

Charakterisierung allosterischer Bindungsstellen von P2X4-Rezeptor-Modulatoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stephanie Weinhausen

aus

Bergisch Gladbach

Bonn 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Christa E. Müller
2. Gutachter: PD Dr. Anke Schiedel

Tag der Promotion: 03.03.2017

Erscheinungsjahr: 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2012 bis November 2016 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Purinerge Rezeptoren	1
1.2	Die P2X-Rezeptoren	2
1.3	Agonisten an P2X-Rezeptoren	10
1.4	Antagonisten an P2X-Rezeptoren	11
1.5	Allosterische Modulation	13
1.6	Allosterische Modulatoren des P2X4-Rezeptors	15
1.7	P2X-Rezeptoren als Drug-Targets	20
1.8	P2X4-Rezeptoren als Zielstruktur für Wirkstoffe gegen neuropathische Schmerzen	20
1.9	Scherstress und P2X4-Polymorphismen	23
2	Zielsetzung	25
3	Strategie	26
4	Allgemeine Methoden	29
4.1	Bildung von Rezeptorchimären	29
4.2	Zielgerichtete Mutagenese	31
4.3	Stabile Transfektion	33
4.4	Lentivirales Transfektionssystem	33
4.4.1	Aufbau des HIV-1-Genoms	33
4.4.2	Lenti- X^{TM} : Lentivirales Verpackungssystem	33
4.4.3	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	36
4.5	Pharmakologische Charakterisierung	37
4.5.1	Calcium-Assay	37
5	Bildung von Rezeptorchimären zwischen dem humanen P2X4- und dem P2X2-Rezeptor	38
5.1	Pharmakologische Charakterisierung der P2X4(P2X2)-Rezeptorchimären	40
5.1.1	Zusammenfassung und Diskussion	42
5.2	Einzelmutationen im Sequenzbereich v1, v2-v5 und v10	43
5.3	Umklonierung des humanen P2X4-Gens in den pUC19-Vektor	44
5.3.1	Zielgerichtete Mutagenese	45
5.4	Umklonierung in den pLVX-IRES-mCherry-Vektor	46
5.5	Pharmakologische Charakterisierung von Rezeptoren mit Einzelmutation	48
5.5.1	Charakterisierung von P2X4-Rezeptoren mit Einzelmutation im Bereich v2-v5	51
5.5.2	Zusammenfassung und Diskussion	54
6	Identifizierung von Bindungsstellen neuer allosterischer P2X4-Rezeptor-Antagonisten	56
6.1	Allosterische Antagonisten: Strukturklasse I (SKI)	56
6.1.1	Testergebnisse von SKI.1 an chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren	58

6.1.2	Testung von SKI.1-Analoga an chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren	60
6.1.3	Zusammenfassung und Diskussion	63
6.1.4	Allosterische Modulation von P2X4-Rezeptormutanten durch SKI.1	64
6.2	Allosterische Antagonisten: Strukturklasse II	66
6.2.1	Testung von SKII.1 am chimären (P2X4)P2X2-Rezeptor c2-c5	67
6.2.2	Testergebnisse weiterer Verbindungen der Strukturklasse II .	69
6.2.3	Testergebnisse von SKII.2 an chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren	70
6.2.4	Testung von SKII.1 an P2X4-Rezeptoren mit Alaninmutation im Bereich v2-v5	72
6.2.5	Zusammenfassung und Diskussion	74
6.3	Allosterische Antagonisten: Strukturklasse III	75
6.3.1	Allosterische Modulation von P2X4(P2X2)-Rezeptoren durch SKIII.1	76
6.4	Zusammenfassung und Diskussion	78
6.4.1	Allosterische Modulation von P2X4-Rezeptormutanten durch SKIII.1	79
7	Ivermectin	81
7.1	Einleitung	81
7.2	Ergebnisse: Effekte von Ivermectin an verschiedenen P2X-Rezeptor-Subtypen	82
7.2.1	Radioligand-Bindungsstudien von Ivermectin am hP2X4-Rezeptor	84
7.3	Allosterische Modulation chimärer P2X4(P2X2)-Rezeptoren durch Ivermectin	86
7.3.1	Positive allosterische Modulation	86
7.3.2	Funktionsgewinn durch Ivermectin	87
7.3.3	Negative allosterische Modulation	88
7.4	Homologie-Modelling und Molecular Docking	91
7.5	Zusammenfassung	94
7.5.1	Potenzierung durch Ivermectin	94
7.5.2	Funktionsgewinn	94
7.5.3	Negative allosterische Modulation	95
8	BX430	99
8.1	Einleitung	99
8.2	Ergebnisse	99
8.2.1	Allosterische Modulation der P2X-Rezeptor-Subtypen	99
8.2.2	Radioligand-Bindungsstudien von BX430 am hP2X4-Rezeptor	100
8.2.3	Allosterische Modulation von chimären P2X(P2X2)-Rezeptoren durch BX430	101

8.3	BX430-Bindungsstelle	103
8.4	Zusammenfassung und Diskussion	104
9	Der allosterische Antagonist Paroxetin	107
9.1	Einleitung	107
9.2	Ergebnisse	107
9.2.1	Allosterische Modulation durch Paroxetin	107
9.2.2	Allosterische Modulation chimärer P2X4(P2X2)-Rezeptoren durch Paroxetin	109
9.2.3	Allosterische Modulation von hP2X4-Rezeptormutanten durch Paroxetin	111
9.3	Zusammenfassung und Diskussion	113
10	Allosterische Modulation der P2X-Rezeptoren durch die Metall-Kationen Cu^{2+} und Zn^{2+}	114
10.1	Einleitung	114
10.2	Koordination von Metall-Kationen im Organismus	114
10.3	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Kupfer- und Zink-Kationen	116
10.4	Allosterische Modulation der P2X-Rezeptoren durch Metall-Kationen	118
10.4.1	Allosterische Modulation durch Cu^{2+} -Ionen	121
10.4.2	Allosterische Modulation durch Zn^{2+} -Ionen	121
10.4.3	Ergebnisse: Allosterische Modulation durch Cu^{2+} -Ionen	124
10.4.4	Zusammenfassung und Diskussion	130
10.4.5	Ergebnisse: Allosterische Modulation durch Zn^{2+} -Ionen	131
10.4.6	Zusammenfassung und Diskussion	137
10.5	Fazit	139
11	Anthrachinone	141
11.1	Einleitung	141
11.2	Ergebnisse	142
11.2.1	Allosterische Modulation durch Cibacron Blue	142
11.2.2	Allosterische Modulation von P2X4(P2X2)-Rezeptoren durch Cibacron Blue	143
11.2.3	Allosterische Modulation der P2X4(P2X2)-Chimäre c10 durch Anthrachinon-Derivate	146
11.2.4	Charakterisierung der Anthrachinon-Bindungsstelle in der P2X4- (P2X2)-Chimäre c10	149
11.2.5	Überprüfung der Bindungsstellen-Hypothese anhand weiterer Anthrachinon-Derivate	151
11.2.6	Zusammenfassung und Diskussion	154
11.3	Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen von Anthrachinon-Derivaten am hP2X4E307T-Rezeptor	156
11.4	Docking-Experimente	167

11.5	Zusammenfassung	169
12	Zusammenfassung und Ausblick	173
12.1	Mutagenesestudien am humanen P2X4-Rezeptor	173
12.2	Charakterisierung allosterischer Bindungsstellen neuer P2X4-Rezeptor- antagonisten	174
12.3	Charakterisierung allosterischer Bindungsstellen bekannter P2X4-Rezeptor- Modulatoren	175
12.4	Fazit	180
13	Experimenteller Teil	182
13.1	Material und Geräte	182
13.2	Chemikalien	184
13.3	Zellkulturmedien und -zusätze	185
13.4	Enzyme	185
13.4.1	Restriktionsenzyme	185
13.4.2	Sonstige Enzyme	185
13.5	Nukleinsäuren und Nukleotide	185
13.5.1	Nukleotide	185
13.5.2	Plasmide	185
13.5.3	Primer	185
13.5.4	Marker	186
13.6	Zusätze für die lentivirale Transfektion	186
13.7	Kits	186
13.8	Zellen	186
13.9	Herstellung von Puffern und Lösungen	187
13.9.1	Lösungen und Puffer für die fluorimetrische Calciumbestimmung	187
13.9.2	Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie	187
13.9.3	Lösungen und Puffer für die Zellkultur	188
13.10	Herstellung von Kulturmedien für Bakterien	188
13.10.1	LB-Medium	188
13.10.2	SOC-Medium	189
13.10.3	Herstellung von LB-Agar-Platten	189
13.11	Zellkultur	189
13.11.1	Zellen auftauen	189
13.11.2	Zellen splitten	189
13.11.3	Einfrieren von Zellen	189
13.12	Molekularbiologische Methoden	190
13.12.1	Agarose-Gelelektrophorese	190
13.12.2	Reinigung von DNA über Agarosegel	190
13.12.3	Reinigung des Vektorfragmentes	190
13.12.4	Identifikation positiver Klone	190
13.12.5	Subklonierung von Rezeptor-DNA in den pUC19-Vektor	190

13.12.6	Subklonierung der Mutageneseklonen in den pUC19hP2X4-Ursprungsklon	191
13.12.7	Klonierung der Mutageneseklonen in den pLVX-IRES-mCherry-Vektor	192
13.12.8	T4-Ligase vermittelte Ligation	193
13.12.9	Umklonierung chimärer P2X4(P2X2)-Rezeptoren aus dem pMK-RQ-Vektor in den pLVX-IRES mCherry-Vektor	194
13.12.10	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien	194
13.12.11	Gezielte Mutagenese des P2X4-Rezeptors und der Chimäre c10195	
13.12.12	Selektion von Bakterien-Monoklonen	198
13.12.13	Minipräparation	198
13.12.14	Midipräparation	198
13.12.15	Sequenzierung	198
13.12.16	Retrovirale Transfektion mit Lenti-X-System	199
13.12.17	Vorbereitung gefriergetrockneter DNA	199
13.12.18	Subklonierung in den pLVX-IRES-mCherry-Vektor	200
13.13	Fluorimetrischer Calcium-Assay	200
14	Abkürzungsverzeichnis	202
	Literatur	204
15	Danksagung	218
16	Publikationsverzeichnis	220
16.1	Publikationen	220
16.2	Kongressbeiträge	220

1 Einleitung

1.1 Purinerge Rezeptoren

Das Konzept des „Purinergic Signalling“ wurde erstmals 1972 durch Burnstock *et al.* beschrieben.¹ Es basiert auf der Entdeckung, dass Adenosintriphosphat (ATP, Abb. 1) als Neurotransmitter in inhibitorischen nicht-adrenergen und nicht-cholinergen Nerven im Darm eines Meerschweins wirkte.

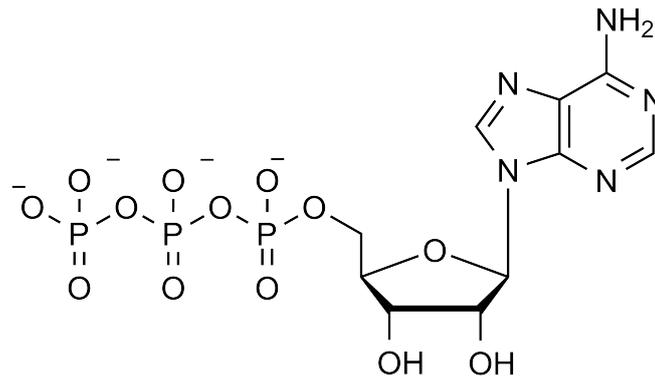


Abbildung 1: Chemische Struktur von Adenosintriphosphat (ATP)

Entsprechende Membranrezeptoren für Adenosin und Adenosintriphosphat wurden 1987 entdeckt und abhängig von ihrer Aktivierbarkeit durch Adenosin bzw. AMP, ADP oder ATP in die Klassen P1 bzw. P2 eingeteilt.^{2,3} Die P1-Rezeptoren lassen sich in vier Subtypen, die A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und die A₃-Rezeptoren unterteilen. Aufgrund der Feststellung, dass die P2-Rezeptoren Ligand-gesteuerte Ionenkanäle (LGIC) oder G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR) darstellen, wurden sie später in zwei Gruppen, die P2X- und die P2Y-Rezeptoren, eingeteilt.⁴ Bisher wurden sieben P2X-Rezeptor-Subtypen identifiziert, die hauptsächlich durch extrazelluläres ATP gesteuert werden. Die acht bekannten P2Y-Rezeptoren sind je nach Subtyp durch Adenin- oder Uracil-Nucleotide aktivierbar.⁵ Die dritte Rezeptorklasse, P0, stellt das neueste Mitglied der purinergen Rezeptorfamilie dar. Die ebenfalls G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden bisher nur in Nagetieren beschrieben und werden durch Adenin aktiviert.⁶ Bisher konnten zwei Adenin-Rezeptor-Subtypen (Ade1 und Ade2) identifiziert werden. Eine Übersicht über die Familie der purinergen Rezeptoren zeigt die Abb. 2.

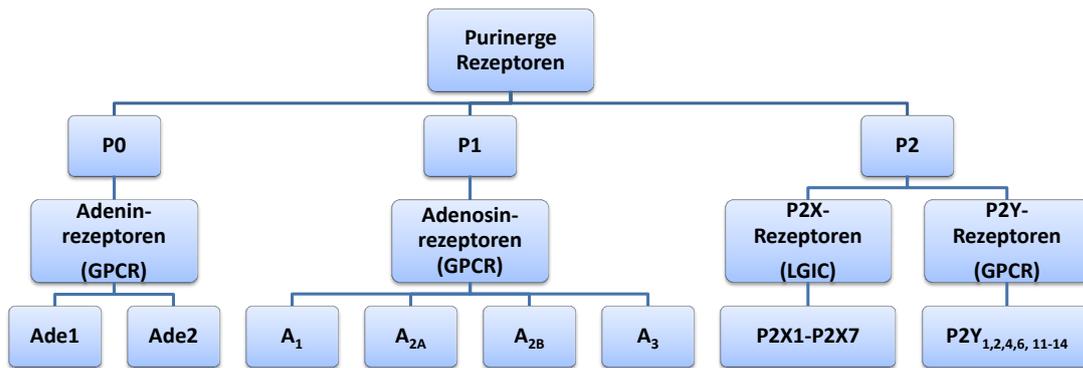


Abbildung 2: Schematische Übersicht über die purinergen Rezeptoren

1.2 Die P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren stellen Ligand-gesteuerte Ionenkanäle für Kationen (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) dar, die durch extrazelluläres ATP aktivierbar sind. Sie sind innerhalb der Gattung der Wirbeltiere weit verbreitet, jedoch ist die Sequenzhomologie innerhalb der wirbellosen Lebewesen sehr gering.⁷ Die P2X-Proteine einer Rezeptoruntereinheit sind 379 bis 595 Aminosäuren lang und zeigen zwischen 35 und 54 % Sequenzhomologie. Ein Rezeptor ist aus drei Rezeptoruntereinheiten zusammengesetzt.⁷

P2X-Rezeptoren kommen ubiquitär im Körper vor, am verbreitetsten sind sie jedoch im zentralen Nervensystem, im vaskulären und pulmonalen System, im Gastrointestinaltrakt, in der Skelettmuskulatur, den Knochen und dem blutbildenden System (vgl. Tab. 1).⁸

Tabelle 1: Verteilung der P2X-Rezeptoren im Organismus⁸

Rezeptor	Hauptverteilung
P2X1	glatte Muskulatur, Blutplättchen, Cerebellum, Spinalneuronen
P2X2	glatte Muskulatur, Gehirn, Pankreas, Retina, chromaffine Zellen, autonome und sensorische Ganglien
P2X3	nozizeptive sensorische Neuronen, Nucleus Tractus Solitarius (NTS), einige sympathische Neuronen
P2X4	Mikroglia, Hoden, Darm, Endothelzellen
P2X5	Proliferierende Hautzellen, Darm, Blase, Thymus, Rückenmark, Herz, Nebennierenmark
P2X6	Hirn, motorische Neuronen im Rückenmark
P2X7	Makrophagen, Mastzellen, Mikroglia, Pankreas, Haut, endokrine Organe

P2X-Rezeptoren stehen aufgrund ihrer Beteiligung an zahlreichen (patho)physiolo-

gischen Prozessen wie der Wahrnehmung von Schmerz, entzündlichen Veränderungen oder Krebs als Zielstrukturen für potentielle neue Wirkstoffe im Fokus der Forschung.⁵ Bisher wurden sieben Subtypen (P2X1-P2X7) identifiziert, wobei jeder Rezeptor-Subtyp unterschiedliche pharmakologische und elektrophysiologische Eigenschaften, wie z.B. ATP-Potenz oder Desensibilisierungsrate aufweist.^{9,10} Der EC₅₀-Wert für ATP variiert je nach Subtyp zwischen nanomolaren und geringen mikromolekularen Konzentrationen. Die einzige Ausnahme stellt der P2X7-Rezeptor dar, der einen EC₅₀-Wert von größer als 100 μ M aufweist und der durch ATP nur partialagonistisch aktiviert wird.⁷ P2X-Rezeptoren können in schnell und langsam desensibilisierende Rezeptoren unterteilt werden. Während die P2X1- und P2X3-Rezeptoren schnell desensibilisieren, desensibilisieren die P2X2-, P2X4-, P2X5- und P2X7-Rezeptoren langsam.⁷ Diese Eigenschaft ist von großer physiologischer Relevanz, da sie die Dauer der Signaltransduktion bedingt und die Empfindlichkeit bei weiterer Anwesenheit von ATP reguliert. Die Desensibilisierung resultiert höchstwahrscheinlich aus einem Übergang in den geschlossenen Zustand bei andauernder Bindung des Agonisten.⁷ Die erneute Anregung des Rezeptors erfordert demnach eine Konformationsänderung des Rezeptors zum Übergang in den Ruhezustand. Die molekularen Mechanismen, die diesen Zustand bedingen, sind noch nicht ausreichend verstanden.⁷ Die Bildung von Rezeptor-Chimären aus Teilen desensibilisierender und nicht-desensibilisierender Rezeptoren zeigt aber eine Verwicklung der TM-Domänen sowie der cytoplasmatischen N- und C-terminalen Domänen in dieses Phänomen.^{7,10,11}

P2X-Rezeptoren bilden homo- oder heterotrimere Komplexe aus drei Rezeptor-Monomeren.¹² Die pharmakologischen Eigenschaften eines Heterotrimers können sich von denen der Homotrimere unterscheiden, wobei ihre Relevanz bisher noch nicht vollständig verstanden ist. Eine Zusammenfassung der möglichen Homomer- bzw. Heteromerbildung zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: *Möglichkeiten der Homomer- bzw. Heteromerbildung¹²*

	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
P2X1	+				+		
P2X2		+	+			+	
P2X3		+	+				
P2X4				+		+	+
P2X5	+				+		
P2X6		+		+			
P2X7							+

Fünf von sieben humanen P2X-Subtypen (P2X1-P2X4 und P2X7) sind in der Lage, funktionelle homotrimere Ionen-Kanäle zu bilden.⁵ Der humane homotrimere P2X5-Rezeptor ist dagegen meist nicht funktionell, was mit dem Fehlen des Exons 10 asso-

ziiert ist.¹³ Der humane P2X6-Rezeptor-Subtyp zeigt nur in Koexpression mit P2X2- oder P2X4-Subtypen ein Signal für ATP.⁵ Der erste P2X-Rezeptor, der kristallisiert werden konnte, war der P2X4-Rezeptor des Zebrafisches (zf). Es konnten Röntgenstrukturen des Rezeptors im ungebundenen und im ATP-gebundenen Zustand (beide N- und C-terminal trunziert) erhalten werden, die ein verbessertes Verständnis der Ereignisse im Zusammenhang mit der ATP-Bindung und der Rezeptor-Aktivierung ermöglicht haben.^{14,15} Jedes Rezeptor-Monomer besitzt zwei transmembrane Segmente (TM1 und TM2), die die Membran komplett durchqueren. Die Amino- und Carboxytermini (N- und C-Termini) liegen intrazellulär. Die im Vergleich mit den Transmembrandomänen große Extrazellulärdomäne ragt weit aus der Membran hinaus (vgl. Abb. 3a).^{7,14,15} Die Transmembranregion besteht aus sechs Transmembranhelices, wobei jeweils zwei Helices zu einer Untereinheit gehören. Innerhalb der Untereinheiten sind die Helices antiparallel angeordnet. Die inneren TM2-Helices kreuzen sich mittig. Dabei schnüren sie die Transmembranpore ein und definieren so den geschlossenen Ruhezustand des Ionenkanals (vgl. Abb. 3c).^{14,15}

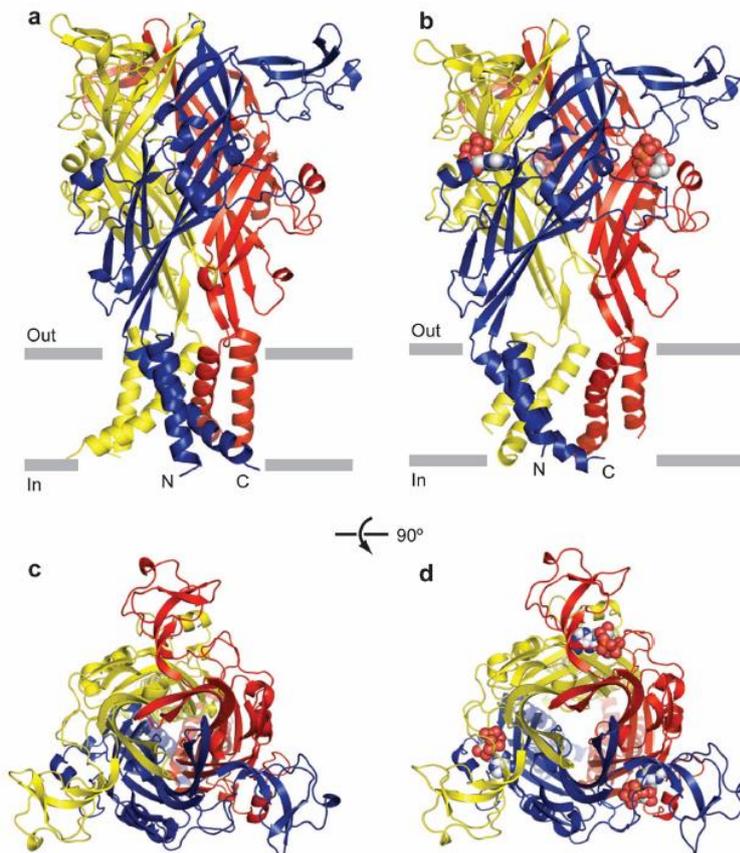


Abbildung 3: Der Aufbau des homotrimeren P2X4-Rezeptors. (a) Seitenansicht, geschlossener Zustand. (b) Seitenansicht, aktivierter Zustand. (c) Aufsicht, geschlossener Zustand. (d) Aufsicht, aktivierter Zustand.¹⁵

Die TM-Domänen sind an der Öffnung und der Schließung des Ionenkanals beteiligt.⁹ Der Aufbau einer einzelnen P2X₄-Untereinheit ähnelt der Gestalt eines Delfins, wobei die Transmembranhelices die Schwanzflossen und die extrazelluläre Region die Flossen und den oberen Körperbereich darstellen (vgl. Abb. 4).

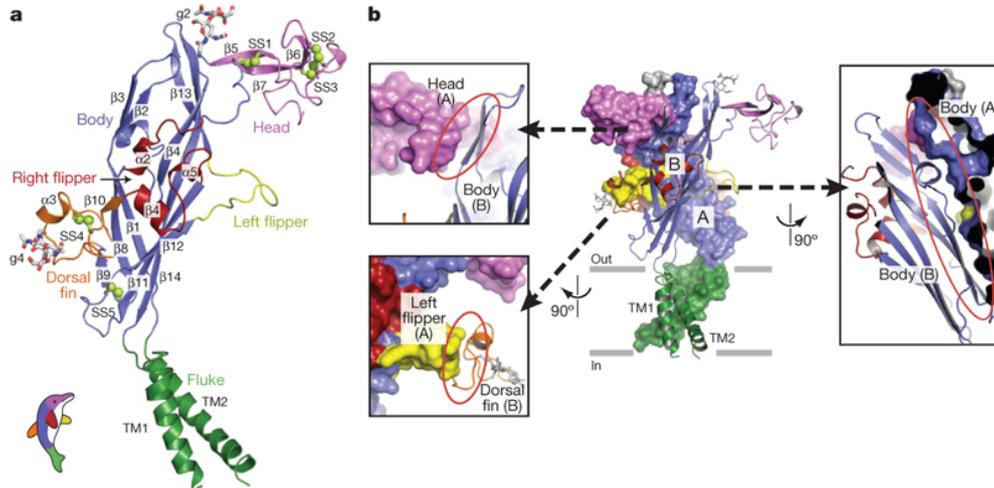


Abbildung 4: (a) Delfinartiger Aufbau eines P2X₄-Rezeptor-Monomers des Zebrafischs. (b) Intermolekulare Kontakte zwischen zwei P2X₄-Rezeptor-Untereinheiten.¹⁴

Die Extrazellulär-Domäne beinhaltet unter anderem zehn konservierte Cysteinreste, die Disulfidbrücken ausbilden und damit eine wichtige Rolle in der dreidimensionalen Organisation des Rezeptors spielen.^{5,9} Außerdem sind vierzehn Glycinreste, zwischen zwei und sechs Consensussequenzen für N-Glykosylierungsstellen sowie die orthosterischen Bindungsstellen für ATP vorhanden.¹⁵

Nach Kawate *et al.* wird der zentrale Aufbau des Delfinkörpers durch den extrazellulären Teil gebildet und ist durch ein Transthyretin-artiges β -Sandwich-Motiv charakterisiert, das eine sehr starre Struktur zeigt und gegenüber konformationellen Veränderungen stabil zu sein scheint. Die Kontakte zwischen den Untereinheiten werden größtenteils von den Extrazellulärdomänen vermittelt. Die oberen Regionen der β -Faltblattstrukturen in der Körperdomäne stehen in Kontakt zu den benachbarten Untereinheiten, während zwischen den angrenzenden Untereinheiten im Bereich der Basis der Extrazellulärdomäne kein Kontakt besteht. Angrenzend an die Körperdomäne befinden sich die strukturell variierenden Kopf-, Schwanzflossen-, linke und rechte Flossen-Domänen. Die Kopfreion wird durch drei antiparallele β -Faltblattstrukturen und eine α -Helix definiert. Hauptkontakte zwischen Untereinheiten finden zwischen zwei Körperdomänen, zwischen Kopf- und Körperdomänen und linker Flossen- und Schwanzflossendomäne statt (vgl. Abb. 4).¹⁴ Da die Aminosäurereste im Bereich der Körperdomäne hoch konserviert sind, während die Aminosäurereste in Kopf, linker Flosse und Schwanzflosse

wenig konserviert sind, schließen Kawate *et al.*, dass die Körper-Körper-Interaktion innerhalb der P2X-Rezeptorfamilie verbreitet ist.¹⁴

2012 gelang es Hattori *et al.* den P2X₄-Rezeptor des Zebrafisches im ATP-gebundenen Zustand zu kristallisieren und drei Bindungsstellen für ATP im extrazellulären Bereich zu identifizieren (vgl. Abb. 5). Diese liegen jeweils an den Schnittstellen zwischen zwei Rezeptoruntereinheiten. Das negativ geladene ATP interagiert mit positiv geladenen Aminosäureresten in Form ionischer Wechselwirkungen (Abb. 5). Im Vergleich mit der Röntgenstruktur im geschlossenen Zustand bestätigte sich die strukturelle Starrheit der oberen Körper-Domäne, die keine elementaren konformatorischen Veränderungen durch die ATP-Bindung zeigte, während die untere Körper-Domäne im Rahmen der ATP-Bindungen deutlichen Bewegungen unterlag. Die resultierenden mechanischen Bewegungen führen zu einem Auseinanderdriften der TM-Helices, wodurch es zur Kanalöffnung kommt.¹⁵

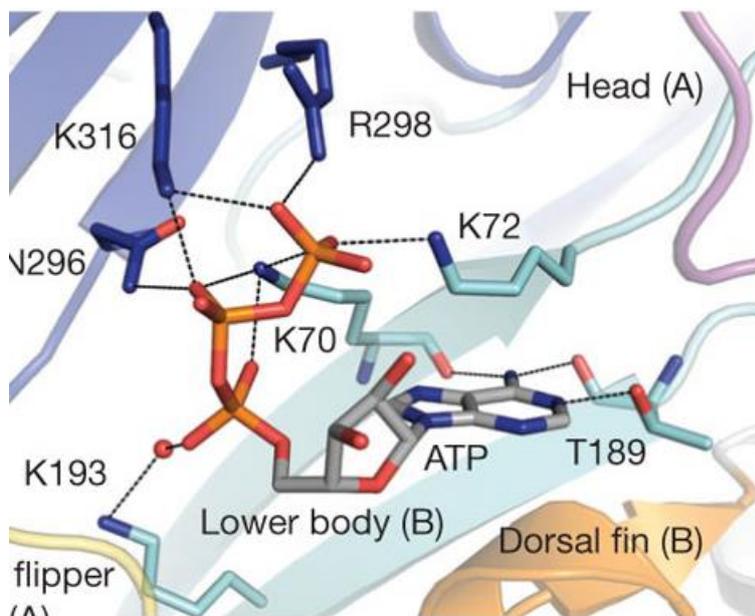


Abbildung 5: Darstellung der ATP-Bindungsstelle im P2X₄-Rezeptor des Zebrafisches.¹⁵

Das gebundene ATP-Molekül zeigt eine U-förmige Konformation, die β - und γ -Phosphatreste sind in Richtung des Adenin-Rings orientiert. In der Bindungstasche nimmt der Aminosäurerest K70 (Untereinheit 2) eine Schlüsselrolle ein. Seine Ammoniumgruppe ist innerhalb des Zentrums der Triphosphatgruppe platziert und interagiert mit den Sauerstoff-Atomen aller drei Phosphatgruppen. N296 und K316 der Untereinheit 1 interagieren zusätzlich mit dem β -Phosphatrest, während K72 (Untereinheit 2), N298 (Untereinheit 1) und K316 (Untereinheit 1) an Interaktionen mit dem γ -

Phosphatrest beteiligt sind. Zusätzlich kann die Bildung einer Lösungsmittelvermittelten Brückenbindung zwischen K193 und der α -Phosphatgruppe beobachtet werden, die unter physiologischen Bedingungen vermutlich durch Wassermoleküle vermittelt wird. Die Adenin-Base ist ins Innere der Bindungstasche orientiert und bildet drei Wasserstoff-Brückenbindungen mit der Seitenkette von Y189 und den Carbonyl-Sauerstoffatomen von K70 und Y189. Alle beschriebenen Aminosäurereste sind innerhalb der P2X-Familie konserviert. Weitere hydrophobe Interaktionen zwischen der Adenin-Base und den Aminosäureresten L191 und I232 sind hinsichtlich ihrer Hydrophobizität in den P2X-Rezeptoren verbreitet, jedoch sind die beschriebenen Reste teilweise durch andere Aminosäuren ersetzt.¹⁵

Während des Prozesses der Rezeptor-Aktivierung finden verschiedene Konformationsänderungen statt (vgl. Abb. 6). Die Bindung von ATP führt zu einer Aufwärtsbewegung der Rückenflossen-Domäne in Richtung der Kopf-Domäne.¹⁵

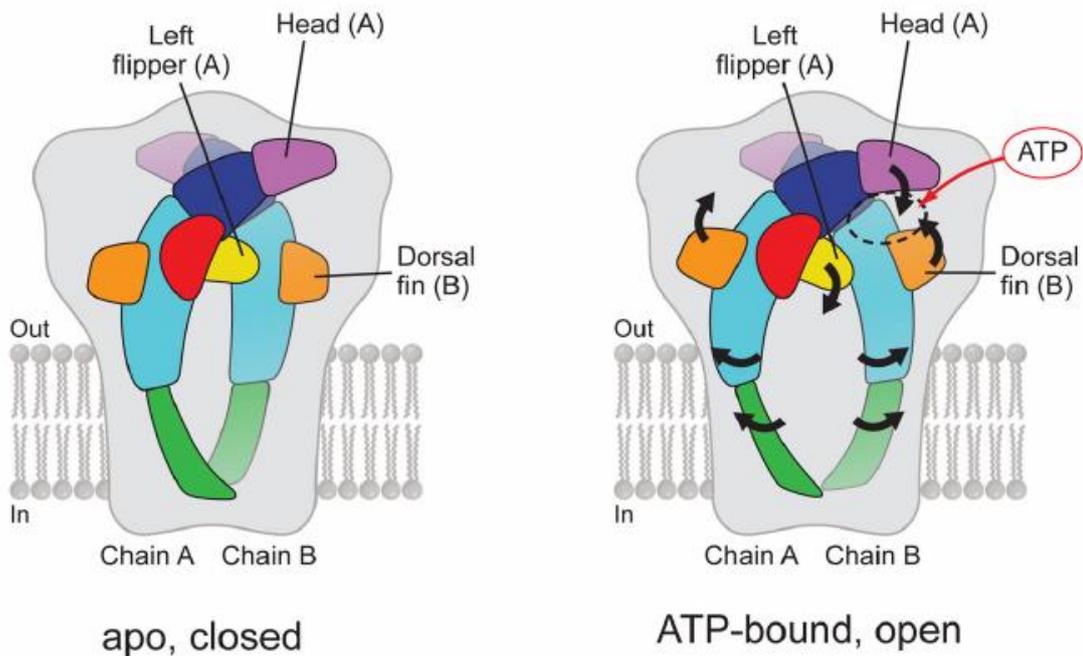


Abbildung 6: Darstellung des Mechanismus der Rezeptoraktivierung.¹⁵

Gleichzeitig findet eine Auswärtsbewegung der linken Flossen-Domäne statt. Es schiebt sich die untere Körper-Domäne durch die Kopplung an Rückenflossen- und linke Flossen-Domäne ebenfalls nach außen, wodurch sich der Bereich zwischen den Transmembrandomänen weitet und sich der Ionen-Kanal öffnet (vgl. Abb. 3b und d).¹⁵ Die P2X-Rezeptoren besitzen drei Bindungsstellen für ATP, wovon mindestens zwei besetzt sein müssen um den Rezeptor zu aktivieren.¹⁰

Kürzlich wurden Kristallstrukturen des humanen P2X3-Rezeptors beschrieben, die den Rezeptor im Ruhezustand ohne gebundenen Agonisten, im ATP-gebundenen aktiven Zustand, im desensibilisierten ATP-gebundenen Zustand und im geschlossenen Zustand gebunden an die orthosterischen Antagonisten TNP-ATP und A-317491 zeigen.¹⁶ Drei Mutationen (T13P, S15V und V161I) wurden in den Rezeptor eingefügt um ein Konstrukt mit langsamer und unvollständiger Desensibilisierung zu erhalten. Im Vergleich zu den bereits beschriebenen Kristallstrukturen des zf P2X4-Rezeptors sind die Transmembrandomänen weniger stark verkürzt weshalb erstmals sichtbar wird, dass cytoplasmatische Aminosäurereste im offenen Rezeptor eine sogenannte cytoplasmatische Kappe bilden und damit den Zustand stabilisieren (vgl. Abb. 7).¹⁶

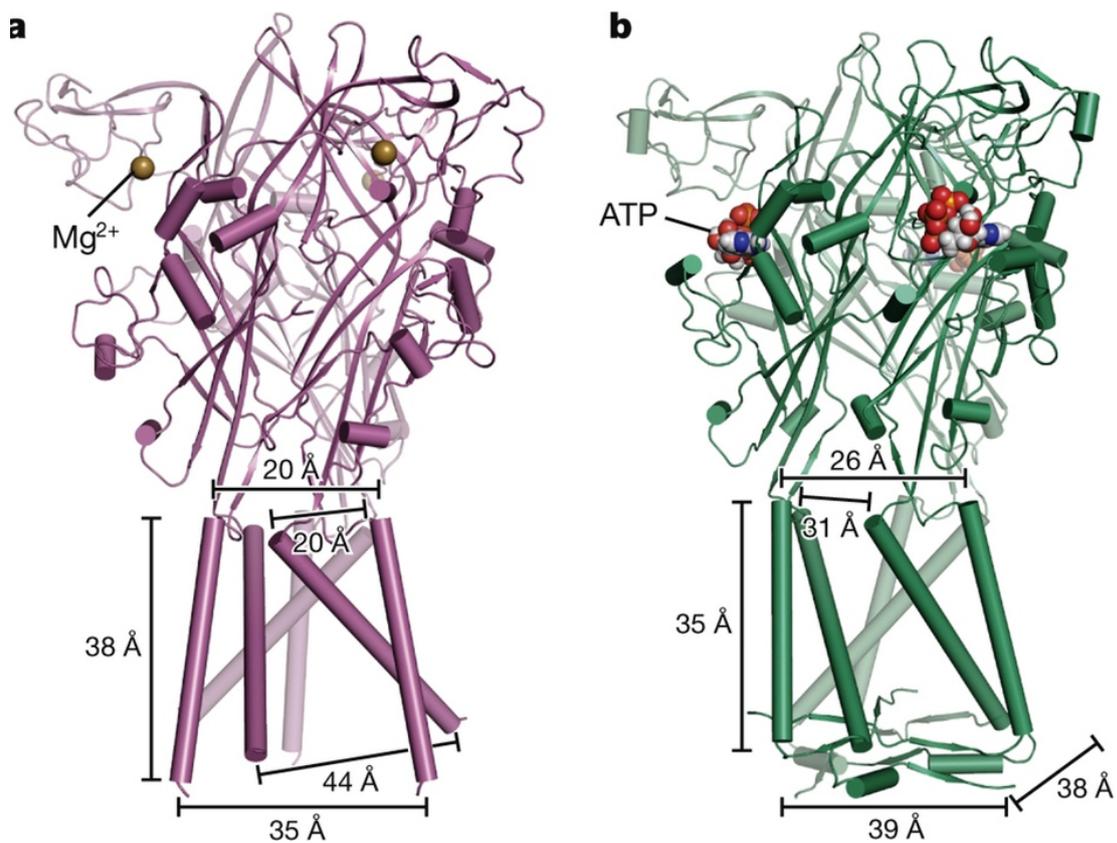


Abbildung 7: Trimere Struktur des humanen P2X3-Rezeptors im (links) geschlossenen und (rechts) ATP-gebundenen geöffneten Zustand.¹⁶

Die drei mutierten Aminosäurereste in Position 13, 15 und 161 gehen bei der Bildung der cytoplasmatischen Kappe elementare hydrophobe stabilisierende Interaktionen ein (vgl. Abb. 8). Die Ausbildung dieses speziellen Strukturmotivs scheint eine zentrale Rolle während der Rezeptoröffnung spielen und wird im geschlossenen oder im desensibilisierten Zustand zerstört.

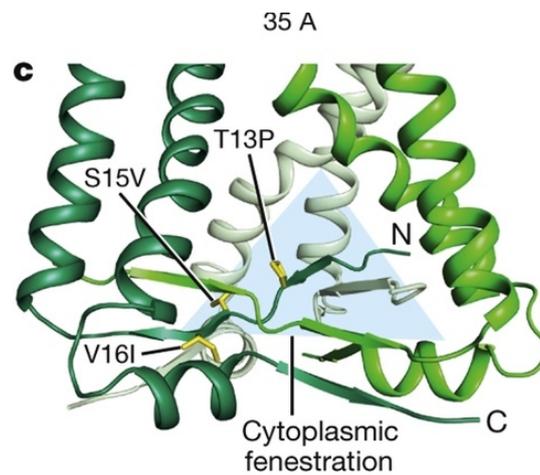


Abbildung 8: Darstellung der cytoplasmatischen Kappe bestehend aus β -Faltblättern der C- und N-Termini sowie der dreieckig geformten Fensteranordnung.¹⁶

Darüber hinaus kommt es nach Mansoor *et al.* während der Rezeptoraktivierung in der TM2-Domäne innerhalb der Sequenz G333-V334-G335 zum Übergang von einer α -Helix zu einer 3_{10} Helix. Beim Übertritt in den desensibilisierten Zustand entwickelt sich die 3_{10} Helix zurück zur α -Helix bei gleichzeitiger Einwärtsdrehung des Aminosäurerestes V334.¹⁶ Die Rezeptorpore schließt sich wieder wobei sich die Aminosäurereste die die Pore definieren von denen im geschlossenen ungebundenen Zustand unterscheiden. Ein Übergang in den geschlossenen Ausgangszustand setzt weitere konformatorische Änderungen sowohl im extrazellulären als auch im transmembranären Bereichen voraus.¹⁶ Die beiden kompetitiven Antagonisten TNP-ATP und A-317491 besetzen die gleiche Bindungsstelle wie ATP, binden jedoch tiefer innerhalb der Bindungstasche und nehmen eine andere Orientierung als ATP ein.

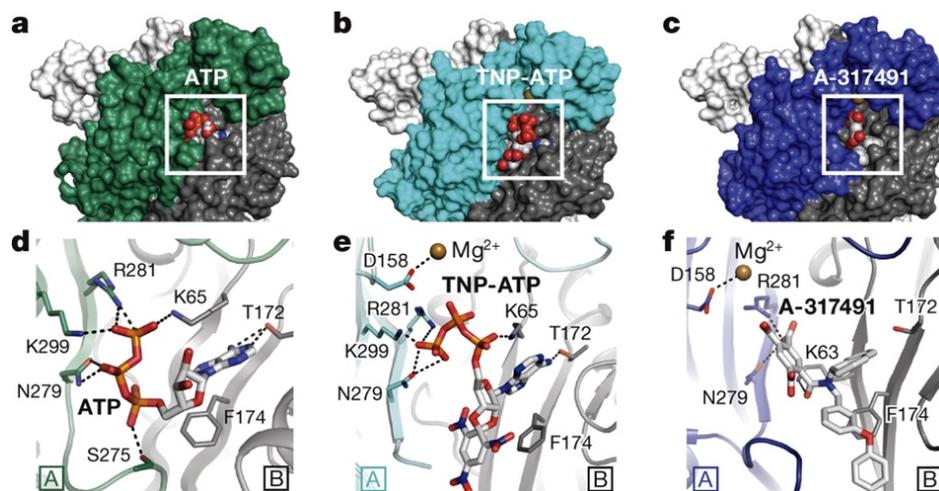


Abbildung 9: Darstellung von ATP und der kompetitiven Antagonisten TNP-ATP und A-317491 innerhalb der Bindungstasche des hP2X3-Rezeptors.¹⁶

So interagiert K65 (K67 im hP2X4-Rezeptor) mit der α -Phosphat-Gruppe des TNP-ATP und nicht mit der γ -Phosphat-Gruppe des ATPs. Dadurch liegt die Ribose-Gruppe tiefer innerhalb des Spaltes zwischen linker Flosse- und Rückenflossen-Domäne und verhindert die notwendige Aufwärtsbewegung der Rückenflossen-Domäne die elementar für die Kanalöffnung ist. Der geschlossene Zustand wird stabilisiert.¹⁶

Kristallstrukturen anderer P2X-Subtypen bzw. anderer Spezies fehlen bisher.

1.3 Agonisten an P2X-Rezeptoren

Die Abb. 10 zeigt bekannte Agonisten an P2X-Rezeptoren. Aus den Strukturen wird ersichtlich, dass sie alle Derivate des ATPs darstellen. Die Verbindungen sind nicht selektiv, jedoch variiert ihre Potenz je nach P2X-Subtyp. Die zugehörigen EC_{50} -Werte zeigt Tabelle 3.

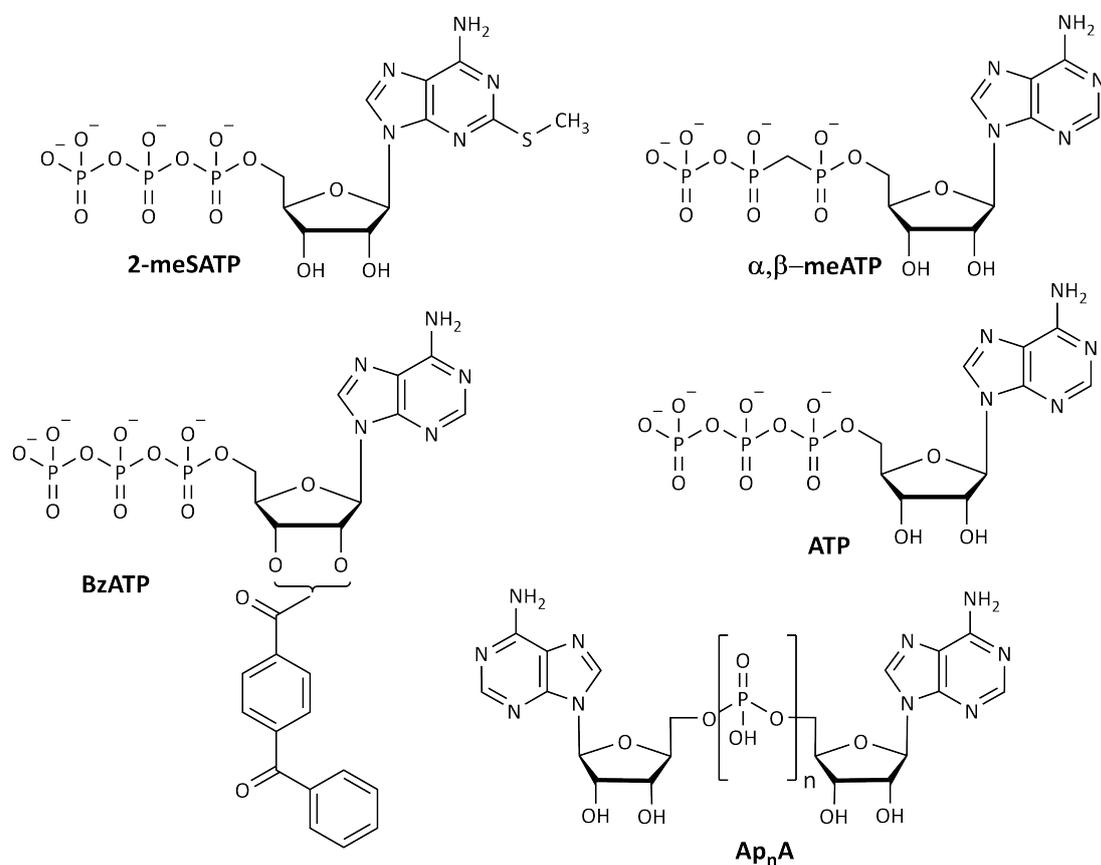


Abbildung 10: Chemische Strukturen nichtselektiver P2X-Rezeptor-Agonisten

Tabelle 3: Affinitäten nichtselektiver P2X-Rezeptor-Agonisten, angegeben als EC_{50} (μM)¹⁷

Agonist	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
ATP	0,1-0,7	2-8	1,2-4,1	1-10	0,5-4	2000-4000
α,β -meATP	0,1-1	>100	1-2	4-300	1-12	>300
BzATP	0,7-24	6-30	0,04-0,08	3	1-6	10
2MeSATP	0,1-1	1	0,3	10-100	0,5	200

Einzigste Ausnahmen stellen die Adenin-Dinucleotide (Ap_nA) dar, die je nach Subtyp als Agonisten oder Partialagonisten wirken, jedoch auch in Abhängigkeit von der Kettenlänge inaktiv an einzelnen Subtypen sein (vgl. Tabelle 4) und damit eine teilweise vorhandene, wenn auch eingeschränkte Selektivität zeigen können.

Tabelle 4: Agonistische Potenz von Adenin-Dinucleotiden an Ratten-P2X-Rezeptoren. Dargestellt sind die EC_{50} -Werte in μM . Angelehnt an Burnstock 1999 (r =Ratte).¹⁸

Agonist	rP2X1	rP2X2	rP2X3	rP2X4
Ap_2A	inaktiv	inaktiv	inaktiv	inaktiv
Ap_3A	> 100	inaktiv	1,0 ± 0,5	inaktiv
Ap_4A	0,04 ± 0,01	15,2 ± 1,0	0,80 ± 0,12	3,0 ± 0,4
Ap_5A	0,9 ± 0,1	inaktiv	1,3 ± 0,3	inaktiv
Ap_6A	0,72 ± 0,08	inaktiv	1,6 ± 0,4	> 100

inaktiv
 Partialagonist
 Agonist

1.4 Antagonisten an P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptorantagonisten wird aufgrund der Beteiligung der P2X-Rezeptoren an zahlreichen (patho)physiologischen Prozessen therapeutisches Potential zur Bekämpfung vielfältiger Erkrankungen zugesprochen. Abb. 11 zeigt die Strukturen der unspezifischen P2X-Antagonisten Suramin, PPADS (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure) und TNP-ATP (2'-(oder-3')-O-Trinitrophenyl-ATP) und in Tab. 5 sind ihre IC_{50} -Werte an P2X-Rezeptorsubtypen aufgelistet.

Tabelle 5: Inhibitorische Potenzen nichtselektiver P2X-Rezeptorantagonisten, angegeben als IC_{50} (μM)^{5,17}

Antagonist	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
TNP-ATP	0,006	2	0,001	15	0,6-0,7	>30
Suramin	1-2	10	3	>300	2-3	>300
PPADS	1	1-3	1,5	>300	0,2-0,6	10-45

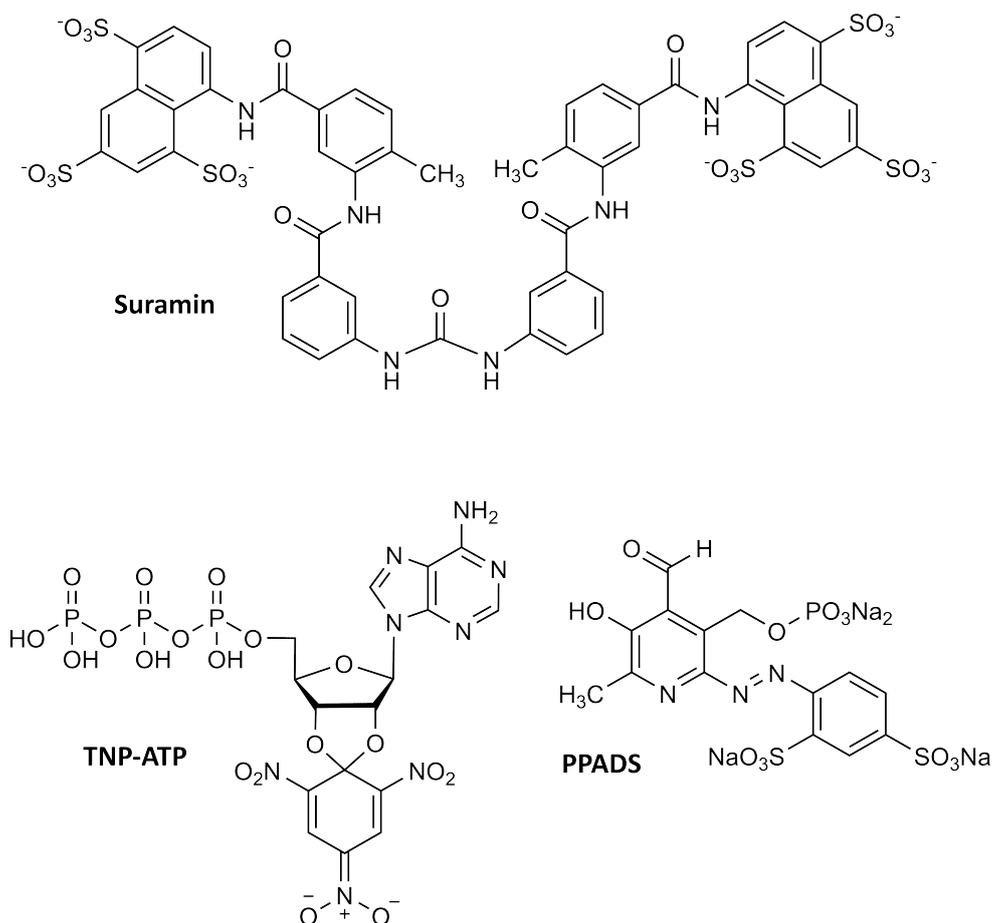


Abbildung 11: Chemische Strukturen der unspezifischen P2X-Rezeptorantagonisten PPADS, Suramin und TNP-ATP.

Das Bindungsverhalten dieser Standard-P2X-Rezeptorantagonisten ist bereits in Teilen untersucht worden. Während TNP-ATP mit der orthosterischen Bindungsstelle interagiert und auch für Suramin ein kompetitiver Bindungsmechanismus beschrieben wird, stellt PPADS einen nicht-kompetitiven P2X-Rezeptorantagonisten dar.¹⁹

Mutagenesestudien zeigten, dass PPADS mit Lysinresten, vermutlich durch die Bildung einer Schiffsbasis interagiert.²⁰ Die Einführung eines Lysinrestes in Position 249 (Nummerierung des Ratten-P2X4-Rezeptors (rP2X4)) reichte aus um eine in der Höhe mit den P2X1- und P2X2-Rezeptoren vergleichbare Hemmung des rP2X4-Rezeptors zu erreichen.²⁰ Jedoch scheinen auch andere Aminosäurereste einen Beitrag zur Bindung dieses Antagonisten zu leisten, denn die ebenfalls PPADS-sensitiven P2X3- und P2X7-Rezeptoren tragen keinen Lysinrest in der entsprechenden Position.¹⁹ Die Bildung von P2X-Rezeptorchimären zeigte ergänzend den Einfluss der Aminosäurereste 81-183 (P2X4-Rezeptor) auf die Sensitivität von PPADS.^{21,22} Dem Argininrest 126 im P2X7-Rezeptor konnte in Mutagenesestudien eine wichtige Rolle zugeordnet werden.²² Insgesamt betrachtet scheinen vor allem positiv geladene Aminosäurereste in Nähe der

orthosterischen Bindungsstelle an der Bindung des Antagonisten beteiligt zu sein. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Bindung von PPADS möglicherweise zu konformatorischen Änderungen in Nähe der orthosterischen Bindungsstelle führt und dadurch die ATP-Bindung beeinflusst.¹⁹

Suramin wird therapeutisch gegen Trypanosomen-Erkrankungen wie die Schlafkrankheit eingesetzt und zeigt, anders als PPADS, einen kompetitiven Hemmmechanismus.²³ Jedoch sind unterschiedliche Aminosäurereste an der Bindung von Suramin bzw. ATP beteiligt.^{24,25} In Mutagenesestudien wurde dem Aminosäurerest Q78 (Nummerierung des rP2X4-Rezeptors) eine wichtige Rolle in Bezug auf Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Suramin zwischen den verschiedenen Spezies zugeschrieben.²¹ Ein Austausch des Aminosäurerestes gegen Lysin erhöhte die Affinität zehnfach. Ein weiterer Aminosäurerest der in Mutagenesestudien als Teil der Bindungsstelle identifiziert werden konnte ist K138 (Nummerierung des hP2X1-Rezeptors).²⁶ Dieser Aminosäurerest ist jedoch in Suramin-sensitiven Rezeptoren nicht konserviert, weshalb in erster Linie die positive Ladung des Lysinrestes als bedeutsam für die Interaktion mit der negativ geladenen Verbindung Suramin postuliert wird.^{19,26}

Zusammengefasst ermöglichen die oben präsentierten Standardantagonisten erste Erkenntnisse über die molekulare Basis der antagonistischen Wirkung an P2X-Rezeptoren. Die Hauptbemühungen der Forschung konzentrieren sich jedoch auf die Entwicklung Subtyp-selektiver Verbindungen.

1.5 Allosterische Modulation

Eine Alternative zur Entwicklung orthosterischer Liganden ist die Entwicklung allosterischer Liganden, die Bindungsstellen abseits der orthosterischen Bindungsstellen besetzen und die Rezeptoraktivität von dort aus durch Änderungen seiner Konformation modulieren.²⁷⁻²⁹ Prominente Beispiele für diese Art der Ionenkanal-Modulation sind Benzodiazepine am GABA_A-Rezeptor.³⁰ Für weitere Ligand-gesteuerte-Ionenkanäle sind allosterische Modulatoren beschrieben. Dazu gehören GABA_C-, Glycin-, nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren, NMDA-Rezeptoren aber auch P2X-Rezeptoren.^{9,31-33} Durch allosterische Modulatoren ausgelöste Effekte können von vollständiger positiver Modulation bis zur vollständigen negativen Modulation variieren.³⁴ Negative allosterische Modulatoren (NAM) stellen nicht-kompetitive Antagonisten dar, deren antagonistischer Effekt durch hohe Konzentrationen an Agonisten, im Gegensatz zu kompetitiven Antagonisten, nicht aufgehoben werden können. Positive allosterische Modulatoren (PAM) sind in der Lage die Aktivität oder die Wirksamkeit eines orthosterischen Agonisten zu erhöhen.^{34,35} Ein Vorteil der Entwicklung allosterischer Modulatoren ist ihre Abhängigkeit von der Anwesenheit des endogenen Liganden. Ist dessen Aktivität reduziert, reduziert sich in der Regel auch der Effekt des allosterischen Modulators, was z.B. bei zirkadianer Freisetzung eines Neurotransmitters ein nennenswerter Vorteil

ist. Eine Ausnahme stellen allosterische Agonisten dar, die auch in Abwesenheit des orthosterischen Liganden den Rezeptor aktivieren können.³⁴ Ein weiterer Vorteil allosterischer Modulatoren ist die potentielle Subtyp-Selektivität. Diese ist beispielsweise im Falle der P2X-Rezeptoren schwierig durch orthosterische Liganden zu erreichen, da die ATP-Bindungsstelle in allen Rezeptor-Subtypen konserviert ist. Allosterische Modulatoren können an innerhalb der Rezeptor-Subtypen nicht konservierte Domänen binden und auf diese Weise Selektivität erreichen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass allosterische Modulatoren zwar zu allen Subtypen gleiche Affinität besitzen, jedoch Subtyp-Selektivität durch variierende Kooperation dieser allosterischen mit der orthosterischen Bindungsstelle erreicht werden kann.²⁷

1.6 Allosterische Modulatoren des P2X4-Rezeptors

Für den P2X4-Rezeptor sind verschiedene PAMs und NAMs beschrieben, die den Rezeptor mit unterschiedlicher Potenz modulieren. Die wichtigsten Verbindungen sind in Abb. 12 dargestellt. Tabelle 6 fasst darüber hinaus weitere allosterische Modulatoren des P2X4-Rezeptors, ihre inhibitorischen bzw. aktivierenden Potenzen, die Testmethoden sowie die Spezies an der getestet wurde und die identifizierten Bindungsstellen zusammen. Dabei wird deutlich, dass ein Großteil der genannten allosterischen Modulatoren nur schwache bis moderate Affinitäten zeigen, Daten am humanen P2X4-Rezeptor häufig fehlen und die Kenntnis von allosterischen Bindungsstellen bisher sehr eingeschränkt ist.

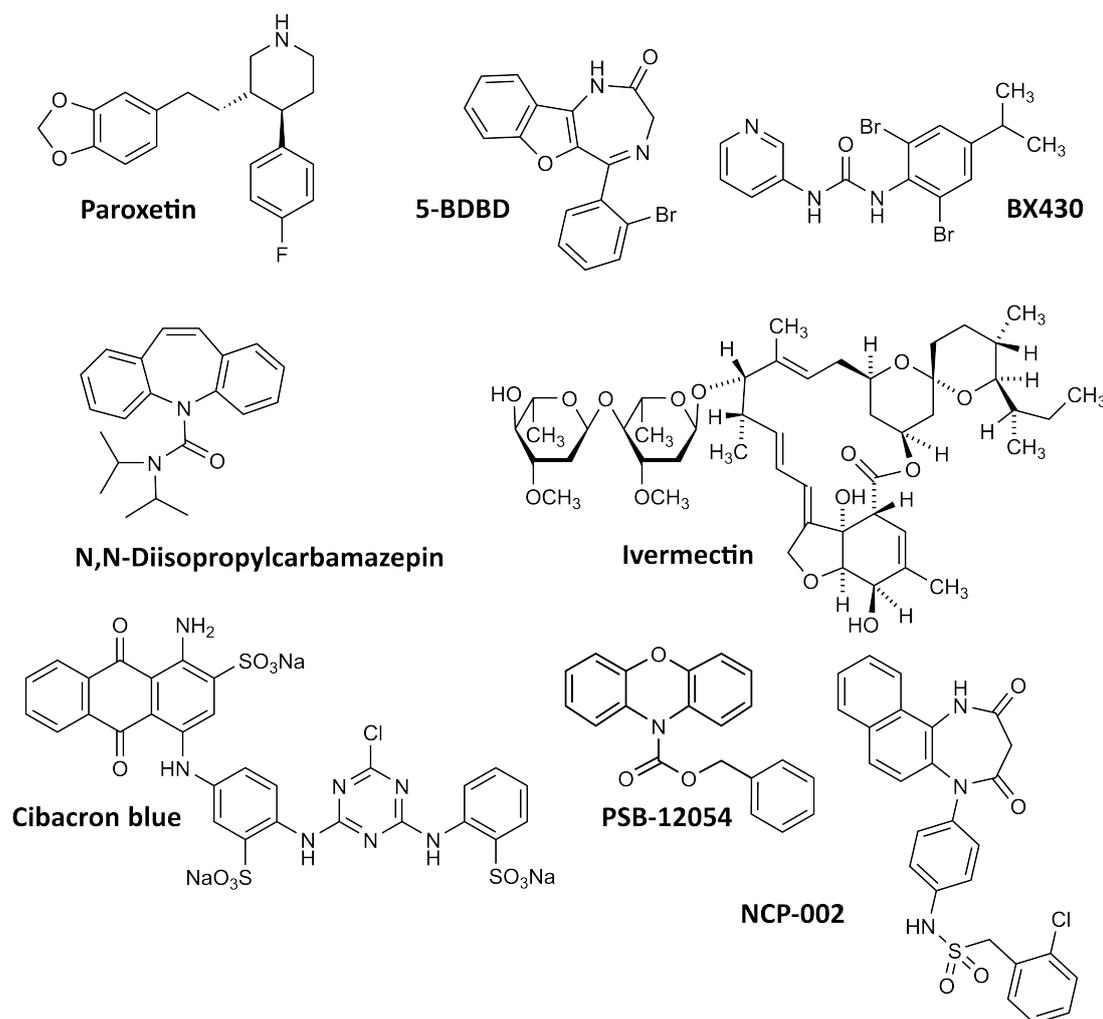
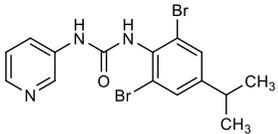
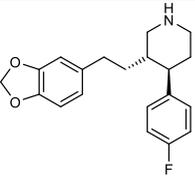
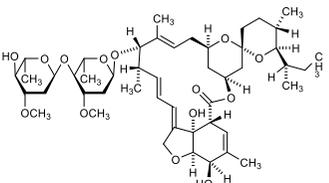
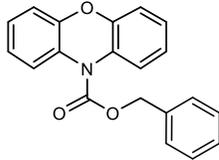
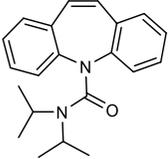
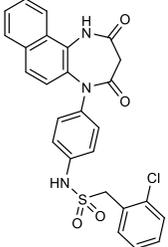
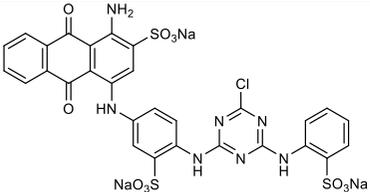
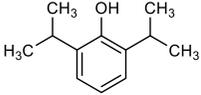


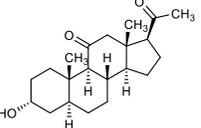
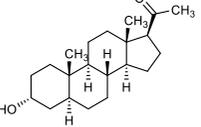
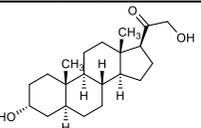
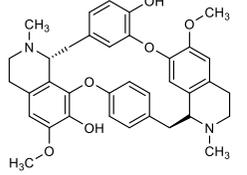
Abbildung 12: Positive und negative allosterische Modulatoren des P2X4-Rezeptors.

Tabelle 6: In der Literatur beschriebene positive und negative allosterische $P2X_4$ -Rezeptor-Modulatoren. Dargestellt sind die modulatorischen Potenzen an der entsprechenden Rezeptor-Spezie, die Testmethode und bereits identifizierte Bindungsstellen.³⁶⁻⁵⁵

Verbindung	Spezies	Methode	IC ₅₀	EC ₅₀	Bindungsstellen	Quelle
 BX430	Human Ratte Maus Zebrafisch	Patch-Clamp	0,54 μM inaktiv inaktiv 1,89 μM		-	Ase 2013
 Paroxetin	Ratte Human	Patch-Clamp Calcium-Einstrom	2,45 μM 1,87 μM		-	Nagata 2009
 5-BDBD	Human	Patch-Clamp	0,5 μM		-	Fischer DE10312969A1
 Ivermectin	Human Ratte Maus	Patch-Clamp		0,25 und 2 μM 3 μM	vgl. Kapitel 7	Silberberg 2004 Khakh 1999

Verbindung	Spezies	Methode	IC ₅₀	EC ₅₀	Bindungsstellen	Quelle
 PSB-12054	Human Ratte Maus	Calcium- Einstrom	0,187 μM 2,10 μM 1,77 μM		-	Hernandez- Olmos 2012
 N,N-Diisopropylcarbamazepin	Human Ratte Maus	Calcium- Einstrom	3,44 μM 54 μM 14 μM		-	Tian 2014
 NCP-002	Human	Calcium- Einstrom (Fura 2) Calcium- Einstrom (Fluo 4)	0,064 μM 0,00482 μM		-	Sakuma WO2013105608 A1 A.Abdelrahman (nicht publiziert)
 Cibacron blue	Ratte	Bindungsstudien Patch-Clamp	9,3 μM	3 μM	-	Michel 1997 Miller 1998

Verbindung	Spezies	Methode	IC ₅₀	EC ₅₀	Bindungsstellen	Quelle
H ₂ O ₂	Ratte	Patch-Clamp	300 µM		-	Coddou 2009
Zn ²⁺	Ratte	Patch-Clamp		5 µM	vgl. Kapitel Metallkationen	Coddou 2007
Cu ²⁺	Ratte	Patch-Clamp	10 µM		vgl. Kapitel Metallkationen	Coddou 2007
Cd ²⁺	Ratte	Patch-Clamp		20 µM	Cys132, H140, D138	Coddou 2005, Lorca 2005
Hg ²⁺	Ratte	Patch-Clamp	10 µM		Cys430	Coddou 2005, Coddou 2009
Protonen	Ratte	Patch-Clamp	pKa 6.8		His268	Stoop 1997, Clarke 2000
Ethanol	Ratte	Patch-Clamp	58 mM		Asp331, Met336, Trp46	Xiong 2000, Ostrovskaya 2011, Franklin 2012
 Propofol	Ratte	Patch-Clamp		50 µM	-	Tomioka 2000

Verbindung	Spezies	Methode	IC ₅₀	EC ₅₀	Bindungsstellen	Quelle
 Toluene	Ratte	Patch-Clamp		1 mM	-	Woodward 2004
 Alfaxalon	Ratte	Patch-Clamp		0,40 μM	-	Codocedo 2009
 Allopregnanolon	Ratte	Patch-Clamp		0,36 μM	-	Codocedo 2009
 3α,21Dihydroxy-5α-pregnan-20-on	Ratte	Patch-Clamp		0,10 μM	-	Codocedo 2009
 d-Tubocurarin	Ratte	Bindungsstudien	> 10 μM		-	Michel 1997

1.7 P2X-Rezeptoren als Drug-Targets

P2X-Rezeptoren spielen eine Rolle in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen und gelten als zukünftige Zielstrukturen für Wirkstoffe in der Behandlung verschiedenster Erkrankungen.

Der P2X1-Rezeptor zeigt hohe Expression in humanen Blutplättchen und glatten Muskelzellen.⁵⁶ Rezeptoren dieses Subtyps spielen eine wichtige Rolle in der Thrombozytenaggregation und der Kontrolle der Blasenfunktion.^{57,58} P2X1-Rezeptorantagonisten stellen potentielle antithrombotische Wirkstoffe für die Schlaganfallsprophylaxe dar.^{57,59} P2X2-Rezeptoren kommen ubiquitär im Körper vor und werden insbesondere in peripheren und zentralen Neuronen exprimiert.⁶⁰ P2X2-Rezeptorantagonisten kommen dementsprechend als zukünftige Wirkstoffe zur Behandlung von Schmerzen und zur Neuroprotektion in Betracht.⁶¹ P2X3-Rezeptoren kommen in sensorischen Neuronen und in der Harnblase vor.^{62,63} Antagonisten dieses Subtyps stellen potentielle Wirkstoffe in der Behandlung von Schmerzen und Erkrankungen der Atemwege wie Husten und pulmonale Fibrose dar.^{64,65} Der P2X3-Antagonist AF-219 (Struktur nicht zugänglich) befindet sich bereits in der klinischen Phase II zur Therapie von chronischem Husten.⁶⁴ Der P2X4-Rezeptor ist der am weitesten verbreitete P2X-Rezeptor-Subtyp im Organismus.⁶⁶ P2X4-Rezeptoren zeigen eine Hochregulierung ihrer Expression im Falle von Entzündung und Verletzungen von Nerven. Ihre Blockade ist eine Strategie für therapeutische Interventionen gegen neuropathischen Schmerz und neurodegenerative Erkrankungen.^{67,68} P2X7-Rezeptoren sind hoch exprimiert in Immun-Zellen. P2X7-Rezeptorantagonisten gelten als potentielle Wirkstoffe in der Behandlung zahlreicher Erkrankungen in Verbindung mit Entzündung und Schmerzen aber auch bei Depression, Angst- und bipolaren Störungen.^{69,70}

Die Entwicklung positiver allosterischer Modulatoren ist ein Ansatz um die P2X-Rezeptor-Aktivierung zu erhöhen, was in der Krebstherapie oder in der Therapie der Alkoholabhängigkeit von Nutzen sein könnte.^{43,71–73} Ethanol wirkt als allosterischer P2X4-Rezeptorantagonist und der Missbrauch von Alkohol führte im Ratten-Modell zu einer reduzierten P2X4-Rezeptor-Genexpression.⁷⁴ Besonders wichtig ist die Rolle des P2X7-Rezeptors in Zusammenhang mit dem Tumorwachstum einzuschätzen, auch wenn die genauen Mechanismen dahinter, die sowohl progressiv als auch regressiv sein können, noch nicht vollständig verstanden sind.⁷² P2X7-Rezeptoragonisten können die P2X7-Rezeptorstimulation erhöhen, was mit Zell-Tod assoziiert ist, P2X7-Rezeptorantagonisten dagegen blockieren die Tumor-Progression.⁷² Beide Strategien gelten daher als vielversprechend.

1.8 P2X4-Rezeptoren als Zielstruktur für Wirkstoffe gegen neuropathische Schmerzen

Unter neuropathischen Schmerzen versteht man Schmerzen, die durch die Verletzung des Nervensystems zustande kommen. Ursächlich sind meistens Ereignisse wie mecha-

nische Traumata, metabolische Erkrankungen, neurotoxische Chemikalien, Infektionen oder Tumore. Zentrale neuropathische Schmerzen resultieren meist aus Schlaganfällen, Multipler Sklerose oder Verletzungen des Rückenmarks. Typische Symptome neben starken Schmerzen sind erhöhte Schmerzsensibilität (Hyperalgesie) und Berührungsempfindlichkeit (Allodynie).⁷⁵ Neuropathische Schmerzen sind gegenüber klassischen Wirkstoffen gegen Schmerzen wie NSAR (nicht-steroidalen Antirheumatika) oder Opioiden häufig therapieresistent. Mittel der ersten Wahl in der Therapie sind Antidepressiva oder Antikonvulsiva, die aber ebenfalls oft nur begrenzte Wirksamkeit zeigen.⁷⁶ Neue therapeutische Ansätze zur Behandlung dieser Art von Schmerzen sind daher dringend notwendig.

