

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

Einfluss extrazellulärer Anionen auf den P2X7-Rezeptor

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
für das Fachgebiet Physiologie

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

von Christoph Kubick
geboren am 07.02.1984 in Guben

Betreuer: Prof. Dr. Fritz Markwardt

Gutachter: 1. Prof. Dr. Fritz Markwardt
2. Prof. Dr. Michael Schäfer (Leipzig)
3. PD Dr. Thomas Zimmer (Jena)

09.10.2011

15.05.2012

Referat:

Bei P2X7-Rezeptoren unterschiedlicher Spezies handelt es sich um ligandenabhängige unspezifische Kationenkanäle mit ihrem natürlich vorkommenden Agonisten ATP⁴⁻. P2X7-Rezeptoren finden sich in verschiedenen Spezies in unterschiedlichen Zellpopulationen wie zum Beispiel Makrophagen bis hin zu Thyreozyten. Eine besondere Funktion kommt ihnen bei Immunmodulation, Nozizeption und Zellsekretion zu. Ebenso scheint ihnen eine Rolle bei zellproliferativen Prozessen zuzukommen, bis hin zu einer Bedeutung in Karzinomgeweben.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss Veränderungen der physiologisch vorkommenden extrazellulären Anionenkonzentration auf P2X7-Rezeptoren des Menschen und der Maus nehmen, wie sie beispielsweise bei inflammatorischen Prozessen vorkommen können. Als Zellmodelle in Lösungen mit verschiedenen organischen und anorganischen Anionen bei Patch- und Voltage-clamp Messungen dienten einerseits RAW-Makrophagen der Maus sowie Oozyten der Gattung *Xenopus laevis*. Letztere ermöglichen nach Expression heterologer P2X7-Rezeptor-RNA Messungen sowohl an speziesdifferenten Rezeptoren als auch Untersuchungen in Ca²⁺-freien Lösungen.

Es zeigt sich eine speziesunabhängige Steigerung der ATP-induzierten Rezeptorantwort unter den organischen Anionen Glutamat und Aspartat, wohingegen die anorganischen Anionen Sulfat, Nitrat und in besonderem Maße Jodid zu einer Inhibierung führen. Speziesdifferent ist das stärkere Ausmaß der Hemmung durch anorganische Anionen am mP2X7 sowie die alleinige Beeinflussung der Potenz des Agonisten ATP⁴⁻ am mP2X7. Untersuchungen an der humanen Rezeptormutante P2X7^{S339Y}, mit dem alleinigen Vorliegen der hochaffinen ATP-Aktivierungsstelle, ergaben keine Beeinflussung durch Anionensubstitution. Dies lässt auf eine alleinige Anionenmodulation der Rezeptoraktivierung über die niedrigaffine Aktivierungsstelle schließen. Speziesdifferenzen im Ausmaß der Hemmung durch anorganische Anionen lassen sich durch einen größeren Anteil der niedrigaffinen Aktivierungsstelle des Gesamtstroms am mP2X7 gegenüber dem hP2X7 erklären.

Die Verwendung extrazellulärer Ca²⁺-Ionen führt zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplituden und signifikanten Umkehrpotentialverschiebungen in positivere Bereiche, deren Ursache in einer sekundären Aktivierung Ca²⁺-ionen aktivierter Chloridkanäle zu liegen scheint.

Folglich könnten frei werdende extrazelluläre anionische Proteine bei inflammatorischen Zell- und Gewebsschäden durch Verdrängung anorganischer Anionen eine Steigerung der P2X7-Rezeptorantwort induzieren.

Kubick, Christoph, Einfluss extrazellulärer Anionen auf den P2X7-Rezeptor, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 68 Seiten, 2011.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Historie der Entdeckung purinerger Signalwege.....	1
1.2 P1-Purinozeptoren	2
1.3 P2-Purinozeptoren	3
1.3.1 P2Y-Rezeptoren	3
1.3.2 P2X-Rezeptoren	4
1.4 P2X7-Rezeptor	6
1.4.1 Molekulare Eigenschaften	6
1.4.2 Charakterisierung auf Einzelkanalebene	7
1.4.3 Agonisten.....	8
1.4.4 Antagonisten.....	8
1.4.5 Signalkaskaden	10
1.4.6 Porenbildung	10
1.4.7 Speziesdifferenzen.....	12
1.4.8 Vorkommen und klinische Bedeutung	13
2. Zielstellung	16
3. Material und Methodik.....	17
3.1 Material	17
3.2 Methoden.....	17
3.2.1 Kultivierung der RAW-Makrophagen.....	17
3.2.2 RNA Präparation zur Injektion in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	18
3.2.3 Präparation der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	18
3.3 Elektrophysiologie.....	19
3.3.1 RAW-Makrophagen	19
3.3.2 <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	20
3.4 Datenverarbeitung	21
3.5 Verwendete Lösungen.....	22
4. Ergebnisse	23
4.1 Einfluss von extrazellulären Anionen auf den murinen P2X7-Rezeptor in RAW-Makrophagen	23
4.1.1 Relative Amplituden ATP ⁴⁻ -induzierter Ströme.....	23
4.1.2 ATP ⁴⁻ -Konzentrations-Wirkungs-Kurven	25
4.1.3 Strom-Spannungs-Charakteristiken.....	27
4.2 Einfluss von extrazellulären Anionen auf humane und murine P2X7-Rezeptoren sowie die humane P2X7 ^{S339Y} -Rezeptormutante heterolog exprimiert in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	28
4.2.1 Relative Amplituden ATP ⁴⁻ -induzierter Ströme am humanen und murinen P2X7-Rezeptor	28
4.2.2 Jodid-Konzentrations-Wirkungs-Kurven am humanen und murinen P2X7-Rezeptor.....	30
4.2.3 ATP ⁴⁻ -Konzentrations-Wirkungs-Kurven am humanen P2X7-Rezeptor.....	32
4.2.4 ATP ⁴⁻ -Konzentrations-Wirkungs-Kurven am murinen P2X7-Rezeptor	34

4.2.5	Strom-Spannungs-Charakteristiken am humanen und murinen P2X7-Rezeptor.....	36
4.2.6	Relative Stromamplituden an der humanen P2X7 ^{S339Y} -Rezeptormutante.....	38
4.2.7	Strom-Spannungs-Charakteristiken an der humanen P2X7 ^{S339Y} -Rezeptormutante.....	39
5.	Diskussion.....	41
5.1	Datenlage.....	41
5.2	Anionenimpermeabilität der P2X7-Rezeptoren.....	43
5.3	Allosterische Beeinflussung der ATP ⁴⁻ -Bindungsstelle am murinen P2X7-Rezeptor.....	44
5.4	Mechanismus der Beeinflussung durch extrazelluläre Anionen am humanen P2X7-Rezeptor.....	45
5.5	Hypothese des unterschiedlichen Einflusses auf die Potenz des Agonisten am humanen und murinen P2X7-Rezeptor.....	45
5.6	Speziesdifferenzen relativer Amplituden bei anorganischen Anionen.....	47
5.7	Bedeutung des Ca ²⁺ -Ions auf die Messung von Ganzzellströmen.....	48
5.8	Bedeutung im Organismus.....	49
6.	Zusammenfassung.....	53
7.	Literaturverzeichnis.....	56
8.	Thesen.....	67

Anhang

- A-I Tabellarischer Lebenslauf
- A-II Selbständigkeitserklärung
- A-III Publikation
- A-IV Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

2-meSATP	2-methyl-thio-Adenosintri-phosphat
A-438079	3-(5-(2,3-dichlorophenyl)-1H-tetrazol-1-yl)methyl pyridine
A-740003	N-(1-(((cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl) amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide
$\alpha\beta$ -Me-ATP	alpha,beta-methylene-ATP
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	One-way repeated measures analysis of variance
Asn284	Asparagin an Position 284 einer Aminosäurekette
ATP	Adenosinmonophosphat
ATP ⁴⁻	Freies Adenosintri-phosphat
ATP γ S	5'-O-(3-thiotriphosphat)
Ba ²⁺	Bariumion
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'- Tetraessigsäure
BBG	Brilliant Blue G
BzATP	2'3'-O-(4-benzoyl)-benzoyl-ATP
Ca ²⁺	Calciumion
CaCCs	Calcium aktivierte Chloridkanäle
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase 1 = ICE	Interleukin-1- konvertierendes Enzym
Cd ²⁺	Cadmiumion
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
Co ²⁺	Cobaltion
COX II	Cyclooxygenase II
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
Cu ²⁺	Kupferion
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	halbmaximale Aktivierungskonzentration
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure

ERK 1/2	durch extrazelluläres Signal regulierte Proteinkinase
FCS	fetales Kälberserum
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HEK 293 Zellen	humane embryonale Nierenzellen 293
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
hP2X7	humaner P2X7-Rezeptor (P2X7-Rezeptor des Menschen)
hP2X7 ^{S339Y}	hP2X7-Rezeptormutante mit Austausch der Aminosäure Serin gegen Tyrosin an Position 339 der Aminosäure-Sequenz
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
ICE	Interleukin1-konvertierendes Enzym
IL	Interleukin
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
KD-Wert	Dissoziationskonstante
KN-04	N-[1-[N-methyl-p-(5-isoquinoline sulphonyl)benzyl]-2-(4-phenylpiperazine)ethyl]-5-isoquinolinesulphonamid
KN-62	1-[N,O-bis(5-isoquinolinsulfonyl)-N-Methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin
1MA ⁺	monomethylammonium ⁺
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgATP	Magnesiumadenosintriphosphat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mn ²⁺	Manganion
mP2X7	muriner P2X7-Rezeptor (P2X7-Rezeptor der Maus)
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear Factor of κB
NF279	8,8'-(carbonylbis(imino-4,1-phenylenecarbonylimino-4,1-phenylenecarbonylimino))bis(1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid)
Ni ²⁺	Nickelion
NO	Stickstoffmonoxid
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NMDG ⁺	N-methyl-D-glucamine ⁺
oATP	oxidiertes ATP (2',3'-Dialdehyd-ATP)
Ori	Oozyten-Ringer-Lösung

PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der freien Protonen-Konzentration
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLD	Phospholipase D
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonat
Pro-IL-1 β	Vorstufe des Interleukin 1 β
RAW 264.7	Monozyten-Zelllinie der Maus, induziert durch belson murine leukemia virus
RNA	Ribonukleinsäure
rP2X7	rodent P2X7-Rezeptor (P2X7-Rezeptor der Ratte)
S1P	Sphingosin 1-phosphat
SD	Standardabweichung
SLC17A9	solute carrier family 17, member 9
Sr ²⁺	Strontiumion
Tab.	Tabelle
THP-1 Zellen	humane akute monozytäre leukämie Zelllinie
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
YO-PRO-1	fluoreszierende Propidium-Verbindung
Zn ²⁺	Zinkion
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Historie der Entdeckung purinerger Signalwege

