Die Untereinheitenstöchiometrie des humanen P2X₂/3-Rezeptors

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.**

**an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig**

Eingereicht von

Julia Anna Maria Schmid, geboren am 22. März 1990 in Regensburg

angefertigt am

Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Leipzig

unter der Betreuung von

Prof. em. Dr. Dr. h. c. Peter Illes und Dr. rer. med. habil. Patrizia Rubini Illes

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades am 16. April 2019

Inhaltsverzeichnis

I	Bibliographische Zusammenfassung	4
1	Einleitung	5
1.1	Das purinerge Signalsystem (engl. <i>purinergic signalling</i>)	5
1.2	Purinerge Rezeptoren als pharmakologisches Target	6
1.3	P2X-Rezeptoren	8
1.3.1	Aufbau einer P2X-Untereinheit	8
1.3.2	3D-Struktur, ATP-Bindung und Kanalöffnung	9
1.3.3	Desensitisierung und allosterische Modulation	10
1.3.4	Homo- und Heterotrimere	11
1.3.5	ATP-Bindungsstellen in Heteromeren und Untereinheitenstöchiometrie ...	12
1.4	Der P2X2/3-Rezeptor und seine Rolle im nozizeptiven System	13
1.5	Pharmakologische Eigenschaften von P2X2, P2X3 und P2X2/3	15
1.6	Das Ziel meiner Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Zellkultur	18
2.1.1	HEK293-Zellen	18
2.1.2	Plasmide	18
2.1.3	Mutagenese	19
2.1.4	Transfektion	19
2.2	Ca ²⁺ -Imaging	20
2.2.1	Fura-2	20
2.2.2	Fluoreszenzmikroskopie	21
2.3	Datengewinnung	21
2.3.1	Arbeitsplatz	21
2.3.2	Ablauf eines Experiments	22
2.4	Datenauswertung	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Nomenklatur zur Untereinheitenstöchiometrie	27
3.2	Versuchskomplex I: Experimente mit hP2X2- und hP2X3-Mutanten	27
3.2.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Wildtyp-Rezeptorvarianten	28

3.2.2	Inaktivität der verwendeten Mutanten in homomeren Konstellationen	30
3.2.2.1	P2X2-Mutanten K69A und K307A	30
3.2.2.2	P2X3-Mutanten K63A und K299A	31
3.2.3	Mutationen im NBS1	31
3.2.4	Mutationen im NBS4	32
3.3	Versuchskomplex II: Rezeptormodifikation durch Veränderung des pH-Werts . . .	34
3.3.1	Applikation von $\alpha\beta$ -meATP	35
3.3.2	Applikation von 2-MeSATP	36
3.4	Versuchskomplex III: Einsatz des kompetitiven Antagonisten A-317491 mit $\alpha\beta$ -meATP	37
4	Diskussion	39
4.1	Nullhypothese und Arbeitshypothese	39
4.2	Transfektionsverhältnis und resultierende Untereinheitenstöchiometrie	40
4.3	Versuchskomplex I: Experimente mit inaktiven hP2X2- und hP2X3-Mutanten . . .	40
4.4	Versuchskomplex II: Rezeptormodifikation durch Veränderung des pH-Werts . . .	43
4.4.1	Vergleich mit den Ergebnissen der Patch-Clamp-Methode	44
4.4.2	Pathophysiologischer Aspekt von saurem pH in der extrazellulären Matrix	45
4.5	Versuchskomplex III: Einsatz des kompetitiven Antagonisten A-317491	45
4.6	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	47
5	Ergänzende Daten	49
6	Abkürzungsverzeichnis	52
7	Abbildungsverzeichnis mit Quellenangaben	54
8	Tabellenverzeichnis mit Quellenangaben	55
9	Zubehör	56
10	Literaturverzeichnis	58
II	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	66
III	Lebenslauf	67
IV	Danksagung	68

I Bibliographische Zusammenfassung

Schmid, Julia Anna Maria

Die Untereinheitenstöchiometrie des humanen P2X2/3-Rezeptors

Universität Leipzig, Dissertation

Diese Arbeit umfasst 68 Seiten, 23 Abbildungen, 17 Tabellen, 96 Literaturangaben und 8 Internetquellen.

Heteromere P2X2/3-Rezeptoren befinden sich neben homomeren P2X3-Rezeptoren an peripheren und zentralen Endigungen von nozizeptiven Spinalganglienneuronen und spielen eine Rolle bei der Entstehung von akuten und chronischen Schmerzen, die im Rahmen von Verletzungen, Entzündungen, Tumorerkrankungen und Neuropathien auftreten. Bislang ging man davon aus, dass P2X2/3-Rezeptoren eine festgelegte Untereinheitenstöchiometrie von $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wird an transient mit der cDNA von hP2X2 und hP2X3 transfizierten HEK293-Zellen untersucht, inwiefern sich heteromere P2X2/3-Rezeptoren in Abhängigkeit vom gewählten Transfektionsverhältnis P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 in Bezug auf ihre pharmakologischen Eigenschaften funktionell unterscheiden und somit wahrscheinlich auch in einer alternativen Untereinheitenstöchiometrie von $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ vorkommen. Die Ergebnisse der durchgeführten Ca^{2+} -Imaging-Experimente legen die Schlussfolgerung nahe, dass bei P2X2/3-Rezeptoren abhängig vom jeweiligen Expressionslevel der beteiligten P2X-Subtypen beide Untereinheitenstöchiometrien 1:2 und 2:1 existieren, dass sie sich aber in ihren funktionellen Eigenschaften nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Diese Erkenntnisse tragen zur Vervollständigung des Wissens über P2X2/3-Rezeptoren bei, die ein potenzielles Target für die Entwicklung neuer, analgetisch wirksamer Arzneimittel darstellen.

Die Ergebnisse meiner experimentellen Arbeit sind zum Teil in folgende Publikation eingeflossen:

Kowalski, Maria; Hausmann, Ralf; Schmid, Julia; Dopychai, Anke; Stephan, Gabriele; Tang, Yong et al. (2015): **Flexible subunit stoichiometry of functional human P2X2/3 heteromeric receptors**. In: *Neuropharmacology* 99, S. 115–130.

1 Einleitung

1.1 Das purinerge Signalsystem (engl. *purinergic signalling*)

Purine wie Adenin und Guanin sind essentielle Bestandteile von Nukleotiden. Ein Nukleotid, zum Beispiel ATP, setzt sich aus einem Purin oder Pyrimidin als organische Base, einem Pentosezucker, Ribose oder Desoxyribose, und ein bis drei Phosphatresten zusammen (siehe Abb. 1). Ein Nukleosid wie Adenosin hingegen besteht definitionsgemäß nur aus Base und Pentose.

Nukleotide haben in lebenden Organismen zahlreiche Funktionen. Sie dienen unter anderem als Bausteine für DNS und RNS, stellen in Form von ATP den wichtigsten Energieträger im Zellstoffwechsel dar und spielen als intrazelluläre Signalmoleküle, beispielsweise als *second messenger* cAMP, eine wichtige Rolle. (Rassow 2008, S. 412 ff.)

Abb. 1: Aufbau von Adenosintriphosphat mit zwei energiereichen Säureanhydridbindungen zwischen den drei Phosphatgruppen (~)

Die nähere Erforschung der extrazellulären Funktion von Purinen in nukleosidischen Verbindungen, insbesondere von ATP, begann mit der Hypothese des *purinergic signalling*, die Geoffrey Burnstock 1972 formulierte (Burnstock 2006). Untersuchungen an glatten Muskelzellen aus Meerschweinchendarm hatten Hinweise auf die Existenz eines nicht-adrenergen und nicht-cholinergen Neurotransmitters ergeben. In der Folge wurde ATP als Transmittersubstanz nachgewiesen und man sprach von purinenger Signaltransmission. (Burnstock 1972)

Zudem wurde 1976 das Konzept der Kotransmission vorgeschlagen, das besagt, dass ein Neuron mehr als nur einen spezifischen Transmitter ausschütten kann. Dieses Konzept ist mittlerweile allgemein anerkannt und ATP wurde als Kotransmitter verschiedener Substanzen wie Noradrenalin, Acetylcholin, GABA und Glutamat im peripheren sowie zentralen Nervensystem identifiziert. (Burnstock 2004)

Ging man zunächst davon aus, dass ATP vor allem aus dem Zytosol geschädigter Zellen freigesetzt wird und so seine extrazelluläre Wirkung entfaltet, so kennt man heute verschiedene Mechanismen der regulierten ATP-Freisetzung aus präsynaptischen Strukturen. Je nach Zellart kommen Exozytose aus synaptischen Vesikeln, spezielle ATP-Transportproteine oder Kanäle aus Connexinen bzw. Pannexinen zum Einsatz (siehe Abb. 2). (Abbraccio et al. 2009)

Im synaptischen Spalt sorgen verschiedene Enzyme, die übergeordnet als Ekt nukleotidasen bezeichnet werden, für den raschen Abbau von ATP und limitieren damit seine Transmitterwirkung

zeitlich. Durch hydrolytische Dephosphorylierung entstehen die Substrate ADP, AMP und schließlich Adenosin, die wiederum an andere Rezeptorstrukturen binden können als das initial freigesetzte ATP. (Sperlágh et al. 2007)

Abb. 2: Schematische Darstellung von ATP-Freisetzung und Inaktivierung durch Ektonukleotidasen (Verkhratsky und Burnstock 2014)

Auch bestimmte Pyrimidine wie Uridin wirken als Bestandteile von Nukleotiden wie UTP und UDP im Extrazellulärraum als Transmittermoleküle, nutzen analog zu den Purinderivaten Mechanismen zu präsynaptischer Ausschüttung und Abbau und wirken zum Teil an denselben Rezeptoren (Lazarowski 2012). Trotz der Beteiligung von Pyrimidinen am purinergen Signalsystem behielt man den Begriff des *purinergic signalling* bei.

Nachdem die Bedeutung der purinergen Signaltransmission bis in die 1990er Jahre stark umstritten war, erfährt das Thema seit der Klonierung der ersten Purinozeptoren 1994 zunehmende Aufmerksamkeit der internationalen Forschungsgemeinschaft. Dies belegt die Anzahl der erschienenen Publikationen zum Thema *P2 purinergic signalling*, die von ungefähr 100 im Jahr 1990 auf etwa 1700 im Jahr 2012 gestiegen ist. (Burnstock 2014)

Man weiß mittlerweile, dass ATP als Signalmolekül im gesamten menschlichen Organismus eine Rolle spielt, und zwar je nach Organsystem oder betrachteter Gewebeart als Kotransmitter oder eigenständiger Neurotransmitter. Dabei wirkt es sowohl über schnelle synaptische Transmission als auch über langsame neuromodulatorische Mechanismen, deren genaueres Verständnis Gegenstand aktueller Forschung darstellt. (Khakh und North 2012)

1.2 Purinerge Rezeptoren als pharmakologisches Target

Extrazelluläre Nukleoside und Nukleotide binden an spezielle Plasmamembranrezeptoren, die seit 1978 der Familie der purinergen Rezeptoren zugeordnet werden. Initial unterteilte man die

Purinozeptoren in die Klassen der P1- und P2-Rezeptoren. Hauptunterscheidungsmerkmal waren die präferierten endogenen Liganden, die für die P1-Rezeptoren Adenosin und für die P2-Rezeptoren ATP und ADP darstellen. Die P1- bzw. Adenosinrezeptoren wurden nach unterschiedlichen molekularen Strukturen und pharmakologischen Eigenschaften in vier Subtypen eingeteilt (siehe Tab. 1). (Ralevic und Burnstock 1998)

Nachdem man unter den P2-Rezeptoren sowohl ligandengesteuerte Kationenkanäle als auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert hatte, wurden sie 1994 offiziell in die zwei Hauptgruppen der ionotropen P2X- und der metabotropen P2Y-Rezeptoren eingeteilt (Fredholm et al. 1994). In der Folge wurden anhand von genetischer Sequenz und struktureller Kriterien sieben P2X- und acht P2Y-Subtypen identifiziert (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Aktuelle Einteilung der Purinozeptoren, erstellt nach der IUPHAR/BPS-Database

Klasse	Hauptgruppe	Wirkungsweise	Endogene Agonisten	Subtypen
P1		G-Protein-gekoppelt	Adenosin	A ₁ A _{2A} A _{2B} A ₃
P2	X	Ligandengesteuerte, nicht-selektive Kationenkanäle	ATP	P2X ₁ P2X ₂ P2X ₃ P2X ₄ P2X ₅ P2X ₆ P2X ₇
P2	Y	G-Protein-gekoppelt	ATP, ADP, UTP, UDP, UDP-Glucose	P2Y ₁ P2Y ₂ P2Y ₄ P2Y ₆ P2Y ₁₁ P2Y ₁₂ P2Y ₁₃ P2Y ₁₄

Purinerge Rezeptoren werden in der Pharmakotherapie bereits bei verschiedenen Indikationen als Targets verwendet.

Intravenös appliziertes Adenosin dient beispielsweise als gut etabliertes Notfallmedikament bei tachykarden Herzrhythmusstörungen, da es P1-rezeptorvermittelt kurzzeitig die Erregungsüberleitung am AV-Knoten blockiert (Szentmiklosi et al. 2015). Theophyllin wird als Adenosinrezeptorantagonist aufgrund seines bronchospasmolytischen Effekts als Antiasthmikum eingesetzt (D'Alonzo 1996). Koffein als massenhaft konsumiertes Aufputschmittel entfaltet unter

anderem über seine antagonistische Wirkung an Adenosinrezeptoren im ZNS seine anregende Wirkung (Rassow 2008, S.787).

Die mittlerweile international verwendeten Thrombozytenaggregationshemmer Prasugrel, Ticagrelor und Cangrelor, die bei akutem Myokardinfarkt und ischämischem Schlaganfall als Arzneimittel der ersten Wahl verabreicht werden, sind P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten (Rollini et al. 2017). In Japan wird der P2Y₂-Agonist Diquafosol zur Behandlung von Augentrockenheit und Retinaablösung eingesetzt (Lau et al. 2014).

Pharmakologische Substanzen, die an P2X-Rezeptoren wirken, werden derzeit bezüglich vieler verschiedener Erkrankungen erforscht und sind teilweise sehr vielversprechend für die Entwicklung neuer Medikamente (Burnstock 2018). Präklinische Untersuchungen werden beispielsweise mit dem P2X3-Rezeptorantagonisten AF-353 hinsichtlich seiner antihypertensiven Wirkung durchgeführt (Pijacka et al. 2016). Ein weiterer P2X3-Antagonist, AF-219, befindet sich bereits als Antitussivum bei idiopathischem chronischem Husten in der Phase der klinischen Erprobung (Abdulqawi et al. 2015).

1.3 P2X-Rezeptoren

Im menschlichen Organismus gibt es drei Superfamilien von membranständigen ligandengesteuerten Ionenkanälen (*ligand-gated ion channels, LGICs*). Zu den *Cys-loop*-Rezeptoren mit ihrer pentameren Struktur gehören zum Beispiel nACh- und 5-HT₃-Rezeptoren, zu den tetrameren ionotropen Glutamatrezeptoren zählen NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoren. Die trimeren P2X-Rezeptoren bilden die dritte Gruppe der LGICs (Lemoine et al. 2012).

1.3.1 Aufbau einer P2X-Untereinheit

Bislang wurden sieben Gene für P2X-Untereinheiten identifiziert, deren Aminosäuresequenzen von Subtyp zu Subtyp zu 40 bis 55 % identisch sind. P2X1 bis P2X7 werden von unterschiedlichen Wirbeltieren, u.a. von Mensch (h), Ratte (r), Maus (m), Huhn (c), Zebrafisch (zf) und Krallenfrosch (x), exprimiert. Eine P2X-Untereinheit besteht aus 384 (cP2X4) bis 595 (hP2X7) Aminosäuren. Die kurzen Amino(N)- und Carboxy(C)-Termini eines P2X-Proteins befinden sich intrazellulär. Zwei hydrophobe Transmembrandomänen (TM1 und TM2) stellen die Verbindung zu einer langen extrazellulären Schleife her, in der zehn konservierte Cysteinreste Disulfidbrücken ausbilden und die räumliche Struktur sichern (siehe Abb. 3). (North 2002)

Abb. 3: Primärstruktur einer einzelnen P2X-Untereinheit (Samways et al. 2014)

1.3.2 3D-Struktur, ATP-Bindung und Kanalöffnung

Die Darstellung des homomeren Zebrafisch(zf)-P2X4-Rezeptors, zunächst in geschlossenem und später auch in offenem Zustand, mithilfe der Röntgenkristallographie gibt Aufschluss über die dreidimensionale Struktur funktioneller P2X-Rezeptoren. Die Kenntnis der Kristallstruktur ermöglicht ein tieferes Verständnis für die molekularen Mechanismen, die der Rezeptorfunktion zugrunde liegen. (Khakh und North 2012)

Ein P2X-Rezeptor setzt sich aus drei P2X-Untereinheiten zusammen (Aschrafi et al. 2004; Barera et al. 2005). Betrachtet man zunächst den extrazellulären Anteil einer einzelnen Untereinheit im dreidimensionalen Raum, so stellt man fest, dass seine Umrisse denen eines Delfins ähneln: Der Delfinschwanz steckt, analog zu den α -Helices von TM1 und TM2, in der Zytoplasmamembran. Die Längsachse des Delfinkörpers ragt im rechten Winkel zur Membran in den Extrazellulärraum. Die β -Faltblattstrukturen in der Extrazellulärschleife des Untereinheitenproteins bilden Kopf (*head*), Rückenflosse (*dorsal fin*), linke und rechte Brustflosse (*left and right flipper*) des Delfins (siehe Abb. 4A). Zwischen zwei benachbarten P2X-Untereinheiten des trimeren Rezeptors scheinen je drei Kontaktflächen (*interfaces*) zu bestehen. Es wird spekuliert, dass die molekulare Beschaffenheit dieser Kontaktflächen, die je nach beteiligtem P2X-Subtyp variieren kann, ausschlaggebend für die Zusammenlagerung von den jeweiligen homomeren bzw. heteromeren P2X-Rezeptoren ist. (Kawate et al. 2009)

Pro P2X-Rezeptor gibt es drei Agonisten-Bindungsstellen, die sich jeweils zwischen zwei benachbarten P2X-Untereinheiten befinden. Eine ATP-Bindungstasche wird, betrachtet man sie im Delfinmodell, von oberem Körper (*upper body*) und linker Brustflosse der einen Untereinheit (*chain A*) und unterem Körper (*lower body*) und Rückenflosse der Nachbaruntereinheit (*chain B*) umschlossen (siehe Abb. 4B,C). Bei dem komplexen Mechanismus, der zur Bindung von ATP führt, spielen scheinbar die positiv geladenen Lysinreste innerhalb der Bindungstasche eine entscheidende Rolle, da sie mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des ATP interagieren. (Hattori und Gouaux 2012) Die Entdeckung dieses Zusammenhangs ermöglichte unter anderem die Durchführung von Mutagenesestudien, in denen es beispielsweise um die Generierung inaktiver P2X-Subtypen geht. Noch vor der Darstellung der P2X-Kristallstruktur waren pro Bindungsstelle vier Gruppen von Aminosäuren identifiziert worden, die an der Agonisten-Bindung beteiligt sind. Man bezeichnet diese Gruppen als Nukleotid-Bindungssegmente (NBS, *nucleotide binding segment*). NBS 1 und 2 liegen dabei auf der einen (*chain A*), NBS 3 und 4 auf der benachbarten P2X-Untereinheit (*chain B*). (Mager et al. 2004; Bodnar et al. 2011)

Ging man zunächst davon aus, dass die Aktivierung eines P2X-Rezeptors erst durch Bindung von drei Agonisten-Molekülen erfolge, so gilt es mittlerweile als erwiesen, dass für die Öffnung des Ionenkanals zwei Agonisten-Bindungen ausreichen (Stelmashenko et al. 2012; Hausmann

Abb. 4: Dreidimensionaler Aufbau von P2X-Rezeptoren

A Kristallstruktur einer P2X-Untereinheit mit Umriss eines Delfins zum Vergleich

B Zwei benachbarte Untereinheiten (*chain A, B*) während der ATP-Bindung

C Konformationsänderung von offenem zu geschlossenem Zustand durch ATP-Bindung, exemplarisch dargestellt an zwei von drei P2X-Untereinheiten (*chain A, B*) (Hattori und Gouaux 2012)

et al. 2012) Man vermutet, dass kleine Kationen (Ca^{2+} , Na^{+}) aus der umgebenden Flüssigkeit frei durch die drei seitlichen Öffnungen zwischen den Rezeptoruntereinheiten in den extrazellulären Rezeptorvorhof diffundieren. Durch die Agonisten-Bindung wird eine Konformationsänderung des Rezeptors ausgelöst, die bewirkt, dass sich die drei Transmembrandomänen TM2 irisblendenartig auseinanderbewegen und einen Membrankanal freigeben. Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen strömen durch die durchlässige Pore ins Zytosol, während Kalium(K^{+})-Ionen austreten. Die resultierende Ladungsverschiebung führt in der Zelle zu einer Membrandepolarisation, die zelltypabhängig Aktionspotentiale auslösen kann. Zum anderen hat die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Einfluss auf verschiedene kalziumabhängige Signalprozesse im Zellstoffwechsel. (Samways et al. 2014)

1.3.3 Desensitisierung und allosterische Modulation

Auf die Aktivierung des P2X-Rezeptors folgt in der Regel eine Phase der Desensitisierung, in der die Agonisten-Bindungsstellen zwar noch besetzt sind, die Kanalpore aber bereits geschlossen ist und keinen Kationeneinstrom mehr zulässt. Der Rezeptor kann in diesem Zustand nicht erneut aktiviert werden, die P2X-vermittelte Signalübertragung wird also zeitlich limitiert und eine Überstimulation der Zelle gegebenenfalls verhindert. Das Desensitisierungsverhalten hängt von den jeweiligen P2X-Subtypen ab, die an der Rezeptorbildung beteiligt sind. Man unterscheidet grob zwischen langsam- und schnell-desensitisierenden P2X-Subtypen. (Kaczmarek-Hájek et al. 2012) So ist P2X2 in der Splice-Variante A beispielsweise durch sein langsames, P2X3 hingegen durch sein schnelles Desensitisierungsverhalten charakterisiert (Brändle et al. 1997; Zemkova et al. 2004).