Die Blockade von P2X4-Rezeptoren gilt als eine neue Strategie in der Behandlung von neuropathischem Schmerz. Abbildung 13 zeigt den potentiellen Mechanismus der Modulation durch P2X4-Rezeptoren, der von Inoue *et. al* vorgeschlagen wurde.⁶⁷ Durch die Verletzung eines peripheren Nervs kommt es zur Aktivierung spinaler Mikroglia im Rückenmark. Daraus resultiert die Hochregulierung der Expression zahlreicher Gene wie zum Beispiel von P2X4-Rezeptoren unter Beteiligung zahlreicher proinflammatorischer Chemokine. Die P2X4-Rezeptoren werden durch ATP aktiviert, wodurch es zur Ausschüttung verschiedener bioaktiver Faktoren (z.B. BDNF, Brain-derived neurotrophic factor) kommt. BDNF reguliert in negativer Weise den Kalium-Chlorid-Transporter KCC2 über TrkB (Tropomyosin receptor kinase B), wodurch es zu einem intrazellulären Anstieg von Chlorid-Ionen und zur Depolarisation der Neuronen im Rückenmarkshinterhorn gefolgt von einer Stimulation durch GABA (γ -Aminobuttersäure) und Glycin kommt. Daraus resultiert eine Übererregung der Neuronen und in Folge dessen kommt es zur Entwicklung von neuropathischem Schmerz.⁶⁷

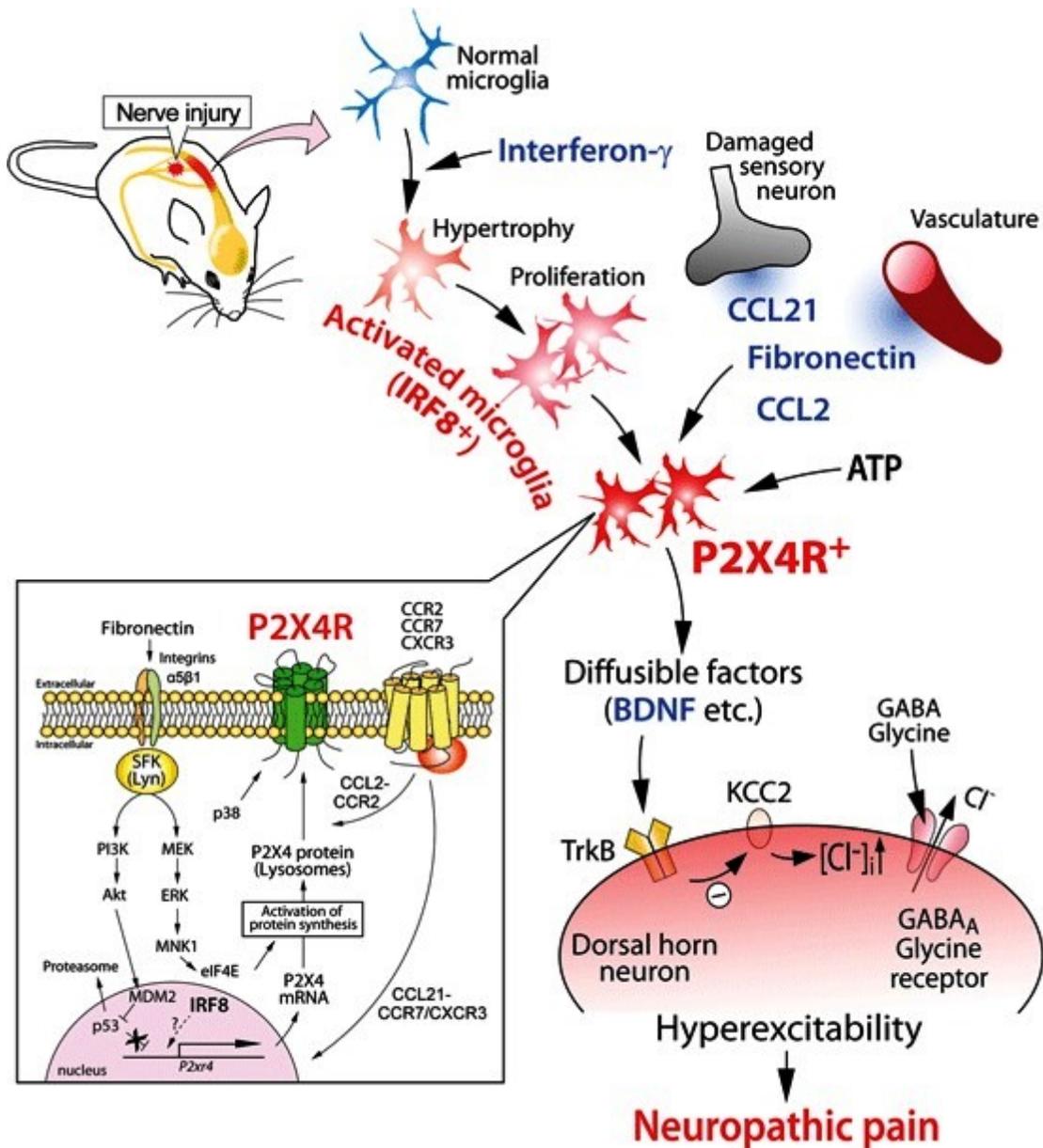


Abbildung 13: Modulation von neuropathischen Schmerzen über hochregulierte P2X₄-Rezeptoren in aktivierten spinalen Mikroglia.⁶⁷

Eine aktuelle Studie konnte die gleichzeitige Beteiligung von Monozyten neben Mikroglia am Übergang von akutem Schmerz zu chronischem Schmerz nach der Verletzung eines peripheren Nerven zeigen. Jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass nach der initiierten Phase Mikroglia-unabhängige Signalwege das Fortschreiten der Erkrankung steuern.⁷⁷

1.9 Scherstress und P2X4-Polymorphismen

Blutgefäße sind durch die pulsartige Natur von Blutdruck und Blutfluss dauerhaft Scherkräften ausgesetzt.⁷⁸ Dieser sogenannte Scherstress löst in Endothel-Zellen Reaktionen aus, die maßgeblich den Gefäßtonus, die Angiogenese, vaskuläre Remodelierung und Arterogenese beeinflussen.⁷⁹ P2X4-Rezeptoren sind die am höchsten exprimierten P2X-Rezeptoren in vaskulären Endothel-Zellen, spielen eine Rolle in der Scherstress-induzierten Ca^{2+} -Signalwirkung und sind an der Entstehung von NO beteiligt. Der Knockout des P2X4-Gens in Mäusen führte zu Tieren mit erhöhtem Blutdruck und erniedrigter Produktion von NO.⁷⁹ P2X4-Rezeptoren haben dementsprechend einen positiven Einfluss auf die arterielle Elastizität und den Blutdruck.

Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein des P2X4-Rezeptor-Polymorphismus Tyr315P2X4Cys einen negativen Einfluss auf die Höhe des Blutdrucks hat. Für den humanen P2X4-Rezeptor sind bisher vier Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) beschrieben: Tyr315Cys, Ala6Ser, Ile9Val und Ser242Gly.⁸⁰ Die Tyr315Cys-Mutation führte *in vivo* zu erhöhtem Blutdruck. In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte der Tyr315P2X4Cys-Rezeptor einen Verlust der Rezeptorfunktion während an den Rezeptormutanten Ala6Ser, Ile119Val und Ser242Gly bezüglich des ATP-Effektes keine signifikanten Veränderungen messbar waren. Betrachtet man die zfp2X4-Röntgenstruktur zeigt sich, dass Tyr315 in direkter Nähe zu einer der ATP-Bindungsstellen liegt (vgl. Abb. 14) und die Einführung eines zusätzlichen Cystein-Restes möglicherweise die Struktur der Extrazellulärdomäne destabilisiert.

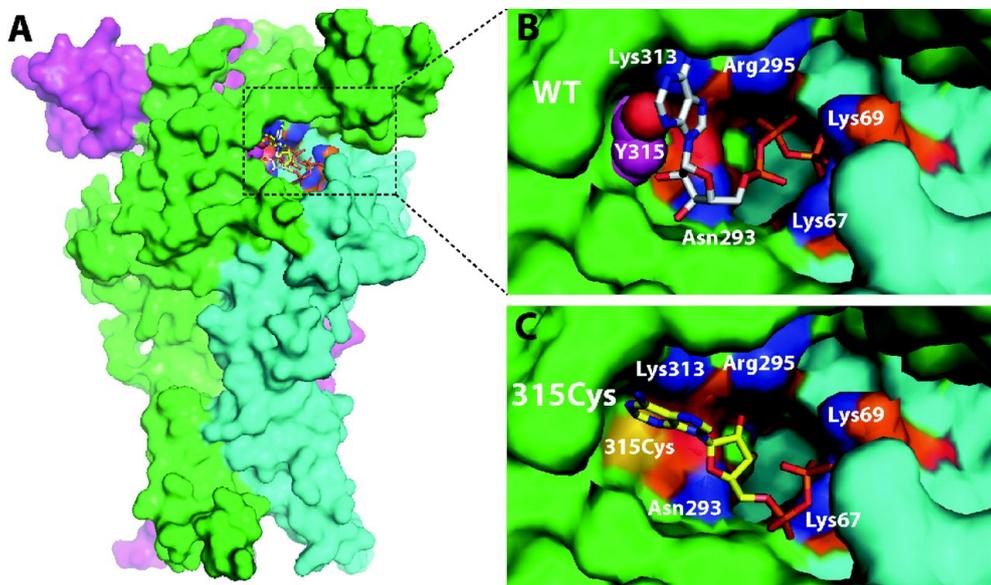


Abbildung 14: (A) Homologie-Modell des humanen P2X4-Rezeptors mit gedocktem ATP. (B) Nahansicht der ATP-Bindungsstelle und an der ATP-Bindung beteiligte Aminosäurereste im wt hP2X4-Rezeptor und (C) im Tyr315Cys-Rezeptor.⁸⁰

Das Vorliegen einer Tyr315Cys-Mutation stellt einen Risikofaktor und damit einen potentiellen Biomarker für Bluthochdruck dar.⁸¹ Gleichzeitig bedeutet dies, dass bei der Entwicklung möglicher P2X4-Rezeptorantagonisten, kardiovaskuläre Parameter sehr genau betrachtet werden müssen und das Vorhandensein der Tyr315Cys-Mutation ein Ausschluss-Kriterium für eine mögliche Therapieoption mit P2X4-Rezeptorantagonisten darstellen könnte.

2 Zielsetzung

Die Blockade von P2X4-Rezeptoren gilt als neue Strategie in der Therapie von neuropathischen Schmerzen.⁸² Bei der Entwicklung potentieller Wirkstoffe ergeben sich jedoch zahlreiche Hürden. Aus Kristallstrukturen des P2X4-Zebrafischrezeptors in geschlossener und offener Form ist bekannt, dass innerhalb der P2X-Familie konservierte, geladene Aminosäurereste die orthosterischen Bindungsstellen für ATP bilden und an der Rezeptoraktivierung beteiligt sind.^{14,83} Die hohe Polarität der ATP-Bindungsstelle macht die Entwicklung orthosterischer Liganden einerseits kompliziert, andererseits ergibt sich aus orthosterischen Liganden das Problem einer schwierig zu erreichenden P2X-Subtypselektivität. Eine Alternative ist daher die Entwicklung allosterischer Liganden, deren Bindungsstellen innerhalb nicht konservierter Rezeptor-Bereiche liegen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch das Wissen über die allosterischen Bindungsstellen am P2X4-Rezeptor sehr eingeschränkt. Wie in Abschnitt 1.6 detailliert erläutert, sind bereits einige positive allosterische P2X4-Rezeptor Modulatoren (PAMs) und ebenso negative allosterische P2X4-Modulatoren (NAMs) identifiziert worden, die mit moderater Affinität und teilweise auch Subtypselektivität die P2X4-Rezeptor-Funktion allosterisch modulieren.³⁴ In unserem Arbeitskreis wurden darüber hinaus, ausgehend von initialen Screenings, verschiedene Bibliotheken von allosterischen P2X4-Antagonisten entwickelt, die den Rezeptor potent und selektiv hemmen. Die relevanten Bindungsstellen dieser Verbindungsklassen sind jedoch noch unbekannt und deren Kenntnis für ihre weitere Optimierung sowie auch zum Aufspüren neuer potentieller Leitstrukturen unerlässlich.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Mechanismen der allosterischen Modulation (positiv und negativ) des P2X4-Rezeptors zu verstehen und die relevante(n) Bindungsstelle(n) bekannter und neuer allosterischer Modulatoren zu identifizieren. Die Ergebnisse sollen eine verbesserte Basis für die Entwicklung von Wirkstoffen für die Therapie von chronischem Schmerz sowie neuroinflammatorischer und neurodegenerativer Erkrankungen liefern.

3 Strategie

Abb. 15 zeigt verschiedene allosterische Modulatoren des humanen P2X4-Rezeptors mit Selektivität gegenüber den humanen P2X2- und P2X7-Subtypen. Die chemischen Strukturen der Verbindungen der Strukturklassen (SK) I-III können aus patentrechtlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Sie werden nachfolgend als Verbindungen der SK I-III-Nummerierung bezeichnet.

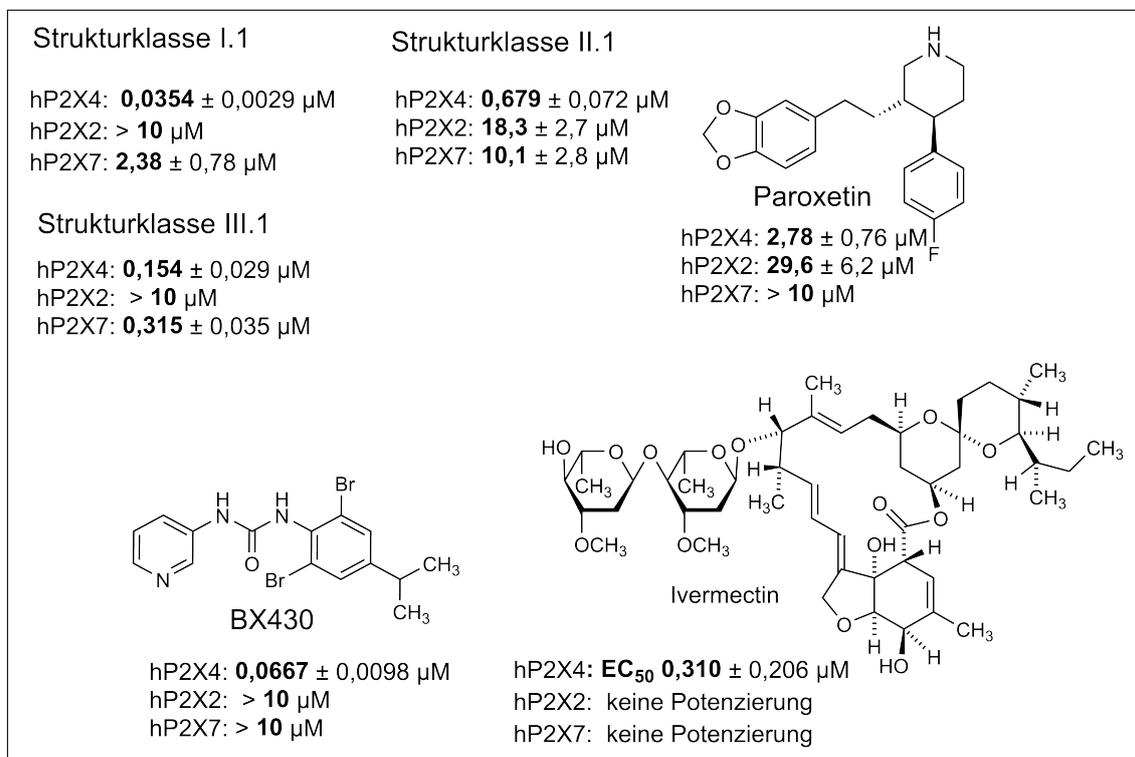


Abbildung 15: Auswahl an allosterischen P2X₄-Rezeptor-Modulatoren. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als IC₅₀-Werte ± SEM in μM aus 3-5 Experimenten.

Ausgehend von dem Gedanken, dass die Selektivität für den P2X₄-Subtyp aus Bindungsstellen resultieren muss, die in anderen P2X-Subtypen nicht vorhanden sind bzw. größere Unterschiede aufweisen, wurde ein Alignment (vgl. Abb. 16) der humanen P2X₄-, P2X₂- und P2X₇-Rezeptorsequenzen durchgeführt und Regionen mit Sequenzvariationen, basierend auf einem P2X₄-Rezeptor Homologie-Modell, analysiert. Dabei wurden 10 variable Regionen (v1-v10) innerhalb der P2X-Familie im extrazellulären Bereich der Rezeptoren identifiziert, die mögliche Bindungsstellen für allosterische Modulatoren darstellen könnten. Diese Variationsbereiche wurden im humanen P2X₄-Rezeptor gegen die entsprechende Sequenz des humanen P2X₂-Rezeptor ausgetauscht, da die Selektivität der Modulatoren gegenüber dem humanen P2X₂-Subtypen ausgeprägter als gegenüber dem P2X₇-Rezeptor ist. Der Austausch einer potentiell an der Bindungsstelle beteiligten Rezeptor-Teilsequenz gegen den entsprechenden Teil des humanen P2X₂-Rezeptor sollte zu einem Verlust bzw. einer starken Reduktion

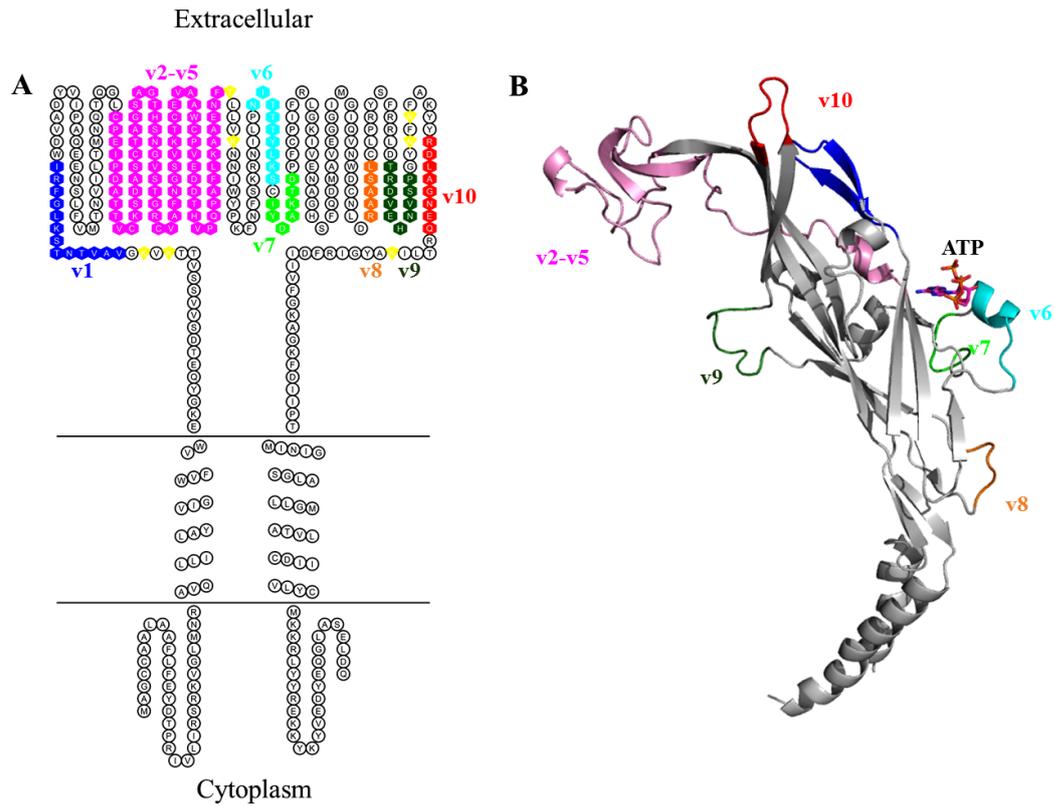


Abbildung 17: (A) Snake-like Plot des humanen P2X₄-Rezeptors. Farblich markierte Aminosäurereste stellen die Sequenzvariationen v1-v10 dar, die im humanen P2X₄-Rezeptor gegen die entsprechende Sequenz des humanen P2X₂-Rezeptors ausgetauscht wurden. Gelb markierte Aminosäurereste sind Teil der ATP-Bindungsstellen. (B) Delfin-artige Darstellung des humanen P2X₄-Monomers mit farblich gekennzeichneten Bereichen v1-v10 (Abb. von V. Namasivayam).

Tabelle 7: Übersicht über die gewünschten $P2X_4(P2X_2)$ -Rezeptorchimären und die jeweils ausgetauschten $P2X_4$ -Sequenzbereiche.

Typ	Sequenzvariation
Chimäre c1	P2X4(V71-I83P2X2)
Chimäre c2-c5	P2X4(C116-T186P2X2)
Chimäre c6	P2X4(N208-S216P2X2)
Chimäre c7	P2X4(I218-D224P2X2)
Chimäre c8	P2X4(R265-L269P2X2)
Chimäre c9	P2X4(T281-P290P2X2)
Chimäre c10	P2X4(R301-Q308P2X2)

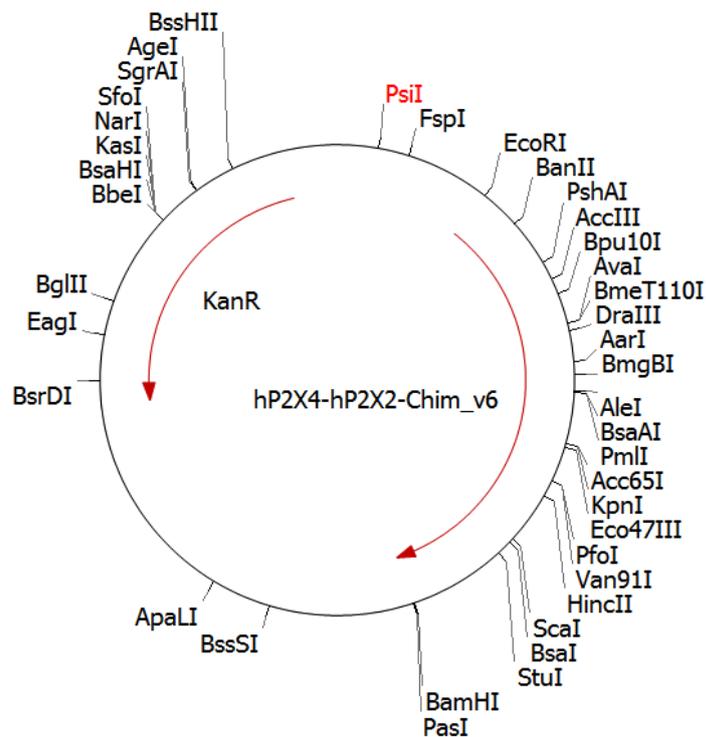


Abbildung 19: Rezeptorgen der $P2X_4(P2X_2)$ -Chimäre c6 im $pMK-RQ$ -Vektor mit angefügten $EcoRI$ - und $BamHI$ -Schnittstellen.

4.2 Zielgerichtete Mutagenese

Konnten bei der Testung der P2X4(P2X2)-Chimären signifikante Veränderungen im Bezug auf die Affinität einzelner Verbindungen, resultierend aus dem Austausch der variablen Regionen v1-v10 festgestellt werden, wurden zur detaillierteren Analyse einzelne Aminosäurereste des jeweiligen Bereiches zielgerichtet mutiert.

Unter der zielgerichteten Mutagenese versteht man die gezielte Veränderung einer DNA-Sequenz durch Austausch einzelner oder mehrerer Basen. Dadurch ergibt sich meistens eine Änderung in der Proteinsequenz. Die Methode der zielgerichteten Mutagenese wird häufig zur Funktionsanalyse einer DNA-Sequenz genutzt.^{84–86} Ein Schema der Methode zeigt Abb. 20.

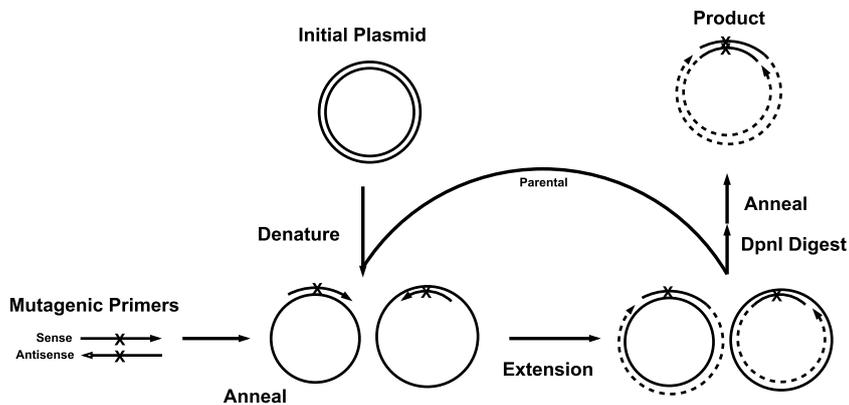


Abbildung 20: Schematischer Ablauf der zielgerichteten Mutagenese⁸⁷

Zur Durchführung wird ein Plasmid benötigt, das die gewünschte DNA-Sequenz, in diesem Fall die des humanen P2X4-Rezeptors, enthält. Im vorliegenden Projekt wurde das humane P2X4-Gen in den pUC19-Vektor (vgl. Abb. 21) eingebracht, da kleine Plasmide mit höherer Effizienz transformiert werden. Außerdem muss ein Primerpaar definiert werden, das die gewünschte, veränderte Basensequenz trägt und zueinander komplementär ist. Zur Einführung der Mutation wird eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, während der das Primerpaar an die DNA angelagert und das Plasmid amplifiziert wird.

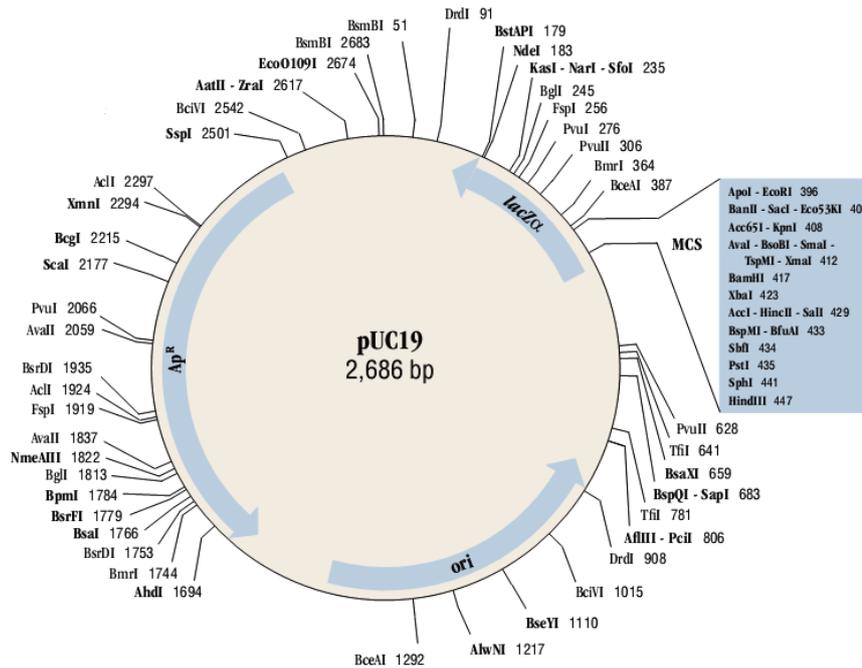


Abbildung 21: Genkartierung und Multiple cloning site (MCS) des *pUC19*-Vektors.⁸⁸

Dadurch werden sowohl Mutterplasmide ohne Mutation erhalten als auch Tochterplasmide, die die gewünschte Mutation tragen. Nach dem Ende der PCR kann das Mutterplasmid durch das Restriktionsenzym DpnI selektiv verdaut werden. Das Enzym DpnI schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA.⁸⁴ Das Mutterplasmid stammt aus *E. coli*-Bakterien und liegt daher in methylierter Form vor. Das Tochterplasmid ist nicht methyliert, wird dadurch nicht geschnitten und kann abschließend durch Transformation in Bakterien aufgenommen und vervielfältigt werden.^{84–87} Die Plasmid-DNA einzelner Bakterien-Klone wurde isoliert und zur DNA-Sequenzierung durch die Firma GATC geschickt. Enthielt die DNA die gewünschte Mutation, wurde sie für die Erstellung stabil transfizierter Zell-Linien eingesetzt.

4.3 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird die Rezeptor-DNA, anders als bei der transienten Transfektion, in das Zell-Genom integriert.⁸⁹ Die Zielzellen, im vorliegenden Fall 1321N1-Astrozytom-Zellen, exprimieren den gewünschten Rezeptor dauerhaft. 1321N1-Astrozytom-Zellen wurden als Zielzellen ausgewählt, da sie keine ATP-Antwort auslösen und daher spätere Messungen nicht durch ein endogenes ATP-Signal beeinflussen. Ihr Nachteil besteht jedoch in der aufwändigen Transfektionsmethode, die zur Bildung der stabilen Zell-Linien genutzt werden muss. 1321N1-Astrozytom-Zellen lassen sich nur über ein retrovirale Transfektionssystem (im Rahmen dieser Doktorarbeit durch Lentiviren) transfizieren.

4.4 Lentivirales Transfektionssystem

Lentiviren gehören zur Familie der *Retroviridae* und zeichnen sich aus durch ihre Fähigkeit, virale genomische Information in ein Wirtsgenom zu integrieren. Dafür nutzt das Virus die Enzyme virale reverse Transkriptase und Integrase. Gegenüber anderen Retroviren ist das Lentivirus in der Lage, sich auch in nicht teilenden Zellen zu vermehren.⁹⁰

4.4.1 Aufbau des HIV-1-Genoms

Die Mehrzahl der lentiviralen Vektoren basieren auf HIV-1. Das HIV-1-Genom ist 9 kb groß und codiert für neun virale Proteine (vgl. Abb 22). Es handelt sich um drei (Gag, Pol und Env) Strukturproteine, zwei Regulatorproteine (Tat und Rev) und vier Begleitproteine (Vif, Vpr, Vpu und Nef). Das virale Genom wird durch Long terminal repeats flankiert (LTRs), die für die virale Transkription, die reverse Transkription und die Integration benötigt werden. Das Verpackungssignal ψ liegt zwischen dem 5'-LTR und dem Gag-Gen.⁹⁰

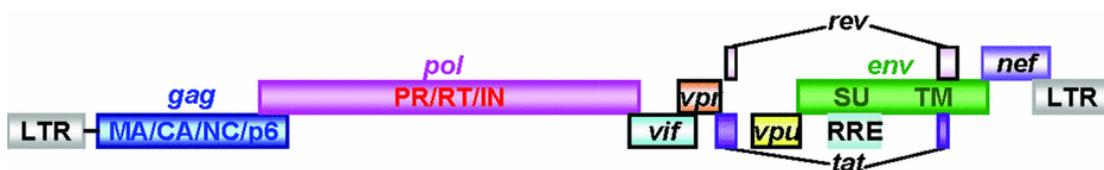


Abbildung 22: Aufbau des HIV-1-Genoms⁹⁰

4.4.2 Lenti-XTM: Lentivirales Verpackungssystem

Zur Transfektion von Zellen werden replikations-inkompetente Viren genutzt um ein Absterben der Zelle durch eine dauerhafte Produktion von Viren zu verhindern. Zusätzliche Modifikationen dienen zur Produktion hoher Konzentrationen sicherer Viren mit

hohem transgenen Expressionslevel. Im vorliegenden Fall wird das Lenti-X HTX Packaging System⁹¹ genutzt, bei dem das gewünschte Gen in einen Lenti-X-Expressionsvektor (vgl. Abb. 23) eingebracht wird.

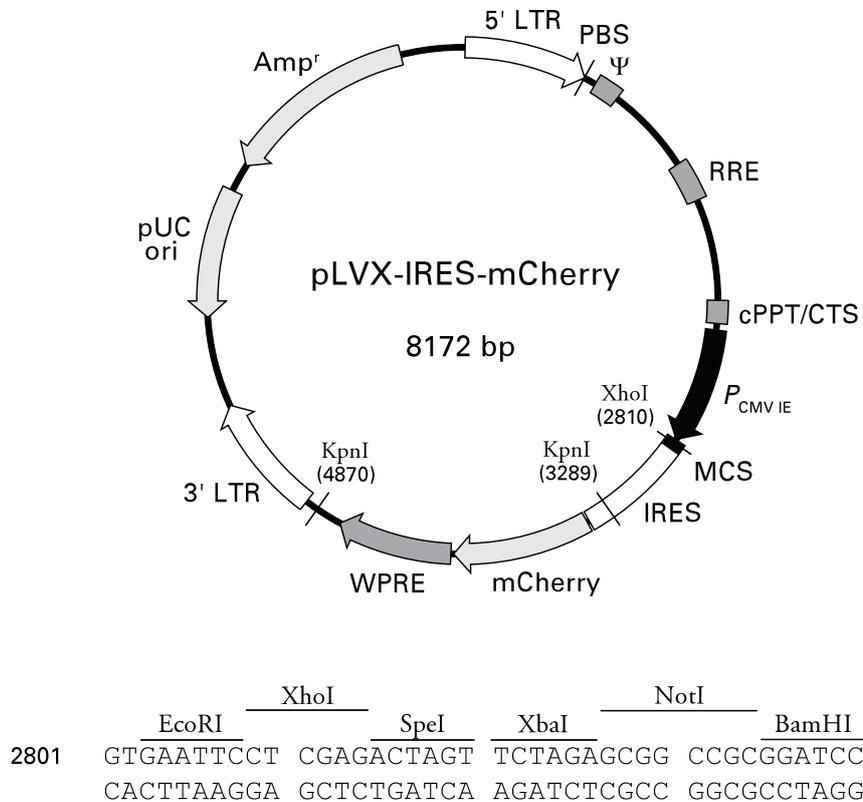


Abbildung 23: Vektorkarte und Multiple cloning site des pLVX-IRES-mCherry-Vektors⁹¹

Der pLVX-IRES-mCherry-Vektor ermöglicht die Koexpression von dem in den Vektor eingebrachten Gen und dem mCherry-Gen. Die Koexpression macht es möglich, mCherry als Indikator für die Transduktionseffizienz zu nutzen.⁹¹ mCherry ist ein mutiertes fluoreszierendes Protein aus dem tetrameren *Discosoma sp.* rot fluoreszierendem Protein DsRed. Um die Expression zweier Gene von einem Transkript zu ermöglichen, werden die beiden codierenden Regionen über eine *Internal ribosomal entry site* (IRES) miteinander verbunden.^{91–93} Als Promotor dient dabei ein Promotor des humanen Cytomegalie-Virus (P_{CMVIE}). Der pLVX-IRES-mCherry-Vektor besitzt darüber hinaus das posttranskriptionale regulatorische Element des Murmeltier-Hepatitis-Virus (WPRE). Dieses regulatorische Protein unterstützt die Weiterverarbeitung der RNA, erhöht die Transportquote der viralen RNA aus dem Zellkern und führt zu erhöhten viralen Titern der Verpackungszellen. Als zweites regulatorisches Element enthält der Vektor das Gen für RRE (Rev-response element), dass ebenfalls den Virustiter

erhöht. Dies geschieht durch eine Zunahme des Auswärtstransportes von ungespleißter viraler RNA aus dem Zellkern.⁹¹ Des Weiteren besitzt der Vektor ein Gen für ein Terminationselement (cPPT/CTS, central polypurine tract/central termination sequence), welches im Verlauf der Zielzell-Infektion den Import des viralen Genoms in den Zellkern steigert. Dadurch wird die Vektorintegration verbessert und die Transduktionsrate erhöht. Außerdem besitzt der Vektor einen pUC Replikationsursprung (pUC ORI) und ein *E.coli* Ampicillin-Resistenz-Gen (Amp), das die Amplifikation in Bakterien möglich macht.⁹¹ Um rekombinante Lentiviren zur Zielzellinfektion herzustellen, müssen ein spezielles Transfektions-Reagenz und der pLVX-IRES-mCherry-Vektor in Lenti-X293T-Zellen kotransfiziert werden. Diese Zellen enthalten kein Verpackungssignal. Das Reagenz besteht aus einer speziellen Zusammensetzung verschiedener Vektoren und exprimiert die wichtigen lentiviralen Proteine Pol, Tat, Rev und GAG sowie eine Umhüllung, die den viralen Tropismus bedingt.⁹¹ Diese resultiert aus dem vesikulärem Stomatitis-Virus (VSV-G). Der pLVX-IRES-mCherry-Vektor enthält neben den oben genannten Genen noch ein Verpackungssignal. In der Verpackungszelle kann nun aus den einzelnen Bausteinen ein komplettes, pseudotypisiertes Viruspartikel entstehen, das jedoch die Proteine Pol, Tat, Rev und Gag nicht selbst enthält und deshalb replikationsdefekt ist.⁹¹ Die Viren können anschließend zur Infektion der Astrozytom-1321N1-Zielzellen genutzt werden.

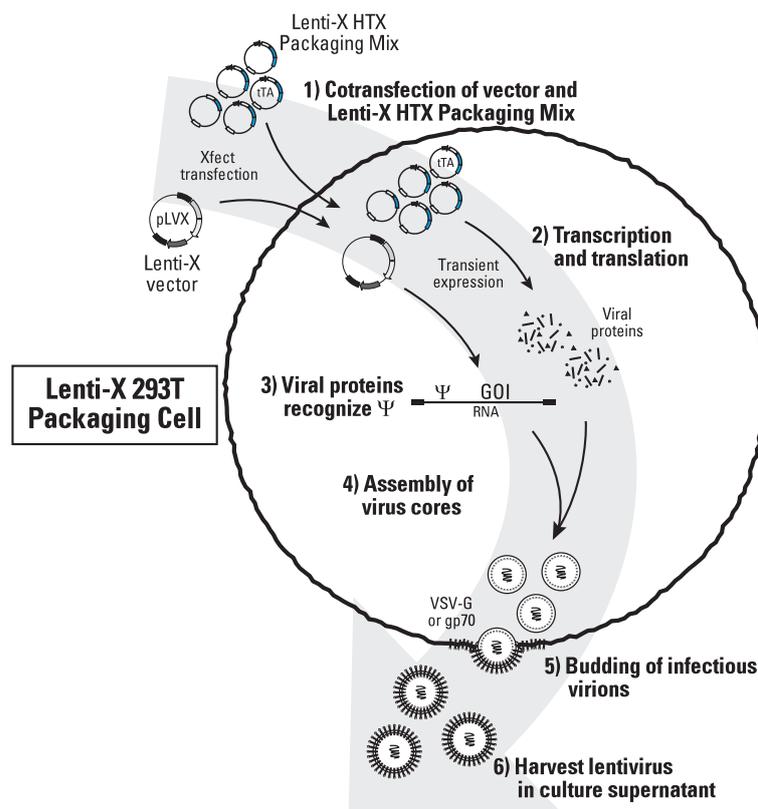


Abbildung 24: Übersicht über den Produktionsweg der Lentiviren⁹¹

4.4.3 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Die Analyse und Selektion positiv transfizierter Zellen erfolgte über *Fluorescence activated cell sorting* (FACS). Diese Methode macht es möglich, positiv transfizierte Zellen innerhalb eines definierten Wellenlängenbereiches über ihre Fluoreszenzmarkierung zu erkennen und zu isolieren. Zur Anregung des in erfolgreich transfizierten Zellen exprimierten mCherry-Proteins wurde eine Wellenlänge von 561 nm gewählt. Für die Emission wurde ein 610/20 nm Filter genutzt. Fluoreszierende Zellen wurden einzeln kultiviert und bis zur Konfluenz hochgezogen, um monoklonale Zell-Linien zu erhalten. Abbildung 25 zeigt den vereinfachten Aufbau eines FACS-Gerätes. Die Methode des FACS beruht auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie. Eine Zell-Suspension wird durch einen Zerstäuber transportiert und als Tropfen mit Zell-Inhalt durch einen Laserstrahl geleitet. Eine Zelle, die den Laserstrahl durchquert, wird für einen kurzen Moment beleuchtet. Der resultierende Fluoreszenz-Puls wird über ein Detektorsystem analysiert. Zellen mit gewünschten Fluoreszenzcharakteristika werden umgekehrt polarisiert und über ein elektrisches Feld geleitet, welches sie in ein Auffanggefäß aussortiert, im vorliegenden Fall in eine sterile 96-Well-Platte.⁹⁴

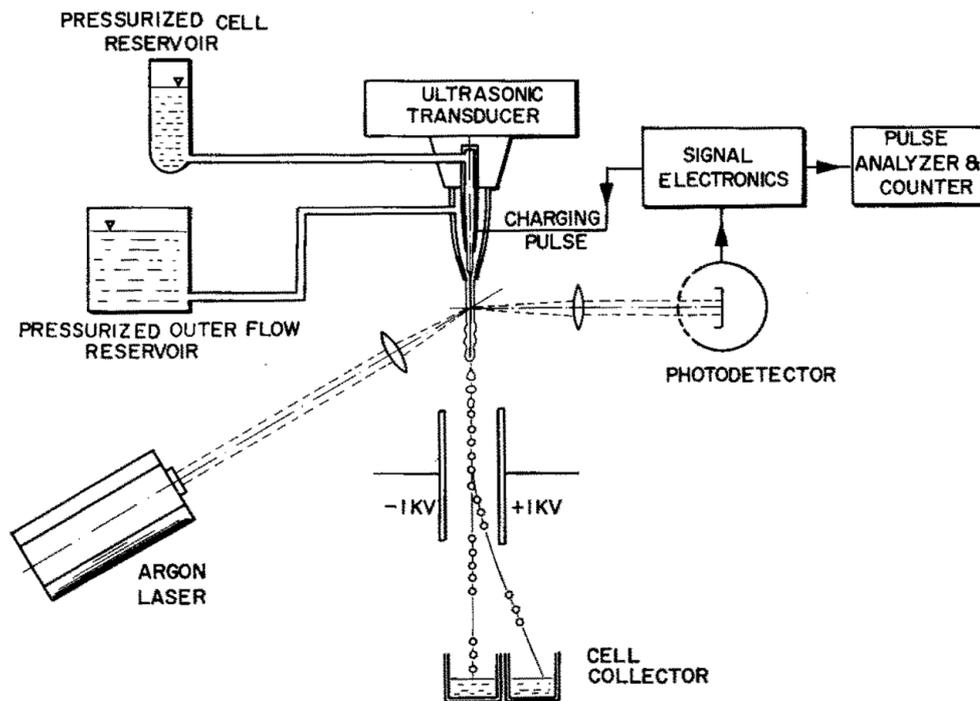


Abbildung 25: Vereinfachter Aufbau eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers.⁹⁴

4.5 Pharmakologische Charakterisierung

4.5.1 Calcium-Assay

Zur pharmakologischen Charakterisierung der mutierten P2X4-Rezeptoren wurde der ATP-induzierte Calcium-Ionen-Einstrom in die Zellen in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen an allosterischen Modulatoren gemessen. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Fluo-4 Direct[®] der Firma Invitrogen verwendet, das einen fluoreszierenden Indikator für Calcium darstellt. Das schematische Prinzip der Messung zeigt Abb. 26. Die nicht fluoreszierende Vorstufe Fluo-4-acetoxymethylester kann die Zellmembran passieren und wird innerhalb der Zellen durch Esterasen in die aktive Form Fluo-4 umgewandelt. Fluo-4 bildet mit Calcium-Ionen einen fluoreszierenden Chelatkomplex. Die Aktivierung des Rezeptors durch den Agonisten ATP führt zum Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen und als Folge der Bindung der Calcium-Ionen an Fluo-4 zur konzentrationsabhängigen Erhöhung der Fluoreszenz.⁹⁵ Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Messungen an adhärennten Zellen im 96-Well-Format an einem FlexStation[®] Microplate Reader durchgeführt.

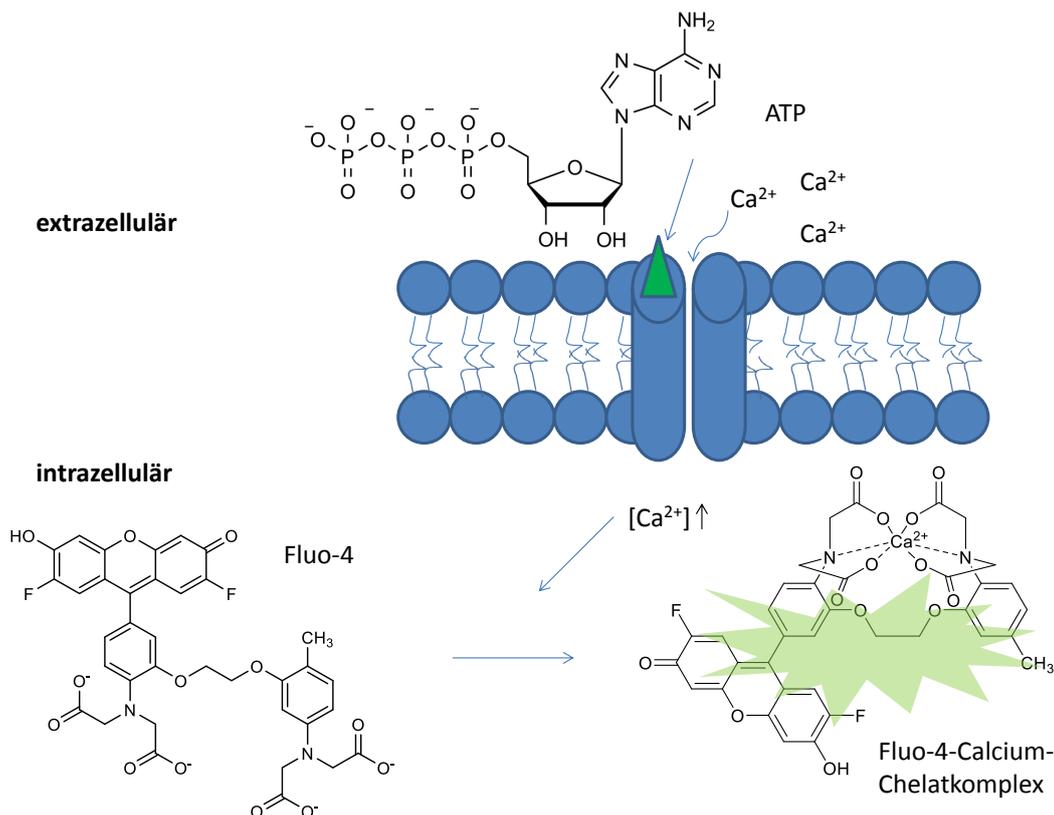


Abbildung 26: Prinzip des ATP-induzierten Calcium-Einstrom Assays. Als Fluoreszenzfarbstoff wird Fluo-4 verwendet.

5 Bildung von Rezeptorchimären zwischen dem humanen P2X4- und dem P2X2-Rezeptor

Ein erster Ansatz zur Ermittlung potentieller Bindungsstellen allosterischer Modulatoren am P2X4-Rezeptor war die Bildung von Rezeptorchimären. Dafür wurden, wie bereits beschrieben, Teilsequenzen (v1-v10) des humanen P2X4-Rezeptors gegen die entsprechenden Sequenzen des humanen P2X2-Rezeptors ausgetauscht. Der humane P2X2-Rezeptor wurde ausgewählt, da die zu testenden Verbindungen eine hohe Selektivität für den humanen P2X4-Rezeptor aufwiesen, während sie keine nennenswerte inhibitorische Potenz am humanen P2X2-Rezeptor zeigten. Die DNA-Sequenzen der P2X4(P2X2)-Chimären wurden durch De Novo-Synthesen von der Firma Invitrogen hergestellt. Über im Rahmen der Gen-Synthese eingefügte Restriktionsschnittstellen wurden die chimären Rezeptorgene mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI aus dem pMK-RQ-Vektor in den pLVX-IRES-mCherry-Vektor kloniert. Abbildung 27 und 28 zeigen exemplarisch das experimentelle Vorgehen für die P2X4(P2X2)-Chimären **c1**, **c7**, **c8** und **c10**.

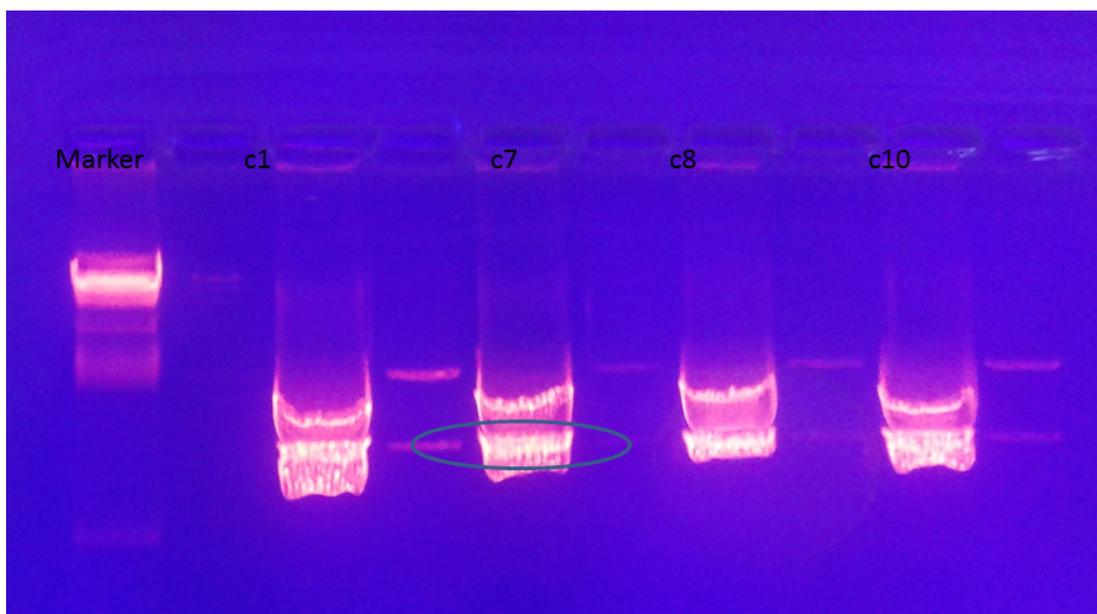


Abbildung 27: Umklonierung der chimären Rezeptorgene aus dem pMK-RQ-Vektor in den pLVX-IRES-mCherry-Vektor durch Restriktion mit den Enzymen EcoRI und BamHI. Die Markierung zeigt exemplarisch die Bande des jeweiligen Rezeptorgens, die ausgeschnitten und aufgereinigt wurde. c1: hP2X4 (V71-I83hP2X2), c7: hP2X4 (I218-D224hP2X2), c8: hP2X4 (R265-L269hP2X2), c10: hP2X4 (R301-Q308hP2X2)

Positive P2X4(P2X2)-Rezeptor-Klone wurden selektiert, der Rezeptor in 1321N1-Astrozytom-Zellen exprimiert (Abschnitt 4.4), positiv stabil transfizierte Zellen über FACS

(Abschnitt 4.4.3) selektiert und im fluorimetrischen ATP-induzierten Calcium-Einstrom-Assay pharmakologisch charakterisiert (Abschnitt 5.1 und 4.5.1).

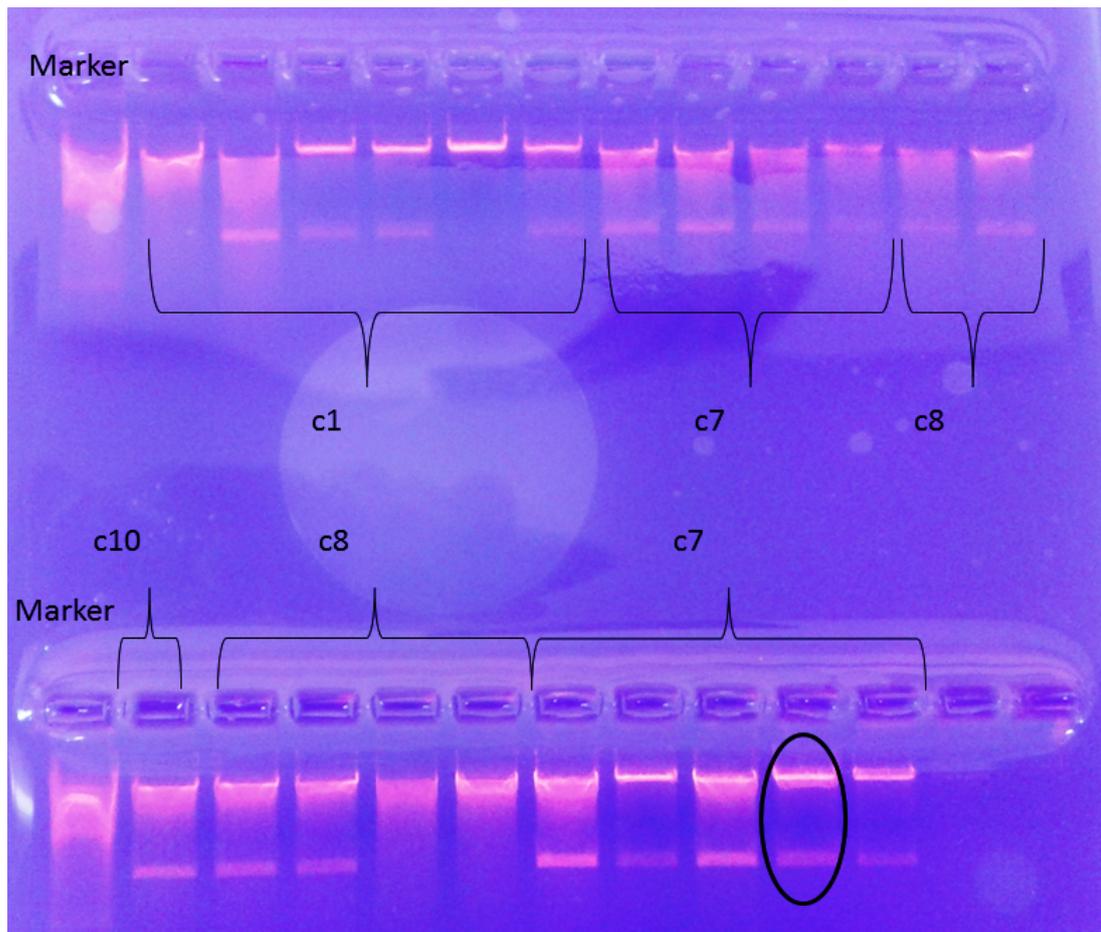


Abbildung 28: Kontrollrestriktion der $P2X_4$ ($P2X_2$)-Klone im $pLVX$ -IRES-mCherry Vektor mit $EcoRI$ und $BamHI$. Die Markierung zeigt exemplarisch einen positiven Klon, der anschließend zum Sequenzieren zur Firma GATC geschickt wurde. c1: $hP2X_4$ (V71-I83hP2X2), c7: $hP2X_4$ (I218-D224hP2X2), c8: $hP2X_4$ (R265-L269hP2X2), c10: $hP2X_4$ (R301-Q308hP2X2)

5.1 Pharmakologische Charakterisierung der P2X4(P2X2)-Rezeptor-chimären

Um die sieben chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren auf Funktionalität zu prüfen, wurde ihre Aktivierbarkeit durch den natürlichen Liganden ATP gemessen. Die Messgröße in diesem Testsystem stellt der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration dar. Jede Messung wurde mindestens drei Mal an jedem Rezeptor durchgeführt (n=3-5). Für jeden Rezeptor wurden der maximale Effekt von ATP und die ATP-Potenz (EC₅₀-Wert von ATP) ermittelt. Als Bezugsgröße für den maximalen ATP-Effekt wurden 100 μ M an Carbachol eingesetzt, einem Agonisten des natürlicherweise in den Astrozytoma-Zellen vorkommenden muscarinischen M3-Rezeptors. Die Ergebnisse an den P2X4(P2X2)-Rezeptoren wurden mit denen am humanen P2X4-Rezeptor verglichen und Abweichungen auf Signifikanz geprüft.

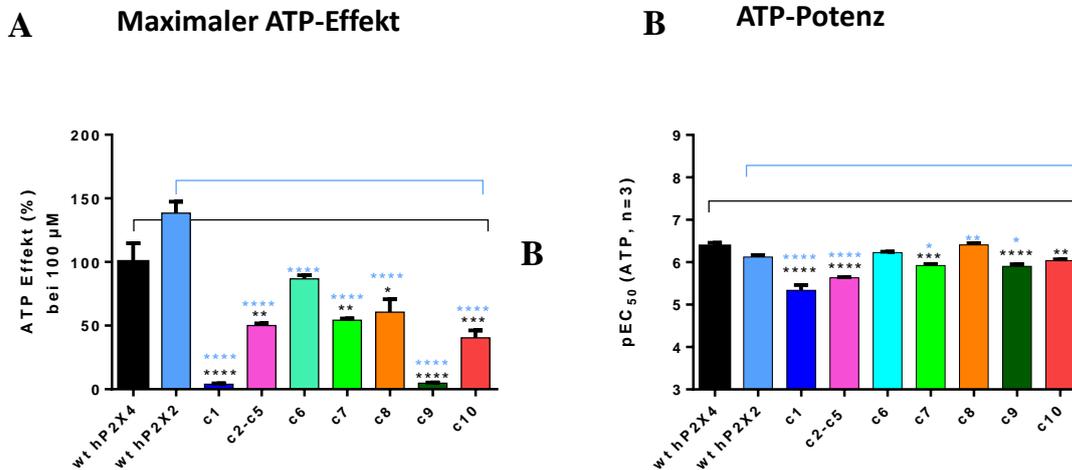


Abbildung 29: Calciumeinstrom-Experimente P2X4(P2X2)-Rezeptoren.

(A) Maximaleffekt von ATP in Bezug auf 100 μ M Carbachol an chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren im Vergleich zu den P2X4- und P2X2-Wildtypen, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytoma-Zellen. (B) ATP-Potenzen dargestellt als pEC₅₀-Werte \pm SEM. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X4-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

ATP induziert den Einstrom von Calcium mit EC₅₀-Werten von 0,354 μ M am P2X4- und 0,763 μ M am P2X2-Rezeptor (vgl. Tab. 8). Wie aus Abb. 30 und Abb. 29A und B ersichtlich sind alle chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren, mit Ausnahme von **c1** und **c9**, signifikant durch ATP aktivierbar. Der Austausch der großen Region C116-T186 in Chimäre **c2-c5** führte zu einem über 7-fach erhöhten Anstieg des EC₅₀-Wertes von ATP. Zusätzlich ist an dieser Chimäre der Maximaleffekt von ATP im Vergleich zum

P2X4-Rezeptor um 50 % reduziert. Für die Rezeptoren **c7** und **c10** konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden mit EC₅₀-Werten von 1,21 μM (**c7**) und 0,923 μM (**c10**) und maximalen ATP-Effekten von 54 % (**c7**) bzw. 40 % (**c10**). Für die chimären Rezeptoren **c6** und **c8** konnten keine signifikanten Unterschiede in den EC₅₀-Werten festgestellt werden (0,592 μM und 0,392 μM); die maximalen Effekte, die für ATP ermittelt werden konnten, lagen relativ hoch (87 % und 61 %).

Tabelle 8: Calciumeinstrom-Experimente P2X4(P2X2)-Rezeptoren. Stimulation des humanen P2X4-, des humanen P2X2- und der P2X4(P2X2)-Rezeptoren durch den Agonisten ATP. Dargestellt sind die maximalen ATP-Effekte in Relation zu 100 μM an Carbachol und die EC₅₀-Werte von ATP ± SEM. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X4-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Rezeptor		ATP	
Name	Sequenzvariante	EC ₅₀ ± SEM (μM)	Effekt (% ± SEM) bei 100 μM ATP
wt P2X4	-	0,357 ± 0,031	100 ± 15
wt P2X2	-	0,763 ± 0,083	139 ± 9
Chimäre c1	P2X4(P2X2V71-I83)	(4,83 ± 1,38****)	4 ± 1****
Chimäre c2-c5	P2X4(P2X2C116-T186)	2,32 ± 0,06****	50 ± 2**
Chimäre c6	P2X4(P2X2N208-S216)	0,592 ± 0,027	87 ± 3
Chimäre c7	P2X4(P2X2I218-D224)	1,21 ± 0,10***	54 ± 1**
Chimäre c8	P2X4(P2X2R265-L269)	0,392 ± 0,033	61 ± 10*
Chimäre c9	P2X4(P2X2T281-P290)	(1,28 ± 0,16****)	5 ± 1****
Chimäre c10	P2X4(P2X2R301-Q308)	0,923 ± 0,058**	40 ± 6***

Die Rezeptoren **c1** und **c9** zeigten eine sehr geringe Aktivierbarkeit durch ATP mit maximalen Effekten von nur 4-5 % (Abb. 29A) verglichen mit dem humanen P2X4-Wildtyp-Rezeptor. EC₅₀-Werte für ATP, 4,83 μM für **c1** und 1,28 μM für **c9**, konnten trotzdem noch abgeschätzt werden; sie scheinen nur moderat reduziert zu sein im Vergleich zu denen am wt P2X4-Rezeptor.

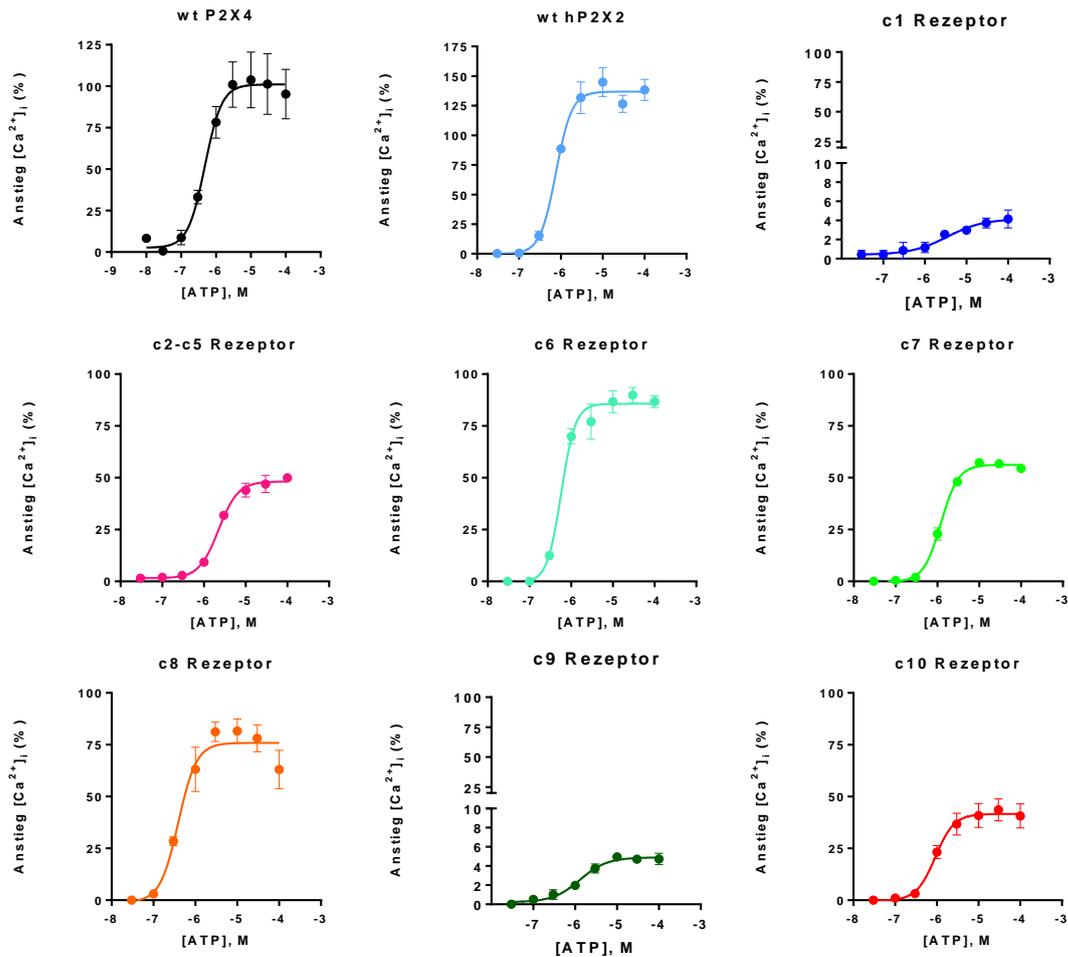


Abbildung 30: *Calciumeinstrom-Experimente P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.*

Konzentration-Wirkungskurven des natürlichen Liganden ATP an wt hP2X₄-, wt hP2X₂- und chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.

5.1.1 Zusammenfassung und Diskussion

Die Klonierung von sieben P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären und die Erstellung stabil transfizierter Zell-Linien war erfolgreich. Fünf der sieben mutierten Rezeptoren (**c2-c5**, **c6**, **c7**, **c8** und **c10**) zeigten gute Funktionalität. Die Rezeptorchimären **c1** und **c9** waren hingegen nur in geringem Maße durch ATP aktivierbar.

In einer früheren elektrophysiologischen Patch-Clamp-Studie wurde gezeigt, dass eine Mutation des Aminosäurerestes V291 im P2X₄-Rezeptor des Zebrafisches zu einem signifikanten Anstieg des EC₅₀-Wertes von ATP und gleichzeitig zu einer Reduktion des

maximalen ATP-Effekts führte.⁹⁶ Der Autor konnte darüber hinaus zeigen, dass Aminosäurereste in direkter Nähe zu den orthosterischen Bindungsstellen an koordinierten, essentiellen und für den P2X4-Rezeptor spezifischen allosterischen Konformationsänderungen beteiligt sind, die von der ATP-Bindung zur Kanalöffnung führen. Modifikationen im Bereich dieser Aminosäurereste hatten einen großen Einfluss auf die maximale ATP-Antwort des Rezeptors.⁹⁶ In den im Rahmen dieser Doktorarbeit beschriebenen Experimenten wurde die Region v9 des hP2X4-Rezeptors inklusive des Aminosäurerestes V291 (Nummerierung des zf P2X4-Rezeptors) gegen die entsprechende Sequenz des humanen P2X2-Rezeptors ausgetauscht, was ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der maximalen ATP-Antwort bei gleichzeitig steigendem EC₅₀-Wert von ATP führte. Die Regionen v1 und v9 befinden sich darüber hinaus in direkter Nachbarschaft zu den orthosterischen Bindungsstellen. Unsere Ergebnisse an den Chimären **c1** und **c9** unterstützen damit die Hypothese, dass essentielle allosterische Veränderungen in der Nähe der orthosterischen Bindungsstellen eine wichtige Rolle für die Rezeptorfunktionalität spielen. Sie bestätigen außerdem die Bedeutung der Region v9 inklusive des Aminosäurerestes V291, nicht nur für den zf P2X4-Rezeptor, sondern auch für den humanen P2X4-Rezeptor.

5.2 Einzelmutationen im Sequenzbereich v1, v2-v5 und v10

Zur detaillierten Analyse potentieller allosterischer Bindungsstellen am humanen P2X4-Rezeptor wurden als weitere Strategie im Sequenzbereich v1, v2-v5 und v10 einzelne Aminosäurereste mutiert, die mutierten Rezeptoren stabil exprimiert und pharmakologisch analysiert. Eine Übersicht über alle vorhandenen Einzelmutanten zeigt Tab 9.

Tabelle 9: Übersicht über alle generierten Einzelmutanten im humanen P2X4- oder in einem chimären P2X4(P2X2)-Rezeptor. In der Klammer steht der jeweilige Sequenzbereich, in dem sich die Mutation befindet.

hP2X4 (v2-v5)	hP2X4 (v10)	Chimäre c10 (v10)	Chimäre c10 (v1)
D121A	D302I	T306E	K78A
K127A	Q308T		
D129A	Q308A		
S131A	E307T		
T133A			
G138A			
H140A			
N142A			

5.3 Umklonierung des humanen P2X4-Gens in den pUC19-Vektor

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurde das humane P2X4-Rezeptor-Gen aus dem pQXCIN-Vektor in den kleineren pUC19-Vektor umkloniert. Dafür wurde ein Restriktionsverdau mit EcoRI und XbaI durchgeführt. Die Aufreinigung über ein Agarosegel ergab das folgende Bandenmuster (vgl. Abb. 31). Die Bande des hP2X4/EcoRI+XbaI-Fragmentes lag bei etwa 1800 kb.

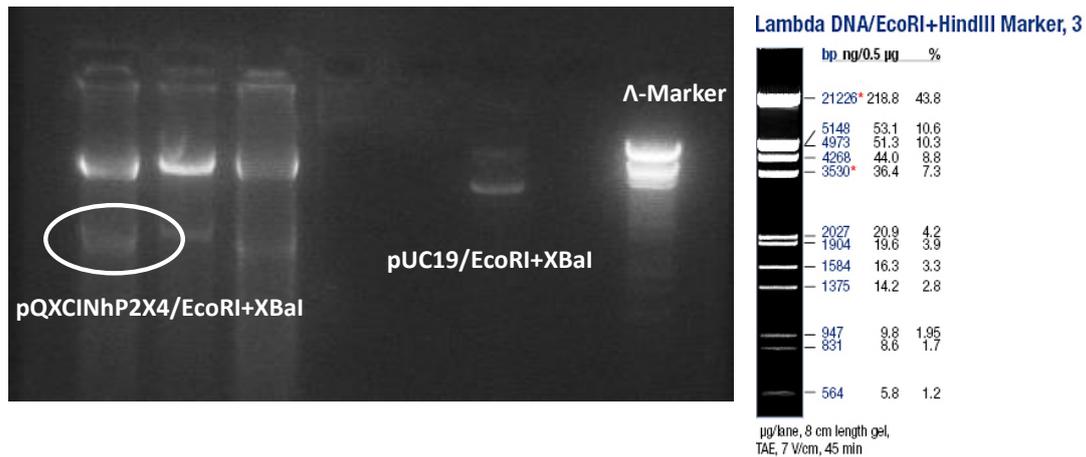


Abbildung 31: Geldokumentation der EcoRI und XbaI geschnittenen pQXCINhP2X4- und pUC19-Fragmente (Abb. Lambda-Marker⁹¹).

Nach der Ligation des hP2X4/EcoRI+XbaI-Fragmentes und des pUC19/EcoRI+XbaI-Fragmentes wurde die Plasmid-DNA in kompetente E.coli-Bakterien transformiert. Zur Analyse der erhaltenen Bakterien-Klone wurde ein Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA mit EcoRI/XbaI durchgeführt. Positive Klone zeigen im Agarose-Gel zwei Banden. Das Insert betrug etwa 1800 kb (vgl. Abb. 32).

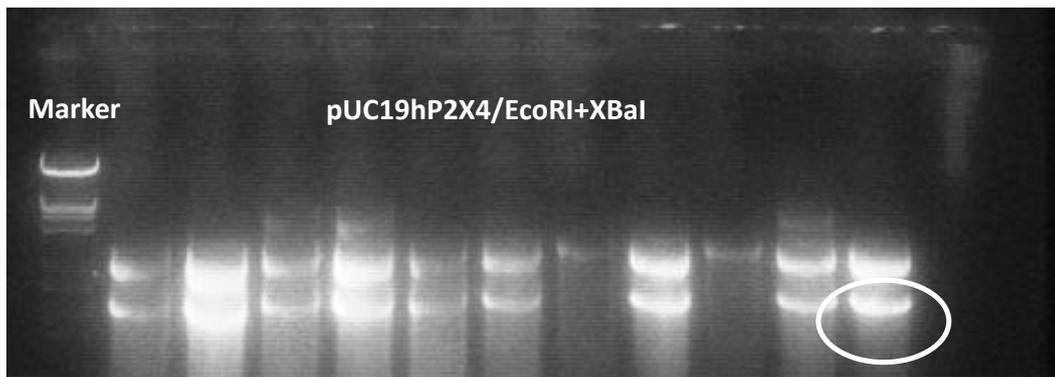


Abbildung 32: Geldokumentation der positiven *pUC19hP2X4*-Klone nach einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XbaI*. Das Insert beträgt ca. 1800 kb.

5.3.1 Zielgerichtete Mutagenese

Abbildung 33 zeigt einen Ausschnitt der DNA-Sequenz des humanen P2X4-Rezeptors im Bereich v2-v5. Die Aminosäurereste, die gegen Alanin ausgetauscht wurden, sind gelb markiert.

```

GTCATGACCAACGTGATCCTCACCATGAACCAGACACAGGGCCTGTGCCCCGAGATTCCA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CAGTACTGGTTGCACTAGGAGTGGTACTTGGTCTGTGTCCCGGACACGGGGCTCTAAGGT
101 V M T N V I L T M N Q T Q G L C P E I P -
GATGCGACCACTGTGTGTAATCAGATGCCAGCTGTACTGCCGGCTCTGCCGGCACCCAC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CTACGCTGGTGACACACATTTAGTCTACGGTCGACATGACGGCCGAGACGGCCGTGGGTG
121 D A T T V C K S D A S C T A G S A G T H -
AGCAACGGAGTCTCAACAGGCAGGTGCGTAGCTTTCAACGGGTCTGTCAAGACGTGTGAG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TCGTTGCCTCAGAGTTGTCCGTCCACGCATCGAAAAGTTGCCAGACAGTTCTGCACACTC
141 S N G V S T G R C V A F N G S V K T C E -

```

Abbildung 33: Ausschnitt der DNA-Sequenz des humanen *P2X4*-Rezeptors. Gelb markierte Aminosäurereste wurden gegen Alanin ausgetauscht.

In Abbildung 34 ist exemplarisch für die Mutante **hP2X4D129A** die Strategie des Basenaustausches erläutert. Das Primerpaar, das die Mutation (gelb) trägt und zueinander komplementär ist, wird im Rahmen der Mutagenese-PCR an die DNA angelagert.

```

GTCATGACCAACGTGATCCTCACCATGAACCAGACACAGGGCCTGTGCCCCGAGATCCA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CAGTACTGGTTGCACTAGGAGTGGTACTTGGTCTGTGTCCCGGACACGGGGCTCTAAGGT
a 101 V M T N V I L T M N Q T Q G L C P E I P -
CTGTGTGTAAATCAGCCGCCAGCTGTACTGCC
GATGCGACCACTGTGTGTAAATCAGATGCCAGCTGTACTGCCGGCTCTGCCGGCACCCAC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CTACGCTGGTGACACACATTTAGTCTACGGTCGACATGACGGCCGAGACGGCCGTGGGTG
GACACACATTTAGTCCGGTCGACATGACGG
a 121 D A T T V C K S D A S C T A G S A G T H -
AGCAACGGAGTCTCAACAGGCAGGTGCGTAGCTTTCAACGGGTCTGTCAAGACGTGTGAG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TCGTTGCCTCAGAGTTGTCCTCCAGCATCGAAAGTTGCCCAGACAGTTCTGCACACTC
a 141 S N G V S T G R C V A F N G S V K T C E -
hP2X4D129A-f CTGTGTGTAAATCAGCCGCCAGCTGTACTGCC
hP2X4D129A-r GGCAGTACAGCTGGCGGCTGATTACACACAG

```

Abbildung 34: Anlagerung des definierten Mutageneseprimers an die DNA-Sequenz (Ausschnitt) des humanen P2X4-Rezeptors.