Adenosintriphosphat (ATP) besitzt eine Schlüsselrolle im Energiestoffwechsel von Lebewesen. Chemisch betrachtet setzt sich das Molekül aus der Purinbase Adenin, einem Pentosezucker (β -D-Ribose) und einem Triphosphat zusammen. ATP stellt mit seinen 3 Phosphaten, welche am Pentosezucker kovalent gebunden sind, das energiereichste adeninhaltige Nukleotid dar. Mit sinkender Anzahl der Phosphatverbindungen in Form von Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) verliert das Molekül an Energie. ATP wirkt somit als Energiespeicher, wobei die Energiebereitstellung des ATP durch Hydrolyse zu ADP erfolgt. Dieser Mechanismus spielt z.B. bei der Muskelkontraktion eine wichtige Rolle. Jedoch kommt dem Molekül ATP auch eine zunehmend ins Interesse gerückte Bedeutung bei der Vermittlung von extrazellulären Signalen zu. ATP übernimmt also ebenfalls die Aufgabe eines wichtigen Signalmoleküls an purinergeren Rezeptoren. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte P2X7-Rezeptor findet in dem frei in Lösung vorliegenden ATP⁴⁺ seinen natürlich vorkommenden Agonisten. Den chemischen Verwandten des ATP wie ADP, AMP und Adenosin kommt ebenfalls eine wichtige Rolle an purinergeren Rezeptoren zu, auf deren Klassifikation an späterer Stelle eingegangen wird. Erste Entdeckungen bei der purinergeren Signalübertragung wurden bereits 1929 mit aus Herzmuskel isoliertem AMP und Adenosin gemacht (Drury and Szent-Gyorgyi, 1929). So kam es nach intravenöser Injektion in Versuchstieren zu einer Senkung der Herzfrequenz durch Abnahme der Leitfähigkeit des Erregungsleitungssystems, zur Dilatation arterieller Gefäße und einer Hemmung der intestinalen Motilität. So dient Adenosin heute zum Beispiel im klinischen Alltag als Pharmakon zur Durchbrechung von Reentry-Tachykardien. Nur wenige Jahre später gab es bereits erste Untersuchungen, welche Konsequenzen chemische Modifikationen am Adenosintriphosphat nach sich ziehen. So fanden Gillespie et. al heraus, dass ATP die stärkste Störung der Erregungsweiterleitung am Herzen aufweist. Des Weiteren weist eine Veränderung am ATP-Molekül in Form einer Deaminierung den größten Wirkungsverlust auf (Gillespie, 1934). Durch Dephosphorylierung entstandenes ADP oder AMP führt zu einer Senkung des Blutdrucks und zu einer Dilatation von Koronargefäßen, da das Vorhandensein der letztgenannten Moleküle ein Zeichen des Energiemangels darstellt, dem durch eine verstärkte Durchblutung entgegengewirkt werden kann. An der glatten Muskulatur von Ileum und Uterus des Meerschweinchens konnte hingegen eine Muskelkontraktion durch ATP Applikation nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass es aufgrund unterschiedlicher Reaktionen nach Stimulation mit differenten Purinen auch verschiedene Purinozeptoren geben muss. Den ersten Beweis für das Vorhandensein von Adenosinrezeptoren

erbrachten Sattin und Rall. Sie konnten mit Hilfe von Methylxanthinen die adenosinvermittelte Akkumulation von cyclischem AMP (cAMP) an Schnitten von Meerschweinchenhirnen hemmen (Sattin and Rall, 1970). Andere Untersuchungen der Purine stützten sich auf die ADP-abhängige Beeinflussung der Plättchenaggregation (Born, 1962) sowie der Histaminfreisetzung von Mastzellen (Cockcroft and Gomperts, 1980).

Parallel zu diesen Erkenntnissen über die vielfältigen Effekte durch Stimulation purinergere Substanzen wurden ebenfalls die Quellen der purinergen Signalstoffe und die Auslöser ihrer Freisetzung untersucht. So konnte als eine Adenosinquelle das Herz unter hypoxischen Bedingungen ausgemacht werden. Die vasodilatierende Eigenschaft des Adenosin spielt somit eine wichtige Rolle in der reaktiven Hyperämie (Berne, 1963; Gerlach et al., 1963). Nachdem eine ATP Freisetzung aus der sich kontrahierenden Skelettmuskulatur beschrieben wurde (Boyd and Forrester, 1968; Forrester and Lind, 1969), verdichtete sich die Hypothese, dass Adenosinderivate an der Regulation des Blutflusses, je nach metabolischer Situation des Organsystems, beteiligt sind. Neben diesen humoralen Signalübertragungen konnte in den fünfziger Jahren ein Hinweis auf eine Funktion des ATP als Neurotransmitter gefunden werden. Diesen Hinweis lieferten Untersuchungen, in denen eine Freisetzung von ATP aus dem Nervus auricularis nachgewiesen werden konnte (Holton and Holton, 1953; Holton, 1959). Burnstock postulierte im Anschluss das Vorhandensein von ATP als weiteren im Organismus neben den bereits bekannten Acetylcholin und Adrenalin vorkommenden Neurotransmitter. Mittlerweile ist die Rolle der Purine als Neurotransmitter, Cotransmitter und humoralen Mediator im peripheren und zentralen Nervensystem gut bekannt (Ralevic and Burnstock, 1998). So verwundert es nicht, dass Purine von vielen Zelltypen unter physiologischen wie pathophysiologischen Bedingungen freigesetzt werden können. Nebennierenmarkzellen, Thrombozyten, Mastzellen, Erythrozyten, basophile Leukozyten, Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen wurden als wichtige Quellen von purinen Mediatorstoffen bei Gewebhypoxie, Zelluntergängen oder aber auch bei der Blutgerinnung entdeckt (Ralevic and Burnstock, 1998). Diese Vielfalt an Rezeptoren erforderte bereits 1978 eine erste Klassifikation, welche in modifizierter Form bis heute Gültigkeit hat (Burnstock, 1978). Der erste Grad der Einteilung purinergere Rezeptoren richtet sich nach deren Agonisten. So unterscheidet man „P1-Purinorezeptoren“ von „P2-Purinorezeptoren“.

1.2 P1-Purinozeptoren

P1-Purinozeptoren werden von Adenosin als natürlich vorkommenden Agonisten aktiviert, daher findet sich im Sprachgebrauch auch die synonyme Bezeichnung als Adenosinrezeptor. Des Weiteren gilt die Antagonisierbarkeit durch Methylxanthin und die Signalübertragung mittels des second messengers cAMP als typisches Charakteristikum. Eine differenziertere

Unterteilung der P1-Rezeptoren erfolgt anhand der Molekülstrukturen, ihrer pharmakologischen Eigenschaften und den von ihnen ausgelösten intrazellulären Signalkaskaden. So unterteilen sich die P1-Purinorezeptoren in vier Subtypen (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3). Allen gemeinsam ist die Kopplung der Signaltransduktion an G-Proteine bei jedoch unterschiedlichen vorliegenden Signalkaskaden. So kommt es zu einer Aktivierung (A_{2A}), beziehungsweise Hemmung (A_1 , A_3) der Adenylatcyclase und/oder zu einer Aktivierung der Phospholipase C (A_1 , A_{2B} , A_3). P1-Rezeptoren besitzen die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typischen 7 transmembranären Domänen, gebildet durch je 21-28 hydrophobe hoch konservierte Aminosäuren. Das N-terminale Ende des Proteins befindet sich extrazellulär, wohingegen die C-terminale Aminosäurenkette intrazellulär liegt (Ralevic and Burnstock, 1998).

1.3 P2-Purinozeptoren

Die andere große Rezeptorklasse bilden die P2-Purinorezeptoren, welche vorwiegend durch Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Uridintriphosphat (UTP) erregt werden. Die weitere Unterteilung dieser Rezeptorklasse gründet in der Entdeckung ihrer grundlegend verschiedenen Mechanismen der Signaltransduktion. So wurden zuerst durch ATP aktivierte Ionenkanäle (Benham and Tsien, 1987) entdeckt, welche die Bezeichnung P2X erhielten. Vier Jahre später folgte die Beschreibung von G-Protein gekoppelten ATP Rezeptoren (Dubyak, 1991) unter der später folgenden Bezeichnung P2Y (Abbraccio and Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1994). Auf dieser Basis konnte die alte fehlerhafte Nomenklatur P_{2X} , P_{2Y} , P_{2U} , P_{2T} und P_{2Z} abgelöst werden (Ralevic and Burnstock, 1998).

1.3.1 P2Y-Rezeptoren

Die $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ und $P2Y_{14}$ Rezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die lückenhafte numerische Fußnotenomenklatur hat ihre Ursache in einer frühzeitigen und (wie sich später herausstellte) fehlerhaften Zuordnung von anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder bereits eindeutig identifizierter P2Y-Rezeptoren. So ist der $p2y3$ -Rezeptor im Genom von Vögeln der homologe Vertreter des $P2Y_6$ -Rezeptors in Organismen von Säugetieren (Li et al., 1998). $p2y3$, $p2y5$, $p2y7$, $p2y9$ und $p2y10$ sind bewiesenermaßen keine P2Y-Rezeptoren und fallen somit aus der Klassifikation heraus (Herold et al., 1997; Li et al., 1997b; Noguchi et al., 2003; Murakami et al., 2008). P2Y-Rezeptoren haben eine Länge von 308 bis 377 Aminosäuren und besitzen, ähnlich wie andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren, sieben transmembranäre Strukturen, welche die Tertiärstruktur bilden. Der Großteil der P2Y-Rezeptoren bedient sich mittels G-Protein gekoppelter Aktivierung der Phospholipase C. Dies führt zur Bildung von Inositoltriphosphat

(IP₃) mit der darauffolgenden Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Im Anschluss daran kann eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen folgen, wie zum Beispiel die Aktivierung der Proteinkinase C, der Phospholipase A₂ und der Ca²⁺ abhängigen NO-Synthetase mit Bildung des starken Gefäßdilators Stickstoffmonoxid (NO) (Boyer et al., 1992; Barnard et al., 1994). Andere P2Y-Rezeptoren bedienen sich in ihrer Signaltransduktion der Adenylatcyclase mit Erhöhung (P2Y₆, P2Y₁₁) bzw. Erniedrigung (P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) der Konzentration des second messengers cAMP (King and Townsend-Nicholson, 2003). Die Zeitspanne der Rezeptorantwort bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren umfasst eine Dauer von wenigen Sekunden und wird von den P2X-Rezeptoren noch deutlich unterboten (s.u.). Zwar wird der Großteil der P2Y-Rezeptoren von ATP oder ADP erregt, jedoch führen auch die Pyrimidine UTP und UDP zu einer Rezeptorantwort. Daher wird der Begriff der P2-Rezeptoren in der Nomenklatur gegenüber der Bezeichnung Purinozeptoren bevorzugt (Jacobson et al., 2000; King and Townsend-Nicholson, 2003).