Neben den orthosterischen Agonisten-Bindungsstellen, die auch von kompetitiven Antagonisten genutzt werden, verfügen P2X-Rezeptoren über unterschiedliche allosterische Bindungsstellen, deren Besetzung die Affinität des Rezeptors zu seinem Agonisten steigern oder abschwächen kann. Je nach P2X-Subtyp wirken beispielsweise Protonen im Rahmen einer pH-Wert-Veränderung, bestimmte Metallionen (z.B. Zn^{2+}), Proteinkinasen oder Lipide regulierend auf die Rezeptorfunktion ein. (Coddou et al. 2011)

1.3.4 Homo- und Heterotrimer

Gehören die drei Untereinheiten eines P2X-Rezeptors zum selben P2X-Subtyp, so spricht man von einem homotrimeren Rezeptor. Sind zwei oder sogar drei verschiedene P2X-Subtypen an der Rezeptorbildung beteiligt, handelt es sich um ein Heterotrimer. (Chataigneau et al. 2013; Antonio et al. 2014)

Alle bekannten P2X-Subtypen außer P2X6 bilden in heterologen Expressionssystemen funktionelle homotrimere Rezeptoren (Torres et al. 1999; Aschrafi et al. 2004). Native P2X-Rezeptoren weisen in Untersuchungen jedoch häufig biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften auf, die von denen der rekombinanten homomeren Rezeptoren abweichen. Diese Beobachtung legte schon früh die Annahme nahe, dass native P2X-Rezeptoren häufig in heterotrimeren Konstellationen vorliegen, die die Eigenschaften der beteiligten Subtypen kombiniert aufweisen. (Lewis et al. 1995; Nörenberg und Illes 2000)

1999 führte die Gruppe Torres et al. eine systematische biochemische Analyse mit je zwei heterolog koexprimierten P2X-Subtypen in HEK293-Zellen durch und stellte fest, dass alle Subtypen außer P2X7 hetero-oligomeren Rezeptorkonstellationen bilden können (Torres et al. 1999). In der Folge wurden die sechs Heterotrimere P2X1/2, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/5, P2X2/6 und P2X4/6 in verschiedenen Studien auch funktionell untersucht und charakterisiert (Saul et al. 2013). Die sichere Identifikation von nativen heteromeren P2X-Rezeptoren gelang bislang für P2X2/3-Rezeptoren in sensiblen Neuronen verschiedener Lokalisation wie den Spinalganglien (*dorsal root ganglion*, DRG) (u.a. Lewis et al. 1995; Pankratov et al. 2001; Cockayne et al. 2005) und für P2X1/5-Rezeptoren in kortikalen Mäuseastrozyten (Lalo et al. 2008). Zudem gibt es Hinweise auf das Vorkommen von P2X2/3-Rezeptoren in Geschmacksknospen (Kinnamon und Finger 2013) und P2X2/6-Rezeptoren in neuronalen Stammzellen (Majumder et al. 2007; Schwindt et al. 2011).

Kürzlich gelang erstmals der Nachweis eines funktionellen heterotrimeren P2X-Rezeptors aus drei verschiedenen Subtypen (P2X2/P2X4/P2X6) in einem heterologen Expressionssystem (Antonio et al. 2014).

1.3.5 ATP-Bindungsstellen in Heteromeren und Untereinheitenstöchiometrie

Homomere P2X-Rezeptoren weisen drei äquivalente ATP-Bindungsstellen auf (u.a. Roberts et al. 2012; Hausmann et al. 2013). In heteromeren P2X-Rezeptoren hingegen unterscheiden sich alle drei ATP-Bindungsstellen voneinander, auch wenn nur zwei P2X-Subtypen am Rezeptoraufbau beteiligt sind: Eine homomere Bindungsstelle entsteht zwischen den zwei Untereinheiten, die demselben Subtyp angehören (z.B. Kontakt zwischen P2X3/P2X3-Untereinheit). Die beiden anderen, heteromeren Bindungsstellen befinden sich je zwischen zwei Untereinheiten der beiden verschiedenen, an der Rezeptorbildung beteiligten Subtypen. Sie unterscheiden sich dadurch, dass jede beteiligte Untereinheit in der Bindung jeweils einmal die Funktion von *chain A* (mit NBS 1 und 2) und *chain B* (mit NBS 3 und 4) einnimmt (z.B. Kontakt zwischen P2X3/P2X2 und P2X2/P2X3). Die drei Bindungsstellen eines Heteromers können daher auch unterschiedliche Eigenschaften, zum Beispiel in Bezug auf ihre Agonistenbindungsaffinität und -spezifität aufweisen. (Saul et al. 2013)

Die pharmakologischen Eigenschaften eines P2X-Rezeptors werden von den biochemischen und strukturellen Merkmalen der P2X-Subtypen bestimmt, aus denen er sich zusammensetzt. Daher ist für die funktionelle Charakterisierung eines P2X-Heteromers zum einen entscheidend, welche Subtypen an seinem Aufbau beteiligt sind, und zum anderen, welche Untereinheitenstöchiometrie vorliegt, das heißt, welcher Subtyp sich in der Über- oder Minderzahl befindet. (Hausmann et al. 2012; Hausmann et al. 2015)

Im Falle des P2X2/3-Rezeptors ging man bislang von einer fixen Untereinheitenstöchiometrie von einer P2X2- und zwei P2X3-Untereinheiten (1:2; $(\text{P2X2})_1/(\text{P2X3})_2$) aus (Jiang et al. 2003; Wilkinson et al. 2006; Hausmann et al. 2012). Beim Heteromer P2X2/6 wurde eine 2:1-Stöchiometrie nachgewiesen (Hausmann et al. 2012). Allerdings belegte eine Untersuchung mittels Atomkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM), dass P2X2/6 abhängig vom Expressionslevel der beiden beteiligten Subtypen sowohl als Rezeptor mit einer 2:1 als auch mit einer 1:2-Stöchiometrie auftreten kann (Barrera et al. 2007). Diese Entdeckung legt die Vermutung nahe, dass auch andere Heteromere je nach Expressionslevel ihrer Untereinheitensubtypen in variablen Stöchiometrien vorliegen und dementsprechend funktionell unterschiedliche Phänotypen ausbilden können.

In meiner Arbeit untersuche ich die Untereinheitenstöchiometrie des rekombinanten P2X2/3-Rezeptors in Hinblick auf ihre Variabilität funktionell mithilfe der Ca^{2+} -Fluoreszenzmikroskopie.

1.4 Der P2X2/3-Rezeptor und seine Rolle im nozizeptiven System

Der P2X2/3-Rezeptor wurde bereits 1995 mittels Patch-Clamp-Technik in Neuronen des Ganglion inferius (syn. Ganglion nodosum) der Ratte nachgewiesen. Aufgefallen war er durch sein langsames Desensitisierungsverhalten als Charakteristikum des P2X2A-Subtyps in Kombination mit Stromantworten auf $\alpha\beta$ -meATP, einem selektiven P2X3-Agonisten. (Lewis et al. 1995) Zahlreiche biochemische Untersuchungen bestätigten in der Folge die Zusammenlagerung von P2X2- und P2X3-Untereinheiten zu Heterotrimeren. (Radford et al. 1997; Torres et al. 1999; Hausmann et al. 2012; Kowalski et al. 2015)

Native P2X2/3-Rezeptoren wurden neben homomeren P2X3-Rezeptoren in Neuronen der Spinalganglien (*dorsal root ganglion, DRG*), sowie der sensiblen Ganglien trigeminale (Nervus trigeminus) und inferius (Nervus vagus) von Ratten und Mäusen entdeckt (Cook et al. 1997; Thomas et al. 1998; Dunn et al. 2001; Petruska et al. 2002). Funktionelle Analysen mit Knock-out-Mäusen gaben auch Hinweise auf die Präsenz von P2X2/3 in Neuronen vegetativer Ganglien und in sensiblen Afferenzen der Harnblase (Cockayne et al. 2005).

Ein Zusammenhang zwischen extrazellulärem ATP und Nozizeption bzw. der Entstehung von Schmerz wurde erstmals 1976 vermutet, als menschliche Probanden nach subkutaner Injektion von ATP akut Schmerzen entwickelt hatten. (Bleehen et al. 1976)

Der Begriff Nozizeption umfasst die physiologisch und biochemisch objektiv nachvollziehbaren Mechanismen, die zur Entstehung der subjektiven Sinneswahrnehmung Schmerz führen.

Mechanische, thermische oder chemische Reize, die den Körper potenziell oder tatsächlich schädigen können, werden von primär afferenten Nozizeptoren in Rezeptorpotenziale transduziert und daraufhin in Aktionspotenziale transformiert. Nozizeptoren sind in beinahe allen Geweben des Körpers vorhanden und befinden sich in den peripheren Endigungen von afferenten, pseudo-unipolaren Neuronen, deren Perikarya in den sensiblen Spinalganglien sitzen. An der zentralen Endigung des DRG-Neurons im Hinterhorn des Rückenmarks erfolgt die Transmission des Nozizeptorsignals auf ein zweites Neuron, welches im selben Segment auf die Gegenseite kreuzt und im lateralen Vorderseitenstrang (lat. *tractus spinothalamicus lateralis*) zum Thalamus zieht. Im Thalamus wird der Reiz auf ein drittes Neuron umgeschaltet, das die Information auf den somatosensorischen Kortex (lat. *gyrus postcentralis*) überträgt (siehe Abb. 5). Durch die kortikale Verarbeitung entsteht die bewusste, in Bezug auf Lokalisation und Intensität diskriminative Wahrnehmung des Schmerzes. (Aumüller und Wurzinger 2010, S.1103 ff.; Speckmann et al. 2009, S. 68 ff.)

Im Rahmen von verschiedenen Arten pathologischer Prozesse wie Verletzungen oder Entzündungen kommt es im betroffenen Gewebe, entweder durch Zelluntergang oder durch gezielte

Ausschüttung von umgebenden Zellen, zu einer Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration (Burnstock 2013). P2X3 und P2X2/3-Rezeptoren befinden sich an den peripheren Nozizeptorendigungen der Spinalganglienneurone und tragen durch ihre Aktivierung über die Bildung von Aktionspotenzialen zur Weiterleitung des Schmerzreizes in das Hinterhorn des Rückenmarks bei. An den zentralen, präsynaptischen Endigungen der DRG-Neurone sind neben P2X3 ebenfalls P2X2/3-Rezeptoren lokalisiert. Sie scheinen in dieser Position wiederum für die Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration zu sorgen und indirekt an der Ausschüttung von Glutamat beteiligt zu sein (siehe Abb. 6). Beide Transmitter, ATP und Glutamat, tragen zur Erregung des nachgeschalteten Rückenmarkneurons und damit zur Weiterleitung des nozizeptiven Reizes bei. (Burnstock und Wood 1996; Gu und MacDermott 1997)

Nozizeptive DRG-Neurone gehören entweder zur Gruppe der schnell leitenden, myelinisierten A δ -Faser-Neurone oder zur Gruppe der langsam leitenden, nicht-myelinisierten C-Faser-Neurone (Snider und McMahon 1998). Unter den C-Faser-Neuronen gibt es eine Subpopulation, die den Capsaicin-sensitiven transienten Rezeptorpotential-Kationenkanal V1 (TRPV1) exprimiert. Seine Bedeutung für die Entstehung von Schmerz ist seit langem allgemein anerkannt. Insbesondere für diese TRPV1-positiven C-Faser-DRG-Neurone mit kleinem Soma-Durchmesser wurde die Koexpression von P2X2-

Abb. 5: Nozizeption unter Beteiligung von P2X3 und P2X2/3 (Wirkner et al. 2007)

Abb. 6: P2X3 und P2X2/3 an peripheren und zentralen Endigungen des DRG-Neurons (Burnstock 2013)

und P2X3- Untereinheiten nachgewiesen, was eine Involvierung von P2X3- und P2X2/3-Rezeptoren in die Mechanismen der Nozizeption nahelegt. (Lewis et al. 1995; Chen et al. 1995; Wirkner et al. 2007)

Bislang wurde in unterschiedlichen Untersuchungen an Tiermodellen nachgewiesen, dass eine absolute oder relative Inaktivierung von P2X3 und P2X2/3-Rezeptoren zu herabgesetztem Schmerzempfinden führt. So reduzierte die gentherapeutische Herunterregulierung der P2X3-Proteintranslation bei Ratten sowohl akuten als auch chronischen Entzündungsschmerz sowie neuropathischen Schmerz. (Barclay et al. 2002; Stone und Vulchanova 2003; Hemmings-Mieszcak 2003; Dorn et al. 2004) Hinweise für eine Beteiligung an der Entstehung von Migräne und Tumorschmerzen liegen ebenfalls vor (Wirkner et al. 2007). Studien mit P2X3- und P2X2/3-Antagonisten (A317491, TNP-ATP) bestätigten deren analgetische Wirkung bei entzündlicher Hyperalgesie (Oliveira et al. 2009; Xu et al. 2012).

1.5 Pharmakologische Eigenschaften von P2X2, P2X3 und P2X2/3

In meiner Arbeit sollen von unterschiedlichen Expressionslevels der Subtypen P2X2 und P2X3 Rückschlüsse auf die Untereinheitenstöchiometrie des P2X2/3-Rezeptors gezogen werden (1:2 oder 2:1). Dafür bietet es sich an, die bekannten pharmakologischen Eigenschaften von homomeren P2X2- und P2X3-Rezeptoren mit den Eigenschaften der heteromeren P2X2/3-Rezeptoren zu vergleichen, die sich entweder bei einem Überschuss von P2X2-cDNA oder P2X3-cDNA bilden. Die pharmakologischen Profile von P2X2 und P2X3 werden in Bezug auf Charakteristika, die in meiner Arbeit Anwendung finden, in Tabelle 2 beschrieben.

Tab. 2: Pharmakologische Profile von homomeren P2X2- und P2X3-Rezeptoren (aus Coddou et al. 2011)

EC₅₀ = mittlere effektive Konzentration

IC₅₀ = mittlere inhibitorische Konzentration

nM = Nanomolar, µM = Mikromolar

		P2X2	P2X3
Agonist	αβ-meATP	EC ₅₀ > 100 µM (Brake et al. 1994; Roberts et al. 2012)	EC ₅₀ = 1 - 2 µM (Lewis et al. 1995; Chen et al. 1995)
	2-MeSATP	EC ₅₀ = 1 µM (Evans et al. 1995; Lynch et al. 1999)	EC ₅₀ = 0,3 µM (Lewis et al. 1995; Chen et al. 1995)
Antagonist	A-317491	Keine antagonistische Wirkung	IC ₅₀ = 20 nM (Jarvis et al. 2002)
Modulator	Erhöhung der Protonenkonzentration	Positiver modulatorischer Effekt (Stoop et al. 1997; Clyne et al. 2002)	Negativer modulatorischer Effekt (Stoop et al. 1997; Gerevich et al. 2007)

Bislang wurden die pharmakologischen Eigenschaften des P2X2/3-Rezeptors als ähnlich denen des homomeren P2X3-Rezeptors beschrieben, mit der Ausnahme, dass P2X2/3 ein langsames Desensitisierungsverhalten zeigt. In diesem Punkt gleicht er dem ebenfalls langsam desensitisierenden homomeren P2X2-Rezeptor der Splice-Variante A. (Coddou et al. 2011)

$\alpha\beta$ -Methylen-ATP ($\alpha\beta$ -meATP) ist ein selektiver Agonist des P2X1, P2X3- und P2X2/3-Rezeptors. Am P2X2-Rezeptor wirkt es erst in sehr hoher Konzentration agonistisch. 2-Methylthio-ATP (2-MeSATP) ist ebenso wie $\alpha\beta$ -Methylen-ATP ein Strukturanalogon von ATP und stellt einen nicht-selektiven Agonisten an P2X- und P2Y-Rezeptoren dar. (Jacobson et al. 2002; Gever et al. 2006) HEK293-Zellen, die in meiner Arbeit als heterologes Expressionssystem dienen, exprimieren P2Y-Rezeptoren endogen. Bindet 2-MeSATP an die metabotropen P2Y-Rezeptoren, steigt die $[Ca^{2+}]_i$ durch Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und beeinflusst so die Ergebnisse des Ca^{2+} -Imaging (siehe Abb. 7). (Fischer et al. 2003) Diese Verfälschung der Ergebnisse durch die P2Y-Rezeptoraktivität wird bei der Auswertung der Experimente mit 2-MeSATP durch den Abzug einer MOCK-Transfektionskurve korrigiert.

Abb. 7: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptors mit sieben Transmembrandomänen neben einem P2X-Rezeptor

A-317491 ist ein selektiver, kompetitiver Antagonist von P2X3 und P2X2/3. Auf P2X2 hat er keinen antagonistischen Effekt (Jarvis et al. 2002). Wegen seiner günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften, z.B. wegen seiner hohen Bioverfügbarkeit bei subkutaner Applikation, gilt A-317491 als potenzieller zukünftiger Arzneimittelwirkstoff (Donnelly-Roberts et al. 2008).

Vom Subtyp P2X2 sind drei verschiedene Varianten bekannt, die durch alternatives Spleißen (engl. *splicing*) in verschiedenen Geweben entstehen. Variante A entsteht aus der vollen Länge der P2X2-DNA-Sequenz und zeigt, wie bereits erwähnt, ein langsames Desensitisierungsverhalten. Die Varianten B und E entstehen durch *splicing* an dem DNA-Abschnitt, der für das C-terminale Ende des P2X2-Proteins kodiert. Sie desensitisieren beide erheblich schneller als Variante A, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung findet (Coddou et al. 2011). Sie eignen sich daher weniger gut, um P2X2 funktionell von anderen schnell desensitisierenden P2X-Subtypen wie P2X3 zu unterscheiden.

1.6 Das Ziel meiner Arbeit

Schmerzen in unterschiedlichen Qualitäten und Intensitäten gehen mit vielen Erkrankungen einher und bewirken bei den Betroffenen häufig einen hohen Leidensdruck. Um eine Chronifizierung von akuten Schmerzzuständen zu verhindern, ist eine frühzeitige und wirksame analgetische Pharmakotherapie in vielen Fällen von entscheidender Bedeutung. In der medikamentösen Schmerztherapie kommen derzeit zahlreiche Opioid- und Nicht-Opioid-Analgetika (z.B. NSAR) zum Einsatz, bei deren Gabe jedoch verschiedene Kontraindikationen (z.B. eingeschränkte Nierenfunktion bei NSAR) und potenzielle Nebenwirkungen (z.B. Erosionen im Gastrointestinaltrakt bei NSAR, spastische Obstipation, sedierender Effekt bei Opioiden) beachtet werden müssen. (Mutschler et al. 2013, S.194 ff.)