Das Plasmid wird amplifiziert, wodurch sowohl Mutter- als auch die Mutation tragende Tochterplasmide entstehen. Nach dem Ende der PCR kann das Mutterplasmid durch das Restriktionsenzym DpnI, das spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet, selektiv restringiert werden. Der Ansatz wird anschließend in kompetente E.coli-Bakterien transfomiert. Zur abschließenden Identifizierung positiver Mutageneseklone wurde die isolierte Plasmid-DNA durch die Firma GATC-Biotech sequenziert und über das BLAST[®]-Programm analysiert. In Abb. 35 ist exemplarisch das Ergebnis der Analyse der Mutante hP2X4D129A dargestellt. Die eingefügte Mutation ist gelb markiert.

```

Query 368 TCCCTCTTCGTCATGACCAACGTGATCCTCACCATGAACCAGACACAGGGCCTGTGCCCC 427
|||||
Sbjct 596 TCCCTCTTCGTCATGACCAACGTGATCCTCACCATGAACCAGACACAGGGCCTGTGCCCC 655

Query 428 GAGATTCAGATGCGACCACTGTGTGTAAATCAGCCGCCAGCTGTACTGCCGGCTCTGCC 487
|||||
Sbjct 656 GAGATTCAGATGCGACCACTGTGTGTAAATCAGATGCCAGCTGTACTGCCGGCTCTGCC 715

Query 488 GGCACCCACAGCAACGGAGTCTCAACAGGCAGGTGCGTAGCTTTCAACGGGTCCGTC AAG 547
|||||
Sbjct 716 GGCACCCACAGCAACGGAGTCTCAACAGGCAGGTGCGTAGCTTTCAACGGGTCTGTCAAG 775

```

Abbildung 35: Ergebnis der DNA-Sequenzierung (Ausschnitt) der Mutante D129A; gelb: eingefügte Mutation.

5.4 Umklonierung in den pLVX-IRES-mCherry-Vektor

1321N1-Astrozytom Zielzellen wurden über das Lenti-XTM lentivirale Verpackungssystem mit der mutierten P2X4-Rezeptor-DNA transfiziert. Dies erforderte eine Umklonierung der mutierten Rezeptor-DNA in den bicistronischen pLVX-IRES-mCherry-Vektor.

Dieser erlaubt die Koexpression des gewünschten Rezeptorgens neben dem fluoreszierenden mCherry-Protein zur Identifikation positiv transfizierter Zellen. Dafür wurden die DNA der Mutageneseklone mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, fehlende Basenpaare aufgefüllt und anschließend eine Restriktion mit NotI durchgeführt. Das pLVX-IRES-mCherry-Plasmid wurde mit BamHI verdaut, überhängende Basen aufgefüllt und anschließend mit NotI verdaut. Die erhaltenen Fragmente wurden ligiert und in kompetente E.coli-Bakterien transformiert. Zur Analyse der erhaltenen Klone wurde ein Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA mit EcoRI und SacII durchgeführt. In Abb. 36 ist beispielhaft das Ergebnis des Restriktionsverdaus der Mutante hP2X4D129A dargestellt.

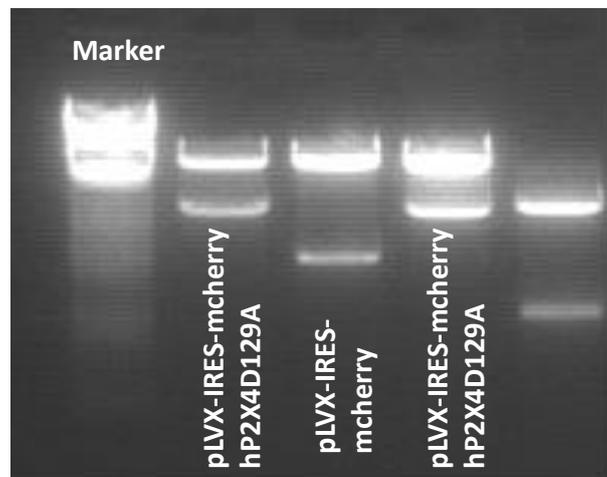


Abbildung 36: Geldokumentation der Umklonierung von hP2X4D129A aus pUC19 in den pLVX-IRES-mCherry-Vektor. Der Restriktionsverdau wurde mit EcoRI HF und SacII durchgeführt.

Positive pLVX-IRES-mCherry P2X4-Rezeptorklone mit Einzelmutation wurden zur Erstellung stabil transfizierter Zell-Linien genutzt.

5.5 Pharmakologische Charakterisierung von Rezeptoren mit Einzelmutation

Zur Charakterisierung der Rezeptormutanten wurde, wie bereits beschrieben, der ATP abhängige Calcium-Einstrom in die Zellen gemessen. Dazu wurden Konzentrations-Wirkungskurven des natürlichen Liganden ATP aufgenommen und die maximalen ATP-Effekte sowie die EC_{50} -Werte von ATP gemessen und mit den erzielten Werten am P2X₄-Wildtyp bzw. an der Chimäre **c10** verglichen. Alle einzelmutierten Rezeptoren konnten durch ATP aktiviert werden (Abb. 37). An den Mutanten **E307T** (47 %), **Q308T** (53 %) und **D302I** (39 %) waren die maximalen Effekte von ATP signifikant reduziert. Die ATP-Potenzen der verschiedenen Mutanten waren größtenteils unverändert. Lediglich an der Mutante P2X₄**E307T** war der EC_{50} -Wert mit 0,865 μ M gegenüber 0,357 μ M am hP2X₄-Rezeptor, geringfügig erhöht (vgl. Tab. 10). Am mutierten c10**K78A**-Rezeptor lag die ATP-Potenz verglichen mit der unmutierten Chimäre **c10** etwas höher. Mit 0,598 μ M bewegte sich der EC_{50} -Wert stattdessen im Bereich des humanen P2X₄-Wildtyps.

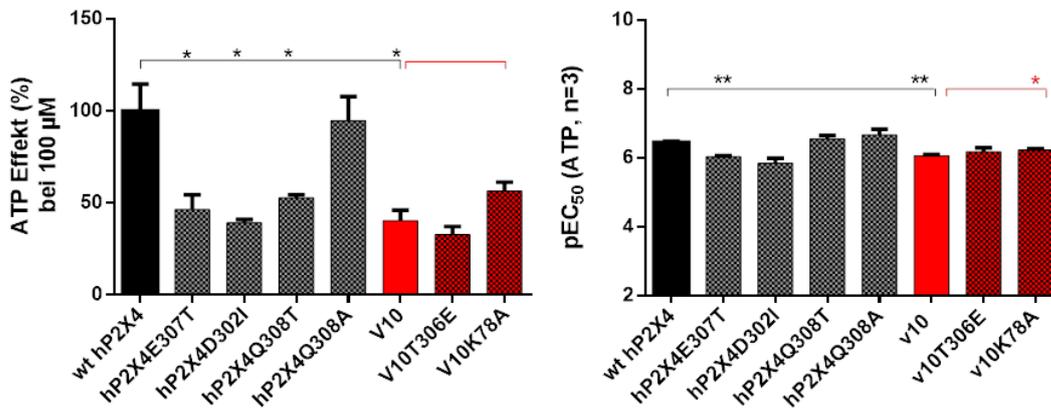


Abbildung 37: Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄- und P2X₄(P2X₂)-Rezeptormutanten.

Links: ATP-Effekte (100 μ M) Rechts: ATP-Potenzen als pEC_{50} -Werte \pm SEM an humanen P2X₄-, chimären c10- und einzelmutierten P2X₄- oder c10-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytoma-Zellen, im Vergleich zum humanen P2X₄-Wildtyp bzw. zur Chimäre c10. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

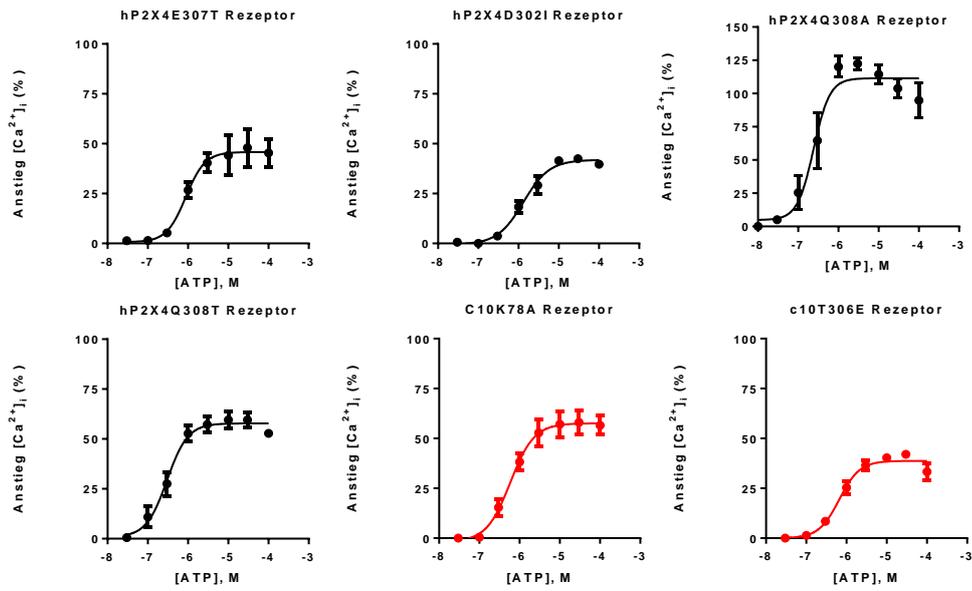


Abbildung 38: *Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄- und P2X₄(P2X₂)-Rezeptormutanten.*
Konzentrations-Wirkungskurven von ATP an einzelmutierten hP2X₄- und c10-Rezeptoren.

Tabelle 10: Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄- und P2X₄(P2X₂)-Rezeptormutanten.

Wirksamkeit und Potenz von ATP an humanen P2X₄-, chimären c10- und einzelmutierten P2X₄- oder c10- Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytoma-Zellen, in Relation zu 100 μM Carbachol. Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp bzw. der Chimäre c10: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.

Rezeptor	ATP	
Name	EC ₅₀ ± SEM (μM)	ATP-Effekt ± SEM (%)
wt P2X4	0,357 ± 0,031	100 ± 15
P2X4 E307T	0,865 ± 0,011 **	47 ± 8 *
P2X4 D302I	1,60 ± 0,59	39 ± 2 *
P2X4 Q308T	0,295 ± 0,073	53 ± 2 *
P2X4 Q308A	0,248 ± 0,094	95 ± 13
Chimäre V10	0,862 ± 0,068 **	40 ± 6 *
V10 T306E	0,717 ± 0,210	33 ± 4
V10 K78A	0,598 ± 0,060 *	57 ± 5

5.5.1 Charakterisierung von P2X4-Rezeptoren mit Einzelmutation im Bereich v2-v5

Zur Charakterisierung der Rezeptormutanten wurden erneut Konzentrations-Wirkungskurven von ATP aufgenommen (Abb. 39).

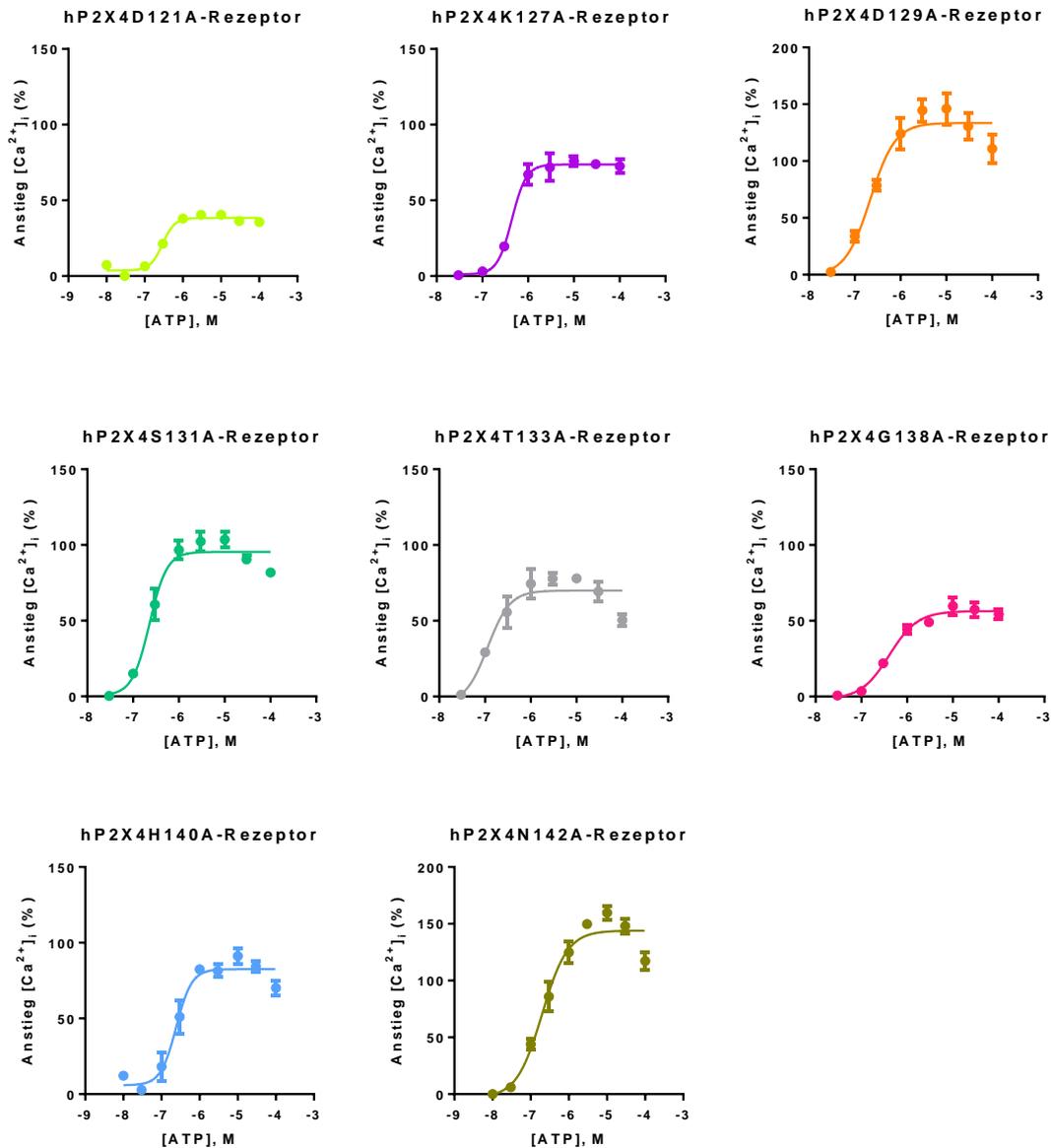


Abbildung 39: Calciumeinstrom-Experimente an P2X4-Rezeptoren mit Alaninmutation im Sequenzbereich v2-v5.

Konzentrations-Wirkungskurven von ATP an humanen P2X4-Rezeptoren mit Alaninmutation im Sequenzbereich v2-v5.

Alle P2X4-Rezeptormutanten konnten durch ATP aktiviert werden. An den Mutanten **D121A**, **T133A** und **G138A** war die Wirksamkeit von ATP signifikant erniedrigt (vgl. Abbildung 40 und Tab. 11). An den übrigen Mutanten waren die ATP-Effekte, verglichen mit dem humanen P2X4-Rezeptor Wildtyp, nicht signifikant verändert. Die

EC₅₀-Werte von ATP waren an allen Mutanten unverändert gegenüber dem P2X₄-Rezeptor Wildtyp.

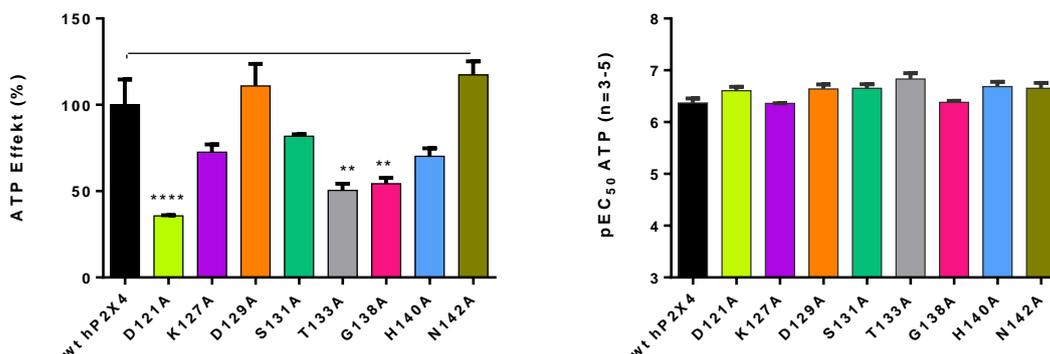


Abbildung 40: Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄-Rezeptoren mit Alaninmutation im Sequenzbereich v2-v5.

Links: ATP-Potenzen als pEC₅₀-Werte ± SEM an humanen P2X₄-Rezeptoren mit Alaninmutation im Sequenzbereich v2-v5, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytoma-Zellen, und rechts: Wirksamkeit von ATP bezogen auf 100 μM Carbachol. Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung vom humanen P2X₄-Rezeptor Wildtyp wurden angenommen, wenn $p < 0.05$; (**) wenn $p < 0.01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.

Tabelle 11: Calciumeinstrom-Experimente an P2X4-Rezeptoren mit Alaninmutation im Sequenzbereich v2-v5.

Potenzen und Wirksamkeit von ATP \pm SEM in Relation zu 100 μ M Carbachol. Ergebnisse eines one-way ANOVA mit nachfolgendem Dunnetts-Test im Vergleich zum humanen P2X4-Rezeptor. Signifikanz (*) wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.

Verbindung	ATP	
Rezeptor	EC ₅₀ \pm SEM (μ M)	ATP-Effekt \pm SEM (%) bei 100 μ M
wt hP2X4	0,357 \pm 0,031	100 \pm 15
hP2X4 H140A	0,221 \pm 0,050	85 \pm 15
hP2X4 G138A	0,421 \pm 0,030	54 \pm 4**
hP2X4 D129A	0,248 \pm 0,047	110 \pm 13
hP2X4 D121A	0,259 \pm 0,035	36 \pm 1****
hP2X4 N142A	0,251 \pm 0,060	117 \pm 8
hP2X4 S131A	0,230 \pm 0,045	82 \pm 1
hP2X4 K127A	0,435 \pm 0,005	73 \pm 5
hP2X4 T133A	0,159 \pm 0,044	51 \pm 4**

5.5.2 Zusammenfassung und Diskussion

Die Klonierung von vier humanen P2X4-Rezeptoren mit Einzelmutation im Variationsbereich v10, acht humanen P2X4-Rezeptoren mit Einzelmutation zu Alanin im Variationsbereich v2-v5 sowie von zwei P2X4(P2X2)**c10**-Rezeptormutanten mit jeweils einer Einzelmutation in den Bereichen v1 und v10 und die Herstellung stabil transfizierter Zell-Linien war erfolgreich.

Alle P2X4-Rezeptormutanten zeigten gute Funktionalität und mit dem humanen P2X4-Rezeptor-Wildtyp vergleichbare ATP-Potenzen, mit Ausnahme der Mutante **E307T** (geringfügig erhöhter EC_{50} -Wert). An den Rezeptormutanten **P2X4D302I**, **P2X4E307T**, **P2X4Q308T**, **P2X4D121A**, **P2X4T133A** und **P2X4G138A** waren jedoch die Effekte von 100 μ M ATP signifikant reduziert. Die P2X4(P2X2)**c10**-Rezeptormutanten zeigten gegenüber der Chimäre **c10** keine signifikante Änderung der ATP-Effekte, jedoch war die ATP-Potenz an der **c10K78A**-Mutante geringfügig erhöht.

Es konnte bereits durch die Bildung von P2X4(P2X2)-Rezeptorchimären gezeigt werden, dass Modifikationen im Bereich der Aminosäurereste V71-I83 (v1) in Nähe der ATP-Bindungsstellen K67 und K69 einen großen Einfluss auf die maximale ATP-Antwort des Rezeptors haben. Der Austausch der variablen Region v1 führte zu einem Rezeptor mit geringer Funktionalität. Die alleinige Mutation des polaren Aminosäurerestes **K78** zu Alanin in Bereich v1 in Chimäre **c10** reichte aus um den maximalen Effekt von ATP signifikant zu reduzieren. Dies könnte auf die Beteiligung des Lysinrestes in Position 78 in von der ATP-Bindung zur Kanalöffnung führende Prozesse zurückzuführen sein (vgl. *Zhao et al.*⁹⁶).

Die Aminosäurereste **D302**, **E307** und **Q308** liegen innerhalb des Variationsbereiches v10, in Nähe der ATP-Bindungsstellen R295, N293 und K313. Der komplette Austausch dieses Bereiches in Chimäre **c10** führte ebenfalls zu einem reduzierten ATP-Effekt. Möglicherweise verändern die eingefügten Mutationen die Konformation des Rezeptors. Da die Mutation des Glutaminrestes zu einem polaren Threoninrest in Position 308 bei vergleichbarer ATP-Potenz zu einem reduzierten ATP-Effekt führte, jedoch der Austausch der gleichen Position gegen einen Alaninrest keinen veränderten ATP-Effekt bedingte, scheint in diesem Fall die Auswahl des eingefügten Aminosäurerestes eine entscheidene Rolle gespielt zu haben. Da sich in Chimäre **c10** durch den Austausch der variablen Region v10 in Position 308 ebenfalls eine Threoninrest befindet, könnte dies daraufhin deuten, dass ein polarer Threoninrest in Position 308 (indirekt) zu einer Reduzierung des ATP-Effektes beiträgt.

Die mutierten Aminosäurereste **D121**, **T133**, **G138** liegen in großer Entfernung von den orthosterischen Bindungsstellen. Ein direkter Einfluss der entsprechenden Aminosäurereste auf die Höhe des ATP-Effektes ist daher unwahrscheinlich. Darüber hinaus

konnten in experimentellen Studien durch Coddou *et al.* an den Mutanten **H140A**, **T133A** und **D138A** im Ratten-P2X4-Rezeptor keine Veränderungen des ATP-Effekts festgestellt werden.⁴⁷

Die Überprüfung der Expressionslevel aller Rezeptormutanten steht noch aus.

6 Identifizierung von Bindungsstellen neuer allosterischer P2X4-Rezeptor-Antagonisten

Auf der Suche nach neuen potenten und selektiven P2X4-Rezeptor-Antagonisten wurden verschiedene Strukturklassen (SK) identifiziert, die den P2X4-Rezeptor mit moderater bis sehr guter Potenz hemmen und Selektivität gegenüber anderen P2X-Rezeptoren zeigen. Die chemischen Strukturen sind aus patentrechtlichen Gründen nicht dargestellt. Für die Experimente zur Identifizierung möglicher Bindungsstellen am P2X4-Rezeptor wurde stellvertretend für jede Strukturklasse eine Leitverbindung (vgl. Abb. 41) ausgewählt, die in fluoreszenzdetektierten Calciumeinstrom-Experimenten an den P2X4(P2X2)-Chimären auf ihre inhibitorische Potenz getestet wurde. Konnten im Rahmen dieser Versuchsreihen für die Potenzen der Leitverbindungen signifikante Abweichungen vom P2X4-Rezeptor-Wildtyp beobachtet werden, wurden zunächst weitere Vertreter der betreffenden Strukturklasse an der entsprechenden Rezeptorchimäre getestet.

Strukturklasse I.1

hP2X4: **0,0354** ± 0,0029
 hP2X2: > **10**
 hP2X7: **2,38** ± 0,78

Strukturklasse II.1

hP2X4: **0,679** ± 0,072
 hP2X2: **18,3** ± 2,7
 hP2X7: **10,1** ± 2,8

Strukturklasse III.1

hP2X4: **0,154** ± 0,029
 hP2X2: > **10**
 hP2X7: **0,315** ± 0,035

Abbildung 41: Ausgewählte Leitverbindungen verschiedener Strukturklassen (SKI-III) mit P2X₄-Rezeptor antagonistischer Aktivität und Selektivität gegenüber anderen P2X-Rezeptor-Subtypen. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM in μM aus 3-5 Experimenten.

6.1 Allosterische Antagonisten: Strukturklasse I (SKI)

Die Leitverbindung SKI.1 der Strukturklasse I hemmte den humanen P2X4-Rezeptor mit einem IC₅₀-Wert von 0,0354 μM. An humanen P2X1- und P2X2-Rezeptoren konnte keine signifikante Inhibition gemessen werden (Tab 12). An humanen P2X3- und P2X7-Rezeptoren waren die inhibitorischen Potenzen der Verbindung signifikant niedriger mit IC₅₀-Werten von 1,46 μM und 2,38 μM.

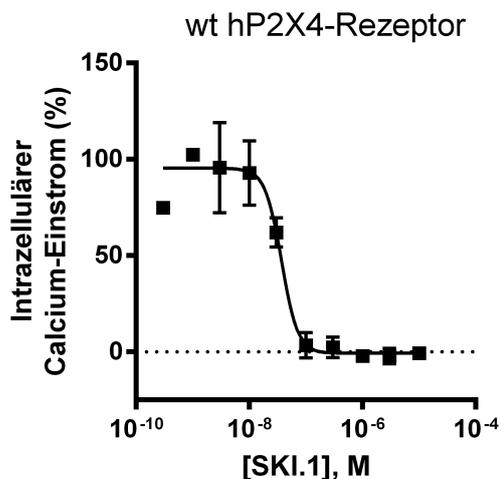


Abbildung 42: Calciumeinstrom-Experimente am humanen P2X4-Rezeptor.

Konzentrations-Wirkungskurve des allosterischen Antagonisten **SKI.1** am humanen P2X4-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytomazellen. Zur Aktivierung des Rezeptors wurde eine ATP-Konzentration verwendet, die dem EC₈₀-Wert entspricht. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 3 Experimenten.

Tabelle 12: Calciumeinstrom-Experimente an P2X-Rezeptoren.

Selektivität der Verbindung **SKI.1** gegenüber anderen P2X-Subtypen. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten.

Rezeptor	SKI.1
Name	IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt P2X1	> 10
wt P2X2	> 10
wt P2X3	1,46 ± 0,03
wt P2X4	0,0354 ± 0,0029
wt P2X7	2,38 ± 0,78

6.1.1 Testergebnisse von SKI.1 an chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren

Um die Aktivität der Verbindung an den mutierten P2X4-Rezeptoren zu messen, wurden Konzentrations-Wirkungskurven (Abb. 44) von **SKI.1** an allen funktionellen chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren aufgenommen. Während die Verbindung die Chimären **c2-c5** und **c10** mit unveränderter Potenz hemmte, die IC₅₀-Werte betragen 0,0388 bzw. 0,0432 μM, zeigten sich an den Chimären **c6**, **c7** und **c8** signifikante Abweichungen von 0,0354 μM am humanen P2X4-Rezeptor-Wildtyp (Abb. 43 und Tab. 13).

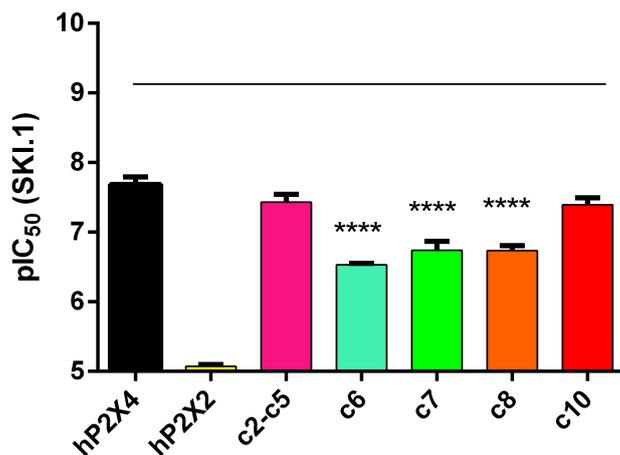


Abbildung 43: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X4-(P2X2)-Rezeptoren.

Allosterische Modulation chimärer P2X4(P2X2)-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytomazellen, durch den allosterischen Antagonisten SKI.1. Dargestellt sind die Potenzen von SKI.1 als pIC₅₀-Werte ± SEM an P2X4(P2X2)-Rezeptorchimären im Vergleich zu den Potenzen an P2X4- und P2X2-Wildtyprezeptoren. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X4-Wildtyp: Signifikanz () der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)*

Mit 0,294 μM war der IC₅₀-Wert an der Chimären **c6** im Vergleich zum P2X4-Wildtyp 8-fach erhöht. Ähnliches konnte an den chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren **c7** und **c8** beobachtet werden. Die IC₅₀-Werte lagen mit 0,197 (an **c7**) bzw. 0,189 μM (an **c8**) 6-fach bzw. 5-fach höher als am P2X4-Rezeptor-Wildtyp.

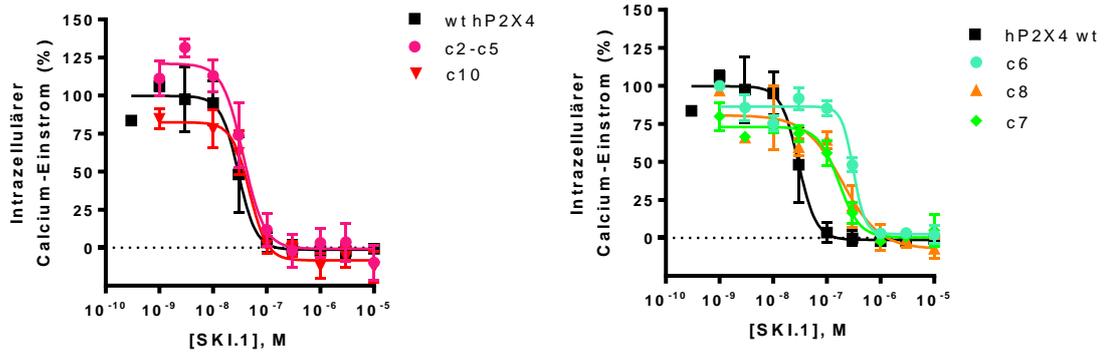


Abbildung 44: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.*

Konzentrations-Wirkungskurven von SKI.1 an humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären.

Tabelle 13: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.*

Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytomazellen durch den allosterischen Antagonisten SKI.1. Dargestellt sind die Potenzen von SKI.1 als IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz () der Abweichung wurde angenommen, wenn p < 0,05; ** wenn p < 0,01; *** wenn p < 0,001 und **** wenn p < 0,0001.)*

Rezeptor	Sequenzvariation	SKI.1
		IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt P2X4	-	0,0354 ± 0,0029
wt P2X2	-	> 10
Chimäre c2-c5	P2X4 (C116-T186P2X2)	0,0388 ± 0,0090
Chimäre c6	P2X4 (N208-S216P2X2)	0,294 ± 0,014****
Chimäre c7	P2X4 (I218-D224P2X2)	0,197 ± 0,050****
Chimäre c8	P2X4 (R265-L269P2X2)	0,189 ± 0,031****
Chimäre c10	P2X4 (R301-Q308P2X2)	0,0432 ± 0,0086

6.1.2 Testung von SKI.1-Analoga an chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren

Zur Bestätigung und zur weiteren Untersuchung der signifikanten Effekte der Verbindung **SKI.1** an den Chimären **c6**, **c7** und **c8** wurden vier weitere Strukturanaloga an den entsprechenden Rezeptoren getestet. Erneut wurden Konzentrations-Wirkungskurven aufgenommen und die Potenzen der Verbindungen in Form der IC_{50} -Werte ermittelt (Abb. 45 und 46).

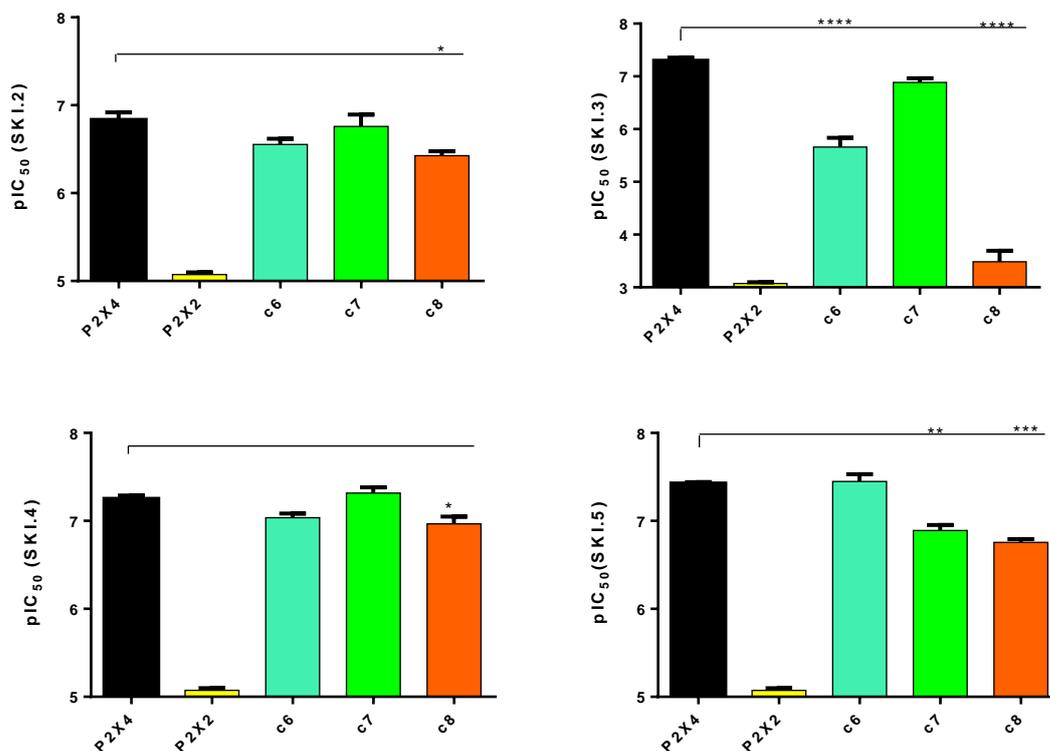


Abbildung 45: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X4(P2X2)-Rezeptoren.

Modulation chimärer P2X4(P2X2)-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytoma-Zellen, durch SKI.1-Analoga im Vergleich zum humanen P2X4-Rezeptor. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als pIC_{50} -Werte \pm SEM aus 3-5 Experimenten. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X4-Wildtyp: Signifikanz () der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)*

Die Testergebnisse variierten je nach Verbindung deutlich. **SKI.2** zeigte an der Chimären **c8** (IC_{50} 0,381 μ M) eine sehr geringe signifikante Abweichung in der Potenz vom P2X4-Wildtyp (IC_{50} 0,193 μ M). An allen anderen Chimären war die Potenz der Verbindung nahezu unverändert. Anders sahen die Ergebnisse für die Verbindung **SKI.5** aus. In diesem Fall waren die IC_{50} -Werte mit 0,132 μ M an **c7** und 0,176 μ M an **c8** gegenüber

0,0375 μM am P2X4-Rezeptor 4-5-fach erhöht. Deutlich ausgeprägter war der Effekt auch für die Verbindung **SKI.3**. Mit einem IC_{50} -Wert von $> 10 \mu\text{M}$ war **SKI.3** kaum noch aktiv an der Mutante **c8**. Zusätzlich konnten starke signifikante Veränderungen in ihrer Affinität zu den Chimären **c6** und **c7** gemessen werden. Einem IC_{50} -Wert von 0,0512 μM am P2X4-Rezeptor-Wildtyp standen IC_{50} -Werte von 2,50 μM an **c6** und 0,134 μM an **c7** gegenüber. Für die Verbindung **SKI.4** konnten hingegen nur geringe signifikante Abweichungen an der Chimären **c8** gemessen werden.

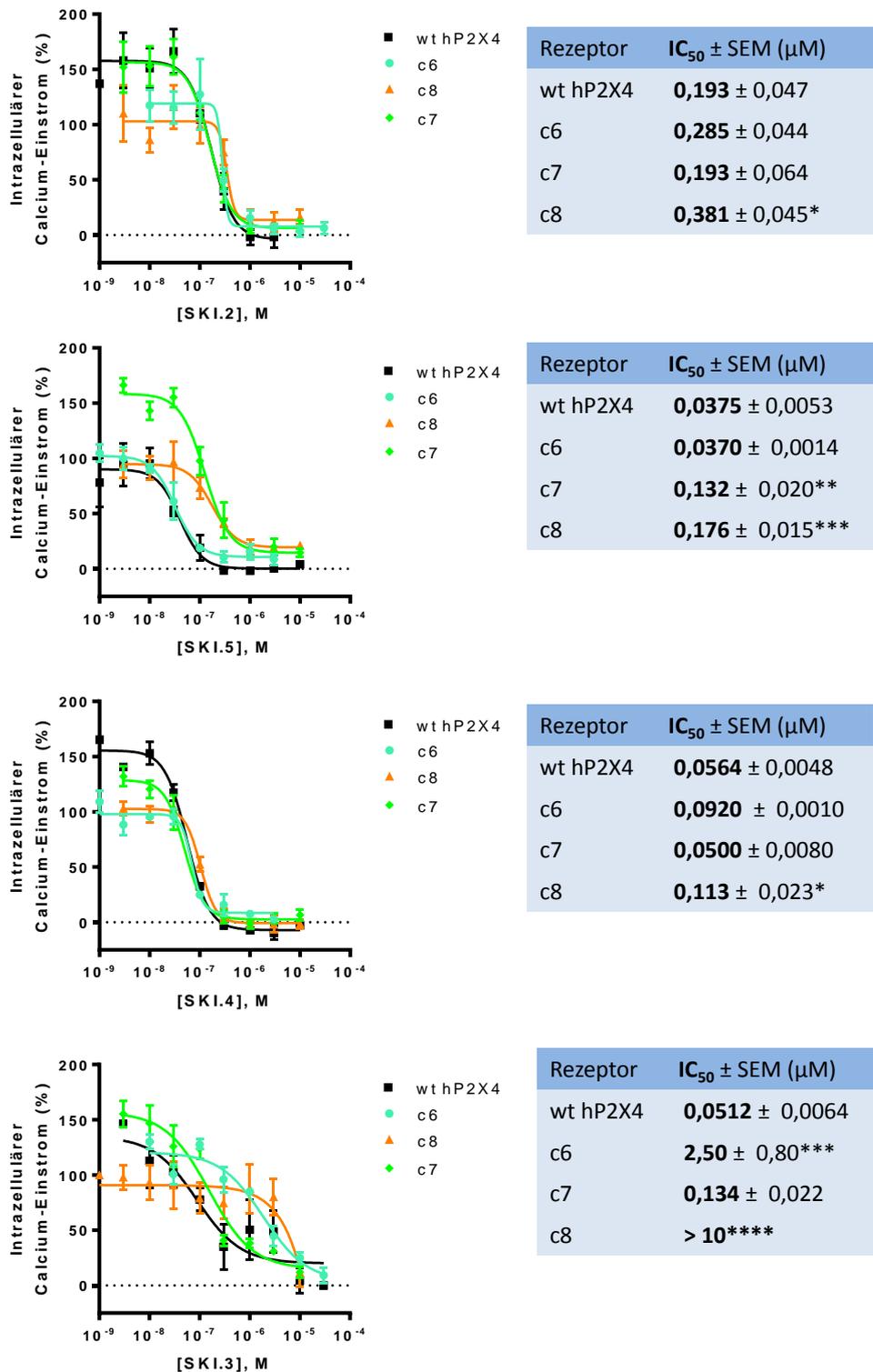


Abbildung 46: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.*

Konzentrations-Wirkungskurven und IC₅₀-Werte ± SEM von SKI.2, SKI.5, SKI.4 und SKI.3 an P2X₄(P2X₂)-Chimären. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz () der Abweichung wurde angenommen, wenn p < 0,05; ** wenn p < 0,01; *** wenn p < 0,001 und **** wenn p < 0,0001.)*

6.1.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse deuten daraufhin, dass Aminosäurereste innerhalb von drei variablen Regionen (v6, v7 und v8) eine Rolle in der Bindung der untersuchten Derivate spielen könnten (vgl. Abb. 47). Es müssten jedoch weitere Verbindungen der Strukturklasse I an den Chimären **c6**, **c7** und **c8** getestet werden, um ein genaueres Bild zu erhalten und um die Hypothese einer allosterischen Bindungsstelle im Bereich der drei variablen Regionen v6, v7 und v8 weiter zu prüfen.

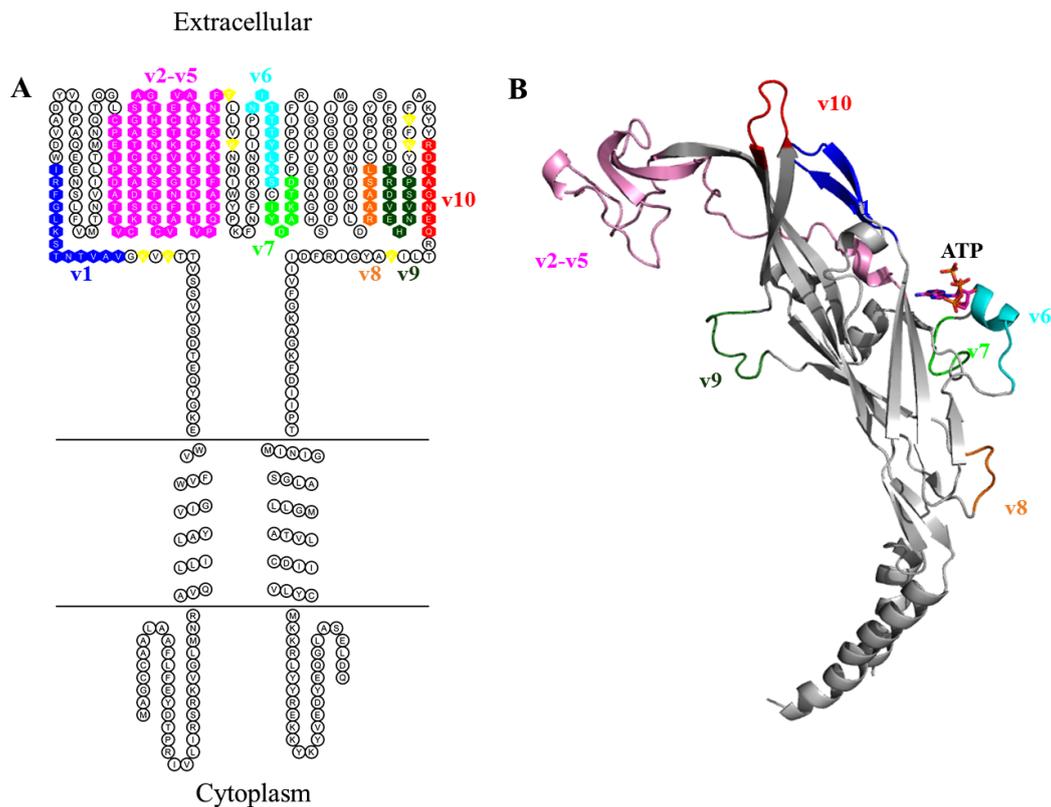


Abbildung 47: (A) Snake-like Plot des hP2X4-Rezeptors und (B) Delfinartige Darstellung des humanen P2X4-Monomers (Abb. von V. Namasivayam).

Die aus den ausgetauschten Aminosäureresten des P2X4-Rezeptors resultierenden Effekte variieren je nach Verbindung deutlich. Für einige Verbindungen (**SKI.1**, **SKI.3**) sind erhebliche signifikante Abweichungen der IC_{50} -Werte an allen drei Rezeptorchimären sichtbar, andere Verbindungen (**SKI.2**, **SKI.4** und **SKI.5**) dagegen zeigen nur an einzelnen Chimären leichte Abweichungen in ihrer Potenz. Eine Aussage über Struktur-Wirkungsbeziehungen ist auf Basis dieser fünf Verbindungen nicht möglich. Da die Verbindungen aufgrund der kaum messbaren Funktionalität der Rezeptoren nicht an den Chimären **c1** und **c9** getestet werden konnte, kann eine Interaktion mit den variablen

Regionen v1 und v9 nicht ausgeschlossen werden.

6.1.4 Allosterische Modulation von P2X4-Rezeptormutanten durch SKI.1

Zur genaueren Betrachtung des Variationsbereiches v2-v5, der bereits mit der allosterischen Modulation durch Metall-Ionen im P2X4-Rattenrezeptor in Verbindung gebracht wurde,^{97,98} wurde die Leitverbindung der Strukturklasse I auch an den vorhandenen Alaninmutanten im Bereich v2-v5 getestet. Aufgenommene Konzentrations-Wirkungskurven (vgl. 48, 49 und Tab. 14) zeigten an den Mutanten **D121A**, **S131**, **T133A**, **G138A** geringfügige signifikante Abweichungen vom humanen P2X4-Rezeptor. An diesen Rezeptoren waren die inhibitorischen Potenzen der Verbindung **SKI.1** geringfügig erhöht. Eine Interaktion der Strukturklasse mit den Aminosäureresten **D121**, **K127**, **D129**, **S131**, **T133**, **G138**, **H140** und **N142** kann daher ausgeschlossen werden, da in diesem Fall eine deutliche Abnahme der Potenzen zu erwarten gewesen wäre.

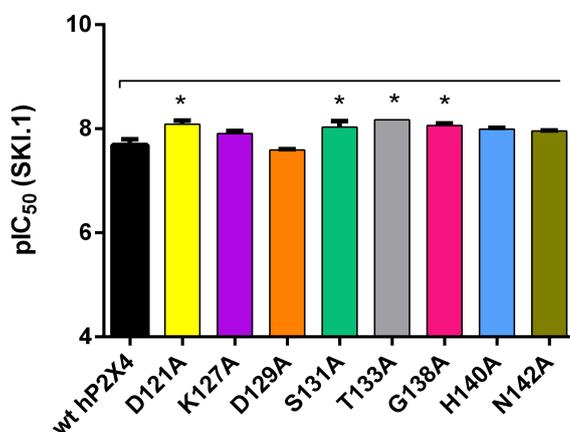


Abbildung 48: Calciumeinstrom-Experimente an hP2X4-Rezeptormutanten im Variationsbereich v2-v5.

Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen von **SKI.1** als pIC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X4-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

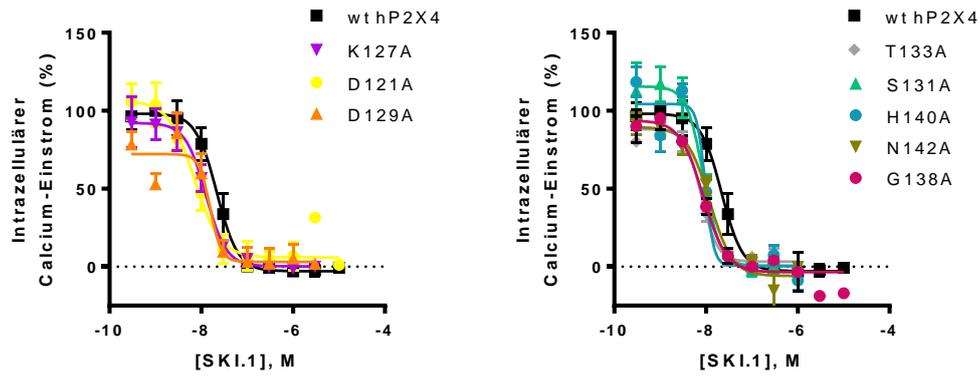


Abbildung 49: *Calciumeinstrom-Experimente an hP2X4-Rezeptormutanten.*

Konzentrations-Wirkungskurven von *SKI.1* an humanen *P2X4*-Rezeptormutanten im Variationsbereich v2-v5.

Tabelle 14: *Calciumeinstrom-Experimente an P2X4-Rezeptormutanten.*

Negative allosterische Modulation von *hP2X4*-Rezeptormutanten durch *SKI.1*. Dargestellt sind die IC_{50} -Werte \pm SEM aus 3-5 Experimenten.

Verbindung	SKI.1
Rezeptortyp	$IC_{50} \pm SEM$ [μ M]
wt hP2X4	$0,0354 \pm 0,0029$
H140A	$0,0102 \pm 0,0006$
G138A	$0,00873 \pm 0,00075^*$
D129A	$0,0200 \pm 0,0052$
D121A	$0,00843 \pm 0,00145^*$
S131A	$0,0104 \pm 0,0030^*$
K127A	$0,0126 \pm 0,0015$
T133A	$0,00672 \pm 0,00001^*$
N142A	$0,0111 \pm 0,0003$

6.2 Allosterische Antagonisten: Strukturklasse II

Der allosterische Antagonist **SKII.1** (Abb. 50) hemmte den humanen P2X4-Rezeptor mit einem IC_{50} -Wert von $0,679 \mu\text{M}$.

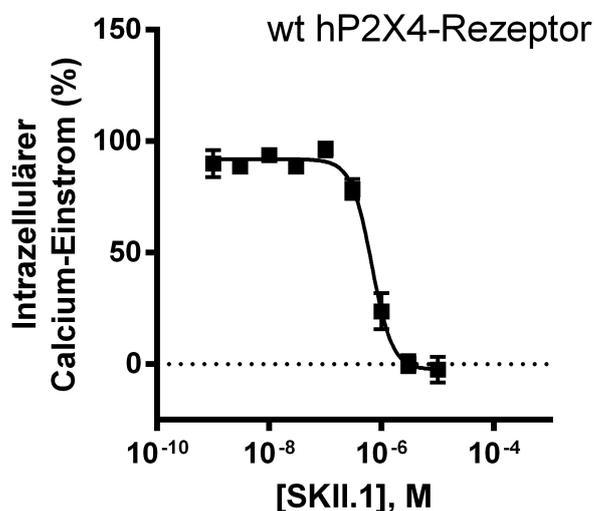


Abbildung 50: *Calciumeinstrom-Experimente am humanen P2X4-Rezeptor.*

*Konzentrations-Wirkungskurve von **SKII.1** am humanen P2X4-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytomazellen. Zur Aktivierung des Rezeptors wurde eine ATP-Konzentration verwendet, die dem EC_{80} -Wert entspricht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 Experimenten.*

Die Verbindung zeigte mittelmäßige bis gute Selektivität abhängig vom P2X-Subtyp (vgl. Tab. 15). Mit einem IC_{50} -Wert von $2,45 \mu\text{M}$ am humanen P2X1-Rezeptor war die Selektivität gegenüber diesem Rezeptor-Subtyp am schwächsten ausgeprägt (4-fach). Am P2X2- und P2X7-Rezeptor waren die IC_{50} -Werte von **SKII.1**, bezogen auf den P2X4-Rezeptor, deutlich erhöht (27- bzw. 15-fach). Am P2X3-Rezeptor konnte dagegen keine signifikante inhibitorische Aktivität der Verbindung gemessen werden.

Tabelle 15: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X-Rezeptoren.*

Selektivität von SKII.1 gegenüber verschiedenen P2X-Rezeptor-Subtypen. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte der Verbindung an den P2X-Rezeptoren ± SEM aus 3-5 Experimenten.

Rezeptor	IC₅₀ ± SEM (µM)
wt P2X1	2,45 ± 0,33
wt P2X2	18,3 ± 2,7
wt P2X3	> 10
wt P2X4	0,679 ± 0,072
wt P2X7	10,1 ± 2,8

6.2.1 Testung von SKII.1 am chimären (P2X4)P2X2-Rezeptor c2-c5

Zur Untersuchung des allosterischen Modulators auf mögliche Interaktionen mit dem P2X4-Rezeptor im Bereich der Sequenzvariationen v2-v5 wurden Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung an der **c2-c5**-Chimäre aufgenommen. Es wurde der IC₅₀-Wert der Verbindung am mutierten Rezeptor bestimmt und mit denen an humanen P2X4- und P2X2-Rezeptoren verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikante Abweichung der Potenz der Verbindung am **c2-c5**-Rezeptor im Vergleich zum humanen P2X4-Rezeptor. Die Potenz der Verbindung war an der Rezeptorchimäre um den Faktor 10 geringer (vgl. Abb. 51 und Tab.16).

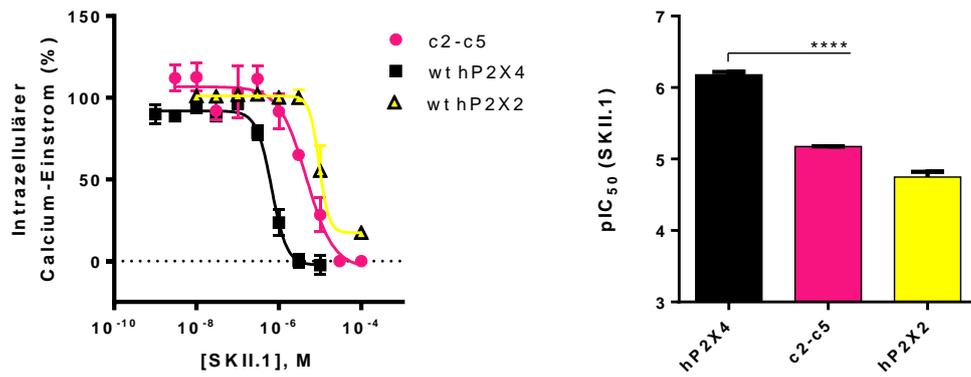


Abbildung 51: Calciumeinstrom-Experimente am humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptor c2-c5.

Negative Modulation des chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptors c2-c5 durch SKII.1. Links: Konzentrations-Wirkungskurven an humanen P2X₄- und P2X₂- und dem chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptor c2-c5, rechts: Potenzen der Verbindung als pIC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Tabelle 16: Calciumeinstrom-Experimente am humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptor c2-c5.

Negative allosterische Modulation der Chimäre c2-c5 durch SKII.1 im Vergleich zum humanen P2X₄-Rezeptor. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Rezeptor	Sequenzvariation	IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt P2X4	-	0,679 ± 0,072
wt P2X2	-	18,3 ± 2,7
Chimäre c2-c5	P2X4 (C116-T186P2X2)	6,70 ± 0,06****
Chimäre c6	P2X4 (N208-S216P2X2)	n.v.
Chimäre c7	P2X4 (I218-D224P2X2)	n.v.
Chimäre c8	P2X4 (R265-L269P2X2)	n.v.
Chimäre c10	P2X4 (R301-Q308P2X2)	n.v.

n.v. nicht vorhanden

6.2.2 Testergebnisse weiterer Verbindungen der Strukturklasse II

Zur Überprüfung und weiteren Untersuchung der signifikanten Effekte der Verbindung **SKII.1** an der Chimäre **c2-c5** wurden drei Strukturanaloga mit ebenfalls P2X4-Rezeptor antagonistischer Wirkung an dem mutierten Rezeptor getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 und Tabelle 17 dargestellt. Im Gegensatz zu der Verbindung **SKII.1**, zeigten die allosterischen Modulatoren **SKII.4**, **SKII.3** und **SKII.2** an der Chimäre **c2-c5** die gleichen Potenzen wie am P2X4-Rezeptor-Wildtyp und konnten die Ergebnisse der Leitverbindung **SKII.1** nicht bestätigen.

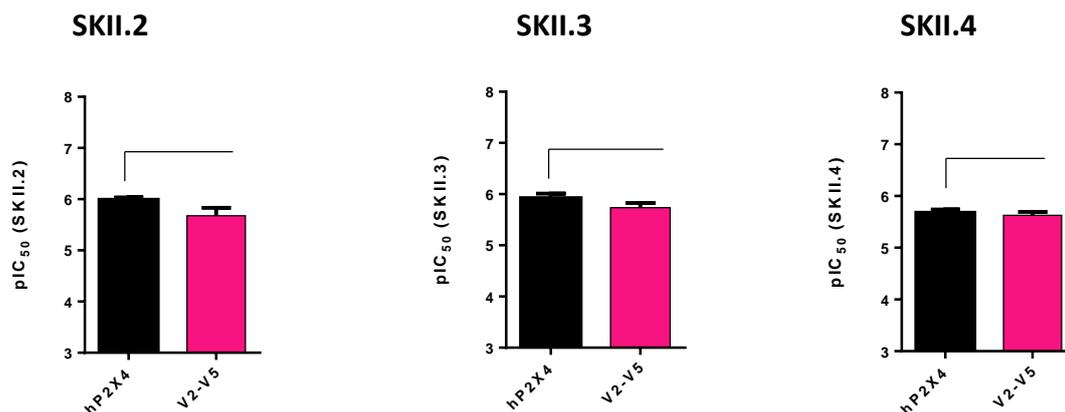


Abbildung 52: *Calciumeinstrom-Experimente am humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptor c2-c5.*

Negative allosterische Modulation der Chimäre c2-c5 durch SKII.1-Analoga im Vergleich zum humanen P2X₄-Rezeptor. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten.

Tabelle 17: *Calciumeinstrom-Experimente am humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptor c2-c5.*

Negative allosterische Modulation der Chimäre c2-c5 durch SKII.1-Analoga. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten.

Verbindung	SKII.2	SKII.3	SKII.4
Rezeptor	IC₅₀ ± SEM (µM)		
wt hP2X4	1,05 ± 0,10	1,34 ± 0,32	2,22 ± 0,27
Chimäre c2-c5	2,23 ± 0,76	2,99 ± 0,60	2,47 ± 0,32

6.2.3 Testergebnisse von SKII.2 an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren

Im nächsten Schritt sollten die Verbindungen der SK II an allen weiteren funktionellen chimären Rezeptoren getestet werden, um die entsprechenden variablen Bereiche auf mögliche Bindungsstellen für die Strukturklasse zu überprüfen. Da die Leitverbindung **SKII.1** nicht mehr zur Verfügung stand, wurde **SKII.2** für weitere Untersuchungen verwendet. Erneut wurden Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung an den Rezeptorchimären **c6**, **c7**, **c8** und **c10** aufgenommen und die IC₅₀-Werte am jeweiligen Rezeptor bestimmt und mit denen am humanen P2X₄-Rezeptor verglichen (vgl. Abb. 53 und Tab. 18).

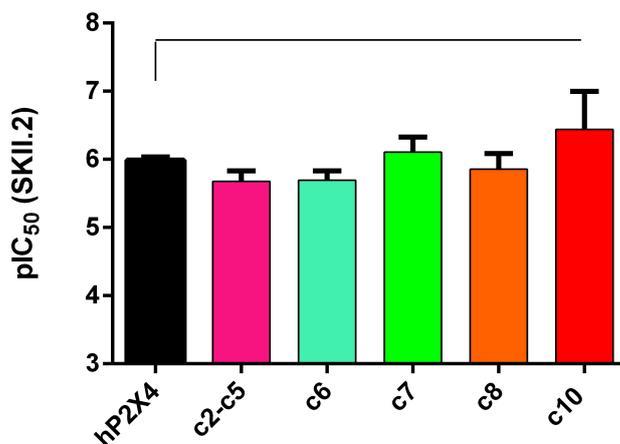


Abbildung 53: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.*

Negative allosterische Modulation von P2X₄(P2X₂)-Rezeptor-Chimären durch SKII.2. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als pIC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten.

Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zum P2X₄-Rezeptor beobachtet werden. **SKII.2** hemmte die Rezeptorchimären **c6**, **c7**, **c8** und **c10** mit ähnlicher Potenz.

Tabelle 18: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.
Negative allosterische Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren durch SKII.2. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als IC₅₀-Werte ± SEM.

Rezeptor	Sequenzvariation	IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt P2X ₄	-	1,05 ± 0,10
wt P2X ₂	-	-
Chimäre c2-c5	P2X ₄ (C116-T186P2X ₂)	1,35 ± 0,08
Chimäre c6	P2X ₄ (N208-S216P2X ₂)	2,24 ± 0,71
Chimäre c7	P2X ₄ (I218-D224P2X ₂)	1,01 ± 0,50
Chimäre c8	P2X ₄ (R265-L269P2X ₂)	1,51 ± 0,41
Chimäre c10	P2X ₄ (R301-Q308P2X ₂)	0,524 ± 0,377

6.2.4 Testung von SKII.1 an P2X4-Rezeptoren mit Alaninmutation im Bereich v2-v5

Zu weiteren Untersuchung des gemessenen Effektes an der Chimären **c2-c5** wurden Konzentrations-Wirkungskurven an P2X4-Rezeptoren mit Mutation im Bereich der variablen Regionen v2-v5 (Abb. 54) aufgenommen.

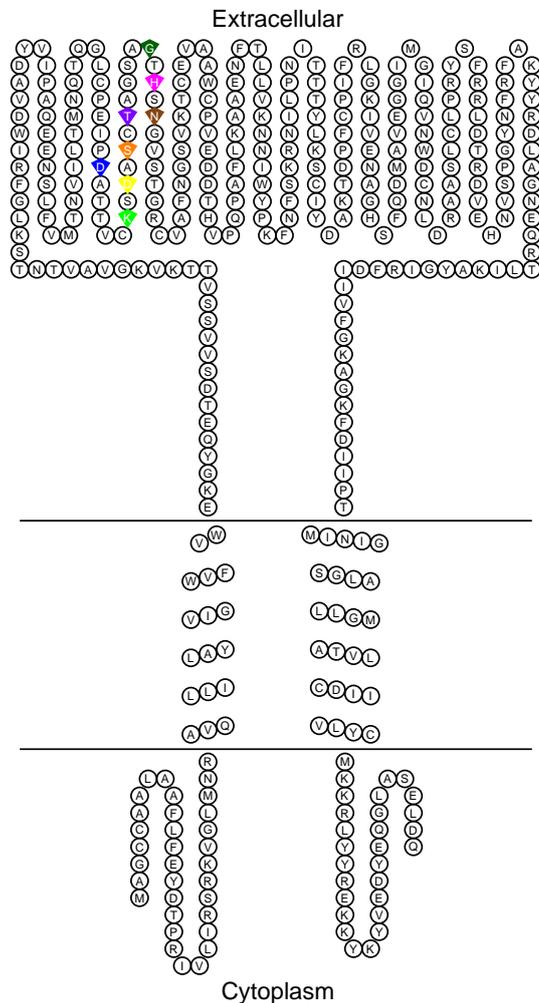


Abbildung 54: Snakeplot des humanen P2X4-Rezeptor-Monomers. Farbig markierte Aminosäurereste des variablen Bereichs v2-v5 wurden zu Alanin mutiert. Es konnten die hP2X4-Rezeptormutanten D121A, K127A, D129A, S131A, T133A, G138A, H140A und N142A erhalten werden.

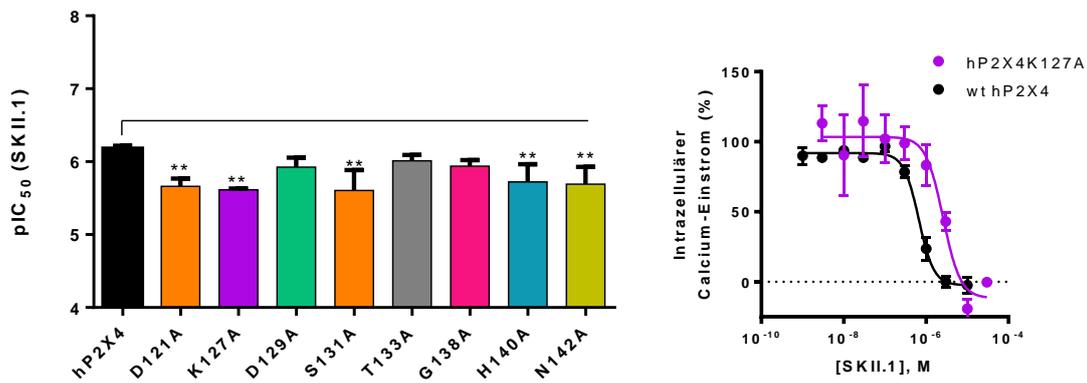


Abbildung 55: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X₄-Rezeptoren mit Einzelmutation.

Links: pIC₅₀-Werte von **SKII.1** an einzelmutierten P2X₄-Rezeptoren ± SEM aus 3-5 Experimenten. Rechts: Konzentrations-Wirkungskurven von **SKII.1** an der K127AP2X₄-Mutante und am humanen P2X₄-Rezeptor-Wildtyp. Überprüfung der Abweichungen vom wt hP2X₄-Rezeptor auf Signifikanz durch einen one-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts-Test. Signifikanz (*) wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.

Der allosterische Antagonist **SKII.1** zeigte zwar an fast allen P2X₄-Rezeptor-Mutanten minimal (2-3-fache) reduzierte Potenzen im Vergleich zum P2X₄-Rezeptor-Wildtyp (vgl. Abb. 55 und Tab.19), jedoch war die Reduktion 10-fach geringer ausgeprägt als an der Chimären **c2-c5**. Die geringste inhibitorische Potenz zeigte die Verbindung an der **K127A**-Mutante. Der IC₅₀-Wert lag mit 2,43 μM 3,6-fach niedriger als am humanen P2X₄-Rezeptor (IC₅₀ 0,679 μM).

Tabelle 19: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X4-Rezeptoren mit Einzelmutation.

Allosterische Modulation einzelmutierter P2X4-Rezeptoren durch SKII.1. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten. Überprüfung der Abweichungen vom wt hP2X4- Rezeptor auf Signifikanz durch einen one-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts-Test. Signifikanz () wurde angenommen, wenn p < 0,05; ** wenn p < 0,01; *** wenn p < 0,001 und **** wenn p < 0,0001.*

Rezeptor	IC ₅₀ ± SEM [μM]
hP2X4 wt	0,679 ± 0,072
H140A	2,12 ± 0,55**
G138A	1,20 ± 0,23
D129A	1,30 ± 0,42
D121A	2,33 ± 0,61**
N142A	2,26 ± 0,55**
S131A	3,01 ± 1,71* (n=2)
K127A	2,43 ± 0,10**
T133A	1,00 ± 0,17

6.2.5 Zusammenfassung und Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse liefern keine klare Aussage bezüglich einer potentiellen allosterischen Bindungsstelle für SKII-Derivate im variablen Bereich v2-v5. Zwar konnte für die Leitstruktur der Gruppe SKII.1 eine 10-fach niedrigere Potenz am c2-c5-Rezeptor als am humanen P2X4-Rezeptor und damit eine Annäherung an den IC₅₀-Wert des humanen P2X2-Rezeptors (18,6 μM) gemessen werden, jedoch ließen sich die Ergebnisse für weitere SKII.1-Analoga nicht bestätigen. Alle drei getesteten Verbindungen zeigten an der Chimären c2-c5 eine vergleichbare Potenz mit der am P2X4-Rezeptor-Wildtyp. Da jedoch die Kettenlänge der Leitstruktur SKII.1 deutlich länger ist als in den Folgeverbindungen SKII.2-SKII.4, wäre auch eine abweichende Bindungsstelle möglich. Eine Beteiligung der Aminosäurereste D121, H140, G138, S131, K127 und N142 im variablen Bereich v2-v5 an einer Interaktion mit SKII.1 ist zwar

grundsätzlich nicht ausgeschlossen, jedoch waren die Abweichungen verglichen zum P2X4-Wildtyp so minimal, dass keiner der entsprechenden Aminosäurereste eine alleinige elementare Rolle in der Bindung des Antagonisten spielen kann. Eine Beteiligung der variablen Regionen v6, v7, v8 und v10 an der Bindung der **SKII**-Derivate **2-4** kann dagegen ausgeschlossen werden. An den entsprechenden chimären Rezeptoren zeigten sich keine signifikanten Abweichungen vom P2X4-Rezeptor. **SKII.1** stand zur Testung an den chimären Rezeptoren **c6**, **c7**, **c8** und **c10** nicht mehr zur Verfügung, weshalb zu einer möglichen Interaktion keine Aussage getroffen werden kann. Da die Verbindungen aufgrund der kaum messbaren Funktionalität der Rezeptormutanten, bisher nicht an den Chimären **c1** und **c9** getestet werden konnte, kann eine Interaktion mit den variablen Regionen v1 und v9 nicht ausgeschlossen werden.

6.3 Allosterische Antagonisten: Strukturklasse III

Die Verbindung **SKIII.1** hemmte den humanen P2X4-Rezeptor mit einem IC_{50} -Wert von $0,154 \mu M$ (Abb. 56 und Tab. 20). Am humanen P2X1-Rezeptor war **SKIII.1** geringfügig potenter ($IC_{50} 0,0769 \mu M$) als am humanen P2X4-Rezeptor, wohingegen der P2X7-Rezeptor, mit einem IC_{50} -Wert von $0,315 \mu M$, ähnlich stark gehemmt wurde. An P2X2- und P2X3-Subtypen konnte keine signifikante Aktivität der Verbindung gemessen werden.

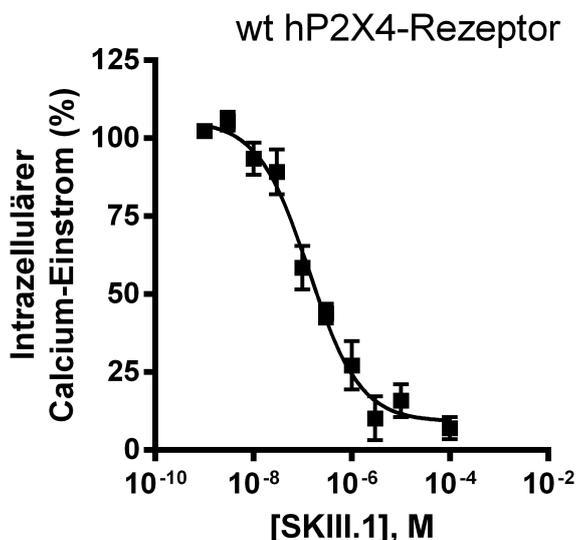


Abbildung 56: *Calciumeinstrom-Experimente am humanen P2X4-Rezeptor.*

*Konzentrations-Wirkungskurve der Verbindung **SKIII.1** am humanen P2X4-Rezeptor-Wildtyp, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytoma-Zellen. Zur Aktivierung des Rezeptors wurde eine ATP-Konzentration verwendet, die dem EC_{80} -Wert entspricht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 Experimenten.*

Tabelle 20: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X-Rezeptoren.

Selektivität von **SKIII.1** gegenüber anderen P2X-Subtypen. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten der Verbindung an humanen P2X1-, P2X2-, P2X3-, P2X4- und P2X7-Rezeptoren.

Rezeptor	IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt P2X1	0,0769 ± 0,0106
wt P2X2	> 10
wt P2X3	> 10
wt P2X4	0,154 ± 0,029
wt P2X7	0,315 ± 0,035

6.3.1 Allosterische Modulation von P2X4(P2X2)-Rezeptoren durch SKIII.1

Zur Untersuchung der Verbindung **SKIII.1** auf möglicherweise veränderte Aktivität an den P2X4(P2X2)-Rezeptoren wurden Konzentrations-Wirkungskurven des Antagonisten an allen funktionellen Chimären aufgenommen. Die IC₅₀-Werte der Verbindung an den mutierten Rezeptoren wurden bestimmt und mit dem am humanen P2X4-Rezeptor verglichen. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 57. Im Balkendiagramm sind hier die pIC₅₀-Werte dargestellt. **SKIII.1** hemmte den P2X4-Rezeptor-Wildtyp und alle Rezeptorchimären mit ähnlicher Potenz (vgl. Tab.21 und Abb. 58).

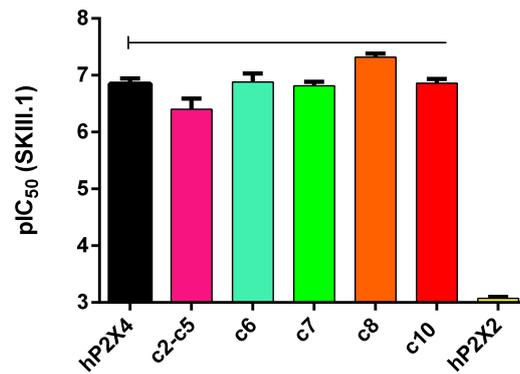


Abbildung 57: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.*

Negative allosterische Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytoma-Zellen, durch SKIII.1 im Vergleich zu den Wildtyp-Rezeptoren. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen der Verbindung als pIC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten.