1.3.2 P2X-Rezeptoren

Die Gruppe der P2X-Rezeptoren umfasst sieben verschiedene Ionenkanäle (P2X₁₋₇) mit einer sehr kurzen Reaktionszeit unter 10 ms (Bean, 1992). Erstmals gelang die Klonierung eines P2X-Rezeptors im Jahre 1994 (Valera et al., 1994). Im Anschluss offenbarte sich früh die weite Verteilung in Geweben von Vertebraten und Eukaryonten. So finden sich P2X-Rezeptoren im Nervensystem (autonome, zentrale, enterische und sensorische Neurone, Cochlea und Retina Zellen), im Gefäßsystem (Kardiomyozyten, Endothel und glatter Muskulatur), im Atmungs- und Verdauungssystem (Epithel, glatte Muskulatur der Darmwand), im Skelettmuskel, in Knochen und im hämatopoetischen System (Jacobson, 2010). Die Quartärstruktur der P2X-Rezeptorfamilie setzt sich aus drei homologen Proteinen mit einer Länge von je 384 (P2X₄) bis 595 (P2X₇) Aminosäuren zusammen. Hinweise dafür lieferten Untersuchungen mittels der Gelelektrophorese (Nicke et al., 1998). Im Jahre 2005 konnte diese Annahme erstmals visuell mittels der Elektronen- und Atomkraftmikroskopie untermauert werden (Barrera et al., 2005; Mio et al., 2005). Vier Jahre später bestätigten Röntgenstrukturanalysen am kristallisierten P2X₄-Rezeptor des Zebrafisches den trimeren Aufbau von P2X-Rezeptoren (Kawate et al., 2009). Wie bereits erwähnt bilden drei homologe Proteine einen Rezeptorkomplex, wobei sie je zwei hydrophobe Domänen in α -Helix-Struktur ausbilden. Die zwischen jenen hochkonservierten hydrophoben Domänen liegenden Abschnitte mit einer Länge von circa 280 Aminosäuren bilden den extrazellulären Anteil des Rezeptors. Auffällig ist das Vorkommen von 10 konservierten Cysteinresten, welche auf mehrere Exons verteilt sind (North, 2002). Ihnen könnte entscheidende Bedeutung bei der Ausbildung der Tertiärstruktur im Sinne von

Disulfidbrücken und der Änderung der Rezeptorkonformation durch die Bindung von Kationen zukommen. Die Substitution der Cysteine durch Alanine führte zu einer deutlichen Abschwächung der Rezeptorantwort (Clyne et al., 2002). Mit einer extrazellulären Schleife und zwei transmembranären Domänen liegen die N- und C-Termina folglich intrazellulär, wobei diese Schlussfolgerung mittels FLAG Tag markierten Rezeptoren an N- und C-Terminus bewiesen wurde (Torres et al., 1998b). So konnten entsprechende extrazellulär applizierte Antikörper nur nach Permeabilisierung der Zellmembran binden. Alle 7 P2X-Rezeptoren weisen übereinstimmende Sequenzen am N-Terminus auf. Der Glykosylierung an N-terminalen Aspartatresten kommt entscheidende Bedeutung beim Transport des Proteins in die Zellmembran zu. P2X-Mutanten ohne eben diese Aspartate am N-Terminus verbleiben im Zellinneren und bilden keine funktionsfähigen Rezeptoren aus (Newbolt et al., 1998; Torres et al., 1998a). Ähnliche Beobachtungen konnten im intrazellulären C-Terminus des Proteins gemacht werden. So kommt es ebenfalls nach Mutationen in einem bestimmten Motiv (YXXXX) 8 Aminosäuren nach Ende des transmembranären Abschnitts im C-Terminus zu einem herabgesetzten Einbau der Rezeptoren (P2X2-6) in die Zellmembran (Chaumont et al., 2004). Eine Besonderheit weist der P2X7-Rezeptor im C-terminalen Proteinabschnitt auf. Neben einer deutlich längeren Aminosäurekette findet sich eine weitere hydrophobe Domäne, welche die Zellmembran jedoch nicht durchzieht. Aus diesem Unterschied heraus erklärt sich auch die geringste Sequenzhomologie des P2X7-Rezeptors im Vergleich zu den anderen Subtypen. Insgesamt geht man von einer Sequenzhomologie von 40 bis 55 Prozent aus wobei der P2X4-Rezeptor die größte Übereinstimmung mit seinen „Verwandten“ aufweist (North, 2002). Bemerkenswerterweise findet sich keine Sequenzhomologie zu anderen bekannten Proteinen. Es ist lediglich eine geringe Ähnlichkeit in der extrazellulären Schleife zur Aminoacyl-tRNS Synthetase der Klasse II beschrieben worden (Freist et al., 1998; Kawate et al., 2009).

Der Mechanismus der Signaltransduktion vollzieht sich, wie für Ionenkanäle bekannt, über eine Öffnung des Rezeptorkanals nach Bindung des Liganden. So kommt es zum Ausstrom von K^+ , wichtig für die Aktivierung der Caspase 1 = ICE (Interleukin1-konvertierendes Enzym) und zum Einstrom von Kationen vorwiegend in der Form von Na^+ und in geringerem Maße von Ca^{2+} Ionen (Egan and Khakh, 2004).

Neben der extrazellulären ATP^{4-} Konzentration gibt es vielfältige Einflussgrößen auf die Rezeptorantwort. Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} führen zu einer Verminderung der Potenz des Agonisten ATP^{4-} . Dies geschieht durch die Bildung von $MgATP^{2-}$ und $CaATP^{2-}$ Chelatkomplexen, wodurch die Konzentration des wirksamen Agonisten ATP^{4-} verringert wird (Ralevic and Burnstock, 1998). Des Weiteren zeigten Einzelkanaluntersuchungen, dass divalente Kationen ebenfalls eine allosterische Hemmung des Rezeptors aufweisen können (Nakazawa and Hess, 1993; Evans, 1996; Li et al., 1997a). Unterscheidet sich bei Mg^{2+} und

Ca²⁺ Ionen lediglich das Ausmaß der Hemmung zwischen den P2X-Subtypen, zeigen sich bei den weiteren divalenten Kationen Zn²⁺ und Cu²⁺ hingegen teilweise gegensätzliche Effekte auf P2X Rezeptoren. Zn²⁺ (<100 µM) hat einerseits eine Potenzierung an P2X2-, P2X4-, P2X5- und P2X6-Rezeptoren (Le et al., 1998; Xiong et al., 1999), andererseits eine Hemmung an P2X1- und P2X7-Rezeptoren (Virginio et al., 1997) zur Folge und lässt den P2X3-Rezeptor unbeeinflusst. Cu²⁺ inhibiert den P2X7-Rezeptor (Virginio et al., 1997; Acuna-Castillo et al., 2007), zeigt keine Beeinflussung des P2X4-Rezeptors (Xiong et al., 1999) und führt zu einer gesteigerten Aktivierung des P2X2-Rezeptors. Ebenso unterliegen die P2X-Rezeptoren einer Beeinflussung durch extrazelluläre H⁺-Ionen. Bei pH-Werten im aziden Bereich kommt es zu einer Inhibition an P2X1-, P2X3-5- und P2X7-Rezeptoren und einer Zunahme der Agonistenaffinität am P2X2-Rezeptor (King et al., 1996; Stoop et al., 1997; Flittiger et al., 2010).

Pharmakologisch zeigen P2X-Rezeptoren ebenfalls gegensätzliche Reaktionen. Eine Einteilung der P2X-Rezeptorfamilie bietet außerdem das Desensitivierungsverhalten. Hierbei gibt es P2X1- und P2X3-Rezeptoren, welche schnell desensitivieren und sensitiv gegenüber αβ-Me-ATP sind (Ralevic and Burnstock, 1998). Das heißt, nach wiederholter beziehungsweise länger andauernder Agonistenapplikation im Bereich von wenigen Zehntelsekunden kommt es zu einer verringerten bis aufgehobenen Rezeptorantwort. Bei den langsamen beziehungsweise nicht desensitivierenden P2X2-, P2X4- und P2X6-Rezeptoren erfolgt das vorhergehend erläuterte Verhalten merklich verzögert oder bleibt gänzlich aus (Ralevic and Burnstock, 1998).

1.4 P2X7-Rezeptor

1.4.1 Molekulare Eigenschaften

Analog zu den bereits aufgeführten P2X-Rezeptoren bilden drei Polypeptidketten einen Rezeptorkomplex, d.h. der vollständige Rezeptor liegt als Trimer vor. Insbesondere P2X7-Untereinheiten schienen dabei ausschließlich homologe Rezeptoren zu bilden (Torres et al., 1999). Lediglich eine Heteromerenbildung mit dem P2X4-Rezeptor konnte in jüngerer Vergangenheit beschrieben werden (Dubyak, 2007; Guo et al., 2007). Festzuhalten ist jedoch, dass der homomere P2X7-Rezeptor der bevorzugte und am häufigsten vorkommende Assoziationsstatus ist (Nicke, 2008). Der augenscheinlich größte Unterschied des P2X7-Rezeptors zum Rest der P2X-Rezeptorfamilie ist dessen innerhalb der P2X-Rezeptorfamilie längste Sequenz der Rezeptoruntereinheiten von 595 Aminosäuren. Ursächlich hierfür ist das entsprechend längste C-terminale Ende, welches sich trotz seiner zusätzlichen hydrophoben Domäne zwischen AS 510 und 530 komplett intrazellulär befindet. Eben diesem C-terminalen

Ende werden besondere Eigenschaften der P2X7-Rezeptorfunktion wie die Bildung einer großen permeablen Pore und die Beteiligung an Immunantworten und dem Apoptosegeschehen (s.u.) zugeschrieben. Am humanen Rezeptor konnten hoch- und niedrig-affine ATP Bindungsstellen identifiziert werden (Klapperstück et al., 2001). Fraglich ist dabei, ob eine vorgegebene unterschiedliche Affinität der Bindungsstellen vorbesteht oder nach Bindung eines negativ geladenen ATP⁴⁻ die Bindung weiterer ATP⁴⁻-Moleküle elektrostatisch oder allosterisch gehemmt wird. Den zwei Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität und daraus resultierenden unterschiedlichen Werten der halbmaximalen Erregung (KD-Werte ATP⁴⁻ hochaffin: 4 µM / niedrigaffin 220 µM) könnte eine Bedeutung bei teils sehr unterschiedlichem Rezeptorverhalten bei unterschiedlichen Agonistenkonzentrationen zukommen. So fanden sich wachstumsfördernde Effekte nach Stimulation des P2X7-Rezeptors mit niedrigen ATP-Konzentrationen bei einer starken Expression des P2X7-Rezeptors auf Tumorzellen, wohingegen lang andauernde wie hochdosierte ATP Applikationen zum Zelluntergang durch eine beschriebene Porenbildung führten (Klapperstück et al., 2001; Adinolfi et al., 2009).