Um die Bandbreite an Behandlungsstrategien für Schmerzen zu erweitern, ist die Entwicklung von neuen analgetisch wirksamen Arzneimitteln von großem Interesse. P2X3- und P2X2/3-Rezeptoren an den peripheren und zentralen Endigungen von sensiblen DRG-Neuronen spielen eine Rolle im nozizeptiven System und insbesondere bei der Entstehung von akuten und chronischen Schmerzen, die durch Verletzungen, Entzündungen, Tumorerkrankungen und Neuropathien ausgelöst werden. Damit stellen sie einen potenziellen pharmakologischen Angriffspunkt für Analgetika dar. (Wirkner et al. 2007; Burnstock 2013)

Zwei verschiedene Untereinheitenstöchiometrien 1:2 und 2:1 bei nativen heteromeren P2X2/3-Rezeptoren könnten aufgrund von unterschiedlichen pharmakodynamischen Eigenschaften der beiden Rezeptorvarianten einen Einfluss auf die pharmakologische Steuerung der P2X2/3-Aktivität, etwa durch selektive Antagonisierung, haben. Um festzustellen, ob eine solche funktionelle Diversität von $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ und $P2X2)_2/(P2X3)_1$ besteht, und um diese gegebenenfalls zu charakterisieren, erzeuge ich in meiner Arbeit durch Modifikation der transienten Transfektion in einem heterologen Expressionssystem einen Überschuss einmal von P2X2- und einmal von P2X3-Untereinheiten und untersuche die heteromeren Rezeptoren mittels Mutagenese-Experimenten, pH-Wert-Veränderung und Einsatz des selektiven Antagonisten A-317491 im Hinblick auf etwaige Unterschiede ihrer funktionellen Eigenschaften.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 HEK293-Zellen

Für die Experimente wurden HEK(*human embryonic kidney*)293-Zellen verwendet. Es handelt sich um Zellen aus Nierengewebe, die initial 1973 von einem menschlichen Embryo isoliert und mit Teilen des Adenovirus 5 transformiert worden waren (Graham et al. 1977). HEK293-Zellen und ihre Derivate wurden in der Folge zu einer der am häufigsten eingesetzten Zelllinien im Rahmen von zellbiologischer Forschung (Stepanenko und Dmitrenko 2015). Sie eignen sich insbesondere für Transfektionsstudien, da sie einfach zu kultivieren sind und rekombinante DNA zuverlässig exprimieren (Thomas und Smart 2005).

Die HEK293-Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) kultiviert, das zusätzlich 4,5 mg/ml D-Glukose, 10 % fötales Kälberserum und 2 mM L-Glutamin enthielt. Im Inkubator lag die Temperatur bei 37 °C, die Luftfeuchtigkeit bei 95 % und der CO₂-Gehalt bei 5 %. Die Zellen wuchsen auf dem Boden von Zellkulturflaschen (75 x 25 mm) in einem einschichtigen Zellrasen und wurden ab einer Konfluenz von etwa 80 % jeweils in eine neue Kulturflasche passagiert. Es erfolgten maximal 30 Passagen bis zur Herstellung einer neuen Kultur aus kryokonservierten HEK-Zellen.

2.1.2 Plasmide

Die cDNAs des hP2X2-Rezeptors (Splice-Variante A) und des hP2X3-Rezeptors waren mit Hilfe der Restriktionsenzyme PstI und EcoRI in die Vektoren pIRES2-Ds-Red (hP2X2A) und pIRES2-EGFP (hP2X3) eingebracht worden (Hausmann et al. 2012). Die bicistronischen lentiviralen IRES(*internal ribosome entry site*)-Vektoren stellten sicher, dass eine P2X-Untereinheit und ein fluoreszierendes Protein Ds(*discosoma species*)-Red oder EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) von einer Zelle jeweils simultan exprimiert wurden (siehe Angaben des Herstellers Clontech). Anhand der roten oder grünen Fluoreszenz konnten für die Experimente so gezielt Zellen ausgewählt werden, die P2X2-, P2X3- oder beide Rezeptoruntereinheiten exprimierten (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Kombinationen aus P2X-cDNA und IRES-Vektoren mit entsprechender Fluoreszenzfarbe

cDNA	IRES-Vektor	Fluoreszenzfarbe
hP2X2A	pIRES2-Ds-Red	rot
hP2X3	pIRES2-EGFP	grün

2.1.3 Mutagenese

Die hP2X2- und hP2X3-Austauschmutanten-cDNAs wurden durch ortsspezifische Mutagenese nach dem Protokoll von QuikChange (Stratagene) erzeugt (Hausmann et al. 2012; Kowalski et al. 2014). In der mutierten Untereinheit wurde je eine hoch konservierte, positiv geladene Aminosäure Lysin (K) durch

eine ungeladene, hydrophobe Aminosäure Alanin (A) ausgetauscht. Die Position der ausgetauschten Aminosäure in der Aminosäuresequenz der Rezeptoruntereinheit wird mit der Zahl in der Mitte des Mutantennamens angegeben. Für die vorliegende Arbeit wurden von hP2X2 zu hP2X3 in ihrer Mutationsposition homologe Austauschmutanten verwendet (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Für meine Arbeit ausgewählte inaktive und eingeschränkt aktive P2X2- und P2X3-Mutanten (Fischer et al. 2007; Bodnar et al. 2011; Hausmann et al. 2012)

	NBS 1	NBS 4
P2X2	K69A	K307A
P2X3	K63A	K299A

2.1.4 Transfektion

Für die transiente Transfektion wurden HEK293-Zellen zunächst vom Boden einer etwa viertägig inkubierten Zellkulturflasche durch vorsichtiges Absaugen und Spülen mit 2 ml DMEM gelöst. Je drei Tropfen der Zellsuspension wurden auf ein unbeschichtetes Deckglas (Durchmesser 30 mm, Höhe 0,14 mm) in eine Zellkulturschale (Durchmesser 30 mm) in 1,5 ml DMEM ausgesät. Jede Schale wurde mit einer Mischung aus 0,5 µg (homomere P2X2- und P2X3-Rezeptoren, heteromere P2X2-wt/P2X3-wt-Rezeptoren) bzw. 0,75 µg (heteromere P2X2-mut/P2X3-wt- und P2X2-wt/P2X3-mut-Rezeptoren) Plasmid-DNA, 10 µl Polyfect-Transfektionsreagenz und 100 µl Opti-MEM versehen und 18 bis 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium aus den Zellkulturschalen entfernt und durch 2 ml Opti-MEM ersetzt.

Bei Experimenten mit heteromeren P2X2/3-Rezeptoren wurden die Plasmide je nach gewünschter Rezeptoruntereinheitenstöchiometrie in der entsprechenden Menge kombiniert (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Rezeptorphänotyp mit dafür ausgewähltem Transfektions- und Plasmid-Mengen-Verhältnis

Gewünschter Rezeptorphänotyp	Transfektions- verhältnis	verwendete Plasmid-Mengen im Verhältnis
(P2X2-wt) ₁ /(P2X3-wt) ₂	1:2	0,16 µg : 0,32 µg
(P2X2-wt) ₂ /(P2X3-wt) ₁	4:1	0,40 µg : 0,10 µg
(P2X2-mut) ₁ /(P2X3-wt) ₂	1:2	0,25 µg : 0,50 µg
(P2X2-mut) ₂ /(P2X3-wt) ₁	4:1	0,60 µg : 0,15 µg
(P2X2-wt) ₁ /(P2X3-mut) ₂	1:2	0,25 µg : 0,50 µg
(P2X2-wt) ₂ /(P2X3-mut) ₁	4:1	0,60 µg : 0,15 µg

Die Zellen wurden vom zweiten bis zum vierten Tag post transfectionem für die Ca²⁺-Imaging-Experimente verwendet.

2.2 Ca²⁺-Imaging

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des Ca²⁺-Imaging angewandt. Sie beruht auf der Bestimmung der Veränderung von intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen, die durch die Aktivierung von P2X-Rezeptoren ausgelöst werden. Ca²⁺ in lebenden HEK293-Zellen wurde zu diesem Zweck mit einem fluoreszierenden Indikatorfarbstoff markiert und mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse in verschiedenen Versuchsreihen quantifiziert.

2.2.1 Fura-2

Für die Experimente wurde Fura-2 als Ca²⁺-Indikator verwendet. Die Vorstufe Fura-2-AM ist zellmembranpermeabel und wird intrazellulär durch Esterasen zur aktiven und nicht membrangängigen Form Fura-2 hydrolysiert (Tsien 1989; siehe auch Angaben des Herstellers Sigma-Aldrich).

Fura-2 wurde 1985 von Roger Tsien und Kollegen synthetisiert und ist seither ein gebräuchlicher Fluoreszenzfarbstoff für Ca²⁺ (Patel et al. 2013). Es bindet mit einer hohen Selektivität in einer Stöchiometrie von 1:1 an Ca²⁺-Ionen. Fura-2-Ca²⁺-Komplexe haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm, freie Fura-2-Moleküle dagegen bei einer Wellenlänge von etwa 360 nm (siehe Abb. 8). Diese unterschiedlichen Exzitationsspektren stellen eine entscheidende Qualität von Fura-2 dar, denn sie erlauben die Abschätzung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration anhand einer Verhältnis-Berechnung. Bei $\lambda = 340$ nm und $\lambda = 380$ nm unterscheiden sich die Fluoreszenzintensitäten von Fura-2-Ca²⁺-Komplexen und freien Fura-2-Molekülen am stärksten voneinander. Das Verhältnis (engl. *ratio*) der Fluoreszenzintensitäten

Abb. 8: Exzitationsspektrum von Fura-2 in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration. Blaue Titrationskurve: Ca²⁺-freies Medium; rote Titrationskurve: maximale Konzentration an freiem Ca²⁺ (43,5 μ M). Bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm bestehen die größten Differenzen zwischen den Fluoreszenzintensitäten beider Kurven (grüne Pfeile).

(FR) bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ und $\lambda = 380 \text{ nm}$ wird in eine Kalibrationsgleichung eingesetzt, die nach $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgelöst wird. Auf diese Weise ist das Ergebnis unabhängig von verschiedenen Störvariablen wie unterschiedlicher Dicke der Präparate oder ungleichmäßiger Indikatorkonzentration in den verschiedenen betrachteten Zellen. (Grynkiewicz et al. 1985)

2.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Ziel der Fluoreszenzmikroskopie ist es, die Intensität von Fluoreszenz zu messen. Die Schwierigkeit besteht dabei darin, dass die Intensität des Fluoreszenzlichts im Vergleich zur Intensität des Anregungslichtes sehr schwach ist. Deshalb müssen für die entsprechenden Wellenlängen geeignete Lichtfilter und dichroitische Strahlteiler eingesetzt werden (Sanderson 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden Wellenlängen von 340 nm und 380 nm für die Exzitation gewählt. Die Emission wurde bei Wellenlängen um 510 nm gemessen.

2.3 Datengewinnung

2.3.1 Arbeitsplatz

Für die Experimente wurde ein invertiertes Epifluoreszenzmikroskop (Olympus IX 70) verwendet. Als Lichtquelle für die Fluoreszenzbilder diente eine Hochdruck-Xenonbogenlampe (75 Watt), die in einen Monochromator (Till Photonics Polychrome II) integriert war. Für die orientierende Betrachtung der Zellen im Durchlichtverfahren war zusätzlich eine Quarz-Halogenlampe (12 Volt, 100 Watt) über dem Objektisch angebracht.

Das zu verwendende Objektiv und die Fokussierung wurden jeweils manuell eingestellt. In der Filtertrommel befanden sich drei Filterblöcke (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Exzitations- und Emissionswellenlängen für den jeweiligen Fluoreszenzbereich

Filterblock	Exzitationswellenlänge	Emissionswellenlänge
Fura-2-Fluoreszenz	340 nm und 380 nm	510 nm
Rotfluoreszenz	545 $\pm$ 25 nm	605 $\pm$ 70 nm
Grünfluoreszenz	460 nm bis 495 nm	510 nm

Eine vierte Position in der Filtertrommel blieb leer und wurde für die rein lichtmikroskopische Betrachtung der Zellen verwendet.

Der Objektivwechselrevolver war mit drei verschiedenen Objektiven ausgestattet. Die zwei schwächeren Objektive wurden zur Orientierung auf dem Objektträger eingesetzt, sie vergrößerten das Bild 10- und 20-fach bei numerischen Aperturen (NA) von 0,3 und 0,5.

Die numerische Apertur ist ein Maß für die Lichtmenge, die ein Objektiv einfangen kann. Sie errechnet sich aus dem Produkt aus dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Objektträger und Frontlinse des Objektivs sowie dem Sinus von dessen halbem Öffnungswinkel α ($NA = n \times \sin \alpha$). Die NA gibt damit einen Hinweis auf das Auflösungsvermögen eines Objektivs. Je größer die NA, desto höher ist das Auflösungsvermögen. (Danz 2005)

Für die Experimente selbst wurde ein Ölimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer NA von 1,35 verwendet. Diese Kombination aus Ölimmersion und hoher NA sicherten eine optimale Auflösung für die verwendeten Wellenlängen λ . (Olympus IX70 Fluorescence and TIRF Microscope Operations Manual)

Im Objektisch befand sich eine kreisrunde Aussparung, in die als Objektträger ein maßgefertigter Kunststoffring mit dem transparenten Deckgläschen und den darauf anhaftenden Zellen eingesetzt werden konnte. Dank eines eingepassten Aufsatzes entstand über dem Deckglas eine Wanne für etwa zwei Milliliter Ringerlösung, die während eines Experimentes kontinuierlich ausgetauscht wurden. Im Aufsatz war seitlich in einer Öffnung ein kleiner Schlauch befestigt, der an eine Absaugpumpe angeschlossen war.

Über dem Objektisch war eine verstellbare feine Quarzglaspinzette (Durchmesser 200 μm) montiert, die über Kunststoffschläuche mit den 12 Reservoirs eines DAD(*drug application device*)-Superfusions-Systems (ALA Scientific Instruments) verbunden war. Die Applikation von Substanzen während der Experimente erfolgte druckkontrolliert nach Protokollen, die mit der Software DADport auf dem angeschlossenen Laptop erstellt wurden.

Ein Trinokular stellte den optisch wirksamen Teil des Mikroskops dar. Zur Betrachtung der Zellen stand ein Binokular mit 10-facher Vergrößerung zur Verfügung. Der dritte optische Kanal war mit einer Peltier-gekühlten CCD(*charge-coupled device*)-Digitalkamera (IMAGO, Till Photonics) verbunden. Sie dokumentierte die Experimente mit Fotos, die mithilfe der Software Tillvision (Version 4.0, Till Photonics) graphisch und numerisch ausgewertet wurden.

2.3.2 Ablauf eines Experiments

Zu Beginn eines Experimentes wurde eine Zellkulturschale mit transfizierten Zellen ausgewählt und mit 4 μl Fura-2-AM der Konzentration 2,5 $\mu\text{mol/l}$ versehen. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Kulturschale konsequent vor unnötigem Lichteinfall geschützt, um ein vorzeitiges Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes (*photobleaching*) zu verhindern. Zudem galt es, den schädigenden Effekt des Lichts auf die mit Fura-2 beladenen Zellen (*photodynamic damage*) zu reduzieren. (Tsien 1989) Die Schale wurde eine Stunde lang mit dem Ca^{2+} -Indikator inkubiert.

Währenddessen wurde der Ca^{2+} -Imaging-Arbeitsplatz vorbereitet. Am Messplatz lag durchgängig Zimmertemperatur mit Schwankungen von 20 bis 24 $^{\circ}\text{C}$ vor. Die Ringerlösung, die während

der Experimente als Extrazellulärlösung zum Einsatz kam, wurde auf Basis von zweifach destilliertem Wasser gemischt (Zusammensetzung siehe Tab. 7). Ihr gewünschter pH-Wert von 7,4 wurde mit einem pH-Meter kontrolliert.

Abhängig vom Protokoll für den jeweiligen Versuchstag wurden Substanzlösungen in den benötigten Konzentrationen hergestellt und in die entsprechenden Reservoirs des Superfusions-Systems gefüllt.

Nach Ablauf der 60-minütigen Inkubationszeit wurde das Fura-2-haltige Medium aus der Zellkulturschale entfernt. Die Zellen wurden zweimal vorsichtig mit je 2 ml Ringerlösung gespült. Anschließend wurde der dünne Glas-Chip, auf dem die Zellen angewachsen waren, mit einer Pinzette vom Boden der Kulturschale angehoben und in den Kunststoffring eingesetzt, der anschließend auf dem Objektisch positioniert wurde. Durch den eingepassten Aufsatz über dem Glas-Chip entstand eine Perfusionswanne, in der durch eine Rollerpumpe und die Absaugung ein konstanter Austausch von Ringerlösung mit einer Flussrate von 0,8 ml/min während der gesamten Experimentdauer gewährleistet war. Durch den kontinuierlichen Austausch der Extrazellulärlösung wurde sichergestellt, dass applizierte Substanzen während dem Ablauf des Versuchsprotokolls schnell ausgewaschen wurden.

Anschließend erfolgte die Betrachtung der Zellen sowohl im Durchlicht als auch mit den entsprechenden Einstellungen für Rot- und Grünfluoreszenz. Ziel war es, eine geeignete Gruppe von Zellen zu finden, die je nach Fragestellung des jeweiligen Versuchstages rot und bzw. oder grün fluoreszierten als Zeichen dafür, dass sie die erforderlichen P2X-Untereinheiten exprimierten. Zudem sollten die Zellen weder einzeln stehen noch überlappen. Morphologische Kriterien wie runde, gleichmäßige Form, mittlere Größe und nicht zu vakuolenreiches Zytosol wurden zusätzlich bei der Auswahl berücksichtigt.

War unter Betrachtung mit dem Ölimmersionsobjektiv in 400facher-Vergrößerung (40 (Objektiv) x 10 (Binokular)) ein passender Objektausschnitt eingestellt und fokussiert, so wurde die Quarzpipette des DAD vorsichtig unter optischer Kontrolle mithilfe des Binokulars ungefähr 300 µm oberhalb der Zellen fixiert. Eine korrekte Position der Pipette war überaus wichtig für verlässliche Ergebnisse des Experimentes: Saß sie zu dicht an den Zellen, bestand das Risiko, dass die Zellen während der Substanzapplikation weggespült wurden. War die Pipette hingegen zu weit entfernt, erreichte die Substanz die Zellen verzögert und das ausgelöste Ca^{2+} -Signal konnte nur unvollständig aufgezeichnet werden.

Tab. 7: Zusammensetzung der Extrazellulärlösung

Bestandteile der Ringer-Lösung	Konzentration in mmol/l
NaCl	135,0
KCl	4,5
MgCl ₂	1,0
HEPES-Puffer	10,0
D-Glucose	10,0
CaCl ₂	2,0

Mithilfe der Tillvision-Software wurden mit den Einstellungen für Rot-, Grün- und Fura-2-Fluoreszenz Ausgangsfotos aufgenommen, auf denen die zu untersuchenden Zellen manuell eingekreist und als ROIs (*ranges of interest*) markiert wurden. Die ROIs stellten die Grundlage für die darauffolgenden Einzelzell- Ca^{2+} -Analysen dar. Das Fura-2-Foto diente der Software als Basis für die Berechnung der Schwankungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration während des Experimentes. Folgende Einstellungen wurden zur Aufnahme der Fotos vorgenommen (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Fotoeinstellungen

	Rotfluoreszenz (Ds-red-P2X2-Komplex)	Grünfluoreszenz (eGFP-P2X3-Komplex)	Fura-2-Fluoreszenz (Fura-2- Ca^{2+} -Komplex und freies Fura-2)
Emissionswellenlänge (nm)	540	470	380
Expositionszeit (ms)	60	30	8

Die Expositionszeit beschreibt die Dauer der Beleuchtung mit Anregungslicht für die Aufnahme eines Fotos. Je schwächer die Leuchtkraft des Fluorophors, desto länger muss beleuchtet werden. Eine möglichst kurze Expositionszeit dient im Gegensatz dazu der Vermeidung des Bleich-Effekts. Außerdem bestand durch manuelles Schließen einer Blende am Ölimmersionsobjektiv zusätzlich die Möglichkeit, die auf die Zellen einwirkende Lichtquantität zu reduzieren.

Nun wurde das Versuchsprotokoll gestartet. Die Tillvision-Software, die die Aufnahme der Fotos steuerte, lief synchron mit der DAD-Software, die den zeitlichen Ablauf der Substanzgabe koordinierte. In den drei verschiedenen Experimentkomplexen verliefen die Protokolle weitgehend nach dem gleichen Prinzip: Waschphasen, in denen die Zellen mit Ringerlösung gespült werden, wechselten sich mit Substanzphasen ab, in denen Agonisten sowohl in unterschiedlicher Konzentration als auch bei verschiedenen pH-Werten oder zusammen mit Antagonisten appliziert wurden. Exemplarisch dargestellt ist hier das Registrat einer ROI aus dem Protokoll für eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit dem Agonisten $\alpha\beta$ -meATP (Abb. 9, Tab. 9).

Abb. 9: Originalregistrat einer mit (hP2X2-wt)/(hP2X3-wt)-1:2 transfizierten HEK293-Zelle bei $\alpha\beta$ -meATP-Gaben in aufsteigender Konzentration. Protokollschritte 1 bis 15 gemäß Tabelle 9. Ungerade Zahlen (1, 3, ...) entsprechen Waschphasen, gerade Zahlen (2, 4, ...) Substanzphasen.

