binden und nicht für einen „Nachschub“ geeigneter PIs in lokaler Nähe des Rezeptors sorgen. Die Offen-Konformation kann nicht lange stabil bleiben und der Rezeptor geht (zunächst über den I₂-Zustand) in den desensibilisierten Zustand über, was sich in Ganzzelleableitungen in einem verstärkten Desensibilisierungsverhalten äußerte. Zusätzlich wurde die Rezeptormutante im *Patch Clamp*-Experiment untersucht, jedoch zeigte sie hier keinerlei Unterschiede in der Stromantwort auf sättigende ATP-Konzentrationen zum Wildtyp-Rezeptor, sowohl die Kinetiken (Zeitkonstante τ) als auch die Stärken der Desensibilisierung („I_{Ende}“) beider Gruppen waren identisch. Dieser Befund bekräftigt *oben gemachte* Annahme, dass die hier herbeigeführte Doppel-Punktmutation im distalen C-Terminus die Interaktion mit der PIK unterband bzw. störte, so dass es nur in Ganzzelleableitungen zu einem veränderten Desensibilisierungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp kam, nicht jedoch im *Patch Clamp*-

4. Diskussion

Versuch, da hier die PIK ohnehin bereits ausgewaschen war. Somit war keinerlei Unterschied zwischen Wildtyp und mutiertem Rezeptor mehr zu beobachten. Demnach führte die Neutralisation der Proline 451 und 454 zu einem veränderten Phänotyp, jedoch nicht als intrinsischer Rezeptoreigenschaft, sondern als Auswirkung einer unterbundenen/gestörten Interaktion mit einem – nur in der intakten Zelle vorhandenen – regulativen Faktor, bei dem es sich nach den hier gewonnenen Ergebnissen um die PI3- oder die PI4-Kinase handelt.

Auch das Phänomen des unterschiedlichen Desensibilisierungsverhalten der beiden *splice Varianten* des rP2X₂R [BRÄNDLE *et al.*, 1997; SIMON *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1999] können hiermit erklärt werden, sie besitzen zwar beide das SH3-Epitop im distalen C-Terminus, können also mit der PI3-/4-Kinase interagieren, jedoch fehlt der schnell desensibilisierenden 2b-Variante ein wichtiger Bereich des proximalen C-Terminus, der – nach FUJIWARA & KUBO - für die PI-Interaktionen mit der Membran verantwortlich ist, so dass der Offen-Zustand des Rezeptors nicht stabilisiert werden kann.

Im Falle der Ci-VSP Coexpressionsstudien zeigte sich, dass die Ci-VSP in den PI-Haushalt der Zelle eingriff und somit in der Lage war, auf die Desensibilisierung des P2X₂R einzuwirken. Welche Veränderung letztendlich die entscheidende für die P2X₂R Regulation war, bleibt noch zu klären, jedoch scheint es nach vorangegangener Diskussion, als sei vorrangig PI_{4,5}P₂ für eine Modulierung des Rezeptors verantwortlich (*s. o.*). Diese Vermutung steht allerdings in direktem Gegensatz zu den Aussagen von FUJIWARA & KUBO [2006], die ausdrücklich PI_{4,5}P₂ ausschlossen, und wird im abschließenden Kapitel dieser Arbeit (4.4.3) noch einmal ausführlich diskutiert werden.

Vorliegend konnte nachgewiesen werden, dass der „Ci-VSP-Effekt“ ausschließlich am C_{ATP}-Zustand des Rezeptors angreift, Arretierung des Rezeptors im O_{ATP}-Zustand zeigte keinerlei Beeinflussung durch die Ci-VSP. Dieses Ergebnis, was *oben* bereits diskutiert wurde, wird hier nun verständlich: Im O_{ATP}-Zustand sind die Rezeptor-PI-Interaktionen stark, der Kanal ist vor einer Desensibilisierung geschützt. Dadurch, dass er durch einen *open pore block* in diesem Zustand arretiert wurde, blieb diese starke Interaktion über lange Zeit erhalten, die an dieser Interaktion beteiligten PIs wurden nicht durch zelluläre Enzyme des PI-Metabolismus umgesetzt und auch die Ci-VSP hatte keinen Zugang zu den beteiligten PIs, da der Rezeptor durch eben jenen *open pore block* nicht zwischen C_{ATP}- und O_{ATP}-Zustand hin- und herwechseln konnte.

Die Tatsache, dass der „Ci-VSP-Effekt“ erst in Anwesenheit von ATP, also nach ATP-Bindung an den Rezeptor beobachtet werden konnte, weist darüber hinaus darauf hin, dass es erst durch eine Konformationsänderung aufgrund extrazellulärer Ligandenbindung zu einer PI-Kinase-Aktivität in Rezeptornähe kommen kann. Wäre das nicht der Fall, hätte auch eine

Ci-VSP-Aktivierung vor Agonisten-Applikation das empfindliche Gleichgewicht der betreffenden PIs in der Membran bereits gestört, so dass die initiale Stromantwort des Rezeptors deutlich verringert gewesen wäre, da dann weniger Rezeptormoleküle den O_{ATP} -Zustand, den die Interaktionen mit den PIs stabilisieren, erreicht hätten. Dies war jedoch nicht zu beobachten. Somit lässt sich zwar nicht ausschließen, dass die PI-Kinase konstitutiv an den Rezeptor bindet (wie es für andere Klasse IA-PI3K berichtet wird: z. B. am CD2 [KIVENS *et al.*, 1998]), aber es kann daraus geschlossen werden, dass die PI-Kinase, die an den distalen C-Terminus assoziiert, erst nach Agonisten-Bindung an den Rezeptor in räumliche Nähe ihrer membranständigen Substrate gebracht wird, um dort aktiv zu sein. Der Fakt, dass der „Ci-VSP-Effekt“ sich innerhalb von Minuten, also recht langsam entwickelte, spricht ebenfalls für diese Annahme. Eine genauere, proteinbiochemische Untersuchung dieser hier postulierten PI-Kinase-Bindung an den distalen C-Terminus des $P2X_2R$ ist in jedem Falle vonnöten.

Da membranäre Phosphoinositide in sog. *lipid rafts*, also akkumuliert in der Membran vorliegen [HILGEMANN *et al.*, 2001], und selbiges auch für $P2X_2$ Rezeptoren („*Cluster*“, [KHAKH *et al.*, 2001b]) nachgewiesen wurde, lässt sich weiterhin vermuten, dass diese $P2X_2$ -Cluster mit denen der PI zusammenfallen könnten, was jedoch einer detaillierten Untersuchung bedarf, aber bereits ebenfalls durch ZHAO [2007b] und Kollegen hypothetisiert wurde.

4.4.3 PI3- oder PI4-Kinase?

Bisher wurde – vereinfachend – in dieser Diskussion der vorliegenden Ergebnisse von der PI-Kinase gesprochen, abschließend soll nun näher auf die möglichen Verantwortlichkeiten der beiden hier diskutierten PI-Kinasen eingegangen werden:

FUJIWARA & KUBO stellen die alleinige Verantwortung an der PI-abhängigen Desensibilisierungsregulation des $P2X_2R$ auf die Seite der PI3K bzw. deren Metabolite und berufen sich dabei auf Experimente mit dem PI-Kinase-Inhibitor Wortmannin (*s. o.*) sowie PIP_n -Bindungsassays an Teilen des proximalen C-Terminus. In diesen Assays konnten sie eine Bindung von sämtlichen monophosphorylierten sowie biphosphorylierten PIPs, nicht jedoch von $PI_{3,4,5}P_3$ zeigen. Aufgrund der Tatsache, dass sie Oozyten mit hohen Konzentrationen an Wortmannin behandelten und davon ausgingen, spezifisch die PI3K zu inhibieren, zogen FUJIWARA & KUBO den Schluss, dass es sich bei den an der Regulation beteiligten PIs ausschließlich um 3'-phosphorylierte PIs (namentlich PI_3P und $PI_{3,5}P_2$) handelt. Sie ließen damit nicht nur anders phosphorylierte PIs außer Acht, sondern auch – ohne Angabe von Gründen - das 3'-phosphorylierte $PI_{3,4}P_2$. Die Tatsache, dass sie durch Wortmannin bzw. LY294002 nicht nur die PI3K, sondern vielmehr auch die PI4K inhibierten, wurde ignoriert. Legte man die von FUJIWARA & KUBO verwendete Schlussfolgerung an deren Bindungsassay-Ergebnisse an, mit dem Zugrundelegen einer PI4K-Inhibition durch

4. Diskussion

Wortmannin, so käme man zu dem Ergebnis, dass es sich vielmehr um die 4'-phosphorylierten PIs (PI_4P , $PI_{4,5}P_2$, $PI_{3,4}P_2$) handelt, die einen Einfluss auf den $P2X_2R$ ausüben.

In der vorliegenden Arbeit wurde – im Widerspruch zu den Interpretationen von FUJIWARA & KUBO – eine stimulierende Wirkung des $PI_{4,5}P_2$ auf den $P2X_2R$ gefunden, eine Beeinflussung durch $PI_{3,5}P_2$ sowie durch die PI3K jedoch ausgeschlossen. Wortmannin-Behandlung (d. h. PI4K-Inhibition) der Rezeptor exprimierenden Oozyten resultierte phänotypisch im gleichen Verhalten des Rezeptorstroms wie in den Untersuchungen von FUJIWARA & KUBO, jedoch wird dieses vorliegend völlig anders gedeutet, was nachfolgend dargelegt wird.

Von den hier gewonnen Ergebnissen scheint eine PI4K-Beteiligung am „Ci-VSP-Effekt“ und an der $P2X_2R$ Regulation wahrscheinlicher als eine PI3K-Beteiligung. Es konnte vorliegend gezeigt werden, dass $PI_{4,5}P_2$ einen stimulierenden Einfluss auf den $P2X_2R$ hatte, gestützt wird dieses Ergebnis durch Ergebnisse von ZHAO *et al.* [2007a+b]. Darüber hinaus zeigten, wie schon erwähnt, FUJIWARA & KUBO [2006] eine Bindung dieses PIs an den C-Terminus des $P2X_2R$. Die PI4K ist am PI-Metabolismus beteiligt, und zwar dahingehend, dass sie die essentielle Vorstufe des $PI_{4,5}P_2$, das PI_4P , synthetisiert. Wird demnach im zellulären Milieu die PI4K inhibiert (durch z. B. Wortmannin), kann kein $PI_{4,5}P_2$ mehr synthetisiert werden [ZHAO *et al.*, 2007b], seine zelluläre Konzentration sinkt [BERNIER *et al.*, 2008] und der $P2X_2R$ nicht mehr im Offen-Zustand stabilisiert werden (s. Abb. 4.5). Der umgekehrte Effekt würde durch eine Ci-VSP-Aktivierung in coexprimierenden Zellen hervorgerufen: diese Phosphatase ist in der Lage, $PI_{4,5}P_2$ zu dephosphorylieren, mit dem selben Effekt wie der einer PI4K-Inhibition. Somit stehen offenbar auch diese beiden Enzyme in einer – wenn auch nicht direkten – antagonistischen Beziehung zueinander.

Aufgrund dieser Betrachtungen kann man zwar die PI4K als möglichen $P2X_2R$ Regulator ansehen, jedoch die PI3K noch nicht ausschließen. Das wird erst möglich durch nähere Beleuchtung der Tatsache, dass die PI3K (Klasse I) als Reaktionsprodukt $PI_{3,4,5}P_3$ hervorbringt - das heißt, wenn es sich um eine alleinige PI3K-Beteiligung handelte, müsste bei einer reinen PI3K-Inhibition der zu beobachtende Effekt auf eine Depletierung des $PI_{3,4,5}P_3$ zurückzuführen sein. Dieses PI zeigte in der vorliegenden Arbeit aber keinerlei Beeinflussung des $P2X_2R$ im *Patch Clamp*-Experiment, und auch FUJIWARA & KUBO konnten keinerlei Bindung des proximalen C-Terminus an dieses PI feststellen. Aus diesem Grund nahmen sie an, dass es zu einer Rezeptor-Bindung an membranäre 3'-phosphorylierte PIs (v. a. das – höchst selten vorkommende (s. o.) - $PI_{3,5}P_2$) kommt. Jedoch wird dieses durch eine PI3K-Inhibition in keiner Weise in seiner Synthese gestört, da die verantwortliche Kinase in diesem Fall mitnichten die PI3K, sondern die PI3P5-Kinase ist ($PI3P5K$ [MÜLLER, 2007], s. Abb. 4.3). Das heißt, dass die verstärkte Desensibilisierung des $P2X_2R$ unter Wortmannin-

4. Diskussion

Einfluss nicht auf eine PI_{3,5}P₂-Depletierung (aufgrund reiner PI3K-Inhibition) zurückgeführt werden kann, wie von FUJIWARA & KUBO postuliert. Darüber hinaus hatte ein PI_{3,5}P₂-Zusatz in dieser Arbeit auf den P2X₂R keinen Effekt. Wenn die Aussagen von FUJIWARA & KUBO Bestand hätten, dann müsste sich im Umkehrschluss bei einer verstärkten PTEN-Aktivität (Imitation einer PI3K-Inhibition [WAITE & ENG, 2002]) in der Zelle der PI_{3,5}P₂-Gehalt ändern, dies ist jedoch nicht der Fall: eine Überexpression der PTEN-Phosphatase beeinflusst die 3'-phosphorylierten PIs PI_{3,5}P₂ und PI₃P in keiner Weise [LESLIE & DOWNES, 2002], sondern nur das PI_{3,4,5}P₃ – und dieses hatte keinen Effekt auf den P2X₂R und bindet auch nicht an dessen C-Terminus.