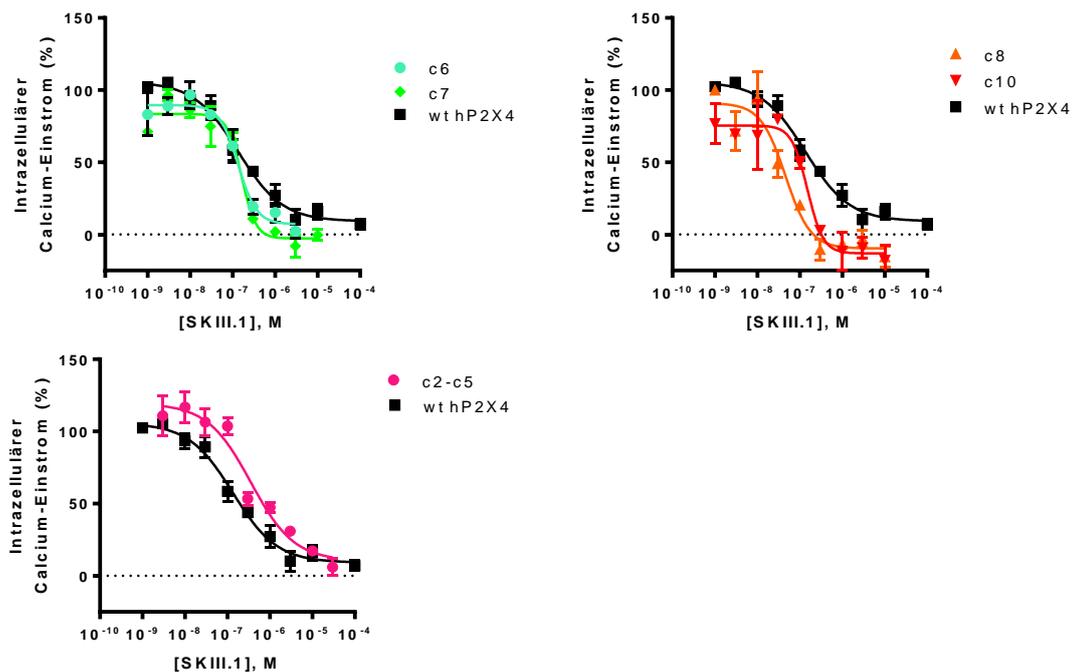


Abbildung 58: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.*

Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung SKIII.1 an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Astrozytoma-Zellen, im Vergleich zum humanen P2X₄-Rezeptor-Wildtyp. Zur Anregung des jeweiligen Rezeptors wurde eine ATP-Konzentration verwendet die dem EC₈₀-Wert entspricht.

Tabelle 21: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.

Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren im Vergleich zu den P2X₂- und P2X₄-Rezeptor-Wildtypen durch **SKIII.1**. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten.

Rezeptor	Sequenzvariation	IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt P2X4	-	0,154 ± 0,029
wt P2X2	-	> 10
Chimäre c2-c5	P2X4 (C116-T186P2X2)	0,483 ± 0,218
Chimäre c6	P2X4 (N208-S216P2X2)	0,156 ± 0,048
Chimäre c7	P2X4 (I218-D224P2X2)	0,157 ± 0,026
Chimäre c8	P2X4 (R265-L269P2X2)	0,0485 ± 0,0071
Chimäre c10	P2X4 (R301-Q308P2X2)	0,143 ± 0,027

6.4 Zusammenfassung und Diskussion

Der allosterische Antagonist **SKIII.1** hemmte den humanen P2X₄-Rezeptor und alle funktionellen P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren mit vergleichbaren Potenzen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die variablen Regionen v2-v5, v6, v7, v8 und v10 keine direkte Rolle in der Bindung von **SKIII.1** spielen. Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich außerdem schließen, dass bei der Bindung von **SKIII.1** andere Bereiche des P2X₄-Rezeptors eine Rolle spielen als bei der Bindung von den Derivaten der **SKI**. Da die Verbindung aufgrund der kaum messbaren Funktionalität nicht an den Chimären **c1** und **c9** getestet werden konnte, kann eine Interaktion mit den variablen Regionen v1 und v9 nicht ausgeschlossen werden.

6.4.1 Allosterische Modulation von P2X4-Rezeptormutanten durch SKIII.1

Unterstützend wurde **SKIII.1** auch an den **H140A**-, **G138A**-, **T133A**-, **S131A**-, **D129A**-, **K127A**- und **D121A**-Mutanten getestet. Die durchgeführten Calcium-Einstromexperimente ergaben für den Großteil der P2X4-Rezeptormutanten keine signifikanten Abweichungen vom Wildtyp-Rezeptor. Nur an den **H140A**- und **N142A**-Rezeptoren waren die inhibitorischen Potenzen mit IC_{50} -Werten von 0,744 und 4,94 μ M signifikant erniedrigt. Da die Testergebnisse an diesen Rezeptoren jedoch aufgrund von Löslichkeitsproblemen der Verbindung nur schwer reproduzierbar waren, eine hohe Standardabweichung lieferten und ein zweites Testsystem zur Kontrolle fehlt, kann keine endgültige Aussage über eine mögliche Interaktion der Aminosäurereste **H140** und **N142** mit der Verbindung getroffen werden. Die zukünftige Testung weiterer Derivate der **SKIII** an den entsprechenden Mutanten könnte weiterführende Erkenntnisse liefern.

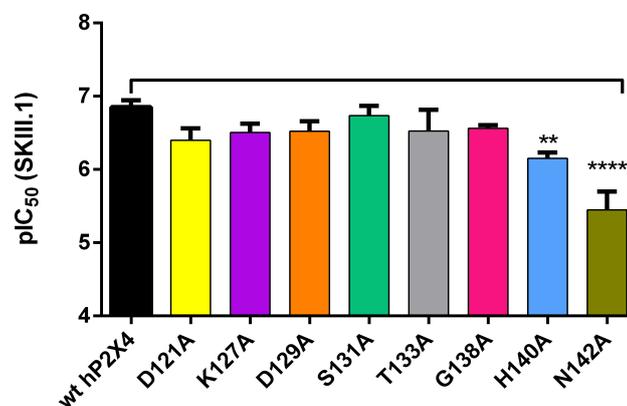


Abbildung 59: Calciumeinstrom-Experimente an hP2X4-Rezeptormutanten.

Negative allosterische Modulation von humanen P2X4-Rezeptormutanten durch **SKIII.1**. Dargestellt sind die pIC_{50} -Werte \pm SEM aus 3-5 Experimenten. Überprüfung der Abweichungen vom wt hP2X4-Rezeptor auf Signifikanz durch einen one-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts-Test. Signifikanz (*) wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.

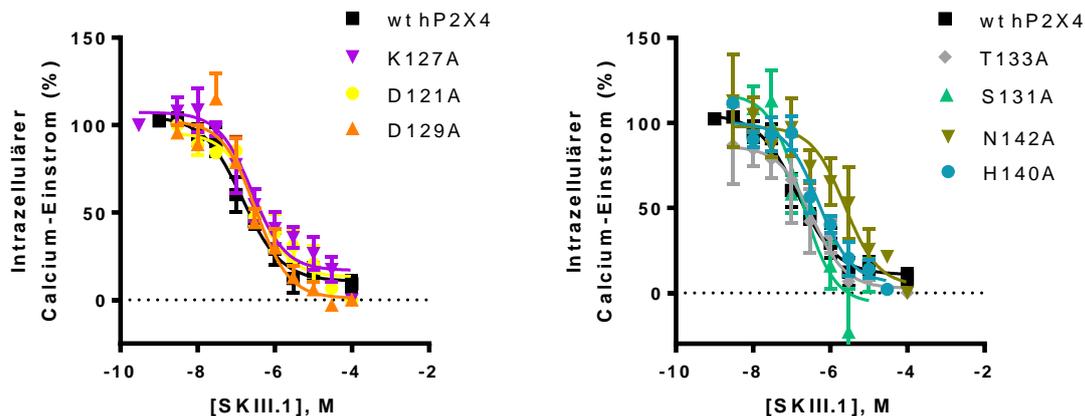


Abbildung 60: *Calciumeinstrom-Experimente an hP2X4-Rezeptormutanten.*
 Konzentrations-Wirkungskurven von **SKIII.1** an humanen P2X4-Rezeptormutanten im Variationsbereich v2-v5.

Tabelle 22: *Calciumeinstrom-Experimente an P2X4-Rezeptormutanten.*
 Negative allosterische Modulation von hP2X4-Rezeptormutanten im Variationsbereich v2-v5 durch **SKIII.1**. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten.

Verbindung	IC ₅₀ ± SEM [µM]
wt hP2X4	0,154 ± 0,029
H140A	0,744 ± 0,131**
G138A	0,277 ± 0,029
D129A	0,332 ± 0,103
D121A	0,453 ± 0,151
S131A	0,192 ± 0,046
K127A	0,330 ± 0,077
T133A	0,366 ± 0,212
N142A	4,94 ± 1,60****

7 Ivermectin

7.1 Einleitung

Im Jahr 2015 wurde der Nobelpreis in Medizin an Satoshi Omura and William C. Campbell für die Entdeckung von Avermectin verliehen, einer antiparasitisch wirksamen Verbindung, die aus *Streptomyces*-Kulturen gewonnen werden konnte.⁹⁹ Das makrocyclische natürliche Produkt Ivermectin (Abb. 61) ist ein Derivat des Avermectins.

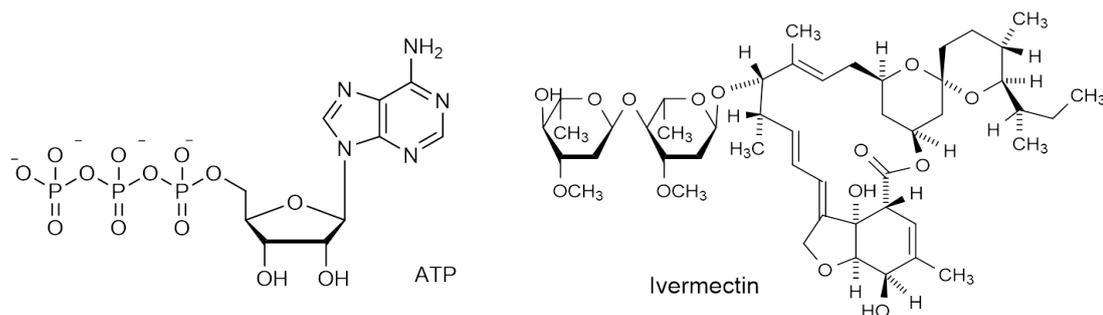


Abbildung 61: Struktur des natürlichen Liganden ATP und des allosterischen Modulators Ivermectin.

Es aktiviert mit hoher Potenz einen exklusiv in wirbellosen Lebewesen vorkommenden Glutamat-gesteuerten Chlorid-Ionenkanal.³⁴ Diese Eigenschaft macht Ivermectin zu einem weit verbreiteten Therapeutikum in der Human- und Tiermedizin zur Behandlung von Infektionen mit Ektoparasiten. In höheren Konzentrationen beeinflusst Ivermectin allosterisch die Aktivität weiterer Ligand-gesteuerter-Ionenkanäle wie den γ -Aminobuttersäure A (GABA_A)-Rezeptor, den nikotinischen α 7-Acetylcholin-Rezeptor und den Glycin-Rezeptor.¹⁰⁰ Darüber hinaus wurde Ivermectin als positiver allosterischer Modulator (PAM) des P2X4-Rezeptors^{38,101} sowie des humanen P2X7-Rezeptors, jedoch nicht der P2X7-Rezeptoren der Maus und der Ratte, beschrieben.¹⁰² An anderen P2X-Subtypen zeigt es keinen positiven allosterischen Effekt.³⁸ Aufgrund seiner ungewöhnlichen pharmakologischen Charakteristika wird Ivermectin als Werkzeug in der P2X-Rezeptorforschung eingesetzt. Ausserdem wird es in seiner Eigenschaft, P2X4-Rezeptoren positiv allosterisch zu modulieren, als Wirkstoff zur Behandlung von Alkoholabhängigkeit diskutiert.⁴³ Die modulatorischen Effekte von Ivermectin sind konzentrationsabhängig. In elektrophysiologischen Patch-Clamp-Experimenten am P2X4-Rezeptor führte seine Applikation in niedrigen Konzentrationen (EC_{50} 0,25 μ M) zu einer Erhöhung der Kanal-Amplitude und in hohen Konzentrationen (EC_{50} 2 μ M) zu einer erleichterten Rezeptoröffnung und einer verlängerten Rezeptor-Deaktivierung.³⁹ Wegen dieses zweiphasigen Charakters wurde in verschiedenen Publikationen die Existenz mehrerer allosterischer Bindungsstellen für Ivermectin in P2X4-Rezeptoren postuliert, die teilweise hohe und teilweise niedrige Affinitäten besitzen.^{38,39,100} Ivermectin

wirkt als Potenziator nur, wenn es extrazellulär, nicht wenn es intrazellulär appliziert wird. Dies zeigt, dass die Bindungsstelle bzw. die Bindungsstellen von Ivermectin im extrazellulären Teil des Rezeptors lokalisiert sein müssen.³⁹ Verschiedene Publikationen postulieren eine Involvierung der Transmembran-Domänen in die Ivermectin-Bindung am P2X4-Rezeptor,^{103,104} jedoch ist die exakte Lage der Bindungsstelle nicht bekannt. Keine der bisher beschriebenen Mutationen in der P2X4-Rezeptorsequenz konnte die positiv modulierenden Effekte von Ivermectin vollständig unterbinden.¹⁰³ Darüber hinaus konnten Experimente mit chimären Zell-Linien und scannender Mutagenese der zwei Transmembran-Domänen keine für die Interaktion des Rezeptors mit Ivermectin relevanten und dabei auch gleichzeitig P2X4-Rezeptor-spezifischen Aminosäurereste identifizieren.^{103,104}

7.2 Ergebnisse: Effekte von Ivermectin an verschiedenen P2X-Rezeptor-Subtypen

Um die Effekte des allosterischen Modulators Ivermectin auf verschiedene P2X-Rezeptor Subtypen zu untersuchen, wurden Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung in Anwesenheit von 100 μM ATP (entsprechend dem maximalen ATP-Effekt) am humanen P2X4-Rezeptor aufgenommen. Der maximale ATP-Effekt, gemessen in Anwesenheit einer hohen Konzentration von Ivermectin (10 μM) und die Potenz von Ivermectin wurden bestimmt. Am humanen P2X4-Rezeptor Wildtyp potenzierte Ivermectin den ATP-Effekt mit einem EC_{50} -Wert von 0,310 μM . Eine Konzentration von 10 μM an Ivermectin erhöhte die maximale ATP-Antwort von 100 % auf 167 % (vgl. Tab. 23 und Abb. 62). Dagegen führten 10 μM an Ivermectin am humanen P2X2-Rezeptor zu keiner Potenzierung der ATP-Antwort. Am humanen P2X1- (74 % Reduzierung der ATP-Antwort), humanen P2X3- (49 %) und am Ratten-P2X3-Rezeptor (70 %) führten hohe Konzentrationen von Ivermectin (10 μM) zu einer signifikanten Rezeptor-Inhibition (vgl. Abb. 62), während am humanen P2X7-Rezeptor nur ein minimaler inhibitorischer Effekt beobachtet werden konnte (8 %). Anschließend wurden die IC_{50} -Werte von Ivermectin an P2X1-, P2X2- und P2X3-Rezeptoren in Anwesenheit von ATP (in seiner EC_{80} -Konzentration) bestimmt. Ivermectin inhibierte den P2X1-Rezeptor mit einem IC_{50} -Wert von 1,72 μM . Die Ivermectin-Potenz am Ratten P2X3-Rezeptor lag im gleichen Bereich (IC_{50} 4,43 μM), wohingegen der IC_{50} -Wert von Ivermectin am humanen P2X3-Rezeptor signifikant höher lag (17,1 μM).

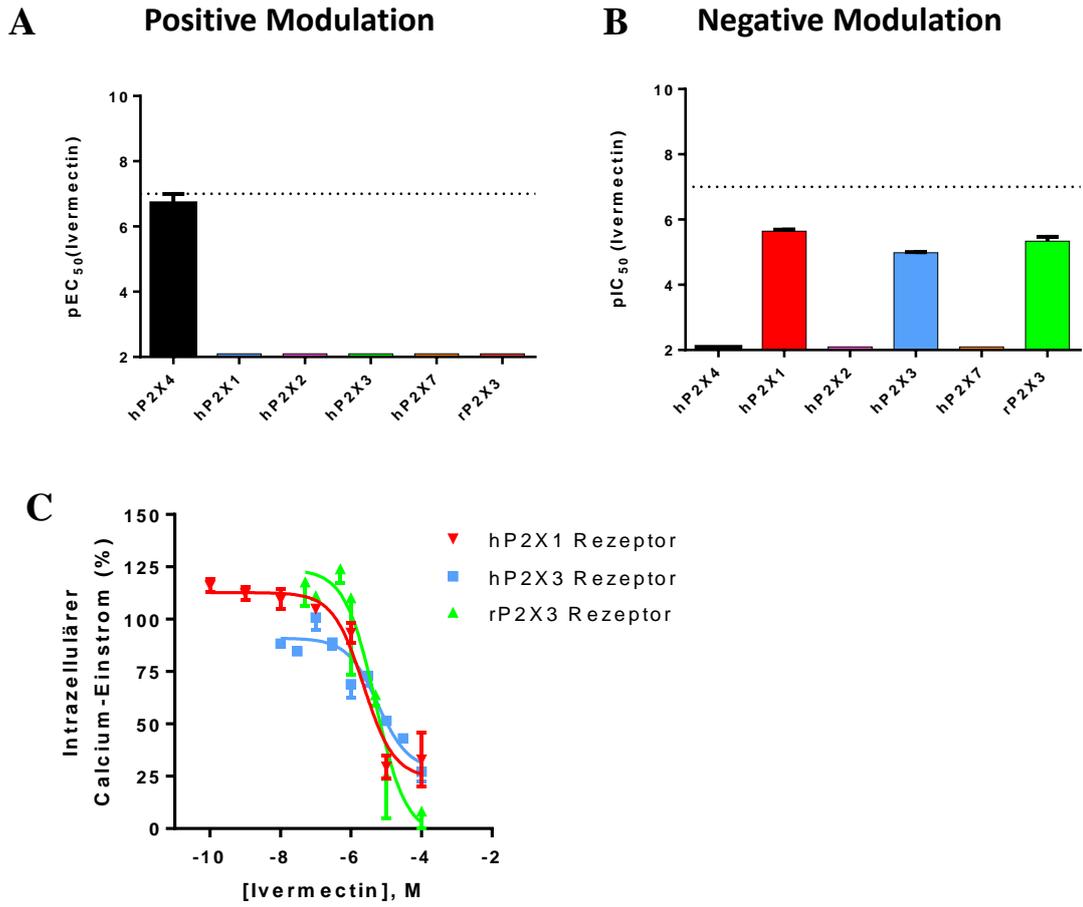


Abbildung 62: Modulation von P2X-Rezeptor-Subtypen durch Ivermectin. (A) Positive Modulation dargestellt als pEC₅₀-Werte ± SEM. (B) Negative Modulation dargestellt als pIC₅₀-Werte ± SEM. (C) Konzentrations-Wirkungskurven von Ivermectin.

Abbildung 63: Effekte des allosterischen P2X₄-Rezeptor Modulators Ivermectin an verschiedenen P2X-Rezeptoren.

Rezeptor	ATP-Modulation durch 10 μ M Ivermectin (% \pm SEM)	EC ₅₀ \pm SEM (μ M)	Inhibition durch 10 μ M Ivermectin (% \pm SEM)	IC ₅₀ \pm SEM (μ M)
hP2X4	167 \pm 17	0,310 \pm 0,206	keine Inhibition	n.v
mP2X4	150 \pm 6	1,66 \pm 0,47	keine Inhibition	n.v
rP2X4	235 \pm 7	0,107 \pm 0,042	keine Inhibition	n.v
hP2X2	Keine Potentierung	n.v	keine Inhibition	n.v
hP2X1	Keine Potentierung	n.v	70 \pm 5	1,72 \pm 0,23
hP2X3	Keine Potentierung	n.v	49 \pm 1	17,1 \pm 4,5
rP2X3	Keine Potentierung	n.v	74 \pm 20	4,43 \pm 1,58
hP2X7	Keine Potentierung	n.v	8 \pm 29 (bei 20 μ M)	> 10

h: human, r: Ratte, m: Maus, n.v. nicht vorhanden

7.2.1 Radioligand-Bindungsstudien von Ivermectin am hP2X4-Rezeptor

Zur Untersuchung der beschriebenen allosterischen Eigenschaften von Ivermectin wurden Radioligand-Kompetitions-Assays durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Es wurde die Membranpräparation des in 1321N1-Astrozytom-Zellen stabil exprimierten humanen P2X₄-Rezeptors genutzt. Für die Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden 100 μ M ATP eingesetzt. In Abwesenheit von Ivermectin zeigte ATP γ S Affinität für die humane P2X₄-Rezeptor-Membranpräparation mit einem IC₅₀-Wert von 14,6 nM (Abbildung 64 A und 65). Der ermittelte K_D-Wert lag bei 14,1 nM und damit deutlich höher als der K_D-Wert aus Sättigungsassays (K_D 0,761 nM).

Konzentrations-Wirkungskurven von Ivermectin zeigten keine Modulation der Bindung von 0,2 nM (K_D=0,7) [³⁵S]ATP γ S an den humanen P2X₄-Rezeptor (vgl. Abb. 64). Homologe Kompetitions-Experimente mit ATP γ S in Anwesenheit von 1 μ M oder 10 μ M an Ivermectin (Abb. 65) führten zu keinen signifikanten Veränderungen der K_D-Werte im Vergleich zu den Werten von ATP γ S ohne Ivermectin. Dies zeigt den allosterischen Bindungscharakter von Ivermectin.

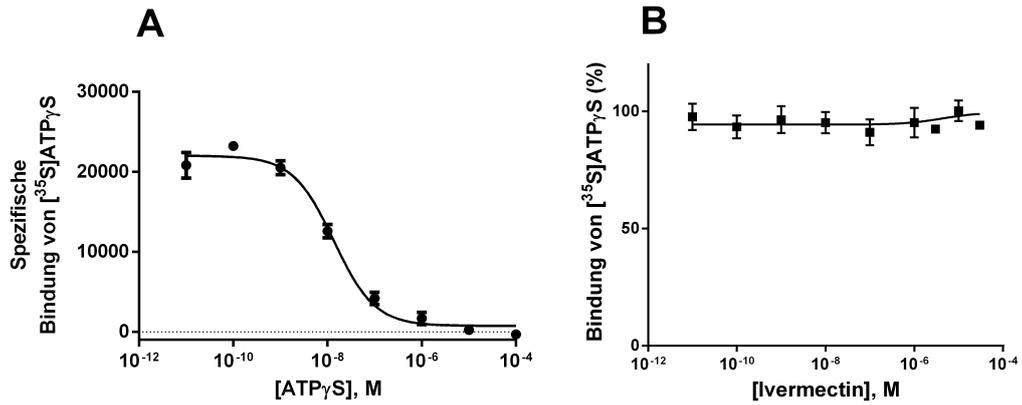
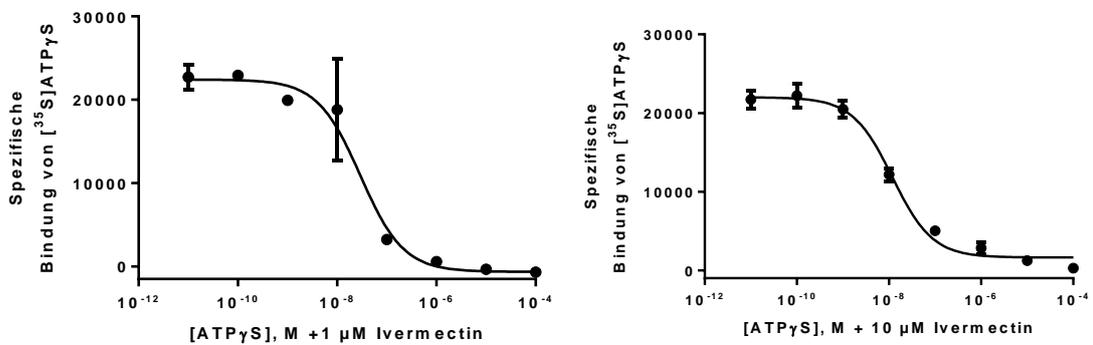


Abbildung 64: (A) Kompetitions-Bindungsstudien des $P2X_4$ -Rezeptoragonisten $\text{ATP}\gamma\text{S}$; homologe Kompetitions-Experimente mit $\text{ATP}\gamma\text{S}$ gegen $[^{35}\text{S}]\text{ATP}\gamma\text{S}$ (0,2 nM) an Membranpräparationen von humanen $P2X_4$ -Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen. (B) Konzentrations-abhängige Wirkung von Ivermectin auf die Bindung von $[^{35}\text{S}]\text{ATP}\gamma\text{S}$ an den humanen $P2X_4$ -Rezeptor (durchgeführt durch Dr. A. Abdelrahman).



K_D (nM), n=3

$\text{ATP}\gamma\text{S}$ ohne Ivermectin	$14,1 \pm 2,7$
$\text{ATP}\gamma\text{S}$ + 1 μM Ivermectin	$25,7 \pm 8,0$
$\text{ATP}\gamma\text{S}$ + 10 μM Ivermectin	$11,5 \pm 0,7$

Abbildung 65: Homologe Kompetitions-Experimente mit $\text{ATP}\gamma\text{S}$ gegen $[^{35}\text{S}]\text{ATP}\gamma\text{S}$ (0,2 nM) an Membranpräparationen von $hP2X_4$ -Rezeptor exprimierenden 1321N1 Astrozytoma-Zellen in Anwesenheit von 1 μM Ivermectin und 10 μM Ivermectin (durchgeführt durch Dr. A. Abdelrahman).

7.3 Allosterische Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren durch Ivermectin

Im nächsten Schritt wurde der Effekt von Ivermectin auf die sieben chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren untersucht, um die entsprechenden variablen Sequenzbereiche auf mögliche Bindungsstellen zu überprüfen. Dafür wurden Konzentrations-Wirkungskurven von Ivermectin in Anwesenheit von 100 μ M ATP aufgenommen. Die Stimulation des ATP-Effekts durch eine hohe Ivermectin-Konzentration (10 μ M) und der entsprechende EC₅₀-Wert wurden berechnet und verglichen mit seinen Effekten an humanen P2X₄- und humanen P2X₂- Rezeptoren. Interessanterweise variierte die Richtung der allosterischen Modulation (positiv, negativ) abhängig von der ausgetauschten Sequenzvariation. Eine Übersicht über die jeweiligen Ergebnisse zeigt Abbildung 66.

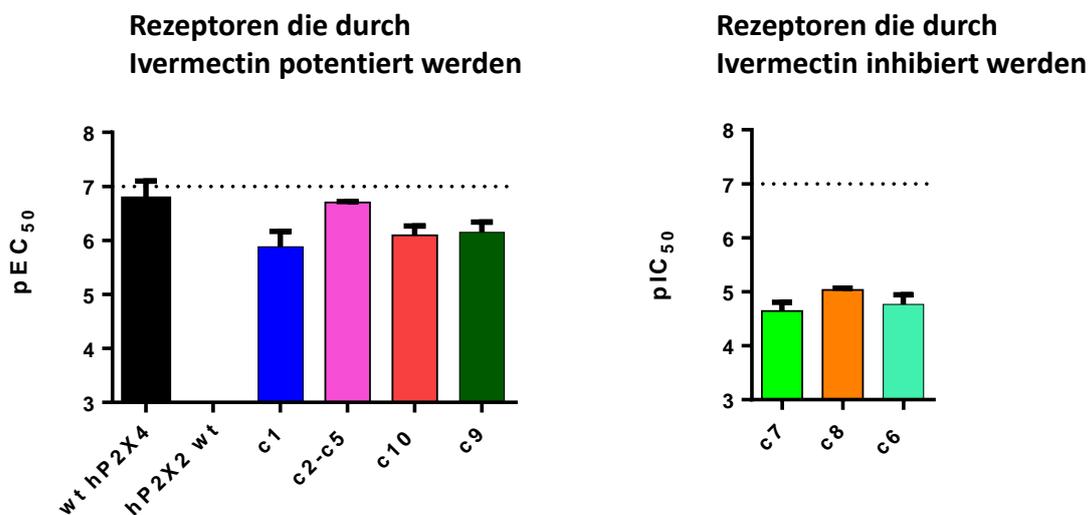


Abbildung 66: Potenzierung bzw. Inhibition chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren durch Ivermectin. Dargestellt sind die Potenzen von Ivermectin als pEC₅₀- bzw. pIC₅₀-Werte \pm SEM aus 3-5 Experimenten.

7.3.1 Positive allosterische Modulation

Die chimären Rezeptoren **c2-c5** und **c10** zeigten eine positive allosterische Modulation der ATP-Antwort durch Ivermectin mit EC₅₀-Werten von 0,119 bzw. 1,15 μ M (vgl. Abb. 67, 70A und Tab. 23). Ivermectin erhöhte, berechnet auf der Basis des humanen P2X₄-Rezeptor-Wildtyps, den maximalen Effekt von ATP am chimären Rezeptor **c2-c5** von 50 % auf 137 % (um 274 %) und am **c10** P2X₄(P2X₂)-Rezeptor von 40 auf 70 % (um 75 %).

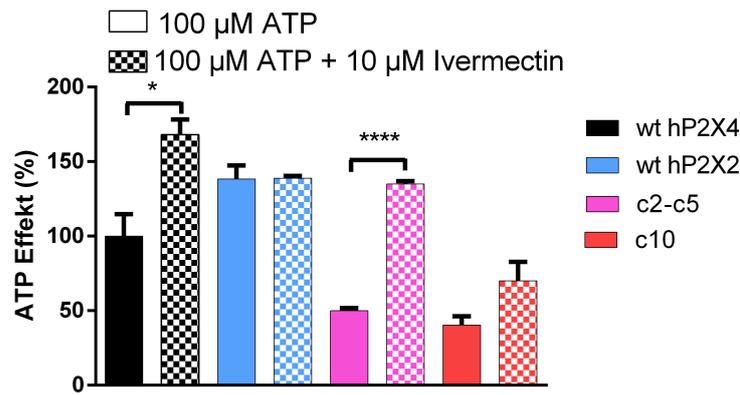


Abbildung 67: *P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren die durch Ivermectin positiv allosterisch moduliert werden. Die Modulation der ATP-Antwort ± SEM durch 10 μM Ivermectin an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren im Vergleich mit den humanen hP2X₄- und P2X₂-Rezeptor-Wildtypen ist dargestellt.*

7.3.2 Funktionsgewinn durch Ivermectin

An den chimären Rezeptoren **c1** und **c9**, die nur geringe Rezeptor-Aktivierbarkeit (4-5 %) durch alleinige Stimulierung mit ATP gezeigt haben, führte Ivermectin zu einem Funktionsgewinn (vgl. Abb. 68, 70D und Tab. 23). Eine Ivermectin-Konzentration von 10 μM induzierte einen partiellen Funktionsgewinn an den chimären Rezeptoren **c1** (auf 29 %, 7,3-fach) und **c9** (auf 47 %, 9,4-fach). An beiden P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der EC₅₀-Werte von Ivermectin im Vergleich zu denen am humanen P2X₄-Rezeptor Wildtyp.

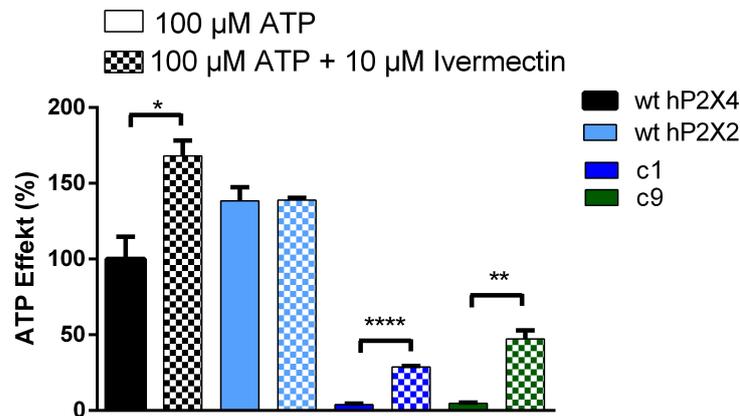


Abbildung 68: *P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren, die einen Funktionsgewinn durch Ivermectin zeigen. Die Modulation der ATP-Antwort ± SEM durch 10 μM Ivermectin an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren im Vergleich zu den humanen hP2X₄- und P2X₂-Rezeptor-Wildtypen ist dargestellt.*

7.3.3 Negative allosterische Modulation

Überraschenderweise wirkte Ivermectin an den chimären Rezeptoren **c6**, **c7** und **c8** als negativer allosterischer Modulator und führte zu einer signifikanten Inhibition der ATP-Antwort um 32 % am **c6**-, um 44 % am **c7**-Rezeptor und um 54 % am **c8**-Rezeptor (vgl. Abb 69, 70B und Tab. 23). Die berechneten IC_{50} -Werte lagen dabei zwischen 12 und 26 μ M und damit um ein Mehrfaches höher als der EC_{50} -Wert von Ivermectin am humanen P2X4-Rezeptor.

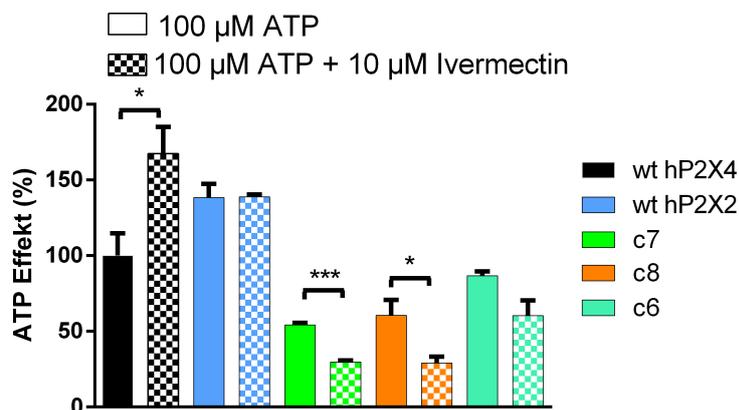


Abbildung 69: *P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren mit Inhibition durch Ivermectin. Modulation der ATP-Antwort \pm SEM durch 10 μ M Ivermectin an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren im Vergleich mit den humanen hP2X₄- und P2X₂-Rezeptor-Wildtypen.*

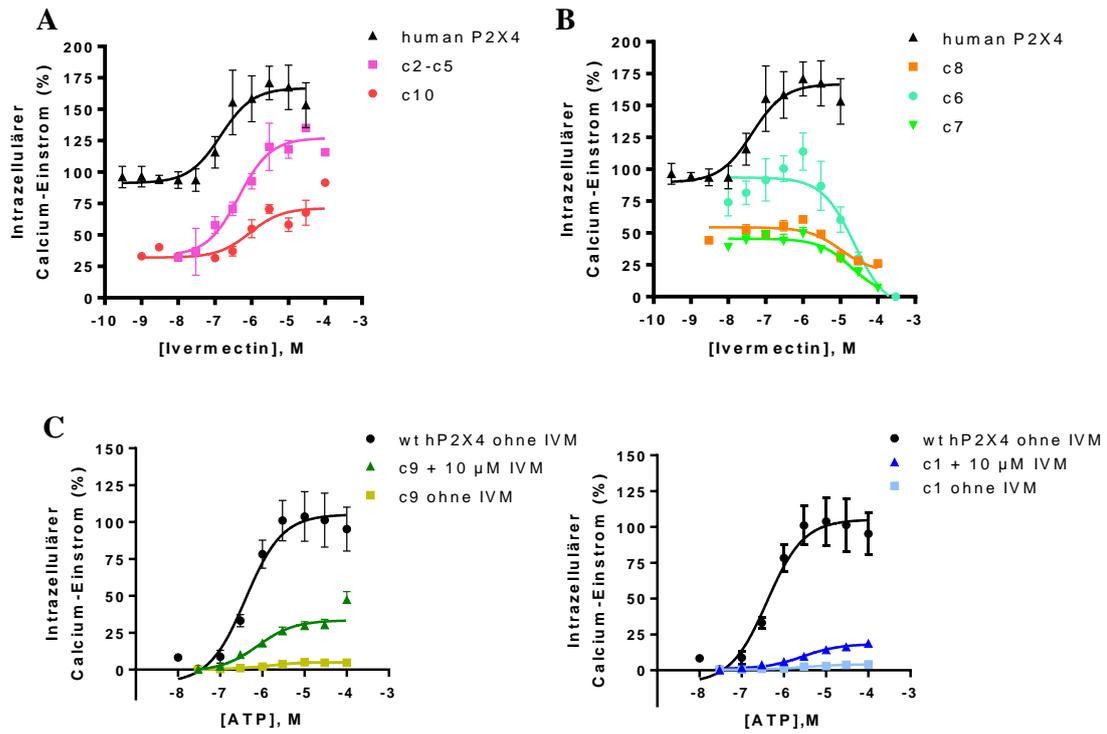


Abbildung 70: Allosterische Modulation chimärer $P2X_4(P2X_2)$ -Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen, durch Ivermectin. Anstiege des intrazellulären Calciums wurden in Relation zu den Effekten gesetzt, die durch Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ ATP (entspricht dem maximalen Effekt) in Abwesenheit von Ivermectin am humanen $P2X_4$ -Rezeptor-Wildtyp erzielt werden konnten. (A) Positive allosterische Modulation des humanen $P2X_4$ -Rezeptors und der $P2X_4(P2X_2)$ -Rezeptoren **c2-c5** und **c10** durch Ivermectin. (B) Negative allosterische Modulation von **c7** und **c8** durch Ivermectin. (C) Funktionsgewinn von **c1** und **c9** durch Ivermectin.

Tabelle 23: ATP-Effekte in humanen P₂X₄-, P₂X₂- und chimären P₂X₄(P₂X₂)-Rezeptoren in Anwesenheit und Abwesenheit von Ivermectin sowie Potenzen von Ivermectin ± SEM. Prüfung auf signifikante Abweichung vom wt h₂P₂X₄-Rezeptor durch einen one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test. Signifikanz (*) wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.

Rezeptor		Ivermectin			
Name	Sequenzvariation	EC ₅₀ ± SEM von Ivermectin (µM)	ATP Antwort bei 100 µM (%) ohne Ivermectin	ATP Antwort bei 100 µM (%) in Anwesenheit von 10 µM Ivermectin	IC ₅₀ ± SEM von Ivermectin (µM)
wt P2X4	-	0,310 ± 0,206	100 ± 15	168 ± 10	n.v.
wt P2X2	-	n.v.	139 ± 9	139 ± 2	n.v.
<u>Potentierung</u>					
Name	Sequenzvariation	EC ₅₀ ± SEM von Ivermectin (µM)	ATP Antwort bei 100 µM (%) ohne Ivermectin	ATP Antwort bei 100 µM (%) in Anwesenheit von 10 µM Ivermectin	IC ₅₀ ± SEM von Ivermectin (µM)
Chimera c2-c5	P2X4 (P2X2C116-T186)	0,199 ± 0,005	50 ± 2	135 ± 12	n.v.
Chimera c10	P2X4 (P2X2R301Q308)	1,15 ± 0,66**	40 ± 6	70 ± 12	n.v.
<u>Funktionsgewinn</u>					
Name	Sequenzvariation	EC ₅₀ ± SEM von Ivermectin (µM)	ATP Antwort bei 100 µM (%) ohne Ivermectin	ATP Antwort bei 100 µM (%) in Anwesenheit von 10 µM Ivermectin	IC ₅₀ ± SEM von Ivermectin (µM)
Chimera c1	P2X4 (P2X2V71-I83)	1,82 ± 0,76**	4 ± 1	29 ± 1	n.v.
Chimera c9	P2X4 (P2X2T281-P290)	0,356 ± 0,046	5 ± 1	47 ± 6	n.v.
<u>Inhibition</u>					
Name	Sequenzvariation	EC ₅₀ ± SEM von Ivermectin (µM)	ATP Antwort bei 100 µM (%) ohne Ivermectin	ATP Antwort bei 100 µM (%) in Anwesenheit von 10 µM Ivermectin	IC ₅₀ ± SEM von Ivermectin (µM)
Chimera c7	P2X4 (P2X2I218-D224)	n.v.	54 ± 1	30 ± 1	25,8 ± 8,6****
Chimera c8	P2X4 (P2X2R265-L269)	n.v.	61 ± 10	29 ± 5	12,1 ± 2,9****
Chimera c6	P2X4 (P2X2N208-S216)	n.v.	87 ± 3	60 ± 10	20,1 ± 6,9****

7.4 Homologie-Modelling und Molecular Docking

Zahlreiche frühere Studien, die darauf abzielten die ATP-Bindungsstelle am P2X₄-Rezeptor zu charakterisieren und das Verständnis des Mechanismus der ATP-induzierten Ionenkanalöffnung zu erhöhen, haben gezeigt, dass eine Abwärtsbewegung der Kopfdomäne und eine Aufwärtsbewegung der Rückenflossendomäne und der linken Flosse-domäne elementare Mechanismen im Prozess der P2X₄-Rezeptor Aktivierung darstellen.^{83,105} Auf dieser Basis haben wir die Analyse des P2X₄-Rezeptors fortgesetzt. Ausgehend von den Röntgen-Strukturen des Zebrafisch-(zf) P2X₄-Rezeptors in der geschlossenen¹⁴ und der offenen Form⁸³ wurde ein Homologie-Modell (Abb. 71B) des humanen P2X₄-Rezeptors durch Dr. V. Namasivayam entwickelt.

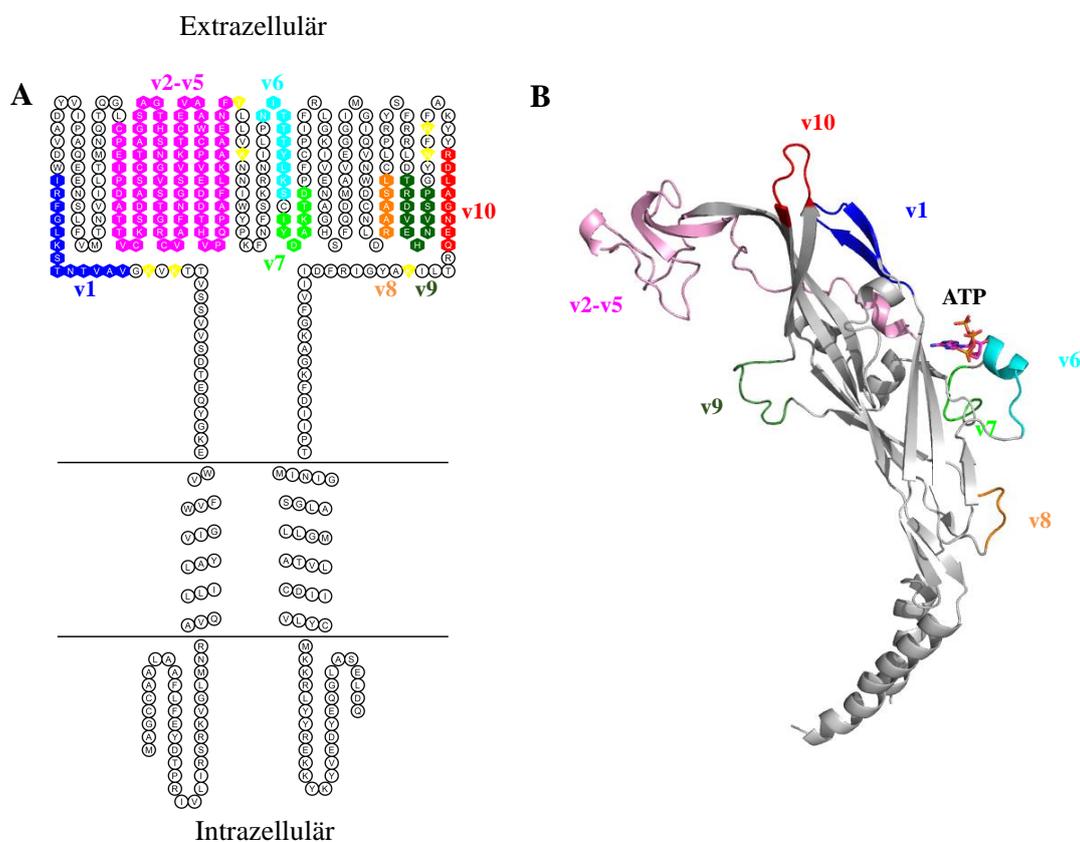


Abbildung 71: (A) Snake-like Plot des humanen P2X₄-Rezeptors. Farblich markierte Aminosäurereste stellen die Sequenzvariationen v1-v10 dar. Gelb markierte Aminosäurereste sind Teil der ATP-Bindungsstellen. (B) Homologie-Modell des humanen P2X₄-Monomers in ATP-gebundener Form und farblich gekennzeichneten Bereichen v1-v10 (Dr. V. Namasivayam).

Die Aminosäurereste der Regionen v6, v7 und v8 bilden gemeinsam die Rückenflossenregion (Abb. 71) und sind innerhalb der P2X-Rezeptorfamilie in ihrer Sequenz variabel (vgl. Abb. 72).

Variable region v6

```

SP|P51575|P2RX1_HUMAN EVNAAHMKT 216
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN DRTDGYLKR 225
SP|P56373|P2RX3_HUMAN NLTARDMKT 202
SP|Q99571|P2RX4_HUMAN NITTTYLKS 216
SP|O15547|P2RX6_HUMAN TWDPTYFKH 227
SP|Q99572|P2RX7_HUMAN GLNIT---- 215

```

Variable region v7

```

SP|P51575|P2RX1_HUMAN LFHKTLH 224
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN TFHEASD 233
SP|P56373|P2RX3_HUMAN RFHPDKD 210
SP|Q99571|P2RX4_HUMAN IYDAKTD 224
SP|O15547|P2RX6_HUMAN RYEPQFS 235
SP|Q99572|P2RX7_HUMAN TFHKTON 223

```

Variable region v8

```

SP|P51575|P2RX1_HUMAN WHVRH 269
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN LPASE 278
SP|P56373|P2RX3_HUMAN KAWDQ 255
SP|Q99571|P2RX4_HUMAN RAASL 269
SP|O15547|P2RX6_HUMAN TGDSG 280
SP|Q99572|P2RX7_HUMAN RWFHH 268

```

Abbildung 72: *Alignment der variablen Regionen v6, v7 und v8 in humanen P2X-Subtypen.*

Bindet ATP an die orthosterische Bindungsstelle des P2X4-Rezeptors, so bildet sich eine Vertiefung unterhalb der Rückenflossenregion des Rezeptors. Ivermectin wurde in diesen Bereich des offenen humanen P2X4-Rezeptor-Modells gedockt und mögliche Bindungspositionen der Verbindung und ihre Interaktionen mit Aminosäureresten der v6-, v7- und v8-Domänen detailliert analysiert. Die Bindungsposition mit der geringsten freien Bindungsenergie zeigte Interaktionen des Ivermectins mit Aminosäureresten aller drei betrachteter Regionen der Rückenflossendomäne (v6, v7 und v8). Demnach können zahlreiche Aminosäurereste an den Wechselwirkungen mit Ivermectin beteiligt sein, wenngleich eine eindeutige Aussage zu den exakten Wechselwirkungen aufgrund der hohen mechanischen Flexibilität der Region und der begrenzten Aussagekraft eines Homologie-Modells ohne weitere experimentelle Belege zu spekulativ wäre. Abbildung 73 zeigt die ermittelte Bindungsstelle von Ivermectin im extrazellulären Bereich des Rezeptors.

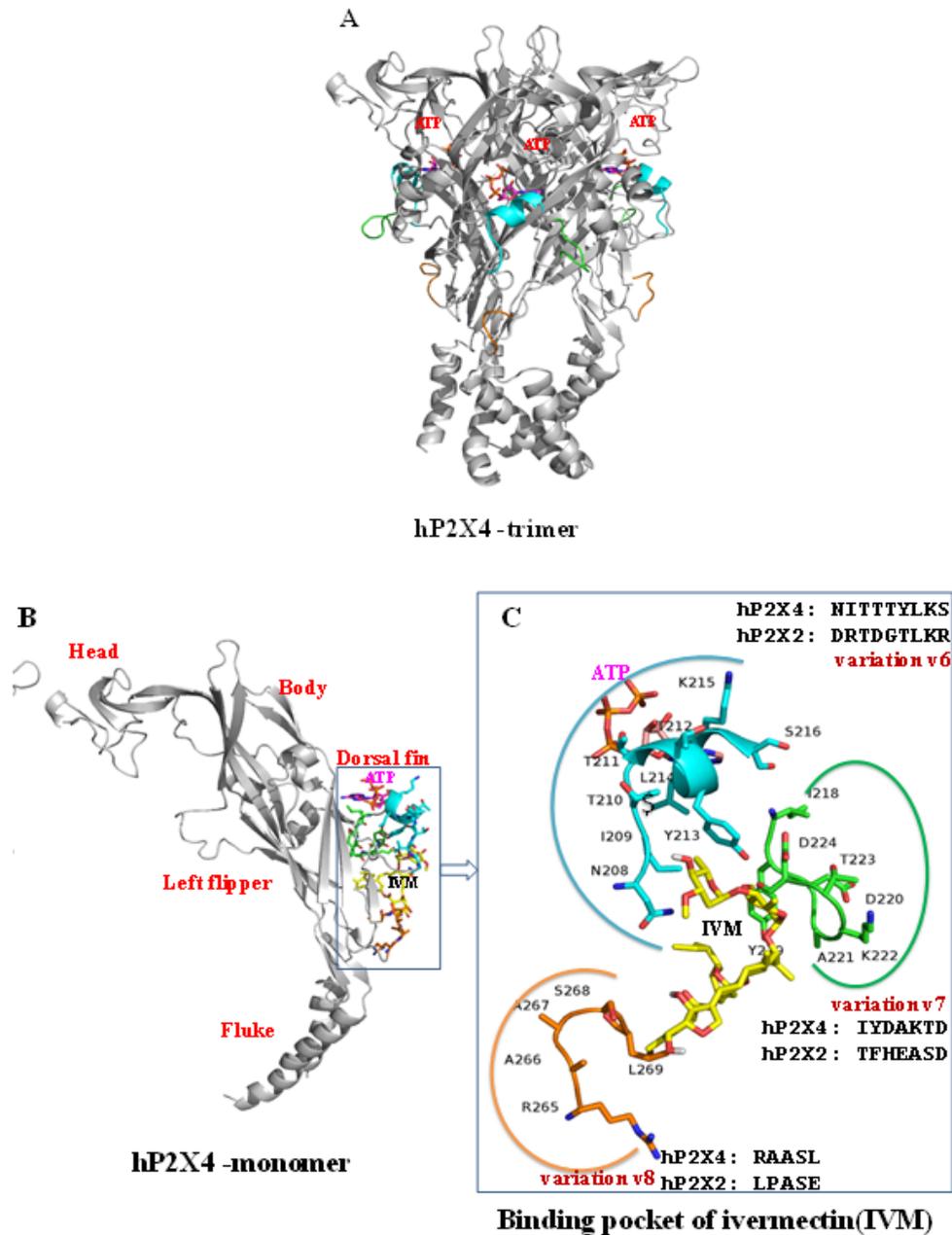


Abbildung 73: (A) Humanes P2X₄-Rezeptor-Trimer in ATP-gebundener Konformation. Die variablen Regionen v6, v7 und v8 sind farbig markiert in türkis, grün bzw. orange. (B) Monomer des humanen P2X₄-Rezeptors in ATP-gebundener Form mit den hervorgehobenen variablen Regionen v6, v7 und v8. Die Position des energieminiert gedockten Ivermectins (IVM) innerhalb des Homologie-Modells des humanen P2X₄-Rezeptors ist illustriert durch gelb gefärbte Kohlenstoffatome und rot gefärbte Sauerstoffatome. (C) Nahansicht der Ivermectin-Interaktionsstelle. Dargestellt sind Ivermectin, ATP und die Aminosäurereste der Regionen v6, v7 und v8 (Abb. Dr. V. Namasivayam).

In (A) wird das humane P2X4-Rezeptor-Trimer im ATP-gebundenen Zustand dargestellt. (B) zeigt das P2X4-Monomer in ATP- und Ivermectin-gebundener Form sowie (C) eine Nahansicht der vorgeschlagenen Interaktionsstelle von Ivermectin innerhalb der Regionen v6, v7 und v8. Die Aminosäurereste Asn208 (v6) und Thr223 (v7) könnten in die Bildung von Wasserstoffbrücken involviert und Tyr213 (v6) an der Bildung schwacher aromatischer Wechselwirkungen mit Wasserstoffatomen des Ivermectins beteiligt sein. Zusätzlich ist auch eine Beteiligung von Ile209 (v6), Phe226 (zwischen v7 und v8), Leu269 (v8), Leu271 (zwischen v8 und v9) an hydrophoben Wechselwirkungen möglich. Die ermittelte Bindungsposition von Ivermectin ermöglicht aufgrund ihrer Entfernung von 4.5-4.0 Å schwächere Interaktionen des Moleküls mit Aminosäureresten in der unmittelbaren Umgebung. So könnten die Seitenketten der Aminosäurereste Asp224 (v7), Phe 226 (zwischen v7 und v8), Ser268 (v8) und das Rückgrat von Pro272 (zwischen v8 und v9) an Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrücken-Bindungen oder wie im Falle des Phe226 (zwischen v7 und v8), in Form von aromatischen Wechselwirkungen mit Wasserstoffatomen, an der Bindung des Ivermectin beteiligt sein. Für genauere Aussagen wären weitere Mutagenesen der genannten Aminosäurereste notwendig.

7.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnten wir demonstrieren, dass extrazelluläre variable Regionen eine Rolle in der allosterischen Modulation des P2X4-Rezeptors durch den positiven allosterischen Modulator Ivermectin spielen. Aus dem Austausch der Regionen v6, v7 und v8 im humanen P2X4-Rezeptor gegen die korrespondierenden Regionen des humanen P2X2-Rezeptor-Wildtyps resultierte ein deutlicher Effekt auf die positive allosterische Modulation durch Ivermectin. Interessanterweise zeigte Ivermectin an diesen drei P2X4(P2X2)-Rezeptorchimären (**c6**, **c7** und **c8**) nicht nur signifikant reduzierte Affinität, sondern auch eine gegensätzliche Modulationsrichtung. Ivermectin wirkte negativ statt positiv auf den ATP-induzierten Calciumeinstrom an den Chimären **c6**, **c7** und **c8**.

7.5.1 Potenzierung durch Ivermectin

An den chimären Rezeptoren **c2-c5** und **c10** wurden keine signifikanten Veränderungen der allosterischen Potenzierung durch Ivermectin festgestellt. An beiden chimären Rezeptoren potenzierte Ivermectin die ATP-Antwort, in vergleichbarer Weise wie am wt hP2X4-Rezeptor. Dies deutet daraufhin, dass Ivermectin keine Interaktionen mit Aminosäureresten der Regionen v2-v5 oder v10 des humanen P2X4-Rezeptors eingeht.

7.5.2 Funktionsgewinn

Ivermectin führte an den chimären Rezeptoren **c9** und **c1**, die nur 4-5 % Aktivierung durch ATP zeigten, zu einem signifikanten Funktionsgewinn, also einer positiven alloste-

rischen Modulation durch Ivermectin. Dies zeigt, dass die variablen Regionen v1 und v9 möglicherweise eine Rolle in der Rezeptoraktivierung durch ATP spielen, jedoch keine Rolle im Mechanismus der positiven allosterischen Modulation durch Ivermectin. Dies verdeutlicht außerdem den allosterischen Modulationscharakter des Ivermectins. Da Ivermectin jedoch nur in Anwesenheit von ATP den P2X4-Rezeptor aktivieren kann,³⁸ zeigen diese Ergebnisse auch, dass der Austausch der Regionen v1 und v9 keinen direkten Einfluss auf die ATP-Bindung hat. Möglicherweise sind stattdessen wichtige allosterische Bewegungen, die im Rahmen der Rezeptoraktivierung eine Rolle spielen, durch den Sequenzaustausch unterbunden. Diese Hypothese wird durch eine frühere Patch-Clamp Studie unterstützt, die beschreibt, dass Aminosäurereste in der Nähe der orthosterischen Bindungsstellen in essentielle, P2X4-spezifische allosterische Prozesse involviert sind, die von der ATP-Bindung zur Kanalöffnung führen (vgl. Kapitel 5.1.1).⁹⁶ Die variablen Bereiche v1 und v9 liegen in unmittelbarer Nähe der orthosterischen Bindungsstellen. Ivermectin könnte demnach essentielle allosterische Bewegungen stabilisieren, die die Öffnung des Ionenkanals erleichtern. Bereits 2004 konnte in elektrophysiologischen Experimenten gezeigt werden, dass Ivermectin den offenen Zustand des Ionenkanals stabilisiert,³⁹ was die vorliegenden Ergebnisse zusätzlich unterstützt.

7.5.3 Negative allosterische Modulation

Computer-Simulationen basierend auf dem Homologie-Modell des humanen P2X4-Rezeptors zeigten, dass die variablen Regionen v6, v7 und v8 während des Prozesses der Rezeptor-Aktivierung eine Vertiefung unterhalb der Rückenflossen-Region bilden, die aus Aufwärtsbewegungen der linken Flosse und der Rückenflossenregion bei gleichzeitiger Abwärtsbewegung der Kopfregion des Rezeptors resultiert. Dockingstudien in die gebildete Vertiefung zeigten eine gute Aufnahme der Verbindung. Ivermectin konnte mit Aminosäureresten aller drei variabler Regionen v6, v7 und v8 interagieren. Möglicherweise erleichtert oder verlängert die Bindung von Ivermectin in diese Vertiefung den Aufenthalt der Rückenflossenregion des Rezeptors im aktivierten Zustand (Aufwärtsbewegung der Rückenflossenregion in Richtung der ATP-Bindungsstelle) was zur Potenzierung des ATP-Effektes führt. Von früheren Experimenten mit chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren ist bekannt, dass Transmembrandomänen und Teile der extrazellulären Domänen eine wichtige Rolle in der positiven allosterischen Modulation des humanen P2X4-Rezeptors durch Ivermectin spielen.^{103,104} Eine experimentelle Studie, in der Sequenzen des P2X2-Rezeptors durch korrespondierende Sequenzen des P2X4-Rezeptors ersetzt wurden, zeigte, dass der Austausch von nur einer Transmembrandomäne (TMD) oder der extrazellulären Domäne nicht ausreicht um die Ivermectin-Sensitivität auf den P2X2-Rezeptor zu übertragen. Der Austausch beider TMDs reichte aus um partielle Sensitivität für Ivermectin zu erzielen und der gemeinsame Austausch von TMD2 und der extrazellulären Domäne führte zur vollen Ivermectin-Sensitivität des P2X2-Rezeptors. Der gleichzeitige Austausch beider TMDs und der Extrazellu-

lärdomäne führte zu einem P2X2-Rezeptor mit höherer Ivermectin-Sensitivität als der P2X4-Rezeptor.¹⁰⁴ Verschiedene Experimente konnten einzelne Aminosäurereste (W46, W50, D331, M336 und andere) innerhalb der Transmembrandomänen TMD1 und TMD2 identifizieren, die in den Prozess der Ionenkanal-Passage involviert sind¹⁰⁶ und die in Patch-Clamp-Studien mit Effekten, die durch Ivermectin induziert werden, interferierten.^{43,100,107–109} Jedoch konnte keine der genannten Einzelmutationen alle positiven modulatorischen Effekte des Ivermectins reduzieren.¹⁰⁰ Mutationen innerhalb der Transmembrandomänen konnten die verlängerte Kanalaktivierung und die Erweiterung der Pore aufheben, jedoch nicht die Potenzierung des maximalen ATP-Effekts durch Ivermectin.^{100,109} Daten aus Mutagenesestudien am Aminosäurerest W46 unterschieden sich zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen.^{100,104,107} Während eine Gruppe für die Einzelmutante W46A am Ratten P2X4-Rezeptor in Anwesenheit von Ivermectin eine Erhöhung des maximalen Effektes von ATP messen konnte,¹⁰⁴ konnte eine andere Gruppe¹⁰⁷ an der gleichen Mutante Inhibition durch Ivermectin messen. Eine Studie postulierte die Beteiligung von Y42 an der Bindungsstelle von Ivermectin.¹⁰⁷ Diese experimentellen Ergebnisse sind schwierig zu interpretieren, da Y42 einen konservierten Aminosäurerest darstellt, der eine besondere Rolle in der Kanalaktivierung innerhalb der gesamten P2X-Rezeptorfamilie spielt.¹¹⁰ Eine Mutation in dieser Position führte zu P2X-Rezeptoren mit veränderter ATP-Affinität und Kanalpassagen-Eigenschaften.¹¹⁰ Möglicherweise wird die Hemmung durch die Bindung an einer anderen Bindungsstelle induziert als die Steigerung. Der hemmende Effekt ist beim P2X4-Wildtyp-Rezeptor nicht apparent, weil er vom aktivierenden Effekt überlagert wird. Erst wenn der stimulierende Effekt reduziert oder vollständig blockiert ist (wie bei **c6**, **c7** und **c8**) wird ein hemmender Effekt beobachtet. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen und in Übereinstimmung mit Literaturdaten³⁹ postulieren wir daher die Existenz von zwei Ivermectin-Bindungsstellen im P2X4-Rezeptor, die erste zwischen den Transmembrandomänen (geringe Affinität, IC₅₀-Werte im micromolaren Bereich) und die zweite innerhalb der variablen Regionen v6, v7 und v8 (hohe Affinität, EC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich). Mutationen innerhalb der Bindungsstelle im extrazellulären Bereich (v6, v7 und v8) heben den potenzierenden Effekt von Ivermectin auf und führen, wie an den Chimären **c6**, **c7** und **c8**, zur Rezeptorinhibition.

Diese Hypothese einer zweiten Bindungsstelle mit geringer Affinität wird durch verschiedene experimentelle Ergebnisse gestützt. **Erstens** konnten wir in unseren Selektivitätsstudien zeigen, dass Ivermectin die humanen P2X1-, humanen P2X3- und Ratten-P2X3-Rezeptoren nicht potenziert, sondern konzentrationsabhängig inhibiert, wenn auch mit geringerer Potenz (IC₅₀ im mikromolaren Bereich). Die chimären Rezeptoren **c6**, **c7** und **c8** zeigten ebenfalls keine Potenzierung durch Ivermectin, die Rezeptoren wurden jedoch durch hohe Konzentrationen (im mikromolaren Bereich) an allosterischem Modulator inhibiert. **Zweitens** ist die von uns postulierte Ivermectin-Bindungsstelle im extrazellulären Bereich innerhalb der P2X-Familie variabel, während die Aminosäurereste zwischen den Transmembrandomänen in der P2X-Familie konser-

viert sind. Die Aminosäurereste W46, D331 und M336, die an der Bindung von Ivermectin innerhalb der Transmembrandomänen beteiligt sein sollen,⁴³ sind nicht P2X4-Rezeptor-spezifisch. Die selektive Potenzierung des P2X4-Rezeptors durch Ivermectin lässt sich anhand dieser Aminosäurereste alleine kaum erklären. Betrachtet man die Sequenzen der humanen P2X1-, P2X3- und Ratten-P2X3-Rezeptoren zeigt sich, dass W46 in humanen hP2X1-, humanen P2X3- und Ratten-P2X3-Rezeptoren, D331 und M336 auch im humanen P2X1-Rezeptor und D331 auch im humanen P2X7-Rezeptor vorhanden sind. Nur im humanen P2X2-Rezeptor sind keine der oben erwähnten Aminosäurereste vertreten.

Die hier präsentierte neue Bindungsstelle ist in der P2X-Rezeptorfamilie wenig konserviert, was die Abwesenheit von potenzierenden Effekten in humanen P2X1-, P2X2- und P2X3-Rezeptoren erklären könnte. Ebenso lassen sich speziesspezifische Unterschiede in P2X7-Rezeptoren, beschrieben durch Nörenberg *et al.*,¹⁰² sowie in P2X3- und P2X4-Rezeptoren in Hinblick auf die Ivermectin-Potenzen (vgl. Abb. 63) mit den molekularen Interaktionen des Ivermectin erklären die in Docking-Studien identifiziert werden konnten. Da der Großteil der publizierten Experimente am Rattenrezeptor durchgeführt wurden, können speziesspezifische Unterschiede auch in Hinblick auf die Bindungsstelle nicht ausgeschlossen werden.

Der speziesspezifische Effekt von Ivermectin am humanen P2X7-Rezeptor konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bisher nicht bestätigt werden. Aufgrund einer vorhandenen Mutation im wt hP2X7-Rezeptor müssen diese Ergebnisse jedoch noch einmal wiederholt werden.

Die variablen Regionen v6, v7 und v8 wurden als Loop-Regionen mit großer mechanischer Flexibilität identifiziert, weshalb Aussagen über interagierende Aminosäurereste ohne weitere experimentelle Daten schwer zu treffen sind. In der variablen Region v6 wurden durch den Austausch der Sequenz gegen die korrespondierenden Bereiche des hP2X2-Rezeptors die Aminosäurereste Isoleucin 209 und Tyrosin 213 durch Arginin und Threonin, in der variablen Region v7 Alanin 221 und Lysin 222 durch Glutaminsäure und Alanin und in der variablen Region v8 Leucin 269 und Arginin 265 durch Glutaminsäure und Leucin ersetzt, wodurch sich die Bindungsstelle verändert hat. Die Mehrzahl der Aminosäurereste, die in der Lage sind Interaktionen mit Ivermectin einzugehen, entsprechen jedoch denen in den chimären Rezeptoren **c6**, **c7** und **c8**. So sind Asp224, Phe226, Ser268 und Pro272 ebenfalls im humanen P2X4-Rezeptor vorhanden. Trotzdem könnte der Austausch der Regionen v6, v7 und v8 des P2X4-Rezeptors gegen die entsprechenden Teilsequenzen des humanen P2X2-Rezeptors und die dadurch resultierenden Veränderungen benachbarter spezifischer Aminosäurereste die Orientierung nicht-spezifischer Aminosäurereste sowie deren Fähigkeit zu Wasserstoff-Brückenbindungen oder hydrophoben Wechselwirkungen verändert sowie auch die Form der Bindungsstelle beeinflusst haben. Notwendige und spezifische Wechselwirkungen, die für eine hoch affine Bindung des macrozyklischen Ivermectins nötig wären, könnten so verloren gegangen sein.

Zusammenfassend gehen wir davon aus, dass die potenzierenden und inhibitorischen Effekte des Ivermectins möglicherweise eine Konsequenz aus seiner Eigenschaft, mit zwei verschiedenen Rezeptorbindungsstellen interagieren zu können, darstellen. Die Docking-Simulationen unterstützen die Hypothese, dass Ivermectin an eine extrazelluläre Bindungsstelle binden könnte, die alle drei variable Regionen v6, v7 und v8 einbezieht. Jedoch möchten wir die auf einem Homologie-Modell basierenden Ergebnisse nicht überinterpretieren. In Hinblick auf die mechanische Flexibilität der Regionen v6, v7 und v8 sind die vorgeschlagenen konkreten Interaktionen hypothetisch: wegen konformativer Veränderungen, zum Beispiel im Zusammenhang mit der Rezeptoraktivierung, ist Toleranz für zahlreiche spezifische Interaktionen zwischen Aminosäure-Reste der Regionen v6, v7 und v8 und dem Modulator Ivermectin vorhanden. Zur Zeit können wir ohne weitere experimentelle Belege nicht endgültig festlegen, welche Aminosäurereste der drei Regionen an den Wechselwirkungen mit dem makrocyclischen Molekül Ivermectin im Detail beteiligt sind und damit die Potenzierung bzw. die Inhibition auslösen. Dazu wären weitere experimentelle Studien, beispielsweise mit Einzelmutanten (Asn208, Ile209, Thr223, Phe225, Leu269 und Leu271) innerhalb der Bereiche v6, v7 und v8 oder auch die Bildung einer gegensätzlichen Rezeptor-Chimäre (v6, v7 und v8 aus dem humanen P2X4-Rezeptor in den humanen P2X2-Rezeptor einsetzen) notwendig.

8 BX430

8.1 Einleitung

Das Phenylharnstoff-Derivat **BX430** (vgl. Abb. 74) wurde in elektrophysiologischen Patch-Clamp-Experimenten als selektiver, negativer allosterischer Modulator (NAM) des humanen P2X4-Rezeptors identifiziert.³⁶ An P2X4-Rezeptoren der Ratte und der Maus war keine Inhibition durch **BX430** messbar, während der P2X4-Rezeptor des Zebrafischs effektiv gehemmt wurde. Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Verbindung den ATP-Effekt vom extrazellulären Bereich des Rezeptors aus negativ moduliert. Die Bindungsstelle der Verbindung wird daher in der Ektodomäne oder innerhalb der Transmembran-Domänen vermutet, da eine Applikation von intrazellulärer Seite aus zu keiner Inhibition führte. **BX430** führte außerdem zu einer signifikanten Hemmung der Ivermectin-induzierten positiven Modulation des humanen P2X4-Rezeptors.³⁶

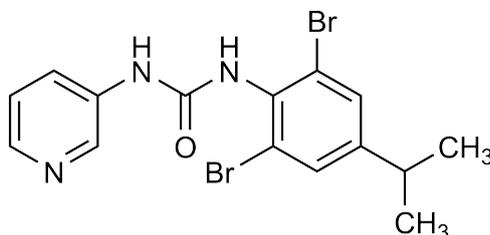


Abbildung 74: Chemische Struktur des allosterischen P2X4-Rezeptor-Antagonisten **BX430**.

8.2 Ergebnisse

8.2.1 Allosterische Modulation der P2X-Rezeptor-Subtypen

Zur Bestätigung der negativen allosterischen Modulation des humanen P2X4-Rezeptors durch **BX430** wurden ATP-induzierte Calcium-Einstrom-Assays durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung in Anwesenheit der EC₈₀-Konzentrationen von ATP an P2X1- (EC₈₀ 0,1 μM), P2X2- (EC₈₀ 1 μM), P2X3- (EC₈₀ 0,1 μM), P2X4- (EC₈₀ 1 μM) und P2X7-Rezeptoren (EC₈₀ 2000 μM) aufgenommen. Die prozentuale Inhibition durch 10 μM an **BX430** und - wenn möglich - der IC₅₀-Wert wurden bestimmt. Das Phenyl-Harnstoff-Derivat **BX430** hemmte den humanen P2X4-Subtypen (vgl. Tab. 24) mit einem IC₅₀-Wert von 0,0667 μM. Am P2X4-Rezeptor der Maus war der Effekt 4-fach (IC₅₀ 0,286 μM) am P2X4-Rezeptor der Ratte 40-fach (IC₅₀ 2,74 μM) schwächer. An anderen P2X-Rezeptor Subtypen führten 10 μM **BX430** zu keiner signifikanten Inhibition (vgl. Abb. 75).

Tabelle 24: Allosterische Modulation der ATP-Antwort durch BX430. Dargestellt sind die prozentuale Inhibition der P2X-Rezeptoren durch 10 μ M BX430 sowie für den P2X4-Subtypen der IC_{50} -Wert \pm SEM von BX430.

Rezeptor		BX430
Typ	$IC_{50} \pm$ SEM (μ M)	%-Inhibition \pm SEM bei 10 μ M
wt P2X4	0,0707 \pm 0,0059	98 \pm 6
r P2X4	2,36 \pm 0,19	84 \pm 4
m P2X4	0,206 \pm 0,022	94 \pm 2
wt P2X1	>> 10	-14 \pm 24
wt P2X2	>> 10	-1 \pm 3
S15VrP2X3	>> 10	24 \pm 9
wt P2X7	>> 10	17 \pm 8

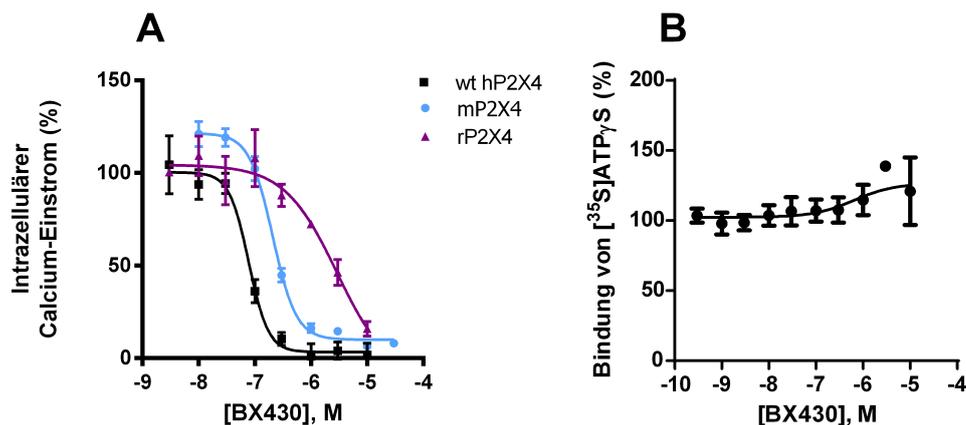
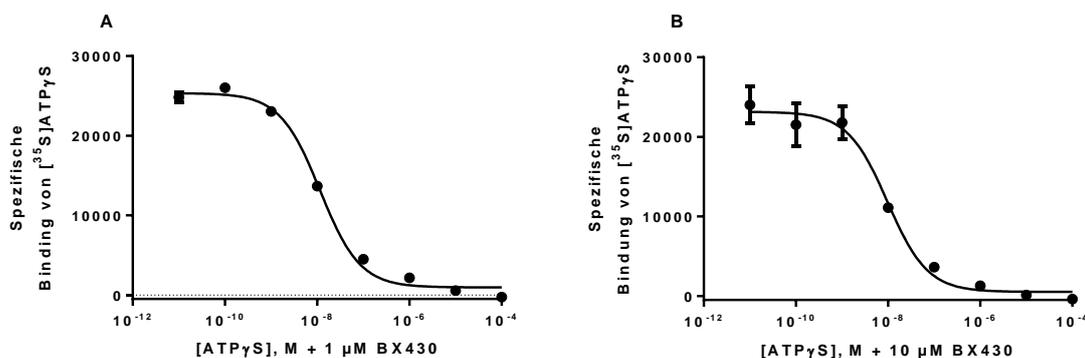


Abbildung 75: (A) Konzentrations-Wirkungskurven von BX430 an P2X4-Rezeptoren. (B) Konzentrations-abhängige Wirkung von BX430 auf die Bindung von $[^{35}S]ATP\gamma S$ an den humanen P2X4-Rezeptor (durchgeführt durch Dr. A. Abdelrahman).