Tab. 9: Musterprotokoll für Dosis-Wirkungs-Kurven-Experimente (vereinfachte Darstellung)

Schritt	Phase	Applizierte Substanz	Zeit (min : sec)	Fotofrequenz	Zeitachse (min : sec)
1	Waschphase	Ringer	02:00	3/min	00:00 - 02:00
2	Substanzphase	10 μM α,β-meATP	00:07	4/sec	02:00 - 02:07
3	Waschphase	Ringer	10:18	3/min	02:07 - 12:25
4	Substanzphase	1 μM α,β-meATP	00:07	4/sec	12:25 - 12:32
5	Waschphase	Ringer	10:18	3/min	12:32 - 22:50
6	Substanzphase	3 μM α,β-meATP	00:07	4/sec	22:50 - 22:57
7	Waschphase	Ringer	10:18	3/min	22:57 - 33:15
8	Substanzphase	10 μM α,β-meATP	00:07	4/sec	33:15 - 33:22
9	Waschphase	Ringer	10:18	3/min	33:22 - 43:40
10	Substanzphase	30 μM α,βmeATP	00:07	4/sec	43:40 - 43:47
11	Waschphase	Ringer	10:18	3/min	43:47 - 54:05
12	Substanzphase	100 μM α,βmeATP	00:07	4/sec	54:05 - 54:12
13	Waschphase	Ringer	10:18	3/min	54:12 - 64:30
14	Substanzphase	300 μM α,βmeATP	00:07	4/sec	64:30 - 64:37
15	Waschphase	Ringer	06:00	3/min	64:37 - 70:37

Während den Substanzapplikationen mit einer Dauer von je sieben Sekunden wurden bei abwechselnder Belichtung mit $\lambda = 340\text{nm}$ und $\lambda = 380\text{nm}$ pro Sekunde vier Fotos aufgenommen. Die emittierten Fluoreszenzintensitäten FI wurden auf den Fotos festgehalten und miteinander in Verhältnis gesetzt (FR, *fluorescence ratio*). Dabei korrelierte die Veränderung der FR (ΔFR) direkt mit der Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Während der Waschphasen wurden die Fluoreszenzintensitäten auf dieselbe Weise betrachtet, allerdings mit einer niedrigeren Fotofrequenz von 3/min, zum einen um Belichtungszeit einzusparen, zum anderen, weil in den Waschphasen keine schnelle Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu erwarten war.

Die Dauer eines Experimentes variierte je nach Protokolltypus von 39 min, 33 sec (verkürzte Dosis-Wirkungs-Kurve, vier Applikationen) bis 70 min, 37 sec (gesamte Dosis-Wirkungs-Kurve, sieben Applikationen). Pro Zellkulturschale wurden maximal drei Experimente durchgeführt, bevor sie verworfen wurde. Der Ausbleicheffekt sowie mechanische und pharmakologische Belastung durch die Substanzapplikationen begrenzten die Aussagekraft des Ca^{2+} -Signals der Zellen zeitlich auf etwa drei Stunden.

2.4 Datenauswertung

Die erhobenen Daten wurden mithilfe von vorprogrammierten Makros in MS Excel (Windows 8 und 10) übertragen. In Excel wurden aus den Δ FR-Werten der einzelnen ROIs Mittelwerte und Standardfehler (S.E.M.) für alle ROIs einer Experimentreihe berechnet. Diese Daten wurden mit den Programmen SigmaPlot (Version 13) bzw. Origin (Version 17G) in Graphikform gebracht und statistisch ausgewertet. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde sichergestellt, dass die Grundgesamtheit der Messergebnisse für einzelne ROIs, anhand derer Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt wurden, normalverteilt waren. Unterschiede zwischen je zwei Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One-Way ANOVA, engl. *analysis of variance*) auf ihre Signifikanz überprüft. Zusätzlich wurden Post-hoc-Tests nach Holm-Sidak und Bonferroni durchgeführt. In den Versuchskomplexen, in denen es um den Grad von Inhibition ging, also pH-Wert- und Antagonisten-Experimente, wurde der Mann-Whitney-Test als Signifikanztest verwendet, da die Vergleichsgruppen hier nicht normalverteilt sind. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt ($p < 0,05$). Ein Unterschied von mehr als 5 % zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen galt demnach als statistisch signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Nomenklatur zur Untereinheitenstöchiometrie

Im Folgenden zeige ich die Untereinheitenanzahl eines P2X-Subtyps, die in einer heterotrimeren Rezeptorkonstellation vorhanden ist, jeweils mit einer tief gestellten „1“ oder „2“ nach der Subtypenbezeichnung an. Diese Nomenklatur weicht von der gängigen IUPHAR-Schreibweise ab, scheint aber für die Fragestellung meiner Arbeit sinnvoll. So gehen aus einem Transfektionsverhältnis P2X2/P2X3-1:2 hauptsächlich (P2X2)₁/(P2X3)₂-Heteromere hervor, während das Transfektionsverhältnis P2X2/P2X3-4:1 die Zusammenlagerung von (P2X2)₂/(P2X3)₁-Heteromeren befördert.

3.2 Versuchskomplex I: Experimente mit hP2X2- und hP2X3-Mutanten

Im Versuchskomplex I wurden mithilfe von Agonistenapplikationen in aufsteigender Konzentration Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, um die Funktion von homo- und heteromere Rezeptorkonstellationen aus beiden Transfektionsverhältnissen miteinander vergleichen zu können. Auf der Ordinate der Dosis-Wirkungs-Kurven sind linear aufsteigend die Veränderung der *fluorescence ratio* (ΔFR) abgebildet. Auf der Abzisse werden die Agonistenkonzentrationen logarithmisch aufsteigend dargestellt. Die Kurven wurden mit der Hill-Gleichung berechnet, verlaufen sigmoidal und sind durch drei Parameter charakterisiert:

- Der maximale Effekt ($E_{\max}$), angegeben in ΔFR , stellt eine Annäherung an die maximale Änderung der FR (und damit der $[Ca^{2+}]_i$) dar, die durch die Rezeptorwirkung in der Zelle erzielt werden kann. $E_{\max}$ steht damit für die Wirkungsstärke des Agonisten am jeweiligen Rezeptor.
- Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}), angegeben in μM , gibt die Agonistenkonzentration an, bei deren Applikation 50 Prozent des maximalen Effekts ($E_{\max}$) eintritt. Je größer EC_{50} , desto geringer ist die Affinität des Agonisten an den betreffenden Rezeptor.
- Der Hill-Koeffizient (n_H), angegeben ohne Einheit, ist ein Maß für die Steilheit der Kurve und misst die Kooperativität bei Vorhandensein mehrerer Agonistenbindungsstellen in einem Enzym oder Rezeptor. Die Kooperativität beschreibt die Veränderung der Agonistenaffinität einzelner Bindungsstellen eines Rezeptors durch die Besetzung benachbarter Bindungsstellen. Ist der Hill-Koeffizient n_H größer 1, liegt eine positive Kooperativität vor. Das bedeutet, dass die Besetzung der ersten Agonistenbindungsstelle in einem Rezeptor die Agonistenaffinität der übrigen Bindungsstellen steigert. Je größer n_H , desto steiler fällt die Dosis-Wirkungs-Kurve aus und desto schneller sind alle Agonistenbindungsstellen eines Rezeptorproteins besetzt. (Mutschler et al. 2013; Heinrich et al. 2014, S.120 f.)

Für die Kurven wurden die Veränderungen der FR bei Agonistenapplikation in aufsteigender Konzentration von 1, 3, 10, 30, 100 und 300 μM betrachtet. Vor der Gabe der niedrigsten Dosis von 1 μM erfolgte jedoch regelhaft eine Substanzapplikation von 10 μM , deren Antwort nicht in die Ergebnisauswertung einfließt. In ähnlich konzipierten Arbeiten war gezeigt worden, dass die Antworten auf die erste Substanzapplikation beim Ca^{2+} -Imaging nicht reproduziert werden können (Hausmann et al. 2012). Sie werden daher als eine Art nicht verwertbare „Aufwachreaktion“ (sog. *wake-up*) betrachtet.

3.2.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Wildtyp-Rezeptorvarianten

Zunächst wird die Wirkung des selektiven Agonisten $\alpha\beta$ -meATP auf den homomeren hP2X3-Wildtyp-Rezeptor sowie die hP2X2/hP2X3-Wildtyp-Heteromeren in den Transfektionsverhältnissen 1:2 und 4:1 betrachtet (siehe Abb. 10. Die korrespondierenden Daten zu Abb. 10 finden sich in Tab. 10 unter Ergänzende Daten, 5. Analog dazu die Daten zu Abb. 11, 12, 13, 14, 15, 18 und 19 in Tab. 11 bis 17.)

Abb. 10A zeigt die resultierenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Die Kurve für P2X3-wt hat den niedrigsten E_{max} -Wert und den höchsten Hill-Koeffizienten, ist also am steilsten. Die Kurve für P2X2-wt/P2X3-wt-4:1 hingegen weist mit Abstand den höchsten E_{max} -Wert beim kleinsten

Abb. 10: Betrachtung der drei Wildtyp-Rezeptorvarianten hP2X3wt sowie (hP2X2-wt)/(hP2X3-wt)-1:2 und -4:1

A Dosis-Wirkungs-Kurven mit $\alpha\beta$ -meATP in aufsteigender Konzentration (1 – 300 μM)

B Vergleich der Fluoreszenz-Verhältnisse der drei betrachteten Wildtyp-Rezeptorvarianten bei 100 und 300 μM $\alpha\beta$ -meATP. Statistische Auswertung mit $p < 0,05$. Das Kreuz (+) bedeutet einen signifikanten Unterschied der jeweiligen Säule im Vergleich zur hP2X3-Säule (One-Way-ANOVA). Der Paragraph (§) zeigt jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden verglichenen Säulen an (One-Way-ANOVA).

n_H auf. Auch die Kurve von P2X2-wt/P2X3-wt-1:2 fällt flacher aus als die des homomeren P2X3-wt-Rezeptors.

Der statistische Vergleich der drei Kurven (Abb. 10B) ergibt, dass sich die Antworten auf 100 und 300 μM $\alpha\beta$ -meATP sowohl von P2X2-wt/P2X3-wt-1:2 als auch -4:1 signifikant von denen des homomeren P2X3-wt unterscheiden. Vergleicht man dieselben Antworten von P2X2-wt/P2X3-wt-1:2 und -4:1 jeweils miteinander, stellt man auch hier bei beiden Paaren einen signifikanten Unterschied zueinander fest.

Zu Anfang meiner experimentellen Arbeit habe ich das Protokoll für eine gesamten Dosis-Wirkungskurve mit Applikation von 10, 1, 3, 10, 30, 100 und 300 μM des Agonisten in zwei kurze Protokolle mit 10, 1, 10, 100 μM und 10, 3, 30, 300 μM Substanzkonzentrationen aufgeteilt. Die Anwendung kürzerer Protokolle schien mir zu Beginn günstiger im Hinblick auf das Überleben und Haftenbleiben der Zellen während der Experimente. Mit zunehmender Routine gelangen jedoch auch Experimente mit langen Protokollen einwandfrei. Abbildung 11 zeigt drei Originalregistrare von ROIs aus verkürzten Dosis-Wirkungs-Protokollen.

Die Konfiguration der Antworten auf 100 bzw. 300 μM $\alpha\beta$ -meATP stellt sich abhängig von der jeweiligen Rezeptorzusammensetzung leicht unterschiedlich dar: Während die P2X3wt-Antworten sehr spitz erscheinen, fallen sie bei den P2X2-wt/P2X3-wt-1:2 etwas und bei -4:1 deutlich breiter aus. Obwohl diese Beobachtung nicht statistisch belastbar und das Ca^{2+} -Imaging nicht die Methode der Wahl ist, um Aussagen über das Desensitisierungsverhalten eines Rezeptors zu treffen, stützen die betrachteten Originalaufnahmen dennoch die Annahme, dass P2X2-wt/P2X3-wt im Transfektionsverhältnis 4:1 langsamer desensitisiert und damit dem Verhalten des homomeren P2X2-Rezeptors stärker ähnelt als P2X2-wt/P2X3-wt-1:2.

Abb. 11: Originalaufnahmen von einzelnen ROIs aus verkürzten Dosis-Wirkungs-Protokollen

- A** P2X3wt
- B** P2X2-wt/P2X3-wt-1:2
- C** P2X2-wt/P2X3-wt-4:1

(Unterschiedliche Skalierung der Ordinate.)

3.2.2 Inaktivität der verwendeten Mutanten in homomeren Konstellationen

Hintergrund der Mutageneseexperimente war die Idee, von beiden betrachteten P2X-Subtypen je zwei inaktive bzw. in ihrer Aktivität stark eingeschränkte Mutanten in eine heteromere Konstellation mit dem jeweils anderen Subtyp als normal funktionierenden Wildtyp zu bringen und jeweils für beide Transfektionsverhältnisse zu testen, welche Rolle die inaktive Mutante in Über- oder Minderzahl für die Funktionalität des Rezeptors spielt.

3.2.2.1 P2X2-Mutanten K69A und K307A

Zunächst habe ich für die ausgewählten P2X-Mutanten Dosis-Wirkungs-Experimente in homomeren Rezeptorzusammensetzungen durchgeführt, um ihre teilweise oder vollständige Inaktivität zu überprüfen.

Für die homomeren P2X2-K69A- und P2X2-K307A-Rezeptoren wurde dafür der nicht-selektive Agonist 2-MeSATP verwendet, der, wie in der Einleitung erwähnt, neben P2X- auch die in HEK-Zellen endogen exprimierten P2Y-Rezeptoren aktiviert, was zur Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher führt. Um den P2Y-Effekt aus der Dosis-Wirkungs-Kurve von mutierten P2X2-Homomeren herausrechnen zu können, wurden Experimente mit MOCK-transfizierten Zellen durchgeführt.

Bei der MOCK-Transfektion behandelt man die Zellen analog zur üblichen transienten Transfektionsprozedur vor, versieht sie aber nur mit Polyfect-Transfektionsreagenz und nicht mit P2X-cDNA. Die so vorbereiteten HEK-Zellen exprimieren also keine P2X-Rezeptoren. Ihre Antworten auf die Applikation von 2-MeSATP können daher nur auf die P2Y-Aktivierung zurückzuführen sein. Man subtrahiert die Mittelwerte der MOCK-Experiment-Ergebnisse von denen der homomeren Mutanten-P2X2-Ergebnisse und erhält näherungsweise die Höhe der reinen P2X-Antworten (Abb. 12).

Abb. 12: Dosis-Wirkungskurven für **A** P2X2-K69A und **B** P2X2-K307A, je P2X + P2Y-Antwort, MOCK-Antwort und reine P2X-Antwort als Ergebnis der Subtraktion (P2X+P2Y) - MOCK

Die Dosis-Wirkungs-Kurven, die allein auf die Rezeptoraktivität der homomeren P2X2-K69A und -K307A zurückzuführen sind, zeigen, dass beide P2X2-Mutanten zwar nicht völlig inaktiv, aber dennoch nur sehr eingeschränkt funktionstüchtig sind. $E_{\max}$ von P2X2-K69A ist mit $0,42 \pm 0,01 \Delta\text{FR}$ mehr als doppelt so hoch wie $E_{\max}$ von P2X2-K307A, befindet sich dabei aber immer noch im Bereich einer niedrigen Wirkungsstärke.

3.2.2.2 P2X3-Mutanten K63A und K299A

Die Experimente mit homomeren Mutanten-P2X3-Rezeptoren wurden wieder mit dem selektiven Agonisten $\alpha\beta$ -meATP durchgeführt. Sowohl P2X3-K63A als auch -K299A, die ihre Austauschmutationen in homologen Proteinpositionen zu P2X2-K69A und -K307A tragen, zeigten sich als vollständig inaktiv (Abb. 13).

Abb. 13: Inaktive **A** P2X3-K63A- und **B** P2X3-K299A-Homomere

3.2.3 Mutationen im NBS1

Es folgt zunächst die Betrachtung der beiden homologen Mutanten P2X2-K69A und P2X3-K63A, deren Austauschmutationen sich im NBS1 nahe von TM1 befinden (Bodnar et al. 2011; Hausmann et al. 2012), in heteromeren Zusammensetzungen mit ihren Wildtyp-Partner-Untereinheiten in den beiden Transfektionsverhältnissen 1:2 und 4:1 (siehe Abb. 14).

Zunächst stellt man fest, dass Untersuchungen an Rezeptoren mit Mutation in der der P2X2-Untereinheit in Dosis-Wirkungs-Kurven resultieren, während Rezeptoren mit Mutation in der P2X3-Untereinheit erst auf hohe $\alpha\beta$ -meATP-Konzentrationen schwach reagieren und keine sigmoidal verlaufenden Dosis-Wirkungs-Beziehungen zeigen (siehe Abb. 14A).

Auffällig ist, dass die Kurve für P2X2-K69A/P2X3-wt-4:1 ($E_{\max} = 0,66 \pm 0,02 \Delta\text{FR}$) im Vergleich zur Kurve für das Wildtyp-Heteromer P2X2-wt/P2X3-wt-4:1 ($E_{\max} = 1,87 \pm 0,04 \Delta\text{FR}$) (siehe 3.3.1.) wesentlich niedriger ist und eine viel geringere Agonistenaffinität aufweist. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass ein Überschuss an dysfunktionalen, mutierten P2X2-

Abb. 14: Betrachtung der Rezeptorvarianten (hP2X2-K69A)/(hP2X3-wt) und (hP2X2-wt)/(hP2X3-K63A), jeweils in den Transfektionsverhältnissen 1:2 und 4:1

A Dosis-Wirkungs-Kurven mit $\alpha\beta$ -meATP in aufsteigender Konzentration (1 – 300 μM)

B Vergleich der Fluoreszenz-Verhältnisse der vier Rezeptorvarianten bei 100 und 300 μM $\alpha\beta$ -meATP. Statistische Auswertung mit $p < 0,05$. Der Paragraph (§) bedeutet jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden verglichenen Säulen (One-Way-ANOVA).

Untereinheiten die Funktionalität der $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ -Heteromeren nur einschränken, aber nicht aufheben.

Vergleicht man nun dasselbe Mutanten-Wildtyp-Konstrukt in den zwei verschiedenen Transfektionsverhältnissen miteinander, so stellt man bei jedem Vergleichspaar einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Höhen der Rezeptorantworten auf 100 und 300 μM $\alpha\beta$ -meATP fest (siehe Abb. 14B). Ist eine P2X2-Mutante beteiligt, fällt die Antwort im 1:2-Transfektionsverhältnis signifikant höher aus. Handelt es sich bei P2X3 um die mutierte Untereinheit, ist die Antwort hingegen im 4:1-Transfektionsverhältnis signifikant höher. Letztere Beobachtung hat jedoch keine so große Aussagekraft, da die Antworten der P2X2-wt/P2X3-mut. in beiden Transfektionsverhältnissen selbst bei hohen Agonistenkonzentrationen sehr niedrig sind. Abgesehen davon könnte man den Schluss ziehen, dass bei einer inaktiven P2X3-Untereinheit in einem $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ -Rezeptor die intakte P2X2-Untereinheit in der Überzahl entscheidend zur Rezeptoraktivität beiträgt.

3.2.4 Mutationen im NBS4

Nun betrachten wir analog zur eben erläuterten Versuchsreihe die Experimente mit den beiden anderen homologen Mutanten P2X2-K307A und P2X3-K299A. Ihre Austauschmutationen liegen im NBS4 nahe der TM2 (Abb. 15). (Bodnar et al. 2011; Hausmann et al. 2012)

Abb. 15: Betrachtung der Rezeptorvarianten (hP2X2-K307A)/(hP2X3-wt) und (hP2X2-wt)/(hP2X3-K299A), jeweils in den Transfektionsverhältnissen 1:2 und 4:1

A Dosis-Wirkungs-Kurven mit $\alpha\beta$ -meATP in aufsteigender Konzentration (1 – 300 μ M)

B Vergleich der Fluoreszenz-Verhältnisse der vier Rezeptorvarianten bei 100 und 300 μ M $\alpha\beta$ -meATP. Statistische Auswertung mit $p < 0,05$. Der Paragraph (§) zeigt jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden verglichenen Säulen (One-Way-ANOVA) an. Nicht signifikant (n.s.) sind die Unterschiede zwischen den übrigen Säulenpaaren (One-Way-ANOVA).

Auch in dieser Versuchsreihe zeigen die Heteromeren mit einer mutierten P2X2-Untereinheit sigmoidale Dosis-Wirkungs-Beziehungen in beiden angewandten Transfektionsverhältnissen, während beide Heteromerenkonstellationen mit mutierten P2X3-Untereinheiten bis auf geringe Antworten auf hohe Agonistenkonzentrationen inaktiv bleiben (siehe Abb. 15A).

Die Kurve für P2X2-K307A/P2X3-wt-4:1 ($E_{\max} = 1,67 \pm 0,12 \Delta$ FR) unterscheidet sich weniger von ihrem Wildtyp-Pendant ($E_{\max} = 1,87 \pm 0,04 \Delta$ FR) als die Mutationskonstellation P2X2-K69A/P2X3-wt-4:1 ($E_{\max} = 0,66 \pm 0,02 \Delta$ FR). In diesem Fall scheint der Überschuss an inaktiven P2X2-Untereinheiten die Rezeptorfunktion nicht so deutlich zu beeinträchtigen.

Die Antworten von P2X2-K307A/P2X3-wt-1:2 und -4:1 unterscheiden sich auch statistisch gesehen nicht signifikant voneinander (siehe Abb. 15B). Bei den Antworten von P2X2-wt/P2X3-K299A-1:2 und -4:1 ist ein signifikanter Unterschied festzustellen, der jedoch aufgrund der geringen Agonistenwirkstärke in beiden Konstellationen nicht sehr aussagekräftig ist.