Ein weiteres Argument für eine PI4K-basierte Regulation des P2X₂R ist die Tatsache, dass eine Bindung dieses Enzyms via SH3-Epitop im distalen C-Terminus an den P2X₇R gefunden wurde [KIM *et al.*, 2001]. ZHAO und Kollegen konnten 2007[b] durch PI4K-Inhibition mit Wortmannin zeigen, dass die zellulären PI_{4,5}P₂-Level reduziert waren und sich dies in einer Reduzierung der Stromamplitude des P2X₇R äußerte. PI_{4,5}P₂-Zusatz führte in diesen Messungen zu einer „Erholung“ des Rezeptorstroms, eine PI3K-Inhibition mit nanomolaren, spezifischen Konzentrationen dieses Kinase-Inhibitors zeigte in diesen Untersuchungen keinen Effekt. Selbiges zeigten sie am P2X₃R.

Auch der „Ci-VSP-Effekt“ kann damit nicht mehr mit einer PI_{3,5}P₂- bzw. einer PI_{3,4,5}P₃-Depletierung durch Ci-VSP erklärt werden, da dieses Enzym zwar PI_{3,4,5}P₃ dephosphorylieren kann, dies aber, aufgrund der Tatsachen, dass weder FUJIWARA & KUBO eine Bindung an dieses PI feststellen konnte, noch in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss dieser PI-Isoformen auf den P2X₂R gefunden werden konnte, ausgeschlossen werden kann. Hinzu kommt das Ergebnis, dass weder ein Zusatz der PI3K noch der PTEN einen Einfluss auf den P2X₂R hatten - beides Enzyme, die den PI_{3,4,5}P₃-Gehalt in der Zelle beeinflussen.

Die noch am Anfang aufgestellte Hypothese, dass der PI3K-PTEN-Antagonismus womöglich eine essentielle Rolle in der Regulation des P2X₂R spielt, muss an dieser Stelle dahingehend korrigiert werden, dass es sich wohl eher um einen anderen, empfindlich regulierten, antagonistischen PI-Metabolismus in der Zelle handelt. Zwar zeigt die Ci-VSP große strukturelle Ähnlichkeit mit der PTEN-Phosphatase (Gegenspieler der PI3K), kann aber, im Gegensatz zur PTEN auch PI_{4,5}P₂ dephosphorylieren. Da nun die PI4K nach näherer Betrachtung mehr und mehr in den Fokus zu rücken scheint, stellt sich die Frage nach einem „Ci-VSP-Pendant“ in der nativen Zelle, wenn es sich dabei nicht um PTEN handelt (Ci-VSP selber kommt nur in Seescheiden vor und kann daher nicht als nativer Regulator des P2X₂R betrachtet werden). In der intakten Zelle gibt es Phosphoinositid 5'-Phosphatasen: die des Typ I hydrolysieren lediglich Inositol-_{1,4,5}-Trisphosphat (IP₃) und Inositol-_{1,3,4,5}-Tetrakisphosphat (IP₄) [COMMUNI *et al.*, 2001], jedoch ist die des Typ II („Inositol Polyphosphat 5'Phosphatase“,

4. Diskussion

INPP5B) in der Lage, sowohl IP_3 als auch $PI_{4,5}P_2$ zu hydrolysieren [JEFFERSON & MAJERUS, 1995; BLERO *et al.*, 2007]. Sie wurde 1987 im Rattenhirn entdeckt [HANSEN *et al.*, 1987] und stellt einen wichtigen Regulator des zellulären PI-Metabolismus dar. Somit kann an dieser Stelle die Hypothese aufgestellt werden, dass der $P2X_2R$ einer Regulation durch den zellulären PI4K-INPP5B-Antagonismus reguliert wird (s. *Abb. 4.6*).

PI_4P (Synthese-Produkt der PI4K) kann als auf den $P2X_2R$ regulierend wirkendes PI ausgeschlossen werden, da eine Ci-VSP-Aktivität PI_4P produziert, dies aber Desensibilisierungs-verstärkend wirkt. Somit ist der Effekt der PI4K auf den $P2X_2R$ indirekter Natur dahingehend, dass durch sie eine essentielle Vorstufe des $PI_{4,5}P_2$ synthetisiert wird [ZHAO *et al.*, 2007b], s. *Abb. 4.6*.

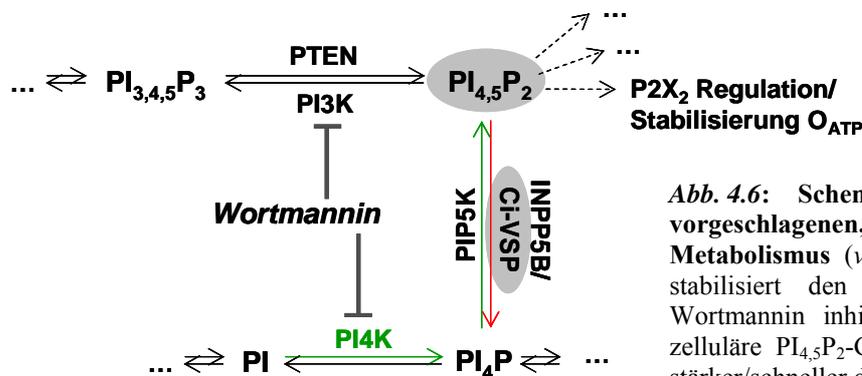


Abb. 4.6: Schema des in dieser Arbeit vorgeschlagenen, $P2X_2R$ -regulierenden PI-Metabolismus (vgl. *Abb. 4.4* bzw. *4.5*). $PI_{4,5}P_2$ stabilisiert den Offen-Zustand des Kanals, Wortmannin inhibiert die PI4K, so dass der zelluläre $PI_{4,5}P_2$ -Gehalt sinkt und der Rezeptor stärker/schneller desensibilisiert (s. *Text*).

Somit sind die vorangegangenen Ausführungen kompatibel mit Ergebnissen bzw. Daten anderer Arbeitsgruppen [KIM *et al.*, 2001; FUJIWARA & KUBO, 2006; MURATA & OKAMURA, 2007; ZHAO *et al.*, 2007b], jedoch in Teilen widersprüchlich zu den Interpretationen von FUJIWARA & KUBO [2006].

Abschließend wird darauf hingewiesen, dass die *oben dargestellte* Regulation des $P2X_2R$ über eine komplexe PI-Regulation nur eine weitere Möglichkeit des „fine tunings“ der Desensibilisierungs-Regulation [ZHAO *et al.*, 2007b] in diesem System offenbart, da die PI4K und ihr Gegenspieler INPP5B nicht die einzigen Faktoren sind, die regulierend auf den $P2X_2R$ einwirken, sondern sich lediglich in eine ganze „Regulationskaskade“ einreihen. Diese steht offenbar in einem empfindlichen Gleichgewicht und ist von diversen, PI-unabhängigen Einflüssen abhängig, wie Studien zur Beteiligung des proximalen C-Terminus des $P2X_2R$ und anderer Faktoren darlegen. In all diesen Studien konnte gezeigt werden, dass Mutationen nahezu jedes AS-Rests im proximalen C-Terminus (Reste 365-376, v. a. Val370) sich auf die Stärke der Desensibilisierung auswirken [BRÄNDLE *et al.*, 1997; SIMON *et al.*, 1997; KOSHIMIZU *et al.*, 1998b; SMITH *et al.*, 1999], diese Wirkung im Nachhinein aber nicht immer auf eine PI-Beteiligung zurückgeführt werden kann. Konstitutive Phosphorylierung des Rezeptors an C-terminalen (Thr371, Thr464, s. *Abb. 1.4*) sowie N-terminalen AS (Thr18) durch die PKC scheinen die Desensibilisierung negativ zu beeinflussen, d. h., zu hemmen, PKA-vermittelte

4. Diskussion

Phosphorylierung (Ser431) scheint sie dagegen zu beschleunigen [BOUÉ-GRABOT *et al.*, 2000]. ZHOU *et al.* [1998] fanden darüber hinaus eine Beteiligung des cytoplasmatischen Teils der 2. Transmembrandomäne und sprechen dem Asp349 (konserviert in P2X_{1,2,3}) eine essentielle Rolle zu, jedoch wurde 2004 eine Studie veröffentlicht, die diese Ergebnisse teilweise in Frage stellt [NAKAZAWA & OHNO, 2004]. Des Weiteren ist die Desensibilisierung abhängig von externen Faktoren, wie z. B. extrazellulären, divalenten Kationen, obwohl hierbei nicht geklärt ist, ob es sich um wahre Desensibilisierungs-Beeinflussung handelt oder eher um Inaktivierung des Rezeptors [DING & SACHS, 1999].

4.5 Ausblick

Diese Arbeit hat gezeigt, dass der P2X₂ Rezeptor durch Phosphoinositide reguliert werden kann und dass dabei die PI4K bzw. das PI_{4,5}P₂ eine entscheidende Stellung einnehmen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine prolinreiche Region am distalen C-Terminus höchstwahrscheinlich für eine Regulation des P2X₂R durch die PI4K verantwortlich ist, so dass sich proteinbiochemische Methoden, wie z. B. Immunopräzipitationsstudien mit diesem Proteinbereich o. Ä. zur weiteren Aufklärung der hier zugrunde liegenden Mechanismen und Bestätigung der aufgestellten Hypothesen (Bindung PI4-Kinase an den distalen C-Terminus), anbieten.

Des Weiteren ist mittlerweile eine HEK293-Zelllinie in diesem Labor etabliert, die den P2X₂R stabil exprimiert, was reproduzierbare Ganzzelleitungen im *Patch Clamp*-Experiment ermöglicht, da der in dieser Arbeit limitierende Schritt der Transfektion wegfällt. Eine Erweiterung der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen mithilfe dieser Zelllinie würde weiteren Aufschluss über die Möglichkeiten der Phosphoinositid-Regulation am P2X₂ Rezeptor geben.

Während schnell-desensibilisierende Subtypen, wie der P2X₁R, gegenüber einer Ci-VSP-bedingten Desensibilisierungs-Beeinflussung „immun“ sind, da die Desensibilisierung schon vollständig ist, bevor der „Ci-VSP-Effekt“ greifen kann, und nicht-desensibilisierende Subtypen (P2X_{2/1} Rezeptorchimäre) ebenfalls nicht beeinflussbar sind, da es keine Desensibilisierung gibt, die durch Ci-VSP zu verstärken wäre, wäre eine weiterführende Untersuchung mit Coexpressions-Studien am P2X₄ Rezeptor interessant. Dieser weist den kürzesten C-Terminus aller 7 bekannten Subtypen auf und zeigt ein intermediäres Desensibilisierungs-Verhalten, das sich biphasisch äußert.

Ein weiterer, noch zu untersuchender und ebenfalls interessanter Punkt, der jedoch zunächst nichts mit der P2X Regulation durch Phosphoinositide zu tun hat, wäre die detailliertere Untersuchung des durch Aminoglykoside herbeigeführten *open pore blocks* am P2X₂R, wie er im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben wurde. In dieser Arbeit wurde hiervon Abstand genommen, da es sich nicht um das eigentliche Thema handelte, sondern lediglich als „Nebeneffekt“ entdeckt wurde, wobei es sich allerdings später als wertvolles Werkzeug zur näheren Charakterisierung des „Ci-VSP-Effekts“ herausstellte.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich in erster Linie mit der Regulation des P2X₂ Rezeptors (P2X₂R) durch Phosphoinositide (PI). P2X Rezeptoren sind durch extrazelluläres ATP aktivierte Kationenkanäle, die ubiquitär unter Vertebraten, v. a. im zentralen wie peripheren Nervensystem exprimiert werden. Bis heute sind 7 verschiedene Untereinheiten dieser Rezeptorfamilie bekannt, die nach homo- oder heterotrimerer Assemblierung unterschiedliche funktionelle Phänotypen ausbilden. Die P2X Rezeptoren sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Für ihre Beteiligung am zellulären Signalgeschehen wurde in der Vergangenheit der Begriff der purinergen Signaltransduktion geprägt.