8.2.2 Radioligand-Bindungsstudien von BX430 am hP2X4-Rezeptor

Zur Überprüfung der allosterischen Eigenschaft des humanen P2X4-Rezeptor-Antagonisten wurden Radioligand-Kompetitions-Assays durchgeführt. Dafür wurden Konzentrations-Wirkungskurven von **BX430** aufgenommen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Es wurde die Membranpräparation des in 1321N1 Astrozytoma-Zellen stabil exprimierten humanen P2X4-Rezeptors genutzt.



	K_D (nM), n=3
ATP γ S ohne Inhibitor	14,1 \pm 2,7
ATP γ S + 1 μ M BX430	11,1 \pm 0,54
ATP γ S + 10 μ M BX430	10,5 \pm 2,0

Abbildung 76: *Homologe Kompetitions-Experimente mit ATP γ S gegen 35 S]ATP γ S (0,2 nM) an Membranpräparationen von hP2X $_4$ -Rezeptor exprimierenden 1321N1 Astrozytoma-Zellen in Anwesenheit von 1 μ M BX430 und 10 μ M BX430 (durchgeführt durch Dr. A. Abdelrahman).*

Für die Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden 100 μ M ATP eingesetzt. **BX430** zeigte keine Modulation der Bindung von 0,2 nM ($K_D=0,7$) [35 S]ATP γ S an den humanen P2X $_4$ -Rezeptor (vgl. Abb. 75B). Homologe Kompetitions-Experimente mit ATP γ S in Anwesenheit von 1 μ M oder 10 μ M BX430 (Abb. 76) führten zu keinen signifikanten Veränderungen der K_D -Werte im Vergleich zu den Werten von ATP γ S ohne Inhibitor. Diese Ergebnisse bestätigen den allosterischen Bindungscharakter der Verbindung am humanen P2X $_4$ -Rezeptor.

8.2.3 Allosterische Modulation von chimären P2X(P2X $_2$)-Rezeptoren durch **BX430**

Um die Effekte von **BX430** an den chimären P2X $_4$ (P2X $_2$)-Rezeptoren zu untersuchen, wurden Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung an allen funktionellen Chimären aufgenommen. Die IC_{50} -Werte sowie die prozentuale Inhibition durch 10 μ M **BX430** wurden ermittelt und mit den Werten am humanen P2X $_4$ -Rezeptor verglichen (vgl. Abb. 77 und Tab. 25). An den chimären Rezeptoren **c7** und **c10** konnten keine signifikanten Unterschiede des IC_{50} -Wertes im Vergleich zum humanen P2X $_4$ -Rezeptor gemessen werden. Am Rezeptor **c2-c5** war der IC_{50} -Wert von **BX430** 10-fach erhöht. Die Chimären **c6** (35 %) und **c8** (77 %) wurden durch die Verbindung nur teilweise gehemmt. Die IC_{50} -Werte waren mit 3,09 μ M am **c6**-Rezeptor (46-fach) und 0,323 μ M am **c8**-Rezeptor (5-fach) signifikant erhöht.

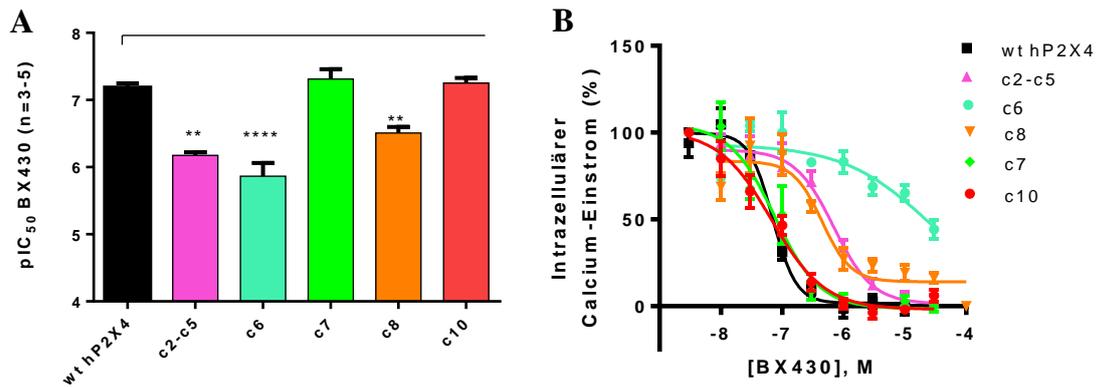


Abbildung 77: (A) pIC_{50} -Werte \pm SEM für BX430 am humanen P2X₄-Rezeptor und chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren. (B) Konzentrations-Wirkungskurven von BX430 an den chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren. Überprüfung der Abweichungen vom wt hP2X₄-Rezeptor auf Signifikanz durch einen one-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts-Test. Signifikanz (*) wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.

Tabelle 25: Negative allosterische Modulation der ATP-Antwort durch BX430. Dargestellt sind die prozentuale Maximalinhibition der chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren durch BX430 sowie die IC₅₀-Werte \pm SEM von BX430 an den Chimären. Überprüfung der Abweichungen vom wt hP2X₄-Rezeptor auf Signifikanz durch einen one-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts-Test. Signifikanz (*) wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.

Rezeptor		BX430	
Typ	Sequenzvariation	IC ₅₀ \pm SEM (μ M)	Maximalinhibition (%)
wt P2X4	-	0,0707 \pm 0,0059	99 \pm 6
wt P2X2	-	>> 10	-1 \pm 3
Chimäre c2-c5	P2X4(P2X2C116-T186)	0,676 \pm 0,073**	98 \pm 6
Chimäre c6	P2X4(P2X2N208-S216)	4,80 \pm 1,91****	46 \pm 5***
Chimäre c7	P2X4(P2X2I218-D224)	0,0970 \pm 0,0326	101 \pm 3
Chimäre c8	P2X4(P2X2R265-L269)	0,379 \pm 0,025**	84 \pm 3
Chimäre c10	P2X4(P2X2R301-Q308)	0,0590 \pm 0,0189	102 \pm 2

8.3 BX430-Bindungsstelle

Docking-Simulationen des allosterischen Inhibitors **BX430** in das Homologie-Modell des humanen P2X4-Rezeptors im **geschlossenen** Zustand zeigten, dass **BX430** in der Nähe der Aminosäurereste der variablen Region v6 bindet. Eines der beiden Brom-Atome am Phenyl-Ring bildet elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Rest Asp224 (v7). In Hinblick auf die mechanische Flexibilität der Region besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass auch das zweite Brom-Atom an den Wechselwirkungen mit dem Rezeptor teilnehmen könnte. Zur Überprüfung der Beteiligung beider Brom-Atome wäre die Synthese eines Derivates mit nur einem Brom-Substituenten notwendig. Die Entfernung zum Carbonyl-Atom des Restes Asn208 (v6) beträgt ungefähr 2.5 Å in einem ca. 85°-Winkel. Der Phenyl- und der Pyridin-Ring können zusätzlich schwache aromatische Wechselwirkungen mit Wasserstoffatomen der Reste Ile 209 und Asn208 (beide v6) ausbilden. Der Isopropyl-Rest der Verbindung bindet innerhalb des Spaltes, der von den Aminosäureresten Thr210 bis Tyr213, im Bereich der variablen Region v6, geschaffen wird. Durch die Anordnung der Isopropyl-Gruppe könnte der Pyridin-Ring eine π - π Wechselwirkung mit Phe226 (zwischen v7 und v8) bilden. Darüber hinaus ist Ser268 aus der variablen Region v8 in der Nähe des Pyridin-Rings von BX430 platziert (vgl. Abb. 78 und 79) und könnte ein Wasserstoffbrückenbindung eingehen.

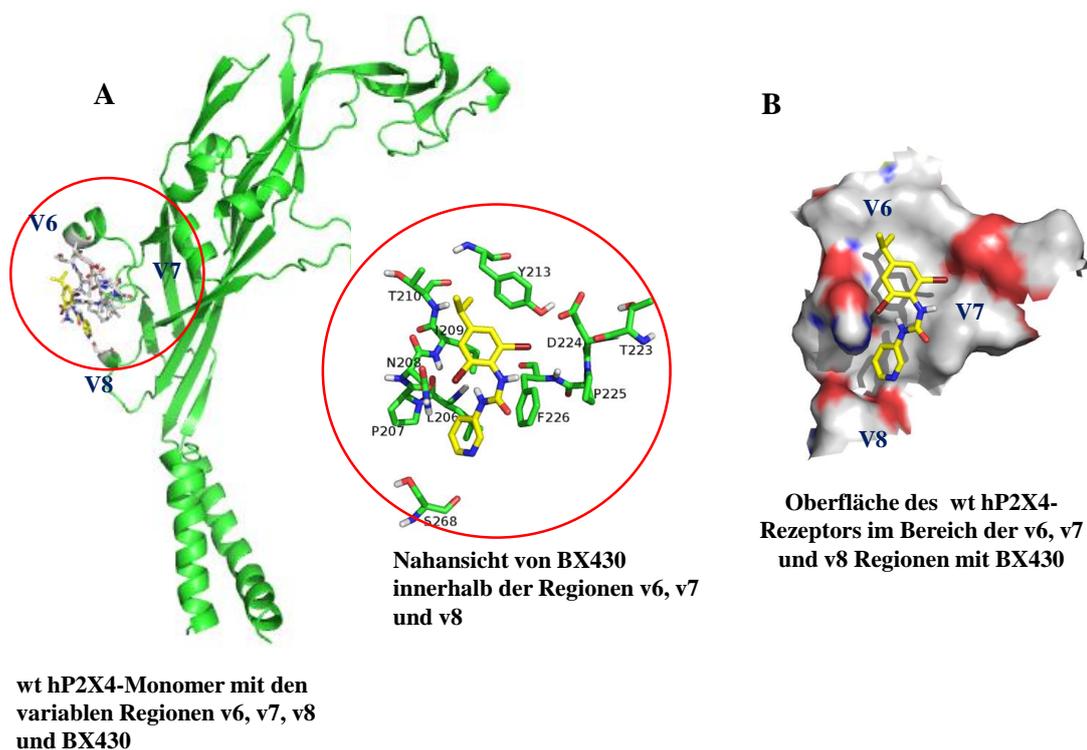
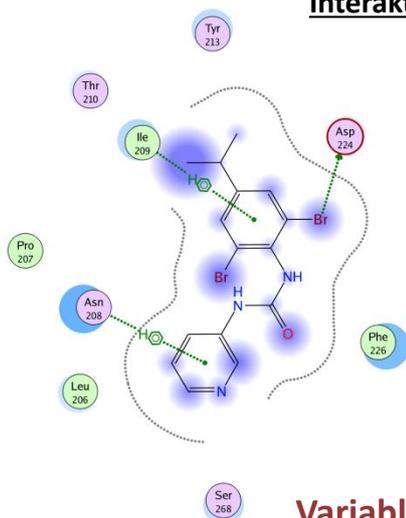


Abbildung 78: (A) Humanes P2X4-Rezeptor-Monomer mit BX430 und den variablen Regionen v6, v7 und v8 sowie eine Nahansicht auf die postulierte Bindungsstelle von BX430. (B) Darstellung der Oberfläche des humanen P2X4-Rezeptors mit BX430 innerhalb der Regionen v6, v7 und v8 (modifiziert nach Dr. V. Namasivayam).

Variable Region v6

hP2X1 **EV**NAAHMKT
 hP2X2 **DR**TDGYLKR
 hP2X3 **NL**TARDMKT
 hP2X4 **NI**TTTYLKS
 rP2X4 **NI**TT**S**YLKS
 mP2X4 **NI**TT**S**YLKS
 hP2X7 **GL**NIT----



Interaktionen von BX430 mit nahen Aminosäureresten

Variable Region v7

hP2X4 **IYDA**KTD
 rP2X4 **IYNA**QTD
 mP2X4 **IYNA**R**T**D

Variable Region v8

hP2X4 **RAAS**L
 rP2X4 **RAAS**L
 mP2X4 **RAAS**H

Abbildung 79: 2D-Interaktions-Diagramm von BX430 und dem humanen P2X4-Rezeptor und Alignment der variablen Region v6 in den humanen P2X-Rezeptoren und v7 und v8 in den P2X4-Rezeptoren (modifiziert nach Dr. V. Namasivayam).

8.4 Zusammenfassung und Diskussion

Das kleine Molekül **BX430** wirkte in unseren Untersuchungen als Antagonist des humanen P2X4-Rezeptors mit einem IC₅₀-Wert von 0,0707 μM. In Radioligand-Bindungsstudien zeigte es keine Modulation der Bindung von [³⁵S]ATPγS an den humanen P2X4-Rezeptor, was den allosterischen Bindungscharakter der Verbindung bestätigt. **BX430** zeigte eine Spezies-Spezifität für den humanen P2X4-Rezeptor. Die Potenz der Verbindung war deutlich schwächer an P2X4-Rezeptoren der Ratte (40-fach) und der Maus (4-fach). An anderen P2X-Subtypen konnte keine Aktivität von BX430 detektiert werden.

Der Austausch der variablen Regionen v2-v5, v6 und v8 in den chimären Rezeptoren **c2-c5**, **c6** und **c8** reduzierte die **BX430**-Potenz an den entsprechenden Rezeptor-mutanten, während keine signifikanten Veränderungen an den **c7**- und **c10**-Chimären gemessen werden konnten (vgl. Tab. 25). Die Erhöhung des IC₅₀-Wertes war moderat an **c8** (5-fach) und **c2-c5** (10-fach), jedoch 50-fach am **c6**-Rezeptor.

Ausgehend von Docking-Simulationen ist **Ile 209** in der variablen Region v6 der wich-

tigste Aminosäurerest für die Bindung von **BX430** im humanen P2X4-Rezeptor. Dieser Aminosäurerest ist innerhalb der P2X4-Familie konserviert und ist im chimären Rezeptor **c6** durch Arginin ersetzt. Sein Austausch könnte die Bindung von **BX430** innerhalb der Bindungsstasche im Bereich der variablen Region v6 behindern, wodurch es zur deutlichen Reduktion der Affinität kam. Andere Aminosäurereste, die an der Bindung von **BX430** beteiligt sein könnten, sind Asn208 in der Region v6 (ersetzt durch Asparaginsäure im humanen P2X2-Rezeptor) und Asn224 innerhalb von v7, ebenfalls ersetzt durch Asparaginsäure im humanen P2X2-Rezeptor. In allen P2X-Subtypen ist die Region v6 komplett variabel, womit sich die Selektivität von **BX430** erklären lassen könnte.

Eine Interaktion von **BX430** mit der Region v2-v5 ist basierend auf dem Homologie-Modell nicht plausibel. Möglicherweise hat der Austausch einer langen Sequenz von 70 Aminosäureresten im chimären Rezeptor **c2-c5** zu einer gewissen Konformationsänderung des Rezeptorproteins geführt und dabei indirekt die Interaktionen des Rezeptors mit dem **BX430**-Molekül beeinflusst.

Ein Alignment der variablen Region v6 in P2X4-Rezeptoren von Maus, Ratte und Mensch ergab einen Unterschied in einem einzigen Aminosäurerest (vgl. Abb. 79). Der Threoninrest im humanen P2X4-Rezeptor ist in den P2X4-Rezeptoren von Maus und Ratte gegen einen Serinrest ausgetauscht. Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, warum die inhibitorische Potenz von **BX430** an den Nagetierrezeptoren im Vergleich zum humanen P2X4-Rezeptor reduziert ist. Genauerer Aufschluss könnte die Mutagenese der Position 212 im humanen P2X4-Rezeptor von Threonin zu Serin geben und umgekehrt in den Nagetier-Rezeptoren von Serin zu Threonin.

Mit ausschließlich diesem einzelnen Aminosäurerest lassen sich jedoch die Unterschiede in den Potenzen zwischen dem P2X4-Rezeptor der Maus und der Ratte nicht erklären. Betrachtet man zusätzlich die variablen Bereiche v7 und v8, zeigt sich ein weiterer Unterschied in Position 222 im variablen Bereich v7. Der basische Aminosäurerest Lysin im humanen P2X4-Rezeptor ist in der Maus gegen das ebenfalls basische Arginin, in der Ratte jedoch gegen einen Glutaminrest ausgetauscht. Zwar scheint der Aminosäurerest 222 entgegen dem benachbarten Asparaginsäurerest in Position 224 nicht direkt an der Bindung von **BX430** beteiligt zu sein, möglicherweise könnte er aber indirekt Einfluss nehmen und Unterschiede in den Potenzen an Maus und Ratte bedingen.

Diese Ergebnisse unterstützen darüber hinaus die Hypothese einer extrazellulären Bindungsstelle von Ivermectin im Bereich von v6 (vgl. Kapitel 7). Der NAM **BX430** wurde kürzlich als Inhibitor der positiven allosterischen Modulation durch Ivermectin am humanen P2X4-Rezeptor identifiziert.³⁶ Beide Verbindungen interagieren nach den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen mit der Region v6, was auf eine gemeinsame oder überlappende extrazelluläre Bindungsstelle für **BX430** und Ivermectin im humanen P2X4-Rezeptor innerhalb der Rückenflossen-Region hindeutet. **BX430** ist deutlich

kleiner als Ivermectin und scheint daher in erster Linie verstärkt mit Aminosäureresten der v6-Region zu interagieren. Das makrocyclische Ivermectin ist dagegen größer, weshalb Wechselwirkungen mit insgesamt drei variablen Regionen (v6, v7, v8) stattfinden können.

9 Der allosterische Antagonist Paroxetin

9.1 Einleitung

Die Verbindung Paroxetin (vgl. Abb. 80) wurde ursprünglich als antidepressiver Wirkstoff entwickelt, der sehr potent die selektive Serotonin-Wiederaufnahme (SSRI) hemmt und daher zu erhöhten Serotonin-Spiegeln führt.¹¹¹ In höheren Konzentrationen wirkt es als nicht-kompetitiver Antagonist an P2X4-Rezeptoren (IC_{50} humaner P2X4-Rezeptor $1,87 \mu\text{M}$).³⁷ In Maus-Modellen konnte der Nutzen von Paroxetin in der Behandlung von taktiler Allodynie bei neuropathischen Schmerzen über einen P2X4-antagonistischen Wirkungsmechanismus gezeigt werden.^{37,112}

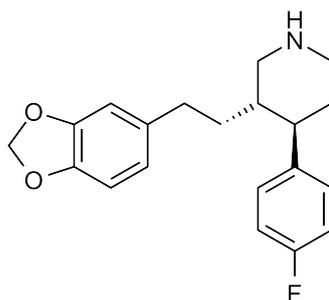


Abbildung 80: Chemische Struktur des allosterischen Antagonisten Paroxetin.

9.2 Ergebnisse

9.2.1 Allosterische Modulation durch Paroxetin

Zur Bestätigung der negativen allosterischen Modulation des humanen P2X4-Rezeptors durch Paroxetin wurden Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung in Anwesenheit einer EC_{80} -Konzentration an ATP zur Stimulation des Rezeptors aufgenommen. Paroxetin hemmte den humanen P2X4-Rezeptor-Wildtyp mit einem IC_{50} -Wert von $2,08 \mu\text{M}$ (vgl. Abb. 81 und Tab. 26). Der Antagonist zeigte eine deutlich geringere Potenz am humanen P2X2-Rezeptor (IC_{50} $29,6 \mu\text{M}$). In einer hohen Konzentration von $10 \mu\text{M}$ hemmte Paroxetin den humanen P2X1-Rezeptor zu 54 % während es keinen signifikanten Effekt am humanen P2X7-Rezeptor zeigte.

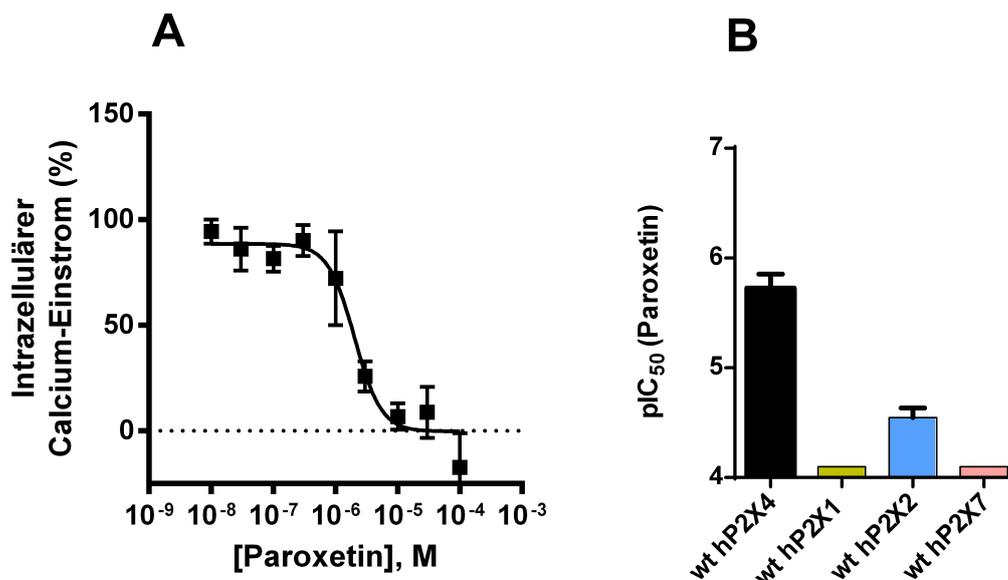


Abbildung 81: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X-Rezeptoren.*

(A) *Konzentrations-Wirkungskurve von Paroxetin am humanen P2X₄-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen und (B) Selektivität von Paroxetin für den P2X₄-Rezeptor-Subtypen. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte ± SEM von Paroxetin an P2X₁-, P2X₂-, P2X₄- und P2X₇-Rezeptoren.*

Tabelle 26: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X-Rezeptor Subtypen.*

Selektivität von Paroxetin für den humanen P2X₄-Subtypen. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als IC₅₀-Werte sowie die prozentuale Inhibition bei 10 μM an Paroxetin ± SEM.

Verbindung	Paroxetin	
	Rezeptortyp	IC ₅₀ ± SEM [μM], n=3-4
hP2X4	2,08 ± 0,55 <small>IC₅₀ = 1,87 μM (Nagata et al. Mol. Pain 2009)</small>	93 ± 6
hP2X2	29,6 ± 6,2	8 ± 4
hP2X1	≥ 10	54 ± 5
hP2X7	> 10	16 ± 0

9.2.2 Allosterische Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren durch Paroxetin

Zur Untersuchung eines weiteren Antagonisten mit moderater Affinität für den P2X₄-Rezeptor und guter Selektivität gegenüber anderen P2X-Rezeptor-Subtypen wurden Konzentrations-Wirkungskurven von Paroxetin an allen funktionellen P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären aufgenommen. Die Aktivität der Verbindung an den Rezeptorchimären war im Vergleich zum humanen P2X₄-Rezeptor unverändert (Abb. 82, 83 und Tab. 27). Alle funktionellen Rezeptorchimären konnten durch Paroxetin vollständig gehemmt werden.

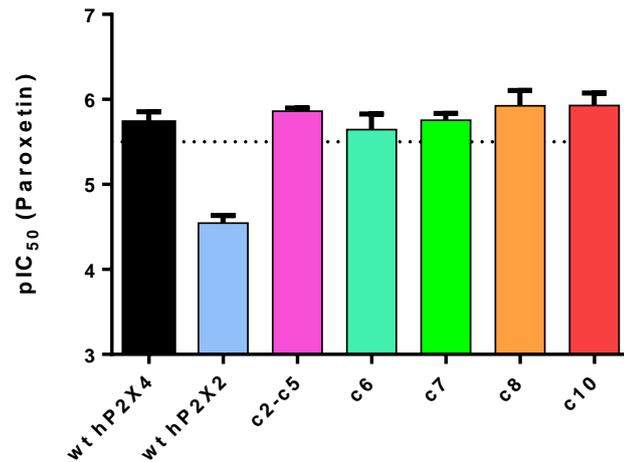


Abbildung 82: *Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären.*

Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren durch Paroxetin. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen als pIC₅₀-Werte ± SEM.

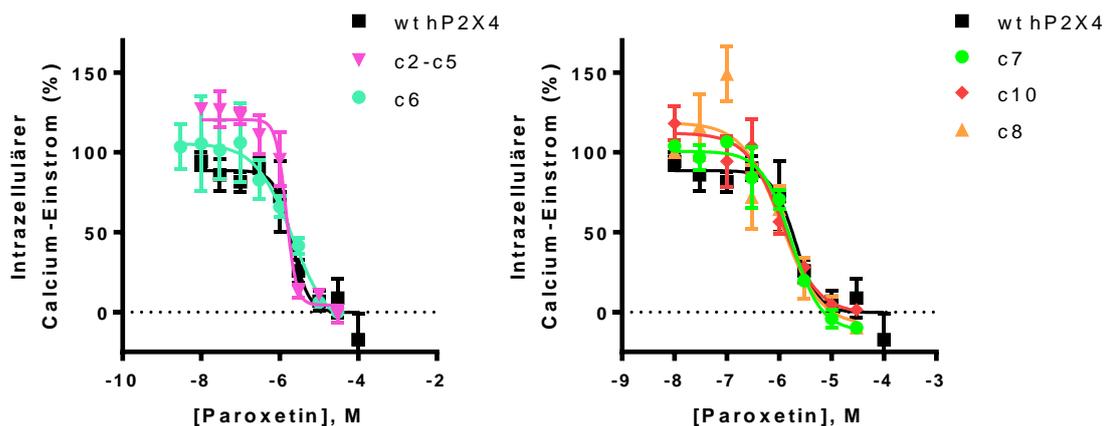


Abbildung 83: *Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären.*

Konzentrations-Wirkungskurven von Paroxetin an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren

Tabelle 27: Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären.

Negative allosterische Modulation von P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren durch Paroxetin. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen von Paroxetin als IC₅₀-Werte ± SEM.

Rezeptor	Verbindung	Paroxetin
Typ	Sequenzvariation	IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt P2X ₄	-	2,08 ± 0,55
wt P2X ₂	-	29,6 ± 6,2
Chimäre c2-c5	P2X ₄ (C116-T186P2X ₂)	1,47 ± 0,22
Chimäre c6	P2X ₄ (N208-S216P2X ₂)	2,72 ± 1,15
Chimäre c7	P2X ₄ (I218-D224P2X ₂)	1,83 ± 0,36
Chimäre c8	P2X ₄ (R265-L269P2X ₂)	1,39 ± 0,49
Chimäre c10	P2X ₄ (R301-Q308P2X ₂)	1,32 ± 0,45

9.2.3 Allosterische Modulation von hP2X4-Rezeptormutanten durch Paroxetin

Zur genaueren Betrachtung des Sequenzbereiches v2-v5, der bereits mit der allosterischen Modulation durch Metall-Ionen im P2X4-Rattenrezeptor in Verbindung gebracht wurde,^{97,98} wurde Paroxetin auch an den vorhandenen P2X4-Rezeptormutanten **H140A**, **G138A**, **T133A**, **S131A**, **D129A**, **K127A** und **D121A** getestet. Dafür wurden erneut Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung an den Mutanten aufgenommen. Tabelle 28 und die Abbildungen 84 und 85 zeigen, dass Paroxetin alle getesteten Rezeptoren mit vergleichbaren Potenzen hemmte.

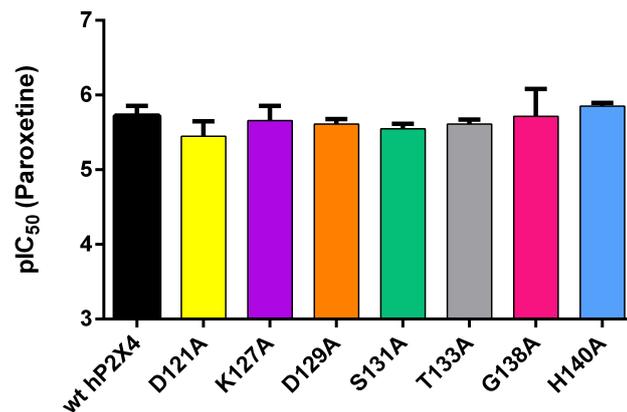


Abbildung 84: *Calciumeinstrom-Experimente an hP2X4-Rezeptormutanten.*

Dargestellt sind die inhibitorische Potenzen von Paroxetin als pIC₅₀-Werte ± SEM.

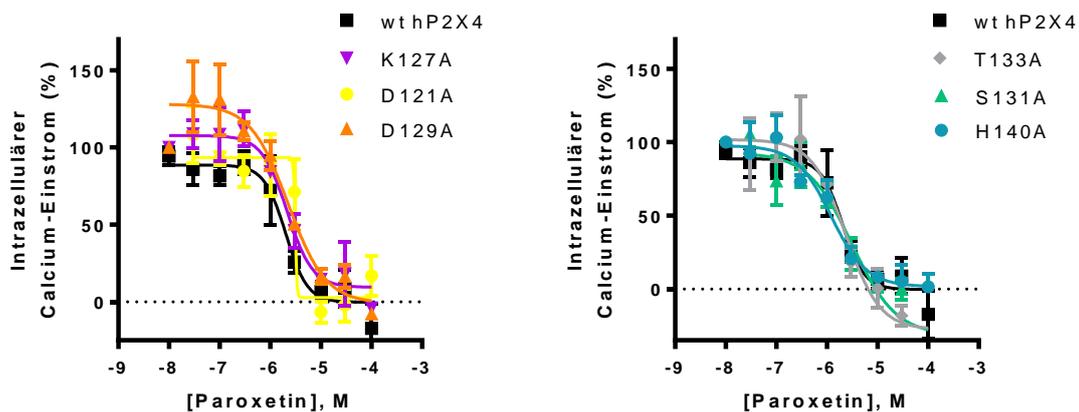


Abbildung 85: *Calciumeinstrom-Experimente an hP2X4-Rezeptormutanten.*

Konzentrations-Wirkungskurven von Paroxetin an hP2X4-Rezeptormutanten.

Tabelle 28: *Calciumeinstrom-Experimente an hP2X4-Rezeptormutanten.*

Negative allosterische Modulation von hP2X4-Rezeptormutanten durch Paroxetin. Dargestellt sind die inhibitorischen Potenzen von Paroxetin als IC₅₀-Werte ± SEM.

Verbindung	Paroxetin
Rezeptortyp	IC₅₀ ± SEM [μM]
wt hP2X4	2,08 ± 0,55
H140A	1,42 ± 0,14
G138A	3,51 ± 2,33
D129A	2,52 ± 0,37
D121A	3,94 ± 1,70
S131A	2,90 ± 0,42
K127A	2,73 ± 1,29
T133A	2,51 ± 0,38

Die Ergebnisse aus Experimenten mit P2X4-Rezeptormutanten unterstützen das Resultat aus den Experimenten mit P2X4(P2X2)-Rezeptorchimären, die keine Interaktion von Paroxetin mit Aminosäureresten des Sequenzbereichs v2-v5 gezeigt haben.

9.3 Zusammenfassung und Diskussion

Der allosterische Antagonist Paroxetin zeigte am humanen P2X4-Rezeptor und an allen funktionellen P2X4(P2X2)-Rezeptoren ähnliche Potenz. Paroxetin geht demnach und im Gegensatz zu den allosterischen Modulatoren Ivermectin und BX430 keine Interaktionen mit den variablen Regionen v2-v5, v6, v7, v8 und v10 ein. Dies deutet auf die Existenz mehrerer allosterischer Bindungsstellen im Bereich der extrazellulären Domäne hin. Des Weiteren konnte auch eine Interaktion mit den Aminosäureresten **H140**, **G138**, **T133**, **S131**, **D129**, **K127** und **D121** im Bereich der Kopfdomäne ausgeschlossen werden, die eine Rolle in der allosterischen Modulation durch verschiedene Metall-Ionen spielt (vgl. Kapitel 10). Die Bindungsstelle(n) von Paroxetin im humanen P2X4-Rezeptor konnte(n) im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht identifiziert werden.

10 Allosterische Modulation der P2X-Rezeptoren durch die Metall-Kationen Cu^{2+} und Zn^{2+}

10.1 Einleitung

Metall-Kationen haben elementare Funktionen in biologischen Systemen als Ladungsträger (Na^+ , K^+), Strukturstabilisatoren (Mg^{2+} , Ca^{2+}) oder Katalysatoren in verschiedensten biochemischen Reaktionen (z.B. Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$, $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$). Während Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} als dissoziierte Salze intra- oder extrazellulär vorliegen, kommen Spurenelemente wie Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$ und $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ in der Regel und auch aufgrund ihrer teilweise vorhandenen Toxizität nur in Proteinkomplexen vor.¹¹³

10.2 Koordination von Metall-Kationen im Organismus

Trotz der zahlreichen theoretisch denkbaren Interaktionsmöglichkeiten zwischen Aminosäureresten und Metall-Kationen hat sich gezeigt, dass je nach Metall-Kation Interaktionen mit bestimmten Aminosäuren favorisiert sind (vgl. Tabelle 29).

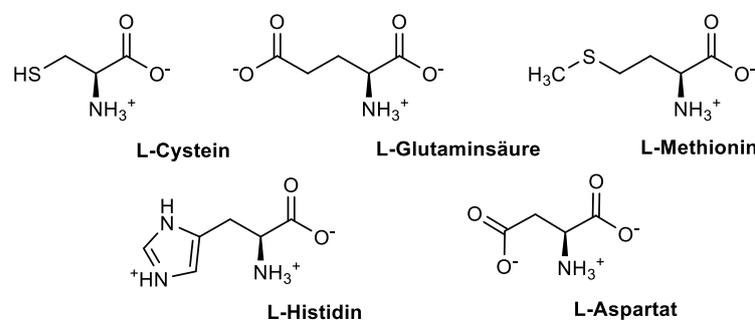
Tabelle 29: Metall-Kationen mit typischen Liganden und Koordinationsgeometrie nach Williams.^{114,115}

Metallkation	Bindungsbeständigkeit	Typische Zahl und Art der Liganden	Typische Koordinationsgeometrie
Zn(II)	hoch	3: His, Cys, (Glu)	verzerrt tetraedrisch
Cu(I), Ag(I)	hoch	3,4: Cys, His, Met	verzerrt tetraedrisch
Cu(II), Pd(II)	hoch	3,4: His, Met, (Cys)	verzerrt quadratisch planar
Fe(II), Ni(II), Co(II), Mg(II)	niedrig	4-6: His, Glu, (Asp)	oktaedrisch (wenig verzerrt)
Fe(III)	hoch	4-6: Glu, Asp, Tyr, Cys	oktaedrisch (wenig verzerrt)

Diese Präferenzen lassen sich durch das HSAB-Konzept (Hard and Soft Acids and Bases) nach Pearson erklären.¹¹⁶ Diesem Prinzip nach existieren harte Säuren, die bei kleiner Größe eine hohe positive Ladung durch wenig Außenelektronen besitzen und schlecht polarisierbar sind (z.B. H^+ , Mg^{2+}), sowie weiche Säuren mit kleiner positiver Ladung, vielen Außenelektronen und großer Größe, die gut polarisierbar sind (z.B.

Ag^+). Auf der anderen Seite gibt es harte Basen, die bei kleiner Größe ebenfalls eine hohe Ladungsdichte aufweisen und schlecht polarisierbar sind (z.B. F^-) sowie weiche Basen, die bei großer Größe durch viele Außenelektronen eine hohe negative Ladung tragen und gut polarisierbar sind (z.B. Br^-). Besonders stabile Komplexe ergeben die Kombinationen aus harten Säuren und harten Basen bzw. aus weichen Säuren und weichen Basen.¹¹⁶ Metall-Kationen stellen demnach Säuren dar, die in Abhängigkeit vom Ionenradius, der Ladung und der Oxidationsstufe harte oder weiche Liganden sein können. Cu^+ ist dem HSAB-Konzept nach eine weiche Säure und interagiert bevorzugt mit den Stickstoff- bzw. Schwefelatomen in den Seitenketten von Aminosäuren wie Histidin, Cystein und Methionin, die weiche Liganden darstellen.¹¹⁵ Cu^{2+} und Zn^{2+} sind dagegen weniger weich. Sie werden in einen Zwischenbereich zwischen hart und weich eingeordnet und interagieren bevorzugt mit Basen, die ebenfalls in diesen Zwischenbereich fallen.¹¹⁷

Eine Analyse von 100 Metalloproteinen und 3000 Übergangsmetall-Komplexen, basierend auf Protein- und Struktur-Datenbanken, konnte die oben beschriebenen präferierten Interaktionen zwischen Metall-Kationen und bestimmten Aminosäuren bestätigen, jedoch in geringerer Anzahl auch das Vorkommen von Zn(II) - und Cu(II) -Aspartat-Komplexen sowie vereinzelt auch die Bildung von Komplexen mit weiteren Aminosäureresten zeigen.¹¹⁸ So konnten im Zusammenhang mit der Vermittlung insbesondere negativer allosterischer Effekte durch Zn^{2+} -Kationen, auch Lysinreste als häufiger vorkommende (13 %) Komplexliganden identifiziert werden.¹¹⁹ Eine Übersicht über Aminosäuren, die bevorzugt koordiniert mit Cu^{2+} und Zn^{2+} vorliegen, sowie die Form der jeweiligen Interaktion, zeigt Abbildung 86.



Aminosäure	Interaktion mit Zn^{2+} / Cu^{2+}
Histidin	Imidazol
Cystein	Thiol
Methionin	Thioether
Aspartat	Carboxylat
Glutaminsäure	Carboxylat

Abbildung 86: Strukturen der durch Zn^{2+} - bzw. Cu^{2+} -Kationen bevorzugten Aminosäuren und mögliche Strukturelemente die an den Interaktionen beteiligt sind.

10.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Kupfer- und Zink-Kationen

Kupferionen als $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ -Redoxsystem spielen eine katalytische Schlüsselrolle in zahlreichen biochemischen Prozessen wie Redox-Reaktionen und Elektronentransfer.^{120,121} Aufgrund dieser Fähigkeit sind sie ein häufiger Bestandteil von Elektronen übertragenden Enzymen. Die Aufnahme von Kupfer, das in der Nahrung bevorzugt als Cu^{2+} vorliegt, sowie der Transport in die Zellen und die Speicherung innerhalb des Organismus geschieht über Kupfertransporter (z.B. Ctr1, ATP7A, ATP7B) und -chaperone (z.B. AtoxI, Cox17, CCS), die jeweils Präferenzen für bestimmte Oxidationsstufen zeigen (vgl. Abb. 87).^{113,114} Die höchsten Kupferkonzentrationen im menschlichen Körper befinden sich in der Leber und im Gehirn.¹¹³ Mutationen in den Genen für die Transporter ATP7A (Menkes-Protein, in extrahepatischen Geweben) und ATP7B (Wilson-Protein, in Hepatozyten) führen zu Kupferverteilungsstörungen.¹¹³

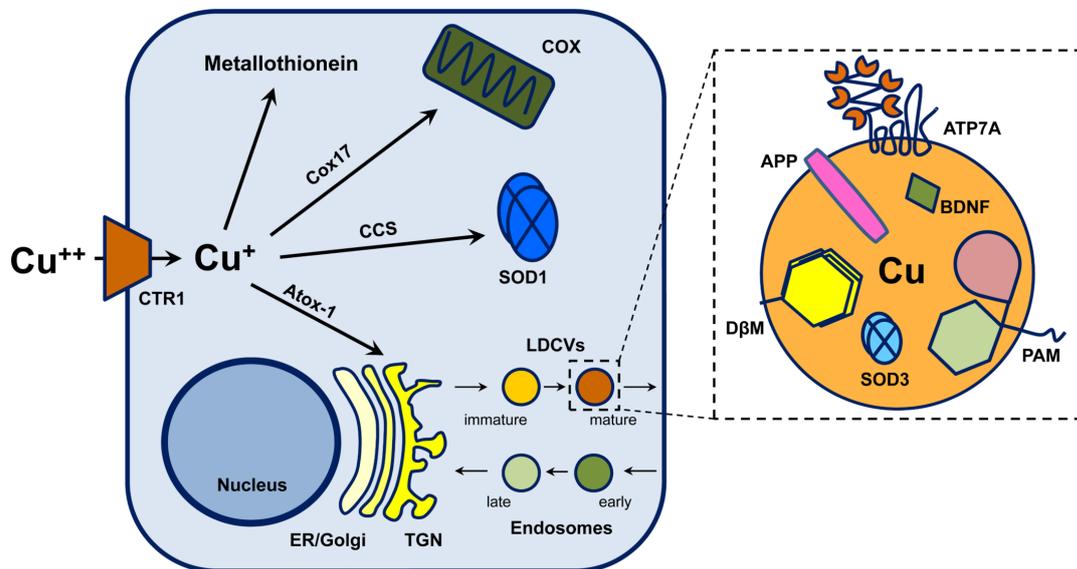


Abbildung 87: Schlüsselorganellen und Proteine der Kupferhomöostase.¹²²

Zn^{2+} -Ionen haben katalytische, strukturelle und signaltransduktorische Bedeutung im Organismus.¹²³ Sie sind Bestandteil von über 300 Enzymen und an der Insulinspeicherung beteiligt sowie in Form von an DNA-bindenden Zink-Finger-Motiven Bestandteil von genregulatorischen Transkriptionsfaktoren.¹¹³ Für den Zn^{2+} -Ionen-Transport stehen CDF- (Cation diffusion facilitator) und ZIP-Transporter zur Verfügung. Abbildung 88 zeigt die Verteilung von Zn^{2+} -Ionen innerhalb der Zellen.

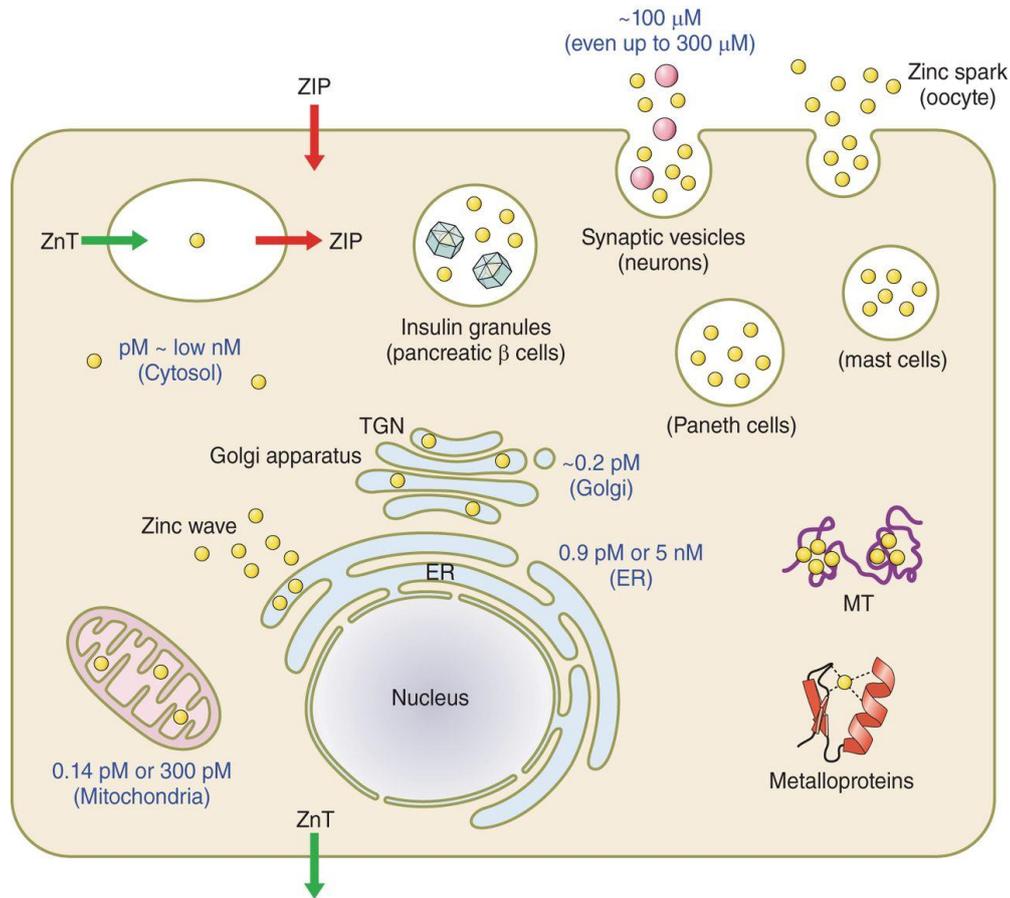


Abbildung 88: Verteilung von Zn^{2+} -Ionen innerhalb der Zellen.¹²³

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Ungleichgewicht von Zink- (Zn^{2+}) und Kupfer- (Cu^{2+}) Ionen im zentralen Nervensystem in die Pathogenese zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen involviert ist.¹²⁴ Proteine, die mit der Pathogenese solcher Erkrankungen assoziiert sind (Amyloid- β -, α -Synuclein- und Prion-Proteine), binden an Übergangsmetalle und beeinflussen möglicherweise die Proteinaggregation.^{125,126} Auch eine Modulation von NMDA- und $GABA_A$ -Rezeptoren durch (Zn^{2+})- und (Cu^{2+})-Kationen ist beschrieben. Zn^{2+} -Kationen modulieren NMDA-Rezeptoren positiv und $GABA_A$ -Rezeptoren negativ, Cu^{2+} -Kationen dagegen beide Rezeptorarten negativ.^{119,127–131} Dies legt einen Einfluss der Metallkationen auf wichtige zentrale Neurotransmittergleichgewichte nahe.^{122,125}

10.4 Allosterische Modulation der P2X-Rezeptoren durch Metall-Kationen

Zahlreiche Metall-Kationen können außerdem P2X-Rezeptoren allosterisch modulieren. Dazu gehören neben Schwermetallen wie Blei (Pb^{2+}), Quecksilber (Hg^{2+}) und Cadmium (Cd^{2+}), Makroelementen wie Calcium (Ca^{2+}), Natrium (Na^+) oder Magnesium (Mg^{2+}), auch essentielle Spurenelemente wie Kupfer (Cu^{2+}) und Zink (Zn^{2+}). Sie werden neben Neurotransmittern präsynaptisch innerhalb von Vesikeln gespeichert, durch elektrische Zelldepolarisation gemeinsam mit diesen freigesetzt und können so postsynaptisch vorhandene Zielstrukturen, beispielsweise Ligand-gesteuerte Ionenkanäle, modulieren.^{97,98} Die Richtung der Modulation (positiv oder negativ) sowie die Position der an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste unterscheiden sich dabei sowohl abhängig vom Rezeptor-Subtypen als auch von der Spezies (vgl. Tab. 30 und Abb. 89). Die Bindungsstellen für Metall-Kationen sind demnach innerhalb der P2X-Familie nicht völlig konserviert.¹⁷ Zusätzliche Komplexität erhält das Thema durch Aminosäurereste die zwar innerhalb der P2X2-Rezeptoren spezies-konserviert vorliegen, jedoch nicht in jeder Spezies an der allosterischen Modulation durch Metall-Kationen beteiligt sind (vgl. Abb. 89). Ebenso zeigt sich am Beispiel des P2X2-Rezeptors, dass konservierte Aminosäurereste abhängig von der Spezies eine gegensätzliche Richtung der Modulation durch Metallkationen vermitteln können.^{42,132}

Sind in P2X2-Rezeptoren ausschließlich Histidinreste an der Bindung von Metallkationen beteiligt, so wurden im P2X4-Rezeptor unterschiedliche Aminosäurereste (H140, D138, D121, E118) als Interaktionspartner identifiziert.^{42,133}

Tabelle 30: Übersicht über die Modulation der P2X₄- und P2X₂-Rezeptoren durch Cu²⁺- und Zn²⁺-Ionen. Speziesspezifische Unterschiede, die Richtung der Modulation (potenzierend, inhibierend) sowie an der Bindungsstelle beteiligte Aminosäurereste sind dargestellt. ^{42,47,98,132-137}

Rezeptor	Cu ²⁺ -Kationen			
	Effekt	EC ₅₀ /IC ₅₀	Methode	Bindungsstellen
hP2X ₄	nicht bekannt	nicht bekannt	-	nicht bekannt
rP2X ₄	inhibitorisch	IC ₅₀ 4,9 µM Coddou et al. 2007	Patch-clamp , ATP 1 µM	H140, D138 Coddou et al. 2003 E118, D121 Igawa et al. 2015
hP2X ₂	inhibitorisch	IC ₅₀ 0,04 µM Punthambaker et al. 2014	Patch-Clamp, EC ₁₀ ATP	H204, H209, H330 Punthambaker et al. 2014
rP2X ₂	Zweiphasig: potenzierend und inhibierend	2 µM, 10-20 % Potentierung 10 µM, 20 % Inhibition Lorca et al. 2005	Patch-Clamp, 10 µM ATP	H120, H213, H192, H319, H245 Lorca et al. 2005
Rezeptor	Zn ²⁺ -Kationen			
	Effekt	EC ₅₀ /IC ₅₀	Methode	Bindungsstellen
hP2X ₄	Zweiphasig	Potentierung bei [Zn ²⁺] < 10 µM und Inhibition > 100 µM Guzmann et al. 1997	Patch-Clamp, 5µM ATP	-
rP2X ₄	Zweiphasig: potenzierend und inhibierend	EC ₅₀ 2,4 µM Acuna-Castillo et al. 2000 50 % Inhibition bei 1000 µM Zn ²⁺	Patch-Clamp, 1 µM ATP	C132, H140, D138 Coddou et al. 2007 H140, D138 Igawa et al. 2015
hP2X ₂	inhibitorisch	IC ₅₀ 8 µM Punthambaker et al. 2012	Patch-Clamp, EC ₁₀ ATP	H204, H209, H330 Punthambaker et al. 2012
rP2X ₂	Zweiphasig: potenzierend und inhibierend	10 µM, 10-20 % Potentierung 100 µM, 20 % Inhibition Lorca et al. 2005	Patch-Clamp, 10 µM ATP	H120, H213, (H192), (H245) Lorca et al. 2005 , Nagaya et al. 2005 , Clyne et al. 2002

```

SP|P56373|P2RX3_HUMAN      -----MNCISDFFTYETTKSVVKSWSWTIGIINRVVQLLIISYFVGVW
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN      MAAQQPKYPAGATARRLARGCWSALWDYETPKVIIVVRNRRLLGVLYRAVQLLILLYFVWYV
SP|P49653|P2RX2_RAT        -----MVRRLARGCWSAFWDYETPKVIIVVRNRRLLGFVHRMVLQLLILLYFVWYV
SP|O15547|P2RX6_HUMAN      ---MCPQLAGAGSMGSPGATTGWGLLDYKTEKVMTRNWRVGLQRLLQFGIVVYVVGWA
SP|Q99572|P2RX7_HUMAN      -----MPACCS---CSDVDFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIFSIV-CFA
SP|Q93086|P2RX5_HUMAN      -----MGQAGCKGLCLSLFDYKTEKYVIAKNKKVGLLYRLLQASILAYLVVWV
SP|P51575|P2RX1_HUMAN      -----MARRFQEEAAFLFEYDTPRMVLRNKKVGVIFRLIQLVVLYVIGWV
SP|Q99571|P2RX4_HUMAN      -----MAGCCAALAAFLFEYDTPRIVLIRSRKVGMLNRAVQLLILAYVIGWV
SP|P51577|P2RX4_RAT        -----MAGCCSVLGSFLFEYDTPRIVLIRSRKVGMLNRAVQLLILAYVIGWV
                               .  . * . :   . : . * :   . : . * .  . .

SP|P56373|P2RX3_HUMAN      FLHEKAYQVRDTAIESSVVTKVKGSGLYA-----NRVMDVSDYVTPPQGTSTVF
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN      FIVQKSYQESETGPESSIITKVKGITTS-----HKVWDVVEEYVKKPEGGSVF
SP|P49653|P2RX2_RAT        FIVQKSYQDSETGPESSIITKVKGITMSE-----DKVWDVVEEYVKKPEGGSVF
SP|O15547|P2RX6_HUMAN      LLAKKGYQERDLEPQFSIITKLGKVSVTQ-----IKELGNRLWDVADVFKPPQGENVF
SP|Q99572|P2RX7_HUMAN      LVSDKLYQRKE-PVISSVHTKVKGIAEVKEEIVENGVKKLVHVSFDTADYTFPLQG-NSF
SP|Q93086|P2RX5_HUMAN      FLIKKGYQDVTSLQSAVITKVKGVAFTN-----TSDLGQRIDWDVADYVIPAQGENVF
SP|P51575|P2RX1_HUMAN      FLYEKGYQTSS-GLISSVSVKLGKGLAVTQ-----LPGLGPQVWDVADYVIPAQGENSF
SP|Q99571|P2RX4_HUMAN      FVWEKGYQETD-SVSSVTTKVKGVAFTN-----TSKLGFRIDWDVADYVIPAQGENSL
SP|P51577|P2RX4_RAT        FVWEKGYQETD-SVSSVTTKAKGVAFTN-----TSQLGFRIDWDVADYVIPAQGENSL
                               : . * * * .   : . * * *   : * . : . * :   . .

SP|P56373|P2RX3_HUMAN      VIITKMIVTENQMGGFCPESEE--KYRCVSDSQC--GPERLPGGGILTGRCVNY-SVLR
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN      SIITRVEATHSQTQGTCPESIRVHNATCLSDADCVAGELDMLGNLRTGRCVYYQGPSK
SP|P49653|P2RX2_RAT        SIITRIEIVTPSQTLGTCPESMRVHSSSTCHSDDDCIAGQLDMQGNIRTGHCVPYYHGDSK
SP|O15547|P2RX6_HUMAN      FLVTNFLVTPAQVQGRCPHEPSPVLANCVDEDCPEGEGGTHSHGVKTTGQCVVFN-THR
SP|Q99572|P2RX7_HUMAN      FVMTNFLKTEGQEQRLCPEYPT-RRTLCSDDRGCKKGMMDPQSKGIQTRGCVVYEG-NQK
SP|Q93086|P2RX5_HUMAN      FVVTNLIVTPNQRONVCAENEGIPDGACSKDSCHAGEAVTAGNVKTRGRCLRRENLRG
SP|P51575|P2RX1_HUMAN      VVMTNFIVTPKQTQGYCAEHPE-G-GICKEDSGCTPGKAKRKAQGIKRTGKCVAFND-TVK
SP|Q99571|P2RX4_HUMAN      FVMTNVLTMNQTLGCEIPD-ATTVCKSDASCTAGSAGTHSNGVSTGRCVFANG-SVK
SP|P51577|P2RX4_RAT        FIMTNMIVTVNQSTQSTCFHIFH-KTSICNSDADHTPGSVDTHHSSGVATGRCVFNE-SVK
                               : . * . * *   : . * * *   : * . : . * :   . * : * * * .

SP|P56373|P2RX3_HUMAN      TCEIQGWCPTVD-TVET-PIMMEAENFTIFIKNSIRFPLFNFKEGNLLPNLTARDMKT
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN      TCEVFGWCPVEDG-ASVSQFLGTMAPNFTILIKNSIHYPKFHFSKGNIARDR-TDGYLKRC
SP|P49653|P2RX2_RAT        TCEVSAWCPVEDG-TSDNHFLGKMAPNFTILIKNSIHYPKFHFSKGNIARDR-TDGYLKRC
SP|O15547|P2RX6_HUMAN      TCEIWSWCPVESG-VVPSRLLAQANFTLFIKNTVTFSKFNFSSKNSALETWDPTDYFKHC
SP|Q99572|P2RX7_HUMAN      TCEVSAWCPIEAVEEAPRALLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTRNILPLGN----ITC
SP|Q93086|P2RX5_HUMAN      TCEIFAWCPLETS-SRPEEPFLKEAEDFTIFIKNHIRFPKFNSSKNSVMDVKDRSFLKSC
SP|P51575|P2RX1_HUMAN      TCEIFGWCPVEVDDIPRPALLREAENFTLFIKNSISFPRFKVNRNRLVEEVNAHMKTC
SP|Q99571|P2RX4_HUMAN      TCEVAAWCPVEDDHTVPQAFLKAAENFTLLVKNNIWYPKFNSSKRNILNITTTYLKSC
SP|P51577|P2RX4_RAT        TCEVAAWCPVEDVGVPTAFLKAAENFTLLVKNNIWYPKFNSSKRNILNITTTYLKSC
                               * * : . * * *   : * : * * : * :   : . : * * *

SP|P56373|P2RX3_HUMAN      RFHPDKDPFCPIRLVGDVVKFAGQDFAKLARTGGVGLGKIGWCDLKDAWDQCIPKYSFT
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN      TFHEASDLYCPIFKLGFIVEKAGESFTELAHKGGVIGVIINWDCDLDPASECNPKYSFR
SP|P49653|P2RX2_RAT        TFDQSDPYCPIFRLGFIVEKAGENTTELAHKKGGVIGVIINWDCDLDPASECNPKYSFR
SP|O15547|P2RX6_HUMAN      RYEPQFSPYCPVFRIGDLVAKAGGTFEDLALLGGSVGIRVHWDCDLTDGDSGCWPHYSFQ
SP|Q99572|P2RX7_HUMAN      TFHKTQNPQCPIFRLGDIFRETGDNFSDVAIQGGIMGIEIYDCNLDRWFHCRPKYSFR
SP|Q93086|P2RX5_HUMAN      HFGPK-NHYCPIFRLGSVIRWAGSDFQDIALEGGVIGINIEWNCDLDKAAESCHPHYSFS
SP|P51575|P2RX1_HUMAN      LFHKTLHLFCPVFQLGYVVQESGQNFSTLAEKGGVVGITIDWHCDLDWHVRHCRPIYEFH
SP|Q99571|P2RX4_HUMAN      YDAKTDPFCPIFRLGKIVENAGHSFQDMAVEGGIMGIQVNWDCNLDRASLCLPRYSFR
SP|P51577|P2RX4_RAT        IYNAQTDPFCPIFRLGTIVEDAGHSFQEMAVEGGIMGIQKWCNLDRASLCLPRYSFR
                               :   * * : : * * . : * * * : * * * : * * *

SP|P56373|P2RX3_HUMAN      RLDSVSEKSSVSPGYNFRFAKYYKMENGSEYRTLLKAFGIRFDVLYVGNAGKFNIIPTII
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN      RLDPKH--VPASSGYNFRFAKYYKING-TTTRTLIKAYGIRIDVIVHGQAGKFSLIPTII
SP|P49653|P2RX2_RAT        RLDPKY--DPASSGYNFRFAKYYKINGTTTTTRTLIKAYGIRIDVIVHGQAGKFSLIPTII
SP|O15547|P2RX6_HUMAN      LQE-----KSNFERTATHWWEQPGVEARTLLKLYGIRFDILVTGQAGKFGLIPTAV
SP|Q99572|P2RX7_HUMAN      RLDDKTTNVSLYPGYNFRYAKYYKE-NNVEKRTLIKVFGIRFDILVFTGGKFDIQLVV
SP|Q93086|P2RX5_HUMAN      RLDNK-LSKSVSSGYNFRFARYYRDAAGVEFRTLMKAYGIRFDVMVNGK-----
SP|P51575|P2RX1_HUMAN      GLYE---EKNLSPGFNFRFARHFVE-NGTNYRHLFKVFGIRFDILVDGKAGKFDIPTMT
SP|Q99571|P2RX4_HUMAN      RLDRDVEHNVSPGYNFRFAKYYRDLAAGNEQRTLIKAYGIRFDIIVFGKAGKFDIPTMTI
SP|P51577|P2RX4_RAT        RLDRDLEHNVSPGYNFRFAKYYRDLAAGNEQRTLIKAYGIRFDIIVFGKAGKFDIPTMTI
                               . : * * * * :   :   * * * : * * * : * * *

SP|P56373|P2RX3_HUMAN      SSVAAFTSVGVGTVLCDIILLNFL-----KGADQYKAKKFEENVETT
SP|Q9UBL9|P2RX2_HUMAN      NLATALTSVGVGSFLCDWILLTFM-----NKNKVYSHKKFDKVCTPS
SP|P49653|P2RX2_RAT        NLATALTSIGVGSFLCDWILLTFM-----NKNKLYSHKKFDKVRTPK

```

Abbildung 89: Alignment zwischen den Sequenzen der humanen P2X- und den Ratten-P2X2- und P2X4-Rezeptoren. Pink: Variationsbereich v2-v5 (durch entsprechenden Sequenzen des hP2X2-Rezeptors ausgetauscht); Türkis: v6; Grün: v7; Orange: v8; Rot: v10; Unterstrichen: Einzelmutante vorhanden; Grau: Mutation zu Histidin führt zur „Humanisierung“ des Rattenrezeptors; Hellgrün: an der Vermittlung allosterischer Effekte durch Cu²⁺-Kationen beteiligt; Gelb: an der Vermittlung allosterischer Effekte durch Zn²⁺- und Cu²⁺-Kationen beteiligt; Violett: an Vermittlung potenzierenden Effekte durch Zn²⁺-Kationen beteiligt. ^{17,42,47,133-135,138-146}

10.4.1 Allosterische Modulation durch Cu^{2+} -Ionen

Kupfer ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$) ist ein wichtiges Spurenelement im Organismus und im Gehirn als Cofaktor, Neuromodulator und strukturelle Komponente in zahlreiche physiologische Prozesse involviert. Die Freisetzung des Metall-Kations in Folge einer elektrischen Depolarisation kann im synaptischen Spalt zu Kupfer-Konzentrationen (Cu^{2+}) von 15 bis 250 mM führen.¹⁴⁷ P2X-Rezeptoren werden durch direkte Interaktion der Cu^{2+} -Ionen mit den Rezeptoren allosterisch moduliert. Dabei stellen neben dem P2X4-Subtypen die P2X2-Rezeptoren (jeweils humaner und Nagetierrezeptor) und der P2X7-Rezeptor der Ratte Zielstrukturen für Cu^{2+} -Ionen dar.¹⁷ Der P2X4-Rezeptor der Ratte wird durch mikromolare Konzentrationen an Cu^{2+} -Ionen inhibiert.¹³³ Als Bindungsstellen werden in der Literatur **H140**, **D138**^{47,133} sowie neuerdings eine zusätzliche Beteiligung der sauren Aminosäurereste **E118** und **D121** diskutiert.¹³⁵ Am P2X2-Rezeptor der Ratte zeigten Kupferkationen, abhängig von der Konzentration, zweiphasige (positiv und negativ) modulierende Effekte. Die potenzierenden Effekte werden mit den Aminosäureresten **H120**, **H192**, **H213**, **H245** assoziiert.^{42,138} Am humanen P2X2-Rezeptor wurde dagegen ein ausschließlich hemmender Effekt (IC_{50} 40 nM) beobachtet.¹³⁴ Mutagenesestudien am hP2X2-Rezeptor konnten die Aminosäurereste **H204**, **H209** und **H330** als relevante Bindungsstellen für die Vermittlung inhibitorischer Effekte durch Cu^{2+} -Kationen identifizieren.¹³⁴ Der P2X7-Rezeptor der Ratte wird durch Cu^{2+} -Ionen ebenfalls gehemmt.¹⁴⁴ Tabelle 30 und Abb. 89 zeigen eine Übersicht der an der allosterischen Modulation der P2X4- und P2X2-Rezeptoren durch Cu^{2+} -Kationen beteiligten Aminosäurereste.

10.4.2 Allosterische Modulation durch Zn^{2+} -Ionen

Zink ist ein essentielles Schwermetall und Zn^{2+} ist ein wichtiger Bestandteil zahlreicher Proteine, darunter intrazelluläre Signalenzyme und Transkriptionsfaktoren.¹⁴⁸ Im zentralen Nervensystem spielt Zink, es liegt im Körper immer in der stabileren Oxidationsstufe (+2) als Zn^{2+} vor, eine wichtige Rolle als neurosekretorisches Produkt und Cofaktor.¹⁴⁹ Zn^{2+} -Ionen werden in bestimmten Hirnregionen gemeinsam mit endogenen Liganden innerhalb der synaptischen Vesikel gespeichert, in Folge von elektrischer Zell-Depolarisation freigesetzt und können dadurch postsynaptisch vorhandene P2X-Rezeptoren modulieren.⁹⁷ Im Gehirn können auf diese Weise Zn^{2+} -Konzentrationen von 100 bis 150 μM erreicht werden.¹⁵⁰ In zahlreichen Publikationen wird ein konzentrationsabhängiger, zweiphasiger Effekt der extrazellulären Modulation durch Zn^{2+} -Ionen an den Rattenrezeptoren (r) rP2X2, rP2X3, rP2X4, rP2X5 beschrieben. In geringen Konzentrationen kommt es durch Zn^{2+} zu einer positiven Modulation der ATP-Antwort, in hohen Konzentrationen zu einer Hemmung.^{17,139–141} An den Rezeptoren rP2X1 und rP2X7 wirken Zn^{2+} -Ionen dagegen nur inhibitorisch.^{139,142–144} Zwei weitere Publikationen von Tittle *et al.*¹⁵¹ und Punthambakert *et al.*¹⁴⁵ beschreiben gegensätzliche Effekte von Zn^{2+} -Ionen am P2X2-Rezeptor der Ratte im Vergleich zum humanen

P2X2-Rezeptor. Während eine starke positive Modulation des Rattenrezeptors durch Zn^{2+} -Ionen beobachtet werden konnte (im Bereich von 2-100 μM), wurde der humane P2X2-Rezeptor im gleichen Konzentrationsbereich durch Zn^{2+} -Ionen ausschließlich gehemmt. Dies deutet auf einen speziesspezifischen zweiphasigen Effekt hin. Die inhibitorische Modulation durch Zn^{2+} -Ionen hing auch von der eingesetzten Menge an ATP ab (Abb. 90). **Zunehmende ATP-Konzentrationen führten zur Abnahme der Zn^{2+} -Potenz.**¹⁵¹

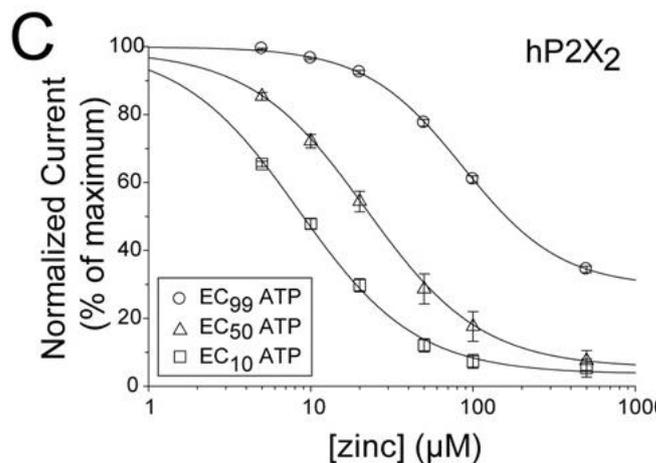


Abbildung 90: *Abhängigkeit der Zn^{2+} -Potenz von der ATP-Konzentration.*¹⁵¹

In Mutagenesestudien konnte im Zusammenhang mit der zweiphasigen Modulation **K197** als elementarer Aminosäurerest identifiziert werden, dessen alleinige Mutation zu Histidin zur „Humanisierung“ der Antwort des P2X2-Rattenrezeptors führte, der anstelle geringer inhibitorischer Zn^{2+} -Potenz hohe inhibitorische Zn^{2+} -Potenz lieferte und damit eine Basis für die beobachteten speziesspezifischen Unterschiede darstellt.¹⁴⁵ Coddou *et al.*^{17,47,133} konnten drei Aminosäurereste identifizieren, die in die Modulation des rP2X4-Rezeptors durch Zn^{2+} -Ionen involviert sind. Während **C132** eine Rolle in der Potenzierung des Rezeptors spielen soll, werden die Mutanten **H140A**, **D138A** im Zusammenhang mit dem inhibitorischen allosterischen Effekt diskutiert. Untersuchungen von Igawa *et al.* konnten die Beteiligung von **C132** nicht bestätigen, wohingegen die Bedeutung der Aminosäurereste **H140** und **D138** zusätzlich belegt werden konnte.¹³⁵ Im Gegensatz dazu spielen im P2X2-Rezeptor der Ratte zwei extrazelluläre Histidinreste, **H120** und **H213**, eine wichtige Rolle bei der Potenzierung durch Zn^{2+} .¹⁹ **H192** und **H245** sind teilweise in diesen Prozess involviert, möglicherweise tragen sie zur Stabilisierung der allosterischen Bindungsstelle bei.^{9,42} Punthambakert *et al.*¹⁴⁵ konnten das „Histidin-Cluster“ **H204**, **H209** und **H330** als elementar für die Inhibition des hP2X2-Rezeptors durch Zn^{2+} identifizieren. Die Dreifachmutation dieser

Histidinreste zu Alanin führte zu einer dramatisch reduzierten inhibitorischen Potenz. Friday *et al.*¹⁴⁶ haben die grundsätzliche Beteiligung negativ geladener Aminosäurereste an der potenzierenden bzw. inhibierenden Modulation des P2X₂-Rezeptors der Ratte durch Zn²⁺ untersucht, konnten jedoch nur **D136** als möglichen Kandidaten für die positive Modulation identifizieren. Zur Übersicht sind die an der Modulation potenziell beteiligten Aminosäurereste in Tabelle 30 bzw. in Abb. 89 dargestellt.

10.4.3 Ergebnisse: Allosterische Modulation durch Cu^{2+} -Ionen

Abbildung 91 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve von CuCl_2 am humanen P2X4-Rezeptor. Der Rezeptor wurde durch Cu^{2+} -Ionen konzentrationsabhängig gehemmt. Der IC_{50} -Wert von CuCl_2 lag mit $3,58 \mu\text{M}$ im Bereich des Literaturwertes ($\text{IC}_{50} 4,9 \mu\text{M}$).¹³³

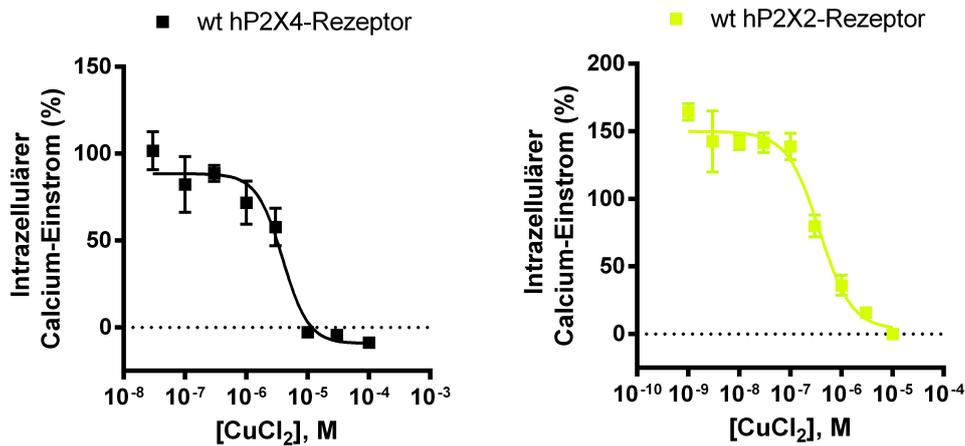


Abbildung 91: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X4- und P2X2-Rezeptoren.

Konzentrations-Wirkungskurven des allosterischen Modulators CuCl_2 an humanen P2X4- und P2X2-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1-Astrozytom-Zellen. Zur Aktivierung des Rezeptors wurde ATP in seinen EC_{80} -Konzentrationen (P2X4R $1 \mu\text{M}$, P2X2R $3 \mu\text{M}$) eingesetzt.

Am humanen P2X2-Rezeptor-Wildtyp war die Potenz von Cu^{2+} -Kationen zehnfach höher als am humanen P2X4-Rezeptor-Wildtyp (Abb. 92). Der IC_{50} -Wert lag bei $0,395 \mu\text{M}$.

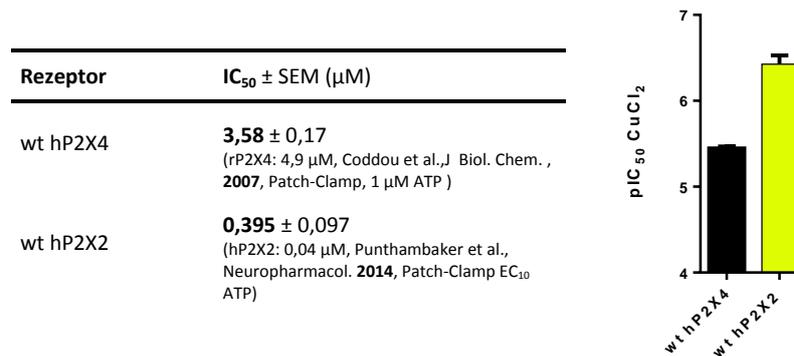


Abbildung 92: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X-Rezeptoren.

Negative Modulation humaner P2X-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1-Astrozytom-Zellen, durch Cu²⁺-Ionen. Links: CuCl₂-Potenzen dargestellt als IC₅₀-Werte im Vergleich zu Literaturdaten. Rechts: CuCl₂-Potenzen an wt hP2X₄- und P2X₂-Rezeptoren dargestellt als pIC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten.