3.3 Versuchskomplex II: Rezeptormodifikation durch Veränderung des pH-Werts

Die Absenkung des pH-Wertes in der extrazellulären Matrix wirkt über allosterische Bindungsstellen für Protonen (H^+) stimulierend, also aktivitätssteigernd, auf die Funktion von homomeren P2X2- und inhibierend auf homomere P2X3-Rezeptoren (siehe Einleitung, 1.5).

In Versuchskomplex II wird das Verhalten von P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 bei wiederholter Agonistenapplikation von 30 μM und gleichzeitig stufenweisem Ansäuern der Extrazellulärflüssigkeit untersucht (siehe Abb. 16). Dabei wird der Grad von Stimulation bzw. Inhibition prozentual angegeben, gemessen an der Höhe der Rezeptorantwort auf die zweite Agonistenapplikation bei einem Normal-pH-Wert von 7,4. Die Antwort auf die erste Agonistenapplikation (bei pH = 7,4) wird analog zu Versuchskomplex I nicht gewertet (*wake-up*) (siehe 3.2). Das Ansäuern erfolgt in zwei Stufen auf pH-Werte von 6,4 und 5,4. Am Ende des pH-Protokolls wird eine letzte Agonistenapplikation bei neutralem pH-Wert von 7,4 durchgeführt um zu kontrollieren, ob sich die Zellen bzw. die Rezeptoraktivität vom modulatorischen Effekt des Ansäuerns erholen (*recovery*). Denn nur dann ist der Grad von Stimulation bzw. Inhibition, die zuvor stattgefunden haben, aussagekräftig und nicht auf eine Zellschädigung oder ähnliches zurückzuführen.

Abb. 16: Originalaufnahme einer ROI aus einem pH-Wert-Protokoll. Substanzapplikationen mit je 30 μM $\alpha\beta$ -meATP (je 7 sec, Schritt 1-5), alternierend mit 10-minütigen Waschphasen (Ringerlösung, pH = 7,4).

- 1) pH = 7,4 (*wake-up*)
- 2) pH = 7,4
- 3) pH = 6,4
- 4) pH = 5,4
- 5) pH = 7,4 (*recovery*)

Zunächst wurden die Versuche mit dem selektiven Agonisten $\alpha\beta$ -meATP an mit hP2X3-wt-, sowie hP2X2-wt/hP2X3-wt-1:2- und -4:1-transfizierten HEK-Zellen durchgeführt. Anschließend verwendete man den nicht-selektiven Agonisten 2-MeSATP, mit dem die Experimente zusätzlich auch an rein hP2X2-wt-transfizierten Zellen durchgeführt werden konnten. Beim Einsatz von 2-MeSATP galt es wiederum, die reinen P2X-Effekte durch Abzug von Ergebnissen aus erneut durchgeführten MOCK-Experimenten (in Absolut-Werten) näherungsweise zu ermitteln.

Da der Fokus bei diesem Versuchskomplex auf dem jeweils zu bestimmenden Grad von Stimulation bzw. Inhibition lag, musste berücksichtigt werden, dass allein schon eine fünfmalige Agonistenapplikation von 30 μM unabhängig von der modulatorischen Wirkung der pH-Wert-Veränderung zu sukzessive sich verringernden Rezeptorantworten führen kann. Diesen Effekt

bezeichnet man als *run-down*. Er ist auf eine Ermüdung der Rezeptoraktivität durch die repetitive Aktivierung zu betrachten, die beispielsweise durch Desensibilisierung zustande kommen kann. Um die Höhe des *run-down*-Effekts abschätzen zu können, wurden Kontrollexperimente sowohl mit $\alpha\beta$ -meATP als auch mit 2-MeSATP an HEK293-Zellen in allen Transfektionskonstellationen durchgeführt. Bei den Kontrollexperimenten wurde fünfmal (bzw. für die Antagonistenexperimente aus Versuchskomplex III sechsmal) hintereinander der jeweilige Agonist in 30 μ M ohne pH-Wertveränderung (bzw. Einsatz von Antagonisten) appliziert (siehe Abb. 17). Die Antworthöhen der dritten bis fünften (bzw. sechsten) Applikation wurden in Relation zur Antwort auf die zweite Applikation gesetzt. Der prozentuale Anteil der Aktivitätsabnahme infolge des *run-down* wurde anschließend zur verbliebenen prozentualen Aktivität der entsprechenden Antwort im analogen pH-Experiment addiert. So konnten die Ergebnisse der pH-Experimente näherungsweise vom *run-down*-Effekt bereinigt werden.

Abb. 17: Originalaufnahme einer ROI aus einem *run-down*-Kontroll-Experiment. Substanzapplikationen mit je 30 μ M $\alpha\beta$ -meATP (je 7 sec, pH=7,4) alternierend mit 10-minütigen Waschphasen (Ringerlösung, pH=7,4)

3.3.1 Applikation von $\alpha\beta$ -meATP

In Abbildung 18 werden die Ergebnisse der pH-Experimente mit $\alpha\beta$ -meATP graphisch dargestellt.

Betrachtet man die Antworthöhen der verschiedenen Rezeptorkonstellationen im Verlauf, so stellt man fest, dass die pH-Wert-Absenkung auf 6,4 und 5,4 auf alle drei einen hemmenden Effekt hat. Bei einem pH-Wert von 6,4 wird P2X2/P2X3-4:1 am stärksten inhibiert (45,9 %). Die Aktivität von P2X2/P2X3-1:2 ist hier im Vergleich am höchsten (77,8 %). Bei pH = 5,4 tritt die stärkste Hemmwirkung bei P2X3 auf (37,5 %). Die Funktion von P2X2/P2X3-1:2 wird auch hier vergleichsweise am wenigsten eingeschränkt (54,6 %).

Der statistische Vergleich der Antworten von P2X2/P2X3-1:2 und P2X2/P2X3-4:1 ergibt bei pH = 6,4 einen signifikanten und bei pH = 5,4 einen nicht-signifikanten Unterschied. Ein diverses Verhalten der Heteromeren aus den beiden Transfektionsverhältnissen 1:2 und 4:1 bei pH-Wert-Erniedrigung scheint also nicht durchgängig gegeben zu sein.

Abb. 18: pH-Experimente mit $\alpha\beta$ -meATP

- A** Änderung der Rezeptoraktivität durch pH-Wert-Modifikation des extrazellulären Mediums bei wiederholter Applikation von 30 μ M $\alpha\beta$ -meATP. Darstellung der Ergebnisse abzüglich *run-down* $\pm$ Standardfehler einschließlich *recovery*-Antwort bei pH=7,4
- B** Statistischer Vergleich der Antworten von P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 bei pH = 6,4 und pH = 5,4 mit One-Way-ANOVA. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ist durch einen Paragraphen gekennzeichnet (§), n.s. steht für einen nicht-signifikanten Unterschied. Ob sich die Antworten jeweils signifikant von der 100%-Marke unterscheiden ($p < 0,05$), wurde mit dem Mann-Whitney-Test untersucht. Besteht ein signifikanter Unterschied, sind die entsprechenden Antwortbalken mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

3.3.2 Applikation von 2-MeSATP

Es folgt die graphische Darstellung der pH-Experimente mit 2-MeSATP (siehe Abb. 19).

Bei dieser Versuchsreihe kann der Effekt der pH-Wert-Absenkung wegen der unselektiven Wirkung von 2-MeSATP auch an hP2X2-transfizierten Zellen betrachtet werden. Bei pH = 6,4 stellt man eine leichte Aktivitätssteigerung von P2X2 auf 115,6 % fest. Bei pH = 5,4 wird die P2X2-Aktivität jedoch auf 64,7 % gesenkt und bewegt sich damit auf einem ähnlichen Niveau wie die von P2X3 (54,7 %). Bei den heteromeren Konstellationen P2X2/P2X3-1:2 und P2X2/P2X3-4:1 hat eine pH-Absenkung auf 6,4 kaum Einfluss auf ihre Aktivität. Bei pH = 5,4 wird die Aktivität von beiden heteromeren Rezeptoren gehemmt, der inhibitorische Effekt ist beim Transfektionsverhältnis 4:1 etwas stärker ausgeprägt (60,8 %) als bei 1:2 (74,4 %). Die P2X3-Aktivität sinkt von 66,6 % bei pH = 6,4 auf 54,7 % bei pH = 5,4. Die Hemmwirkung des Ansäuerns auf P2X3 ist hier also etwas schwächer, aber doch vergleichbar mit der in der $\alpha\beta$ -meATP-Versuchsreihe.

Auch bei 2-MeSATP ist der Unterschied zwischen den P2X2/P2X3-1:2- und -4:1- Antworthöhen bei pH = 6,4 und 5,4 einmal statistisch signifikant und einmal nicht. Eine belastbare Diversität von Rezeptoren aus einem 1:2- und 4:1-Transfektionsverhältnis scheint also auch hier eher unwahrscheinlich zu sein.

Abb. 19: pH-Experimente mit 2-MeSATP

A Änderung der Rezeptoraktivität durch pH-Wert-Modifikation des extrazellulären Mediums bei wiederholter Applikation von 30 μ M 2-MeSATP. Darstellung der Ergebnisse abzüglich *run-down* und MOCK $\pm$ Standardfehler

B Statistischer Vergleich der Antworten von P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 bei pH = 6,4 und pH = 5,4 mit One-Way-ANOVA

§ = signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$

n.s. = nicht-signifikanter Unterschied

* = signifikanter Unterschied von der 100%-Marke ($p < 0,05$) nach dem Mann-Whitney-Test

3.4 Versuchskomplex III: Einsatz des kompetitiven Antagonisten A-317491 mit $\alpha\beta$ -meATP

In Versuchskomplex III kommt der P2X3- und P2X2/P2X3-selektive Antagonist A-317491 zum Einsatz (siehe Einleitung, 1.5). Es erfolgten sechs Agonistenapplikationen in derselben Konzentration von je 30 μ M. Die Antwort auf die erste wurde, wie in den vorangegangenen Protokollen, als nicht-verwertbare „Aufwachreaktion“ (*wake-up*) verworfen. Die Höhe der Antwort auf die zweite Agonistenapplikation wurde als 100 %-Marke verwendet. In den drei folgenden Substanzphasen wurde A-317491 in aufsteigender Konzentration von 0,03, 0,3 und 3 μ M zusätzlich zum Agonisten appliziert, die Antworthöhen werden in Relation zur zweiten Agonistenapplikation gesetzt und prozentual angegeben. Zum Schluss erfolgte zur Kontrolle der Erholung der Zellen bzw. Rezeptoraktivität eine letzte reine Agonistenapplikation (siehe Abb. 20). Für die Antagonistenexperimente wurde, wie für die pH-Experimente, ausschließlich cDNA von humanen Wildtyp-P2X2- und P2X3-Subtypen verwendet.

Das A-317491-Protokoll wurde mit $\alpha\beta$ -meATP an P2X3-, sowie P2X2/P2X3-1:2- und -4:1-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der *run-down*-Kontrollexperimente, die analog zur Beschreibung in Punkt 3.4 durchgeführt wurden, wurden wie bei den den pH-Ex-

Abb. 20: Originalaufnahme einer ROI aus einem A-317491-Protokoll. Substanzapplikationen mit je 30 μM $\alpha\beta$ -meATP (je 7 sec, ohne/mit A-317491, siehe Schritt 1-6), alternierend mit 10-minütigen Waschphasen (Ringerlösung, pH = 7,4)

- 1) – (wake-up)
- 2) –
- 3) 0,03 μM A-317491
- 4) 0,3 μM A-317491
- 5) 3 μM A-317491
- 6) – (recovery)

perimenten mit den Ergebnissen der Antagonistenexperimente verrechnet. Diese werden in der Folge vom *run-down*-Effekt bereinigt dargestellt.

Bei der Wiederholung der Experimente mit 2-MeSATP als Agonisten und zusätzlich an P2X2-transfizierten Zellen entfaltete A-317491 weder an homomeren noch an heteromeren Rezeptoren eine verwertbare Hemmwirkung, was auf die interferierende P2Y-Rezeptoraktivität oder andere, nicht eruierbare Störeinflüsse zurückzuführen sein könnte. Die Ergebnisse der Antagonistenexperimente mit 2-MeSATP kommen hier nicht zur Abbildung, da die Voraussetzung für die Aussagekraft der Versuchsreihe, nämlich die antagonistische Wirkung von A-317491, nicht erfüllt wurde.

In Abbildung 21 werden die Ergebnisse der Antagonisten-Experimente mit $\alpha\beta$ -meATP aufgeführt.

Die Aktivität der drei betrachteten Rezeptorkonstellationen bei 30 μM $\alpha\beta$ -meATP wird durch die Gabe von A-317491 in aufsteigender Konzentration zunehmend stark gehemmt. Den schwächsten inhibitorischen Effekt entfaltet der Antagonist im Vergleich an P2X3-transfizierten Zellen, wo er erst ab einer Konzentration von 0,3 μM zu wirken beginnt. Bei P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 tritt schon bei 0,03 μM eine Hemmung auf 61,5 % bzw. 71,1 % auf. Auch bei A-317491-Konzentrationen von 0,3 und 3 μM wird P2X2/P2X3-1:2 jeweils etwas stärker gehemmt als P2X2/P2X3-4:1. Im statistischen Vergleich fällt der Unterschied zwischen 1:2- und 4:1-Antworten bei A-317491=0,03 μM nicht signifikant und bei 0,3 und 3 μM signifikant aus. Die Tatsache, dass die Restaktivität bei 3 μM mit 5,1 % bei P2X2/P2X3-1:2 und 7,8 % bei P2X2/P2X3-4:1 sehr gering ist, schmälert allerdings die Bedeutung des statistisch signifikanten Unterschieds der Antworthöhen beider Rezeptorkonstellationen bei der höchsten hier eingesetzten Antagonistenkonzentration.

Abb. 21: A-317491-Experimente mit $\alpha\beta\text{-meATP}$

A Einsatz des selektiven Antagonisten A-317491 in aufsteigender Konzentration bei wiederholter Applikation von 30 μM $\alpha\beta\text{-meATP}$. Darstellung der Ergebnisse abzüglich *run-down* $\pm$ Standardfehler

B Statistischer Vergleich der Antworten von P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 bei A-317491 in 0,03, 0,3 und 3 μM mit One-Way-ANOVA ($p < 0,05$).

§ = signifikanter Unterschied

n.s. = nicht-signifikanter Unterschied

* = signifikanter Unterschied von der 100%-Marke nach dem Mann-Whitney-Test

4 Diskussion

4.1 Nullhypothese und Arbeitshypothese

Für heteromere P2X2/3-Rezeptoren wurde bislang eine festgelegte Untereinheitenstöchiometrie von 1:2 angenommen. Meine Nullhypothese H_0 lautet daher: „Die heteromeren P2X2/3-Rezeptoren, die aus den Transfektionsverhältnissen P2X2/P2X3-1:2 oder -4:1 hervorgehen, unterscheiden sich bezüglich ihrer funktionellen Merkmale nicht signifikant voneinander.“ Die Frage nach der funktionellen Diversität von P2X2/3-Rezeptoren mit einer variablen Untereinheitenstöchiometrie findet in meiner Arbeitshypothese H_1 Ausdruck: „Die heteromeren P2X2/3-Rezeptoren unterscheiden sich je nach Transfektionsverhältnis P2X2/P2X3-1:2 oder -4:1 bezüglich ihrer funktionellen Merkmale signifikant voneinander.“

4.2 Transfektionsverhältnis und resultierende Untereinheitenstöchiometrie

Dass sich in meiner Arbeit die Untereinheitenstöchiometrien $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ und $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ als Folge des jeweils gewählten Transfektionsverhältnisses 1:2 und 4:1 in den HEK293-Zellen tatsächlich so ergaben, ließ sich im Rahmen des Ca^{2+} -Imaging nicht nachweisen. Die Bildung beider Stöchiometrien 1:2 und 2:1 in Abhängigkeit vom jeweiligen Transfektionsverhältnis 1:2 und 4:1 wurde daher von der Arbeitsgruppe Hausmann et al. an HEK293-Zellen und Krallenfrosch-(lat. *Xenopus-laevis*-)Oozyten biochemisch untersucht und mittels der elektrophoretischen Verfahren SDS-PAGE und BN-PAGE bestätigt (Kowalski et al. 2015).

Die Wahl des Transfektionsverhältnisses 4:1 für die Erzeugung einer P2X2-Überzahl im heteromeren Rezeptor beruht auf Erkenntnissen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Illes et al. (siehe Abb. 22).

Abb. 22: Theoretische Berechnung der Auftretenshäufigkeit von $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ und $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ bei Transfektionsverhältnissen von P2X2/P2X3-1:10 bis 10:1. Bei 4:1 befindet sich $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ in Relation zu $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ am stärksten in der Überzahl. (Dr. Thomas Riedel, Arbeitsgruppe Prof. Illes)

4.3 Versuchskomplex I: Experimente mit inaktiven hP2X2- und hP2X3-Mutanten

Experimente mit den Wildtyp-Rezeptoren P2X3 sowie P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 ergaben drei verschiedene Dosis-Wirkungs-Kurven. Bei der Betrachtung der beiden heteromeren Konstellationen stellt man fest, dass aus den beiden angewandten Transfektionsverhältnissen Rezeptoren resultieren, deren Konzentrations-Wirkungs-Kurven sich signifikant voneinander unterscheiden. Diese Tatsache spricht zunächst für eine funktionelle Diversität von Rezeptoren der beiden Stöchiometrien und stellt eine gute Basis für die folgenden Untersuchungen von Null- und Arbeitshypothese dar.

Nun werden mutierte, und damit eingeschränkt aktive bzw. inaktive Untereinheiten in die Rezeptorheteromeren eingebracht (siehe Abb. 14, 15). Die Tatsache, dass P2X2-mut/P2X3-wt-1:2

und -4:1 funktionale Rezeptoren mit sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehungen hervorbringen, und dass P2X2-**wt**/P2X3-**mut**-1:2 und -4:1 weitgehend funktionslose Rezeptoren bilden, stützt die Annahme, dass P2X3 die für die Rezeptorfunktionalität entscheidende Untereinheit darstellt. Welche molekularen Mechanismen diese Beobachtung bedingen, bleibt hier unklar.

Dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung vor allem von (P2X2-**mut**)₂/(P2X3-**wt**)₁ überhaupt möglich ist, legt die Vermutung nahe, dass die verwendeten P2X2-Mutanten die Bildung aktivierbarer Agonistenbindungsstellen doch zulassen. Das bestätigen auch meine Experimente an den homomeren P2X2-**mut**-Rezeptoren.

Betrachtet man (P2X2-**mut**)₁/(P2X3-**wt**)₂ und (P2X2-**mut**)₂/(P2X3-**wt**)₁ nun im Hinblick auf ihre unterschiedliche Funktionalität im Vergleich zueinander, so stellt man bei der P2X2-Mutation im NBS1 (**K69A**) einen signifikanten Unterschied zwischen den Antworten von P2X2-**mut**/P2X3-**wt**-1:2 und -4:1 auf hohe Agonistenkonzentrationen fest. Bei der P2X2-Mutation im NBS4 (**K307A**) ist dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Heteromeren-Konstellationen zu konstatieren.

Für die Bewertung dieser Beobachtung muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass die P2X2/P2X3-4:1-Dosis-Wirkungs-Kurve in der Wildtypausführung signifikant steiler und höher ist als die der P2X2-**wt**/P2X3-**wt**-1:2-Variante. Das bedeutet, dass die Unterschiede zwischen den Antworthöhen von P2X2-**mut**/P2X3-**wt**-1:2 und -4:1 auf 100 und 300 μ M $\alpha\beta$ -meATP, die auf die eingeschränkt aktiven mutierten Untereinheiten zurückzuführen sind, eigentlich noch größer ausfallen, als im Vergleich der Absolutwerte ersichtlich wird. Ein Vorliegen von zwei unterschiedlichen Untereinheitenstöchiometrien 1:2 und 2:1, die sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften voneinander abheben, scheint an dieser Stelle plausibel zu sein.

Bei Beteiligung einer P2X3-Mutante am heteromeren P2X2/P2X3-Rezeptor beobachtet man, wie bereits erläutert, eine Inaktivität in beiden mutmaßlichen Stöchiometrien 1:2 und 2:1. Führt man sich die Konstellation (P2X2-**wt**)₂/(P2X3-**mut**)₁ schematisch vor Augen (siehe Abb. 23C, dritte Spalte), so stellt man fest, dass sie zwei heteromere P2X2-P2X3-Bindungsstellen aufweist, von denen eine durch die Mutation auf P2X3 suffizient inaktiviert sein dürfte, die andere jedoch aktiv bleibt. Die dritte Bindungsstelle entsteht zwischen den beiden P2X2-Untereinheiten, die hier keine inaktivierende Mutation tragen. Da in Versuchskomplex I jedoch ausschließlich $\alpha\beta$ -meATP als P2X3- und P2X2/3-selektiver Agonist verwendet wird, kann an der homomeren P2X2-P2X2-Bindungsstelle kein Agonistenmolekül binden, was die Inaktivität des Rezeptor-Gesamtkonstrukts erklärt.