PI_{4,5}P₂ ist ein zelluläres, an der Innenseite der Plasmamembran verankertes Phospholipid, dem zahlreiche, essentielle Funktionen zukommen. Dass es auch Signalfunktion besitzen kann, wurde erst spät (1980) bekannt; dass es darüber hinaus zudem membranäre Transportsysteme reguliert, konnte erst in den letzten Jahren gezeigt werden. Die ersten Kanäle, für die eine Phosphoinositid (PI)-Beeinflussung nachgewiesen wurde, waren die einwärts gleichrichtenden K⁺-Kanäle. 2006 wurden die ersten vorläufigen Hinweise publiziert, dass auch die Kanalfunktion der P2X Rezeptoren durch Phosphoinositide beeinflusst werden kann.

Darauf aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit der P2X₂R nach Expression in *Xenopus* Oozyten elektrophysiologisch auf eine mögliche Regulation durch PIP_ns untersucht. Um die in der Oozyte vorliegenden PI-Level gezielt während der Messung ändern zu können, wurde die spannungsgesteuerte Phosphoinositid-Phosphatase Ci-VSP coexprimiert. Ci-VSP, die der PTEN-Phosphatase strukturell sehr ähnlich ist, wurde 2005 aus der Schlauchascidie *Ciona intestinalis* kloniert. In der veröffentlichten Klonierungsarbeit wurde bereits gezeigt, dass Ci-VSP in der Lage ist, bekannte PI_{4,5}P₂-sensitive Membrankanäle, wie z. B. bestimmte K⁺-Kanäle, spannungsabhängig zu inhibieren.

Es konnte in TEVC-Experimenten gezeigt werden, dass die durch Depolarisation induzierte Aktivierung dieser Phosphatase den P2X₂ Rezeptorstrom in seiner Desensibilisierung sowohl beschleunigt als auch verstärkt. Dieser Effekt war spannungsabhängig und nahm mit höherer Depolarisation zu. Die ermittelte Spannungsabhängigkeit stimmte dabei mit dem sensitiven Potentialbereich der spannungsgesteuerten Ci-VSP-Domäne, gemessen an ihren *gating*-Strömen, überein. Der „Ci-VSP-Effekt“ auf den P2X Rezeptor konnte nur in Anwesenheit von ATP, d.h. bei aktiviertem Rezeptor, beobachtet werden. Wurden die Oozyten mit Wortmannin, einem PI4-Kinase(PI4K)-Inhibitor, behandelt, zeigte sich eine vergleichbare Veränderung des Rezeptorstroms. Eine PI4K-Inhibition zielt demnach offensichtlich auf die

5. Zusammenfassung

gleichen Regulationsmechanismen wie die Ci-VSP-Aktivierung. In weiterführenden zellfreien *Patch Clamp*-Messungen an Oozytenmembranen wurden sowohl Einzelkanal- als auch makroskopische Ströme des P2X₂R unter Einfluss verschiedener, intrazellulär verabreichter PIs und PI-beeinflussender Enzyme untersucht. Einzig die Zugabe von PI_{4,5}P₂ hatte einen deutlich aktivierenden Einfluss auf den makroskopischen Rezeptorstrom, andere getestete PIs (wie auch PI3-Kinase und PTEN-Phosphatase) zeigten keinerlei Wirkung. Vergleichbare Ergebnisse konnten in vorläufigen Einzelkanal-Messungen an diesem Rezeptor Subtyp beobachtet werden.

Da die PI4-Kinase offensichtlich an der beobachteten Beeinflussung der P2X₂R Desensibilisierung beteiligt ist, wurde die P2X₂-Rezeptorsequenz auf potentielle - über sogenannte SH3-Epitope vermittelte - PI4K-Interaktionsbereiche hin untersucht. Diese SH3-Epitope kommen in vielen zellulären Proteinen vor, um Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln. Nach Sequenzanalyse des maßgeblich am Desensibilisierungsgeschehen beteiligten C-Terminus des P2X₂R konnte im distalen Teil ein SH3-Bindungsmotiv lokalisiert werden, das daraufhin durch gerichtete Mutagenese (P2X₂-P451A/P454A) unwirksam gemacht wurde. Dieser mutierte Rezeptor verhielt sich in seiner Desensibilisierung wie der Wildtyp nach Wortmannin-Behandlung, zeigte also eine intrinsisch verstärkte Desensibilisierung. Eine Wortmannin-Behandlung der Oozyten, die den mutierten Rezeptor exprimierten, führte hingegen zu keiner weiteren Beeinflussung des Rezeptorstroms. Somit konnte letztlich der Schluss gezogen werden, dass die PI4K, und das mit ihr in direkter Verbindung stehende PI_{4,5}P₂, einen maßgeblichen Einfluss auf das Desensibilisierungsverhalten des P2X₂R hat. Auf Basis der erarbeiteten Befunde wurde ein kinetisches Reaktionsmodell des P2X₂R erstellt, das bisher aufgestellte Modelle mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereint, aber auch in teilweisem Gegensatz zu dem von FUJIWARA & KUBO [2006] steht.

Des Weiteren wurde im Verlauf dieser Arbeit die reversible Inhibition des P2X₂R durch eine Reihe von Aminoglykosid-Antibiotika untersucht. Durch Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehungen, der Spannungs- sowie wie ATP-Konzentrations-Abhängigkeit der Inhibition konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um einen nicht-kompetitiven *open pore block* handelte. Durch weiterführende Untersuchungen an einer nicht-desensibilisierenden P2X_{2/1} Rezeptorchimäre wurde gezeigt, dass eine Aminoglykosid-Inhibition die ATP-Dissoziation von der Rezeptorbindungsstelle signifikant verlangsamt. Dieser Befund deutet auf eine im Vergleich zum geschlossenen Zustand erhöhte Affinität des offenen Zustands für ATP hin. Neben den hier untersuchten Aminoglykosiden sind bislang keine weiteren Substanzklassen bekannt, die den P2X₂R durch einen derartigen Mechanismus hemmen.

6. Summary

The principal subject of this PhD-Thesis was the phosphoinositide-dependent regulation of the P2X₂ receptor (P2X₂R). P2X receptors are ATP-gated cation channels that are ubiquitous among vertebrates and are expressed especially in central and peripheral nervous system. To date, seven homologous subunits have been cloned which lead to functionally different phenotypes after homotrimeric or heterotrimeric assembly. P2X receptors are involved in a variety of physiological and pathophysiological processes. Due to their involvement in cellular signalling events the term “purinergic signalling” had been established.

PI_{4,5}P₂, a cellular phospholipid, is anchored at the inner leaflet of the plasma membrane and responsible for many important and essential functions. Beside its well-known functions in physiological processes, it was long time neglected that it also plays a pivotal role in cellular signalling, until this fact was proven in 1980. Furthermore, since several years it is generally accepted that it is also involved in the regulation of membrane transport systems. The first channels for which a strong modulation by this phosphoinositide (PI) isoform was demonstrated were Kir-channels (inward rectifying K⁺-channels). First, but very preliminary evidence for a PI-based regulation of P2X receptors has been published in 2006.

Based on these preliminary results the P2X₂R was tested for a potential functional modulation by PIP_ns with electrophysiological and molecular approaches. For manipulating intracellular PI-levels, heterologous coexpression of the voltage-dependent PI-phosphatase, Ci-VSP, was used. Ci-VSP, which has been cloned from the sea squirt (*Ciona intestinalis*) in 2005, is an intracellular localized phosphoinositide-phosphatase. Its structure shows high similarity to PTEN, a tumour suppressor PI-phosphatase, and it is able to influence PI_{4,5}P₂-sensitive membrane channels, like K⁺-channels, in a voltage-dependent manner by modulating the PI_{4,5}P₂-concentration of the cell membrane.

Here it could be shown that coexpression of P2X₂R and Ci-VSP in *X. laevis* oocytes and voltage-dependent activation of the enzymatic activity of Ci-VSP by depolarization influenced the desensitization properties of the P2X₂R in two-electrode voltage-clamp measurements. The depolarization induced Ci-VSP activation resulted in an accelerated and intensified receptor current desensitization upon prolonged agonist application. The effect could only be observed in presence of ATP, i.e. when the receptors were active, and the increase in desensitization was more pronounced at more depolarizing potentials. The potential range for the P2X₂R effect strongly correlated with that for the Ci-VSP activity as derived from Ci-VSP gating-currents, suggesting that activation of Ci-VSP changed the intracellular PI-metabolism by turnover of the membrane-bound PIP_ns, resulting in an

6. Summary

increased P2X₂R desensitization. When oocytes were pre-treated with wortmannin, a PI4-kinase-inhibitor, a similar modulation of receptor current could be observed, suggesting that Ci-VSP-activity and wortmannin interact with the same regulatory pathway. Investigating macroscopic currents in outside out patches of P2X₂ receptor expressing oocyte membranes in presence of PIP_ns and PI-related enzymes it could be demonstrated that only PI_{4,5}P₂ had an stimulating effect on receptor function. All other substances tested (including PI3-kinase and PTEN) showed no effect. Comparable results could be reproduced by single channel analysis of P2X₂ receptor currents.

Due to the fact that the PI4-kinase plays an essential role in the observed effects, the P2X₂R sequence was scanned for potential PI4-kinase interaction motifs. These so called SH3-epitopes had been found in many proteins and mediate protein-protein interactions, i.e. interaction between PI4-kinase and membrane proteins. After sequence analysis of the P2X₂R a SH3-binding-motif was found in the distal region of the C-terminus which is well-known to play a crucial role in receptor desensitization. This motif was then rendered non-functional by site directed mutagenesis (P2X₂-P451A/P454A). The mutant receptor showed an intrinsic increased desensitization virtually identical to the wildtype receptor after wortmannin-treatment. Wortmannin-treatment of the mutant receptors did not result in further increase of receptor current desensitization, indicating that the PI4-kinase and consequently PI_{4,5}P₂ play an essential role in P2X₂R desensitization. Based on these findings, a kinetic model for the P2X₂ receptor was developed. Although this model is partially in line with data from other groups it is not fully compatible with results and their interpretation published by FUJIWARA & KUBO [2006].

In addition, the reversible inhibition of P2X₂ receptor currents by various aminoglycosid-antibiotics was analyzed in detail. After determination of IC₅₀-values, voltage-dependence and ATP-concentration-dependence of receptor current inhibition it could be concluded that aminoglycosides cause a non-competitive open pore block at P2X₂ receptors. Using a non-desensitizing P2X_{2/1} receptor chimera, it could be shown that these antibiotics significantly decelerated the ligand-dissociation from the receptor. This result was interpreted in terms of an increased affinity of the open conformation for ATP when compared to the closed state. Besides the aminoglycoside antibiotics no other substance class is known to inhibit P2X₂ receptors with a comparable mechanism.