1.4.2 Charakterisierung auf Einzelkanalebene

Einzelkanaluntersuchungen am hP2X7 zeigten 2 Typen ATP⁴⁻ induzierter Einzelkanalströme, differenzierbar durch kurz und lang andauernde Kanalöffnungen. Die Öffnungszeiten liegen bei ca. 5 ms und 20 ms. Die entsprechenden Einzelkanalamplituden von 1,3 pA und 2,0 pA sowie die Einzelkanalleitfähigkeiten von 9 pS und 13 pS sind unabhängig von der applizierten ATP⁴⁻ Konzentration. Die applizierte Agonistendosis hat vielmehr einen Einfluss auf die Öffnungswahrscheinlichkeit des P2X7-Rezeptors (Riedel et al., 2007a). So begründet sich die Steigerung des Gesamtzellstroms bei zunehmender ATP⁴⁻ Konzentration in einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der gesamten vorliegenden Einzelkanäle.

Die Kinetik des ATP-abhängigen Öffnens und Schließens des P2X7-Rezeptors konnte durch ein Modell mit 3 geschlossenen und einem offenen Zustand (C-C-C-O) quantitativ beschrieben werden. Man geht hierbei von 2 ATP⁴⁻ Bindungsschritten an 2 gleichwertigen ATP⁴⁻ Bindungsstellen aus. Auf die diskutierte „Große Pore“ durch eine vermutete Kanalporendilatation fanden sich in Einzelkanalexperimenten keine Hinweise. Vielmehr liegt ein konstanter minimaler Porendurchmesser von etwa 8.5 Å vor. Eine Substitution des extrazellulären Natriums durch verschiedene Kationen wie zum Beispiel K⁺, NMDG⁺ oder 1MA⁺ führte zu einer drastischen Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit. Als Ursache wird von einer extrazellulären spannungsabhängigen Natriumbindungsstelle ausgegangen, welche den Übergang in den geschlossenen Zustand entsprechend dem Model C-C-C-O fördert (Riedel et al., 2007b).

1.4.3 Agonisten

Vier elektrophysiologische Merkmale unterscheiden den P2X7-Rezeptor grundsätzlich von anderen P2X-Rezeptoren (North, 2002).

- 1) die Benötigung hoher Dosen von ATP $>100 \mu\text{M}$, um den Rezeptor zu aktivieren
- 2) der Umstand, dass 2',3'-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP) um das 10-30 fache potenter ist als ATP
- 3) der Fakt, dass die Aktivierung durch ATP und BzATP durch Reduzierung bzw. Elimination der extrazellulären Ca^{2+} und Mg^{2+} Konzentration potenziert werden kann
- 4) die Beeinflussung der Stromamplitude und der Erregungszeitverläufe nach mehrmaliger Applikation des gleichen Agonisten

Hierbei ist zu erwähnen, dass BzATP jedoch kein selektiver Agonist am P2X7-Rezeptor ist, da er auch an P2X1- und P2X3-Rezeptoren zu einer Rezeptorantwort führt (Bianchi et al., 1999). Weitere Agonisten in absteigender Reihenfolge sind ATP, 2-meSATP und ATP γ S (Surprenant et al., 1996). ADP und AMP sind wenig potente Agonisten. Jedoch nimmt deren Potenz nach Applikation von ATP zu, wenngleich sie schwache Agonisten im Vergleich zu ATP am P2X7-Rezeptor bleiben. Diesem Effekt scheint eine immunmodulatorische Bedeutung zuzukommen. So zeigt sich auch eine IL1- β Freisetzung bei Kontakt der Zelle mit ADP und AMP wenn zuvor eine Erregung durch ATP stattgefunden hat (Chakfe et al., 2002). Bei einer solch länger andauernden Modifikation könnte es sich um eine Phosphorylierung handeln. Allerdings ist ADP nicht in der Lage, einzelne P2X7-Rezeptor-Ionenkanäle zu öffnen (Markwardt et al., 1997; Riedel et al., 2007a). Als aktiver P2X7-Ligand wird genau genommen freies ATP $^{4-}$ angenommen (North, 2002). Hierfür sprechen die Tatsachen, dass freies ATP $^{4-}$ nur einen kleinen Teil des gesamten ATP ausmacht und somit große Mengen ATP zur Erregung benötigt werden, sowie die Hemmung des P2X7-Rezeptors durch divalente Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , welche Chelatkomplexe mit dem freien ATP $^{4-}$ bilden und dieses somit binden.

1.4.4 Antagonisten

Antagonisten rückten zunehmend ins Interesse, nachdem die Beteiligung des P2X7-Rezeptors an mehreren pathophysiologischen Vorgängen (s.u.) bekannt wurde. So stellen extrazelluläre Kationen eine große Gruppe mit Vertretern dar, welche hemmenden Einfluss auf den Rezeptor haben. Virginio et al. konnten eine Auflistung der Kationen nach Stärke der Inhibition aufstellen. So hemmen folgende Kationen konzentrationsabhängig den rP2X7 in absteigender Reihenfolge; $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} = \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+} = \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} = \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$

unabhängig von der Membranspannung (Virginio et al., 1997). Wie bereits erwähnt führen Kupfer (Cu^{2+}) und Zink (Zn^{2+}) an P2X1-6-Rezeptoren im Gegensatz zu den obigen Ergebnissen zu einer Potenzierung der gemessenen Ströme. Eine Senkung des extrazellulären pH-Wertes (7,4>6,4) führt zu einer Verminderung der Stromamplitude und Verlangsamung der Deaktivierung. Die Inhibition erfolgt durch Protonierung von ATP^{4-} und der damit verbundenen Reduzierung des wirksamen Agonisten. Des Weiteren kommt es zu einer allosterischen Interaktion mit dem P2X7-Rezeptor mit der Folge einer Verminderung der Öffnungswahrscheinlichkeit am Einzelkanal bei unbeeinflusster Einzelkanalamplitude und Einzelkanalöffnungszeit. Die Rezeptormodulation bei einem sauren pH Wert vollzieht sich dabei vorwiegend bei Rezeptoraktivierung über die niedrigaffinen Aktivierungsstellen (Flittiger et al., 2010).

Eine weitere Gruppe stellen gewöhnliche Inhibitoren an P2X-Rezeptoren dar. So zum Beispiel Suramin ($\text{IC}_{50} > 300 \mu\text{M}$ am P2X7 der Ratte) das Ströme noch relativ unspezifisch blockt (Surprenant et al., 1996). Die Suraminanaloga NF279 ($\text{IC}_{50} \sim 10 \mu\text{M}$) und PPADS ($\text{IC}_{50} \sim 3 \mu\text{M}$ am hP2X7 mit dreiminütiger Inkubation, 0 Mg^{2+} und $0,5 \text{ Ca}^{2+}$) weisen hingegen eine höhere Potenz auf (Klapperstück et al., 2000b; Michel et al., 2000). Der potenteste Vertreter dieser Gruppe scheint Brilliant Blue G (BBG) zu sein, welcher am P2X7-Rezeptor der Ratte durch 10 nM und am humanen P2X7 durch 200 nM zum reversiblen Block führt (Jiang et al., 2000). Oxidiertes ATP (oATP) hat nach ein- bis zweistündiger Inkubation einen irreversible Blockierung des P2X7-Rezeptors zur Folge (Surprenant et al., 1996). Die dritte sich abgrenzende Gruppe bilden große organische Kationen, zu denen Calmidazolium und KN-62 zählen. Calmidazolium stellt aufgrund seiner nicht-kompetitiven Hemmung des Kationeneinstroms (Inhibition rP2X7 > hP2X7 (Michel et al., 2000) ohne Beeinträchtigung der Aufnahme größerer Moleküle wie YO-PRO 1 (Virginio et al., 1997) eine Besonderheit dar. Calmidazolium blockt verschiedene Ionenkanäle und ist ebenfalls als intrazellulärer Calmodulinantagonist bekannt. Lediglich extrazellulär appliziertes Calmidazolium führt zu einer Hemmung des P2X7-Rezeptors, woraus sich schließen lässt, dass es Calmodulin-unabhängig zu einer selektiven Kanalblockade ohne Beeinträchtigung der Porenbildung führt oder aber eine allosterische Veränderung des Rezeptors nach sich zieht. Den Piperazinen KN 62 und KN 04 kommt eine ähnliche Bedeutung als Calcium-Calmodulin Proteinkinase II Inhibitor zu. Anders als bei Calmidazolium liegt hier jedoch eine ausgeprägtere Hemmung des hP2X7-Rezeptors im Vergleich zum rP2X7 vor (Humphreys et al., 1998). Das Sexualhormon 17β -Estradiol führt ebenfalls zu einer ausgeprägten Hemmung ($\text{IC}_{50} \sim 3 \mu\text{M}$) des Rezeptors. Weitere Hormone wie 17α -Estradiol und Progesteron blieben in Untersuchungen wirkungslos (Cario-Toumaniantz et al., 1998). Neuere selektive Antagonisten aus vielfältigen chemischen Strukturklassen (zyklische Imide, adamantane Amide, Diarylimidazoline, Cyanoguanidine,

substituierte Aryltetrazole und Arylhydrazide) mit bevorzugter Wirkung am humanen P2X7-Rezeptor sind bedeutende Hoffnungsträger in der Entwicklung neuer verträglicher, selektiver Analgetika, Antiphlogistika und sogar Zytostatika (Nelson et al., 2008; Romagnoli et al., 2008; Carroll et al., 2009; Di Virgilio et al., 2009). Zwei Vertreter, welche eine selektive Antagonisierung des P2X7-Rezeptors aufweisen, konnten mit A-740003 und A-438079 gefunden werden. Bemerkenswert ist die geringe Abhängigkeit des Ausmaßes der Blockierung von der Inkubationszeit und der Art des P2X7-Rezeptor abhängigen Effekts wie Kationeneinstrom, YO-PRO-1 Aufnahme oder die Poren-Formation (Honore et al., 2006; McGaraughty et al., 2007; Donnelly-Roberts et al., 2009).

1.4.5 Signalkaskaden

Neben einer Prozessierung des Pro-IL-1 β zum aktiven Entzündungsmediator IL-1 β durch Caspase 1 laufen nach Aktivierung des Ionenkanalproteins weitere Reaktionen ab, welche mittels intrazellulärer zweiter Botenstoffe mannigfaltige Reaktionen hervorrufen können. Erhöhte Konzentrationen von IL-1 β lösen die Aktivierung verschiedener Enzyme wie Stickstoffoxidsynthetase (NO-Synthetase), Cyclooxygenase II (COX II) und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) aus (Parvathenani et al., 2003; Burnstock, 2006). Der Aktivierung der Caspase 3 kommt ebenfalls Bedeutung bei cytolytischen Prozessen und der Porenformation zu. Hemmstoffe der Caspasen 1 und 3 verhindern eine Freisetzung von IL-1 β und die Aufnahme von YO-PRO-1 nach P2X7-Rezeptorstimulation (Perregaux et al., 2001; Donnelly-Roberts et al., 2004).