In Zusammenschau mit dem Nachweis der 2:1-Stöchiometrie von funktionalen P2X2/P2X6-Rezeptoren (Hausmann et al. 2012), scheint die Funktionalität von P2X-Heteromeren mit P2X2 in der Überzahl erwiesenermaßen möglich zu sein.

Abb. 23: Schema zu inaktiven Mutanten (Kowalski et al. 2015), in folgenden Konstellationen:

A $(P2X3)_3$,

B $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ und

C $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ (Kowalski et al. 2015)

Das rote Kreuz markiert die Lokalisation der Austauschmutation (NBS1 und NBS4 werden hier nicht unterschieden). Die **Pfeile** deuten auf die aktiven Agonistenbindungsstellen: Gibt es davon hypothetisch zwei in einem Rezeptor, so vermutet man eine aktive Rezeptorkonstellation, die durch einen **Rahmen** gekennzeichnet ist. In meinen Experimenten erwies sich zusätzlich zu den im Schema eingerahmten Heteromeren auch die Konstellation $(P2X2mut)_2/(P2X3wt)_1$ als aktiv (**C, zweite Spalte**). Der Kontakt von zwei $P2X2wt$ -Untereinheiten (**C, dritte Spalte**) scheint keine aktive Agonistenbindungsstelle zu ergeben (siehe Erläuterung im Text).

Berücksichtigt man die Selektivität des hier verwendeten Agonisten $\alpha\beta$ -meATP, so findet man eine Erklärung dafür, dass sich die Rezeptoren beider Stöchiometrien im Hinblick auf ihre funktionellen Eigenschaften unter Umständen (wie z.B. bei $P2X2-K307A/P2X3-wt$) weniger voneinander unterscheiden, als die Arbeitshypothese H_1 postuliert. Denn in beiden Stöchiometrien liegen pro Rezeptor je zwei heteromere $P2X2$ - $P2X3$ -Bindungsstellen vor, deren Besetzung durch Agonistenmoleküle für die Rezeptoraktivierung ausreichen dürfte (siehe Abb. 23B,C – erste Spalte). In $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ gibt es demzufolge noch eine dritte, durch $\alpha\beta$ -meATP besetzbare Bindungsstelle zwischen den beiden $P2X3$ -Untereinheiten, während die dritte Bindungsstelle in $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ zwischen den $P2X2$ -Untereinheiten in den Versuchen mit $\alpha\beta$ -meATP inaktiv bleibt.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Variabilität der Untereinheitenstöchiometrie von $P2X2/3$ wurde in unserer Arbeitsgruppe neben dem Ca^{2+} -Imaging auch die elektrophysiologische Me-

thode „*whole-cell patch-clamp*“ angewendet. Dabei werden über eine Elektrode, die die Membran einer einzelnen HEK293-Zelle ansaugt, Stromstärken gemessen, die durch den Ionenfluss durch Membranionenkanäle entstehen. Patch-Clamp und Ca^{2+} -Imaging sind in ihrer Aussagekraft vergleichbare funktionelle Analyseverfahren, die unterschiedliche Stärken und Schwachstellen aufweisen. So ermöglicht das Ca^{2+} -Imaging Messungen an mehreren Zellen gleichzeitig, die exakt denselben Versuchsbedingungen unterliegen. Die Zellen aus demselben Experiment unterliegen denselben äußeren Einflüssen. So befinden sie sich in derselben Passagiestufe, gehören derselben Transfektions-Charge an und sind denselben äußeren Bedingungen am Versuchstag ausgesetzt, wie zum Beispiel der Zimmertemperatur im Versuchslabor, die etwa jahreszeitbedingt leicht schwanken kann. Somit sind die Messergebnisse exakter miteinander vergleichbar als diejenigen von Einzelzellen in hintereinander durchgeführten Experimenten. Außerdem werden beim Ca^{2+} -Imaging innerhalb einer Versuchsreihe in der Regel Messungen an mehr Zellen durchgeführt als beim Patch-Clamp-Verfahren. Die Patch-Clamp-Methode lässt hingegen genauere Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf von Ionenkanalöffnung und Rezeptordesensibilisierung an einer Einzelzelle zu.

Analog zu meinen Ca^{2+} -Imaging-Versuchen wurden auch Patch-Clamp-Experimente mit inaktiven Mutanten durchgeführt. Deren Ergebnisse stimmen trotz kleiner Unterschiede im Wesentlichen mit denen der Ca^{2+} -Imaging-Experimente überein und unterstreichen damit deren Aussagekraft. Im Unterschied zu den Ca^{2+} -Imaging-Ergebnissen ergaben sich im Patch-Clamp-Verfahren keine signifikant unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurvenverläufe bei den Wildtyp-Rezeptorkonstellationen P2X2-wt/P2X3-wt-1:2 und -4:1. Die einzelnen Kurven wurden beim Ca^{2+} -Imaging aus den Messergebnissen von durchschnittlich 29 Zellen pro Kurve ermittelt, während sie beim Patch-Clamp aus Daten von jeweils acht bis elf Zellen errechnet wurden. (Kowalski et al. 2015)

4.4 Versuchskomplex II: Rezeptormodifikation durch Veränderung des pH-Werts

Wie sich die beiden Untereinheitenstöchiometrien im Falle einer allosterischen Modifikation durch Absenkung des pH-Werts im Vergleich zueinander verhalten, wird in Versuchskomplex II untersucht. Da die Lokalisation der allosterischen Bindungsstellen für Protonen in P2X-Rezeptoren nicht abschließend geklärt ist, kann die Interaktion von Modulator und Agonistenmolekülen in P2X2/3-Rezeptoren mit unterschiedlichen Untereinheitenstöchiometrien nicht in einem Schema wie Abb. 23 veranschaulicht werden.

In der ersten pH-Versuchsreihe mit $\alpha\beta$ -meATP werden die heteromeren Rezeptorkonstellationen P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 durch das Ansäuern in ähnlichem Maße in ihrer Aktivität gehemmt

wie der homomere P2X3-Rezeptor. P2X2/P2X3-4:1 gleicht P2X3 in seinem Inhibitionsverhalten sogar noch mehr als P2X2/P2X3-1:2. Beide Heteromeren unterscheiden sich in ihren Inhibitionsgraden nicht durchgängig signifikant voneinander, von einer Annahme der Arbeitshypothese muss in dieser Versuchsreihe also abgesehen werden. Von Heteromeren mit $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ -Stöchiometrie würde man gemäß der H_1 erwarten, dass sie auf eine Erniedrigung des pH-Werts mit gleichbleibender oder gesteigerter Aktivität reagieren und so funktionell eher dem homomeren P2X2-Rezeptor ähneln. Diese Theorie wird durch meine Experimente nicht bestätigt.

In der zweiten pH-Versuchsreihe mit 2-MeSATP wird zusätzlich der Vergleich mit dem homomeren P2X2-Rezeptor möglich. Tatsächlich erfährt er bei pH = 6,4 eine Aktivitätssteigerung, wenn auch nur eine leichte. Bei pH = 5,4 tritt jedoch eine deutliche Hemmung der Rezeptoraktivität zutage, was die Gültigkeit der Vorraussetzung zur Interpretation der pH-Experiment-Ergebnisse, nämlich den stimulierenden Effekt einer Ansäuerung auf den homomeren P2X2-Rezeptor, in Frage stellt. Bei Betrachtung der *recovery*-Antwort des P2X2-Rezeptors stellt man allerdings auch fest, dass sie bei der letzten Agonistenapplikation bei pH = 7,4 nur 75,3 % der Ausgangsaktivität erreicht, was für eine allgemeine Beeinträchtigung der Rezeptoraktivität bzw. des Zellzustandes im Verlauf der durchgeführten Experimente sprechen könnte und damit die Aussagekraft der Hemmung bei pH=5,4 relativiert.

Auch bei 2-MeSATP als Agonisten unterscheiden sich die Heteromeren-Antworten bei pH-Wert-Erniedrigung nicht durchgängig signifikant voneinander. Die Hypothese, P2X2/P2X3-4:1 würde dem homomeren P2X2-Rezeptor funktionell stärker ähneln als P2X2/P2X3-1:2, kann in diesem Versuchskomplex nicht bestätigt werden.

Aus der Kalkulation zu Transfektionsverhältnissen von P2X2- und P2X3-cDNA und den daraus hervorgehenden Rezeptorvarianten (siehe Diskussion, 4.3, Abb. 22) geht hervor, dass bei P2X2/P2X3-4:1 neben $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ vor allem homomere P2X2-Rezeptoren in den HEK293-Zellen exprimiert werden. Diese Tatsache relativiert die Aussagekraft der Experimente mit P2X2/P2X3-4:1-transfizierten Zellen und dem unselektiven 2-MeSATP, da die Antworten auf die Agonistenapplikation neben den heteromeren Rezeptoren immer auch von homomeren P2X2-Rezeptoren ausgelöst werden.

4.4.1 Vergleich mit den Ergebnissen der Patch-Clamp-Methode

Vergleicht man die Ergebnisse meiner Ca^{2+} -Imaging-Experimente auch hier mit denen des Patch-Clamp-Verfahrens, so fallen die Unterschiede deutlicher aus als beim Versuchskomplex mit den inaktiven Mutanten. Hier wird sowohl die Aktivität von P2X2, P2X2/P2X3-1:2 als auch -4:1 durch eine pH-Wert-Erniedrigung gesteigert, P2X3 hingegen gehemmt. Damit wird die Voraussetzung für die Aussagekraft der pH-Experimente, nämlich konträres Verhalten von homomeren

P2X2- und P2X3-Rezeptoren bei pH-Wert-Modifikation, in den Patch-Clamp-Experimenten erfüllt.

Die Antworthöhen der beiden heteromeren Konstellationen unterscheiden sich nur bei Einsatz von 2-MeSATP signifikant voneinander, was, wie eben erläutert, auch auf die Aktivität von homomeren P2X2-Rezeptoren bei 4:1-transfizierten Zellen zurückzuführen sein kann. Bei Verwendung von $\alpha\beta$ -meATP wird kein signifikanter Unterschied zwischen den Rezeptoren aus den 1:2- und 4:1-Transfektionen festgestellt. (Kowalski et al. 2015)

Beim Ca^{2+} -Imaging wurden mit durchschnittlich 25 untersuchten ROIs pro Transfektionsverhältnis und Versuchsreihe wesentlich mehr Zellen untersucht als beim Patch-Clamp-Verfahren ($n = 6 - 13$) und somit eine größere Vergleichsbasis geschaffen. Bei Verwendung von 2-MeSATP ist die P2Y-Aktivität als mögliche Störvariable trotz Korrekturberechnungen immer mit zu berücksichtigen und kann in beiden Verfahren Einfluss auf die Ergebnisse der Experimente ausüben.

4.4.2 Pathophysiologischer Aspekt von saurem pH in der extrazellulären Matrix

In entzündetem Gewebe herrscht ein saurer pH-Wert vor (Mutschler et al. 2013, S.205). Homomere P2X3- sowie heteromere P2X2/3-Rezeptoren sitzen unter anderem an peripheren nozizeptiven Endigungen von DRG-Neuronen und sind so unter Umständen pH-Wert-Veränderungen infolge von pathologischen Vorgängen ausgesetzt. Das Design der pH-Experimente gibt also auch darüber Aufschluss, ob sich P2X2/3-Rezeptoren unterschiedlicher Untereinheitenstöchiometrien in ihrer Aktivität *in vivo* potenziell unterscheiden. Die erläuterten Ergebnisse der *in vitro* – Untersuchungen deuten allerdings nicht darauf hin, dass eine solche Diversität von klinischer Relevanz sein könnte.

4.5 Versuchskomplex III: Einsatz des kompetitiven Antagonisten A-317491

Der Einsatz des selektiven Antagonisten A-317491 bei beiden mutmaßlichen Stöchiometrien des P2X2/3-Rezeptors soll noch zusätzlich Aufschluss über ein eventuell diverses Verhalten von $(\text{P2X2})_1/(\text{P2X3})_2$ und $(\text{P2X2})_2/(\text{P2X3})_1$ geben, zumal die Möglichkeit einer Antagonisierung auch aus pharmakologischer Perspektive im Hinblick auf die Entwicklung neuer Arzneimittelwirkstoffe sehr interessant ist.

Betrachtet man die Hemmwirkung von A-317491 bei repetitiver Applikation von $30 \mu\text{M}$ $\alpha\beta$ -meATP im Verlauf, so stellt man fest, dass P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 stärker inhibiert werden als P2X3. Nachdem A-317491 seinen kompetitiven Antagonismus selektiv an P2X3- und P2X2/3-Rezeptoren ausübt (siehe Einleitung, 1.5), wäre bei einem P2X2/P2X3-4:1-Transfektionsverhältnis mit einer resultierenden Rezeptorstöchiometrie von $(\text{P2X2})_2/(\text{P2X3})_1$ eine geringere inhibitorische

Wirkung von A-317491 als bei klassisch mit P2X2/P2X3-1:2-transfizierten Zellen zu erwarten. Diese Beobachtung bestätigt sich tatsächlich bei meinen Antagonisten-Experimenten mit $\alpha\beta$ -meATP. Allerdings wird die homomere P2X3-Aktivität bei jeder der drei eingesetzten Antagonistenkonzentrationen weniger stark gehemmt, als die der heteromeren Rezeptorkonstellationen. Auch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den 1:2- und 4:1-Antworthöhen kann nicht durchgängig festgestellt werden.

An dieser Stelle rufe man sich das Modell der homo- und heteromeren Agonistenbindungsstellen von P2X2/P2X3-Rezeptoren ins Gedächtnis (siehe Einleitung, 1.3.5, und Diskussion, 4.3). Beide möglichen Untereinheitenstöchiometrien $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ und $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ weisen je zwei heteromere Bindungsstellen auf, an denen jeweils einmal NBS1 und 2 der P2X2-Untereinheit bzw. NBS3 und 4 der P2X3-Untereinheit und anders herum beteiligt sind. Die beiden Stöchiometrien unterscheiden sich also nur in der homomeren Bindungsstelle, die bei $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ zwischen zwei P2X3-Untereinheiten liegt und bei $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ zwischen zwei P2X2-Untereinheiten. Geht man davon aus, dass in beiden Stöchiometrien beide heteromere Bindungsstellen sowohl für $\alpha\beta$ -meATP als auch für A-317491 zugänglich sind, so reicht deren Aktivierung bzw. kompetitive Antagonisierung für einen hemmenden Effekt auf die Rezeptoraktivität aus. Eine Aussage über die potenzielle Diversität der beiden Untereinheitenstöchiometrien könnte somit durch das angewandte funktionelle Analyseverfahren nicht getroffen werden, da die beiden möglichen homomeren Bindungsstellen zwischen zwei P2X3-Untereinheiten in der $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ -Variante und zwischen zwei P2X2-Untereinheiten in der $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ -Variante für die antagonistische Wirkung von A-317491 nicht unbedingt benötigt werden.

Die Ergebnisse der Patch-Clamp-Messungen mit $\alpha\beta$ -meATP und A-317491 ($n = 6 - 10$) sind trotz kleiner Unterschiede mit denen der Ca^{2+} -Imaging-Experimente (n durchschnittlich gleich 24) vergleichbar. Allerdings wird P2X2/P2X3-4:1 bei A-317491-Konzentrationen von 0,03 und 0,3 μM weniger stark inhibiert als P2X3, die stärkste Hemmungswirkung verzeichnet man bei P2X2/P2X3-1:2.

Zusätzlich konnte im Patch-Clamp-Verfahren eine verwertbare Versuchsreihe mit 2-MeSATP als Agonist durchgeführt werden. Hier zeigte sich, dass A-317491 auf homomer mit P2X2 transfiizierte Zellen tatsächlich kaum einen hemmenden Effekt hatte, womit die Vorraussetzung der Antagonistenselektivität für das Versuchsdesign der A-317491-Experimente als erfüllt betrachtet werden kann. Ansonsten zeigten die Antworthöhen von P2X2/P2X3-1:2 und -4:1 beim Einsatz von 2-MeSATP und A-317491 in den drei verwendeten Konzentrationen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Homomere P2X3-Rezeptoren wurden bei Verwendung von 2-MeSATP stärker inhibiert als die heteromeren Rezeptorkonstellationen beider Transfektionsverhältnisse.

Eine Erklärung könnte auch hier im simultanen Auftreten von A-317491-unsensiblen homomeren P2X2-Rezeptoren liegen, die einen 2-MeSATP-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ermöglichen. (Kowalski et al. 2015)

4.6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Das Ziel meiner Arbeit bestand darin, mithilfe der Methode des Ca^{2+} -Imaging zu untersuchen, ob in P2X2/P2X3-1:2- und -4:1-kotransfizierten HEK293-Zellen heteromere P2X2/3-Rezeptoren exprimiert werden, die hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften voneinander abweichen. Detektierte Unterschiede ließen dann auf zwei verschiedene Untereinheitenstöchiometrien $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ und $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ schließen.

Die im Ca^{2+} -Imaging mit $\alpha\beta$ -meATP erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen signifikant unterschiedliche Verläufe für P2X2-wt/P2X3-wt-1:2- und -4:1.

Bei Verwendung von eingeschränkt aktiven P2X2-Mutanten in den heteromeren Konstellationen beider Transfektionsverhältnisse ergeben sich, berücksichtigt man im Vergleich die unterschiedlich steilen Wildtyp-Dosis-Wirkung-Kurven, ebenfalls signifikante Unterschiede in den Antworthöhen auf hohe Agonistenkonzentrationen.

Aus diesen Beobachtungen kann man den Schluss ziehen, dass bei einem deutlichen Überschuss von P2X2-cDNA im Vergleich zu P2X3-cDNA bevorzugt heteromere P2X2/3-Rezeptoren mit der Stöchiometrie 2:1 exprimiert werden. Biochemische Analysen der Arbeitsgruppe Hausmann et al. mit SDS- und BN-PAGE bestätigen diese Vermutung.

Eine allosterische Modulation mittels pH-Wert-Absenkung kann keine durchgängig signifikanten Unterschiede zwischen den Antworthöhen von $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ und $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ auf $\alpha\beta$ -meATP und 2-MeSATP aufdecken. Die Versuchsreihe mit dem unselektiven Agonisten 2-MeSATP scheint jedoch in ihrer Aussagekraft durch die Interferenz von in HEK293-Zellen endogen exprimierten P2Y-Rezeptoren und von simultan bei der heteromeren 4:1-Transfektion auftretenden homomeren P2X2-Rezeptoren beeinträchtigt zu sein.

Versuche mit dem P2X3- und P2X2/3-selektiven Antagonisten A-317491 und $\alpha\beta$ -meATP ergeben ebenfalls keinen stringenten Hinweis darauf, dass sich $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ und $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ im Hinblick auf ihre pharmakologischen Eigenschaften signifikant voneinander unterscheiden.

In der Zusammenschau lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen meiner experimentellen Arbeit folgern, dass der heteromere P2X2/3-Rezeptor abhängig vom Expressionslevel der beiden beteiligten Subtypen P2X2 und P2X3 in zwei verschiedenen Untereinheitenstöchiometrien 1:2 und 2:1 vorliegt.

Da sich die beiden Rezeptorvarianten bei der funktionellen Analyse ihrer pharmakologischen Eigenschaften nicht deutlich voneinander abgrenzen lassen, scheint sich aus dem hier etablierten $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ -Rezeptor kein vielversprechendes neues Target für die Entwicklung neuer Analgetika zu ergeben.

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die P2X2-Untereinheit in DRG-Neuronen von Menschen und Affen deutlich weniger exprimiert wird als in DRG-Neuronen von Ratten (Serrano et al. 2012). Somit könnten auch heteromere P2X2/3-Rezeptoren an sensorischen Ganglienzellen des Menschen für die Entstehung von Schmerz eine wesentlich geringere Rolle spielen, als es bei Untersuchungen an nativen P2X2/3-Rezeptoren im Nager-Tiermodell bis dato den Anschein hatte.

5 Ergänzende Daten

Tab. 10: Ergebnisparameter zur Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (analog dazu Tab. 11 - 14), siehe Abb. 10.

± Standardfehler (S.E.M.); n = Anzahl der betrachteten Zellen (einzelne Antworten wurden aufgrund von technischen Störungen (z.B. Blasen in der Pipette) nicht in die Mittelwertberechnung miteinbezogen, daher wird n häufig als Intervall angegeben).