7. Literaturverzeichnis

- ABBRACCHIO M.P. & BURNSTOCK G. (1994): Purinoceptors: Are there families of P_{2X} and P_{2Y} purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64(3): 445-475.
- ADAM G., LÄUGER P., STARK G. (2003): *Physikalische Chemie und Biophysik. 4. Aufl., Springer Verlag.*
- AHARONOVITZ O., ZAUN H.C., BALLA T., YORK J.D, ORLOWSKI J., GRINSTEIN S. (2000): Intracellular pH regulation by Na⁺/H⁺ exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol* 150(1): 213-224.
- ALABI A.A., BAHAMONDE M.I., JUNG H.J., KIM J.I., SWARTZ K.J. (2007): Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors. *Nature* 450(7168): 370- 376.
- AMICI M., EUSEBI F., MILEDI R. (2005): Effects of the antibiotic gentamicin on nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacol* 49(5): 627-637.
- ARMSTRONG C.M. & BEZANILLA F. (1973): Currents related to Movement of the Gating Particles of the Sodium Channels. *Nature* 242(5398): 459-461.
- ASCHRAFI A., SADTLER S., NICULESCU C., RETTINGER J., SCHMALZING G. (2004): Trimeric Architecture of Homomeric P_{2X2} and Heteromeric P_{2X1+2} Receptor Subtypes. *J Mol Biol* 342(1): 333-343.
- ASHCROFT F. M. (2006): From molecule to malady. *Nature* 440(7083): 440-447.
- AUERBACH A. & SACHS E. (1984): Single-channel currents from acetylcholine receptors in embryonic chick muscle. Kinetic and conductance properties of gaps with bursts. *Biophys J* 45(1): 187-189.
- AXON INSTR. (1993): *The Axon Guide for Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques. Axon Instruments, Inc., USA.*
- BALLA T., DOWNING G.J., JAFFE H., KIM S., ZÓLYOMI A., CATT K.J. (1997): Isolation and molecular cloning of wortmannin-sensitive bovine type III phosphatidylinositol 4-kinases. *JBC* 272(29): 18358-18366.
- BANFIC H., DOWNES C.P. , RITTENHOUSE S.E. (1998): Biphasic Activation of PKB α /Akt in Platelets. *JBC* 273(19): 11630-11637.
- BARAJAS-LÓPEZ C., MONTANO L.M., ESPINOSA-LUNA R. (2002): Inhibitory interactions between 5-HT₃ and P_{2X} channels in submucosal neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(6): G1238-G1248.
- BARRERA N.P., ORMOND S.J., HENDERSON R.M., EDWARDSON J.M., MURRELL-LAGNADO R.D. (2005): Atomic Force Microscopy Imaging Demonstrates that P_{2X2} Receptors Are Trimers but That P_{2X6} Receptor Subunits Do Not Oligomerize. *JBC* 280(11): 10759-10765.
- BAUKROWITZ T., SCHULTE U., OLIVER D., HERLITZE S., KRAUTER T., TUCKER S.J., RUPPERSBERG J.P., FAKLER B. (1998): PIP₂ and PIP as Determinants for ATP Inhibition of K_{ATP} Channels. *Science* 282(5391): 1141-1144.
- BECKER M. (2005): LC-MS/S-Methoden zur Rückstandsanalyse von Penicillinen, Cephalosporinen und Aminoglycosid-Antibiotika. *Dissertation, Bergische Universität Wuppertal.*
- BERNIER L.P., ASE A.R., TONG X., HAMEL E., BLAI D., ZHAO Q., LOGOTHETIS D.E., SÉGUÉLA P. (2008): Direct modulation of P_{2X1} Receptor-channels by the lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Mol Pharmacol* 74(3): 785-792.
- BERRIDGE M.J., HESLOP J.P., IRVINE R.F., BROWN K.D. (1984): Inositol triphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J* 222(1): 195-201.

7. Literaturverzeichnis

- BLANCHET C., ERÓSTEGUI C., SUGASAWA M., DULON D.** (2000): Gentamicin blocks ACh-evoked currents in guinea-pig outer hair cells by impairing Ca²⁺ entry at the cholinergic receptor. *J Physiol* 525(3): 641-654.
- BLERO D., PAYRASTRE B., SCHURMANS S., ERNEUX C.** (2007): Phosphoinositide phosphatases in a network of signalling reactions. *Eur J Physiol* 455(1): 31-44.
- BOSSI E., FABBRINI M.S., CERIOTTI A.** (2007): Exogenous Protein Expression in *Xenopus* Oocytes: Basic Procedures. *Methods in Molecular Biology* 375: 107-132.
- BOUÉ-GRABOT É., ARCHAMBAULT V., SÉGUÉLA P.** (2000): A Protein Kinase C Site Highly Conserved in P2X Subunits Controls the Desensitization Kinetics of P2X₂ ATP-gated Channels. *JBC* 275(14): 10190-10195.
- BOUÉ-GRABOT É., BARAJAS-LÓPEZ C., CHAKFE Y., BLAIS D., BÉLANGER D., EMERIT M.B., SÉGUÉLA P.** (2003): Intracellular Cross Talk and Physical Interaction between Two Classes of Neurotransmitter-Gated Channels. *J Neurosci* 23(4): 1246-1253.
- BOUÉ-GRABOT É., ÉMERIT M.B., TOULMÉ E., SÉGUÉLA P., GARRET M.** (2004): Cross-talk and Co-trafficking between $\rho 1$ /GABA Receptors and ATP-gated Channels. *JBC* 279(8): 6967-6975.
- BRÄNDLE U., SPIELMANN P., OSTEROTH R., SIM J., SUPRENANT A., BUELL G., RUPPERSBERG J.P., PLINKERT P.K., ZENNER H.P., GLOWATZKI E.** (1997): Desensitization of the P2X₂ receptor controlled by alternative splicing. *FEBS letters* 404(2-3): 294-298.
- BRAKE A.J., WAGENBACH M.J., JULIUS D.** (1994): New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371(6497): 519-523.
- BRAUN K., RETTINGER J., GANSO M., KASSACK M., HILDEBRANDT C., ULLMANN H., NICKEL P., SCHMALZING G., LAMBRECHT G.** (2001): NF449: a subnanomolar potency agonist at recombinant rat P2X₁ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364(3): 285-290.
- BROWN A.L., JOHNSON B.E., GOODMAN M.B.** (2008): Patch Clamp Recording of Ion Channels Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J Vis Exp* 20: 936-937.
- BROWN S.G., TOWNSEND-NICHOLSON A., JACOBSON K.A., BURNSTOCK G., KING B.F.** (2002): Heteromultimeric P2X_{1/2} receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* 300(2): 673-680.
- BUISMAN H.P., STEINBERG T.H., FISCHBARG J., SILVERSTEIN S.C., VOGELZANG S.A., INCE C., YPEY D.L., LEIJH P.C.** (1988): Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes. *PNAS USA* 85(21): 7988-7992.
- BURNSTOCK G.** (1972): Purinergic Nerves. *Pharmacol Rev* 24(3): 509-581.
- BURNSTOCK G.** (1976): Purinergic Receptors. *J Theor Biol* 62(2): 491-503.
- BURNSTOCK G.** (1978): A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach, Straub R.W., Bolis L. (eds.), Raven Press, New York, 107-118.
- BURNSTOCK G.** (2007): Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64(12): 1471-1483.
- CAMPBELL R.B., LIZ F., ROSS A.H.** (2003): Allosteric activation of PTEN phosphatase by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *JBC* 278(36): 33617-33620.
- CANDEL A.M., VAN NULAND N.A.J., MARTIN-SIERRA F.M., MARTINEZ J.C., CONEJERO-LARA F.** (2008): Analysis of the thermodynamics of binding of an SH3 domain to proline-rich peptides using a chimeric fusion protein. *J Mol Biol* 377(1): 117-135.

7. Literaturverzeichnis

- CHOW Y.W. & WANG H.L. (1998): Functional Modulation of P2X₂ Receptors by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase. *J Neurochem* 70(6): 2606-2612.
- CHU A. & STEFANI E. (1991): Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced Ca²⁺ release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum terminal cisternal membranes. Ca²⁺ flux and single channel studies. *JBC* 266(12): 7699-7705.
- CHUANG H.H., PRESCOTT E.D., KONG H., SHIELDS S., JORDT S.E., BASBAUM A.I., CHAO M.V., JULIUS D. (2001): Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411(6840): 957-962.
- CLOUES R. (1995): Properties of ATP-gated channels recorded from rat sympathetic neurons: voltage dependence and regulation by Zn²⁺ ions. *J Neurophysiol* 73(1): 312-319.
- CLYNE J.D., WANG L.F., HUME R.I. (2002): Mutational Analysis of the Conserved Cysteines of the Rat P2X₂ Purinoceptor. *J Neurosci* 22(10): 3873-3880.
- CLYNE J.D., BROWN T.C., HUME R.I. (2003): Expression level dependent changes in the properties of P2X₂ receptors. *Neuropharmacol* 44(3): 403-412.
- COLE K.S. (1949): Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch Sci Physiol* 3: 253-258.
- COMMUNI D., GEVAERT K., DEMOL H., VANDEKERCKHOVE J., ERNEUX C. (2001): A novel receptor-mediated regulation mechanism of type I inositol polyphosphate 5-phosphatase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *JBC* 276(42): 38738-38747.
- CULLEN P.J., COZIER G.E., BANTING G., MELLOR H. (2001): Modular phosphoinositide-binding-domains - their role in signalling and membrane trafficking. *Curr Biol* 11(21): R882-893.
- CUTLER N.S., HEITMAN J., CARDENAS M.E. (1997): STT4 is an essential Phosphatidylinositol 4-kinase that is a target of wortmannin in *Saccharomyces cerevisiae*. *JBC* 272(44): 27671-27677.
- CZECH M.P. (2000): PIP₂ and PIP₃: Complex Roles at the Cell Surface. *Cell* 100(6): 603-606.
- DECKERT M., AUSSEL C., BERNARD A., BREITMAYER J.P. (1994): Phenylarsine oxide and phorbol myristate acetate inhibit the CD3-induced rise of cytosolic Ca²⁺ in Jurkat cells by refilling internal Ca²⁺ stores. *Biochem J* 297(3): 567-572.
- DILGER J.P. (2002): The effects of general anaesthetics on ligand-gated ion channels. *Br J Anaesth* 89(1): 41-51.
- DING S. & SACHS F. (1999): Single Channel Properties of P2X₂ Purinoceptors. *J Gen Physiol* 113(5): 695-719.
- DING S. & SACHS F. (2000): Inactivation of P2X₂ purinoceptors by divalent cations. *J Physiol* 522(2): 199-214.
- DING W.G., TOYODA F., MATSURA H. (2004): Regulation of Cardiac I_{Ks} Potassium Current by Membrane Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *JBC* 279(49): 50726-50734.
- DOVE S.K., COOKE F.T., DOUGLAS M.R., SAYERS L.G., PARKER P.J., MICHELL R.H. (1997): Osmotic stress activates phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* 390(6656): 187-192.
- DRURY A.N. & SZENT-GYÖRGYI A. (1929): The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol (Lond)* 68(3): 213-237.
- EGAN T.M., SAMWAYS D.S.K., LI Z. (2006): Biophysics of P2X receptors. *Eur J Physiol* 452(5): 501-512.
- EICKHORST A.N., BERSON A., COCKAYNE D., LESTER H.A., KHAKH B.S. (2002): Control of P2X₂ Channel Permeability by the Cytosolic Domain. *J Gen Physiol* 120(2): 119-131.

7. Literaturverzeichnis

- ELSNER H.A., HÖNCK H.H., WILLMANN F., KREIENKAMP H.J., IGLAUER F. (2000): Poor quality of oocytes from *Xenopus laevis* used in laboratory experiments: prevention by use of antiseptic surgical technique and antibiotic supplementation. *Comp Med* 50(2): 206-211.
- ENNION S.J. & EVANS R.J. (2002): Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X₁ receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol* 61(2): 303-311.
- ESTACION M., SINKINS W.G., SCHILLING W.P. (2001): Regulation of *Drosophila* transient receptor potential-like (TrpL) channels by PLC-dependent mechanisms. *J Physiol* 530(1): 1-19.
- EVANS R.J., LEWIS C., BUELL G., VALERA S., NORTH R.A., SURPRENANT A. (1995): Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2X-purinoceptors). *Mol Pharmacol* 48(2): 178-183.
- EVANS R.J., LEWIS C., VIRGINIO C., LUNDSTROM K., BUELL G., SURPRENANT A., NORTH R.A. (1996): Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol* 497(2): 413-422.
- FAN Z. & MAKIELSKI J.C. (1997): Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *JBC* 272(9): 5388-5395.
- FISHER J. A., GIRDLER G., KHAKH B.S. (2004): Time-Resolved Measurements of State-Specific P2X₂ Ion Channel Cytosolic Gating Motions. *J Neurosci* 24(46): 10475-10487.
- FORGE A. & SCHACHT J. (2000): Aminoglycoside Antibiotics. *Audiol Neurootol* 5(1): 3-22.
- FOUNTAIN S.J. & NORTH A. (2006): A C-Terminal Lysine that Controls Human P2X₄ Receptor Desensitization. *JBC* 281(22): 15044-15049.
- FOUNTAIN S.J., CAO L., YOUNG M.T., NORTH R.A. (2008): Permeation properties of a P2X receptor in the green algae *Ostreococcus tauri*. *JBC* 283(22):15122-15126.
- FOUNTAIN S.J., PARKINSON K., YOUNG M.T., CAO L., THOMPSON C.R., NORTH R.A. (2008): An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 448(7150): 200-203.
- FREIST W., VERHEY J.F., STÜHMER W., GAUSS D.H. (1998): ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett* 434(1-2): 61-65.
- FUJITA N., KAKIMI M., IKEDA Y., HIRAMOTO T., SUZUKI K. (2000): Extracellular ATP inhibits starvation-induced apoptosis via P2X₂ receptors in differentiated rat pheochromocytoma cells. *Life Sciences* 66(19): 1849-1859.
- FUJIWARA Y. & KUBO Y. (2004): Density-dependent changes of the pore properties of the P2X₂ receptor channel. *J Physiol* 558(1): 31-43.
- FUJIWARA Y. & KUBO Y. (2006): Regulation of the desensitization and ion selectivity of ATP-gated P2X₂ channels by phosphoinositides. *J Physiol* 576(1): 135-149.
- GAMPER N. & SHAPIRO M.S. (2007): Target-specific PIP₂ signalling: how might it work? *J Physiol* 582(3): 967-975.
- GANDHI C.S. & ISACOFF E.Y. (2002): Molecular Models of Voltage Sensing. *J Gen Physiol* 120(4): 455-463.
- GEHRMANN T. & HEILMEYER L.M. JR. (1998): Phosphatidylinositol 4-kinases. *Eur J Biochem* 253(2): 357-370.
- GENDREAU S., SCHIRMER J., SCHMALZING G. (2003): Identification of a tubulin binding motif on the P2X₂ receptor. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 786(1-2): 311-318.
- GERICKE A., MUNSON M., ROSS A.H. (2006): Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene* 374(1-9): 1-9.