CuCl₂ zeigte keine Modulation der Bindung von 0,2 nM (K_D=0,7) [³⁵S]ATPγS an den humanen P2X₄-Rezeptor (vgl. Abb. 93). Dieses Ergebnis verdeutlicht den allosterischen Bindungscharakter von Cu²⁺-Kationen an den humanen P2X₄-Rezeptor.

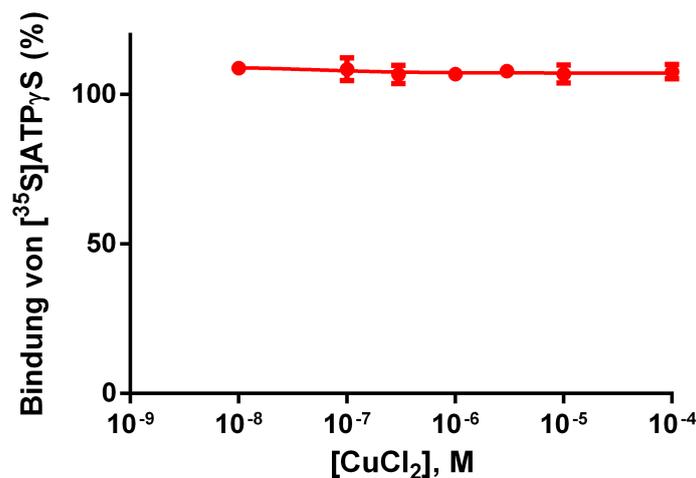


Abbildung 93: Radioligand-Bindungsstudien am humanen P2X₄-Rezeptor.

Kompetitionsexperimente mit CuCl₂ gegen [³⁵S]ATPγS (0,2 nM) an Membranpräparationen von humanen P2X₄-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytom-Zellen (durchgeführt durch Dr. A. Abdelrahman).

Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren durch Cu²⁺-Ionen

Anschließend wurde der Effekt von Cu²⁺-Ionen auf alle funktionellen im Rahmen dieser Arbeit hergestellten chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren getestet. Dafür wurden Konzentrations-Wirkungskurven von CuCl₂ an den chimären Rezeptoren aufgenom-

men. Für die Aktivierung der Rezeptoren wurden die entsprechenden EC_{80} -Werte von ATP eingesetzt. Abbildung 95 zeigt pIC_{50} -Werte und Konzentrations-Wirkungskurven von $CuCl_2$ an den Chimären **c2-c5**, **c6**, **c7**, **c8** und **c10**. Alle Rezeptoren wurden durch Cu^{2+} -Ionen mit ähnlicher Potenz gehemmt (vgl. auch Tab. 31). Es konnten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum humanen P2X4-Rezeptor festgestellt werden.

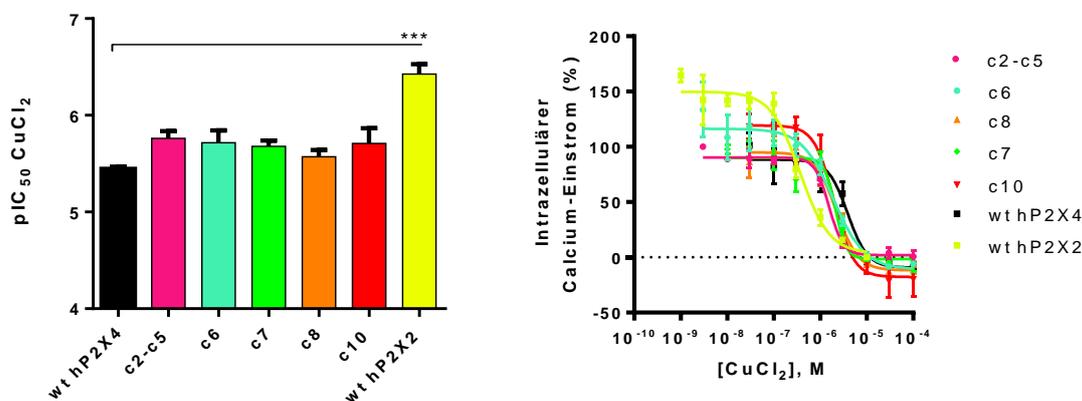


Abbildung 94: Calciumeinstrom-Experimente an chimären $P2X_4(P2X_2)$ -Rezeptoren.

Negative Modulation chimärer $P2X_4(P2X_2)$ -Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1-Astrozytom-Zellen, durch Cu^{2+} -Ionen. Links: $CuCl_2$ -Potenzen dargestellt als pIC_{50} -Werte \pm SEM aus 3-5 Experimenten im Vergleich zum humanen $P2X_4$ -Rezeptor. Rechts: Konzentrations-Wirkungskurven von $CuCl_2$ an chimären $P2X_4(P2X_2)$ -Rezeptoren. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X4-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; und ** wenn $p < 0,01$.)

Tabelle 31: Calciumeinstrom-Experimente an chimären P2X₄-(P2X₂)-Rezeptoren.

Negative allosterische Modulation von P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären, stabil exprimiert in 1321N1-Astrozytom-Zellen, durch Cu²⁺-Ionen. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten im Vergleich zum humanen P2X₄-Rezeptor. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; und ** wenn $p < 0,01$.)

Rezeptor	Sequenzvariation	IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt hP2X4	-	3,58 ± 0,17 (rP2X4: 4,9 µM, Coddou et al., J. Biol. Chem., 2007 , Patch-Clamp, 1 µM ATP)
wt hP2X2	-	0,395 ± 0,097 (hP2X2: 0,04 µM, Punthambaker et al., Neuropharmacol. 2014 , Patch-clamp, EC ₁₀ ATP)
Chimäre c2-c5	P2X4 (C116-T186P2X2)	1,79 ± 0,32
Chimäre c6	P2X4 (N208-S216P2X2)	2,27 ± 0,62
Chimäre c7	P2X4 (I218-D224P2X2)	2,17 ± 0,28
Chimäre c8	P2X4 (R265-L269P2X2)	2,77 ± 0,46
Chimäre c10	P2X4 (R301-Q308P2X2)	2,34 ± 0,75

Allosterische Modulation von P2X4-Rezeptoren mit Alaninmutation im Sequenzvariationsbereich v2-v5 durch Cu²⁺-Ionen

Mit Blick auf die Publikationen von Coddou *et. al.*^{47,133} sowie einer neueren Publikation von Igawa *et. al.*,¹³⁵ die den Bereich der Sequenzvariationen v2 und v3 als bedeutsam für die Modulation des P2X4-Rattenrezeptors durch Cu²⁺-Ionen identifizieren konnten, wurde CuCl₂ zusätzlich auch an den vorhandenen einzelmutierten Rezeptoren im Bereich v2 und v3 (D121A, K127A, D129A, S131A, T133A, G138A, H140A, N142A) getestet. Abbildung 95 zeigt, dass alle einzelmutierten P2X4-Rezeptoren durch Cu²⁺-Ionen negativ moduliert wurden. Signifikante Unterschiede in den IC₅₀-Werten konnten nicht gemessen werden. Anhand des Kurvenverlaufes der Konzentrations-Wirkungskurven konnten keine nennenswerten Unterschiede zum P2X4-Wildtyp festgestellt werden.

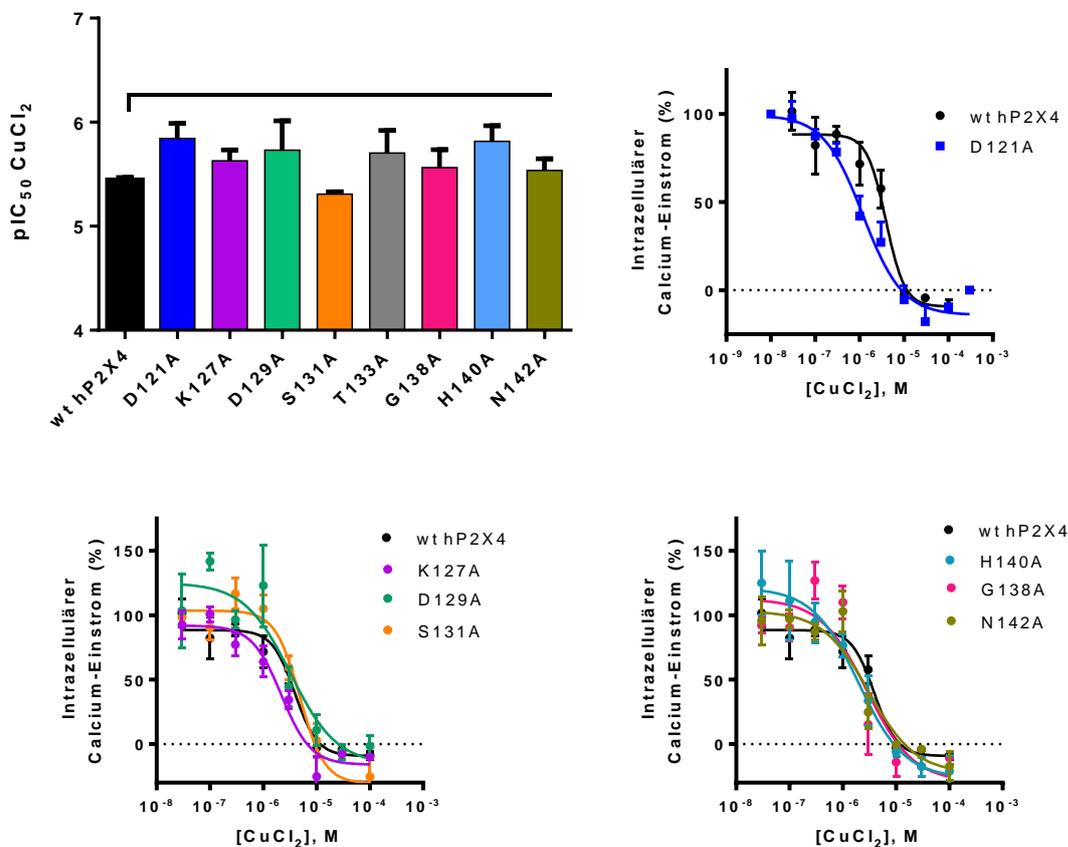


Abbildung 95: Calciumeinstrom-Experimente an hP2X4-Rezeptormutanten.

Negative Modulation der P2X4-Rezeptormutanten, stabil exprimiert in 1321N1-Astrozytom-Zellen, durch CuCl₂. Dargestellt sind die CuCl₂-Potenzen als pIC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten und die Konzentrations-Wirkungskurven. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X4-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; und ** wenn $p < 0,01$.)

Tabelle 32: Calciumeinstrom-Experimente an hP2X₄-Rezeptormutanten.

Negative allosterische Modulation der einzelmutierten P2X₄-Rezeptoren durch CuCl₂. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; und ** wenn $p < 0,01$).

Rezeptor	CuCl₂
Name	IC₅₀ ± SEM (µM)
wt hP2X ₄	3,58 ± 0,17
hP2X ₄ H140A	1,90 ± 0,25
hP2X ₄ G138A	3,22 ± 1,33
hP2X ₄ D129A	2,86 ± 1,84
hP2X ₄ D121A	1,59 ± 0,46
hP2X ₄ N142A	3,11 ± 0,78
hP2X ₄ S131A	4,93 ± 0,25
hP2X ₄ K127A	2,49 ± 0,53
hP2X ₄ T133A	2,32 ± 1,12

10.4.4 Zusammenfassung und Diskussion

Modulation durch Cu^{2+} -Ionen

Der humane P2X₄-Rezeptor sowie alle chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren und P2X₄-Mutanten wurden durch Cu^{2+} -Ionen konzentrationsabhängig (IC_{50} -Werte zwischen 1 und 4 μM) gehemmt. Diese Daten entsprechen den beschriebenen Ergebnissen von Coddou *et. al.*, die eine Hemmung des P2X₄-Rattenrezeptors durch mikromolare Konzentrationen an CuCl_2 zeigen konnten.^{47,133} Der humane P2X₂-Rezeptor wurde ebenfalls durch Cu^{2+} -Ionen gehemmt. Verglichen mit dem humanen P2X₄-Rezeptor lag der IC_{50} -Wert mit 0,395 μM um den Faktor 10 niedriger. Bindungsstellen für Metall-Kationen sind, wie bereits beschrieben, innerhalb der P2X-Rezeptoren weniger konserviert. Sollte beim Austausch gegen entsprechende Sequenzen des humanen P2X₂-Rezeptors eine potentielle P2X₂-Rezeptorbindungsstelle in die Chimäre eingefügt worden sein, wäre eventuell an dem entsprechenden Rezeptor eine erhöhte Cu^{2+} -Potenz erwartet worden. Wie und ob sich die Einfügung einer zusätzlichen Bindungsstelle auf die Ergebnisse des Calcium-Einstromassays auswirken würde, ist dabei nicht vorhersehbar. Zur Erniedrigung der Potenz sollte es kommen, wenn eine Bindungsstelle des humanen P2X₄-Rezeptors gegen einen Bereich des humanen P2X₂-Rezeptors ausgetauscht wurde in dem sich keine Bindungsstelle befindet. Da die Bindungsstellen am humanen P2X₂-Rezeptor bereits beschrieben sind (vgl. Abb. 89) wäre eine Erhöhung der Potenz eventuell für die Chimäre **c7** zu erwarten gewesen. Der entsprechende Aminosäurerest **H330** wurden durch den Austausch der variablen Region v7 in den P2X₄(P2X₂)**c7**-Rezeptor eingefügt. Die anderen beiden Bindungsstellen **H204** und **209** liegen dagegen zwischen den variablen Bereichen v5 und v6. Sie wurden in keiner der Chimären eingefügt. Die Cu^{2+} -Potenzen waren jedoch an den chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren, inklusive dem Rezeptor **c7** unverändert, verglichen mit dem humanen P2X₄-Rezeptor-Wildtyp. Das Einfügen einer einzelnen Bindungsstelle aus dem hP2X₂-Rezeptor scheint keinen Einfluss auf den Rezeptor zu haben. Auch an allen Einzelmutanten waren die CuCl_2 -Potenzen vergleichbar mit denen am humanen P2X₄-Rezeptor. Eine direkte Beteiligung der als relevant beschriebenen Aminosäurereste in der Ratte **D121**, **D138** (**G138** im humanen P2X₄-Rezeptor) und **H140** konnte demnach im humanen Rezeptor nicht bestätigt werden. Die IC_{50} -Werte waren an den **H140A**- und **D121A**-Mutanten sogar geringfügig niedriger als am humanen P2X₄-Wildtyp. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es in Bezug auf die Lage der Bindungsstelle für Cu^{2+} -Ionen im P2X₄-Rezeptor **speziesspezifische** Unterschiede zwischen Ratte und Mensch gibt. Die Hemmung des P2X₄-Rezeptors durch Cu^{2+} könnte biologische Relevanz besitzen, da die physiologischen Konzentrationen im synaptischen Spalt millimolare Werte erreichen können.

10.4.5 Ergebnisse: Allosterische Modulation durch Zn^{2+} -Ionen

Zur Untersuchung der allosterischen Modulation des humanen P2X4-Rezeptors durch Zn^{2+} -Ionen wurden Calciumeinstrom-Experimente am wt P2X4-Rezeptor durchgeführt. Dafür wurden Konzentrations-Wirkungskurven von $ZnCl_2$ aufgenommen. Der humane P2X4-Rezeptor wurde durch Zn^{2+} -Ionen konzentrationsabhängig gehemmt (vgl. Abb. 96). Der IC_{50} -Wert für Zn^{2+} -Ionen lag bei $21,6 \mu M$.

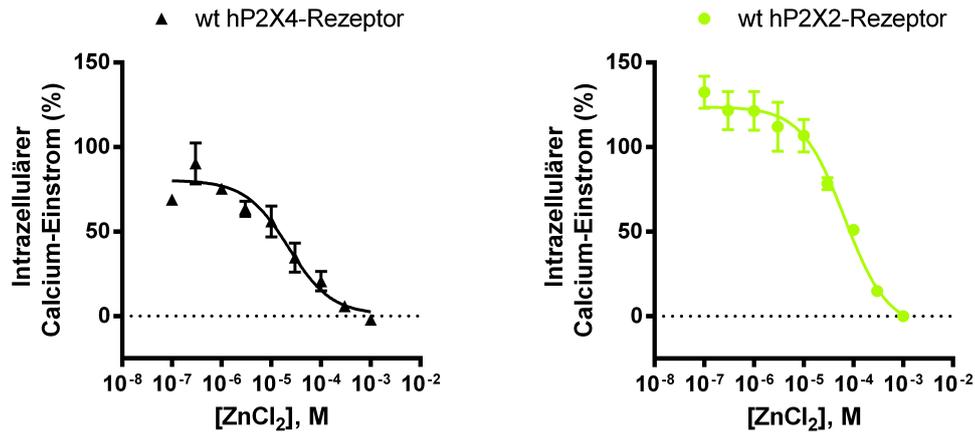


Abbildung 96: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X4- und P2X2-Rezeptoren.

Konzentrations-Wirkungskurven des allosterischen Modulators $ZnCl_2$ an humanen P2X4- und P2X2-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen. Zur Aktivierung des Rezeptors wurde ATP in seinen EC_{80} -Konzentrationen (P2X4R $1 \mu M$, P2X2R $3 \mu M$) eingesetzt. (Hill-Koeffizient n_H 1).

Der humane P2X2-Rezeptor wurde ebenfalls durch Zn^{2+} -Ionen gehemmt. Der IC_{50} -Wert lag mit $70 \mu M$ 3,5-fach höher.

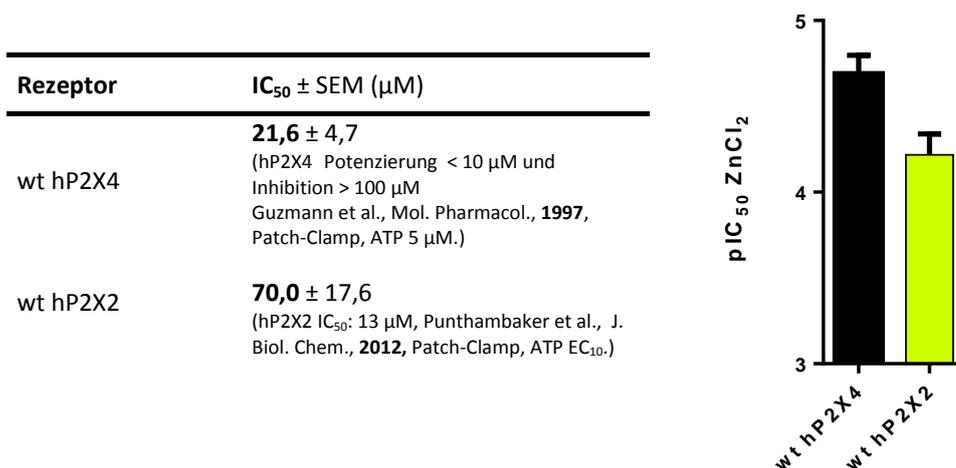


Abbildung 97: Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X-Rezeptoren.

Negative Modulation humaner P2X-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen, durch Zn²⁺-Ionen. Links: ZnCl₂-Potenzen dargestellt als IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten im Vergleich zu Literaturdaten. Rechts: ZnCl₂-Potenzen an wt hP2X₄- und P2X₂-Rezeptoren dargestellt als pIC₅₀-Werte.

ZnCl₂ zeigte keine Modulation der Bindung von 0,2 nM (K_D=0,7) [³⁵S]ATPγS an den humanen P2X₄-Rezeptor (vgl. Abb. 98), was den allosterischen Bindungscharakter der Zn²⁺-Kationen an den P2X₄-Rezeptor unterstreicht.

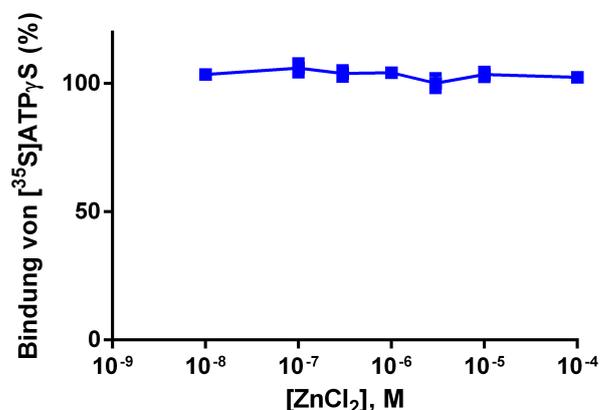


Abbildung 98: Radioligand-Bindungsstudien am humanen P2X₄-Rezeptor.

Kompetitionsexperimente mit ZnCl₂ gegen [³⁵S]ATPγS (0,2 nM) an Membranpräparationen von hP2X₄-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen (durchgeführt durch Dr. A. Abdelrahman).

Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren durch Zn²⁺-Ionen

Im nächsten Schritt wurden Zn²⁺-Ionen in hohen Konzentrationen an allen funktionellen P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären getestet und ihre Potenzen an den mutierten Rezeptoren mit der am Wildtyp-Rezeptor verglichen. An den Chimären **c7**, **c8** und **c10** konnten keine signifikanten Unterschiede zum humanen P2X₄-Rezeptor gemessen werden. Alle drei Rezeptoren wurden mit vergleichbaren IC₅₀-Werten vollständig gehemmt. An den Chimären **c2-c5** und **c6** zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IC₅₀-Werte (255 μM an **c2-c5** und 116 μM an **c6**) für Zn²⁺-Ionen, die auch noch höher als die am humanen P2X₂-Rezeptor gemessenen Werte waren (Abbildungen 99 und Tabelle 33).

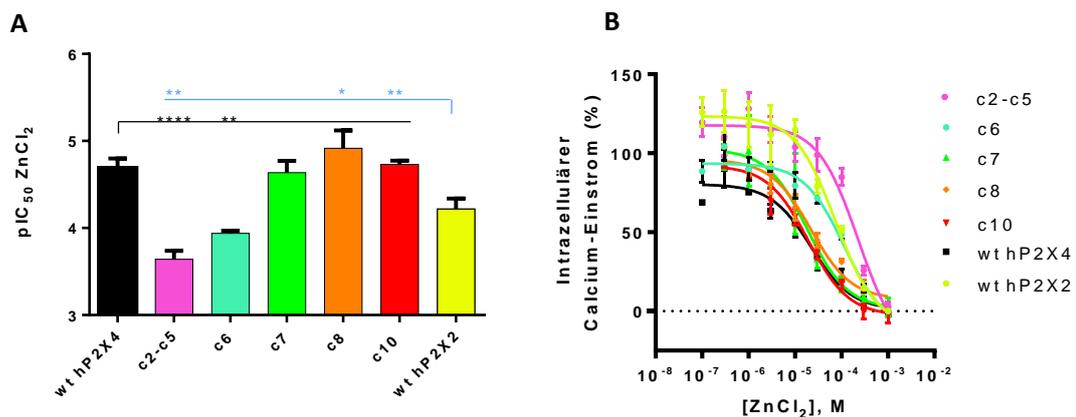


Abbildung 99: Calciumeinstrom-Experimente an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.

(A) Negative allosterische Modulation chimärer P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen, durch ZnCl₂. Zur Aktivierung des Rezeptors wurde ATP in seinen entsprechenden EC₈₀-Konzentrationen eingesetzt. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte ± SEM. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.) (B) Konzentrations-Wirkungskurven von ZnCl₂ an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren stabil exprimiert in 1321N1-Astrozytom-Zellen. Zur Aktivierung der Rezeptoren wurde ATP in seiner EC₈₀-Konzentration eingesetzt. (Hill-Koeffizient n_H 1).

Tabelle 33: Calciumeinstrom-Experimente an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren.

Allosterische Modulation von P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen, durch ZnCl₂. Zur Aktivierung der Rezeptoren wurde ATP in seiner EC₈₀-Konzentration eingesetzt. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Rezeptor		ZnCl ₂
Bezeichnung	Sequenzvariation	IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt P2X4	-	21,6 ± 4,7 (hP2X4: Potenzierung < 10 µM und Inhibition > 100 µM, Guzman et al., Mol. Pharmacol., 2011 , Patch-Clamp, ATP 5 µM.)
wt P2X2	-	70,0 ± 17,6 (hP2X2 IC ₅₀ : 13 µM, Punthambaker et al., J. Biol. Chem., 2012 , Patch-Clamp EC ₁₀ ATP.)
Chimäre c2-c5	P2X4 (C116-T186P2X2)	255 ± 46****
Chimäre c6	P2X4 (N208-S216P2X2)	116 ± 8**
Chimäre c7	P2X4 (I218-D224P2X2)	25,3 ± 6,7
Chimäre c8	P2X4 (R265-L269P2X2)	18,9 ± 7,0
Chimäre c10	P2X4 (R301-Q308P2X2)	18,9 ± 1,7

Modulation von P2X₄-Rezeptormutanten durch Zn²⁺-Kationen

Die nachfolgende Tabelle 34 sowie die Abbildungen 100 und 101 zeigen die Modulation im Bereich der Sequenzvariation v2-v5 einzelmutierter humaner P2X₄-Rezeptoren durch Zn²⁺-Ionen. An den Mutanten **K127A**, **G138A** und **N142A** waren die inhibitorischen Potenzen von Zn²⁺-Ionen im Vergleich zum humanen P2X₄-Rezeptor signifikant reduziert. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt an den Mutanten **G138A** und **N142A**.

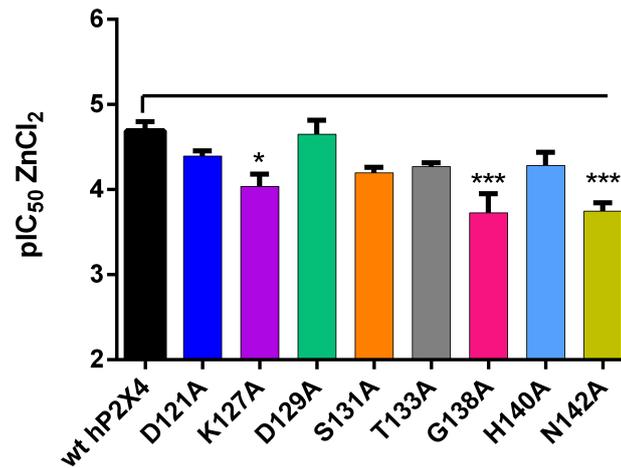


Abbildung 100: Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄-Rezeptormutanten.

Negative allosterische Modulation von P2X₄-Rezeptormutanten, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen, durch ZnCl₂. Zur Aktivierung der Rezeptoren wurde ATP in seinen entsprechenden EC₈₀-Konzentrationen eingesetzt. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$).

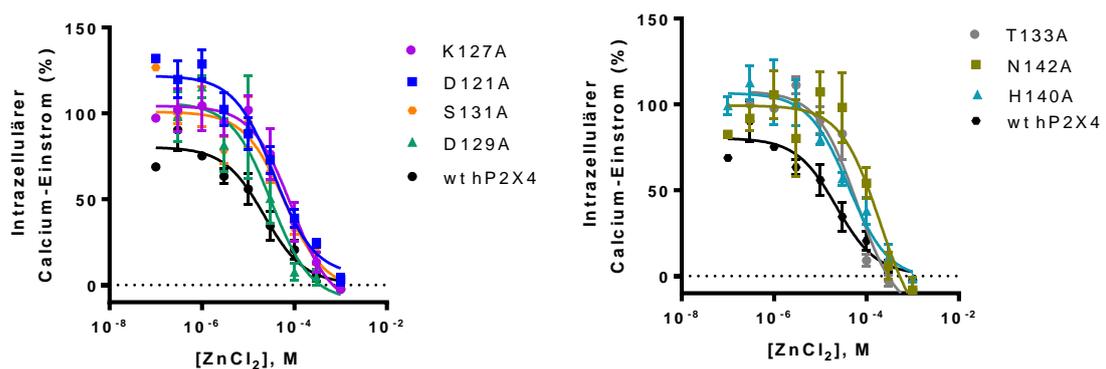


Abbildung 101: Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄-Rezeptormutanten.

Konzentrations-Wirkungskurven des allosterischen Modulators ZnCl₂ an einzelmutierten P2X₄-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen. Zur Aktivierung der Rezeptoren wurde ATP in seinen entsprechenden EC₈₀-Konzentrationen eingesetzt (Hill-Koeffizient n_H 1).

Tabelle 34: Calciumeinstrom-Experimente an P2X₄-Rezeptormutanten.

Negative allosterische Modulation einzelmutierter P2X₄-Rezeptoren, stabil exprimiert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen, durch ZnCl₂. Zur Aktivierung der Rezeptoren wurde ATP in seinen entsprechenden EC₈₀-Konzentrationen eingesetzt. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM aus 3-5 Experimenten. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Rezeptor	ZnCl ₂
Name	IC ₅₀ ± SEM (µM)
wt hP2X4 wt	21,6 ± 6,7
hP2X4 H140A	61,6 ± 19,2
hP2X4 G138A	248 ± 134****
hP2X4 D129A	27,3 ± 9,82
hP2X4 D121A	41,0 ± 5,2
hP2X4 N142A	190 ± 34****
hP2X4 S131A	64,8 ± 9,2
hP2X4 K127A	108 ± 34*
hP2X4 T133A	54,3 ± 5,9

10.4.6 Zusammenfassung und Diskussion

Modulation durch Zinkchlorid

Die humanen P2X4- und P2X2-Rezeptoren, sowie alle P2X4-Rezeptormutanten bzw. P2X4(P2X2)-Chimären zeigten in Calciumeinstrom-Experimenten eine konzentrationsabhängige Hemmung durch Zn^{2+} -Ionen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Daten am Ratten-P2X4-Rezeptor, die einen konzentrationsabhängigen, zweiphasigen Effekt (potenzierend in geringen Konzentrationen und hemmend in hohen Konzentrationen) im gleichen Konzentrationsbereich zeigten.¹⁷ Die Richtung der Modulation durch Zn^{2+} -Ionen scheint demnach am P2X4-Rezeptor speziesspezifisch zu sein. Solche gegensätzlichen Effekte, abhängig von der Spezies, konnten bereits für den P2X2-Rezeptor gezeigt werden.¹⁴⁵ Die Übertragbarkeit auf noch weitere Subtypen konnte nicht überprüft werden, da nur Daten an Rattenrezeptoren existieren.

An den Rezeptorchimären **c2-c5** und **c6** war die Zn^{2+} -Potenz signifikant gegenüber dem humanen P2X4-Rezeptor erniedrigt. Auch gegenüber dem P2X2-Rezeptor war die Zn^{2+} -Potenz erniedrigt, der Effekt war jedoch nur signifikant für die Chimäre **c2-c5**. Dies könnte daraufhin deuten, dass Bindungsstellen für Zn^{2+} -Kationen durch den Austausch gegen die entsprechenden P2X2-Sequenzen aus dem P2X4-Rezeptor entfernt wurden. Bereits beschriebene Bindungsstellen für Zn^{2+} -Ionen im humanen P2X2-Rezeptor (**H204**, **H209** (im Bereich zwischen v2-v5 und v6) und **H330** (v7)) liegen in keiner dieser Regionen (vgl. Abb. 89).

Auch an den einzelmutierten P2X4-Rezeptoren **K127A**, **N142A** und insbesondere in der Mutante **G138A** im Bereich v2-v5 waren die inhibitorischen Potenzen durch Zn^{2+} -Ionen signifikant reduziert. Damit bestätigen die Ergebnisse die bereits für den Ratten-P2X4-Rezeptor beschriebene Bindungsstelle in Position **138**. Im humanen P2X4-Rezeptor befindet sich an dieser Stelle jedoch ein Glycin- anstelle eines Aspartatrestes im Rattenrezeptor. Ebenso bestätigen die Ergebnisse eine generelle Beteiligung des Bereiches v2-v5. **H140** als weitere Bindungsstelle konnte dagegen nicht bestätigt werden, stattdessen wäre eine Beteiligung von **K127** und **N142** sowie ergänzend des Bereiches **v6** an der Interaktion mit Zn^{2+} -Kationen wahrscheinlich. Abbildung 102 zeigt den Snake-like Plot des humanen P2X4-Rezeptors. Die farbig gekennzeichneten Bereich sind möglicherweise an Interaktionen mit Zn^{2+} -Kationen beteiligt.

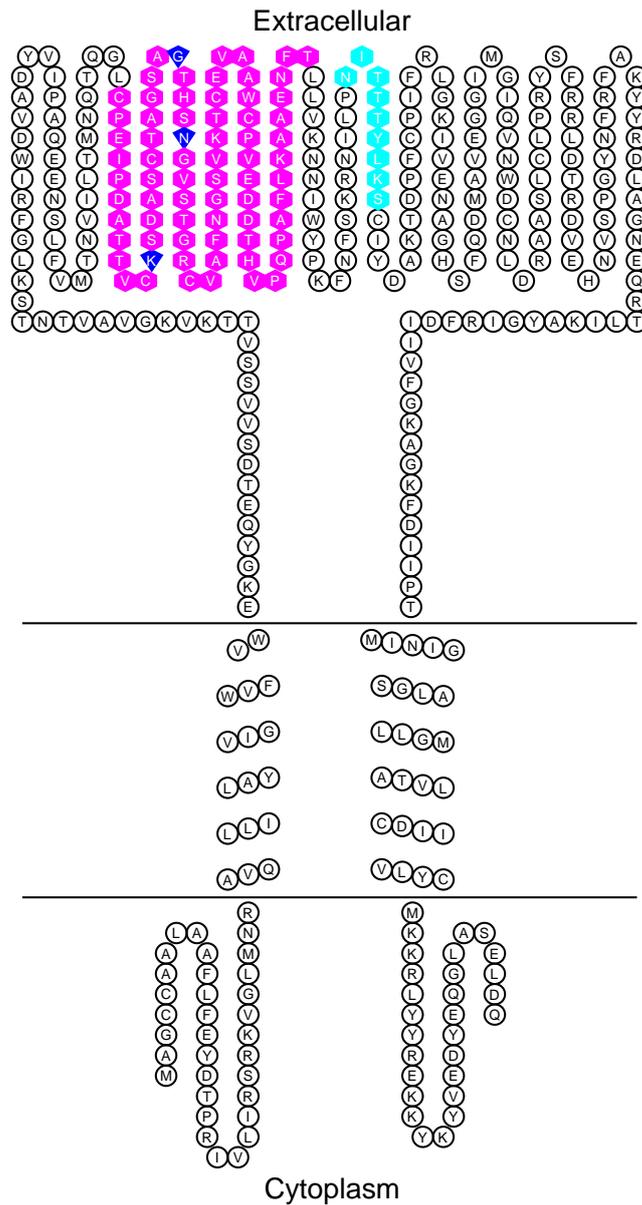


Abbildung 102: Snake-like Plot des humanen P2X₄-Rezeptors. Die Kopfdomäne die in der Chimäre **c2-c5** gegen die entsprechende Sequenz des humanen P2X₂-Rezeptors ausgetauscht wurde ist farblich in pink gekennzeichnet. Blau eingefärbte Aminosäurereste sind möglicherweise an der Interaktion mit Zn²⁺-Kationen beteiligt. Der Bereich v6 ist in türkis gekennzeichnet.

Im Vergleich mit den Literaturdaten liegt der im Calcium-Einstrom-Assay gemessene IC₅₀-Wert des humanen P2X₂-Rezeptors mit 70 μM gegenüber 13 μM¹³² deutlich höher. Dies könnte auf die Abhängigkeit der Zn²⁺-Potenz von der eingesetzten ATP-Konzentration zurückzuführen sein.¹⁵¹ Im Gegensatz zum durch Punthambaker *et al.* eingesetzten EC₁₀ von ATP, wurde im Rahmen dieser Arbeit die jeweilige EC₈₀-Konzentration von ATP eingesetzt.

Die ermittelten EC₅₀-Konzentrationen von ATP schwanken in Abhängigkeit vom getesteten Rezeptor, weshalb zur Anregung der Rezeptoren auch unterschiedliche Konzentrationen an ATP als EC₈₀-Konzentrationen je nach Chimäre oder Mutante eingesetzt wurden. Durch die individuelle Anpassung der ATP-Konzentrationen an die entsprechenden EC₈₀-Werte ist die Vergleichbarkeit der Zn²⁺-Potenzen an den Rezeptormutanten und -Chimären gegeben.

10.5 Fazit

Während die Lage der Bindungsstellen für Cu²⁺-Ionen am humanen P2X₄-Rezeptor weiterhin unklar ist und nicht den beschriebenen Bindungsstellen am Ratten-P2X₄-Rezeptor zu entsprechen scheinen, unterstützen die Testergebnisse von ZnCl₂ am humanen P2X₄-Rezeptor eine Beteiligung des Sequenzbereiches v2-v5 an der Bindung von Zn²⁺-Kationen. Insbesondere die Aminosäurereste **K127**, **N142** und **G138** scheinen in die Interaktion mit Zn²⁺ involviert zu sein, was unter anderem aufgrund des gegenüber dem P2X₄-Rattenrezeptor veränderten Aminosäurerestes in Position **138** überraschend erscheint. Dazu kommt, dass Asparagin und Glycin keine Aminosäurereste darstellen, für die Zn²⁺-Ionen nach dem HSAB-Konzept eine besondere Präferenz besitzen. Lediglich für Lysin werden in der Literatur vereinzelt Komplexe mit Zn²⁺-Kationen über die Bindung an das Amin beschrieben, insbesondere im Zusammenhang mit der Vermittlung negativer allosterischer Modulation.^{118,119} Bekannt ist jedoch, dass sekundäre Liganden durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen einen signifikanten stabilisierenden Effekt auf die Metall-koordinierenden Seitenketten haben und dadurch die Metallaffinität erhöhen können.¹⁵² Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Aminosäurereste in Position **127**, **138** und **142** möglicherweise nicht direkt, aber indirekt an einer Interaktion mit Zn²⁺-Kationen beteiligt sind und durch zielgerichtete Mutagenese bzw. den Austausch gegen die entsprechenden Sequenzen des hP2X₂-Rezeptors stabilisierende Wasserstoffbrücken-Bindungen zerstört worden sein könnten. Gleiches könnte auch für die ausgetauschten Aminosäurereste innerhalb des Variationsbereichs v6 gelten. Für eine direkte Interaktion mit Zn²⁺-Kationen kommt nur der Lysinrest in Position 214 in Frage, eine direkte Interaktion mit weiteren Aminosäureresten ist dagegen unwahrscheinlich, da sich keine bevorzugten Aminosäurereste wie Histidin (H), Cystein(C), Aspartat (D) oder Glutamin (Q) innerhalb des Bereiches v6 befinden, (vgl. Abb. 89).

Anders als am Ratten-P2X₄-Rezeptor ist jedoch die Richtung der allosterischen Modulation durch Zn²⁺-Ionen am humanen P2X₄-Rezeptor im gemessenen Konzentrationsbereich nicht zweiphasig (potenzierend in geringen Konzentrationen und hemmend in hohen Konzentrationen), sondern ausschließlich hemmend, was bereits für den humanen P2X₂-Rezeptor beschrieben wurde.¹⁴⁵ Die Richtung der Modulation der P2X-Rezeptoren durch Metall-Ionen sowie die Lage der Bindungsstellen scheint demnach nicht nur abhängig vom Subtypen, sondern auch abhängig von der Spezies zu sein. Au-

ßerdem variieren die Aminosäurereste innerhalb der P2X-Rezeptoren die mit Metall-Kationen interagieren. Während in P2X2-Rezeptoren ausschließlich Histidinreste Bindungsstellen für Metall-Kationen bilden, sind in P2X4-Rezeptoren auch Asparaginsäure-, Glutaminsäure- und Cystein-Reste an den Interaktionen beteiligt. Ein zentrales Bindungsmotiv für Metall-Kationen scheint demnach innerhalb der P2X-Rezeptoren nicht zu bestehen.

11 Anthrachinone

11.1 Einleitung

Ein weiterer bekannter allosterischer Modulator des P2X4-Rezeptors ist das Anthrachinon-Derivat Cibacron Blue (Abb. 103). Die Verbindung stellt das *ortho*-Isomer von Reactive Blue 2 dar.

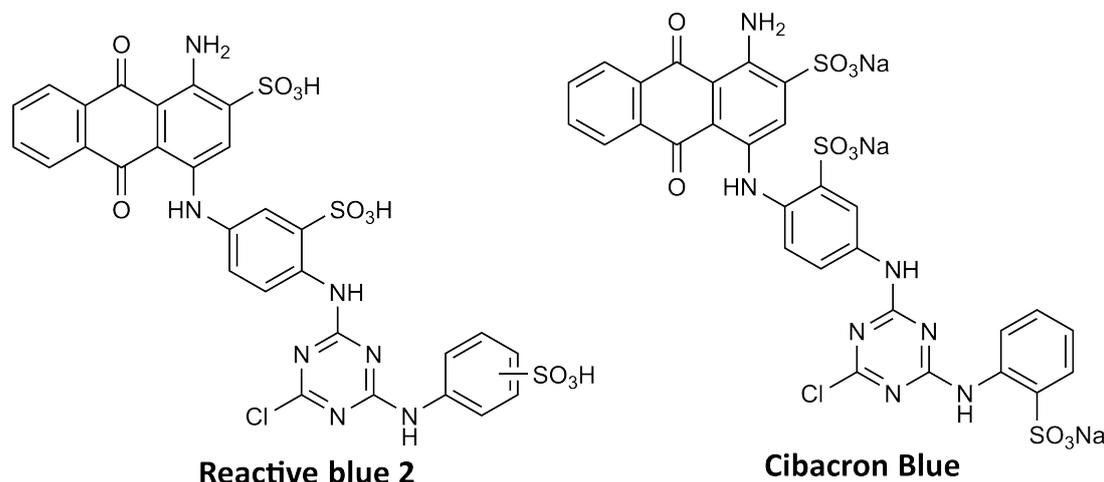


Abbildung 103: Chemische Strukturen von Reactive blue 2 und Cibacron Blue.

Cibacron Blue ist nicht selektiv, sondern moduliert auch weitere P2X-Subtypen, P2Y-Rezeptoren sowie Ecto-5'-Nucleotidasen und Ectonucleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen.^{153–157}

An P2X-Rezeptoren scheint die Richtung der allosterischen Modulation in Abhängigkeit vom Subtypen und der Spezies zu variieren. So konnte die Verbindung in funktionellen Studien als zweiphasiger allosterischer Modulator des P2X4-Rattenrezeptors identifiziert werden.⁴⁰ In niedrigen Konzentrationen (3–30 μM) führte Cibacron Blue zur Potenzierung des Rezeptors, während es in hohen Konzentrationen ($\text{IC}_{50} > 300 \mu\text{M}$) als Antagonist wirkte. Eine Radioligand-Bindungsstudie mit [³⁵S]ATP γ konnte Cibacron Blue als allosterischen Antagonisten im gleichen Konzentrationsbereich (1–100 μM) identifizieren, wobei Cibacron Blue auch unter diesen Assay-Bedingungen eine zweiphasige [³⁵S]ATP γ S Kompetitions-Kurve ergab.⁴¹

Am P2X2-Rattenrezeptor wirkte Cibacron Blue dagegen ausschließlich als Antagonist,⁴⁰ während es am humanen P2X3-Rezeptor die Potenz der ATP-induzierten Aktivierung konzentrationsabhängig erhöhte.¹⁵⁸

Eine Bibliothek von Anthrachinon-Derivaten mit struktureller Verwandtschaft zum Cibacron Blue die potente and selektive Antagonisten am P2X2-Rattenrezeptor darstellen, wurde kürzlich beschrieben.¹⁵⁵

P2Y-Rezeptoren gehören ebenfalls zu den purinergen Rezeptoren.¹⁵⁹ Anders als die P2X-Rezeptoren stellen sie jedoch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren dar. Bisher konnten acht Rezeptor-Subtypen identifiziert werden (P2Y₁, 2, 4, 6, 11, 12, 13 und 14). Der P2Y₁₂-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Thrombozytenaggregation,¹⁶⁰ weshalb die (irreversible) Blockade dieses Rezeptorsubtyps als vielversprechender Ansatz in der antithrombotischen Therapie gilt.¹⁶¹ Bereits vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, dass Anthrachinon-Derivate mit struktureller Verwandtschaft zum Cibacron Blue potente Inhibitoren des P2Y₁₂-Rezeptors darstellen.¹⁵⁴ Selektivität der Verbindungen konnte durch unterschiedliche Substitutionen der Position 4 des Anthrachinon-Grundgerüsts erreicht werden.^{154,155} Anhand von Kristallstrukturen und Mutagenesestudien konnten die Aminosäurereste R256 und K280 innerhalb der Bindungsstelle für Anthrachinon-Derivate identifiziert werden. Diese beiden Aminosäurereste interagieren mit den Sulfonat-Gruppen der Verbindungen.^{162–164}

Wie bereits zuvor beschrieben (vgl. Kapitel 2) wurden eine Serie von chimären P2X4-(P2X2)-Rezeptoren kloniert und exprimiert, mit dem Ziel allosterische Bindungsstellen im extrazellulären Bereiche des hP2X4-Rezeptors zu identifizieren und charakterisieren. Dafür wurden Calciueinstrom-Experimente mit dem allosterischen Modulator Cibacron Blue durchgeführt.

11.2 Ergebnisse

11.2.1 Allosterische Modulation durch Cibacron Blue

Um die Effekte des in der Literatur beschriebenen allosterischen Modulators Cibacron Blue auf die humanen P2X4- und P2X2-Rezeptoren zu untersuchen, wurden Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung aufgenommen. Für die Stimulation beider Rezeptoren wurde ATP in seiner EC₈₀-Konzentration (jeweils 1 μM) eingesetzt. Abbildung 104 und Tabelle 35 zeigen, dass Cibacron Blue beide Wildtyp-Rezeptoren allosterisch moduliert. Am humanen P2X4-Rezeptor war die Richtung der Modulation biphasisch. In hohen Konzentrationen von 10-100 μM wurde der Rezeptor durch Cibacron Blue inhibiert, während in geringeren Konzentrationen von 0,1 bis 3 μM der Rezeptor stimuliert wurde (bis zu 41 %). Der humane P2X2-Rezeptor wurde dagegen durch Cibacron Blue ausschließlich gehemmt (IC₅₀ 13,1 μM).

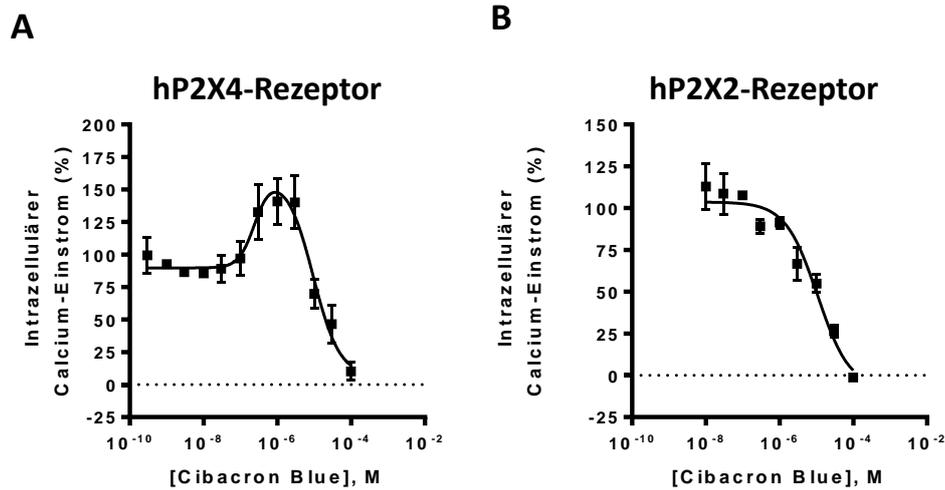


Abbildung 104: *Calciumeinstrom-Experimente an humanen P2X4- und P2X2-Rezeptoren.*

Konzentrations-Wirkungskurven von Cibacron Blue an (A) humanen P2X4- und (B) P2X2-Rezeptoren.

Tabelle 35: *Negative bzw. positive allosterische Modulation der humanen P2X4 - und P2X2-Rezeptoren durch Cibacron Blue. Dargestellt sind die IC₅₀- bzw. EC₅₀-Werte ± SEM von Cibacron Blue.*

Rezeptor	Cibacron Blue	
	IC ₅₀ ± SEM [μM]	EC ₅₀ ± SEM [μM]
wt hP2X4	12,1 ± 4,2	0,243 ± 0,096
wt hP2X2	13,1 ± 2,2	n.v.

n.v. nicht vorhanden

11.2.2 Allosterische Modulation von P2X4(P2X2)-Rezeptoren durch Cibacron Blue

Zur Untersuchung der Effekte von Cibacron Blue an allen funktionellen chimären P2X4(P2X2)-Rezeptoren wurden erneut Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindung aufgenommen (vgl. Abb. 105 und Tab. 36). Während Cibacron Blue auch den P2X4(P2X2)c6-Rezeptor zweiphasisch modulierte, überwog an den anderen chimären Rezeptoren die negative allosterische Modulation. An den Rezeptoren **c2-c5**, **c7** und **c8** war die Affinität von Cibacron Blue gering. Die IC₅₀-Werte der Verbindung lagen zwischen 8,60 und 23,6 μM. Überraschenderweise war die Potenz von Cibacron Blue am chimären Rezeptor **c10** signifikant erhöht. Der IC₅₀-Wert lag mit 0,00476 μM 2500-fach niedriger als am humanen P2X4-Rezeptor (vgl. Abb. 106) und 2700-fach niedriger als

am humanen P2X2-Rezeptor.

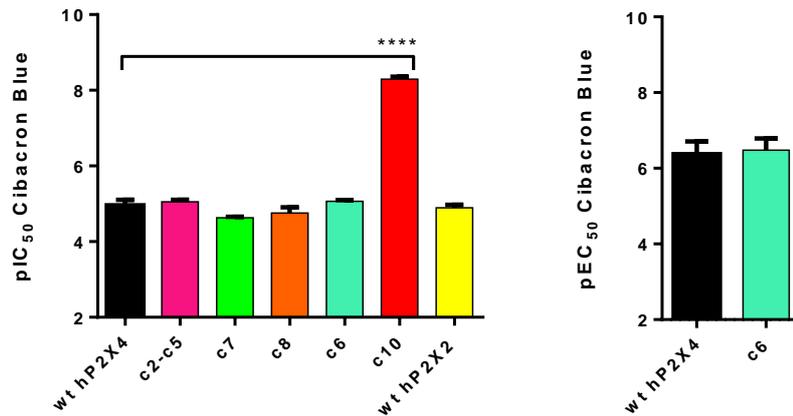


Abbildung 105: Calciumeinstrom-Experimente an hP2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären.

Negative bzw. positive allosterische Modulation von hP2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären durch Cibacron Blue. Dargestellt ist die inhibitorische oder potenzierende Potenz der Verbindung als pIC₅₀-Wert bzw. als pEC₅₀-Wert ± SEM im Vergleich zu humanen P2X₄- und P2X₂-Rezeptoren. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$).

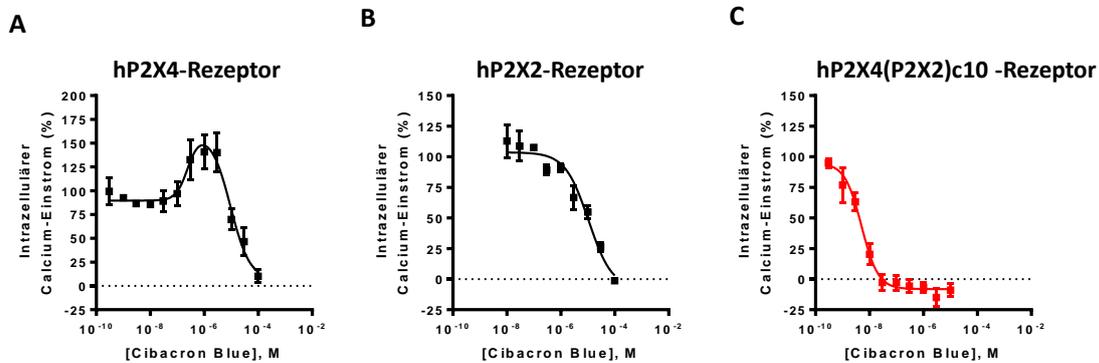


Abbildung 106: Calciumeinstrom-Experimente an der hP2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimäre c10.

Konzentrations-Wirkungskurven von Cibacron Blue an humanen P2X₄-, P2X₂-, und P2X₄(P2X₂)c10-Rezeptoren.

Tabelle 36: Calciumeinstrom-Experimente an hP2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären.

Negative bzw. positive allosterische Modulation der humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären durch Cibacron Blue. Dargestellt sind die IC₅₀- bzw. die EC₅₀-Werte ± SEM von Cibacron Blue. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Rezeptor	Cibacron Blue	
	IC ₅₀ ± SEM [µM]	EC ₅₀ ± SEM [µM]
wt hP2X ₄	12,1 ± 4,2	0,243 ± 0,096
wt hP2X ₂	13,1 ± 2,2	n.v.
Chimäre c2-c5	8,99 ± 1,16	n.v.
Chimäre c6	8,60 ± 0,63	0,530 ± 0,326
Chimäre c7	23,6 ± 1,4	n.v.
Chimäre c8	20,3 ± 8,0	n.v.
Chimäre c10	0,00476 ± 0,00062****	n.v.

n.v. nicht vorhanden

11.2.3 Allosterische Modulation der P2X₄(P2X₂)-Chimäre c10 durch Anthrachinon-Derivate

Zur Bestätigung der hohen Affinität des Cibacron Blue an der Chimäre **c10** und zur Analyse erster Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) wurde eine Bibliothek weiterer Anthrachinon-Derivate mit struktureller Verwandtschaft zum Cibacron Blue an dem mutierten Rezeptor getestet. Die Verbindungen wurden entsprechend der Fragestellungen ausgewählt inwiefern das Ringsystem, das Vorhandensein von Sulfonatgruppen bzw. anderer polarer Gruppen sowie der Linker zwischen Ring D und E die inhibitorischen Potenzen beeinflussen. Alle ausgewählten Verbindungen hemmten den chimären Rezeptor **c10** mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich, wohingegen die Verbindungen nur geringe inhibitorische Potenz am humanen P2X₄-Rezeptor zeigten (vgl. Abb. 107 und Tab. 37 und 38). Die potentesten Verbindungen an der P2X₄(P2X₂)-Chimäre **c10** waren Cibacron Blue (IC₅₀ 0,00476 μ M) und PSB-0739 (IC₅₀ 0,00341 μ M). Demnach scheinen beide Sulfonat-Reste an den Ringen C und D für die hohe inhibitorische Aktivität der Verbindungen essentiell zu sein. Der Ring F in Cibacron Blue scheint dagegen nicht notwendig zu sein. Detailliertere SAR werden im weiteren Verlauf des Kapitels beschrieben.

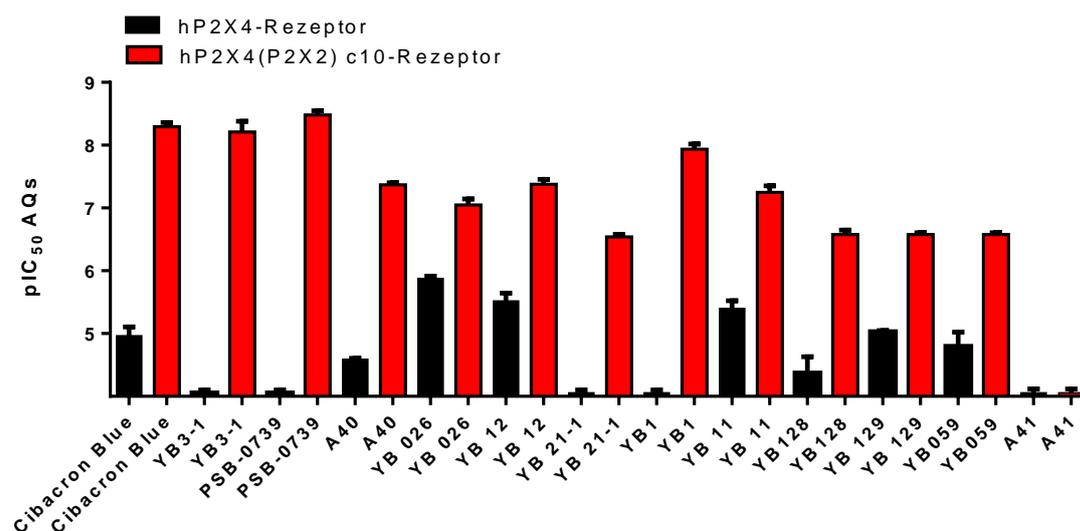


Abbildung 107: *Calciumeinstrom-Experimente an der hP2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimäre c10.*

Negative allosterische Modulation der humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimäre c10 und des humanen P2X₄-Rezeptors durch eine Bibliothek an Anthrachinon-Derivate. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte \pm SEM der Verbindungen.

Tabelle 37: Calciumeinstrom-Experimente an der hP2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimäre c10.

Negative allosterische Modulation der humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimäre c10 und des humanen P2X₄-Rezeptors durch eine Bibliothek an Anthrachinon-Derivate. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM der Verbindungen.

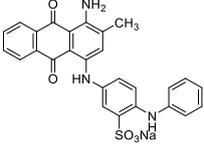
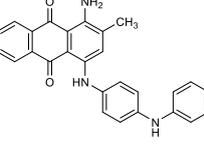
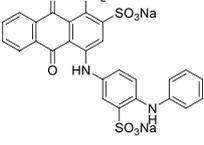
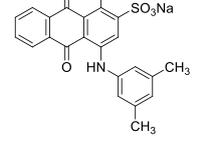
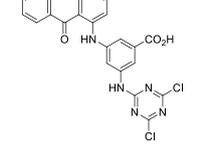
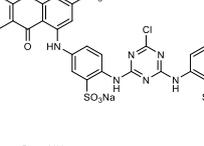
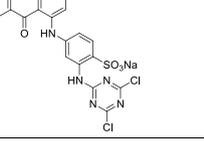
Verbindung	Struktur	IC ₅₀ ± SEM [µM]	
		wt hP2X ₄	P2X ₄ (P2X ₂) c10
A40		25,2 ± 0,7	0,0429 ± 0,0033
A41		> 10	> 10
PSB-0739		> 10	0,00341 ± 0,00049
YB059		20,0 ± 8,45	0,266 ± 0,018
YB3-1		> 10	0,0124 ± 0,0020
Cibacron Blue		3,91 ± 1,53	0,00476 ± 0,00062
YB 1-1		> 10	0,0149 ± 0,0021

Tabelle 38: Calciumeinstrom-Experimente an der hP2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimäre c10 (Teil 2)

Negative allosterische Modulation der humanen P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimäre c10 und des humanen P2X₄-Rezeptors durch eine Bibliothek an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM der Verbindungen.

Verbindung	Struktur	IC ₅₀ ± SEM [µM]	
		wt hP2X ₄	P2X ₄ (P2X ₂) c10
YB 21-1		≥ 10 (38 ± 8)	0,274 ± 0,029
YB 011		4,33 ± 1,29	0,0619 ± 0,0103
YB 012		3,28 ± 0,80	0,0448 ± 0,0073
YB 128		50,5 ± 27,3	0,273 ± 0,044
YB 129		9,33 ± 0,40	0,266 ± 0,017
YB 026		1,35 ± 0,22	0,0922 ± 0,021

11.2.4 Charakterisierung der Anthrachinon-Bindungsstelle in der P2X4-(P2X2)-Chimäre c10

Nachfolgend stellte sich die Frage, warum die Anthrachinon-Derivate eine so hohe Affinität zu der Chimäre **c10** zeigten, wohingegen sie am humanen P2X4- und P2X2-Rezeptor nur schwach aktiv waren. Zur Klärung dieser Frage wurde die bereits bekannte Bindungsstelle des Derivats PSB-0739 im P2Y₁₂-Rezeptor detailliert betrachtet. In Dockingstudien basierend auf der existierenden Kristallstruktur des humanen P2Y₁₂-Rezeptors¹⁶² und Interaktionsanalysen der Anthrachinon-Derivate mit dem P2Y₁₂-Rezeptor konnten bereits **K280** (Lys280) und **R256** (Arg256) als Interaktionspartner der Sulfonat-Gruppen der Verbindung PSB-0739 identifiziert werden (vgl. Abb. 108).

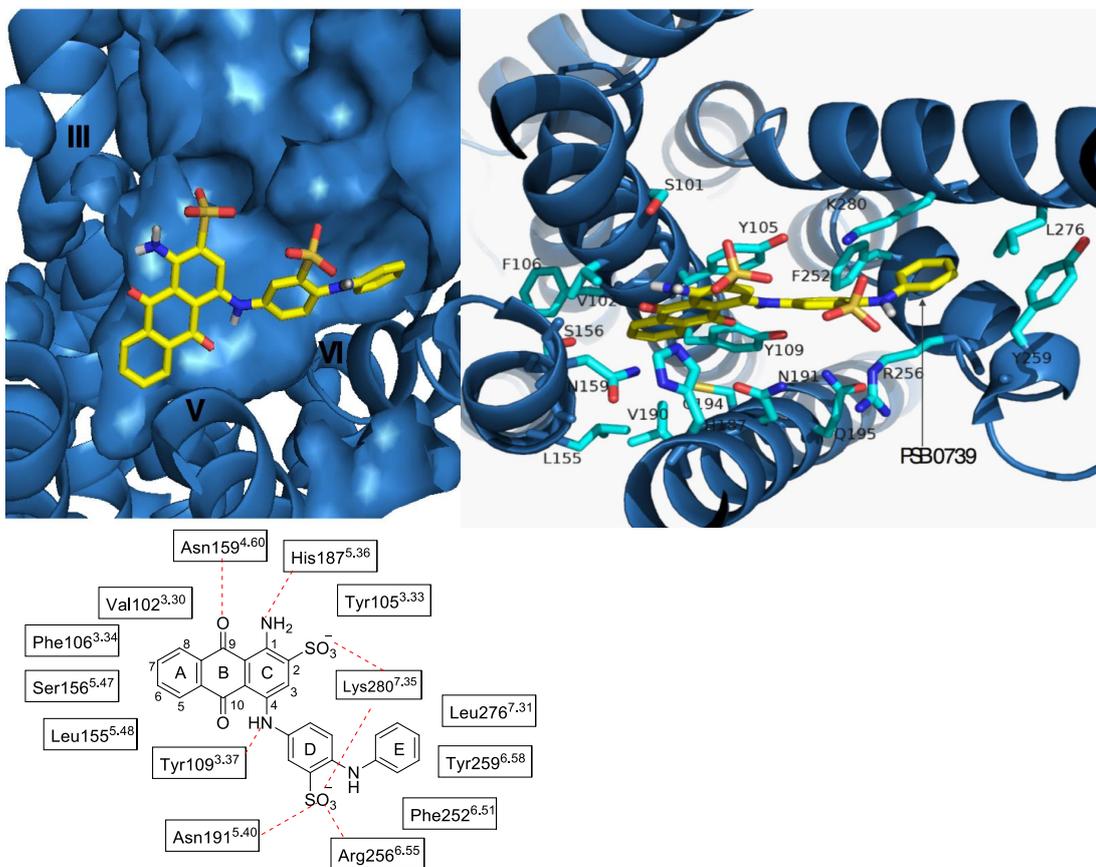


Abbildung 108: Docking von PSB-0739 in die Bindungsstelle am P2Y₁₂-Rezeptor (Abbildung Dr. V. Namasivayam).

Überträgt man diese Kenntnisse der Bindungsstelle im P2Y₁₂-Rezeptor auf den P2X4-Rezeptor bzw. die P2X4(P2X2)-Chimäre **c10** könnten die Aminosäurereste **K78**, **R82** im Bereich v1 sowie **R301** und **T307** (im wt hP2X4-Rezeptor E307) im Bereich v10 eine Bindungsstelle für Anthrachinon-Derivate bilden.

Übersicht

wt hP2X4	71 V1: VAVTNTSK KL GF RI W	78 V1: VAVTNTSK KL GF RI W	82 V1: VAVTNTSK KL GF RI W	301 V10: R DLAG NE EQ	307 V10: R DLAG NE EQ	Geringe Affinität
	Längerer Loop			Intermolekulare Interaktion		
wt hP2X2	V1: ITTSEH K V			V10: K ING- TT	V10: K ING- TT	Geringe Affinität
	Kürzerer Loop			Keine intermolekulare Interaktion		
Chimäre C10	V1: VAVTNTSK KL GF RI W			V10: K ING- TT	V10: K ING- TT	Hohe Affinität
	Längerer Loop			Keine intermolekulare Interaktion		
Die Reste K78 , R82 , R301 und T307 sind möglicherweise in die Interaktion mit den Anthrachinonderivaten involviert						
Einführung einer einzelnen Mutation in den hP2X4-Rezeptor						
hP2X4 Mutante E307T	71 V1: VAVTNTSK KL GF RI W	78 V1: VAVTNTSK KL GF RI W	82 V1: VAVTNTSK KL GF RI W	301 V10: R DLAG NT Q	307 V10: R DLAG NT Q	Erwartete Hohe Affinität
	Längerer Loop			Keine intermolekulare Interaktion		

Abbildung 109: Bindungsstellen-Hypothese für Anthrachinon-Derivate im humanen P2X4-Rezeptor bzw. chimären P2X4(P2X2)-Rezeptor **c10**. Angelehnt an Dr. V. Namasivayam.

Stattfindende bzw. unterbrochene intermolekulare Interaktionen zwischen **R301** und **E307** im Bereich v10, sowie die Länge des Loops in v1 bilden möglicherweise die Grundlage für starke oder schwache Affinität der Anthrachinon-Derivate an den Rezeptoren hP2X4, hP2X2 und P2X4(P2X2) (vgl. Abb. 109). Für hohe Affinität wäre demnach ein langer Loop in v1 und unterbrochene intermolekulare Interaktionen im Bereich v10 zwischen **R301** und **T307** notwendig. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde eine Serie von Rezeptormutanten erstellt, exprimiert und charakterisiert. Dabei sollte die Einführung eines Threoninrestes in Position 307 des hP2X4-Wildtyp zu einer Zunahme der Affinität führen. Zusätzlich sollte auch eine mögliche Beteiligung von P2X4**Q308** und P2X4**D302** durch Mutation beider Positionen untersucht werden. Synonym sollte ein Austausch des Threonins in Position 306 der Chimäre **c10** zu einer Reduktion der Affinität führen. Ebenso sollte ein Austausch von Lysin in Position 78 bzw. von Arginin in Position 82 in der Chimäre **c10** zu reduzierter Affinität führen. Das experimentelle Vorgehen und die Charakterisierung der Rezeptormutanten wurde bereits in Kapitel 5.2 beschrieben. Die Mutante P2X4(P2X2)c10**R82A** konnte bisher leider mit den vorhandenen Mutageneseprimern nicht erhalten werden. Aus Zeitgründen wurde auf die

Definition neuer Primer und die erneute Mutagenese verzichtet.

11.2.5 Überprüfung der Bindungsstellen-Hypothese anhand weiterer Anthrachinon-Derivate

Zur Überprüfung der Bindungsstelle-Hypothese wurden Konzentrations-Wirkungskurven von Cibacron Blue an den P2X4E307T-, P2X4Q308T-, P2X4Q308A-, P2X4D302I-, P2X4(P2X2)c10T306E- und P2X4(P2X2)c10K78A-Rezeptoren aufgenommen. Die Testergebnisse sind in Abb. 110 dargestellt. Cibacron Blue zeigte signifikant erhöhte Potenz am P2X4E307T-Rezeptor (IC_{50} 0,0178 μ M) im Vergleich zum wt hP2X4-Rezeptor. Am P2X4D302I-Rezeptor war die Potenz geringfügig, aber signifikant erhöht. Am P2X4Q308T-Rezeptor war keine signifikante Abweichung vom wt hP2X4-Rezeptor zu erkennen, während Cibacron Blue an der P2X4Q308A-Mutante keinen antagonistischen Effekt zeigte. An der P2X4(P2X2)-Chimäre c10K78A war der IC_{50} -Wert von Cibacron Blue signifikant reduziert, während an der P2X4(P2X2)-c10T306E-Mutante nur eine geringfügig reduzierte Potenz gemessen werden konnte.

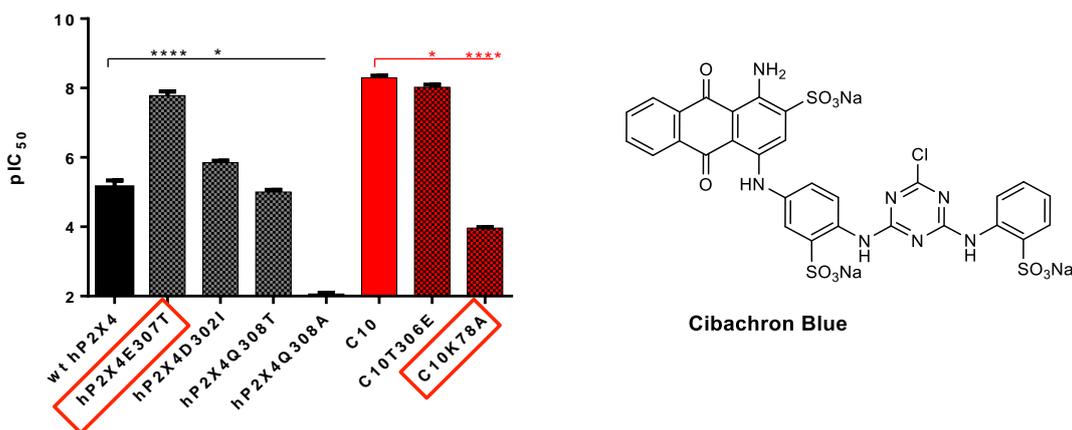


Abbildung 110: Calciumeinstrom-Experimente an P2X4-Rezeptormutanten und P2X4(P2X2)c10-Rezeptormutanten.

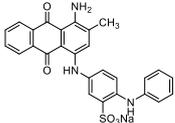
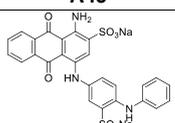
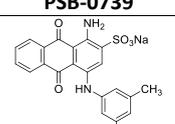
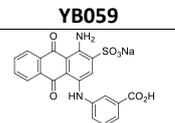
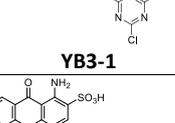
Negative allosterische Modulation der P2X4-Rezeptormutanten bzw. der P2X4(P2X2)c10-Rezeptormutanten durch Cibacron Blue. Dargestellt sind die pIC_{50} -Werte \pm SEM der Verbindungen. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X4-Wildtyp bzw. der P2X4(P2X2)-Chimäre c10: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden Konzentrations-Wirkungskurven von vier weiteren Anthrachinon-Analoga (A40, YB059, PSB-0739 und YB3-1) an den Rezeptormutanten aufgenommen. Die Verbindungen wurden entsprechend ihrer hohen inhibitorischen

schen Potenz an der Chimäre **c10** bei gleichzeitiger struktureller Vielfalt ausgewählt. Die Ergebnisse zeigen Tab. 39 und Abb. 111.

Tabelle 39: Calciumeinstrom-Experimente an hP2X₄- und hP2X₄(P2X₂)c10-Rezeptormutanten.