Agonist $\alpha\beta$ -meATP	Plasmide - Transfektions- verhältnis	$E_{\max}$ (Δ FR)	EC_{50} (μ M)	n_H	n
	P2X3-wt	0,80 ± 0,04	6,36 ± 1,14	3,04 ± 0,98	45 - 55
	P2X2-wt/P2X3-wt - 1:2	1,31 ± 0,09	7,73 ± 1,75	1,90 ± 0,70	15 - 23
	P2X2-wt/P2X3-wt - 4:1	1,87 ± 0,04	14,09 ± 0,78	1,56 ± 0,11	23 - 29

Tab. 11: P2X2-Mutanten K69A und K307A, siehe Abb. 12

Agonist $\alpha\beta$ -meATP	Plasmide - Transfektions- verhältnis	$E_{\max}$ (Δ FR)	EC_{50} (μ M)	n_H	n
	MOCK-Transfektion	0,30 ± 0,09	1,18 ± 0,12	3,33 ± 1,36	10 - 16
	P2X2- K69A (P2X+P2Y)	0,71 ± 0,01	2,31 ± 0,35	1,13 ± 0,08	11 - 16
	P2X2- K69A (P2X)	0,42 ± 0,01	1,25 ± 0,17	1,94 ± 0,46	
	P2X2- K307A (P2X+P2Y)	0,49 ± 0,01	1,53 ± 0,08	2,60 ± 0,25	16 - 27
	P2X2- K307A (P2X)	0,15 ± 0,01	2,29 ± 0,46	2,99 ± 1,58	

Tab. 12: P2X3-Mutanten K63A und K299A, siehe Abb. 13

Agonist $\alpha\beta$ -meATP	Plasmide - Transfektions- verhältnis	$E_{\max}$ (Δ FR)	EC_{50} (μ M)	n_H	n
	P2X3- K63A	–	–	–	20
	P2X3- K299A	–	–	–	29

Tab. 13: Mutationen im NBS1, siehe Abb. 14

Agonist $\alpha\beta$ -meATP	Plasmide - Transfektions- verhältnis	$E_{\max}$ (Δ FR)	EC_{50} (μ M)	n_H	n
	P2X2- K69A /P2X3-wt – 1:2	1,07 ± 0,03	17,10 ± 1,06	2,86 ± 0,30	24
	P2X2- K69A /P2X3-wt – 4:1	0,66 ± 0,02	39,18 ± 2,79	1,30 ± 0,08	31
	P2X2-wt/P2X3- K63A – 1:2	–	–	–	27
	P2X2-wt/P2X3- K63A – 4:1	–	–	–	18 - 28

Tab. 14: Mutationen im NBS4, siehe Abb. 15

Agonist $\alpha\beta$ -meATP	Plasmide - Transfektions- verhältnis	$E_{\max}$ (Δ FR)	EC_{50} (μ M)	n_H	n
	P2X2- K307A /P2X3-wt – 1:2	$1,37 \pm 0,07$	$31,88 \pm 5,07$	$1,02 \pm 0,10$	22 - 25
	P2X2- K307A /P2X3-wt – 4:1	$1,67 \pm 0,12$	$62,17 \pm 9,90$	$25,39 \pm 4,92$	18 - 24
	P2X2-wt/P2X3- K299A – 1:2	–	–	–	30
	P2X2-wt/P2X3- K299A – 4:1	–	–	–	20

Tab. 15: pH-Experimente mit $\alpha\beta$ -meATP, siehe Abb. 18. Alle Zahlenwerte in Prozent angegeben.

- A** Verhältnis von Δ FR aus Substanzphase 3 - 5 (siehe Abb. 16, analog dazu *run-down*-Kontrolle) zu Δ FR aus Substanzphase 2
- B** n = Anzahl der betrachteten ROIs, Verhältnis in Prozent $\pm$ Standardfehler (S.E.M.)
- C** *run-down*: 100% minus Δ FR-Verhältnis aus dem entsprechenden Protokollschritt des Kontrollexperiments (siehe Abb. 17). Ein negativer Wert in Spalte C bedeutet demnach eine gesteigerte Rezeptoraktivität im Vergleich zum Kontrollexperiment, ein positiver Wert bedeutet eine geminderte Aktivität im Sinne des *run-down* (jeweils bezogen auf den jeweiligen Protokollschritt).
- D** Werte aus Spalte B abzüglich der Werte aus Spalte C

A	B	C	D
	P2X3 n = 15 – 17	<i>run-down</i> n = 15	P2X3 abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	$50,73 \pm 7,24$	-2,04	52,78
4./2.	$37,80 \pm 5,94$	0,27	37,53
5./2.	$106,04 \pm 8,11$	11,53	94,51
	P2X2/P2X3-1:2 n = 28	<i>run-down</i> n = 10	P2X2/P2X3-1:2 abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	$79,43 \pm 6,53$	1,64	77,79
4./2.	$53,37 \pm 6,39$	-1,24	54,61
5./2.	$102,64\% \pm 1,98$	0,82	101,81
	P2X2/P2X3-4:1 n = 31	<i>run-down</i> n = 22	P2X2/P2X3-4:1 abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	$46,98 \pm 5,55$	1,10	45,88
4./2.	$43,92 \pm 6,36$	2,38	41,53
5./2.	$88,98 \pm 5,21$	4,02	84,96

Tab. 16: pH-Experimente mit 2-MeSATP, siehe Abb. 19. Alle Zahlenwerte in Prozent angegeben.

A – D siehe Erläuterung Tab. 15

A	B	C	D
	P2X3 (abzgl. MOCK) n = 27	<i>run-down</i> n = 6	P2X3 (abzgl. MOCK) abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	72,79 ± 4,47	6,16	66,63
4./2.	54,32 ± 7,93	-0,34	54,66
5./2.	116,43 ± 4,31	-1,86	118,29
	P2X2/P2X3-1:2 (abzgl. MOCK) n = 25	<i>run-down</i> n = 9	P2X2/P2X3-1:2 (abzgl. MOCK) abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	96,20 ± 4,57	-0,89	97,09
4./2.	78,59 ± 8,09	4,21	74,38
5./2.	98,00 ± 5,96	5,27	92,72
	P2X2/P2X3-4:1 (abzgl. MOCK) n = 25	<i>run-down</i> n = 5	P2X2/P2X3-4:1 (abzgl. MOCK) abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	96,69 ± 5,86	-0,27	96,96
4./2.	61,95 ± 7,82	1,15	60,80
5./2.	98,14 ± 6,28	4,67	93,47
	P2X2 (abzgl. MOCK) n = 25	<i>run-down</i> n = 10 - 11	P2X2 (abzgl. MOCK) abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	116,89 ± 7,48	1,32	115,57
4./2.	68,08 ± 8,30	3,34	64,74
5./2.	82,38 ± 6,61	7,12	75,26

Tab. 17: A-317491-Experimente mit αβ-meATP, siehe Abb. 21. Alle Zahlenwerte in Prozent angegeben.

A – D siehe Erläuterung Tab. 15

A	B	C	D
	P2X3, n = 18 - 24	<i>run-down</i>, n = 24 - 25	P2X3, abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	96,81 ± 8,81	0,31	96,50
4./2.	76,50 ± 7,23	-0,24	76,74
5./2.	27,45 ± 2,99	1,40	26,06
6./2.	119,01 ± 6,50	1,30	117,71
	P2X2/P2X3-1:2 n = 21	<i>run-down</i> n = 10	P2X2/P2X3-1:2 abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	63,17 ± 4,44	1,64	61,53
4./2.	34,96 ± 3,78	-1,24	36,19
5./2.	5,89 ± 0,86	0,82	5,06
6./2.	85,74 ± 2,49	3,87	81,87
	P2X2/P2X3-4:1 n = 27	<i>run-down</i> n = 22	P2X2/P2X3-4:1 abzüglich <i>run-down</i>
3./2.	72,20 ± 4,35	1,10	71,10
4./2.	51,82 ± 5,55	2,38	49,43
5./2.	11,79 ± 1,94	4,02	7,77
6./2.	96,26 ± 2,83	5,14	91,13

6 Abkürzungsverzeichnis

2-MeSATP	2-Methylthio-ATP	E	
5-HT ₃ -R	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor, Serotoninrezeptor	engl.	englisch
°C	Grad Celsius	E _{max}	maximaler Effekt
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration	EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
±	plus minus	F	
ΔFR	Veränderung der <i>fluorescence ratio</i>	FI	Fluoreszenzintensität
A		FR	Fluoreszenzintensitäts-Verhältnis (<i>fluorescence ratio</i>)
αβ-meATP	αβ-Methylen-ATP	H	
Abb.	Abbildung	h	human
abzgl.	abzüglich	HEK	<i>human embryonic kidney</i>
AFM	<i>atomic force microscopy</i>	HEPES	Hydroxy-Ethyl-Piperazinyl-Ethan- Sulfonsäure
AM	Acetoxymethylester	H ⁺	Proton
ADP	Adenosindiphosphat	I	
ATP	Adenosintriphosphat	IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
B		K	
bzw.	beziehungsweise	KCl	Kaliumchlorid
BN-PAGE	<i>blue native polyacrylamide gel electrophoresis</i>	L	
C		λ	lambda
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen	lat.	lateinisch
CaCl ₂	Calciumchlorid	LGIC	<i>ligand-gated ion channel</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>	M	
c	<i>chicken</i>	μl	Mikroliter
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	μm	Mikrometer
D		μmol/l	Mikromol pro Liter
DNS	Desoxyribonukleinsäure	μM	Mikromolar
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
DAD	<i>drug application device</i>	ml	Milliliter
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>	mmol/l	Millimol pro Liter

ms	Millisekunde	S.E.M.	<i>standard error of the mean</i>
min	Minute	syn.	synonym
m	murin	T	
N		Tab.	Tabelle
n	Anzahl der betrachteten Zellen	TRPV1	transienter Rezeptorpotential-Kationenkanal, Unterfamilie V (vanilloid), Subtyp1
n	Brechungsindex		
n _H	Hill-Koeffizient	TM	Transmembrandomäne
nM	Nanomolar	U	
NaCl	Natriumchlorid	u.a.	unter anderem
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika	UDP	Urindindiphosphat
nACh-R	nikotinischer Acetylcholinrezeptor	UTP	Uridintriphosphat
NBS	<i>nucleotid binding segment</i>	W	
NA	numerische Apertur	wt	Wildtyp
R		X	
ROI	<i>range of interest</i>	x	Krallenfrosch
r	Ratte	Z	
RNS	Ribonukleinsäure	zf	Zebrafisch
S		Zn ²⁺	Zink ²⁺ -Ionen
sec	Sekunde	z.B.	zum Beispiel
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>		

7 Abbildungsverzeichnis mit Quellenangaben

- Abb. 1** Aufbau von Adenosintriphosphat
Quelle: <https://classconnection.s3.amazonaws.com/87/flashcards/678276/png/atp.png>, Stand 02.05.2018
- Abb. 2** Schematische Darstellung von ATP-Freisetzung und Inaktivierung
- Abb. 3** Primärstruktur einer einzelnen P2X-Untereinheit
- Abb. 4** Dreidimensionaler Aufbau von P2X-Rezeptoren
- Abb. 5** Nozizeption unter der Beteiligung von P2X3 und P2X2/3
- Abb. 6** P2X3 und P2X2/3 an peripheren und zentralen Endigungen des DRG-Neurons
- Abb. 7** Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptors
Quelle: <http://jgp.rupress.org/content/jgp/148/3/207/F1.medium.jpg>, Stand 09.05.2018
- Abb. 8** Exzitationsspektrum von Fura-2
Quelle: <https://web.archive.org/web/20100408034118/http://www.bphys.unilinz.ac.at/bioph/res/icg/fura.html>, Stand 14.03.2018
- Abb. 9** Originalregistrat einer mit (hP2X2-wt)/(hP2X3-wt)-1:2 transfizierten HEK293-Zelle bei $\alpha\beta$ -meATP-Gaben in aufsteigender Konzentration
- Abb. 10** Betrachtung der drei Wildtyp-Rezeptorvarianten hP2X3-wt sowie (hP2X2-wt)/(hP2X3-wt)-1:2 und -4:1
- Abb. 11** Originalaufnahmen von einzelnen ROIs aus verkürzten Dosis-Wirkungs-Protokollen
- Abb. 12** Eingeschränkt aktive Mutanten P2X2-K69A und P2X2-K307
- Abb. 13** Inaktive Mutanten P2X3-K63A und P2X3-K299A
- Abb. 14** Rezeptorvarianten (hP2X2-K69A)/(hP2X3-wt) und (hP2X2-wt)/(hP2X3-K63A)
- Abb. 15** Rezeptorvarianten (hP2X2-K307A)/(hP2X3-wt) und (hP2X2-wt)/(hP2X3-K299A)
- Abb. 16** Originalaufnahme einer ROI aus einem pH-Wert-Protokoll
- Abb. 17** Originalaufnahme einer ROI aus einem *run-down*-Kontroll-Experiment
- Abb. 18** pH-Experimente mit $\alpha\beta$ -meATP
- Abb. 19** pH-Experimente mit 2-MeSATP

- Abb. 20** Originalaufnahme einer ROI aus einem A-317491-Protokoll
- Abb. 21** A-317491-Experimente mit $\alpha\beta$ -meATP
- Abb. 22** Auftretenshäufigkeit von $(P2X2)_1/(P2X3)_2$ und $(P2X2)_2/(P2X3)_1$ bei Transfektionsverhältnissen von P2X2/P2X3-1:10 bis 10:1
- Abb. 23** Schema zu inaktiven Mutanten

8 Tabellenverzeichnis mit Quellenangaben

- Tab. 1** Aktuelle Einteilung der Purinozeptoren
Quelle: IUPHAR/BPS - Guide to Pharmacology, <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=3;52;77>, Stand 04.05.2018
- Tab. 2** Pharmakologische Profile von homomeren P2X2- und P2X3-Rezeptoren
- Tab. 3** Kombinationen aus P2X-cDNA und IRES-Vektoren mit entsprechender Fluoreszenzfarbe.
Quelle: http://www.clontech.com/US/Products/Viral_Transduction/Lentiviral_Vector_Systems/IRES_Bicistronic, Stand 09.03.2018
- Tab. 4** Inaktive und eingeschränkt aktive P2X2- und P2X3-Mutanten
- Tab. 5** Rezeptorphänotyp mit Transfektions- und Plasmid-Mengen-Verhältnis
- Tab. 6** Verwendete Exzitations- und Emissionswellenlängen
- Tab. 7** Zusammensetzung der Extrazellulärlösung
- Tab. 8** Fotoeinstellungen
- Tab. 9** Musterprotokoll für Dosis-Wirkungs-Kurven-Experimente
- Tab. 10** Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Wildtyp-Rezeptorvarianten
- Tab. 11** P2X2-Mutanten K69A und K307A
- Tab. 12** P2X3-Mutanten K63A und K299A
- Tab. 13** Mutationen im NBS1
- Tab. 14** Mutationen im NBS4
- Tab. 15** pH-Experimente mit $\alpha\beta$ -meATP
- Tab. 16** pH-Experimente mit 2-MeSATP
- Tab. 17** A-317491-Experimente mit $\alpha\beta$ -meATP

9 Zubehör

Geräte und Labormaterialien	Hersteller
Binokular Semi SV6	Zeiss, Göttingen – D
CCD Digitalkamera IMAGO; Peltier-gekühlt	Till Photonics/FEI München GmbH, München – D
Cellstar Zellkulturschalen 25/75 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen – D
Cellstar Zellkulturschalen Ø= 35 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen – D
DAD12-Superfusions-System	ALA Scientific Instruments, Westbury NY – USA
Deckgläschen, Ø=30 mm, h=0,14 mm	Assistent, Sondheim/Rhön – D
Feinwaage Mettler, PB 1502	Toledo – SUI
Filter am Mikroskop Olympus IX 70 1. DsRed ET Filterset (Bandpass, Cy3) 2. Fura-Sperrfilter Olympus (E435 LP) 3. EGFP-Filter (U-MWIB)	AHF Analysetechnik, Tübingen – D 72005
Immersionsöl	Zeiss, Oberkochen – D
Inkubator Hera cell	Heraeus Kelvitron, Hanau – D
Kontaktthermometer MR 3002	Heidolph Instruments, Schwabach – D
Kühlschrank „comfort“ (-20°C)	Liebherr, Kirchdorf – D
Mikroskop CK40 ohne Ölimmersionsobjektiv (10fach)	Olympus, Hamburg – D
Mikroskop IX 70 mit Ölimmersionsobjektiv (40fach)	Olympus, Hamburg – D
Monochromator Polychrome II	TILL Photonics/ FEI München GmbH, München – D
pH-Meter	inoLab, Weilheim – D
Sterilbank Hera safe	Heraeus Kelvitron, Hanau – D
Vortexgerät Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach – D
Wasseraufbereitung Millipore Milli-Q	Merk, Darmstadt – D

Lösungen und Chemikalien	Hersteller
A-317491	Sigma Aldrich, Steinheim – D
2-Methylthio-ATP	Tocris, Eching – D
α,β-Methylen-ATP	Tocris, Eching – D
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt – D
D-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt – D
DMEM - Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	CC Pro, Oberdorla – D
DMSO - Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, Steinheim – D
FBS – Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin – D
Fura-2-Acetoxymethylester	Sigma Aldrich, Steinheim – D
HEPES Buffer	Sigma Aldrich, Steinheim – D
Kaliumchlorid	Acros Organics, New Jersey – USA
L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt – D
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim – D
Natriumchlorid	Acros Organics, New Jersey – USA
Natriumhydrogenphosphat (Pellets)	AppliChem, Darmstadt – D
Opti-MEM – Reduced Serum Medium	Life Technologies, Darmstadt – D
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden – D

Software	Hersteller
MS Dos 1995	Microsoft, Redmond – USA
MS Excel	Microsoft, Redmond – USA
MS Windows XP	Microsoft, Redmond – USA
MS Windows 2000	Microsoft, Redmond – USA
Origin Version 17G	OriginLab Corporation, Northampton – USA
QuarkXPress 7.3	Quark Inc., Denver – USA
SigmaPlot Version 13	Systat Software, Erkrath – D
Tillvision Version 3.3	Till Photonics/ FEI München GmbH, München – D

10 Literaturverzeichnis

- Abbracchio, Maria P.; Burnstock, Geoffrey; Verkhratsky, Alexei; Zimmermann, Herbert (2009): Purinergic signalling in the nervous system. An overview. In: *Trends in Neurosciences* 32 (1), S. 19–29.
- Abdulqawi, Rayid; Dockry, Rachel; Holt, Kimberley; Layton, Gary; McCarthy, Bruce G.; Ford, Anthony P.; Smith, Jaclyn A. (2015): P2X3 receptor antagonist (AF-219) in refractory chronic cough. A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. In: *The Lancet* 385 (9974), S. 1198–1205.
- Antonio, Ligia S.; Stewart, Andrew P.; Varanda, Wamberto A.; Edwardson, J. Michael (2014): Identification of P2X2/P2X4/P2X6 heterotrimeric receptors using atomic force microscopy (AFM) imaging. In: *FEBS Letters* 588 (12), S. 2125–2128.
- Aschrafi, Armaz; Sadtler, Sven; Niculescu, Cristina; Rettinger, Jürgen; Schmalzing, Günther (2004): Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. In: *Journal of Molecular Biology* 342 (1), S. 333–343.
- Aumüller, Gerhard; Wurzing, Laurenz J. (2010): *Anatomie – Duale Reihe*. 208 Tabellen. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Barclay, Jane; Patel, Sadhana; Dorn, Gabriele; Wotherspoon, Glen; Moffatt, Sarah; Eunson, Louise et al. (2002): Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. In: *The Journal of Neuroscience* 22 (18), S. 8139–8147.
- Barrera, Nelson P.; Henderson, Robert M.; Murrell-Lagnado, Ruth D.; Edwardson, J. Michael (2007): The stoichiometry of P2X2/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. In: *Biophysical Journal* 93 (2), S. 505–512.
- Barrera, Nelson P.; Ormond, Susan J.; Henderson, Robert M.; Murrell-Lagnado, Ruth D.; Edwardson, J. Michael (2005): Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (11), S. 10759–10765.
- Bleehen, T.; Hobbiger, F.; Keele, C. A. (1976): Identification of algogenic substances in human erythrocytes. In: *The Journal of Physiology* 262 (1), S. 131–149.
- Bodnar, Mandy; Wang, Haihong; Riedel, Thomas; Hintze, Stefan; Kato, Erzsebet; Fallah, Ghada et al. (2011): Amino acid residues constituting the agonist binding site of the human P2X3 receptor. In: *The Journal of Biological Chemistry* 286 (4), S. 2739–2749.
- Brake, A. J.; Wagenbach, M. J.; Julius, D. (1994): New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. In: *Nature* 371 (6497), S. 519–523.