7. Literaturverzeichnis

- GEVER J.R., COCKAYNE D.A., DILLON M.P., BURNSTOCK G., FORD A.P. (2006): Pharmacology of P2X channels. *Eur J Physiol* 452(5): 513-37.
- GLOOR S., PONGS O., SCHMALZING G. (1995): A vector for the synthesis of cRNA s encoding myc-tagged epitope proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Gene* 160(2): 213-217.
- GLOUCHANKOVA L., KRISHNA U.M., POTTER B.V., FALCK J.R., BEZPROZVANNY I. (2000): Association of the inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor ligand binding site with phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate and adenophostin. *A Mol Cell Biol Res Commun* 3(3): 153-158.
- GOUGH N.R. (2006): From Ras to PI3K. *Sci STKE* 362: 397.
- GRAHAM F.L., SMILEY J., RUSSELL W.C., NAIRN R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- GREENE L.A. & TISCHLER A.S. (1976): Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *PNAS* 73(7): 2424-2428.
- GUNDERSEN C.B., MILEDI R., PARKER I. (1983a): Voltage-operated channels induced by foreign messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 220(1218): 131-140.
- GUNDERSEN C.B., MILEDI R., PARKER I. (1983b): Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 219(1214): 103-109.
- GUO J., WENK M.R., PELLEGRINI L., ONOFRI F., BENFENATI F., DECAMILLI P. (2003): Phosphatidylinositol 4-kinase type II α is responsible for the phosphatidylinositol 4-kinase activity associated with synaptic vesicles. *PNAS* 100(7): 3995-4000.
- GURDON J.B., LANE C.D., WOODLAND H.R., MARBAIX G. (1971): Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233(5316): 177-182.
- HAINES W.R., MIGITA K., COX J.A., EGAN T.M., VOIGT M.M. (2001): The First Transmembrane Domain of the P2X Receptor Subunit Participates in the Agonist-induced Gating of the Channel. *JBC* 276 (35): 32793-32798.
- HALASZOVICH C.R., SCHREIBER D.N., OLIVER D. (2008): Ci-VSP is a depolarization-activated PI_{4,5}P₂- and PI_{3,4,5}P₃-5'-Phosphatase. *JBC* 284(4): 2106-2113.
- HAMILL O.P., MARTY A., NEHER E., SAKMANN B., SIGWORTH F.J. (1981): Improved *patch-clamp* techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391(2): 85-100.
- HAMMOND G., THOMAS C.L., SCHIAVO G. (2004): Nuclear phosphoinositides and their functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 282: 177-206.
- HANSEN C.A., JOHANSON R.A., WILLIAMSON M.T., WILLIAMSON J.R. (1987): Purification and characterization of two types of soluble inositol phosphate 5-phosphomonoesterases from rat brain. *JBC* 262(36): 17319-17326.
- HARVEY J., HARDY S.C., IRVING A.J., ASHFORD M.L. (2000): Leptin activation of ATP-sensitive K⁺ (K_{ATP}) channels in rat CRI-G1 insulinoma cells involves disruption of the actin cytoskeleton. *J Physiol* 527(1): 95-107.
- HE M.L., KOSHIMIZU T.A., TOMIC M., STOJILKOVIC S.S. (2002): Purinergic P2X₂ Receptor Desensitization depends on coupling between Ectodomain and C-Terminal Domain. *Mol Pharmacol* 62(5): 1187-1197.
- HEINEMANN S.H., CONTI F., STÜHMER W. (1992): Recording of gating currents from *Xenopus* oocytes and gating noise analysis. *Methods Enzymol* 207: 353-368.

7. Literaturverzeichnis

- HILGEMANN D.W.** (1990): Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflügers Arch* 415(2): 247-249.
- HILGEMANN D.W. & BALL R.** (1996): Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP₂. *Science* 273(5277): 956-959.
- HILGEMANN D.W., FENG S., NASUHOGLU C.** (2001): The Complex and Intriguing Lives of PIP₂ with Ion Channels and Transporters. *Sci STKE* 111: RE19.
- HILLE B.** (2001): Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd ed. *Sinauer Associates Inc., Sunderland*.
- HIMMEL B. & NAGEL G.** (2004): Protein kinase-independent activation of CFTR by phosphatidylinositols. *EMBO Rep* 5(1): 85-90.
- HOKIN L.E. & HOKIN M.R.** (1958): Acetylcholine and the exchange of inositol and phosphate in brain phosphoinositide. *JBC* 233(4): 818-821.
- HIMMEL B.** (2005): Untersuchungen zur Regulation von CFTR-Chloridkanälen durch Nukleotide und Phosphatidylinositolphosphate. *Dissertation, Max-Planck-Institut für Biophysik/Universität Frankfurt*.
- HORN R.** (2005): Electrifying Phosphatases. *Sci STKE* 307: 1-2.
- HOSSAIN I., IWASAKI H., OKOCHI Y., CHAHINE M., HIGASHIJIMA S., NAGAYAMA K., OKAMURA Y.** (2008): Enzyme Domain Affects the Movement of the Voltage Sensor in Ascidian and Zebrafish Voltage-Sensing Proteins. *JBC* 283(26): 18248-18259.
- HUANG C.L., FENG S., HILGEMANN D.W.** (1998): Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gβγ. *Nature* 39(6669)1: 803-806.
- IWASAKI H., MURATA Y., KIM Y., HOSSAIN M.I., WORBY C.A., DIXON J.E., MCCORMACK T., SASAKI T., OKAMURA Y.** (2008): A voltage-sensing phosphatase, Ci-VSP, which shares sequence identity with PTEN, dephosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *PNAS* 105(23): 7970-7975.
- JASTI J., FURUKAWA H., GONZALES E.B., GOUAUX E.** (2007): Structure of Acid Sensing Ion Channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449(7160): 316-324.
- JEFFERSON A.B. & MAJERUS P.W.** (1995): Properties of Type II Inositol Polyphosphate 5-phosphatase. *JBC* 279(16): 9370-9377.
- JIANG L.H., MACKENZIE A.B., NORTH R.A., SURPRENANT A.** (2000): Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X₇ receptors. *Mol Pharmacol* 58(1): 82-88.
- JONES D.R., GONZÁLEZ-GARCÍA A., DÍEZ E., MARTINEZ-A C., CARRERA A.C., MERÍDA I.** (1999): The Identification of Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in T-lymphocytes and Its Regulation by Interleukin-2. *JBC* 274(26): 18407-18413.
- KAVRAN J.M., KLEIN D.E., LEE A., FALASCA M., ISAKOFF S.J., SKOLNIK E.Y., LEMMON M.A.** (1998): Specificity and Promiscuity in Phosphoinositide Binding by Pleckstrin Homology Domains. *JBC* 273(46): 30497-30508.
- KHAKH B.S. & LESTER H.A.** (1999): Dynamic selectivity filters in ion channels. *Neuron* 23(4): 653-658.
- KHAKH B.S., PROCTOR W.R., DUNWIDDIE T.V., LABARCA C., LESTER H.A.** (1999a): Allosteric control of gating and kinetics at P2X₄ receptor channels. *J Neurosci* 19(17): 7289-7299.
- KHAKH B.S., BAO X.R., LABARCA C., LESTER H.A.** (1999b): Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature Neurosci* 2(4): 322-330.
- KHAKH B.S., ZHOU X., SYDES J., GALLIGAN J.J., LESTER H.A.** (2000): State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature* 406(6794): 405-410.

7. Literaturverzeichnis

- KHAKH B.S., BURNSTOCK G., KENNEDY C., KING B.F., NORTH R.A., SÉGUÉLA P., VOIGT M., HUMPHREY P.P.** (2001a): International Union of Pharmacology. XXIV. Current Status of the Nomenclature and Properties of P2X Receptors and Their Subunits. *Pharmacol Rev* 53(1): 107-118.
- KHAKH B.S., SMITH W.B., CHIU C.S., JU D., DAVIDSON N., LESTER H.A.** (2001b): Activation-dependent changes in receptor distribution and dendritic morphology in hippocampal neurons expressing P2X₂-green fluorescent protein receptors. *PNAS* 98(9): 5288-5293.
- KHAKH B.S. & EGAN T.M.** (2005): Contribution of Transmembrane Regions to ATP-gated P2X₂ Channel Permeability Dynamics. *JBC* 280(7): 6118-6129.
- KHAKH B.S., FISHER J.A., NASHMI R., BOWSER D.N., LESTER H.A.** (2005): An angstrom scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X₂ and alpha₄beta₂ nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Neurosci* 25(29): 6911-20.
- KIM D. & BANG H.** (1999): Modulation of rat atrial G protein-coupled K⁺ channel function by phospholipids. *J Physiol* 517(1): 59-74.
- KIM M., JIANG L.H., WILSON H.L., NORTH R.A., SURPRENANT A.** (2001): Proteomic and functional evidence for a P2X₇ receptor signalling complex. *EMBO J* 20(22): 6347-6358.
- KIVENS W.J., HUNT S.W., MOBLEY J.L., ZEL T., DEL C.L., BIERER B.E., SHIMIZU Y.** (1998): Identification of a Proline-Rich Sequence in the CD2 Cytoplasmic Domain Critical for Regulation of Integrin-Mediated Adhesion and Activation of Phosphoinositide 3-Kinase. *Mol Cell Biol* 18(9): 5291-5307.
- KOHOUT S.C., ULBRICH M.H., BELL S.C., ISACOFF E.Y.** (2008): Subunit organization and functional transitions in Ci-VSP. *Nat Struct Molecular Biol* 15(1): 106-108.
- KOSHIMIZU T., TOMIC M., VAN GOOR F., STOJILKOVIC S.S.** (1998a): Functional role of alternative splicing in pituitary P2X₂ receptor-channel activation and desensitization. *Mol Endocrinol* 12(7): 901-913.
- KOSHIMIZU T.A., TOMIC M., KOHIMIZU M., STOJILKOVIC S.S.** (1998b): Identification of Amino Acid Residues Contributing to Desensitization of the P2X₂ Receptor Channel. *JBC* 273(21): 12853-12857.
- KOYAMA S., YU H., DALGARNO D.C., SHIN T.B., ZYDOWSKY L.D., SCHREIBER S.L.** (1993): Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 family. *Cell* 72(6): 945-952.
- LARSSON H.P.** (2002): The Search is on for the Voltage Sensor-to-gate Coupling. *J Gen Physiol* 120(4): 475-481.
- LEMMON M.A.** (1999): Structural basis for high-affinity phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *Biochem Soc Trans* 27(4): 617-624.
- LEMMON M.A.** (2003): Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 4(4): 201-213.
- LESLIE N.R. & DOWNES C.P.** (2002): PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signalling* 14(4): 285-295.
- LEVIS R.A. & RAE J.L.** (1993): The Use of Quartz Patch Pipettes for Low Noise Single Channel Recording. *Biophys J* 65(4): 1666-1677.
- LIN X., HUME R., NUTTALL A.L.** (1993): Voltage-Dependent Block by Neomycin of the ATP-Induced Whole Cell Current of Guinea-Pig Outer Hair Cells. *J Neurophysiol* 70(4): 1593-1605.
- LIU Y., CASEY L., PIKE L.J.** (1998): Compartmentalization of phosphatidylinositol_{4,5}-biphosphate in low-density membrane domains in the absence of caveolin. *Biochem Biophys Res Commun* 245(3): 684-690.
- LO S.H.** (2004): Molecules in Focus: Tensin. *Int J Biochem Cell Biol* 36(1): 31-34.