P2X7-Rezeptoraktivierung wird ebenfalls mit weiteren abwärts laufenden Signalkaskaden mit Beteiligung von Phospholipase D, Phospholipase A₂ und NF- κ B in Verbindung gebracht (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007). In Abhängigkeit von der receptorexprimierenden Zelle sind verschiedene MAP-Kinasen den P2X7-Rezeptoren nachgeschaltet. Beispielsweise findet in menschlichen Astrozytom-Zellen, jedoch nicht in differenzierten menschlichen THP-1 Zellen, eine P2X7 vermittelte Hochregulation von ERK1/2 statt. Sich anschließende Untersuchungen zeigten, dass ERK 1/2 durch extrazelluläre Nukleotide ohne Porenbildung aktiviert werden können. In THP-1 Zellen bewirkte BzATP eine Steigerung der p38 Expression, das an einem weiteren MAP-Kinase Signalweg beteiligt ist (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007).

1.4.6 Porenbildung

Wie bereits erwähnt handelt es sich beim P2X7-Rezeptor nicht ausschließlich um einen gewöhnlichen Ionenkanal durchlässig für kleine Kationen wie Na⁺, K⁺ und Ca²⁺. Eine besondere Bedeutung kommt ihm aufgrund seiner viel diskutierten Porenbildung zu, welche nach längerer

Stimulation von mehreren Sekunden bis Minuten eine transmembranäre Passage von Molekülen bis zu einer Größe von 900 Da zulässt (North, 2002; Ferrari et al., 2006). Die Porenbildung wurde zu Beginn mittels Aufnahme von großen Fluoreszenzfarbstoffen wie Ethidium und YO-PRO-1 untersucht (North, 2002). Anfangs war man der Ansicht, die Permeation solch großer Moleküle werde durch eine zunehmende Porendilatation ermöglicht.

Folgende Erkenntnisse stützen dieses Modell.

- der Permeabilitätszuwachs mit andauernder ATP Applikation (Virginio et al., 1999b)
- das Auftreten in heterologen Expressionsmodellen (HEK 293, Oozyten) (North, 2002)
- die Antagonisierung (Brilliant Blue G, Suramin, oATP) betrifft Kationeneinstrom und Fluoreszenzfarbstoffaufnahme (Virginio et al., 1999a)
- P2X2, P2X2/3 und P2X4 zeigen ebenfalls eine Permeabilitätssteigerung (North, 2002)

Jedoch lieferten mehrere weitere Studien Ergebnisse, welche für die Beteiligung weiterer Proteine sprechen.

- Maitotoxin öffnet ohne P2X7-Beteiligung eine Membranpore welche sich nicht von der „P2X7-Membranpore“ unterscheiden lässt (Schilling et al., 1999)
- die Abhängigkeit von second-messengern wie Ca^{2+} und MAP-Kinase (Faria et al., 2005)
- N-methyl-D-Glucoamin und YO-PRO-1 permeieren auf unterschiedlichen Wegen die Zellmembran (Jiang et al., 2005)
- Calmidazolium blockt den Ionenkanal und lässt die YO-PRO-1 Aufnahme unbeeinflusst (Virginio et al., 1997)
- in *Xenopus laevis* Oozyten konnte keine Porenbildung nachgewiesen werden, ebenso zeigten Einzelkanaluntersuchungen keine Porendilatation (Klapperstück et al., 2000a; Riedel et al., 2007b)
- bei Mutanten mit verkürztem C-Terminus unterbleibt die Porenbildung bei fortbestehender Ionenkanalaktivität (Surprenant et al., 1996)
- Nachweis der Beteiligung von Pannexin-1 an der Porenbildung (Pelegri and Surprenant, 2006)

Somit ist man nach derzeitigem Erkenntnisstand der Meinung, dass die beschriebene Pore durch ein eigenständiges, dem P2X7 differentes, Protein gebildet wird. Es deutet darauf hin, dass beim porenbildenden Prozess dem Protein Pannexin-1 eine bedeutende Beteiligung zukommt. Ebenso scheint die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins Pro-IL-1 β zu dem

Entzündungsinitiator IL-1 β abhängig vom Pannexin-1 zu sein. (Pelegriin and Surprenant, 2006). IL-1 β sowie die beschriebene Porenformation sind somit hauptverantwortlich für die Bezeichnung als „death-promoting-receptor“. Aufgrund der fehlenden Desensibilisierung bleibt die Pore bei anhaltender ATP Applikation über längere Zeit geöffnet. So kommt es unweigerlich zu einer massiven Störung der Zellhomöostase und dem darauffolgenden Zelluntergang. Inwieweit solche Umstände jedoch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen, bleibt vorerst Gegenstand weiterer Untersuchungen (North, 2002; Skaper et al., 2010).

1.4.7 Speziesdifferenzen

Erstmalig gelang die Klonierung des P2X7-Rezeptors im Jahre 1996 aus einer cDNA Bibliothek von Rattenhirnen (Surprenant et al., 1996). Nur kurze Zeit später folgte die Sequenzierung des humanen und im Anschluss des murinen P2X7-Rezeptors aus Monozyten bzw. Mikrogliazellen (Rassendren et al., 1997; Chessell et al., 1998). Ergänzend sei erwähnt, dass 2008 der P2X7-Rezeptor des Meerschweinchens und 2009 der des Hundes kloniert wurden (Fonfria et al., 2008; Roman et al., 2009). Speziespezifisch zeigen sich teils große Unterschiede im Rezeptorverhalten gemessen an der intrazellulären Ca²⁺ Aufnahme. BzATP fungiert am Ratten-, Maus- und Mensch-P2X7 nachfolgend als Agonist mit der höchsten Potenz. Jedoch wirkt BzATP 10-fach potenter am rP2X7 und hP2X7 gegenüber dem mP2X7. ATP besitzt am hP2X7 und mP2X7 lediglich ein Zehntel der Potenz von BzATP bei gleicher Wirksamkeit. Die Wirksamkeit von ATP im Vergleich zu BzATP am rP2X7 ist dabei hingegen auf ein Drittel herabgesetzt (Donnelly-Roberts et al., 2009). 2-meSATP und ATP γ S sind wenig potente reine Agonisten am hP2X7 und zeigen nur geringe bis fehlende agonistische Aktivität an anderen Säugetier P2X7-Rezeptoren. Der Antagonist PPADS blockt die BzATP induzierte Ca²⁺ Aufnahme in höherem Maße an Mensch- und Ratten-P2X7 im Vergleich zum Maus-P2X7 (Donnelly-Roberts et al., 2009). KN-62 und BBG blockieren selektiv den hP2X7 und rP2X7 ohne den mP2X7 zu beeinflussen (Gargett and Wiley, 1997; Jiang et al., 2000). Konzentrationsabhängig führt NF279 zu einer Hemmung des hP2X7 mit geringem Einfluss auf rP2X7 und mP2X7. Generationen neuerer Antagonisten wie A-740003 und A-438079 zeigen speziesübergreifend eine höhere Potenz an Säugetier P2X7-Rezeptoren mit bestehendem geringeren Effekt am mP2X7 (Donnelly-Roberts et al., 2009). Verantwortlich sind vermutlich kleine Unterschiede in der Aminosäuresequenz der speziesdifferenten P2X7-Rezeptoren, welche bereits große Unterschiede in der Potenz der Agonisten nach sich ziehen können (Hibell et al., 2000). Der Austausch einzelner Aminosäuren Asn284 und Lys127 aus der rP2X7-Rezeptoraminosäuresequenz auf den mP2X7-Rezeptor anstelle Asp284 und Ala127 vermittelt die 100fach höhere Sensitivität gegenüber BzATP am mP2X7. Die zehnfache Steigerung der

Sensitivität bei ATP-Applikation am mP2X7 wird allein durch den Einbau von Asn284 anstelle von Asp284 erreicht (Young et al., 2007). Speziesdifferenzen zeigen sich ebenfalls im Deaktivierungsverhalten. Bei wiederholter Applikation von BzATP (5-10 Mal) kommt es zu einer signifikanten Verlängerung der Deaktivierung am rP2X7 wohingegen dieser Effekt am humanen und murinen Rezeptor ausbleibt. Beim weniger potenten ATP ist diese Veränderung speziesübergreifend nicht zu beobachten. Das BzATP vermittelte Deaktivierungsverhalten unterstreicht die hohe Affinität des BzATP am rP2X7 und weist auf eine Sensibilisierung durch wiederholte Applikationen hin (Hibell et al., 2001). Wiederholte Applikationen mit 100 μ M des Agonisten BzATP am hP2X7 (≥ 8 mal) und mP2X7 (≥ 4 mal) ziehen eine signifikante Verstärkung des gemessenen Stroms nach sich, wohingegen die gemessenen Stromamplituden an rP2X7-vermittelten Strömen konstant bleiben. Werden jedoch submaximale BzATP Konzentrationen ($<100 \mu$ M) verwendet, zeigt sich ebenfalls eine Zunahme der Stromamplitude nach wiederholter Applikation am rP2X7. Der eben genannte Effekt konnte auch bei Verwendung von ATP nachgewiesen werden (Hibell et al., 2000). Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen erbrachten ebenfalls unterschiedliche Rezeptoreigenschaften. Die Aufnahme großer Moleküle wie des Fluoreszenzmarkers YO-PRO-1 nach lang andauernder ATP-Applikation ist ebenfalls speziesdifferent (Rassendren et al., 1997).

1.4.8 Vorkommen und klinische Bedeutung

Der P2X7-Rezeptor nimmt in der Familie der ATP-sensitiven unselektiven Ionenkanäle aufgrund vieler Eigenheiten eine Sonderstellung ein. P2X1-6-Rezeptoren spielen fast ausschließlich im Zentralnervensystem eine Rolle sowie vereinzelt auf glatter Muskulatur (P2X1 + P2X2), Pankreas (P2X2) und im Hodengewebe und Dickdarm (P2X4) (Jacobson, 2010). Dem P2X7 kommt hingegen in vielen Geweben des Organismus eine Funktion zu. Neben der bereits genannten Verteilung im Zentralnervensystem (Mikroglia, Schwannzellen sowie Astrozyten) (Collo et al., 1997; Sim et al., 2004) findet sich der P2X7-Rezeptor auch auf Zellen des hämatopoetischen Systems und des Immunsystems (Mastzellen, Lymphozyten, Erythrozyten, Fibroblasten, Makrophagen und epidermalen Langerhanszellen) (Surprenant et al., 1996) sowie im Knochengewebe (Grol et al., 2009) und dem Bronchialepithel (Riteau et al., 2010). Folglich ist der P2X7-Rezeptor an vielfältigen physiologischen wie auch pathologischen Prozessen in diesen Organsystemen involviert. Dementsprechend ließen Ergebnisse, welche eine weitläufige Beteiligung des P2X7-Rezeptors an verschiedenen Krankheitsbildern aufzeigten, nicht lange auf sich warten.