Negative allosterische Modulation humaner P2X₄- und P2X₄(P2X₂)c10-Rezeptormutanten durch eine kleine Bibliothek an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte ± SEM der Verbindungen. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp bzw. der P2X₄(P2X₂)-Chimäre **c10**: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Verbindung	IC ₅₀ ± SEM [µM], n=3-4							
	hP2X ₄	hP2X ₄ E307T	hP2X ₄ D302I	hP2X ₄ Q308A	hP2X ₄ Q308T	hP2X ₄ (P2X ₂) c10	c10 T306E	c10 K78A
 A40	25,3 ± 0,8	0,180 ± 0,007 ****	17,2 ± 7,6	14,9 ± 4,86	18,8 ± 5,40	0,0429 ± 0,0033	0,0674 ± 0,0169	> 10****
 PSB-0739	> 10	0,0353 ± 0,0047 ****	11,4 ± 1,41**	> 10	18,3 ± 3,60**	0,00341 ± 0,00049	0,00552 ± 0,00022	>10****
 YB059	20,0 ± 8,45	0,195 ± 0,014 ****	8,37 ± 0,46	6,38 ± 1,85	17,0 ± 7,8	0,266 ± 0,018	0,0898 ± 0,0327	> 10****
 YB3-1	> 10	0,117 ± 0,018 ****	> 10	> 10	> 10	0,0124 ± 0,0020	0,0315 ± 0,0067	> 10****
 Cibacron Blue	13,1 ± 2,2	0,0178 ± 0,0047 ****	1,42 ± 0,16*	> 10	10,4 ± 1,3	0,00476 ± 0,00062	0,00974 ± 0,0017*	110 ± 7,07****

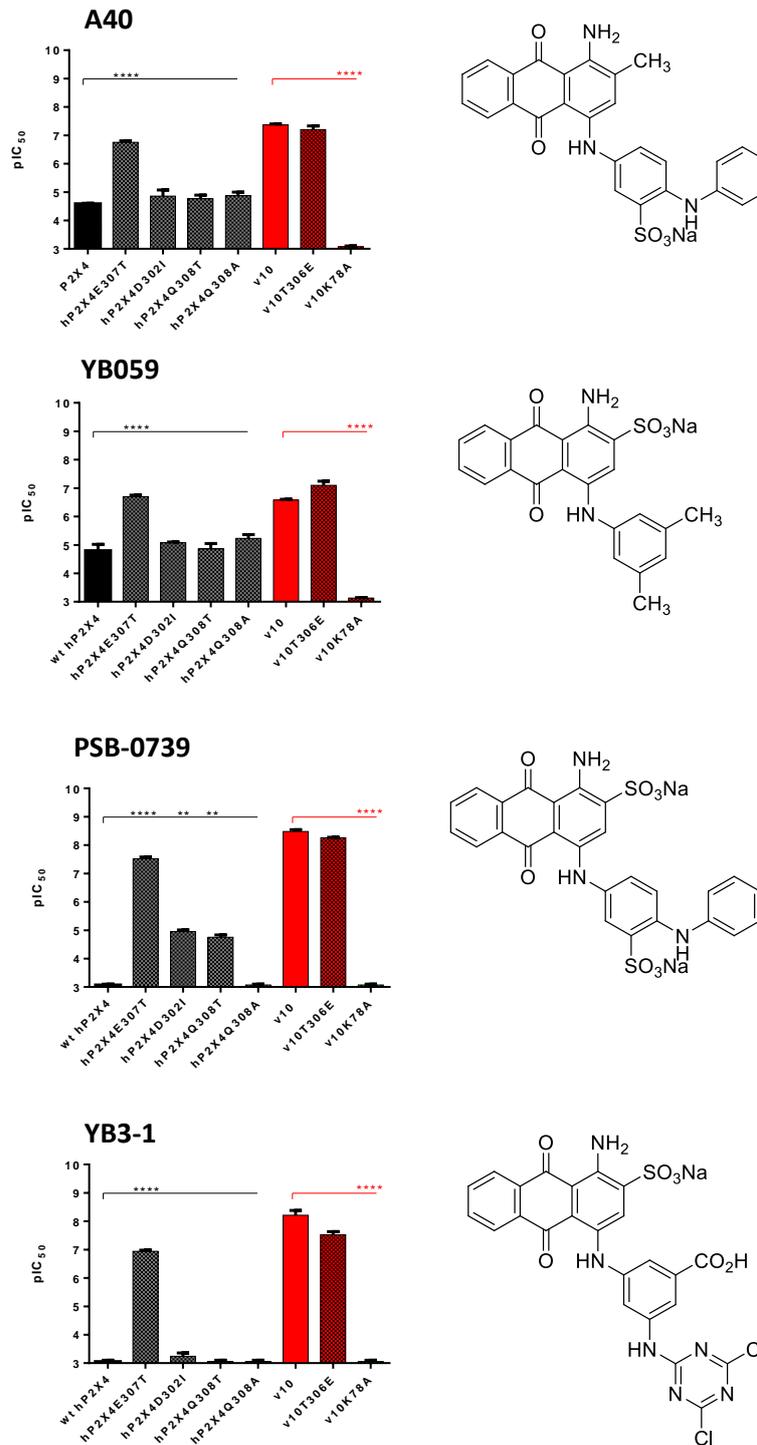


Abbildung 111: Calciumstrom-Experimente an P2X₄-Rezeptormutanten und P2X₄(P2X₂)c10-Rezeptormutanten.

Negative allosterische Modulation der P2X₄-Rezeptormutanten bzw. der P2X₄(P2X₂)c10-Rezeptormutanten durch eine Auswahl an Anthraquinon-Derivaten. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte ± SEM der Verbindungen. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hpP2X₄-Wildtyp bzw. der P2X₄(P2X₂)-Chimäre c10: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn p < 0,05; ** wenn p < 0,01; *** wenn p < 0,001 und **** wenn p < 0,0001.)

Alle getesteten Verbindungen zeigten signifikant erhöhte inhibitorische Affinität zu der Mutanten P2X4**E307T** und signifikant reduzierte inhibitorische Affinität zu der Mutanten P2X4(P2X2)c10**K78A**. An den anderen Rezeptormutanten zeigten die Verbindungen keine abweichenden Effekte verglichen mit dem P2X4-Rezeptor bzw. der P2X4(P2X2)-Chimäre **c10**. Einzige Ausnahme stellte die Verbindung PSB-0739 dar, die auch an den Mutanten P2X4**D302I** und P2X4**Q308T** signifikant erhöhte Potenz zeigte. Jedoch waren die IC₅₀-Werte an beiden Rezeptoren mit 11,4 bzw. 18,3 μM verhältnismäßig hoch, während die Verbindung mit einem IC₅₀ von 0,0353 μM an der P2X4**E307T**-Mutanten 300- bis 500-fach affiner war.

11.2.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die Einführung einer Mutation von Glutamin zu Threonin in Position 307 des humanen P2X4-Rezeptors reicht aus, um eine hohe Affinität der Anthrachinon-Derivate zum Rezeptor zu erzielen. Ebenso reicht eine Mutation der Position K78 zu Alanin in der P2X4(P2X2)-Chimären **c10** aus, um die hohe Affinität für Anthrachinon-Derivate zu verlieren. Der Gegenbeweis, die Einführung einer Mutation von Threonin zur Glutamin in Position 306, zeigte dagegen keine großen Effekte. An diesem Rezeptor wäre nach der Bindungsstellen-Hypothese eine deutliche Reduktion der Affinität erwartet worden. Diese Abweichung kann damit erklärt werden, dass der Sequenzbereich v10 im hP2X2-Rezeptor gegenüber dem humanen P2X4-Rezeptor um einen Aminosäurerest verkürzt ist. Demzufolge wurde beim Sequenzalignment ein Gap gesetzt (vgl. Abb. 112).

V10

hP2X4	RDLAGNEQ
hP2X2	KING-TTT
hP2X4 (P2X2)	KING-TTT

Abbildung 112: *Sequenvariationsbereich v10 in hP2X4-, hP2X2- und hP2X4(P2X2)-Rezeptor.*

Da an der besagten Stelle drei Threoninreste hintereinander liegen, besteht die Möglichkeit, dass der Gap nicht an der korrekte Stellen gewählt wurde und demnach der „falsche“ Threoninrest zu Glutamin mutiert wurde. Zur genaueren Überprüfung sollten in den anderen beiden Positionen (T305 und T307) jeweils Glutaminmutationen eingefügt werden und der Effekt auf die Anthrachinon-Affinität getestet werden. An einer der beiden Mutanten sollte eine reduzierte Affinität der Verbindungen gemessen werden.

Die Ergebnisse aus Calciumeinstrom-Experimenten an P2X₄- bzw. **c10**-Rezeptormutanten bestätigen die Bindungsstellen-Hypothese, nach der die Reste K78 und T307 in die Interaktion mit den Anthrachinon-Derivaten involviert sind.

11.3 Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen von Anthrachinon-Derivaten am hP2X4E307T-Rezeptor

Zur genaueren Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen von Anthrachinon-Derivaten an der hP2X4E307T-Mutante wurden weitere ausgewählte Verbindungen getestet. Die Verbindungen wurden entsprechend der Fragestellungen ausgewählt inwiefern das Ringsystem, das Vorhandensein von Sulfonatgruppen bzw. anderer polarer Gruppen, eine NH₂-Gruppe in Position C1 an Ring C, sowie der Linker zwischen Ring D und E die inhibitorischen Potenzen beeinflussen.

Im ersten Schritt wurde der generelle Aufbau des Ringsystems betrachtet (Abb. 113 und Tab. 40).

Das Ring-System

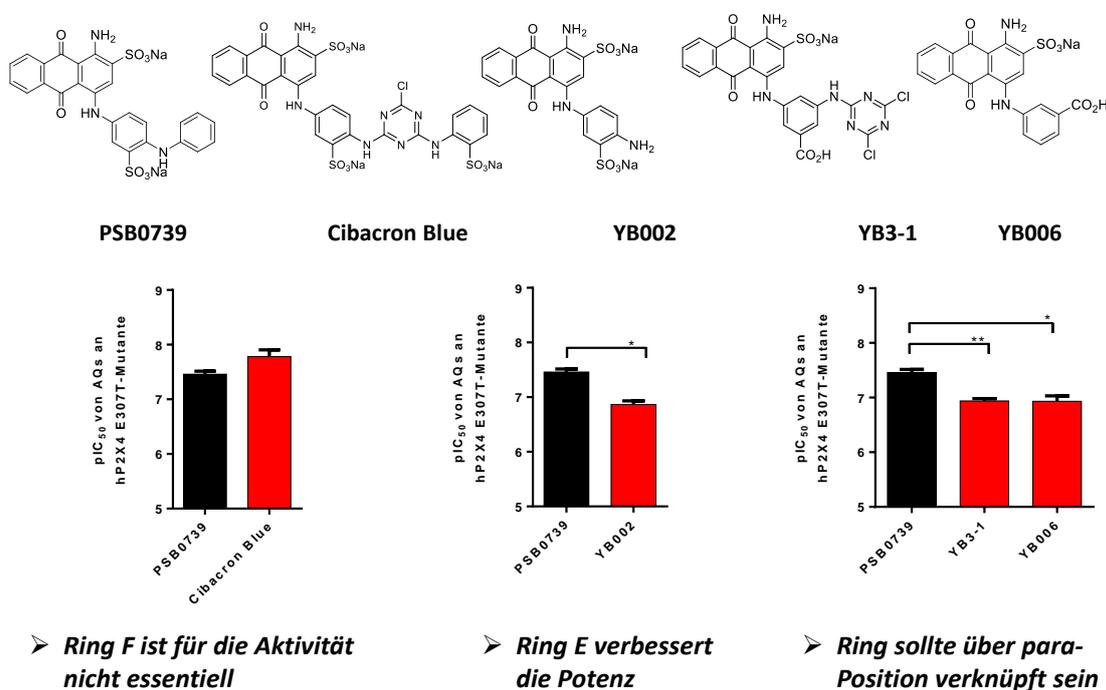


Abbildung 113: *Calciumeinstrom-Experimente am P2X4E307T-Rezeptor.*

Negative allosterische Modulation des P2X4E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X4-Wildtyp: Signifikanz () der Abweichung wurde angenommen, wenn p < 0,05; ** wenn p < 0,01; *** wenn p < 0,001 und **** wenn p < 0,0001.)*

Die beiden Verbindungen mit der höchsten Affinität zur hP2X4E307T-Mutanten waren PSB-0739 und Cibacron Blue, die den Rezeptor mit IC₅₀-Werten von 0,0353 bzw. 0,0178 μM hemmten. Die Einführung eines Rings F in der Verbindung Cibacron Blue

fürte zu einer minimal erhöhten Potenz, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass Ring F für die inhibitorische Aktivität der Anthrachinon-Derivate an der Rezeptormutanten nicht essentiell ist. Der Verlust des Rings E in Verbindung YB002 führt dagegen zu einer signifikant reduzierten Potenz. Das Vorhandensein eines Rings E erhöht demnach die Aktivität am hP2X4E307T-Rezeptor. Die Verknüpfung des Rings D mit Ring E über die *meta*-Position in Verbindung YB3-1 scheint im Vergleich zur Verknüpfung über die *para*-Position zu einer reduzierten Potenz zu führen. Allerdings liegen keine direkt vergleichbaren Verbindungen vor um die Theorie weiter zu verfolgen.

Tabelle 40: Calciumeinstrom-Experimente am P2X4E307T-Rezeptor.

Struktur-Wirkungsbeziehungen: Das Ringsystem. Negative allosterische Modulation des P2X4E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. - noch nicht getestet.

Das Ringsystem		IC ₅₀ ± SEM [µM], n=3-4		
Verbindung	Struktur	hP2X4	hP2X4E307T	P2X4(P2X2) c10
PSB-0739		> 10	0,0353 ± 0,0047	0,00341 ± 0,00049
YB3-1		> 10	0,117 ± 0,018	0,0124 ± 0,0020
Cibacron Blue		12,1 ± 4,2	0,0178 ± 0,0047	0,00476 ± 0,00062
YB002		-	0,139 ± 0,022	-
YB003		-	0,362 ± 0,084	-
YB006		-	0,123 ± 0,0257	-

Als nächstes sollte der Einfluss und die Positionierung der Sulfonat-Gruppen untersucht werden (vgl. Abb. 114 und Tab. 41).

Die Sulfonat-Gruppe an den Ringen C und D

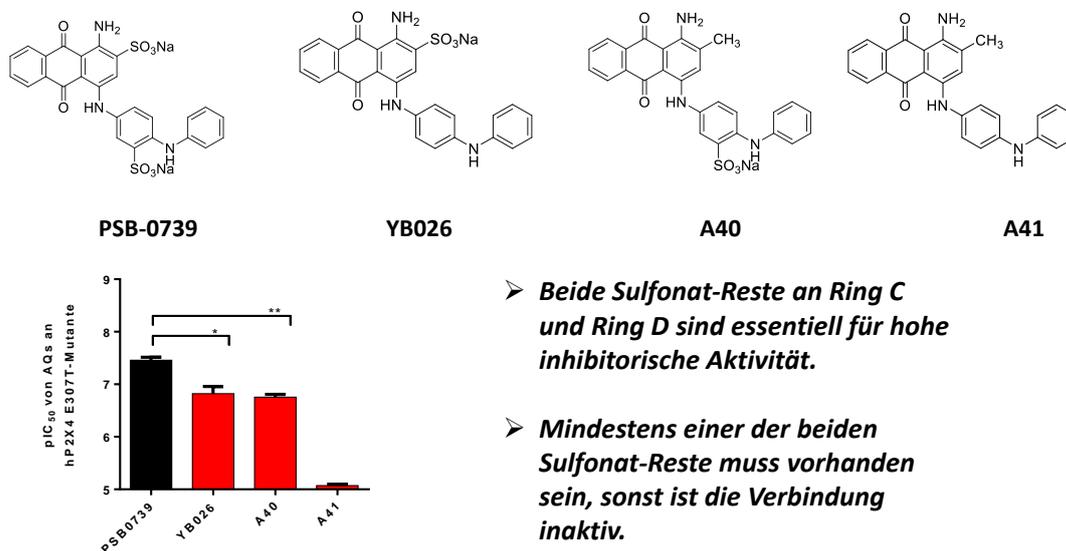


Abbildung 114: Calciumeinstrom-Experimente am P2X₄E307T-Rezeptor.

Negative allosterische Modulation des P2X₄E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Verglichen mit der Verbindung PSB-0739, die jeweils eine Sulfonatgruppe an den Ringen C und D trägt, führte der Verlust einer der beiden Gruppen in Verbindung YB026 und A40 zu einer reduzierten Affinität. Bei Abwesenheit beider Sulfonate in A41 zeigt die Verbindung am P2X₄E307T-Rezeptor keine Aktivität mehr. Daraus ergibt sich, dass das Vorhandensein zweier Sulfonatgruppen, jeweils einer an den Ringen C und D, für die Affinität wichtig ist. Das Vorhandensein einer der beiden Sulfonat-Reste ist essentiell.

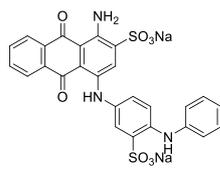
Tabelle 41: Calciumeinstrom-Experimente am P2X₄E307T-Rezeptor.

Struktur-Wirkungsbeziehungen: Die Position der sauren Funktionen. Negative allosterische Modulation des P2X₄E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. - noch nicht getestet.

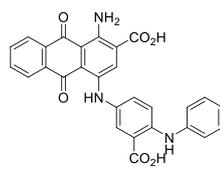
Die SO ₃ Na-Gruppe an den Ringen C und D		IC ₅₀ ± SEM [μM], n=3-4		
Verbindung	Struktur	hP2X ₄	hP2X ₄ E307T	P2X ₄ (P2X ₂) c10
PSB-0739		> 10	0,0353 ± 0,0047	0,00341 ± 0,00049
YB 026		1,35 ± 0,22	0,164 ± 0,042	0,0922 ± 0,021
YB3-1		> 10	0,117 ± 0,018	0,0124 ± 0,0020
YB 21-1		> 10	0,115 ± 0,035	0,274 ± 0,029
A40		25,3 ± 0,8	0,180 ± 0,007	0,0429 ± 0,0033
A41		> 10	> 10	> 10

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Sulfonat-Gruppen durch Carboxylat-Gruppen bzw. durch andere polare Gruppen ersetzt werden können (vgl. Abb. 115 und Tab. 42). Während der Austausch der beiden Sulfonat-Gruppen durch zwei Carboxylat-Gruppen nur zu einer schwachen Reduktion der Affinität führten (Verbindung PSB-0704), führte der Austausch einer der beiden Sulfonate in den Ringen C (LW25) und D (ENA025) durch einen Hydroxymethyl-Rest zu einer reduzierten Affinität an der P2X₄E307T-Mutante. Demnach ist ein Ersatz der Sulfonatgruppen durch Carboxylat-Gruppen -unter minimaler Reduktion der Affinität- möglich, jedoch nicht durch andere polare Gruppen. Die Sulfonat-Gruppe in Position 2 (Ring C) scheint, betrachtet man die Verbindung ENA25 im Vergleich zur Verbindung LW25, etwas stärker zur hohen Affinität beizutragen als die Sulfonat-Gruppe am Ring D.

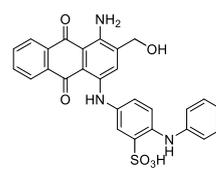
Die Sulfonat-Gruppe an den Ringen C und D



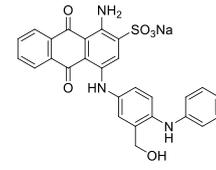
PSB-039



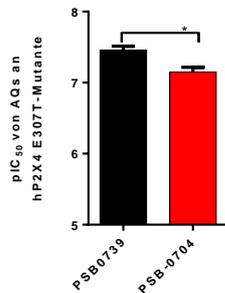
PSB-0704



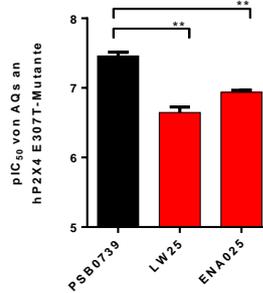
LW25



ENA25



▪ Sulfonat am Ring C kann durch Carboxylat ersetzt werden, was nur zu einer leichten Reduzierung der Aktivität führt.



▪ Sulfonat kann nicht durch andere polare, ungeladene funktionelle Gruppen ersetzt werden.

Abbildung 115: Calciumeinstrom-Experimente am P2X₄E307T-Rezeptor.

Negative allosterische Modulation des P2X₄E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Tabelle 42: Calciumeinstrom-Experimente am P2X₄E307T-Rezeptor.

Struktur-Wirkungsbeziehungen: Einführung polarer Gruppen. Negative allosterische Modulation des P2X₄E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. #: n=1, in Duplikaten. - noch nicht getestet.

Verbindung	Struktur	IC ₅₀ ± SEM [µM], n=3-4		
		hP2X ₄	P2X ₄ E307T	P2X ₄ (P2X ₂) c10
YB3-1		> 10	0,117 ± 0,018	0,0124 ± 0,0020
YB 1-1		> 10	0,168 ± 0,008	0,0149 ± 0,0021
LW25		> 10	0,233 ± 0,039	-
BC04 (PSB-0704)		-	0,0724 ± 0,0102	-
YB 011		4,33 ± 1,29	0,289 ± 0,044	0,0619 ± 0,0103
YB 012		3,28 ± 0,80	0,204 ± 0,027	0,0448 ± 0,0073
ENA025		5,94 [#]	0,116 ± 0,0083	-

NH₂-Linker als Verknüpfung für Ring D und E

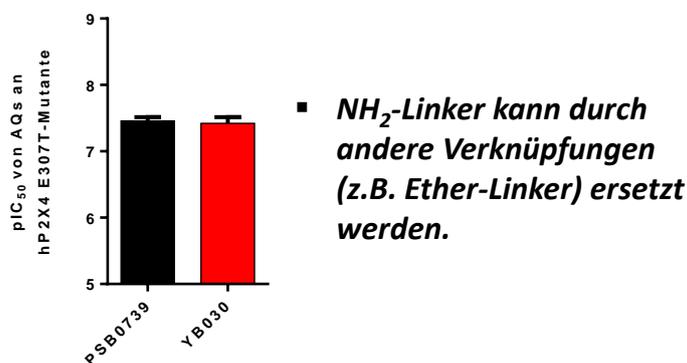
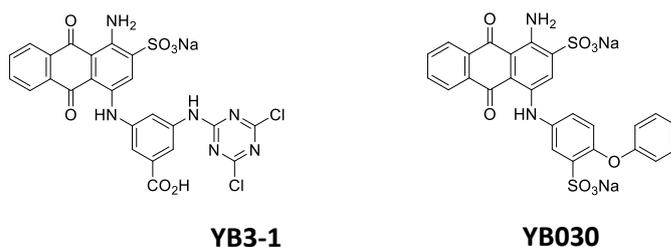


Abbildung 116: Calciumeinstrom-Experimente am P2X₄E307T-Rezeptor.

Negative allosterische Modulation des P2X₄E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthraquinon-Derivaten. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

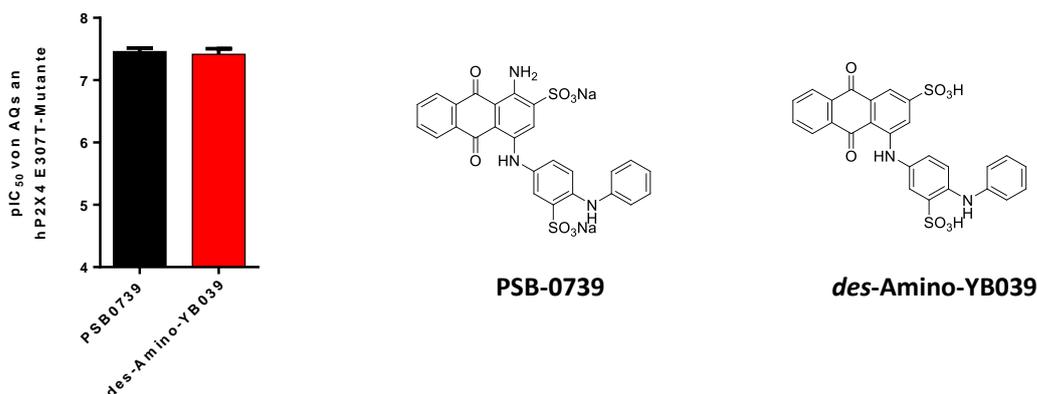
Im nächsten Schritt wurde die Verknüpfung des Ringes D mit dem Ring E untersucht (vgl. Abb. 116 und Tab. 43). Dabei sollten die Frage geklärt werden, ob die Aminogruppe zwischen Ring D und E durch andere Strukturen ersetzt werden kann. Die Einführung einer Ether- anstelle der Aminogruppe führte zu keiner Veränderung der Affinität zwischen den Verbindungen PSB-0739 und YB030. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aminogruppe durch andere Linker austauschbar ist. Bezüglich der Positionierung des Linkers zwischen Ring D und E konnte keine definitive Aussage getroffen werden, da keine direkt miteinander vergleichbaren Verbindungen existieren.

Tabelle 43: Calciumeinstrom-Experimente am P2X₄E307T-Rezeptor.

Negative allosterische Modulation des P2X₄E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. - noch nicht getestet.

<i>NH-Linker zwischen den Ringen D und E</i>				
Verbindung	Struktur	IC ₅₀ ± SEM [µM], n=3-4		
		hP2X ₄	hP2X ₄ E307T	P2X ₄ (P2X ₂) c10
PSB-0739		> 10	0,0353 ± 0,0047	0,00341 ± 0,00049
YB3-1		> 10	0,117 ± 0,018	0,0124 ± 0,0020
YB030		-	0,0396 ± 0,0876	-
YB006		-	0,123 ± 0,0257	-
LW23		-	> 10	-
<i>NH₂ Gruppe in Position 1</i>				
Verbindung	Struktur	hP2X ₄	P2X ₄ E307T	P2X ₄ (P2X ₂) c10
1-des-Amino-YB039		11,4 ± 0,3	0,0404 ± 0,0090	-

NH₂ an Ring C (an C1)



- **NH₂ am Ring C wird für die Aktivität nicht benötigt (im Gegensatz zum P2Y₁₂-Rezeptor).**

Abbildung 117: Calciumeinstrom-Experimente am P2X₄E307T-Rezeptor.

Negative allosterische Modulation des P2X₄E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die pIC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. (Ergebnisse eines one-way Anova-Testes mit nachfolgendem Dunnetts-Test verglichen mit dem humanen hP2X₄-Wildtyp: Signifikanz (*) der Abweichung wurde angenommen, wenn $p < 0,05$; ** wenn $p < 0,01$; *** wenn $p < 0,001$ und **** wenn $p < 0,0001$.)

Vergleicht man die Affinitäten der Verbindungen PSB-0739 und des-Amino-YB039 (Abb. 117 und Tab. 43) zeigt sich, dass die Amino-Gruppe in Position 1 des Ringes C nicht essentiell ist. Die Verbindungen hemmten die P2X₄E307T-Mutante mit gleicher Potenz.

Zur Vervollständigung des Gesamtbildes wurden weitere Verbindungen mit unsubstituiertem Ring D, Carboxylat- anstatt Sulfonat-Gruppe in *para*-Position oder *ortho*-Position an Ring D, aromatischer Verknüpfung der Ringe D und E sowie unterschiedlichen polaren Gruppen in *meta*-Position an Ring D getestet (Tab. 44). Alle Verbindungen zeigten miteinander vergleichbare inhibitorische Potenzen, die deutlich geringer ausgeprägt waren als die Potenz von PSB-0739.

Tabelle 44: Calciumeinstrom-Experimente am P2X₄E307T-Rezeptor.

Negative allosterische Modulation des P2X₄E307T-Rezeptors durch eine Auswahl an Anthrachinon-Derivaten. Dargestellt sind die IC₅₀-Werte der Verbindungen ± SEM. - noch nicht getestet.

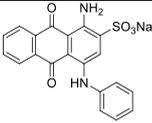
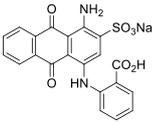
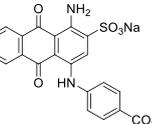
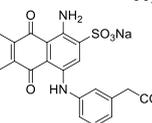
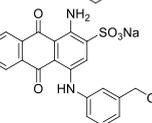
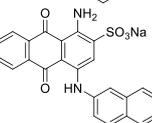
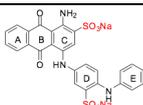
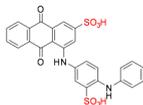
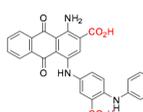
Ergänzende Verbindungen		IC ₅₀ ± SEM [μM], n=3-4		
Verbindung	Struktur	hP2X ₄	P2X ₄ E307T	P2X ₄ (P2X ₂) c10
YB025		-	0,176 ± 0,040	-
YB005		-	0,325 ± 0,029	-
YB008		-	0,231 ± 0,045	-
YB044		-	0,220 ± 0,028	-
YB137		-	0,176 ± 0,040	-
YB041		-	0,282 ± 0,029	-

Tabelle 45: Selektivität von Anthrachinon-Derivaten an der hP2X4E307T-Mutante gegenüber P2Y-Rezeptoren

Ergebnisse von Calciumeinstrom- bzw. β -Arrestin- und cAMP-Experimenten. Dargestellt sind die IC_{50} -Werte der Verbindungen \pm SEM. #: $n=1$ in Duplikaten. - noch nicht getestet.

Rezeptor	hP2X4	hP2X4E30T	hP2Y1	hP2Y4	hP2Y12
Assay	Calcium influx	Calcium influx	Calcium influx	Calcium influx	β -Arrestin cAMP
Verbindung	$IC_{50} \pm$ SEM [μ M], n=3-5		$IC_{50} \pm$ SEM [μ M], n=3-5		
PSB-0739 	> 10	0,0353 \pm 0,0047	-	5,62 \pm 1,76	0,0613 \pm 0,0196
dA-YB039 	11,4 \pm 0,3	0,0404 \pm 0,0090	-	2,98 [#]	0,199 \pm 0,039
PSB-0704 	-	0,0724 \pm 0,0102	4.48 [#]	1,68 \pm 0,46	1,47 \pm 0,06
				1,30 \pm 0,52	

Vergleicht man die Ergebnisse der affinsten Verbindungen PSB-0739, *des*-Amino-YB039 und PSB-0704 am P2X4E307T-Rezeptor mit denen an den P2Y-Rezeptoren, zeigt sich eine 20-60-fache Selektivität der Verbindung PSB-0704 für die P2X4E307T-Mutante (vgl. Tabelle 45). Die zukünftige Synthese eines *Des*-Amino-Derivates von PSB-0704 könnte eventuell dazu beitragen die Selektivität gegenüber den P2Y-Rezeptoren weiter zu erhöhen. Im Gegensatz zu den P2Y-Rezeptoren ist das Vorhandensein der Aminogruppe an Ring C für hohe inhibitorische Potenz am P2X4E307T-Rezeptor nicht notwendig.

11.4 Docking-Experimente

Zur Analyse und Veranschaulichung der Bindungsstelle wurde das Anthrachinon-Derivat PSB-0739 in das Homologie-Modell des humanen P2X4-Rezeptors im geschlossenen, inaktiven Zustand gedockt. Abbildung 118 zeigt die Aufsicht auf das humane P2X4E307T-Rezeptortrimer. Die einzelnen Monomere sind in hellgrün, hellblau und gelb dargestellt. Die Verbindung PSB-0739 ist in die Bindungsstelle zwischen den variablen Regionen v1 (orange) und v10 (blau) gedockt.

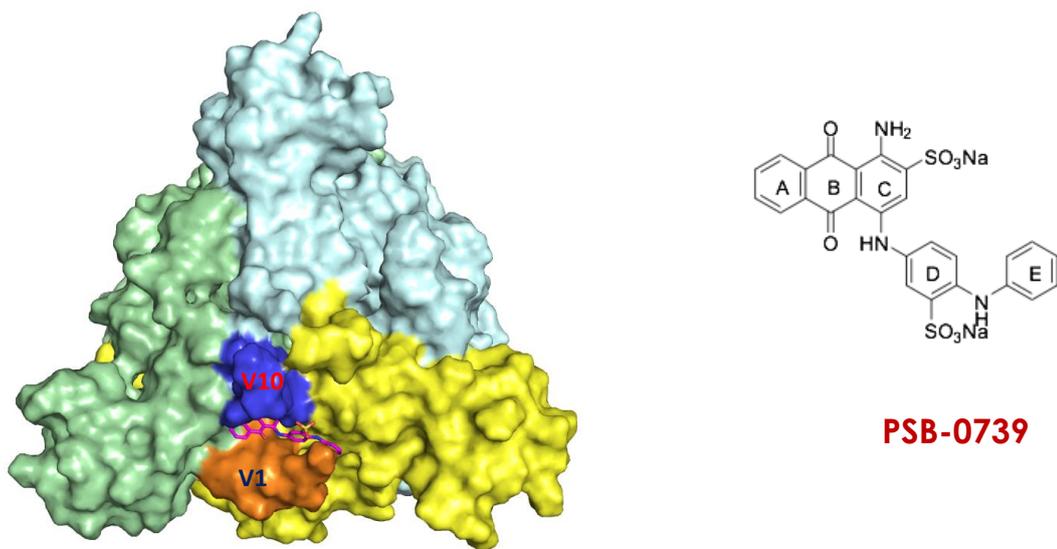


Abbildung 118: Aufsicht auf die das hP2X4E307T-Trimer mit dem gedockten PSB-0739. Die farblich gekennzeichneten Bereiche v1 (orange) und v10 (blau) zeigen die Anthrachinon-Bindungsstelle (Abb. Dr. V. Namasivayam).

Abbildung 119 A zeigt die Orientierung der Verbindung PSB-0739 innerhalb der Bindungsstelle zwischen den Aminosäureresten der Bereiche v1 und v10. In Abbildung 119 B ist ein detailliertes Interaktionsdiagramm der Aminosäurereste mit dem Anthrachinon-Derivat PSB-0739 abgebildet. Daraus ergibt sich, dass die Aminosäurereste K78 und R301 mit den Sulfonat am Ring D interagieren, während die Reste R82 und T307 (E307 im wt hP2X4-Rezeptor) mit dem Sulfonsäure-Rest an Ring C interagieren. Die Ergebnisse werden durch die vorliegenden Mutagenese-Daten gestützt.

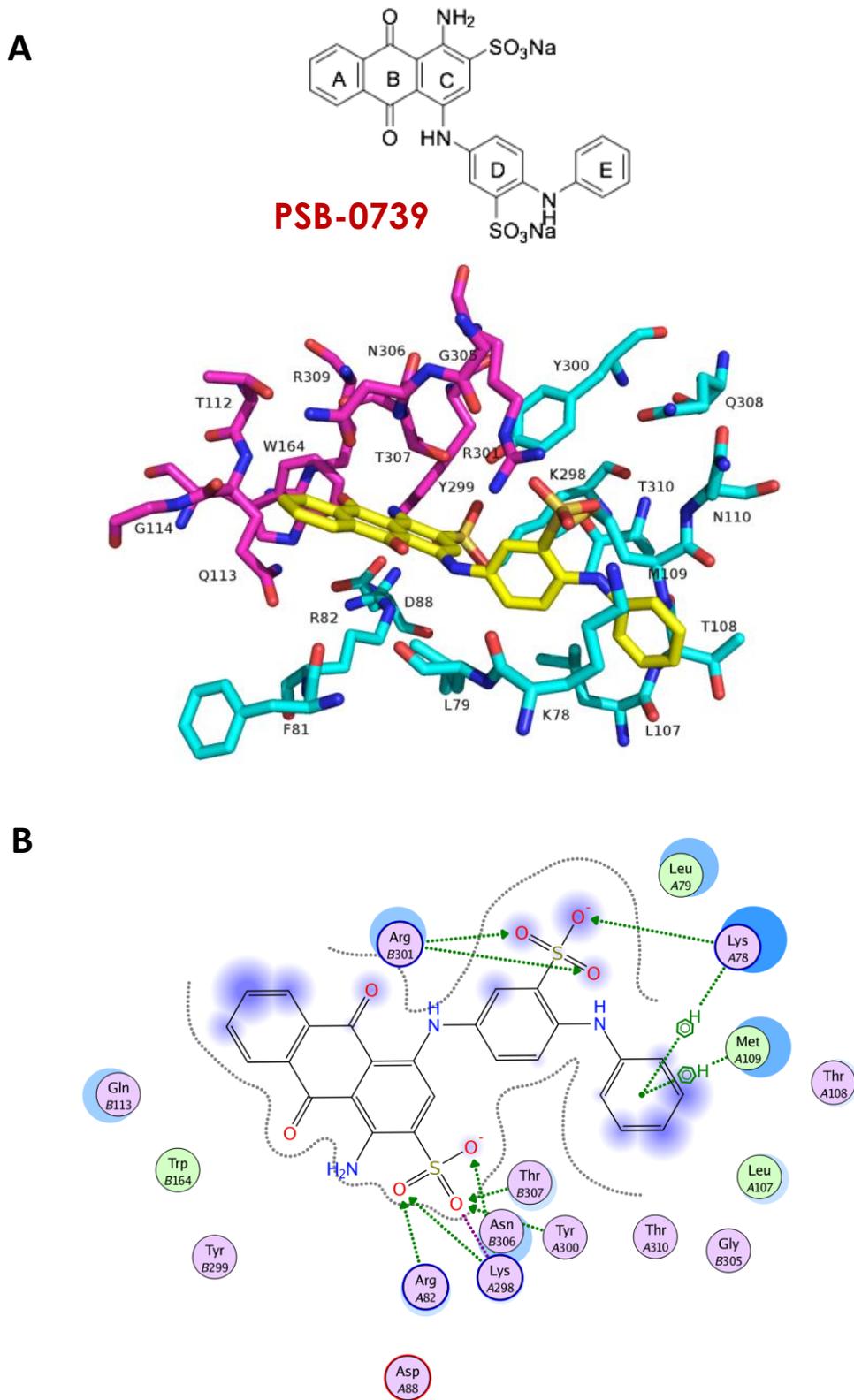


Abbildung 119: (A) PSB-0739 innerhalb der Bindungsstelle zwischen *v1* und *v10* mit benachbarten Aminosäureresten. (B) Interaktionsdiagramm von PSB-0739 und Aminosäuren-Resten (Abb. Dr. V. Namasivayam).

Abbildung 120 zeigt eine Oberflächendarstellung des humanen P2X₄E307T-Trimers sowie eine Nahansicht der Anthrachinon-Bindungsstelle mit gedocktem PSB-0739 zwischen v1 (orange) und v10 (blau). Die Position der ATP-Bindungsstelle ist rot gekennzeichnet.

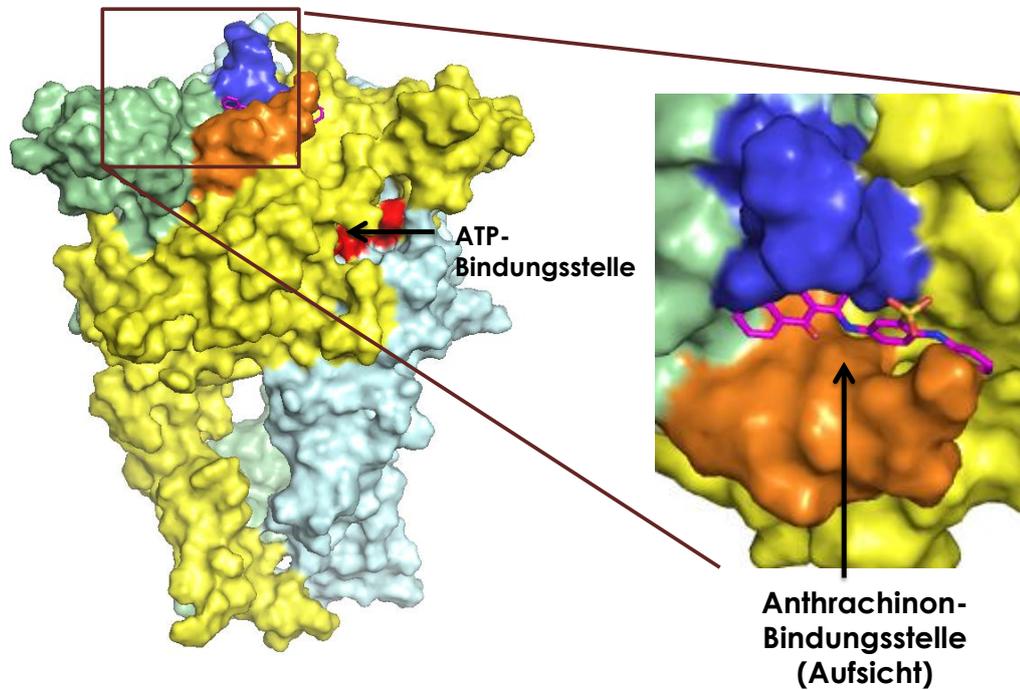


Abbildung 120: *Oberflächendarstellung des humanen P2X₄E307T-Trimers und Nahansicht der Anthrachinon-Bindungsstelle innerhalb der Bereiche v1 (orange) und v10 (blau) von oben betrachtet (Abb. Dr. V. Namasivayam).*

Die variablen Bereiche v1 und v10 liegen in Nähe der ATP-Bindungsstelle, auch wenn keine Aminosäurereste innerhalb dieser Bereiche direkt an der ATP-Bindung beteiligt sind.

11.5 Zusammenfassung

Anhand der Bildung von P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären ist es gelungen, eine allosterische Bindungsstelle für Anthrachinon-Derivate innerhalb des Sequenzbereiches v10 (vgl. Abb. 121) zu identifizieren. An der entsprechenden Rezeptorchimäre P2X₄(P2X₂)c10, jedoch nicht an den anderen chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren, zeigten Cibachron Blue und verwandte Derivate eine gegenüber den humanen P2X₄- und P2X₂-Rezeptoren vielfach erhöhte Potenz mit IC₅₀-Werten im niedrigen nanomolaren Bereich.

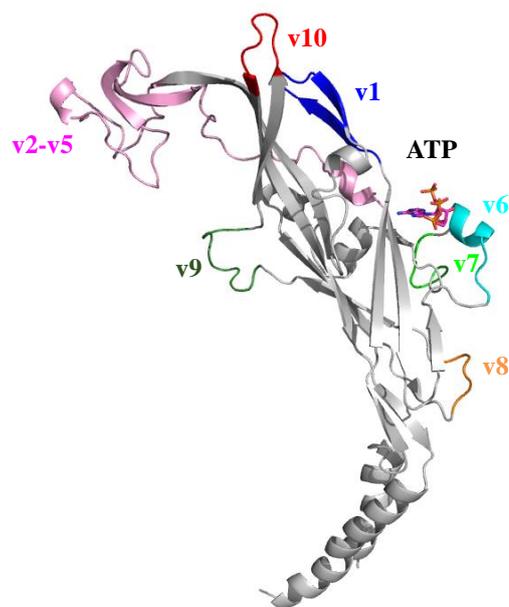


Abbildung 121: Delfin-artige Darstellung des humanen P2X₄-Monomers mit farbig gekennzeichneten Bereichen v1-v10 (Abb. Namasivayam)

Die potentesten Verbindungen stellten PSB-0739 (IC₅₀ 0,00341 μ M) und Cibacron Blue (IC₅₀ 0.00476 μ M) dar (Abb. 122).

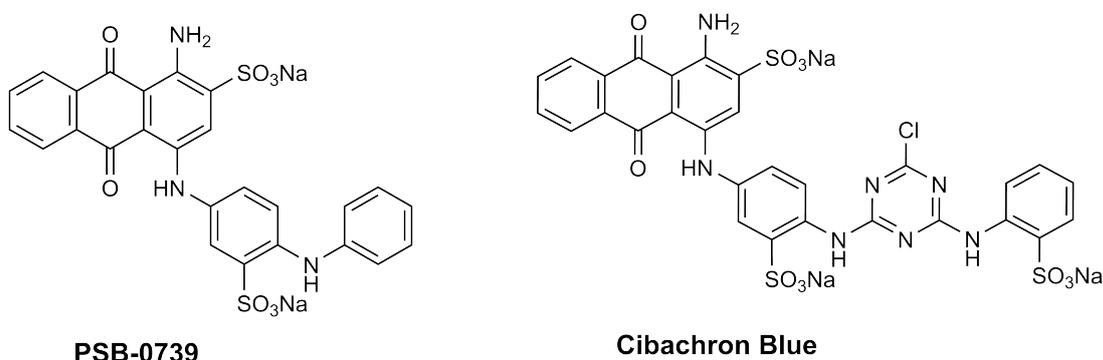


Abbildung 122: Chemische Struktur der allosterischen Antagonisten PSB-0739 und Cibacron Blue an der P2X₄(P2X₂)c10-Chimäre.

Unter Betrachtung eines Homologie-Modells des humanen P2X₄-Rezeptors und darauf basierender zielgerichtete Mutagenese war es möglich, an der Bindungsstelle beteiligte Aminosäurereste im Bereich v1 (R82, K78) und v10 (R301, T307) zu identifizieren. Die Länge des Loops in v1 sowie die Abwesenheit intermolekularen Interaktionen zwischen R301 und T307 sind dabei ursächlich für die hohe Aktivität an dem chimären Rezeptor c10 (Abb. 123).

Übersicht

wt hP2X4	V1: VAVTNTS K LG FRI W	V10: R DLAG NE Q	Geringe Affinität
	Längerer Loop	Intermolekulare Interaktion	
wt hP2X2	V1: ITTSEH K V	V10: K ING- TT	Geringe Affinität
	Kürzerer Loop	Keine intermolekulare Interaktion	
Chimäre C10	V1: VAVTNTS K LG FRI W	V10: K ING- TT	Hohe Affinität
	Längerer Loop	Keine intermolekulare Interaktion	
<p>Die Reste K78, R82, R301 und T307 sind möglicherweise in die Interaktion mit den Anthrachinonderivaten involviert</p>			
<p>Einführung einer einzelnen Mutation in den hP2X4-Rezeptor</p>			
hP2X4 Mutante E307T	V1: VAVTNTS K LG FRI W	V10: R DLAG N T Q	Erwartete Hohe Affinität
	Längerer Loop	Keine intermolekulare Interaktion	

Abbildung 123: Übersicht zur Erklärung der erhöhten Anthrachinon-Affinität an P2X₄(P2X₂)-Chimäre **c10** im Vergleich zu den humanen P2X₄- und P2X₂-Rezeptoren (modifiziert nach Dr. V. Namasivayam).

Darüber hinaus ermöglichten diese Erkenntnisse durch die Einführung einer einzelnen Mutation zu Threonin in Position 307 des humanen P2X₄-Rezeptors, die hohe Affinität der Anthrachinon-Derivate an der Chimäre **c10** auch im hP2X₄-Rezeptor zu simulieren. Damit steht für tiefere Versuche (z.B. der Lösung einer Kristallstruktur) eine Bibliothek von Verbindungen als Werkzeuge zur Verfügung, die den großen Vorteil aufweisen, wasserlöslich zu sein.

Eine Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Anthrachinon-Bibliothek an der P2X₄**E307T**-Mutante konnte Aufschlüsse über relevante Strukturbestandteile und elementare funktionelle Gruppen liefern (vgl. Abb. 124).

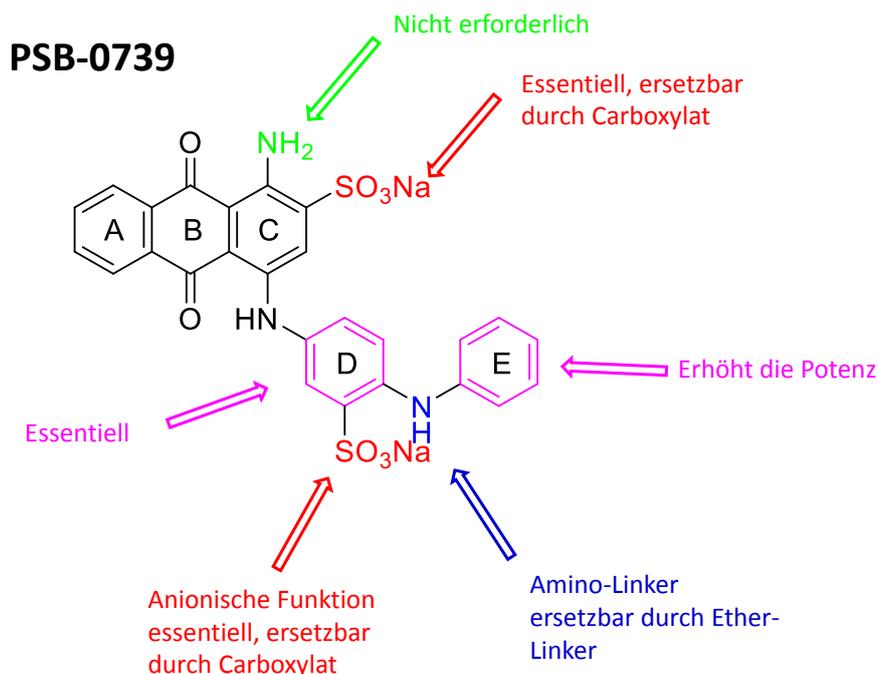


Abbildung 124: Struktur-Wirkungsbeziehungen von Anthrachinon-Derivaten am *E307TP2X4*-Rezeptor.

Mit der Verbindung PSB-0704 (Abb. 125) konnte darüber hinaus eine gegenüber den P2Y-Rezeptoren 20-60-fach selektive Verbindung identifiziert werden, die als Basis für weitere Synthesen dienen könnte, beispielsweise des *Des*-Amino-Derivat von PSB-0704. Diese Verbindung könnte die Selektivität für die P2X4^{E307T}-Mutante gegenüber den P2Y-Rezeptoren weiter erhöhen.

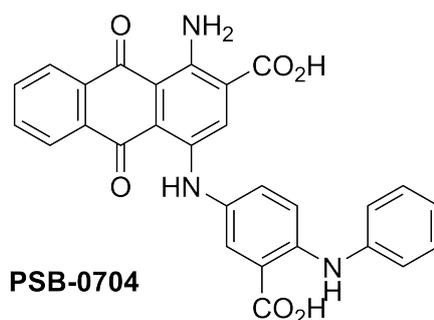


Abbildung 125: Chemische Struktur des allosterischen Antagonisten PSB-0704.

Die Identifizierung einer weiteren allosterischen Bindungsstelle für Anthrachinonderivate, in den Bereichen v1 und v10, liefert erneut einen Hinweis auf das Vorhandensein multipler allosterischer Bindungsstellen im extrazellulären Bereich des humanen P2X4-Rezeptors.

12 Zusammenfassung und Ausblick

P2X-Rezeptoren stehen aufgrund ihrer Beteiligung an zahlreichen (patho)physiologischen Prozessen wie der Wahrnehmung von Schmerz, entzündlichen Veränderungen oder Krebs als Zielstrukturen für potentielle neue Wirkstoffe im Fokus der Forschung. Der P2X4-Rezeptor gilt aufgrund seiner hohen Expression in spinalen Microglia-Zellen, die mit neuropathischem Schmerz assoziiert werden, als vielversprechende Arzneimittel-Zielstruktur.⁶⁷ Die Blockade sowie der Knockout von P2X4-Rezeptoren führte zu deutlich reduzierten neuropathischen Schmerzzuständen.⁶⁸ Die Aktivierung von P2X4-Rezeptoren gilt dagegen als neue Strategie in der Therapie der Alkoholabhängigkeit.^{43,73} Ethanol wirkt als allosterischer Antagonist des P2X4-Rezeptors und der Missbrauch von Alkohol führte im Ratten-Modell zu einer reduzierten P2X4-Rezeptor-Genexpression.⁷⁴ Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen der allosterischen Modulation des P2X4-Rezeptors zu verstehen und die relevante(n) Bindungsstelle(n) bekannter und neuer allosterischer Modulatoren zu identifizieren, um damit eine verbesserte Basis für die Entwicklung neuer, potenter und selektiver positiver und negativer allosterischer P2X4-Rezeptor-Modulatoren (PAMs und NAMs) zu schaffen.

12.1 Mutagenesestudien am humanen P2X4-Rezeptor

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte die Klonierung und Herstellung stabil transfizierter humaner P2X4-Rezeptor Zell-Linien erfolgreich durchgeführt werden. Es konnten neben dem humanen P2X4-Rezeptorwildtyp sieben chimäre P2X4(P2X2)-Rezeptor Zell-Linien (**c1**, **c2-c5**, **c6**, **c7**, **c8**, **c9** und **c10**), acht humane P2X4-Rezeptormutanten im Bereich der variablen Domänen v2-v5 (**D121A**, **K127A**, **D129A**, **S131A**, **T133A**, **G138A**, **H140A** und **N142A**), vier P2X4-Rezeptormutanten innerhalb des variablen Bereichs v10 (**D302I**, **E307T**, **Q308A**, **Q308T**) sowie zwei Mutanten der Chimäre c10 (**T306E** und **K78A**) generiert werden. Mit Ausnahme der beiden Chimären **c1** und **c9** waren alle Rezeptoren funktionell. Eine Übersicht zeigt Abbildung 126. Die Sensitivität der **c1**- und **c9**-Chimären gegenüber dem PAM Ivermectin, die für P2X4-Rezeptoren typisch ist, bestätigte die grundsätzliche Expression der beiden Rezeptoren die in Abwesenheit von Ivermectin kaum aktivierbar waren. Zukünftige Radioligand-Bindungsstudien mit [³⁵S]ATP γ S könnten möglicherweise klären, ob und inwiefern die ATP-Bindung an die Chimären **c1** und **c9** beeinträchtigt ist.

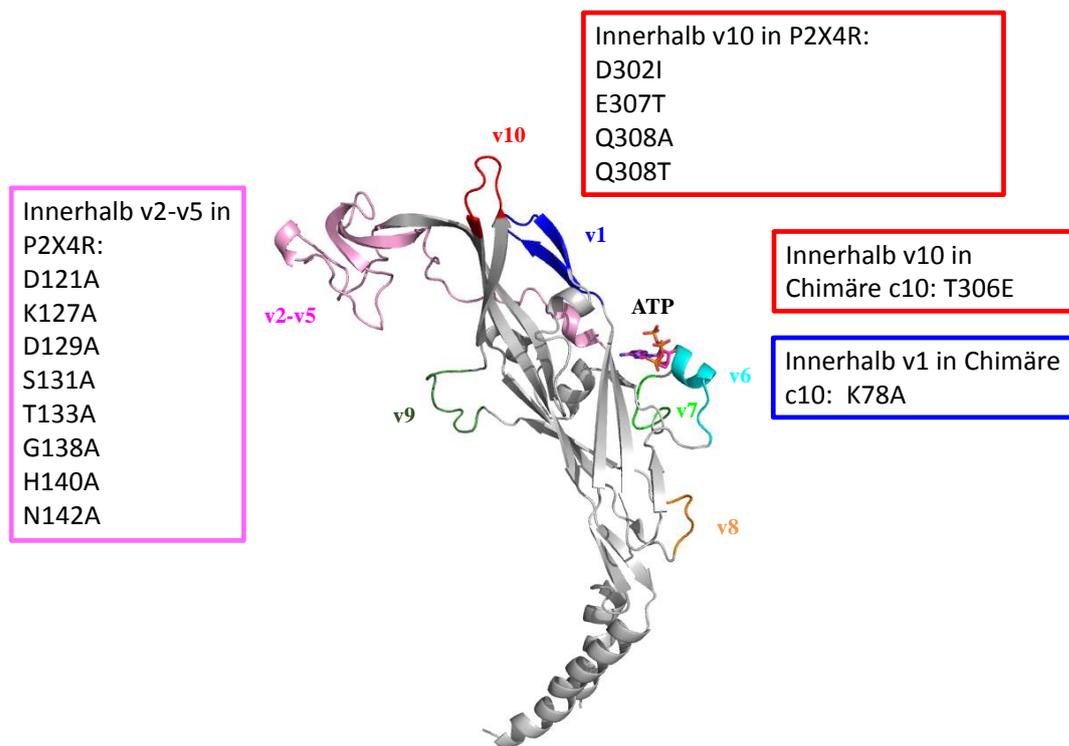


Abbildung 126: Darstellung des humanen P2X₄-Rezeptormonomers im ATP-gebundenen Zustand mit den farblich gekennzeichneten variablen Bereichen v1-v10, die in den chimären Rezeptoren c1-c10 gegen die entsprechenden Sequenzen des humanen P2X₂-Rezeptors ausgetauscht wurden. Die vorhandenen P2X₄-Rezeptormutanten bzw. Mutanten der Chimäre c10 sind in den Kästen notiert und deren Lokalisierung ist farblich dem entsprechenden Rezeptorbereich (v1-v10) zugeordnet.

12.2 Charakterisierung allosterischer Bindungsstellen neuer P2X₄-Rezeptorantagonisten

Die Untersuchung der allosterischen Antagonisten der Strukturklasse **SKI** an allen funktionellen P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären ergab, dass Aminosäurereste der drei variablen Regionen v6, v7 und v8 an der Bindungsstelle beteiligt sein könnten. Für detailliertere Untersuchungen müssten weitere Verbindungen der Strukturklasse an den entsprechenden Rezeptoren getestet werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse wären darüber hinaus Radioligand-Bindungsstudien hilfreich. Ein Radioligand der entsprechenden Strukturklasse ist zum momentanen Zeitpunkt noch in der Entwicklung. Auch die Herstellung weiterer Chimären (P2X₂(P2X₄)v6, P2X₂(P2X₄)v7, P2X₂(P2X₄)v8) wäre sinnvoll, mit denen man untersuchen könnte, ob sich die Sensitivität des humanen P2X₂-Rezeptors für die Antagonisten durch den Austausch gegen die entsprechenden P2X₄-Rezeptor-Sequenzen erhöhen lässt.

Untersuchungen der Strukturklasse **SKII** ergaben keine klaren Ergebnisse in Bezug auf potentielle Bindungsstellen. Während die Leitverbindung eine 10-fach niedrigere Potenz an der Chimären **c2-c5** zeigte, konnte mit anderen Verbindungen der Klasse diese Interaktion nicht bestätigt werden. An innerhalb des variablen Bereichs v2-v5 vorhandenen P2X4-Rezeptormutanten konnten allenfalls schwache Effekte gemessen werden.

Für die Strukturklasse **SKIII** konnten bisher keine Bindungsstellen identifiziert werden. Interaktionen mit den variablen Regionen v2-v5, v6, v7, v8 und v10 wurden nicht festgestellt.

Interaktionen mit den variablen Regionen v1 und v9 können bisher für keine der Strukturklassen ausgeschlossen werden. Da der Calcium-Einstrom-Assay die Funktionalität des Rezeptors voraussetzt, war eine Testung der Verbindungen an den Rezeptoren **c1** und **c9** bisher nicht möglich. Eventuell könnte eine zukünftige Strategie die Vorinkubation der Rezeptoren mit dem PAM Ivermectin darstellen; anschließend könnte der Effekt der Antagonisten auf den durch Ivermectin potenzierten ATP-Effekt gemessen werden.

12.3 Charakterisierung allosterischer Bindungsstellen bekannter P2X4-Rezeptor-Modulatoren

Der allosterische Antagonist Paroxetin (Abb. 127) zeigte am humanen P2X4-Rezeptor und an allen funktionellen P2X4(P2X2)-Rezeptoren ähnliche inhibitorische Potenzen.

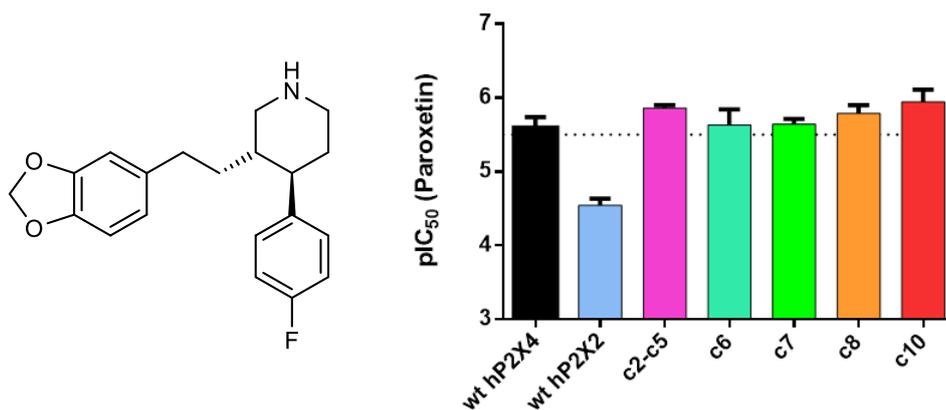


Abbildung 127: Chemische Struktur und inhibitorische Potenzen des allosterischen Antagonisten Paroxetin an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren im Vergleich zum wt hP2X₄-Rezeptor.

Paroxetin geht demnach keine Interaktionen mit den variablen Regionen v2-v5, v6, v7,

v8 und v10 ein. Die Lage der Bindungsstelle ist weiterhin unbekannt.

Im Gegensatz dazu konnten drei variable Regionen (v6, v7 und v8) identifiziert werden, die vermutlich eine Rolle bei der positiven allosterischen Modulation durch Ivermectin (Abb. 128) spielen. An den betreffenden Rezeptoren **c6**, **c7** und **c8** kam es anstatt zur Potenzierung durch Ivermectin zur Inhibition. Diese Ergebnisse deuten auf das Vorhandensein mehrerer Bindungsstellen für Ivermectin hin, die jeweils hemmende bzw. potenzierende Effekte vermitteln. Zur endgültigen Festlegung der an den Wechselwirkungen mit Ivermectin beteiligten Aminosäurereste wären weitere experimentelle Studien, beispielsweise in Form von zielgerichteter Mutagenese (Asn208, Ile209, Thr223, Phe225, Leu269 und Leu271) innerhalb der Bereiche v6, v7 und v8 oder auch die Bildung gegensätzlicher Rezeptor-Chimären (v6, v7 und v8 aus dem humanen P2X4-Rezeptor in den humanen P2X2-Rezeptor einsetzen) hilfreich.

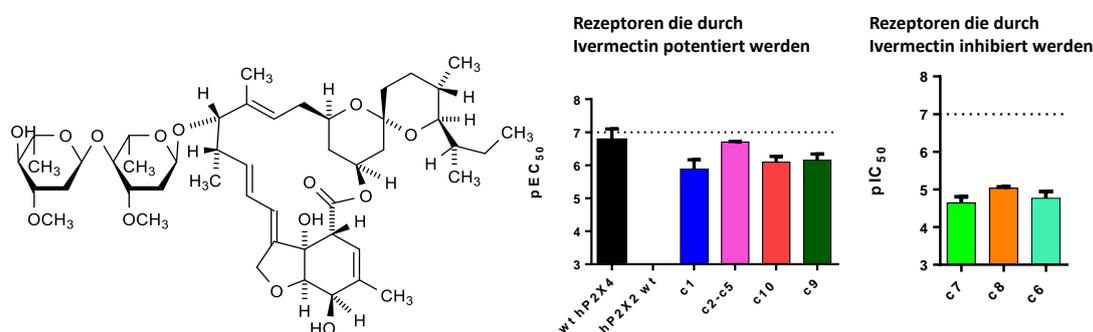


Abbildung 128: Struktur und positive bzw. negative modulatorische Potenzen des allosterischen Modulators Ivermectin an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren im Vergleich zum wt hP2X₄-Rezeptor.

Der gegenüber anderen P2X-Subtypen selektive allosterische Antagonist **BX430** (Abb. 129) zeigte wie Ivermectin ebenfalls Wechselwirkungen mit Aminosäureresten der variablen Region **v6**.

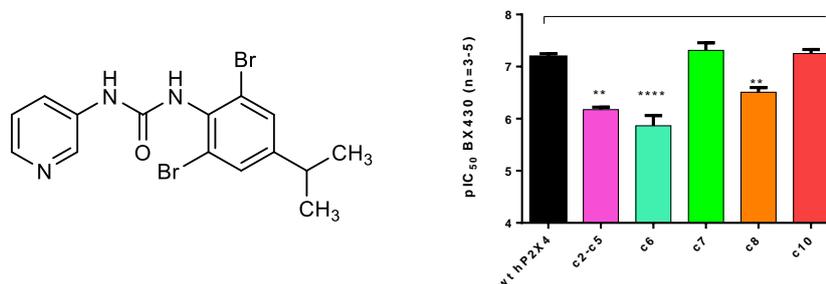


Abbildung 129: Chemische Struktur und inhibitorische Potenzen des allosterischen P2X₄-Rezeptor-Antagonisten **BX430** an chimären P2X₄(P2X₂)-Rezeptoren im Vergleich zum wt hP2X₄-Rezeptor.

An der Chimären **c6** zeigte sich eine 50-fache Erhöhung des IC_{50} -Wertes der Verbindung. Durch Docking-Studien konnte **Ile 209** in der variablen Region v6 als wichtigster Aminosäurerest für die Bindung von **BX430** im humanen P2X4-Rezeptor identifiziert werden. An P2X4-Rezeptoren der Ratte und der Maus war **BX430** deutlich weniger potent. Die IC_{50} -Werte waren 40-fach erhöht am Rattenrezeptor und 4-fach am Rezeptor der Maus. Ein Alignment der variablen Region **v6** der P2X4-Rezeptoren von Maus, Ratte und Mensch ergab einen Unterschied in einem einzigen Aminosäurerest. Der Threoninrest im humanen P2X4-Rezeptor ist in den P2X4-Rezeptoren von Maus und Ratte gegen einen Serinrest ausgetauscht. Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, warum die inhibitorische Potenz von **BX430** an den Nagetierrezeptoren im Vergleich zum humanen P2X4-Rezeptor reduziert ist. Genauerer Aufschluss kann die Mutagenese der Position 212 im humanen P2X4-Rezeptor von Threonin zu Serin geben und umgekehrt in den Nagetier-Rezeptoren von Serin zu Threonin.

Interaktionen von Aminosäureresten im variablen Bereich v2-v5 der Rezeptor-Kopfdomäne mit Metallkationen konnten nur für Zn^{2+} bestätigt werden, wobei die Richtung der allosterischen Modulation am humanen P2X4-Rezeptor, entgegen der am Rattenrezeptor, ausschließlich hemmend war. Insbesondere die Aminosäurereste **K127**, **N142** und **G138** scheinen in die Interaktion mit Zn^{2+} involviert zu sein, wobei eine direkte Interaktion mit **N142** und **G138** unwahrscheinlich ist, da die entsprechenden Aminosäurereste nach dem HSAB-Konzept keine besondere Präferenz für Zink-Kationen besitzen. Ergänzend sind Interaktionen mit der variablen Region v6 wahrscheinlich. Eine direkte Interaktion von Zn^{2+} -Kationen mit Lysinresten bei der Vermittlung einer negativen allosterischen Modulation ist dagegen möglich.¹¹⁹ Es konnten keine Interaktionen der Kopfdomäne mit Cu^{2+} -Kationen festgestellt werden.

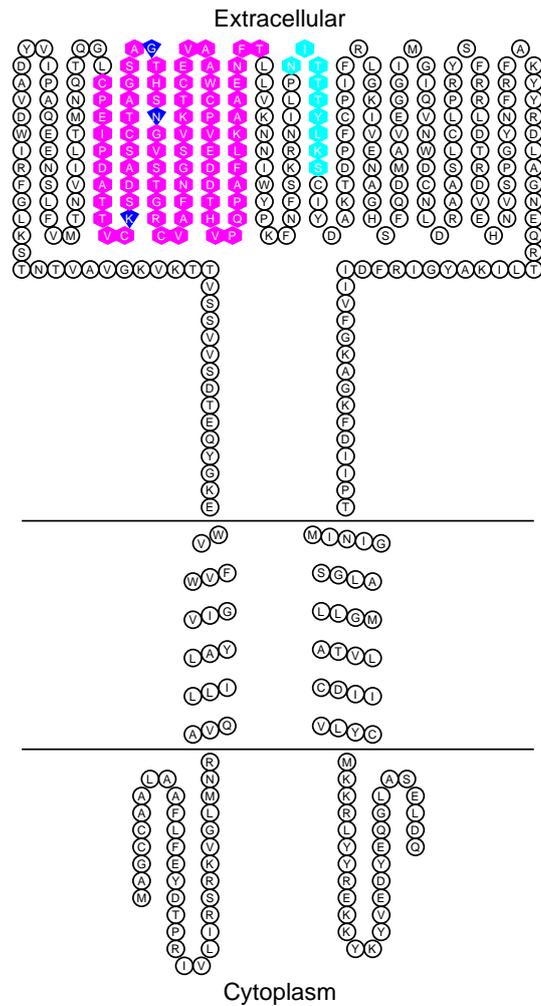


Abbildung 130: Snake-like-Plot des humanen *P2X4*-Rezeptors. Die Kopfdomäne, die in der Chimäre c2-c5 gegen die entsprechende Sequenz des humanen *P2X2*-Rezeptors ausgetauscht wurde, ist farblich in pink gekennzeichnet. Blau eingefärbte Aminosäurereste scheinen an der Interaktion mit Zn^{2+} -Kationen beteiligt zu sein.

Eine neue allosterische Bindungsstelle konnte innerhalb der variablen Bereiche v1 und v10 identifiziert werden. Hier binden die an humanen *P2X2*- und *P2X4*-Rezeptoren relativ schwach wirksamen Anthrachinon-Derivate. An der Rezeptorchimäre *P2X4*(*P2X2*)-c10 zeigten Cibachron Blue und verwandte Derivate deutlich erhöhte Potenzen mit IC_{50} -Werten teilweise im niedrigen nanomolaren Bereich. Die potentesten Verbindungen stellten PSB-0739 (IC_{50} 0,00341 μ M) und Cibacron Blue (IC_{50} 0,00476 μ M) dar (Abb. 131).

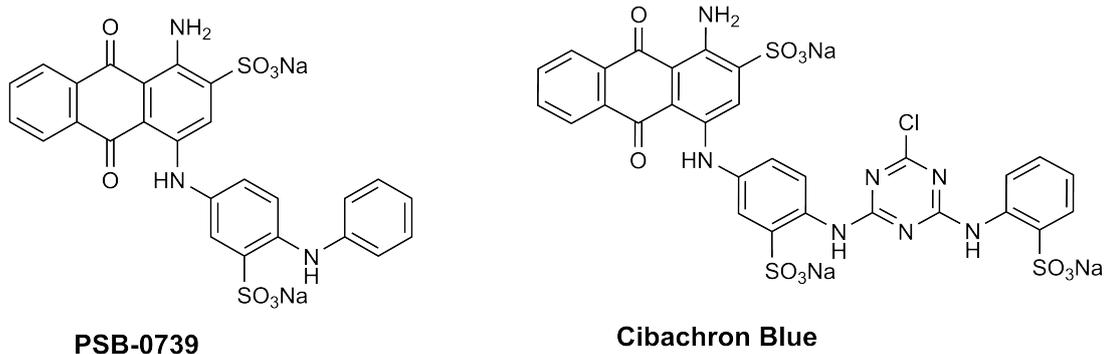


Abbildung 131: Chemische Strukturen der allosterischen Antagonisten PSB-0379 und Cibacron Blue.

Computersimulationen und darauf basierende zielgerichtete Mutagenese ermöglichten die Identifizierung der an der Bindungsstelle beteiligten Aminosäurereste in den Bereichen v1 (**R82**, **K78**) und v10 (**R301**, **T307**). Danach erscheinen die Länge des Loops in v1 sowie die Abwesenheit intermolekularer Interaktionen zwischen **R301** und **T307** als ursächlich für die hohe Aktivität an dem chimären Rezeptor **c10**. Die Einführung einer einzelnen Mutation zu Threonin in Position 307 des humanen P2X4-Rezeptors lieferte einen Rezeptor mit hoher Cibacron Blue-Affinität. Für weiterführende Projekte, z.B. die Lösung einer Kristallstruktur des P2X4-Rezeptors im Komplex mit einem allosterischen Liganden, stehen damit zahlreiche potente und wasserlösliche Verbindungen zur Verfügung.

Eine Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen an der P2X4**E307T**-Mutante ergab Erkenntnisse über relevante Strukturbestandteile und führte zur Identifizierung einer Verbindung (**PSB-0704**, Abb. 132), die 20-60-fache Selektivität gegenüber P2Y-Rezeptoren zeigt. Interessant wäre zukünftig die Synthese des *Des*-Amino-Derivats von

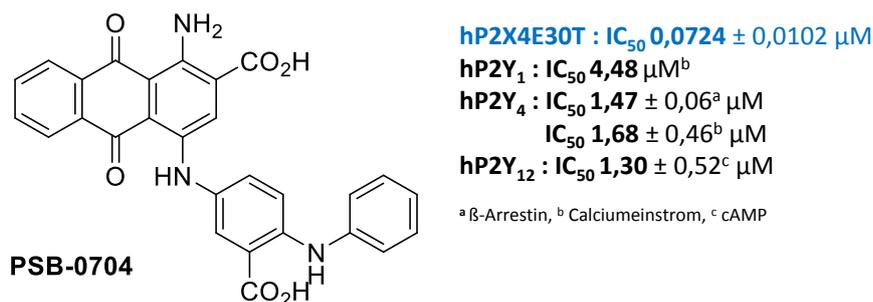


Abbildung 132: Chemische Struktur und Potenzen des allosterischen Antagonisten PSB-0704 an der Mutante hP2X4E307T im Vergleich zu den hP2Y-Rezeptoren.

PSB-0704 (Abb. 133) mit der Möglichkeit zur weiteren Erhöhung der Selektivität, da die Aminogruppe für die Bindung an den P2X4-Rezeptor, im Gegensatz zur Bindung an die P2Y-Rezeptoren, nicht erforderlich ist.

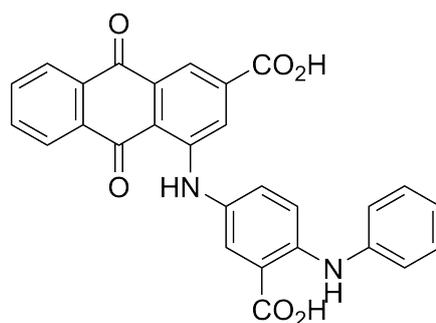


Abbildung 133: *Chemische Struktur des Des-Amino-Derivats von PSB-0704.*

Interaktionen mit den variablen Regionen **v1** und **v9** konnten bisher aufgrund der fehlenden Funktionalität der entsprechenden Rezeptorchimären nicht untersucht werden.

12.4 Fazit

Durch Herstellung und Untersuchung von P2X₄(P2X₂)-Rezeptorchimären und mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese ist es gelungen, allosterische Bindungsstellen für bekannte und neue positive und negative allosterische Modulatoren (PAMs und NAMs) des humanen P2X₄-Rezeptors zu identifizieren. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf die Existenz mehrerer allosterischer Bindungsstellen im Bereich der extrazellulären Domäne des humanen P2X₄-Rezeptors hin, was die Vielseitigkeit der P2X-Rezeptoren als „Drug Targets“ verdeutlicht. Eine Zusammenfassung aller potentiellen Bindungsstellen zeigt Abbildung 134. Mit **BX430** und den Metall-Kationen **Cu²⁺** und **Zn²⁺** konnten für einige allosterische Modulatoren speziesspezifische Unterschiede, einerseits was die Potenzen (**BX430**) und andererseits was die Richtung der allosterischen Modulation und die Lage der Bindungsstellen (Metallkationen) angeht, gezeigt werden. In Hinblick darauf sollten in der Literatur bereits beschriebene Bindungsstellen für allosterische Modulatoren an P2X-Rezeptoren sehr genau überprüft werden, stammt doch der Großteil der Daten lediglich aus Experimenten an Rattenrezeptoren. Unterschiede zu humanen P2X-Rezeptoren, auch in Bezug auf die Lage der Bindungsstellen, können demnach nicht ausgeschlossen werden und müssen individuell überprüft werden, speziell was die Modulation durch Kationen betrifft.