7. Literaturverzeichnis

- LOPES C.M., ZHANG H., ROHACS T., JIN T., YANG J., LOGOTHETIS D.E. (2002): Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron* 34(6): 933-944.
- LU Z., JIANG Y.P., BALLOU L.M., COHEN I.S., LIN R.Z. (2005): Gα_q inhibits cardiac L-type Ca²⁺ channels through phosphatidylinositol 3-kinase. *JBC* 280(48): 40347-40354.
- LUNDBY A., MUTOH H., DIMITROV D., AKEMANN W., KNÖPFEL T. (2008): Engineering of a Genetically Encodable Fluorescent Voltage Sensor Exploiting Fast Ci-VSP Voltage-Sensing Movements. *PLoS one* 3(6): e2514.
- LUSTIG K.D., SHIAU A.K., BRAKE A.J., JULIUS D. (1993): Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuro-blastoma cells. *PNAS* 90(11): 5113-5117.
- LYNCH K.J., TOUMA E., NIFORATOS W., KAGE K.L., BURGARD E.C., VAN BIESEN T., KOWALUK E.A., JARVIS M.F. (1999): Molecular and Functional Characterization of Human P2X₂ Receptors. *Mol Pharmacol* 56(6): 1171-1181.
- MAEHAMA T. & DIXON J.E. (1999): PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *trends Cell Biol* 9(4): 125-128.
- MAJERUS P.W., KESSELEVA M.V., NORRIS F.A. (1999): The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *JBC* 274(6): 10669-10672.
- MARQUEZ-KLAKA B., RETTINGER J., BHARGAVA Y., EISELE T., NICKE A. (2007): Identification of an Intersubunit Cross-Link between Cysteine Residues Located in the Putative ATP Binding Site of the P2X₁ Receptor. *J Neurosci* 27(6): 1456-1466.
- MASIN M., KERSCHTENSTEINER D., DUMKE K., RUBIO M.E., SOTO F. (2006): Fe65 interacts with P2X₂ subunits at excitatory synapses and modulates receptor function. *J Biol Chem* 281(7): 4100-4108.
- MASUKO T., KUNO T., KASHIWAGI K., KUSAMA T., WILLIAMS K., IGARASHI K. (1999). Stimulatory and Inhibitory Properties of Aminoglycoside Antibiotics at N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 290(3): 1026-1033.
- MCLAUGHLIN S., WANG J., GAMBHIR A., MURRAY D. (2002): PIP₂ and Proteins: Interactions, Organization, and Information Flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31: 151-175.
- MCLAUGHLIN S. & MURRAY D. (2005): Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438(7068): 605-611.
- MEAD F. & WILLIAMS A.J. (2002): Ryanodine-induced structural alterations in the RyR channel suggested by neomycin block. *Biophys J* 82(4): 1964-1974.
- METHFESSEL C., WITZEMANN V., TAKAHASHI T., MISHINA M., NUMA S, SAKMANN B. (1986): Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Eur J Physiol* 407(6): 577-588.
- MIGITA K., HAINES W.R., VOIGT M.M., EGAN T.M. (2001): Polar Residues of the Second Transmembrane Domain Influence Cation Permeability of the ATP-gated P2X₂ Receptor. *JBC* 276(33): 30934-30941.
- MILEDI R., PARKER I., SUMIKAWA K. (1983): Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 218(1213): 481-484.
- MILEDI R., PARKER I., WOODWARD R.M. (1989): Membrane Currents Elicited by Divalent Cations in *Xenopus* Oocytes. *J Physiol* 417: 173-195.
- MILLER K.J., MICHEL A.D., CHESSELL I.P., HUMPHREY P.P. (1998): Cibacron blue allosterically modulates the rat P2X₄ receptor. *Neuropharmacol* 37(12): 1579-1586.

7. Literaturverzeichnis

- MIO K., KUBO Y., OGURA T., YAMAMOTO T., SATO C. (2005): Visualization of the trimeric P2X₂ receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem Biophys Res Comm* 337(3): 998-1005.
- MOCANU M.M. & YELLON D.M. (2007): PTEN, the Achilles' heel of myocardial ischaemia/reperfusion injury? *Br J Pharmacol* 150(7): 833-838.
- MÜLLER A. (2007): Phosphatidylinositolphosphate in *D. discoideum* – Inaktivierung eines Gens kodierend für ein myotubularinartiges Protein. *Dissertation, Bergische Universität Wuppertal*.
- MURATA Y., IWASAKI H., SASAKI M., INABA K., OKAMURA Y. (2005): Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435(7046): 1239-1243.
- MURATA Y. & OKAMURA Y. (2007): Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP₂. *J Physiol* 583(3): 875-889.
- NAKANISHI S., CATT K.J., BALLA T. (1995): A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *PNAS* 82(12): 5317-5321.
- NAKAZAWA K., INOUE K., KOIZUMI S. (1994a): Facilitation by 5-hydroxytryptamine of of ATP-activated current in rat pheochromocytoma cells. *Pflugers Arch* 427(5-6): 492-499.
- NAKAZAWA K. (1994b): ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14(2): 740-750.
- NAKAZAWA K., LIU M., INOUE K., OHNO Y. (1997): Potent Inhibition by trivalent cations of ATP-gated channels. *Eur J Pharmacol* 325(2-3): 237-243.
- NAKAZAWA K. & OHNO Y. (2004): Desensitization of P2X₂ receptor/channel pore mutants. *Eur J Pharmacol* 495(1): 27-33.
- NASUHOGLU C., FENG S., MAO J., YAMAMOTO M., YIN H.L., EARNEST S., BARYLKO B., ALBANESI J.P., HILGEMANN D.W. (2002): Non-radioactive analysis of phosphatidylinositides and other anionic phospholipids by anion exchange HPLC with suppressed conductivity detection. *Anal Biochem* 301(2): 243-254.
- NEWBOLT A., STOOP R., VIRGINIO C., SURPRENANT A., NORTH R.A., BUELL G., RASSENDREN F. (1998): Membrane Topology of an ATP-gated Ion Channel (P2X Receptor). *JBC* 273(24): 15177-15182.
- NICKE A., BÄUMERT H., RETTINGER J., EICHELE A., LAMBRECHT G., MUTSCHLER E., SCHMALZING G. (1998): P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17(11): 3016-3028.
- NORTH A. (2002): Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev* 82(4): 1013-1067.
- NUMBERGER M & DRAGUHN A. (1996): Labor im Fokus: Patch Clamp-Technik. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- OHMORI H. (1985): Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J Physiol* 359: 189-217.
- OHTA T., KUBOTA A., MURAKAMI M., OTSUGURO K., ITO S. (2005): P2X₂ Receptors are essential for [Ca²⁺]_i increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289(5): G935-G948.
- OKADA T., SAKUMA L., FUKUI Y., HAZEKI O., UI M. (1994): Blockage of Chemotactic Peptide-induced Stimulation of Neutrophils by Wortmannin as a Result of Selective Inhibition of Phosphatidylinositol-3 Kinase. *JBC* 269(5): 3563-3567.
- OKAMOTO R. & SUMIKAWA K. (1991): Antibiotics cause changes in the desensitization of ACh receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 9(1-2): 165-168.

7. Literaturverzeichnis

- DI PAOLO G. & DE CAMILLI P. (2006): Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443(7112): 651-657.
- PAUKERT M., OSTEROTH R., GEISLER H.S., BRANDLE U., GLOWATZKI E., RUPPERSBERG J.P., GRÜNDER S. (2001): Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X₃ subunit. *JBC* 275(24): 10190-10195.
- PELASSY C., BREITMAYER J.P., AUSSEL C. (2000): Inhibition of phosphatidylserine synthesis during Jurkat T cell activation. *Eur J Biochem* 267(4): 984-992.
- PIKE L.J. & MILLER J.M. (1998): Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *JBC* 273(35): 22298-22304.
- POLLACK S.S. (1949): The *Xenopus* pregnancy text. *Can Med Assoc J* 60(2): 159-161.
- PRESTWICH G.D. (2004): Phosphoinositide Signaling: From Affinity Probes to Pharmaceutical Targets. *Chem & Biol* 11(5): 619-637.
- PRIEL A., GIL Z., MOY V.T., MAGLEBY K.L., SILBERBERG S.D. (2007): Ionic Requirements for Membrane-Glass Adhesion and Giga Seal Formation in Patch-Clamp Recording. *Biophys J* 92(11): 3893-3900.
- PUGH N., MEAD-SAVERY F.C., COADWELL W.J., ROSSI D., SORRENTINO V., WILLIAMS A.J. (2005): Probing luminal negative charge in the type 3 ryanodine receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 337(4): 1072-1079.
- RAISINGHANI M. & PREMKUMAR L.S. (2005): Block of native and cloned vanilloid receptor 1 (TRPV1) by aminoglycoside antibiotics. *Pain* 113(1-2): 123-133.
- RAMSEY I.S., MORAN M.M., CHONG J.A., CLAPHAM D.E. (2006): A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature* 440(7088): 1213-1216.
- RAPEDIUS M., PAYNTER J.J., FOWLER P.W., SHANG L., SANSOM M.S., TUCKER S.J., BAUKROWITZ T. (2007): Control of pH and PIP₂ gating in heteromeric Kir4.1/5.1 channels by H-bonding at the helix-bundle crossing. *Channels* 1(5): 327-330.
- RASGADO-FLORES H. & GONZALEZ-SERRATOS H. (2000): Plasmalemmal transport of magnesium in excitable cells. *Front Biosci* 5: D866-D879.
- RASSENDREN F., BUELL G., NEWBOLT A., NORTH R.A., SURPRENANT A. (1997): Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J* 16(12): 3446-3454.
- RAUCHER D., STAUFFER T., CHEN W., SHEN K., GUO S., YORK J.D., SHEETZ M.P., MEYER T. (2000): Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell* 100(2): 221-228.
- RAYBOULD N.P. & HOUSLEY G.D. (1997): Variation in expression of the outer hair cell P2X receptor conductance along the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 498(3): 717-727.
- RETTINGER J., ASCHRAFI A. AND SCHMALZING G. (2000): Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X₁ receptor. *J. Biol. Chem.* 275(43), 33542-33547.
- RETTINGER J. & SCHMALZING G. (2003): Activation and Desensitization of the Recombinant P2X₁ Receptor at Nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol* 121(5): 451-461.
- RETTINGER J. & SCHMALZING G. (2004): Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P2X₁ receptor. *JBC* 279(8): 6426-6433.
- RETTINGER J., BRAUN K., HOCHMANN H., KASACK M.U., ULLMANN H., NICKEL P., SCHMALZING G., LABMRECHT G. (2005): Profiling at recombinant homomeric and heteromeric rat P2X receptors identifies the suramin analogue NF449 as a highly potent P2X₁ receptor antagonist. *Neuropharmacol* 48(3): 461-468.