An P2X7 knock-out Mäusen verlief eine mittels monoklonaler Antikörper induzierte Arthritis in abgeschwächter Form (Labasi et al., 2002). Dem Rezeptor kommt somit eine entscheidende Rolle beim Entzündungsgeschehen zu. Dies wird deutlich, wenn die ablaufende Signalkaskade

nach P2X7-Rezeptor-vermittelter Freisetzung von IL1- β aus Makrophagen genauer betrachtet wird (Perregaux and Gabel, 1994; MacKenzie et al., 2001; Ferrari et al., 2006). Das Zytokin bewirkt an dessen Zielzellen die Hochregulation der Entzündungsantwort durch Freisetzung von Metalloproteinasen, der Cyclooxygenase-2, von Interleukin 6 (IL-6) und von Adhäsionsmolekülen (Samad et al., 2001; Solle et al., 2001). Im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus bewirkt IL1- β eine Steigerung der Rezeptorexpression und Sensitivierung und führt auf diese Weise zu einer Amplifikation der Entzündungsantwort. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das posttraumatische Ausmaß einer experimentell verursachten Schädigung des Rückenmarks mittels P2X7-Rezeptorantagonisten gedrosselt werden konnte, wobei dies an der funktionellen Wiederherstellung und der geringeren Schädigung des peritraumatischen Zellbereichs gemessen wurde (Wang et al., 2004). Weitere Krankheitsbilder in denen der P2X7-Rezeptor eine Rolle spielt sind der Morbus Alzheimer (Parvathenani et al., 2003), die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) (Di Virgilio and Wiley, 2002; Wiley et al., 2002; Cabrini et al., 2005), die Depression (Lucae et al., 2006), die interstitielle renale Fibrose durch Apoptose von mesangialen Zellen des Nierenglomerulus (Surprenant and North, 2009), die Thrombose (Moore and MacKenzie, 2007), die Tuberkulose (Fernando et al., 2007; Nino-Moreno et al., 2007), das allergische Asthma bronchiale (Muller et al., 2011) und Tumorerkrankungen wie beispielsweise das Neuroblastom (Raffaghello et al., 2006) und das papilläre Schilddrüsenkarzinom (Solini et al., 2008). Eine Erhöhung der P2X7-Rezeptordichte konnte ebenfalls in Prostata-, Brust- und Hauttumoren mittels histologischer Schnitte gefunden werden, ohne jedoch Informationen über die Rezeptoraktivität zu liefern (Di Virgilio et al., 2009). Pathophysiologisch erwähnenswert am Beispiel der Tuberkulose ist die Notwendigkeit der P2X7-Stimulation in Makrophagen, um mittels Aktinpolymerisation eine Verschmelzung von Phagosomen und Lysosomen zu erreichen (Fairbairn et al., 2001; Kuehnel et al., 2009a; Kuehnel et al., 2009b). Weiterhin ist die Expression von P2X7-Rezeptoren in Makrophagen, welche zu mehrkernigen Riesenzellen verschmelzen und bei der Granulombildung (verkäsenden Nekrose) essentielle Bestandteile sind, deutlich erhöht (Chiozzi et al., 1997).

Der Aktivierung des P2X7 Rezeptors kommt ebenfalls in der Nozizeption eine bedeutende Rolle zu. Dieser Einfluss erklärt sich durch die Vielfalt an Schmerzzuständen, in denen ATP freigesetzt werden kann. Dies unterstützt die Ansicht, dass der P2X7-Rezeptor einen neuen Mediator in der Schmerzübertragung darstellt (Parvathenani et al., 2003). P2X7-Rezeptorantagonisten (A-438079/A740003) erzeugen im Mausmodell eine dosisabhängige Hemmung von neuropathischem und entzündlichem Schmerz (Honore et al., 2006; Nelson et al., 2006). Diese Erkenntnisse weckten großes Interesse an der Entwicklung von pharmazeutischen P2X7-Rezeptor Antagonisten, welche sich zum Teil bereits in klinischer Erprobung befinden. Die Firma evotec AG Germany/Hamburg hat eine Phase 1 Studie zur

Erprobung des P2X7-Antagonisten EVT 401 zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis nach ihren Angaben erfolgreich abgeschlossen.

<http://www.evotec.com/article/de/Pipeline/Klinische-Entwicklung/EVT-401/68/4/6>

2. Zielstellung

In vorhergehenden Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die P2X7-Rezeptorantwort durch verschiedene Faktoren moduliert werden kann. So können einerseits extrazelluläre Kationen wie NMDA⁺ und IMA zu einer Steigerung der Rezeptorantwort führen und die divalenten Kationen wie Mg²⁺ und Ca²⁺ sowie Senkungen des pH-Wertes den Rezeptor inhibieren (Riedel et al., 2007b; Flittiger et al., 2010).

Die Datenlage zum Einfluss extrazellulärer Anionen ist vergleichsweise schwach. Der Großteil der publizierten Daten stammt aus indirekten Messverfahren wie der YO-PRO1 Aufnahme oder der IL1- β Prozessierung an P2X7-Rezeptoren unterschiedlicher Spezies (Michel et al., 2000; Gudipaty et al., 2001; Verhoef et al., 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Anioneneffektes auf den P2X7-Rezeptor unterschiedlicher Spezies in Form des humanen und murinen Rezeptors im gleichen Expressionssystem in Form von *Xenopus laevis* Oozyten. Daneben dient die Methodik der Datenerhebung in Ca²⁺-freien Extrazellulärmedien dem Ausschluss sekundär induzierter Prozesse.

Konzentrations-Wirkungs-Kurven sollen Auskunft über den Mechanismus der Rezeptormodulation sowie über das Ausmaß der Beeinflussung der beschriebenen hoch- und niedrigaffinen ATP-Aktivierungsstellen geben (Klapperstück et al., 2001). Als weiteres Modell der hochaffinen ATP-Aktivierungsstelle am hP2X7 dient die Rezeptormutante hP2X7^{S339Y}, welche durch das alleinige Vorliegen der hochaffinen ATP-Aktivierungsstelle charakterisiert ist.

Daneben soll die Erstellung von Strom-Spannungs-Charakteristiken eine Aussage über die mögliche Beteiligung von Anionenströmen am ATP⁴⁻-induzierten Ionenstrom ermöglichen.

3. Material und Methodik

3.1 Material

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) benutzt. Das verwendete Na₂ATP stammt aus der Produktion der Firma Roche (Mannheim, Deutschland). Maus Makrophagen (RAW 264.7; American Type Culture Collection No TIB71) wurden von Prof. G. Griffiths (EMBL, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. *Xenopus laevis* (Krallenfrösche) wurden teils aus Knysna in der Republik Südafrika (African Xenopus Facility), teils aus Bayreuth (Prof. Dr. Olaf Stemmann, Department of Genetics, Universität of Bayreuth) bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der RAW-Makrophagen

RAW-Makrophagen wurden in Einfriermedium (30% FCS, 10% DMSO und 60% Zellen in DMEM) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Nach dem initialen schnellen Auftauprozess in 37 °C warmen Wasserbad wurden die Zellen in Medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)) mit 4 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose, 10% fetalem Kälberserum 1 % Penicillin (100U/ml) – Streptomycin (100 µg/ml)) suspendiert und bei 1400 U/min zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet mit Medium resuspendiert und anschließend die Zellsuspension in Zellkulturflaschen in einer Dichte von 1×10^7 pro 150 cm²-Kulturflasche ausgesät.

Die Inkubation erfolgte bei 37° Celsius im Brutschrank mit einem Kohlendioxidanteil von 5 % in der Umgebungsluft. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden nach Verwerfen des alten Mediums eine 75 cm² Kulturflasche zweimal mit 5 ml PBS (Invitrogen, Darmstadt) gespült. Um die Zellen abzulösen und zu vereinzeln wurden sie 5-10 Minuten mit 3 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Ablöseprozess wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach vollständiger Vereinzelung wurden die Zellen mit 7 ml Medium abgespült und zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit Medium wurden die Zellen in einer Dichte von $0,5 \times 10^7$ Zellen pro ml in neue Zellkulturflaschen überführt. Ein Teil der Zellsuspension wurde in Petrischalen (Durchmesser 4 cm), deren Boden mit Poly-L-Lysin-beschichteten Glasplättchen belegt wurde (10 Stück, 5 mm Durchmesser) ausgesät. Die Zellen, die sich auf den Plättchen anhefteten, wurden elektrophysiologischen Untersuchungen unterworfen. Um Veränderungen der Charakteristika der Zelllinien zu vermeiden, wurden Zellkulturen, welche den Zyklus häufiger als dreißig Mal durchliefen, verworfen.

3.2.2 RNA Präparation zur Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Bereitstellung der cRNA von humanen und murinen P2X7 Rezeptoren erfolgte von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. G. Schmalzing (RWTH Aachen). Zur Herstellung der DNA wurden die bereits publizierten Sequenzen des humanen P2X7 (Surprenant et al., 1996; Rassendren et al., 1997) und des murinen P2X7 (Chessell et al., 1998) mittels PCR amplifiziert. Im Anschluss erfolgte die Ligatur der cDNA mit dem Plasmid pNKS2, dem Oozyten Expressionsvektor (Gloor et al., 1995). Die cRNA's wurden mittels SP6-RNA-Polymerase (Pharmacia) aus linearisierten DNA-Matrizen synthetisiert. Nach der Reinigung mit Sepharose-G50-Chromatographie, Phenol- Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurden die cRNAs in 5 mM Tris/HCl, bei pH 7,2 in Konzentrationen von 0,5 - 1 mg/ml gelöst.