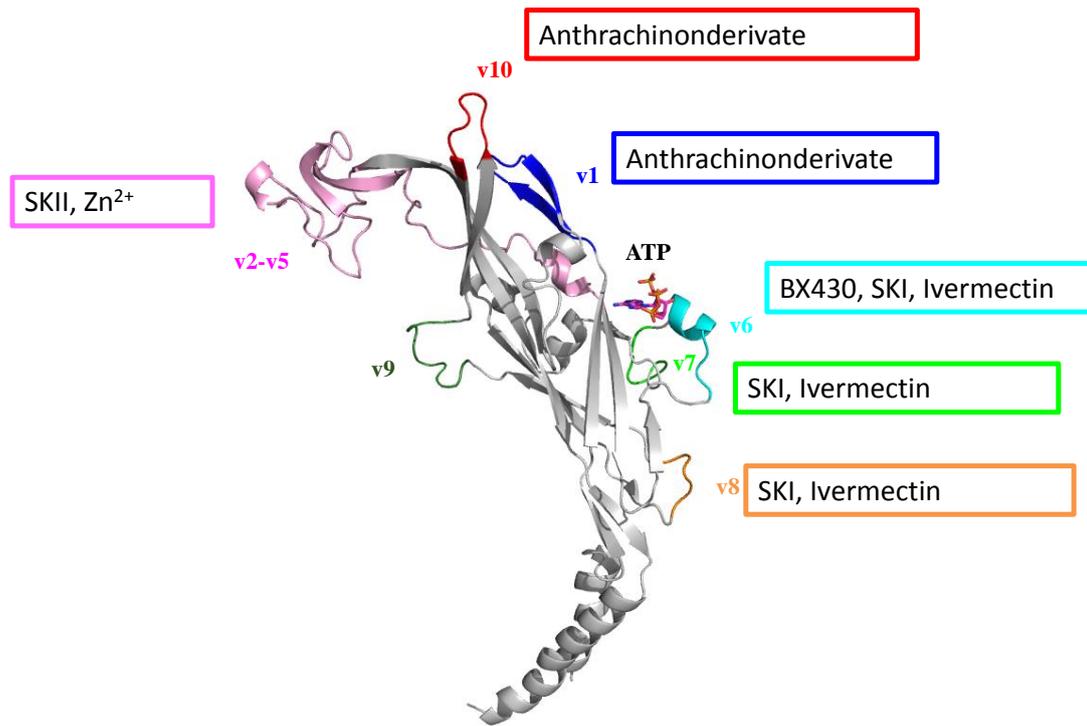


Abbildung 134: Zusammenfassung potentieller Bindungsstellen neuer und bekannter *P2X₄*-Rezeptormodulatoren. (*SK*=Strukturklasse, Strukturen unterliegen aus patentrechtlichen Gründen noch der Geheimhaltung).

Die erhaltenen Ergebnisse können dazu beitragen, die Entwicklung neuer Arzneistoffe, nicht nur für *P2X₄*-Rezeptoren, sondern darüber hinaus für weitere *P2X*-Rezeptor-Subtypen entscheidend voranzutreiben.

13 Experimenteller Teil

13.1 Material und Geräte

Analysenwaage	Mettler Toledo, XA205D4
Autoklav	Systeme VX-95
Autoklavierbeutel	Sarstedt, 861200
Brutschrank	Memmert INCO 246
Bakterienröhrchen	Sarstedt
Bakterienschüttler	Innova 4200 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, USA
Einmalspritzen 5 ml, 20 ml	Braun
Eppendorfgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Eppendorfgefäße 2 ml	Axygen Scientific, Union City
Falcon 15 ml/50 ml	Sarstedt
Fluorimeter	Novostar BMG, Flex Station Molecular devices
Foto-Dokumentations- system	Geldoc, BioRad
Gefrierschrank -80 °C	New Brunswick Scientific (USA), U725-86 EU-20°C Bosch
Gelelektrophoresekammer	BioRad, Mini Protean II™ Schütt Labortechnik Novex Mini-Cell, Invitrogen
Elektrophorese-Netzgerät	Power Pac 300 Schütt Labortechnik Power Pac, Universal, Bio Rad
Halbmikroküvetten	Cuvettes 10 × 4 × 45 mm, Sarstedt
Heizgerät	Thermomixer comfort, Eppendorf Heidolph MR 3001
Kryovials, steril	Sarstedt
Magnetrührer und Heizplatte	IKA Labortechnik, RCT Basic
Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Mikro-Assayplatte	Corning® 3340 CellBind 96 Well plates, steril
Mikrotestplatte	Rotilabo® microtest plates, V profile, 96 Well Carl Roth GmbH Co. KG
Mikrowelle	Microwave 800, Severin
Minivials C	Roth
Multipette	Eppendorf, Multipette Plus
Multipettenaufsätze	Medicinal care, Ritips professional 1,0/5,0

Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Germany
Petrischalen	Sarstedt
pH-Meter	Metrohm, 691 pH Meter
Photometer	Beckmann, DU 530
Pipetten	Eppendorf, 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l
Pipettenspitzen	Brand, Greiner Plastibrand®
Pipettierhilfen	Pipettus Akku, Eppendorf Accu Jet, Brand
Quarzküvetten	Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL®, 10 mm, Hellma®, 101.150-QS
Reservoir, nicht steril	50 ml, VWR International GmbH
Reservoir, steril	50 ml, VWR International GmbH
Serologische Einmalpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, steril, Sarstedt
Software	BLAST® Protein Alignment ChemDraw, Cambridgesoft Clone Manager, Version 9 DNA Translator 2.0, Dr. Schiedel/J. Bosmann GraphPad Prism® Version 4.0, 6.0 San Diego, CA,USA, Microsoft Excel, Version Office 2007, GOLD Version 5.01 Chromas Version 1.45, Conor McCarthy OligoAnalyser 3.1, IDT, Scitools
Sterilfilter	Filtropur 0,22 μ m, Sarstedt
Thermocycler	Px2 Thermal Cycler, Thermo Scientific Biometra
Thermomixer	HeizThermoMixer MHR 23, Eppendorf thermomixer confert
Vortexer	2x3, UniEquip MS2 Minishaker, IKA Labortechnik
Ultraschallbad	Bandelin electronic
Ultrazentrifuge	SW 55Ti (Rotor), Beckman Coulter
Waage	SBC 42, SCALTEC
Wägeschalen	Roth
Werkbank	Laminar-Air-Flow NUNC® Safe flow 1.2 NUNC® BIOFLOW
Zellkulturflaschen	175 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ² , steril, Sarstedt
Zellkulturschalen	175 cm ² , steril, Sarstedt
Zellkulturplatte 96-Well, steril	Greiner Bio-one GmbH
Zellstoff	Labomedic
Zentrifuge	Allegra™ 21 R, Beckman Coulter Avanti™ J-201, Beckman BIOFUGE pico, HeraeusRotofix 32, Hettich
Zentrifugenröhrchen	Ultra-Clear® Tubes, Beckman

13.2 Chemikalien

Agarose	Lonza
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem
BSA	AppliChem
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Fluka; Sigma Aldrich
di-Natriumtartrat-Dihydrat	Appllichem
di-Natriumhydrogenphosphat	Appllichem
D-(+)-Glucose (wasserfrei)	Sigma Aldrich
DMSO	Roth
DMSO, steril	AppliChem
EDTA	Sigma Aldrich
Ethanol, p.A.	Merck
Ethanol, technisch	ZVE Bonn-Endenich
Fluo-4 AM cell permanent dye	10 x 50 μ g Invitrogen GmbH
Folin-Reagenz	Sigma Aldrich
G418	AppliChem
Glycerol	Acros
Isopropanol	ZVE Bonn-Endenich
Kaliumchlorid	Appllichem
Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Kanamycin	Sigma Aldrich
Kupfersulfatpentahydrat	Appllichem
LB-Agar	Roth
LB-Medium	Roth
Magnesiumchlorid	Fluka BioChemika; Sigma Aldrich
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich
Natriumbutyrat	Alfa Aesar
Natriumcarbonat	Appllichem
Natrium-dihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natronlauge	Fluka
Phenolrot	Sigma Aldrich
Pluronic® F-127	Sigma Aldrich
Polybren	Sigma Aldrich
Salzsäure 37 %	Sigma Aldrich
TRIS	Roth

13.3 Zellkulturmedien und -zusätze

DMEM-Medium, Invitrogen

FCS (Fötale Kälberserum), Sigma Aldrich

Penicillin-Streptomycin (10 000 I.E./ml, 10 mg/ml), Invitrogen

13.4 Enzyme

13.4.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Hersteller	Schnittstelle	Arbeitsbedingungen
NotI HF	NEB	5'-GC/GGCCGC-3'	Puffer 4, BSA, 37 °C
StuI	NEB	5'-AGG/CCT-3'	Puffer 4, 37 °C
EcoRI HF	NEB	5'-G/AATTC-3'	Puffer 4, 37 °C
XbaI	NEB	5'-T/CTAGA-3'	Puffer 4, BSA, 37 °C
DpnI	NEB	5'-GAm ^e t/TC-3'	Puffer 4, 37 °C
SacII	NEB	5'-CCGC/GG-3'	Puffer 4, 37 °C
BamHI HF	NEB	5'-GGA/TCC-3'	Puffer 4, 37 °C

13.4.2 Sonstige Enzyme

Enzym	Hersteller
KOD Hot Start DNA-Polymerase	Novagen
T4 Ligase	NEB
T4 DNA-Polymerase	NEB
Pyrobest DNA-Polymerase	Takara

13.5 Nukleinsäuren und Nukleotide

13.5.1 Nukleotide

dNTPs (2 mM jeweils), Novagen

ATP, AppliChem

13.5.2 Plasmide

pUC 19, Clontech

pQCXIN-hP2X4 (Das hP2X4-Fragment wurde von Sonja Hinz in den Vektor eingebracht)

pLVX-IRES-mCherry, Clontech

13.5.3 Primer

Mutageneseprimer s.h 13.12.11

Sequenzierungsprimer (GATC-Archiv)

13.5.4 Marker

Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, Fermentas

13.6 Zusätze für die lentivirale Transfektion

Tet-approved FCS, Clontech

Xfect Reaction Buffer, Clontech

Xfect Polymer, Clontech

Lenti-X HTX Packaging-Mix, Clontech

13.7 Kits

ZR Plasmid MiniprepTM-Classic Kit, Zymo Research

ZymocleanTM Gel DNA-Recovery Kit, Zymo Research

DNA Clean & ConcentratorTM Kit, Zymo Research

FLIPR Calcium 4 Assay Kit, Molecular Devices

PureLink[®] HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit, Invitrogen

13.8 Zellen

One Shot[®] TOP 10 Chemically Competent E.coli, Invitrogen

Lenti-XTM 293T Zell-Linie, Clontech

1321N1 humane Astrozytom-Zellen

13.9 Herstellung von Puffern und Lösungen

13.9.1 Lösungen und Puffer für die fluorimetrische Calciumbestimmung

HBSS-Puffer (pH 7,3)

Komponente	mg/L	mM
Hepes	4766	20
NaCl	8000	137
Glucose	1000	5,55
MgSO ₄	92	0,765
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	186	1,265
NaHCO ₃	350	4,17
KCl	400	5,366
K ₂ HPO ₄	77	1,47
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	49	0,318

Pluronic[®] -Stocklösung

200 mg Pluronic[®] -Feststoff wurden in 800 μ l DMSO angesetzt. Das Gemisch wurde etwa 30 Minuten bis zur vollständigen Lösung im Ultraschallbad behandelt.

Fluo-4[®] -Farbstofflösung

Ein Röhrchen des Farbstoffs wurde in 46,9 μ L DMSO gelöst und in Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden vor Licht geschützt bei -20 °C gelagert.

13.9.2 Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie

TAE-Puffer (50X)

242 g TRIS (2 M), 14,61 g EDTA (50 mM) und 57,1 ml Eisessig wurden mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Der Puffer wurde autoklaviert und vor Gebrauch verdünnt.

TENS-Lösung

Zur Herstellung von 500 ml TENS-Lösung wurden 50 ml einer 100 mM TRIS-Lösung mit 50 ml einer 10 mM EDTA-Lösung gemischt. Der Ansatz wurde mit deionisiertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Für die Herstellung von 50 ml 100 mM TRIS wurden 605 mg TRIS in 45 ml deionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit deionisiertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Zur Herstellung von 50 ml 10 mM EDTA wurden 146 mg EDTA mit 45 ml Wasser versetzt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 8 eingestellt. Die beiden Lösungen wurden ver-

einigt und 12,5 ml 20 %-ige SDS-Lösung und 50 ml 1 N Natronlauge hinzugegeben.

6X Gel-Ladepuffer

Für die Herstellung des 6x Gel-Ladepuffers wurden 25 mg Bromphenolblau (0,25 %) in einer Mischung aus 5 ml Glycerin und 5 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

EDTA-Lösung (100 mM)

Zur Herstellung wurde eine entsprechende Menge an EDTA in deionisiertem Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 8 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

13.9.3 Lösungen und Puffer für die Zellkultur

Natriumbutyrat-Lösung (500 mM)

Zur Herstellung wurden 55,05 mg Natriumbutyrat in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

PBS

Es wurden 8,0 g NaCl (150 mM), 0,2 g KCl (2,5 mM), 1,3 g Na₂HPO₄ (7,5 mM) und 0,2 g KH₂PO₄ (1,5 mM) in 1 Liter deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der Puffer autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Polybren-Lösung (4 mg/ml)

Zur Herstellung wurden 20 mg Polybren in 5 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Trypsin-EDTA-Lösung

0,6 ml einer 0,5 mM EDTA-Stammlösung wurden mit 500 ml PBS zwanzig Minuten bei 120 °C autoklaviert und abgekühlt. Anschließend wurden unter der Werkbank 10 ml einer sterilfiltrierten 2,5 %-igen Trypsinlösung und 1,5 ml einer sterilfiltrierten 0,5 %-igen Phenolrotlösung hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

13.10 Herstellung von Kulturmedien für Bakterien

13.10.1 LB-Medium

Zur Herstellung von 1 Liter LB-Medium wurden 25 g der LB-Fertigmischung in 1000 ml Wasser gelöst. Das fertige Medium wurde autoklaviert und nach Anbruch bei 4 °C gelagert.

13.10.2 SOC-Medium

Zur Herstellung von 100 ml an SOC-Medium wurden 2 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 0,05 g Natriumchlorid, 18,6 mg Kaliumchlorid sowie 0,5 ml einer 2 M Magnesiumchloridlösung vermischt und mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden 2 ml einer sterilfiltrierten 1 M Glucoselösung hinzugefügt. Das Medium wurde bis zum Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

13.10.3 Herstellung von LB-Agar-Platten

Es wurden 32 g der LB-Agar-Fertigmischung in 1 l deionisiertem Wasser gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C und dem Zusatz des gewünschten Antibiotikums wurde die Lösung in Petrischalen (10 cm Durchmesser) gegossen. Nach dem Erstarren der Lösung wurden die Platten luftdicht bei 4 °C gelagert.

13.11 Zellkultur

13.11.1 Zellen auftauen

Eine Zellkulturflasche T 25 wurde mit 5 ml DMEM und den Zusätzen 10 % FCS (0,1 μ M) und 1 % PenStrep (10000 U/ml Pencillin, 10 mg/ml Streptomycin) vorbereitet. Die gewünschten Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 °C angetaut. Die Zellsuspension wurde in die Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

13.11.2 Zellen splitten

Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Trypsin-EDTA-Lösung, das PBS und das Medium angewärmt. Das Medium der bewachsenen Flasche wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen von der Flasche wurde Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Flaschen 1-2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde Medium zugegeben und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Abhängig von dem gewünschten Verhältnis wurden die Zellen auf neue, mit Medium vorbereitete Flaschen verteilt. Die fertig gesplitteten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

13.11.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden die Zellen wie oben beschrieben gesplittet und in ein Falcon-Tube überführt. Das Gefäß wurde bei 1000 g 5 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Gemisch aus 90 % FCS und 10 % DMSO resuspendiert und jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden für 2 h bei -20 °C, dann 24 h bei -80 °C und anschließend im Stickstofftank gelagert.

13.12 Molekularbiologische Methoden

13.12.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1 %-igen großen Gels wurden 0,6 g Agarose angewogen und mit 60 ml TAE-Puffer versetzt. Das Gemisch wurde bis zur vollständigen Lösung in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 3 μl GelRed[®] hinzupipettiert und das Gemisch in einen mit einem Kamm ausgestatteten Gelschlitten geschüttet. Nach dem Erstarren des Gels und der Entfernung des Kamms wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden nun mit 6X Gel-Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Nach Anlegung einer 100 V Spannung wurde das Gel ca. 40 Minuten laufen gelassen. Unter Nutzung eines GelDoc[®]-Systems wurden die erhaltenen Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel zu Dokumentationszwecken fotografiert.

13.12.2 Reinigung von DNA über Agarosegel

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel wurde eine Gelelektrophorese gemäß der Vorschrift in 13.12.1 durchgeführt. Die erhaltenen Banden des gewünschten Fragmentes wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und gemäß dem Protokoll des ZymocleanTM Gel DNA-Recovery Kits (vgl. 13.7) gereinigt.

13.12.3 Reinigung des Vektorfragmentes

Die Reinigung der Vektorfragmente erfolgte gemäß dem Protokoll des DNA Clean & ConcentratorTM Kits (vgl. 13.7).

13.12.4 Identifikation positiver Klone

Zur Identifikation möglicher erfolgreich mutierter Klone wurde ein Restriktionsverdau und anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 13.12.1) durchgeführt. Anhand der Fragmentanzahl und -größe wurden Klone ausgewählt und zum Sequenzieren geschickt.

2 μl DNA
2 μl 10X Puffer 4
1 μl Enzym 1
1 μl Enzym 2
14 μl H ₂ O
<hr/>
20 μl / Ansatz

13.12.5 Subklonierung von Rezeptor-DNA in den pUC19-Vektor

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurde das hP2X4-Rezeptor-Gen aus dem pQXIN-Vektor in den kleineren pUC19-Vektor umkloniert. Dafür wurde ein Restriktionsverdau nach folgendem Ansatz durchgeführt: Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C

pQXCINhP2X4

52 μ l DNA
 6 μ l 10X Puffer 4
 1 μ l EcoRI
 1 μ l XBaI

60 μ l/ Ansatz

pUC19

20 μ l DNA
 3 μ l 10 X NEB-Puffer 4
 5 μ l H₂O
 1 μ l EcoRI
 1 μ l XBaI

30 μ l/ Ansatz

inkubiert. Das erhaltene pUC19-Vektorfragment wurde über das DNA Clean & ConcentratorTM Kit (vgl. 13.7), das hP2X4-Fragment über ein Agarosegel (vgl. 13.12.1) und das ZymocleanTM Gel DNA-Recovery Kit gereinigt. Die Ligation wurde wie in Abschnitt 13.12.8 beschrieben durchgeführt.

13.12.6 Subklonierung der Mutageneseklonen in den pUC19hP2X4-Ursprungs- klon

Da bei der durchgeführten zielgerichteten Mutagenese neben der erwünschten Mutation teilweise weitere unerwünschte Mutationen auftraten, wurden alle erfolgreich mutierten Rezeptorgene in den Ursprungsklon rückkloniert und erneut sequenziert. Dies geschah nach dem folgendem Ansatz:

Mutanten

25 μ l DNA
 3 μ l 10X Puffer 4
 1 μ l NotI
 1 μ l StuI

30 μ l/ Ansatz

pUC19hP2X4

2 μ l DNA
 3 μ l 10 X NEB-Puffer 4
 21 μ l H₂O
 1 μ l NotHF
 1 μ l StuI

50 μ l/ Ansatz

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und 10 Min. auf 65 °C erhitzt. Nach Eiskühlung wurde der Reaktionsansatz über das DNA Clean & ConcentratorTM Kit (vgl.

13.7) gereinigt. Die Ligation erfolgte gemäß dem Abschnitt 13.12.8.

13.12.7 Klonierung der Mutagenesekclone in den pLVX-IRES-mCherry-Vektor

Die erfolgreich mutierten hP2X4-Rezeptor-Gene wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, anschließend wurde eine Auffüllreaktion durchgeführt und letztendlich ein Restriktionsverdau mit NotI durchgeführt. Das erhaltene Fragment wurde über ein Agarose-Gel gereinigt. Dies geschah nach dem folgenden Protokoll:

Mutanten

30 μ l DNA (ca. 10 μ g)
5 μ l 10 X NEB-Puffer 4
10 μ l H₂O
5 μ l EcoRI

50 μ l/ Ansatz

pLVX-IRES-mCherry-Vektor

20 μ l DNA (ca. 10 μ g)
5 μ l 10 X NEB-Puffer 4
20 μ l H₂O
5 μ l BamHI

50 μ l/ Ansatz

Der Ansatz wurde 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend das Enzym 20 Min. bei 65 °C inaktiviert.

Die Auffüllreaktion wurde sowohl für die Mutanten als auch für den Vektor folgendermaßen durchgeführt:

50 μ l DNA-Lösung
5 μ l dNTPs (2mM)
10 μ l BSA
2,5 μ l T4 DNA-Polymerase (3U/ μ l)
32,5 μ l H₂O

100 μ l/ Ansatz

Der Ansatz wurde 15 Min. bei 12 °C inkubiert. Anschließend wurden 11 μ l EDTA (100 mM) hinzugegeben und der Ansatz 20 Min. bei 70 °C inkubiert. Nach Eiskühlung wurde der Reaktionsansatz über das DNA Clean & ConcentratorTM Kit (vgl. 13.7) gereinigt. Im weiteren Verlauf wurden 40 μ l der gereinigten DNA-Lösungen nach folgendem Protokoll verdaut:

40 μl DNA-Lösung (ca. 10 μg)
5 μl 10 X NEB-Puffer 4
5 μl NotHF
50 μl / Ansatz

Der Ansatz wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente der Mutageneseklonen über das ZymocleanTM Gel DNA-Recovery Kit, das Vektorfragment dagegen über das DNA Clean & ConcentratorTM Kit (vgl. 13.7) aufgereinigt. Die Ligation wurde wie in Abschnitt 13.12.8 beschrieben durchgeführt.

13.12.8 T4-Ligase vermittelte Ligation

Für die Verknüpfung des linearisierten pUC19-EcoRI/XbaI-Vektorfragments und des Rezeptor-Gens (hP2X4-EcoRI/XbaI-Fragment) wurde der folgende Ligationsansatz gewählt:

6 μl H ₂ O
2 μl 10 X Ligase-Puffer
1 μl ATP
10 μl hP2X4-EcoRI/XbaI-Fragment
1 μl pUC19-EcoRI/XbaI-Vektorfragment
1 μl T4-Ligase
20 μl / Ansatz

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 Min. bei 65 °C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Als Negativkontrolle wurde eine weitere Ligation ohne Zusatz des hP2X4-EcoRI/XbaI-Fragments durchgeführt.

Für die Ligation der pUC19-hP2X4-NotI/StuI-Vektorfragmentes und des Mutageneseklon-NotI/StuI-Fragmentes wurde der folgenden Ligationsansatz gewählt:

7 μl H ₂ O
2 μl 10 X Ligase-Puffer
9 μl Mutageneseklon-NotI/StuI-Fragment
1 μl pUC19-hP2X4-NotI/StuI-Vektorfragment
1 μl T4-Ligase
20 μl / Ansatz

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 Min. bei 65 °C. Der gleiche Ansatz wurde zur Ligation des pLVX-IRES-mCherry-EcoRI/NotI-Fragmentes und des Mutageneseklon-EcoRI/NotI-Fragmentes gewählt.

13.12.9 Umklonierung chimärer P2X4(P2X2)-Rezeptoren aus dem pMK-RQ-Vektor in den pLVX-IRES mCherry-Vektor

Die chimäischen P2X4(P2X2)-Rezeptoren wurden von der Firma Invitrogen im pMK-RQ-Vektor geliefert und müssten für die lentivirale Transfektion in den pLVX-IRES mCherry-Vektor kloniert werden. Dafür wurde das nachfolgende Protokoll durchgeführt.

14 μ l H ₂ O
2 μ l 10 X Cut Smart Puffer
2 μ l chimäische P2X4(P2X2)-Rezeptor DNA
1 μ l EcoRI
1 μ l BamHI
<hr/>
20 μ l/ Ansatz

14 μ l H ₂ O
2 μ l 10 X Cut Smart Puffer
2 μ l pLVX-IRES mCherry Vektor-DNA
1 μ l EcoRI
1 μ l BamHI
<hr/>
20 μ l/ Ansatz

Die Ansätze wurden jeweils 1h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Rezeptor-DNA-Fragment über das ZymocleanTM Gel DNA-Recovery Kit, das Vektor-DNA-Fragment dagegen über das DNA Clean & ConcentratorTM Kit (vgl. 13.7) aufgereinigt. Nachfolgend wurden die erhaltenen Fragmente wie in Absatz 13.12.8 beschrieben ligiert und in kompetente E.coli Bakterien transformiert (vgl. 13.12.10).

13.12.10 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien

Herstellung

5 ml antibiotikafreies LB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie oder 20 μ l E. coli-Kultur angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2,5 ml der Übernachtskultur mit 500-1000 ml LB-Medium versetzt und weiterhin bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert. Nach 15-minütiger Ruhe auf Eis wurde die Kultur 15 min. bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 125 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei oben genannten Bedingungen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Erneut wurde bei gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem Gemisch aus 0,1 M CaCl₂-Lösung und 15 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Das Resuspendat wurde

zu 100 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die fertigen kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Transformation

100 μ l an kompetenten Zellen wurden aufgetaut und auf Eis gestellt. Eine ausgewählte Menge an zu transformierender Plasmid-DNA wurde zupipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C und ein erneutes Ruhen des Transformationsansatzes auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB- oder SOC-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Eine ausgewählte Menge an DNA wurde auf selektiven Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

13.12.11 Gezielte Mutagenese des P2X4-Rezeptors und der Chimäre c10

Für die Durchführung der zielgerichteten Mutagenese wurden Primer definiert, die den gewünschten Basenaustausch enthalten. Zusätzlich wurden die ausgetauschten Basen von jeweils 12-15 komplementären Basen flankiert, damit die Primersequenz an die DNA-Sequenz binden kann. Die Primersequenzen wurden im Programm *Oligo-Analyzer 3.1* auf mögliche Hairpin-Bildung und Selbstdimerisierung untersucht. Die fertig definierten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle 46 aufgelistet. Die ausgetauschten Sequenzen sind fett gedruckt.

Tabelle 46: *Mutageneseprimer*

Mutation	Primer
D121A	f-5'-GCCCCGAGATTCCAG C CGCGACCACTGTGTGT-3' r-5'-ACACACAGTGGTCG G GCTGGAATCTCGGGGC-3'
K127A	f-5'-GCGACCACTGTGTGT G CCTCAGATGCCAGCTGT-3' r-5'-ACAGCTGGCATCTGAG G CACACACAGTGGTCCG-3'
D129A	f-5'-CTGTGTGTAAATCAG C CGCCAGCTGTACTGCC-3' r-5'-GGCAGTACAGCTGG C GCTGATTTACACACAG-3'
S131A	f-5'-GTGTAAATCAGATGCC G CCTGTACTGCCGGCTC-3' r-5'-GAGCCGGCAGTACAG G CGGCATCTGATTTACAC-3'
T133A	f-5'-TCAGATGCCAGCTGT G CCGCCGGCTCTGCCGG-3' r-5'-CCGGCAGAGCCGG C GCACAGCTGGCATCTGA-3'
G138A	f-5'-CTGCCGGCTCTGCC G CCACCCACAGCAACGG-3' r-5'-CCGTTGCTGTGGGT G CGGCAGAGCCGGCAG-3'
H140A	f-5'-GCTCTGCCGGCACC G CCAGCAACGGAGTCTCAA-3' r-5'-TTGAGACTCCGTTGCT G GCGGTGCCGGCAGAGC-3'
N142A	f-5'-GCCGGCACCCACAG C CGGAGTCTCAACAGGC-3' r-5'-GCCTGTTGAGACTCC G GCGCTGTGGGTGCCGGC-3'
E307T	f-5'-CAGAGACCTGGCTGGCAACACACAGCGCACGCTCATCAAG-3' r-5'-CTTGATGAGCGTGCGCTGT G TGTTGCCAGCCAGGTCTCTG-3'
D302I	f-5'-CCAAGTACTACAGAAT C CTGGCTGGCAACG-3' r-5'-CGTTGCCAGCCAG G ATTCTGTAGTACTTGGC-3'
Q308A	f-5'-CTGGCTGGCAACGAG G CACGCACGCTCATCAAG-3' r-5'-CTTGATGAGCGTGCGT G CCTCGTTGCCAGCCAG-3'
Q308T	f-5'-CTGGCTGGCAACGAGACACGCACGCTCATCAAGG-3' r-5'-CTTGATGAGCGTGCGT G TCTCGTTGCCAGCCAG-3'
T306E	f-5'-CCAAGATCAATGGCACCG A AACCCGCACGCTCATC-3' r-5'-GATGAGCGTGCGGGT T TCGGTGCCATTGATCTTG-3'
K78A	f-5'-GTGACCAACTTCT G CACTTGATTCCG-3' r-5'-GATCCGGAATCCAAGT G CAGAAGTGTTGG-3'

Da mit dem ersten generierten Primerpaaren die Mutation H140A nicht generiert werden konnte, wurde ein neuer kürzerer Primer (vgl. Tabelle 47) definiert, der im Programm *Oligo-Analyzer 3.1* weniger Möglichkeiten zur Selbstdimerisierung zeigte.

Tabelle 47: *modifizierte Mutageneseprimer*

Mutation	Primer
H140A	f-5'-CTGCCGGCACC G CCAGCAACGGAGTCT-3' r-5'-AGACTCCGTTGCT G GCGGTGCCGGCAG-3'

Mutagenese-PCR

Für die Durchführung der zielgerichteten Mutagenese wurde das folgende Pipettierschema verwendet:

7 μl H ₂ O
2,5 μl 10X KOD-Puffer
2,5 μl dNTPs (jeweils 2 mM)
2,0 μl MgSO ₄ (25 mM)
5,0 μl f-Primer (10 pmol/ μl)
5,0 μl r-Primer (10 pmol/ μl)
0,5 μl DNA (50 ng)
0,5 μl Hot Start DNA-Polymerase KOD (2,5 U/ μl)
<hr/> 25 μl Ansatz

Die Konzentration an MgSO₄ wurde für die Mutante H140A verändert. Positive Klone konnten mit einem Zusatz von 0,5 μl MgSO₄ erhalten werden. Zusätzlich wurden den Ansätzen für die Mutanten H140A und T133A 10 % DMSO zugesetzt um die Bildung von Hairpins zu verhindern.

Für die Durchführung der PCR wurde das folgende PCR-Protokoll gewählt:

1	95 °C	2 Min.
2	95 °C	15 Sek.
3	58 °C	15 Sek.
4	68 °C	2 Min. 30 Sek.
5	4 → 2	35 Zyklen
6	68 °C	5 Min.
7	4 °C	

Restriktionsverdau methylierter DNA

Dem PCR-Produkt wurde das Restriktionsenzym Dpn I zugesetzt, welches die methylierte DNA des Ursprungsplasmids verdaut. Dazu wurde der folgende Ansatz verwendet:

25 μl PCR-Produkt
3 μl Puffer 4
1 μl Dpn I
1 μl steriles Wasser
<hr/> 30 μl Ansatz

Der Restriktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 Min. bei 65

°C inaktiviert. Der Ansatz wurde im weiteren Verlauf in kompetente Zellen transformiert.

13.12.12 Selektion von Bakterien-Monoklonen

Zur Selektion wurden auf der Agarose-Platte vorhandene Klone einzeln mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Die einzelnen Klone wurden in einem Bakterienröhrchen mit 5 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin-Zusatz über Nacht bei 37 °C und 500 rpm inkubiert.

13.12.13 Minipräparation

TENS

Eine Übernachtskultur von 5 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin wurde mit jeweils einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C inkubiert. 2ml der Kultur wurden in 2 ml Eppendorf Gefäß bei 14000 rpm 1 Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in 100 µl LB-Medium unter Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl TENS hinzugefügt und durch Bewegung des Eppendorf Gefäßes vermischt. Bei Raumtemperatur wurde der Ansatz 3 Minuten ruhen gelassen. Es wurden 150 µl 3 M NaOAc pH 5,2 zugegeben und das Gemisch gut geschüttelt. Dabei sollte sich ein weißer Niederschlag bilden. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand in ein neues Gefäß mit 500 µl Isopropanol überführt. Nachdem der Ansatz gevortext wurde, wurde er 5 Minuten ruhen gelassen. Anschließend wurde erneut bei 14000 rpm 8-10 Min. zentrifugiert um die DNA zu präzipitieren. Das Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und 3-5 Minuten ruhen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 5-10 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Das trockene Pellet wurde in 100 µl TE mit 20 µg/ml RNase A-Zusatz resuspendiert.

Miniprep Kit

Eine Übernachtskultur von 5 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin wurde mit jeweils einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C bebrütet. Die DNA-Präparation folgt dem Protokoll des ZR Plasmid MiniprepTM-Classic Kits (vgl. 13.7).

13.12.14 Midipräparation

Die DNA-Präparation wurde gemäß dem Protokoll des PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kits (vgl. 13.7) durchgeführt.

13.12.15 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde extern durch die Firma GATC-Biotech durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde der GATC-Archiv-Primer GATC-f-PQCXIP-193764 eingesetzt.

13.12.16 Retrovirale Transfektion mit Lenti-X-System

Die HEK293T-Verpackungszellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90 % wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und in 3 ml resuspendiert. Die einzelnen Flaschen wurden vereinigt. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen ausgezählt und $1,5 \times 10^6$ Zellen pro T25 Flasche mit 5 ml DMEM (10 % FCS und P/S) ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % wurde einige Stunden vor der Transfektion ein Mediumwechsel (DMEM ohne Antibiotikum) durchgeführt. Für die Transfektion wurde der folgende Ansatz genutzt:

steriles Eppendorfgefäß 1

185,5 μ l Xfect Reaction Buffer
12 μ l Lenti-X HTX Packaging-Mix
2,5 μ l Lenti-X Vektor-DNA (1 μ g/ μ l)
200 μ l Endvolumen

steriles Eppendorfgefäß 2

197,5 μ l Xfect Reaction Buffer
2,5 μ l Xfect Polymer
200 μ l Endvolumen

Das Xfect Polymer sollte nicht länger als 30 Min. in wässriger Phase bei Raumtemperatur stehen. Das Gemisch aus Eppendorfgefäß 2 wurde in Eppendorfgefäß 1 überführt, gut gemischt und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz tropfenweise auf die Verpackungszellen gegeben, umgeschwenkt und 4-12 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel mit 3 ml DMEM (Tet-approved FCS/PS) durchgeführt und 30 μ l Natriumbutyratlösung (500 mM) in jede Flasche hinzugegeben. Die Flaschen wurden bei 32 °C für 48 h inkubiert. Während der Dauer der Inkubation wurden die 1321N1-Astrozytom-Zielzellen ausgesät. Pro T25 Zellkulturflasche wurden 5×10^5 Zellen benötigt. Nach dem Ende der Inkubation wurden pro Flasche Verpackungszellen 3 ml des Virenüberstandes abgenommen und durch einen Filter (45 μ m Porengröße) in ein 15 ml Falcon sterilfiltriert. Das Medium der Zielzellen wurde entfernt und durch 3 ml des Virenüberstandes ersetzt. Zusätzlich wurden 6 μ l Polybrenelösung (4 mg/ml) zugegeben. Nach 2,5 h wurde das Medium verworfen und durch 5 ml neues Nullmedium (DMEM/FCS/PS/Ultraglutamin) ausgetauscht. Die Zellen wurden für 48-72 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im FACS bei einer Anregungswellenlänge von 587 nm auf Emission bei 610 nm untersucht und fluoreszierende Einzelklone isoliert.

13.12.17 Vorbereitung gefriergetrockneter DNA

Zur Aufbereitung der gefriergetrockneten DNA wurden 50 μ l destilliertes Wasser auf die DNA gegeben und das DNA-Wasser-Gemisch 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde es mehrfach auf- und abpipettiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

13.12.18 Subklonierung in den pLVX-IRES-mCherry-Vektor

Restriktion des pLVX-IRES-mCherry-Vektor

20 μl pLVX-IRES-mCherry-Vektor
3 μl NEB Puffer 4
1 μl BamHI
1 μl Eco RI
5 μl H ₂ O
<hr/>
30 μl / Ansatz

30 μl hP2X4(P2X2)-Chimäre
4 μl NEB Puffer 4
1 μl BamHI
1 μl Eco RI
5 μl H ₂ O
<hr/>
40 μl / Ansatz

Die Ansätze wurden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1h inkubiert. Die anschließende Aufreinigung, Ligation, Transformation, Minipreparation und Transfektion erfolgte nach den in 13.12 beschriebenen Protokollen.

13.13 Fluorimetrischer Calcium-Assay

Die stabil transfizierten Zell-Linien wurden zur pharmakologischen Charakterisierung auf Agonist-induzierten Calcium-Einstrom untersucht. Dies geschah am Messgerät Flex-Station[®]. Es wurden 50.000 Zellen pro Vertiefung in eine schwarze 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden (Corning 3340) ausgesät. Die Platten wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mit 15 μl Fluo-4-Farbstofflösung und 15 μl Pluronic-Stocklösung in 4970 μl HBSS-Puffer beladen. 40 μl des Ansatzes wurden in jede Vertiefung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei RT wurde die Farbstofflösung verworfen. Für die Messung wurden 150 μl HBSS-Puffer (Testung von Agonisten) bzw. 148 μl HBSS-Puffer und 2 μl des jeweiligen Antagonisten (Testung von Antagonisten) in jede Vertiefung pipettiert. Antagonisten wurden 30 Minuten bei RT vorinkubiert. ATP-Verdünnungen bzw. Verdünnungen des Agonisten wurden in HBSS-Puffer hergestellt und jeweils 60 μl der Verdünnung in eine durchsichtige 96-Well-Platte mit V-Boden überführt. Während des Assays wurden 50 μl der jeweiligen Verdünnung zu den Zellen pipettiert und die resultierende Fluoreszenz in jeder Vertiefung gemessen.

14 Abkürzungsverzeichnis

2-meSATP	2-Methylthioadenosintriphosphat
5-BDBD	5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-on
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
Ap₄A	Diadenosintetraphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A,B	ATP-getriebene Kupfertransporter
BX430	<i>N</i> -[2,6-Dibromo-4-(1-methylethyl)phenyl]- <i>N'</i> -(3-pyridinyl)urea
BzATP	2'-(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosintriphosphat
CDF	Cation diffusion faciator
Chim	Chimäre
P_{CMV}	Promoter Cytomegalovirus
cPPT/CTS	Central polypurine tract/central termination sequence
Ctr1	Coppertransporter 1
Cys	Cystein
DMEM	Dulbeccos´ s modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiammintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
Fluo4-AM	Fluo-4-acetoxymethylester
G418	Geneticin
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
h	human
HBSS	Hank´ s balanced salt solution
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny lethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
Ile	Isoleucin
IRES	Internal ribosomal entry site
LB	Lysogeny broth
LGIC	Ligand-gesteuerter-Ionenkanal
Lys	Lysin
LTR	Long terminal repeats

MCS	Multiple cloning site
m	Maus
nACh	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NMDA	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -aspartat
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
NAM	Negativer allosterischer Modulator
ORI	Origin of replication
PAM	Positiver allosterischer Modulator
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2' 4'-disulfonsäure
PSB-12054	N-(Benzyloxycarbonyl)phenoxazin
r	Ratte
RRE	Rev Response Element
SEM	Standard error of the mean
Ser	Serin
SNP	Single-Nucleotid-Polymorphism
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TMD	Transmembran-Domäne
TNP-ATP	2'-(oder 3')-O-Trinitrophenyladenosintriphosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
Tyr	Tyrosin
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
Val	Valin
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis-Virus
WPRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
ZIP	Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like protein
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

- [1] Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* **1972**, *24*, 509–581.
- [2] Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor, Cell membrane receptors of drugs and hormones: a multidisciplinary approach. *Raven Press* **1987**, New York.
- [3] Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* **1985**, *16*, 433–440.
- [4] Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413–492.
- [5] North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 1013–1067.
- [6] Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H. Q.; Wintmolders, C.; Van den Wyngaert, I.; Van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 8573–8578.
- [7] Kaczmarek-Hajek, K.; Lorinczi, E.; Hausmann, R.; Nicke, A. Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal.* **2012**, *8*, 375–417.
- [8] K.A., J. P2X and P2Y Receptors. <http://www.tocris.com>, Stand 03/2013.
- [9] Coddou, C.; Stojilkovic, S. S.; Huidobro-Toro, J. P. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev Neurosci* **2011**, *22*, 335–354.
- [10] Hausmann, R.; Kless, A.; Schmalzing, G. Key sites for P2X receptor function and multimerization: overview of mutagenesis studies on a structural basis. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 799–818.
- [11] Hausmann, R.; Bahrenberg, G.; Kuhlmann, D.; Schumacher, M.; Braam, U.; Bieler, D.; Schlusche, I.; Schmalzing, G. A hydrophobic residue in position 15 of the rP2X3 receptor slows desensitization and reveals properties beneficial for pharmacological analysis and high-throughput screening. *Neuropharmacology* **2014**, *79*, 603–615.
- [12] Gever, J. R.; Cockayne, D. A.; Dillon, M. P.; Burnstock, G.; Ford, A. P. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 513–537.
- [13] Duckwitz, W.; Hausmann, R.; Aschrafi, A.; Schmalzing, G. P2X5 subunit assembly requires scaffolding by the second transmembrane domain and a conserved aspartate. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 39561–39572.

- [14] Kawate, T.; Michel, J. C.; Birdsong, W. T.; Gouaux, E. Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature* **2009**, *460*, 592–598.
- [15] Hattori, M.; Gouaux, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **2012**, *485*, 207–212.
- [16] Mansoor, S. E.; Lu, W.; Oosterheert, W.; Shekhar, M.; Tajkhorshid, E.; Gouaux, E. X-ray structures define human P2X3 receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* **2016**, 66–71.
- [17] Coddou, C.; Yan, Z.; Obsil, T.; Huidobro-Toro, J. P.; Stojilkovic, S. S. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 641–683.
- [18] Wildman, S. S.; Brown, S. G.; King, B. F.; Burnstock, G. Selectivity of diadenosine polyphosphates for rat P2X receptor subunits. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *367*, 119–123.
- [19] Evans, R. J. Structural interpretation of P2X receptor mutagenesis studies on drug action. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 961–971.
- [20] Buell, G.; Lewis, C.; Collo, G.; North, R. A.; Surprenant, A. An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J.* **1996**, *15*, 55–62.
- [21] Garcia-Guzman, M.; Soto, F.; Gomez-Hernandez, J. M.; Lund, P. E.; Stuhmer, W. Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 109–118.
- [22] Michel, A. D.; Clay, W. C.; Ng, S. W.; Roman, S.; Thompson, K.; Condreay, J. P.; Hall, M.; Holbrook, J.; Livermore, D.; Senger, S. Identification of regions of the P2X7 receptor that contribute to human and rat species differences in antagonist effects. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 738–751.
- [23] Syed, N.-i.-H.; Kennedy, C. Pharmacology of P2X receptors. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* **2012**, *1*, 16–30.
- [24] Ennion, S.; Hagan, S.; Evans, R. J. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35656.
- [25] Roberts, J. A.; Evans, R. J. ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 9043–9055.
- [26] Sim, J. A.; Broomhead, H. E.; North, R. A. Ectodomain lysines and suramin block of P2X1 receptors. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29841–29846.

- [27] Christopoulos, A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 198–210.
- [28] Changeux, J. P. The concept of allosteric interaction and its consequences for the chemistry of the brain. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 26969–26986.
- [29] Keov, P.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: a pharmacological perspective. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 24–35.
- [30] Johnston, G. A. GABA_A receptor pharmacology. *Pharmacol. Ther.* **1996**, *69*, 173–198.
- [31] Kumamoto, E. The pharmacology of amino-acid responses in septal neurons. *Prog. Neurobiol.* **1997**, *52*, 197–259.
- [32] Zhu, S.; Paoletti, P. Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2015**, *20*, 14–23.
- [33] Bertrand, D.; Gopalakrishnan, M. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1155–1163.
- [34] Müller, C. E. Medicinal chemistry of P2X receptors: allosteric modulators. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 929–941.
- [35] Bridges, T. M.; Lindsley, C. W. G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 530–541.
- [36] Ase, A. R.; Honson, N. S.; Zaghdane, H.; Pfeifer, T. A.; Seguela, P. Identification and characterization of a selective allosteric antagonist of human P2X₄ receptor channels. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *87*, 606–616.
- [37] Nagata, K.; Imai, T.; Yamashita, T.; Tsuda, M.; Tozaki-Saitoh, H.; Inoue, K. Antidepressants inhibit P2X₄ receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain* **2009**, *5*, 20.
- [38] Khakh, B. S.; Proctor, W. R.; Dunwiddie, T. V.; Labarca, C.; Lester, H. A. Allosteric control of gating and kinetics at P2X₄ receptor channels. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 7289–7299.
- [39] Priel, A.; Silberberg, S. D. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X₄ receptor channels. *J. Gen. Physiol.* **2004**, *123*, 281–293.
- [40] Miller, K. J.; Michel, A. D.; Chessell, I. P.; Humphrey, P. P. Cibacron blue allosterically modulates the rat P2X₄ receptor. *Neuropharmacology* **1998**, *37*, 1579–1586.

- [41] Michel, A. D.; Miller, K. J.; Lundstrom, K.; Buell, G. N.; Humphrey, P. P. Radiolabeling of the rat P2X4 purinoceptor: evidence for allosteric interactions of purinoceptor antagonists and monovalent cations with P2X purinoceptors. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 524–532.
- [42] Lorca, R. A.; Coddou, C.; Gazitua, M. C.; Bull, P.; Arredondo, C.; Huidobro-Toro, J. P. Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation. *J. Neurochem.* **2005**, *95*, 499–512.
- [43] Franklin, K. M.; Asatryan, L.; Jakowec, M. W.; Trudell, J. R.; Bell, R. L.; Davies, D. L. P2X4 receptors represent a novel target for the development of drugs to prevent and/or treat alcohol use disorders. *Front Neurosci* **2014**, *8*, 176.
- [44] Xiong, K.; Li, C.; Weight, F. F. Inhibition by ethanol of rat P2X4 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 1394–1398.
- [45] Coddou, C.; Codocedo, J. F.; Li, S.; Lillo, J. G.; Acuna-Castillo, C.; Bull, P.; Stojilkovic, S. S.; Huidobro-Toro, J. P. Reactive oxygen species potentiate the P2X2 receptor activity through intracellular Cys430. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 12284–12291.
- [46] Coddou, C.; Lorca, R. A.; Acuna-Castillo, C.; Grauso, M.; Rassendren, F.; Huidobro-Toro, J. P. Heavy metals modulate the activity of the purinergic P2X4 receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *202*, 121–131.
- [47] Coddou, C.; Acuña Castillo, C.; Bull, P.; Huidobro-Toro, J. P. Dissecting the facilitator and inhibitor allosteric metal sites of the P2X4 receptor channel: critical roles of CYS132 for zinc potentiation and ASP138 for copper inhibition. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 36879–36886.
- [48] Stoop, R.; Surprenant, A.; North, R. A. Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J. Neurophysiol.* **1997**, *78*, 1837–1840.
- [49] Clarke, C. E.; Benham, C. D.; Bridges, A.; George, A. R.; Meadows, H. J. Mutation of histidine 286 of the human P2X4 purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *J. Physiol. (Lond.)* **2000**, *523*, 697–703.
- [50] Ostrovskaia, O.; Asatryan, L.; Wyatt, L.; Popova, M.; Li, K.; Peoples, R. W.; Alkana, R. L.; Davies, D. L. Ethanol is a fast channel inhibitor of P2X4 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *337*, 171–179.
- [51] Tomioka, A.; Ueno, S.; Kohama, K.; Goto, F.; Inoue, K. Propofol potentiates ATP-activated currents of recombinant P2X4 receptor channels expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Neurosci. Lett.* **2000**, *284*, 167–170.

- [52] Woodward, J. J.; Nowak, M.; Davies, D. L. Effects of the abused solvent toluene on recombinant P2X receptors expressed in HEK293 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2004**, *125*, 86–95.
- [53] Codocedo, J. F.; Rodriguez, F. E.; Huidobro-Toro, J. P. Neurosteroids differentially modulate P2X ATP-gated channels through non-genomic interactions. *J. Neurochem.* **2009**, *110*, 734–744.
- [54] Tian, M.; Abdelrahman, A.; Weinhausen, S.; Hinz, S.; Weyer, S.; Dosa, S.; El-Tayeb, A.; Müller, C. E. Carbamazepine derivatives with P2X4 receptor-blocking activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1077–1088.
- [55] Hernandez-Olmos, V.; Abdelrahman, A.; El-Tayeb, A.; Freudendahl, D.; Weinhausen, S.; Müller, C. E. N-substituted phenoxazine and acridone derivatives: structure-activity relationships of potent P2X4 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9576–9588.
- [56] Jarvis, M. F.; Khakh, B. S. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 208–215.
- [57] Hechler, B.; Gachet, C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal.* **2011**, *7*, 293–303.
- [58] Burnstock, G. Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. *Purinergic Signal.* **2014**, *10*, 103–155.
- [59] Mahaut-Smith, M. P.; Jones, S.; Evans, R. J. The P2X1 receptor and platelet function. *Purinergic Signal.* **2011**, *7*, 341–356.
- [60] North, R. A.; Jarvis, M. F. P2X receptors as drug targets. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *83*, 759–769.
- [61] Cockayne, D. A.; Dunn, P. M.; Zhong, Y.; Rong, W.; Hamilton, S. G.; Knight, G. E.; Ruan, H. Z.; Ma, B.; Yip, P.; Nunn, P.; McMahon, S. B.; Burnstock, G.; Ford, A. P. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J. Physiol. (Lond.)* **2005**, *567*, 621–639.
- [62] Bradbury, E. J.; Burnstock, G.; McMahon, S. B. The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol. Cell. Neurosci.* **1998**, *12*, 256–268.
- [63] Burnstock, G. Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. *Purinergic Signal.* **2014**, *10*, 103–155.

- [64] Ford, A. P.; Udem, B. J. The therapeutic promise of ATP antagonism at P2X3 receptors in respiratory and urological disorders. *Front Cell Neurosci* **2013**, *7*, 267.
- [65] Jarvis, M. F. Contributions of P2X3 homomeric and heteromeric channels to acute and chronic pain. *Expert Opin. Ther. Targets* **2003**, *7*, 513–522.
- [66] Bo, X.; Kim, M.; Nori, S. L.; Schoepfer, R.; Burnstock, G.; North, R. A. Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res.* **2003**, *313*, 159–165.
- [67] Tsuda, M.; Masuda, T.; Tozaki-Saitoh, H.; Inoue, K. P2X4 receptors and neuropathic pain. *Front Cell Neurosci* **2013**, *7*, 191.
- [68] Tsuda, M.; Shigemoto-Mogami, Y.; Koizumi, S.; Mizokoshi, A.; Kohsaka, S.; Salter, M. W.; Inoue, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **2003**, *424*, 778–783.
- [69] Bartlett, R.; Stokes, L.; Sluyter, R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 638–675.
- [70] Navarro, G.; Borroto-Escuela, D. O.; Fuxe, K.; Franco, R. Purinergic signaling in Parkinson's disease. Relevance for treatment. *Neuropharmacology* **2016**, *104*, 161–168.
- [71] Burnstock, G.; Di Virgilio, F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 491–540.
- [72] Di Virgilio, F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5441–5447.
- [73] Asatryan, L.; Popova, M.; Perkins, D.; Trudell, J. R.; Alkana, R. L.; Davies, D. L. Ivermectin antagonizes ethanol inhibition in purinergic P2X4 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *334*, 720–728.
- [74] Franklin, K. M.; Hauser, S. R.; Lasek, A. W.; Bell, R. L.; McBride, W. J. Involvement of Purinergic P2X4 Receptors in Alcohol Intake of High-Alcohol-Drinking (HAD) Rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2015**, *39*, 2022–2031.
- [75] Costigan, M.; Scholz, J.; Woolf, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu. Rev. Neurosci.* **2009**, *32*, 1–32.
- [76] Haanpaa, M.; Attal, N.; Backonja, M.; Baron, R.; Bennett, M.; Bouhassira, D.; Cruccu, G.; Hansson, P.; Haythornthwaite, J. A.; Iannetti, G. D.; Jensen, T. S.;

- Kauppila, T.; Nurmikko, T. J.; Rice, A. S.; Rowbotham, M.; Serra, J.; Sommer, C.; Smith, B. H.; Treede, R. D. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* **2011**, *152*, 14–27.
- [77] Peng, J.; Gu, N.; Zhou, L.; B Eyo, U.; Murugan, M.; Gan, W. B.; Wu, L. J. Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury. *Nat Commun* **2016**, *7*, 12029.
- [78] Li, Y.-S. J.; Haga, J. H.; Chien, S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J. Biomechan.* **2005**, *38*, 1949–1971.
- [79] Yamamoto, K.; Sokabe, T.; Matsumoto, T.; Yoshimura, K.; Shibata, M.; Ohura, N.; Fukuda, T.; Sato, T.; Sekine, K.; Kato, S.; Isshiki, M.; Fujita, T.; Kobayashi, M.; Kawamura, K.; Masuda, H.; Kamiya, A.; Ando, J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 133–137.
- [80] Stokes, L.; Scurrah, K.; Ellis, J. A.; Cromer, B. A.; Skarratt, K. K.; Gu, B. J.; Harrap, S. B.; Wiley, J. S. A loss-of-function polymorphism in the human P2X4 receptor is associated with increased pulse pressure. *Hypertension* **2011**, *58*, 1086–1092.
- [81] Caseley, E. A.; Muench, S. P.; Roger, S.; Mao, H. J.; Baldwin, S. A.; Jiang, L. H. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers. *Int J Mol Sci* **2014**, *15*, 13344–13371.
- [82] Inoue, K.; Tsuda, M. Purinergic systems, neuropathic pain and the role of microglia. *Exp. Neurol.* **2012**, *234*, 293–301.
- [83] Hattori, M.; Gouaux, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **2012**, *485*, 207–291.
- [84] Weiner, M. P.; Costa, G. L.; Schoettlin, W.; Cline, J.; Mathur, E.; Bauer, J. C. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **1994**, *151*, 119–123.
- [85] Costa, G. L.; Bauer, J. C.; McGowan, B.; Angert, M.; Weiner, M. P. Site-directed mutagenesis using a rapid PCR-based method. **1996**, *57*, 239–248.
- [86] Munteanu, B.; Braun, M.; Boonrod, K. Improvement of PCR reaction conditions for site-directed mutagenesis of big plasmids. *J Zhejiang Univ Sci B* **2012**, *13*, 244–247.
- [87] Stanford.edu, <http://www.stanford.edu/loening/protocols/SiteDirectedMutagenesis.pdf>, Stand 11/2006.

- [88] NEB-Homepage, <https://www.neb.com/products/n3041-puc19-vector>, Stand 04/2016.
- [89] Kim, T. K.; Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397*, 3173–3178.
- [90] Sakuma, T.; Barry, M. A.; Ikeda, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 603–618.
- [91] Clontech, <http://www.clontech.com>, Stand 07/2009.
- [92] Schikorra, N. Entwicklung von zellspezifischen und regulierbaren Expressionssystemen zur Anwendung in der Gentherapie. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Münster, 2004.
- [93] Shaner, N. C.; Campbell, R. E.; Steinbach, P. A.; Giepmans, B. N.; Palmer, A. E.; Tsien, R. Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567–1572.
- [94] Bonner, W. A.; Hulett, H. R.; Sweet, R. G.; Herzenberg, L. A. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* **1972**, *43*, 404–409.
- [95] invitrogen, <http://www.invitrogen.com>, Stand 03/2013.
- [96] Zhao, W. S.; Wang, J.; Ma, X. J.; Yang, Y.; Liu, Y.; Huang, L. D.; Fan, Y. Z.; Cheng, X. Y.; Chen, H. Z.; Wang, R.; Yu, Y. Relative motions between left flipper and dorsal fin domains favour P2X4 receptor activation. *Nat Commun* **2014**, *5*, 4189.
- [97] Huidobro-Toro, J. P.; Lorca, R. A.; Coddou, C. Trace metals in the brain: allosteric modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors. *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 301–314.
- [98] Acuña Castillo, C.; Morales, B.; Huidobro-Toro, J. P. Zinc and copper modulate differentially the P2X4 receptor. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 1529–1537.
- [99] Campbell, W. C. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr Pharm Biotechnol* **2012**, *13*, 853–865.
- [100] Zemkova, H.; Tvrdonova, V.; Bhattacharya, A.; Jindrichova, M. Allosteric modulation of ligand gated ion channels by ivermectin. *Physiol Res* **2014**, *63*, 215–224.
- [101] Omura, S.; Crump, A. The life and times of ivermectin - a success story. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 984–989.

- [102] Nörenberg, W.; Sobottka, H.; Hempel, C.; Plotz, T.; Fischer, W.; Schmalzing, G.; Schaefer, M. Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 48–66.
- [103] Jelinkova, I.; Vavra, V.; Jindrichova, M.; Obsil, T.; Zemkova, H. W.; Zemkova, H.; Stojilkovic, S. S. Identification of P2X4 receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch.* **2008**, *456*, 939–950.
- [104] Silberberg, S. D.; Li, M.; Swartz, K. J. Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. *Neuron* **2007**, *54*, 263–274.
- [105] Hausmann, R.; Kless, A.; Schmalzing, G. Key sites for P2X receptor function and multimerization: overview of mutagenesis studies on a structural basis. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 799–818.
- [106] Samways, D. S.; Li, Z.; Egan, T. M. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front Cell Neurosci* **2014**, *8*, 6.
- [107] Popova, M.; Trudell, J.; Li, K.; Alkana, R.; Davies, D.; Asatryan, L. Tryptophan 46 is a site for ethanol and ivermectin action in P2X4 receptors. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 621–632.
- [108] Popova, M.; Asatryan, L.; Ostrovskaya, O.; Wyatt, L. R.; Li, K.; Alkana, R. L.; Davies, D. L. A point mutation in the ectodomain-transmembrane 2 interface eliminates the inhibitory effects of ethanol in P2X4 receptors. *J. Neurochem.* **2010**, *112*, 307–317.
- [109] Jelinkova, I.; Yan, Z.; Liang, Z.; Moonat, S.; Teisinger, J.; Stojilkovic, S. S.; Zemkova, H. Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *349*, 619–625.
- [110] Stojilkovic, S. S.; Yan, Z.; Obsil, T.; Zemkova, H. Structural insights into the function of P2X4: an ATP-gated cation channel of neuroendocrine cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2010**, *30*, 1251–1258.
- [111] Davis, B. A.; Nagarajan, A.; Forrest, L. R.; Singh, S. K. Mechanism of Paroxetine (Paxil) Inhibition of the Serotonin Transporter. *Sci Rep* **2016**, *6*, 23789.
- [112] Sindrup, S. H.; Otto, M.; Finnerup, N. B.; Jensen, T. S. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *96*, 399–409.
- [113] Löffler, G.; Petrides, P.; Heinrich, P. *Biochemie und Pathobiochemie*; Springer Verlag: Heidelberg, 2007.

- [114] Kaim, W.; Schwederski, B. *Bioanorganische Chemie*; Springer Verlag: Stuttgart, 1991.
- [115] Williams, R. The symbiosis of metal-ion and protein chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 35–46.
- [116] Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533–3539.
- [117] Haas, K. L.; Franz, K. J. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chem. Rev* **2009**, *109*, 4921–4960.
- [118] Rulisek, L.; Vondrasek, J. Coordination geometries of selected transition metal ions Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , and Hg^{2+} in metalloproteins. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *71*, 115–127.
- [119] Peralta, F. A.; Huidobro-Toro, J. P. Zinc as allosteric ion channel modulator: ionotropic receptors as metalloproteins. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, 7.
- [120] Wu, Z.; Fernandez-Lima, F. A.; Russell, D. H. Amino acid influence on copper binding to peptides: cysteine versus arginine. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 522–533.
- [121] Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 205–214.
- [122] Gaier, E.; Eipper, B.; Mains, R. Copper signaling in the mammalian nervous system: Synaptic effects. *Neurosci Res* **2013**, *91*, 2–19.
- [123] Kambe, T.; Tsuji, T.; Hashimoto, A.; Itsumura, N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 749–784.
- [124] Davies, K. M.; Mercer, J. F.; Chen, N.; Double, K. L. Copper dyshomeostasis in Parkinson's disease: implications for pathogenesis and indications for novel therapeutics. *Clin. Sci.* **2016**, *130*, 565–574.
- [125] Kozłowski, H.; Luczkowski, M.; Remelli, M.; Valensin, D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2129–2141.
- [126] D'Ambrosi, N.; Rossi, L. Copper at synapse: Release, binding and modulation of neurotransmission. *Neurochem Int* **2015**, *90*, 36–45.
- [127] Veran, J.; Kumar, J.; Pinheiro, P. S.; Athane, A.; Mayer, M. L.; Perrais, D.; Mülle, C. Zinc potentiates GluK3 glutamate receptor function by stabilizing the ligand binding domain dimer interface. *Neuron* **2012**, *76*, 565–578.

- [128] Feigenspan, A.; Weiler, R. Electrophysiological properties of mouse horizontal cell GABA_A receptors. *J. Neurophysiol.* **2004**, *92*, 2789–2801.
- [129] Sharonova, I. N.; Vorobjev, V. S.; Haas, H. L. Interaction between copper and zinc at GABA_A receptors in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 851–856.
- [130] Vlachova, V.; Zemkova, H.; Vyklicky, L. Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **1996**, *8*, 2257–2264.
- [131] Stys, P. K.; You, H.; Zamponi, G. W. Copper-dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders. *J. Physiol. (Lond.)* **2012**, *590*, 1357–1368.
- [132] Punthambaker, S.; Blum, J. A.; Hume, R. I. High potency zinc modulation of human P2X₂ receptors and low potency zinc modulation of rat P2X₂ receptors share a common molecular mechanism. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 22099–22111.
- [133] Coddou, C.; Morales, B.; Gonzalez, J.; Grauso, M.; Gordillo, F.; Bull, P.; Ras-sendren, F.; Huidobro-Toro, J. P. Histidine 140 plays a key role in the inhibitory modulation of the P2X₄ nucleotide receptor by copper but not zinc. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 36777–36785.
- [134] Punthambaker, S.; Hume, R. I. Potent and long-lasting inhibition of human P2X₂ receptors by copper. *Neuropharmacology* **2014**, *77*, 167–176.
- [135] Igawa, T.; Abe, Y.; Tsuda, M.; Inoue, K.; Ueda, T. Solution structure of the rat P2X₄ receptor head domain involved in inhibitory metal binding. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 680–686.
- [136] Nagaya, N.; Tittle, R. K.; Saar, N.; Dellal, S. S.; Hume, R. I. An intersubunit zinc binding site in rat P2X₂ receptors. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25982–25993.
- [137] Clyne, J. D.; Wang, L. F.; Hume, R. I. Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X₂ purinoceptor. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 3873–3880.
- [138] Xiong, K.; Peoples, R. W.; Montgomery, J. P.; Chiang, Y.; Stewart, R. R.; Weight, F. F.; Li, C. Differential modulation by copper and zinc of P2X₂ and P2X₄ receptor function. *J. Neurophysiol.* **1999**, *81*, 2088–2094.
- [139] Wildman, S. S.; King, B. F.; Burnstock, G. Modulatory activity of extracellular H⁺ and Zn²⁺ on ATP-responses at rP2X₁ and rP2X₃ receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 486–492.

- [140] Wildman, S. S.; King, B. F.; Burnstock, G. Zn²⁺ modulation of ATP-responses at recombinant P2X2 receptors and its dependence on extracellular pH. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*, 1214–1220.
- [141] Wildman, S. S.; Brown, S. G.; Rahman, M.; Noel, C. A.; Churchill, L.; Burnstock, G.; Unwin, R. J.; King, B. F. Sensitization by extracellular Ca²⁺ of rat P2X5 receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X1. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 957–966.
- [142] Liu, X.; Surprenant, A.; Mao, H. J.; Roger, S.; Xia, R.; Bradley, H.; Jiang, L. H. Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73*, 252–259.
- [143] Virginio, C.; Church, D.; North, R. A.; Surprenant, A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* **1997**, *36*, 1285–1294.
- [144] Acuña Castillo, C.; Coddou, C.; Bull, P.; Brito, J.; Huidobro-Toro, J. P. Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X7 purinergic receptor. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 17–26.
- [145] Punthambaker, S.; Blum, J. A.; Hume, R. I. High potency zinc modulation of human P2X2 receptors and low potency zinc modulation of rat P2X2 receptors share a common molecular mechanism. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 22099–22111.
- [146] Friday, S. C.; Hume, R. I. Contribution of extracellular negatively charged residues to ATP action and zinc modulation of rat P2X2 receptors. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 1264–1275.
- [147] Scheiber, I. F.; Mercer, J. F.; Dringen, R. Metabolism and functions of copper in brain. *Prog. Neurobiol.* **2014**, *116*, 33–57.
- [148] Murakami, M.; Hirano, T. Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 1515–1522.
- [149] Frederickson, C. J.; Suh, S. W.; Silva, D.; Frederickson, C. J.; Thompson, R. B. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1471–83.
- [150] Habermacher, C.; Dunning, K.; Chataigneau, T.; Grutter, T. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology* **2016**, *104*, 18–30.
- [151] Tittle, R. K.; Hume, R. I. Opposite effects of zinc on human and rat P2X2 receptors. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 11131–11140.
- [152] Marino, S. F.; Regan, L. Secondary ligands enhance affinity at a designed metal-binding site. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 649–655.

- [153] Baqi, Y.; Lee, S. Y.; Iqbal, J.; Ripphausen, P.; Lehr, A.; Scheiff, A. B.; Zimmermann, H.; Bajorath, J.; Müller, C. E. Development of potent and selective inhibitors of ecto-5'-nucleotidase based on an anthraquinone scaffold. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2076–2086.
- [154] Baqi, Y.; Atzler, K.; Köse, M.; Glanzel, M.; Müller, C. E. High-affinity, non-nucleotide-derived competitive antagonists of platelet P2Y₁₂ receptors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3784–3793.
- [155] Baqi, Y.; Hausmann, R.; Rosefort, C.; Rettinger, J.; Schmalzing, G.; Müller, C. E. Discovery of potent competitive antagonists and positive modulators of the P2X₂ receptor. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 817–830.
- [156] Weyler, S.; Baqi, Y.; Hillmann, P.; Kaulich, M.; Hunder, A. M.; Müller, I. A.; Müller, C. E. Combinatorial synthesis of anilinoanthraquinone derivatives and evaluation as non-nucleotide-derived P2Y₂ receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 223–227.
- [157] Baqi, Y.; Weyler, S.; Iqbal, J.; Zimmermann, H.; Müller, C. E. Structure-activity relationships of anthraquinone derivatives derived from bromaminic acid as inhibitors of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). *Purinergic Signal.* **2009**, *5*, 91–106.
- [158] Alexander, K.; Niforatos, W.; Bianchi, B.; Burgard, E. C.; Lynch, K. J.; Kowaluk, E. A.; Jarvis, M. F.; van Biesen, T. Allosteric modulation and accelerated resensitization of human P2X₃ receptors by cibacron blue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *291*, 1135–1142.
- [159] Burnstock, G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays* **2012**, *34*, 218–225.
- [160] Gachet, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 277–300.
- [161] Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281–341.
- [162] Paoletta, S.; Sabbadin, D.; von Kügelgen, I.; Hinz, S.; Katritch, V.; Hoffmann, K.; Abdelrahman, A.; Strassburger, J.; Baqi, Y.; Zhao, Q.; Stevens, R. C.; Moro, S.; Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Modeling ligand recognition at the P2Y₁₂ receptor in light of X-ray structural information. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2015**, *29*, 737–756.

- [163] Zhang, J.; Zhang, K.; Gao, Z. G.; Paoletta, S.; Zhang, D.; Han, G. W.; Li, T.; Ma, L.; Zhang, W.; Müller, C. E.; Yang, H.; Jiang, H.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Jacobson, K. A.; Stevens, R. C.; Wu, B.; Zhao, Q. Agonist-bound structure of the human P2Y₁₂ receptor. *Nature* **2014**, *509*, 119–122.
- [164] Hoffmann, K.; Baqi, Y.; Morena, M. S.; Glanzel, M.; Müller, C. E.; von Kügelgen, I. Interaction of new, very potent non-nucleotide antagonists with Arg256 of the human platelet P2Y₁₂ receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *331*, 648–655.

15 Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. C.E. Müller am Institut für Pharmazeutische Chemie der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Mein besonderes Dank gilt zunächst Christa für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis, für die gute Betreuung, die Unterstützung auch in schwierigen Situationen, die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft und die Ermöglichung der Teilnahme an zahlreichen Kongressen und Fortbildungen.

Auch PD Dr. Schiedel danke ich ganz herzlich. Liebe Anke, vielen Dank für die Übernahme des Koreferats und für die Unterstützung bei allen Fragen zum Isolabor und zur Molekularbiologie.

Bei Prof. Dr. Jaehde und Prof. Dr. Manthey bedanke ich mich für ihr Mitwirken in der Prüfungskommission.

Mein Dank gilt Vignesh für das „Molecular Modelling“ in der vorliegenden Arbeit, für die immer vorhandene Ansprechbarkeit und für die Bereitschaft alle noch so kurzfristigen Fragen zu beantworten und dabei zu helfen, Lösungen zu finden.

Bei Theo und Sonja bedanke ich mich für die vielen hilfreichen Anmerkungen, Diskussionen und gute Ideen bei auftretenden molekularbiologischen Problemen.

Ich bedanke mich bei Aliaa für die Durchführung der Radioligandbindungsstudien und bei Steffi Weyer, Claudia und Muhammad für Unterstützung bei der Selektivitätstestung.

Lisa Kleene danke ich für ihre Unterstützung im Labor gegen Ende meiner Doktorarbeit.

Ganz besonders danke ich meinen Bürokollegen Anika, Angelika und Markus für die schöne Zeit, die gegenseitige Unterstützung im und außerhalb des Labors, die konstruktive Kritik (insbesondere in Sachen Leergut) und für noch viel mehr. Ich werde euch vermissen!

Allen Kollegen des Isolabors und des Arbeitskreis Müller danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und insbesondere Clara, Claudia, Markus, Christian, Muhammad, Conny und Anne für die gute Zeit am und auch außerhalb des Instituts.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinen Kollegen des 2. Semesterpraktikums,

Mathias, Jenny, Melanie, Jim, Sebastian, Markus und Federico, für die kollegiale und gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Leonie für die unterhaltsamen und fachfremden Mittagspausen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Suse, die mir immer unterstützend zur Seite gestanden haben. Ganz besonders aber danke ich Philipp. Für alles!

16 Publikationsverzeichnis

16.1 Publikationen

Tian, M.; Abdelrahman, A.; Weinhausen, S.; Hinz, S.; Weyer, S.; Dosa, S.; El-Tayeb, A.; Müller, C.E. Carbamazepine derivatives with P2X4 receptor-blocking activity. *Bioorg Med Chem* **2014**, *22*, 1077-10.

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

Weinhausen, S.; Namasivayam, V.; Spanier, C.; Hanck, T.; Hausmann, R.; Abdelrahman, A.; Müller, C.E. Characterization of an extracellular allosteric binding site for P2X4 receptor modulators (In Bearbeitung).

16.2 Kongressbeiträge

Weinhausen, S.; Namasivayam, V.; Spanier, C.; Hanck, T.; Abdelrahman, A.; Müller, C.E. Identification of an allosteric site at the human P2X4 receptor. *Frontiers in Medicinal Chemistry 2015*, Bonn, März **2016** (Poster).

Binding site of the allosteric P2X4 receptor modulator ivermectin. *Purinergic Signaling 2016*, Vancouver, Januar **2016** (Vortrag).

Weinhausen, S.; Namasivayam, V.; Spanier, C.; Hanck, T.; Abdelrahman, A.; Müller, C.E. Binding site of the allosteric P2X4 receptor modulator ivermectin. *Purinergic Signalling 2016*, Vancouver, Januar **2016** (Poster).

Weinhausen, S.; Namasivayam, V.; Spanier, C.; Hanck, T.; Müller, C.E. Binding site of the allosteric P2X4 receptor modulator ivermectin. *DPhG-Doktorandentagung 2015*, Boehringer-Ingelheim, Biberach, März **2015** (Poster und Kurzvortrag).

Weinhausen, S.; Hanck, T.; Namasivayam, V.; Abdelrahman, A.; Hernandez-Olmos, V.; Tian, M.; Müller, C.E. Investigation of the allosteric binding site(s) of P2X4 antagonists. *Purins 2014*, Bonn **2014** (Poster) Abstract publiziert in *Purinergic Signalling* **2014**, *10*, 779.

Hernandez-Olmos, V.; Müller, C.E.; Abdelrahman, A.; El-Tayeb, A.; Freudendahl, D.; Weinhausen, S.; De Ryck, M. N-substituted phenoxazine and acridone derivatives: structure-activity relationships of potent P2X4 receptor antagonists. *EFMC-ISMIC*, **2012** (Poster).