7. Literaturverzeichnis

- ROBERTS J.A., VIAL C., DIGBY H.R., AGBOH K.C., WEN H., ATTERBURY-THOMAS A., EVANS R.J. (2006): Molecular Properties of P2X Receptors. *Eur J Physiol* 452(5):486-500.
- ROHACS T., CHEN J., PRESTWICH G.D., LOGOTHETIS D.E. (1999): Distinct specificities of inwardly rectifying K⁺ channels for phosphoinositides. *JBC* 271(51): 36065-36072.
- RYBAK L.P. & WHITWORTH C.A. (2005): Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discovery Today* 10(19): 1313-1321.
- SCHACHT J. (1993): Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am* 26(5): 845-856.
- SCHATZ A., BUGIE E., WAKSMAN S.A. (1944): Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Sec Exp Biol Med* 55: 66-69.
- SCHWARZ W. & RETTINGER J. (2004): Elektrophysiologie. Übersetzung und Überarbeitung der 2. Ausgabe von Foundations of Electrophysiology. *Shaker Verlag, Aachen*.
- SEARL T.J., REDMAN R.S., SILINSKY E.M. (1998): Mutual occlusion of P2X ATP receptors and nicotinic receptors on sympathetic neurons of guinea-pig. *J Physiol* 510(3): 783-791.
- SELIMOGLU E. (2007): Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr Pharm Des* 13(1): 119-126.
- SHIN Y.K., LI Y., LIU Q., ANDERSON D.H., BABIUK L.A., ZHOU Y. (2007): SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/ Akt signaling pathway activation. *J Virol* 81 (23): 12730-12739.
- SIGWORTH F.J. (1985): Open channel noise. I. Noise in acetylcholine receptor currents suggests conformational fluctuations. *Biophys J* 47(5): 709-720.
- SIMON J., KIDD E.J., SMITH F.M., CHESSELL I.P., MURRELL-LAGNADO R., HUMPHREY P.P., BARNARD E.A. (1997): Localization and Functional Expression of Splice Variants of the P2X₂ Receptor. *Mol Pharmacol* 52(2): 237-248.
- SIMPSON L. & PARSONS R. (2001): PTEN: Life as a Tumour Suppressor. *Exp Cell Res* 264(1): 29-41.
- SMART T.G. (1997): Regulation of excitatory and inhibitory neurotransmitter-gated ion channels by protein phosphorylation. *Curr Opin Neurobiol* 7(3): 358-367.
- SMITH F.M., HUMPHREY P.P.A., MURRELL-LAGNADO R.D. (1999): Identification of amino acids within the P2X₂ receptor C-terminus that regulate desensitization. *J Physiol* 520(1): 91-99.
- SNOW P., YIM D.L., LEIBOW J.D., SAINI S., NUCCITELLI R. (1996): Fertilization Stimulates an Increase in Inositol Trisphosphate and Inositol Lipid Levels in *Xenopus* Eggs. *Dev Biol* 180(1): 108-118.
- SOKOLOVA E., NISTRI A., GINIATULLIN R. (2001): Negative Cross Talk between Anionic GABA_A and Cationic P2X Ionotropic Receptors of Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Neurosci* 21(14): 4958-4968.
- SOOM M., SCHÖNHERR R., KUBO Y., KIRSCH C., KLINGER R., HEINEMANN S.H. (2001): Multiple PIP₂ binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS Lett* 490(1-2): 49-53.
- SORENSEN S.C., LINSEMAN D.A., MCEWEN E., HEACOCK A.M., FISHER S.K. (1998): A role for a wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase in the endocytosis of muscarinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol* 53(5): 827-836.
- SOTO F., GARCIA-GUZMAN M., STÜHMER W. (1997): Cloned Ligand-gated Channels Activated by Extracellular ATP (P2X Receptors). *J Membrane Biol* 160(2):91-100.
- SRIVASTAVA A.K. & MEHDI M.Z. (2005): Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabetic Med* 22(1): 2-13.

7. Literaturverzeichnis

- STEINBERG T.H., NEWMAN A.S., SWANSON J.A., SILVERSTEIN S.C. (1987): ATP⁴⁻ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *JBC* 262(18): 8884-8888.
- STOOP R. & QUAYLE J.M. (1998): Fading and rebound of P2X₂ currents at millimolar ATP concentrations caused by low pH. *Br J Pharmacol* 125(2): 235-237.
- STREB H., IRVINE R.F., BERRIDGE M.J., SCHULZ I. (1983): Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-triphosphate. *Nature* 306(5938): 67-69.
- STÜHMER W. & PAREKH A.B. (1995): Electrophysiological Recordings from *Xenopus* Oocytes (Chap. 15). *Single Channel Recordings* (Eds. Sakmann, B. and Neher, E.), 2nd ed., plenum press., 341-356.
- SUH B.C. & HILLE B. (2005): Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Op Neurobiol* 15(3): 370-378.
- SZÜCS A., SZAPPANOS H., TÓTH A., FARKAS Z., PANYI G., CSERNOCH L., SZIKLAI I. (2004): Differential expression of purinergic receptor subtypes in the outer hair cells of the guinea pig. *Hearing Res* 196(1-2): 2-7.
- THOMAS S.A. & HUME R.I. (1990): Permeation of both cations and anions through a single class of ATP-activated ion channels in developing chick skeletal muscle. *J Gen Physiol* 95(4): 569-590.
- THORNE P.R. & HOUSLEY G.D. (1996): Purinergic signalling in sensory systems. *Sem in the Neurosci* 8(4): 233-246.
- TOKER A. (1998): The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Op Cell Biol* 10(2): 254-261.
- TONG Y., BRANDT G.S., LI M., SHAPOVALOV G., SLINKO E., KARSCHIN A., DOUGHERTY D.A., LESTER H.A. (2001): Tyrosine Decaging Leads to Substantial Membrane Trafficking during Modulation of an Inward Rectifier Potassium Channel. *J Gen Physiol* 117(2): 103-118.
- TOZAKI-SAITOH H., KOIZUMI S., SATO Y., TSUDA M., NAGAO T., INOUE K. (2006): Retinoic Acids Increase P2X₂ Receptor Expression through the 5'-Flanking Region of rP2X₂ Gene in Rat Pheochromocytoma PC-12 Cells. *Mol Pharmacol* 70(1): 319-328.
- ULBRICHT W. (1977): Ionic Channels and Gating Currents in Excitable Membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng* 6: 7-31.
- VALERA S., HUSSY N., EVANS R., ADAMI N., NORTH R.A., SURPRENANT A., BUELL G. (1994): A new class of ligand-gated ion channel defined by P_{2X} receptor for extracellular ATP. *Nature* 371(6510): 516-523.
- VANHAESEBROECK B., LEEVERS S.J., AHMADI K., TIMMS J., KATSO R., DRISCOLL P.C., WOSCHOLSKI R., PARKER P.J., WATERFIELD M.D. (2001): Synthesis and Function of 3-phosphorylated Inositol Lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-602.
- VIAL C., TOBIN A.B., EVANS R.J. (2004a): G-protein-coupled receptor regulation of P2X₁ receptors does not involve direct channel phosphorylation. *Biochem J* 382(1): 101-110.
- VIRGINIO C., CHURCH D., NORTH R.A., SURPRENANT A. (1997): Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor. *Neuropharmacol* 36(9): 1285-1294.
- VIRGINIO C., NORTH R.A., SURPRENANT A. (1998a): Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X₂ and P2X₃ receptors and receptors in rat nodose neurones. *J Physiol* 510(1): 27-35.
- VIRGINIO C., ROBERTSON G., SURPRENANT A., NORTH R.A. (1998b): Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_{2/3} receptors. *Mol Pharmacol* 53(6), 969-973.

7. Literaturverzeichnis

- VIRGINIO C., MACKENZIE A., RASSENDREN F.A., NORTH R.A., SURPRENANT A. (1999): Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature Neurosci* 2(4): 315-321.
- VITAL BRAZIL O. & PRADO-FRANCESCHI J. (1969): The nature of neuromuscular block produced by neomycin and gentamicin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 179(1): 78-85.
- DEVUYST E., DECROCK E., CABOOTER L., DUBYAK G.R., NAUS C.C., EVANS W.H., LEYBAERT L. (2006): Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO* 25(1): 34-44.
- WAITE K.A. & ENG C. (2002): Protean PTEN: Form and Function. *Am J Hum Genet* 70(4): 829-844.
- WANG B.M., WEINER N.D., TAKADA A., SCHACHT J., (1984): Characterization of aminoglycoside-lipid interactions and development of a refined model for ototoxicity testing. *Biochem Pharmacol* 33(20): 3257-3262.
- WANG N., ORR-URTREGER A., KORCZYN A.D. (2002): The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autonomic ganglia: lessons from knockout mice. *Prog Neurobiol* 68(5): 341-360.
- WEBB T.E., SIMON J., KRISHEK B.J., BATESON A.N., SMART T.G., KING B.F., BURNSTOCK G., BARNARD E.A. (1993): Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 324(2): 219-225.
- WEBER W.M. (1999): Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421(2): 213-233.
- WERNER P., SEWARD E.P., BUELL G.N., NORTH R.A. (1996): Domains of P2X receptors involved in desensitization. *PNAS* 93(26): 15485-15490.
- WHITEFORD C.C., BREARLEY C.A., ULUG E.T. (1997): Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate defines a novel PI3-kinase pathway in resting mouse fibroblasts. *Biochem J* 323(3): 597-601.
- WHITLOCK A., BURNSTOCK G., GIBB A.J. (2001): The single-channel properties of purinergic P2X ATP receptors in outside-out patches from rat hypothalamic paraventricular parvocells. *Eur J Physiol* 443(1): 115-122.
- WILDMAN S.S., KING B.F., BURNSTOCK G. (1999): Modulatory activity of extracellular H⁺ and Zn²⁺ on ATP-responses at rP2X₁ and rP2X₃ receptors. *Br J Pharmacol* 128(2): 486-492.
- WINEGAR B.D., HAWS C.M., LANSMAN J.B. (1996): Subconductance Block of Single Mechanosensitive Ion Channels in Skeletal Muscle Fibers by Aminoglycoside Antibiotics. *J Gen Physiol* 107(3): 433-443.
- WISHART M.J. & DIXON J.E. (2002): PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends Cell Biol* 12(12): 579-585.
- WITTER D.J., FAMIGLIETTI S.J., CAMBIER J.C., CASTELHANO A. (1998): Design and synthesis of SH3 domain binding ligands: modifications of the consensus sequence XPpXP. *Bioorgan Med Chem Lett* 8(22): 3137-3142.
- WOMACK K.B., GORDON S.E., HE F., WENSEL T.G., LU C.C., HILGEMANN D.W. (2000): Do phosphatidylinositides modulate vertebrate phototransduction? *J Neurosci* 20(8): 2792-2799.
- WYMAN M.P., BULGARELLI-LEVA G., ZVELEBIL M.J., PIROLA L., VANHAESEBROECK B., WATERFIELD M.D., PANAYOTOU G. (1996): Wortmannin Inactivates Phosphoinositide 3-Kinase by Covalent Modification of Lys-802, a Residue Involved in the Phosphate Transfer Reaction. *Mol Cell Biol* 16(4): 1722-1733.
- XIE L.H., TAKANO M., KAKEI M., OKAMURA M., NOMA A. (1999): Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol kinases, blocks the MgATP-dependent recovery of Kir6.2/SUR2A channels. *J Physiol* 514(3): 655-665.

7. Literaturverzeichnis

- XIONG K., PEOPLES R.W., MONTGOMERY J.P., CHIANG Y., STEWART R.R., WEIGHT F.F., LI C. (1999): Differential modulation by copper and zinc of P2X₂ and P2X₄ receptor function. *J Neurophysiol* 81(5): 2088-2094.
- XU G.Y. & HUANG L.Y. (2004): Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II potentiates ATP responses by promoting trafficking of P2X receptors. *PNAS USA* 101(32): 11866-11873.
- YELLEN G. (1984): Relief of Na⁺ block of Ca²⁺ activated K⁺ channels by external cations. *J Gen Physiol* 84(2): 187-199.
- YUDOWSKI G.A., EFENDIEV R., PEDEMONTE C.H., KATZ A.I., BERGGREN P.O., BERTORELLO A.M. (2000): Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit and regulates its trafficking. *PNAS* 97(12): 6556-6561.
- YUE G., MALIK G., YUE G., EATON D.C. (2001a): Identification of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding sites from epithelial sodium channels in A6 cells. *FASEB J* 15: A836.
- YUE J., LIU J., SHEN X. (2001b): Inhibition of phosphatidylinositol 4-kinase results in a significant reduced respiratory burst in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated human neutrophils. *JBC* 276(52): 49093-49099.
- ZHAO H.B., YU N., FLEMING C.R. (2005): Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear. *PNAS* 102(51): 18724-18729.
- ZHAO Q., LOGOTHETIS D.E., SÉGUÉLA P. (2007a): Regulation of ATP-gated P2X receptors by phosphoinositides. *Eur J Physiol* 455(1): 181-5.
- ZHAO Q., YANG M., TING A.T., DIOMEDES D.E. (2007b): PIP₂ Regulates the Ionic Current of P2X Receptors and P2X₇ Receptor-Mediated Cell Death. *Channels* 1(1): 46-55.
- ZHOU Z. & HUME R.I. (1998): Two mechanisms for inward rectification of current flow through the purinoceptor P2X₂ class of ATP-gated channels. *J Physiol* 507 (3): 529-547.
- ZHOU Z., MONSMA L.R., HUME R.I. (1998): Identification of a Site that Modifies Desensitization of P2X₂ Receptors. *Biochem Biophys Res Comm* 252(3): 541-545.
- ZIMMERMANN H., BRAUN N., ALLGAIER C., ILLES P. (1998): Nukleotide, eine neue Klasse extrazellulärer Signalstoffe im Nervensystem. *Neuroforum* 4(1), 148-157.