3.2.3 Präparation der *Xenopus laevis* Oozyten

Die Haltung der afrikanischen Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) erfolgte bei konstanter Wassertemperatur von 19° Celsius. Nachdem ein Krallenfrosch in Lösung 7 aus Tab. 1 narkotisiert wurde, konnten mittels einer kleinen chirurgischen Inzision im Unterbauch ein ca. 1 cm³ großes Stück Ovar aus dem Ovar entnommen werden. Als Narkotikum diente 3-Aminobenzoessäureethylester (Tricain). Das entnommene Stück Ovar wurde im Anschluss in Lösung 8 aus Tab. 1 gegeben. Der Inhaltsstoff Kollagenase (Typ BLS II der Firma Biochrom, Berlin) diente der Separation von Oozyten und noch anhaftenden Follikelgewebe und anderem bindegewebigem Material. Nach vier bis sechsständiger Inkubation erfolgte das Auswaschen der Kollagenase in Ca²⁺ freier Lösung (Lösung 9 aus Tab. 1). Das Ca²⁺-freie Milieu bewirkte die Aufhebung der Zell-Zellkontakte bestehend aus gap-junctions, so dass die Oozyten nach mehrmaligen Auswaschprozeduren, bestehend aus Zugabe von frischer Lösung, Schwenkung und Dekantierung, letztlich getrennt voneinander vorlagen. Die Aufbewahrung der Oozyten erfolgte in Petrischalen gefüllt mit Ca²⁺-haltiger Ringer-Lösung (Lösung 10 aus Tab. 1). Zur Minimierung der Kontamination durch Bakterien wurden dieser Lösung Antibiotika zugesetzt. Die Injektion von 23 nl der humanen und murinen P2X7 cRNA erfolgte innerhalb 2-6 h in ausselektierten Oozyten des Reifestadiums V und VI.

Die Spannungsklemmenexperimente fanden, wenn nicht anders angegeben, 2 Tage nach Injektion der cRNA statt. Dieser Zeitraum von etwa 48 Stunden erbrachte den besten Kompromiss in punkto Rezeptordichte und Zellqualität.

3.3 Elektrophysiologie

3.3.1 RAW-Makrophagen

Für die elektrophysiologischen Messungen wurde jeweils ein Glasplättchen mit den anhaftenden Zellen auf den Glasboden einer 0,2 ml fassenden Messkammer transferiert. Spannungsklemmenversuche erfolgten in der Ganzzellkonfiguration der „Tight-Seal Voltage-Clamp Technik“ (Hamill et al., 1981) bei Raumtemperatur (ca. 22° C). Die verwendeten Patch-Pipetten aus Borosilikatglaskapillaren (GB150F-8P 0,86 x 1,50 x 80mm; Science Products, Hofheim) wurden in einem zweistufigen Verfahren an einem Pipettenziehgerät (Narishige, Tokio, Japan) hergestellt. Unter mikroskopischer Sichtkontrolle diente ein zum Glühen gebrachter Platindraht der Polierung der Pipettenspitze, um die nötige glatte Oberfläche zur Herstellung eines Gigaseal (s.u.) zu schaffen. Die Zellen umströmte eine Standardbadlösung (Lösung 5, Tab. 1). Die Patchpipetten wurden mit einer ATP- und Na-Aspartat-haltigen Lösung (Lösung 6, Tab. 1) gefüllt und an einen Pipettenhalter montiert, welcher direkt mit dem Vorverstärker (CV 201A) des Patch-Clamp Verstärkers (Axopatch 200A, Axon Instruments, Inc., Foster City, USA) verbunden war. Der Widerstand dieser Pipettenspitzen nach dem Eintauchen in die Badlösung lag bei 5-10 M Ω , dies entspricht einem Öffnungsdurchmesser von ca. 1 μ m. Elektrische Potentiale an den Silberchloridelektroden sowie das Diffusionspotenzial an der Pipettenspitze kompensierte der Patch-Clamp-Verstärker (EPC 7, List electronic, Darmstadt, Germany). Die Messung der Diffusionspotentiale erfolgte wie bereits von Neher (Neher, 1992) beschrieben. Die gemessenen Umkehrpotentiale (V_{rev}) wurden dementsprechend korrigiert. Um stabile Verbindung zwischen Zellmembran und Pipettenspitze mit elektrischen Widerständen im Gigaohm-Bereich („dichte Verbindungen“, „Gigaseals“) zu erhalten, wurde unter Mikroskopkontrolle die Pipettenspitze auf die Zellmembran eines Makrophagen aufgesetzt. Danach konnte durch einen kurzen Saugimpuls ein Seal mit einem Widerstand zwischen 2-20 G Ω zwischen Pipettenspitze und Zelle hergestellt werden. Dieser manuelle Vorgang wurde durch ein akustisches Signal angezeigt, dessen Frequenz mit zunehmender Dichtigkeit des Seals zunahm. Während den Messungen nach erfolgreicher Herstellung eines Gigaseals wurde eine Klemmspannung von -40 mV angelegt. Zur Ermittlung von Umkehrpotentialen (V_{rev}) wurden Strom-Spannungs-Charakteristiken erstellt. Während der sechs Sekunden andauernden Applikation von 0.1 mM ATP⁴⁺ wurde das Membranpotential sechsmal über eine Dauer von 300 ms rampenförmig von -80 mV bis +40 mV verändert. Zwischen den Spannungsrampen lag das Haltepotential analog zu den weiteren Messungen bei -40 mV. Die Applikation des P2X7 Agonisten ATP⁴⁺ erfolgte mittels der U-Rohr Technik (Bretschneider and Markwardt, 1999). Der zu 90 % komplette Lösungswechsel, welcher durch das Öffnen der elektronisch gesteuerten Magnetventile ermöglicht wurde, konnte bei optimaler

U-Rohr Positionierung in weniger als 200 ms vollzogen werden (Bretschneider et al., 1995). Die Dauer der Applikation des Agonisten ATP⁴⁻ betrug je nach Konzentration zwischen 3 und 18 s. Zwischen den einzelnen Applikationen lag eine Mindestzeit von 3 min, in denen die RAW-Makrophagen in der Messkammer von Standardbadlösung (Lös. 5, Tab. 1) umspült wurden. Die benötigten Mengen an Ca und ATP zur Herstellung der in Tab. 1 angegebenen Lösungen mit den freien Konzentrationen von Ca²⁺ und ATP⁴⁻ wurden mit einem freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Schubert, (Universität Mannheim) zur Verfügung gestellten, Computerprogramm (Schubert, 1996) berechnet. Die Badlösungen mit den verschiedenen Anionen (Lösungen 1-4, Tab. 1) beinhalteten die gleichen Zusammensetzungen wie die korrespondierenden U-Rohr Lösungen, denen zusätzlich noch die entsprechende Konzentration an ATP zugesetzt wurde. Um Elektrodenpotentialverschiebungen an der Badelektrode beim Wechsel der Badlösungen zu vermeiden, kamen Agarbrücken in Form von Borosilikatglaskapillaren je zur Hälfte gefüllt mit 3 M KCL Agar und 3 M KCl Lösung zum Einsatz.

3.3.2 *Xenopus laevis* Oozyten

Sämtliche Messungen an den *Xenopus laevis* Oozyten erfolgten bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) mithilfe der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmenmethode (Voltage-Clamp-Technik (Cole 1949) (Schwarz and Rettinger, 2000)). Der Spannungsklemmenverstärker OC-725C stammte von der Firma Hampdon (USA). Bei Datenerhebungen nach dem Prinzip der Spannungsklemme hält man das Membranpotential auf einem bestimmten Level. Hierbei dient eine der 2 Messelektroden zur Bestimmung der Membranspannung. Die andere Elektrode dient zur Verabreichung des Haltestromes, um das Membranpotential beim Auftreten von Zellmembranströmen auf dem gewünschten festgelegten Level zu halten. Als Messelektroden dienten sehr fein gezogene Borosilikatglaskapillaren, welche mit 3 M KCL Lösung befüllt wurden. Es wurden nur Mikroelektroden verwendet deren Widerstand zwischen 0.8 und 1.2 MΩ lag. Der Abgleich der Elektroden und der Diffusionspotentiale erfolgte in Oozyten-Ringer-Lösung (ORi, Lösung 19, Tab. 1). Bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnte Agarbrücken dienten zur Verhinderung von Elektrodenpotential-Verschiebungen beim Wechsel der Badlösungen. In glutamat- und aspartathaltigen Lösungen verschob sich das Potential um etwa 10 mV und wurde entsprechend korrigiert. Bei den Referenzelektrodenpotentialen mit den anderen Anionen kam es zu keinen relevanten Verschiebungen. Während der Messungen befand sich die Oozyte bei einer Klemmspannung von -40 mV in einer ca. 0,1 ml fassenden Badkammer. Strom-Spannungs-Charakteristiken wurden analog zu der zuvor beschriebenen Methodik an RAW-Makrophagen erstellt. Der rasche Lösungswechsel wurde durch elektronisch gesteuerte Magnetventile und ein modifiziertes U-Rohr System (Bretschneider and Markwardt,

1999) sichergestellt. So konnten bei einer konstanten Durchflussgeschwindigkeit von etwa 75 $\mu\text{l/s}$ Lösungswechsel mit Einwaschzeiten von etwa 1210 ± 70 ms und Auswaschzeiten von etwa 1770 ± 170 ms erreicht werden (Bretschneider and Markwardt, 1999; Klapperstück et al., 2000a). Die Dauer der Applikation des Agonisten ATP^{4-} betrug je nach Konzentration zwischen 3 und 18 s. Zwischen den einzelnen ATP^{4-} Applikationen lag eine Mindestzeit von 4 Minuten, in denen die Oozyten in der Messkammer von ORi Lösung umspült wurden. Des Weiteren erfolgten alle Messungen in Mg^{2+} - und Ca^{2+} -freier Extrazellulärlösung (mit Ausnahme Ca^{2+} -haltigen Chlorid- und Glutamatlösungen (Lösungen 12 & 14, Tab.1). Dies diente einerseits dazu, sekundäre Ca^{2+} induzierte Ströme zu verhindern. Andererseits kommt es durch Bindung von Ca^{2+} und Mg^{2+} Ionen an ATP^{4-} zu einer Abnahme des freien ATP^{4-} als wirksamen Agonisten (Falzoni et al., 1995; Markwardt et al., 1997). Um eine entsprechende Menge des Agonisten ATP^{4-} zu erhalten, würde bei Zugabe von Mg^{2+} und Ca^{2+} die Osmolarität durch die große Menge des benötigten Gesamt-ATP vor allem bei hohen ATP^{4-} -Konzentrationen in schwer tolerierbare Bereiche stoßen. Die Abwesenheit divalenter Kationen verursacht jedoch einen starken Leckstrom unter anderem hervorgerufen durch Aktivierung von Chloridkanälen. Um diesen Effekt zu minimieren kam der Chloridkanalhemmstoff Flufenaminsäure (0,1 mM) zum Einsatz (Weber et al., 1995). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es bei der Verwendung von Flufenaminsäure zu einer Steigerung der ATP^{4-} induzierten Ströme um den Faktor $1,25 \pm 0,14$ kommt (Klapperstück et al., 2000a).