- Brändle, U.; Spielmanns, P.; Osteroth, R.; Sim, J.; Surprenant, A.; Buell, G. et al. (1997): Desensitization of the P2X₂ receptor controlled by alternative splicing. In: *FEBS Letters* 404 (2-3), S. 294–298.
- Burnstock, G. (1972): Purinergic nerves. In: *Pharmacological Reviews* 24 (3), S. 509–581.
- Burnstock, Geoffrey (2004): Cotransmission. In: *Current Opinion in Pharmacology* 4 (1), S. 47–52.
- Burnstock, Geoffrey (2006): Historical review. ATP as a neurotransmitter. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 27 (3), S. 166–176.
- Burnstock, Geoffrey (2013): Purinergic mechanisms and pain – an update. In: *European Journal of Pharmacology* 716 (1-3), S. 24–40.
- Burnstock, Geoffrey (2014): Purinergic signalling. From discovery to current developments. In: *Experimental Physiology* 99 (1), S. 16–34.
- Burnstock, Geoffrey (2018): The therapeutic potential of purinergic signalling. In: *Biochemical Pharmacology* 151, S. 157–165.
- Burnstock, Geoffrey; Wood, John N. (1996): Purinergic receptors. Their role in nociception and primary afferent neurotransmission. In: *Current Opinion in Neurobiology* 6 (4), S. 526–532.
- Chataigneau, Thierry; Lemoine, Damien; Grutter, Thomas (2013): Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, S. 273.
- Chen, C. C.; Akopian, A. N.; Sivilotti, L.; Colquhoun, D.; Burnstock, G.; Wood, J. N. (1995): A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. In: *Nature* 377 (6548), S. 428–431.
- Clyne, J. Dylan; LaPointe, Lisa D.; Hume, Richard I. (2002): The role of histidine residues in modulation of the rat P2X₂ purinoceptor by zinc and pH. In: *The Journal of Physiology* 539 (2), S. 347–359.
- Cockayne, Debra A.; Dunn, Philip M.; Zhong, Yu; Rong, Weifang; Hamilton, Sara G.; Knight, Gillian E. et al. (2005): P2X₂ knockout mice and P2X₂/P2X₃ double knockout mice reveal a role for the P2X₂ receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. In: *The Journal of Physiology* 567 (Pt 2), S. 621–639.
- Coddou, Claudio; Yan, Zonghe; Obsil, Tomas; Huidobro-Toro, J. Pablo; Stojilkovic, Stanko S. (2011): Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. In: *Pharmacological Reviews* 63 (3), S. 641–683.
- Cook, S. P.; Vulchanova, L.; Hargreaves, K. M.; Elde, R.; McCleskey, E. W. (1997): Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. In: *Nature* 387 (6632), S. 505–508.

- D'Alonzo, Gilbert E. (1996): Theophylline Revisited. In: *allergy asthma proc* 17 (6), S. 335–339.
- Danz, Rainer: Numerische Apertur, Immersion und förderliche Vergrößerung. In: *Innovation*. 15, Carl-Zeiss AG, 2005, S.12 – 16.
- Donnelly-Roberts, Diana; McGaraughty, Steve; Shieh, Char-Chang; Honore, Prisca; Jarvis, Michael F. (2008): Painful purinergic receptors. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 324 (2), S. 409–415.
- Dorn, Gabriele; Patel, Sadhana; Wotherspoon, Glen; Hemmings-Mieszczak, Maja; Barclay, Jane; Natt, Francois J. C. et al. (2004): siRNA relieves chronic neuropathic pain. In: *Nucleic Acids Research* 32 (5), e49.
- Dunn, Philip M.; Zhong, Yu; Burnstock, Geoffrey (2001): P2X receptors in peripheral neurons. In: *Progress in Neurobiology* 65 (2), S. 107–134.
- 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). In: *Molecular Pharmacology* 48 (2), S. 178–183.
- Fischer, Wolfgang; Wirkner, Kerstin; Weber, Marco; Eberts, Christoph; Köles, Laszlo; Reinhardt, Robert et al. (2003): Characterization of P2X3, P2Y1 and P2Y4 receptors in cultured HEK293-hP2X3 cells and their inhibition by ethanol and trichloroethanol. In: *Journal of Neurochemistry* 85 (3), S. 779–790.
- Fredholm, B. B.; Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Daly, J. W.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. et al. (1994): Nomenclature and classification of purinoceptors. In: *Pharmacological Reviews* 46 (2), S. 143–156.
- Gerevich, Zoltan; Zadori, Zoltan S.; Köles, Laszlo; Kopp, Laurenz; Milius, Doreen; Wirkner, Kerstin et al. (2007): Dual effect of acid pH on purinergic P2X3 receptors depends on the histidine 206 residue. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282 (47), S. 33949–33957.
- Gever, Joel R.; Cockayne, Debra A.; Dillon, Michael P.; Burnstock, Geoffrey; Ford, Anthony P. D. W. (2006): Pharmacology of P2X channels. In: *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 452 (5), S. 513–537.
- 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. In: *The Journal of General Virology* 36 (1), S. 59–74.
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *The Journal of Biological Chemistry* 260 (6), S. 3440–3450.
- Gu, J. G.; MacDermott, A. B. (1997): Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. In: *Nature* 389 (6652), S. 749–753.

- Hattori, Motoyuki; Gouaux, Eric (2012): Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. In: *Nature* 485 (7397), S. 207–212.
- Hausmann, Ralf; Bodnar, Mandy; Woltersdorf, Ronja; Wang, Haihong; Fuchs, Martin; Messemer, Nanette et al. (2012): ATP binding site mutagenesis reveals different subunit stoichiometry of functional P2X_{2/3} and P2X_{2/6} receptors. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (17), S. 13930–13943.
- Hausmann, Ralf; Günther, Janka; Kless, Achim; Kuhlmann, Daniel; Kassack, Matthias U.; Bahrenberg, Gregor et al. (2013): Salt bridge switching from Arg290/Glu167 to Arg290/ATP promotes the closed-to-open transition of the P2X₂ receptor. In: *Molecular Pharmacology* 83 (1), S. 73–84.
- Hausmann, Ralf; Kless, Achim; Schmalzing, Gunther (2015): Key sites for P2X receptor function and multimerization. Overview of mutagenesis studies on a structural basis. In: *Current Medicinal Chemistry* 22 (7), S. 799–818.
- Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Löffler, Georg (Hg.) (2014): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer.
- Hemmings-Mieszczak, M. (2003): Independent combinatorial effect of antisense oligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinant Rat P2X₃ receptor. In: *Nucleic Acids Research* 31 (8), S. 2117–2126.
- Jacobson, Kenneth A.; Jarvis, Michael F.; Williams, Michael (2002): Purine and Pyrimidine (P2) Receptors as Drug Targets. In: *J. Med. Chem.* 45 (19), S. 4057–4093.
- Jarvis, Michael F.; Burgard, Edward C.; McGaraughty, Steve; Honore, Prisca; Lynch, Kevin; Brennan, Timothy J. et al. (2002): A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (26), S. 17179–17184.
- Jiang, Lin-Hua; Kim, Miran; Spelta, Valeria; Bo, Xuenong; Surprenant, Annmarie; North, R. Alan (2003): Subunit Arrangement in P2X Receptors. In: *J. Neurosci.* 23 (26), S. 8903–8910.
- Kaczmarek-Hájek, Karina; Lörinczi, Eva; Hausmann, Ralf; Nicke, Annette (2012): Molecular and functional properties of P2X receptors – recent progress and persisting challenges. In: *Purinergic signalling* 8 (3), S. 375–417.
- Kawate, Toshimitsu; Michel, Jennifer Carlisle; Birdsong, William T.; Gouaux, Eric (2009): Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state. In: *Nature* 460 (7255), S. 592–598.
- Khakh, Baljit S.; North, R. Alan (2012): Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. In: *Neuron* 76 (1), S. 51–69.

- Kinnamon, Sue C.; Finger, Thomas E. (2013): A taste for ATP. Neurotransmission in taste buds. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, S. 264.
- Kowalski, M.; Hausmann, R.; Dopychai, A.; Grohmann, M.; Franke, H.; Nieber, K. et al. (2014): Conformational flexibility of the agonist binding jaw of the human P2X₃ receptor is a prerequisite for channel opening. In: *British Journal of Pharmacology* 171 (22), S. 5093–5112.
- Kowalski, Maria; Hausmann, Ralf; Schmid, Julia; Dopychai, Anke; Stephan, Gabriele; Tang, Yong et al. (2015): Flexible subunit stoichiometry of functional human P2X_{2/3} heteromeric receptors. In: *Neuropharmacology* 99, S. 115–130.
- Lalo, Ulyana; Pankratov, Yuri; Wichert, Sven P.; Rossner, Moritz J.; North, R. Alan; Kirchhoff, Frank; Verkhratsky, Alexei (2008): P2X₁ and P2X₅ subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. In: *The Journal of Neuroscience* 28 (21), S. 5473–5480.
- Lau, Oliver C. F.; Samarawickrama, Chameen; Skalicky, Simon E. (2014): P2Y₂ receptor agonists for the treatment of dry eye disease. A review. In: *Clinical Ophthalmology* (Auckland, N.Z.) 8, S. 327–334.
- Lazarowski, Eduardo R. (2012): Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. In: *Purinergic signalling* 8 (3), S. 359–373.
- Lemoine, Damien; Jiang, Ruotian; Taly, Antoine; Chataigneau, Thierry; Specht, Alexandre; Grutter, Thomas (2012): Ligand-gated ion channels. New insights into neurological disorders and ligand recognition. In: *Chemical Reviews* 112 (12), S. 6285–6318.
- Lewis, C.; Neidhart, S.; Holy, C.; North, R. A.; Buell, G.; Surprenant, A. (1995): Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. In: *Nature* 377 (6548), S. 432–435.
- Lynch, K. J.; Touma, E.; Niforatos, W.; Kage, K. L.; Burgard, E. C.; van Biesen, T. et al. (1999): Molecular and functional characterization of human P2X₍₂₎ receptors. In: *Molecular Pharmacology* 56 (6), S. 1171–1181.
- Mager, Peter; Weber, Anje; Illes, Peter (2004): Bridging the Gap Between Structural Bioinformatics and Receptor Research. The Membrane-embedded, Ligand-gated, P2X Glycoprotein Receptor. In: *CTMC* 4 (16), S. 1657–1705.
- Majumder, Paromita; Trujillo, Cleber A.; Lopes, Camila G.; Resende, Rodrigo R.; Gomes, Katia N.; Yuahasi, Katia K. et al. (2007): New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. In: *Purinergic signalling* 3 (4), S. 317–331.
- Mutschler, Ernst; Geisslinger, Gerd; Kroemer, Heyo Klaus; Menzel, Sabine; Ruth, Peter (2013): Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage. Stuttgart: WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

- Nörenberg, Wolfgang; Illes, Peter (2000): Neuronal P2X receptors. Localisation and functional properties. In: Naunyn-Schmied Arch Pharmacol 362 (4-5), S. 324–339.
- North, R. Alan (2002): Molecular physiology of P2X receptors. In: Physiological Reviews 82 (4), S. 1013–1067.
- Oliveira, Maria Cláudia G.; Pelegrini-da-Silva, Adriana; Tambeli, Cláudia Herrera; Parada, Carlos Amílcar (2009): Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X_{3,2/3} receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. In: Pain 141 (1-2), S. 127–134.
- Pankratov, Yu. V.; Lalo, U. V.; Dashkin, A. N.; Krishtal, O. A. (2001). In: Neurochemical Research 26 (8/9), S. 993–1000.
- Patel, Anish; Hirst, Robert A.; Harrison, Charlotte; Hirota, Kazuyoshi; Lambert, David G. (2013): Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in whole cell suspensions using Fura-2. In: Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) 937, S. 37–47.
- Petruska, J.C; Napaporn, J.; Johnson, R.D; Cooper, B.Y (2002): Chemical responsiveness and histochemical phenotype of electrophysiologically classified cells of the adult rat dorsal root ganglion. In: Neuroscience 115 (1), S. 15–30.
- Pijacka, Wioletta; Moraes, Davi J. A.; Ratcliffe, Laura E. K.; Nightingale, Angus K.; Hart, Emma C.; da Silva, Melina P. et al. (2016): Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. In: Nature Medicine 22 (10), S. 1151–1159.
- Price, Matthew J. (2017): Cangrelor. Pharmacology, Clinical Data, and Role in Percutaneous Coronary Intervention. In: Interventional Cardiology Clinics 6 (1), S. 39–47.
- Radford, Kathryn M.; Virginio, Caterina; Surprenant, Annmarie; North, R. Alan; Kawashima, Eric (1997): Baculovirus Expression Provides Direct Evidence for Heteromeric Assembly of P2X₂ and P2X₃ Receptors. In: J. Neurosci. 17 (17), S. 6529–6533.
- Ralevic, V.; Burnstock, G. (1998): Receptors for purines and pyrimidines. In: Pharmacological Reviews 50 (3), S. 413–492.
- Rassow, Joachim (2008): Biochemie – Duale Reihe. 50 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Roberts, Jonathan A.; Allsopp, Rebecca C.; El Ajouz, Sam; Vial, Catherine; Schmid, Ralf; Young, Mark T.; Evans, Richard J. (2012): Agonist binding evokes extensive conformational changes in the extracellular domain of the ATP-gated human P2X₁ receptor ion channel. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109 (12), S. 4663–4667.
- Rollini, Fabiana; Franchi, Francesco; Angiolillo, Dominick J. (2017): Drug-Drug Interactions When Switching Between Intravenous and Oral P2Y₁₂ Receptor Inhibitors. How Real Is It? In: JACC. Cardiovascular Interventions 10 (2), S. 130–132.

- Samways, Damien S. K.; Li, Zhiyuan; Egan, Terrance M. (2014): Principles and properties of ion flow in P2X receptors. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, S. 6.
- Sanderson, Michael J.; Smith, Ian; Parker, Ian; Bootman, Martin D. (2014): Fluorescence microscopy. In: *Cold Spring Harbor Protocols* 2014 (10), pdb.top071795.
- Saul, Anika; Hausmann, Ralf; Kless, Achim; Nicke, Annette (2013): Heteromeric assembly of P2X subunits. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, S. 250.
- Schwindt, Telma T.; Trujillo, Cleber A.; Negraes, Priscilla D.; Lameu, Claudiana; Ulrich, Henning (2011): Directed differentiation of neural progenitors into neurons is accompanied by altered expression of P2X purinergic receptors. In: *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 44 (3), S. 141–146.
- Serrano, Alexandre; Mo, Gary; Grant, Rebecca; Paré, Michel; O'Donnell, Dajan; Yu, Xiao Hong et al. (2012): Differential expression and pharmacology of native P2X receptors in rat and primate sensory neurons. In: *The Journal of Neuroscience* 32 (34), S. 11890–11896.
- Snider, William D.; McMahon, Stephen B. (1998): Tackling Pain at the Source. New Ideas about Nociceptors. In: *Neuron* 20 (4), S. 629–632.
- Speckmann, Erwin-Josef; Hescheler, Jürgen; Köhling, Rüdiger; Alzheimer, Christian (Hg.) (2009): *Physiologie*. 5. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.
- Sperlágh, Beáta; Heinrich, Attila; Csölle, Cecilia (2007): P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. In: *Purinergic Signalling* 3 (4), S. 269–284.
- Stelmashenko, Olga; Lalo, Ulyana; Yang, Yue; Bragg, Laricia; North, R. Alan; Compan, Vincent (2012): Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules. In: *Molecular Pharmacology* 82 (4), S. 760–766.
- Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. (2015): HEK293 in cell biology and cancer research. Phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. In: *Gene* 569 (2), S. 182–190.
- Stone, Laura S.; Vulchanova, Lucy (2003): The pain of antisense. In vivo application of antisense oligonucleotides for functional genomics in pain and analgesia. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (8), S. 1081–1112.
- Stoop, R.; Surprenant, A.; North, R. A. (1997): Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. In: *Journal of Neurophysiology* 78 (4), S. 1837–1840.
- Szentmiklosi, A. József; Galajda, Zoltán; Cseppento, Ágnes; Gesztelyi, Rudolf; Susán, Zsolt; Hegyi, Bence; Nánási, Péter P. (2015): The Janus face of adenosine. Antiarrhythmic and Proarrhythmic Actions. In: *Current Pharmaceutical Design* 21 (8), S. 965–976.

- Thomas, Philip; Smart, Trevor G. (2005): HEK293 cell line. A vehicle for the expression of recombinant proteins. In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51 (3), S. 187–200.
- Thomas, Sarah; Virginio, Caterina; North, R. Alan; Surprenant, Annmarie (1998): The antagonist trinitrophenyl-ATP reveals co-existence of distinct P2X receptor channels in rat nodose neurones. In: *The Journal of Physiology* 509 (2), S. 411–417.
- Torres, Gonzalo E.; Egan, Terrance M.; Voigt, Mark M. (1999): Hetero-oligomeric Assembly of P2X Receptor Subunits. In: *J. Biol. Chem.* 274 (10), S. 6653–6659.
- Tsien, R. (1989): Fluorescent Probes Of Cell Signaling. In: *Annual Review of Neuroscience* 12 (1), S. 227–253.
- Wilkinson, William J.; Jiang, Lin-Hua; Surprenant, Annmarie; North, R. Alan (2006): Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. In: *Molecular Pharmacology* 70 (4), S. 1159–1163.
- Wirkner, Kerstin; Sperlagh, Beata; Illes, Peter (2007): P2X3 receptor involvement in pain states. In: *Molecular Neurobiology* 36 (2), S. 165–183.
- Xu, Jun; Chu, Katharine L.; Brederson, Jill-Desiree; Jarvis, Michael F.; McGaraughty, Steve (2012): Spontaneous firing and evoked responses of spinal nociceptive neurons are attenuated by blockade of P2X3 and P2X2/3 receptors in inflamed rats. In: *Journal of Neuroscience Research* 90 (8), S. 1597–1606.
- Zemkova, Hana; He, Mu-Lan; Koshimizu, Taka-aki; Stojilkovic, Stanko S. (2004): Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors. In: *The Journal of Neuroscience* 24 (31), S. 6968–6978.

Internetquellen

- <https://www.fluorescencemicroscopes.com/olympus-ix70-inverted-fluorescence-microscope/>
Stand 20.03.2018
- https://digital.bsd.uchicago.edu/equipment_files/Olympus%20IX70%20Fluorescence%20and%20TIRF%20Microscope%20Operations%20Manual%20v2.pdf, Stand 16.03.2018
- <https://www.sigmaldrich.com/catalog/product/SIAL/F0888?lang=de®ion=DE>, Stand 14.03.2018

II Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Leipzig, 23. Juli 2018

Julia Schmid

III Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Nachname Julia Anna Maria Schmid
Geboren am 22.März 1990 in Regensburg

Promotion

08/2013 bis 08/2014 Labortätigkeit in der Arbeitsgruppe Prof. Illes am
Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Leipzig zum Thema „Die Untereinheitenstöchio-
metrie des humanen P2X_{2/3}-Rezeptors“

03/2015 Publikation der Ergebnisse in der Zeitschrift *Neuropharmacology*

03/2018 bis 07/2018 Promotionssemester zum Niederschreiben der Dissertation

Studium der Humanmedizin

10/2010 bis 09/2012 vorklinischer Studienabschnitt an der TU/LMU München

10/2012 bis 10/2017 klinischer Studienabschnitt an der Universität Leipzig

Praktisches Jahr **Innere Medizin** im Diakonissenkrankenhaus Leipzig,
Schwerpunkte Pulmologie und Hämatoonkologie

 Chirurgie am Centre Hospitalier de Nîmes, Frankreich,
Schwerpunkte Gefäß-, Thorax- und Neurochirurgie

 Neurologie am Universitätsklinikum Leipzig, neurologische
Normalstation, Intensivstation und Notaufnahme

12/2017 erfolgreicher Studienabschluss mit dem Dritten Staatsexamen M3

Freiwilliges Soziales Jahr

09/2009 bis 08/2010 entwicklungspolitischer Freiwilligendienst im Rahmen des BMZ-
Programms *weltwärts* in Elat Minkom, Kamerun

Schulausbildung

09/1996 bis 07/2000 Grundschule an der Danziger Straße, Eching bei München

09/2000 bis 07/2009 Domgymnasium, Freising

IV Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Illes für die zuverlässige Betreuung meiner Dissertation und den konstruktiven Austausch bedanken, in dem wir während des gesamten Promotionsprojektes standen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Patrizia Rubini Illes für die sorgfältige Einarbeitung in die Methodik von Zellkultur, Transfektion und Ca^{2+} -Imaging sowie in die Datenauswertung, die sie mir zuteilwerden ließ. Außerdem unterstützte sie mich mit ihrer steten Diskussionsbereitschaft in meiner experimentellen Arbeit sehr.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeiter_innen des Rudolf-Boehm-Institutes, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Michael Schaefer für die Anmerkungen zu meiner Dissertation, und bei meinen Kolleg_innen aus der Arbeitsgruppe Prof. Illes, Dr. Maria Kowalski, Christopher Zens, Dr. Haiyan Yin und Tahir Muhammad Khan für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit.

Meinen Eltern Ingeborg und Dr. Helmuth Schmid danke ich von ganzem Herzen für ihre wertvolle Unterstützung, vor allem während der Zeit meines Studiums, und für ihr Vertrauen.

Zudem bedanke ich mich bei meinem Bruder Florian Heckel und meinem Vater für ihren professionellen Beitrag zum Erstellen und Umsetzen des Layoutkonzepts für die vorliegende Arbeit.

Ich widme diese Dissertation meinem Patenonkel Luigi Loverde und meinen Großeltern Maria Magdalena und Albin Schiessel, in liebevoller Erinnerung.