<http://www.expasy.org>

http://www.enasco.com/page/xen_care

8. Abkürzungen

A	Ampère bzw. Alanin bzw. bzw. Fläche bzw. Adenin bzw. Aqua
ACh	Acetylcholin
AG	Aminoglykosid
Akt	Protein Kinase B
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ADP bzw. ATP	Adenosindiphosphat bzw. Adenosintriphosphat
BBG	<i>Brilliant Blue Green</i>
bp (kb)	Basenpaare (kiloBasenpaare)
BzATP	<i>2'-&3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP</i>
c	centi (10 ⁻²)
C	Kapazität bzw. Cystein bzw. Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cRNA	synthetisch hergestellte RNA nach cDNA-template
cDNA	<i>complementaryDNA</i> , aus mRNA durch reverse Transkriptase hergestellt
Ci-VSP	<i>Ciona intestinalis Voltage Sensing Protein</i>
Cl ⁻	Chlorid
CTP	Cytosintriphosphat
Cys	Cystein
Cs ⁺	Caesium
d	Durchmesser
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleinic Acid</i>
E	Glutamin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	halb-maximale Aktivierungskonzentration
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
g	Gramm; Vielfaches d. Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
G	Leitfähigkeit bzw. Giga- (10 ⁹) bzw. Glycin bzw. Guanin
GABA	<i>γ-amino butyric acid</i> (γ-Aminobuttersäure)
(E)GFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
H ⁺	Wasserstoff/Proton
H-Brücke	Wasserstoffbrückenbindung
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
HEK293	<i>human embryonal kidney cells</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonat
H ₂ O	Wasser
His	Histidin
I	Strom
I _c	kapazitiver Strom
Ile	Isoleucin
INPP5B	Inositol Polyphosphat 5'Phosphatase
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat

8. Abkürzungen

IpgD	<i>PI_{4,5}P₂ 4'-phosphatase</i>
Ip ₅ I	di-Inosin-Pentaphosphat
k	kilo- (10 ³)
K ⁺	Kalium
K	Lysin
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
Konz.	Konzentration
l	Liter
Li ⁺	Lithium
LiCl	Lithiumchlorid
Lys	Lysin
m	Meter bzw. milli- (10 ⁻³)
M	Molarität, molar (mol/l) bzw. mega- (10 ⁶)
max.	maximal/e
2-MeSATP	2-Methylthio-ATP
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgORi	Magnesium-haltiges ORi
min	Minute(n)
MTM(R)	<i>myotubularin related 3'-phosphatase</i>
osM/kg	Osmolarität
n	nano- (10 ⁻⁹) bzw. Anzahl der Mehrfachbestimmungen
n _H	Hill-Koeffizient
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF449	<i>4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis(carbonylimino))) tetrakis-benzene-1,3-disulfonic acid</i>
NMDG ⁺	N-Methyl-D-Glucamin
N.N.	<i>Nomen nominandum</i> (noch zu benennend)
NTS	<i>Nucleus Tractus Solitarius</i>
OPA	<i>Operation Amplifier</i>
ORi	Oocyten-Ringer-Lösung
p	pico- (10 ⁻¹²)
P2X _n R	P2X _n Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Paromo.	Paromomycin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>Patch Clamp</i> bzw. <i>personal computer</i>
PC12	<i>Pheochromocytoma cells</i>
PDK1 bzw. -2	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 bzw. 2
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Phe	Phenylalanin
PI/PIP _{ns}	Phosphatidylinositol(e)/Phosphatidylinositid(e), unabhängig von Isoform
PLA bzw. -C	Phospholipase A bzw. C
PI(N)K	PI(N)-Kinase (N = 3, 4 oder 5)
PKA, -B bzw. -C	Protein Kinase A, -B, bzw. -C (PKB = Akt)
pk _s	Säurekonstante
PLIP	<i>PTEN-like phosphatase</i>
PPADS	<i>pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate</i>
4-ppase	<i>4'-phosphatase</i>
P bzw. Pro	Prolin
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog-Phosphatase</i>
Q	Glutamin bzw. Ladung
R	Widerstand bzw. Arginin
rRNA	ribosomale RNA
Rb ⁺	Rubidium
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute-Kulturmedium</i>
s	Sekunde(n)
S	Siemens
S bzw. Ser	Serin

8. Abkürzungen

Ser	Serin
SHIP	<i>SH2-containing inositol polyphosphate 5'-phosphatase</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
t	Zeit
T	Thymin
τ	mittlere Offenzeit eines Ionenkanals
TEVC	<i>Two Electrode Voltage Clamp</i>
Thr	Threonin
T_m	Schmelzpunkt-Temperatur
TNP-ATP	<i>2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate</i>
UDP bzw. UTP	Uridindiphosphat bzw. Uridintriphosphat
Tyr	Tyrosin
U	Spannung
U_{rev}	Umkehrpotential
UV	Ultraviolett
V	Volt
V_m	Membranpotential bzw. Haltepotential in TEVC-Messungen
Val bzw. V	Valin
VC	<i>Voltage Clamp</i>
vs.	<i>versus</i>
VS	<i>voltage sensing</i>
wt- / WT	Wildtyp-
Zn^{2+}	Zink
ZNS	Zentralnervensystem
α	alpha
β	beta
γ	gamma
Δ	Delta (Differenzbetrag)
ϵ_0	elektrische Feldkonstante
ϵ_r	Dielektrizitätskonstante
μ	mikro- (10^{-6})
Ω	Omega (elektrophysiologisch: Widerstand, Ohm)
*/**	Hypothesenwert ($p < 0,05 / < 0,01$) aus statist. <i>student's t</i> -Test

9. Danksagung

Ich danke...

...Dr. Jürgen Rettinger für die Betreuung meiner Arbeit, sein offenes Ohr für jegliche Probleme und für den ungeheuren Spaß, den mir diese Arbeit bereitet hat.

...Prof. Dr. Ernst Bamberg für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie Hilfestellungen und Lösungen in Situationen, die zunächst nicht lösbar schienen.

...den fünf besten TA's unter Gottes Sonne: Anja Becker, Heike Biehl, Heike Fotis, Lina Hatahet und Janna Lustig - ohne die ich wohl des Öfteren auf dem Schlauch gestanden hätte und die deutlich mehr als nur Arbeitskolleginnen waren bzw. sind!

...meiner Arbeitsgruppe, bestehend aus Yogesh Bhargava und Dr. Anca Popescu, die mir die Messtage nicht nur verkürzt haben, sondern mir auch immer mit helfender Hand zur Seite standen.

...Dr. Christian Bamann für den *Crash*Kurs in Molekularbiologie.

...Prof. Dr. Wolfgang Schwarz und seiner Frau Silvia für die Ermöglichung des Shanghai-Aufenthalts und dafür, dass dieser so abwechslungsreich und interessant war, dass ich sofort zurückgehen würde!

...Dr. Klaus Hartung für seine - nicht nur - technische Hilfe und die Unmengen an Schokolade, die mir meine Nerven während der letzten 4 Jahre bewahrt haben.

...Heidi Bergemann für organisatorische, administrative und persönliche Ratschläge und den „Seelentröstersessel“ in ihrem Büro!

...der gesamten *AG Biophysikalische Chemie* für eine unvergessliche Zeit am Riedberg, mit allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern, vor allem Dr. Taryn Kirsch, Neslihan Tavraz, Dr. Tina Himmel, Patrick Schulz und Dr. Uli Terpitz, die mir wundervolle „*officemates*“ waren.

...all den vielen Helfern im „Hintergrund“, v. a. Helga Volk, Herrn Jansen, Herrn Zipfel, Frau Herzberg, Frau Weber, Frau Harnisch, Herrn Löhmann, Herrn Kussius, Herrn Rinkert, Herrn Knoch, Herrn Herr, Herrn Pawlowski, Rosemarie Schmidell, Solveigh McCormack, Vicky Friedmann, Stefan Eberhardt, und und und....

...den Praktikanten und Diplomanden, die mir teilweise unter die Arme gegriffen haben anstatt nur doppelte Arbeit zu erzeugen, ganz besonders Anne, Rupa und Max.

...meinen Eltern für all ihre Unterstützung, ihre Liebe und den unverwüstlichen Glauben, den sie in mich gesetzt haben - und das ohne je wirklich zu verstehen, was ich den ganzen Tag so im Labor treibe.

...meinem Bruder Dominik für das bisschen Konstanz in meinem Leben und seine immer wieder schonungslose Ehrlichkeit, die mich zwar oft verzweifeln, aber dann doch die Wahrheit erkennen ließ.

...meinen Freunden, die mich in dieser nicht immer einfachen Zeit begleitet haben. Allen voran: Nina, Stina, Taryn, Neslie, Maike, Lina. - 6 Frauen, 6 Goldstücke.
Trixi - meiner Schwester, die ich nie hatte.

...Jörg - für alles. Weil er wahrhaft und einzig mein Monster zu halten in der Lage ist.

Lebenslauf

Name Eva-Verena Bongartz
Geburtsdatum 27. März 1979
Geburtsort Borken/Westf.

Schulbildung

1985-1989 Besuch der Grundschule (Remigius Grundschule in Borken)
1989-1998 Besuch des städt. Gymnasiums (Gymnasium Remigianum in Borken)
09. Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife

Studium/Beruf

10/1998 bis 03/1999 Studium der Biologie an der Universität/Gesamthochschule Kassel
04/1999 bis 10/2000 Studium der Biologie an der Rheinisch-Westfälisch Technischen Hochschule zu Aachen
10/2000 Diplomvorprüfungen
04/2001 bis 12/2002 Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
11-12/2002 Diplom-Hauptprüfungen in dem Hauptfach Zoophysiology (Prof. Dr. R. Paul) sowie in den Nebenfächern Biochemie (Prof. Dr. Klempnauer) und Pflanzenphysiologie (Prof. Dr. Moerschbacher)
01/2003 bis 01/2004 Diplomarbeit an der WWU Münster am Institut für Zoophysiology in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Paul unter Anleitung von Dr. B. Zeis mit dem Thema: „Stoffwechselfysiologische Veränderungen als Funktion der Sauerstoffakklimierung bei *Daphnia magna*.“
01/2004 bis 06/2004 wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Zoophysiology, Abteilung Prof. Dr. Wolf-Michael Weber, WWU Münster
07/2004 bis 07/2005 Dissertation am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften bei Prof. Dr. Ernst Bamberg unter der Anleitung von Prof. Dr. Georg Nagel
08/2005 bis 12/2008 Dissertation am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften bei Prof. Dr. Ernst Bamberg unter der Anleitung von Dr. Jürgen Rettinger mit dem Thema „Untersuchungen zur Regulation von P2X₂ Rezeptoren durch Phosphoinositide mittels einer heterolog exprimierten, intrazellulären spannungsgesteuerten Phosphoinositid-Phosphatase aus *Ciona intestinalis*.“
01/2009 bis heute Trainee Medical Manager bei Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Berlin

Publikationsliste

- ZEIS B., MAURER J., PINKHAUS O., BONGARTZ E., PAUL R.** (2004): A swimming activity assay shows that the thermal tolerance of *Daphnia magna* is influenced by temperature acclimation. *Can J Zool* 82(10): 1605-1613.
- Rettinger J. & Bongartz E.V.** (2005): Competitive or not? – The non-desensitizing P2X₂/P2X₁ receptor chimera as an experimental model for the antagonist binding kinetics at the P2X₁ receptor. *First Joint Italian-German Purine Club Meeting, Chieti, Italy.*
- Bongartz E.V. & Rettinger J.** (2006): Electrophysiological characterization of aminoglycoside antibiotics effects on the P2X₂ receptor and a P2X₂/P2X₁ receptor chimera after heterologous expression in *Xenopus* oocytes. *8th International Symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides, Ferrara, Italy.*
- Bongartz E.V. & Rettinger J.** (2007): Conformation dependent regulation of P2X receptors by Phosphoinositides. *Second Joint Italian-German Purine Club Meeting, Leipzig.*
- BONGARTZ E.V. & RETTINGER J.** (2009): Aminoglycoside block of P2X₂ receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Purinergic Signal, submitted.*
- BONGARTZ E.V. & RETTINGER J.** (2009): Down-regulation of rat P2X₂ receptor currents by co-expression of Ci-VSP, a voltage-dependent phosphatase from *Ciona intestinalis*. *BBA, submitted.*
- HÄNSEL R., FOLDYNOVA-TRANTIRKOVA S., LÖHR F., BUCK J., BONGARTZ E.V., BAMBERG E., SCHWALBE H., DÖTSCH V., TRANTIREK L.** (2009): Evaluation of parameters critical for observing nucleic acids inside living *Xenopus laevis* oocytes by In-Cell NMR Spectroscopy. *JACS* 131(43): 15761-15768.