3.4 Datenverarbeitung

Um den unterschiedlichen Expressionsgrad der individuellen Oozyten zu berücksichtigen, wurden die Messergebnisse sämtlicher Applikationen in Relation zur gemessenen Amplitude nach Applikation von 0,1 mM ATP^{4-} gesetzt. Das gleiche Verfahren diente der Auswertung an den RAW-Makrophagen, da diese ebenfalls individuell unterschiedliche absolute ATP^{4-} induzierte Rezeptordichten aufweisen. Die Amplitude ergibt sich aus der Differenz des maximalen Stromes während der Applikation minus des Haltestroms der Spannungsklemme vor ATP^{4-} Applikation.

Die erhobenen Messdaten wurden mit eigens im Julius Bernstein Institut für Physiologie entwickelten Programmen (SPMulti & SPAnalyzer) aufgenommen, digitalisiert und im Anschluss mit den Programmen Lotus (LotusDevelopmentCorporation, Cambridge, USA) und Microsoft Excel (Microsoft) statistisch weiterverarbeitet. Für die nichtlinearen Approximationen und die Erstellung der Diagramme diente das Programm SigmaPlot (Jandel, Corte Madera, USA). Gemittelte Daten sind als Mittelwert (MW) mit zugehöriger Standardabweichung (SD) angegeben. Die Testung auf signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten erfolgte mit dem Programm SigmaStat (Jandel). Als Testverfahren diente

ANOVA mit nachfolgendem multiplen t-Test. Als für Signifikanz maximale Irrtumswahrscheinlichkeit wurde 5 % angesetzt ($p < 0,05$).

3.5 Verwendete Lösungen

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Lösungen

Lösung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Messungen an RAW Makrophagen	Na-Chlorid	Na-Glutamat	Na-Jodid	Na-Sulfat	Badlösung: Na Chlorid	Patchpipetten Innenlösung:	Oozyten- präparation	Anästhesie	Kollagenase	Auswaschen der Kollagenase	Inkubation	Messungen an Xenopus laevis Oozyten	Na-Chlorid	Na-Glutamat	Na-Glutamat 0,5 Ca ²⁺	Na-Jodid	Na-Aspartat	Na-Nitrat	Na-Sulfat	Badlösung Na-Chlorid
Na-Anion	140	100	140	100	140		NaCl	100	100	100	Na-Anion	100	70	70	100	70	100	70	100	100
KCl					5,4		KCl	1	1	1	KCl									2,5
CaCl ₂	0,5	0,5	0,5	0,5	1	2	CaCl ₂	1	1	1	CaCl ₂	0,5		0,5						1
MgCl ₂					0,5	5,5	MgCl ₂	1	1	1	MgCl ₂									1
Hepes	10	10	10	10	10	10	Hepes	5	5	5	Hepes	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Aspartat						145	Tricain (g/l)				Flufenamin-säure									
EGTA*	0,1*	0,1*				3	Kollagenase (mg/ml)	1,5			EGTA*		0,1*		0,1*	0,1	0,1	0,1		
BAPTA						3	Penicillin (U/ml)													
Glukose	10	10	10	10	10	10	Streptomycin (µg/ml)													
NaATP						5														

*Bei Lösungen zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven Zugabe von 0,1 mmol/l EGTA zur Ca²⁺-Pufferung bei [ATP⁴⁻] ≈ 0,01 mM

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von extrazellulären Anionen auf den murinen P2X7-Rezeptor in RAW-Makrophagen

4.1.1 Relative Amplituden ATP⁴⁻-induzierter Ströme

Wie in Abb. 1a & b exemplarisch ersichtlich, kommt es bei Spannungsklemm-Messungen bei einem negativen Haltepotenzial ($V_h = -40$ mV) an RAW-Makrophagen der Maus während der Applikation des Agonisten ATP⁴⁻ zu einem Einwärtsstrom, der innerhalb von weniger als 1 s einen annähernd konstanten Wert annimmt und nach Beendigung der ATP⁴⁻ Applikation innerhalb von <1 s fast vollständig auf den Wert des Haltestroms vor ATP⁴⁻ Applikation zurückgeht.

Um den Einfluss unterschiedlicher extrazellulärer Anionen auf den murinen P2X7-Rezeptor zu untersuchen, wurden die in unterschiedlichen Extrazellulärlösungen durch Applikation von 0,1 mM ATP⁴⁻ hervorgerufenen Stromamplituden (I_{act} , siehe Abb. 1b) aufgezeichnet. Als weitere Anionen neben dem Chlorid dienten Glutamat, Jodid und Sulfat. Es zeigten sich hierbei signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom extrazellulären Anion (Abb. 1c). Wird die extrazelluläre Chloridlösung durch Glutamatlösung ersetzt, steigt die Stromamplitude auf etwa das Dreieinhalbfache. Bei extrazellulärer Jodid- bzw. Sulfatlösung kommt es hingegen zu einer Abnahme der Stromamplitude cirka auf das 0,2 bzw. 0,7 fache.

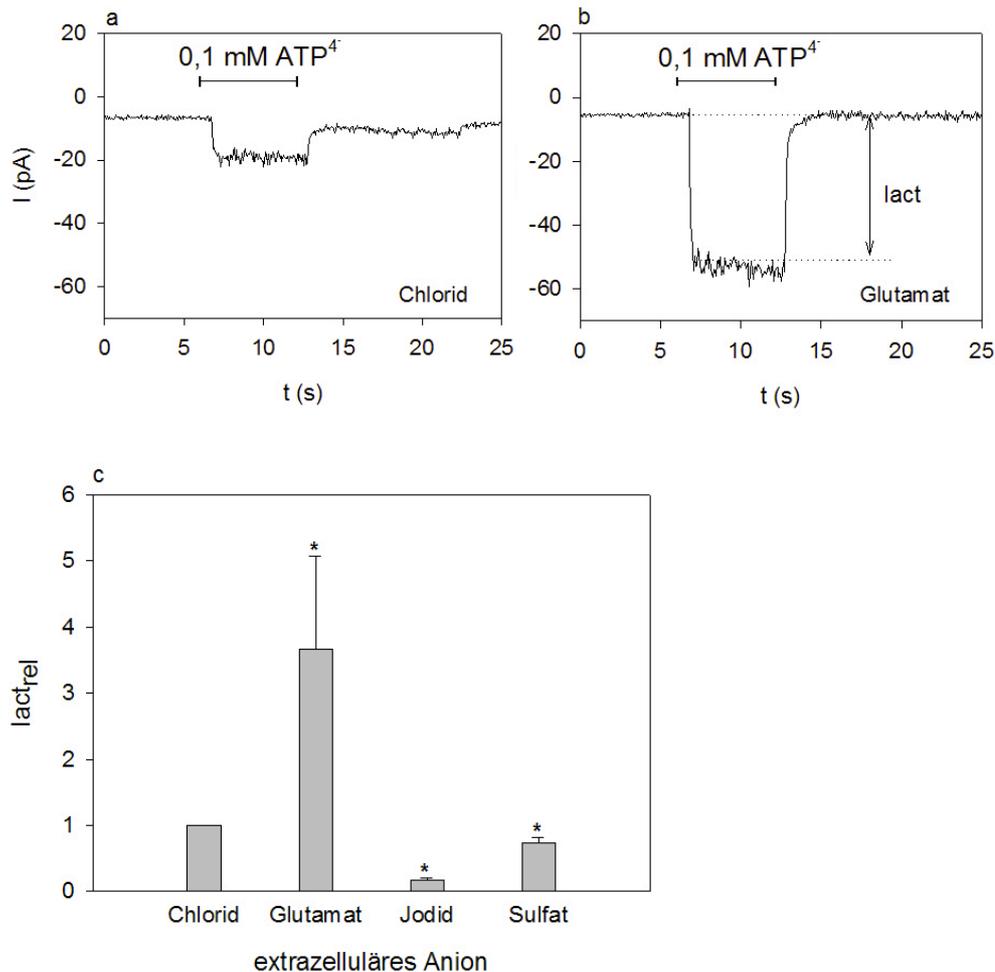


Abb. 1: **Abhängigkeit ATP⁴⁻-induzierter Ganzzellströme vom extrazellulären Anion am murinen-P2X7 Rezeptor in RAW-Makrophagen**

a, b: Exemplarisch dargestellt sind typische ATP⁴⁻-induzierte Ströme von RAW Mausemakrophagen in Extrazellulärlösungen mit den oben angegebenen Anionen (Lösungen 1 & 2, Tab. 1). Die horizontalen Balken stellen die Applikationsdauer (6s) von jeweils 0,1 mM ATP⁴⁻ dar. In b ist zusätzlich die Amplitude des aktivierenden Stroms (I_{act}) dargestellt. c: Relative Amplituden der ATP⁴⁻-induzierten Ströme $I_{act,rel}$ bei den in der Abszisse angegebenen verwendeten extrazellulären Anionen (Lösungen 1, 2, 3, 4, Tab. 1). Um Effekte unterschiedlicher Zellgröße und Rezeptorexpression zu berücksichtigen, wurden bei jeder Zelle die gemessenen Stromamplituden in Relation zur Amplitude bei Applikation von 0,1 mM ATP⁴⁻ in Ca²⁺-haltiger Chloridlösung (Lösung 1, Tab. 1) gesetzt. Aus Gleichung 1 ergibt sich $I_{act,rel}$ (s. Gl. 1). *: Signifikant von 1 verschiedene Werte. Des Weiteren sind alle Amplituden jeweils zueinander signifikant verschieden. MW \pm SD von jeweils 5-9 Messungen/Lösung an 7 RAW-Makrophagen. $V_h = -40$ mV.

$$I_{act_{rel}} = \frac{I_{act}([ATP^{4-}], Anion)}{I_{act}([0,1 \text{ mM } ATP^{4-}], Chlorid)} \quad (1)$$

I_{act} steht für die gemessene Stromamplitude bei der entsprechenden ATP^{4-} Konzentration.

Bei der Ermittlung der relativen Leitfähigkeiten steht G entsprechend anstelle von I_{act} (s. Kap. 4.1.3).

4.1.2 ATP^{4-} -Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Um den Einfluss der Extrazellulärlösung auf den ATP^{4-} -induzierten Strom der Makrophagen tiefgreifender zu untersuchen, wurden ATP^{4-} -Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt (Abb. 2). Aufgrund der sehr starken Hemmung extrazellulärer Jodidionen und der somit notwendigen hohen Verstärkung und sich daraus ergebenden starken „Rauschartefakten“ war es nicht möglich, eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei extrazellulärer Jodidlösung zu erstellen. Bei Messungen mit Verwendung von extrazellulärer Glutamatlösung kommt es zu einer signifikanten Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve im Vergleich zu extrazellulärer Chloridlösung (s. Tab. 2). Der für unendlich hohe ATP^{4-} Konzentration approximierten, relative maximal aktivierende Strom ($I_{rel, \max}$) nimmt in extrazellulärer Chloridlösung etwa doppelt so große Werte an als in Glutamatlösung (s. Tab. 2). Allerdings ist die Approximation mit Vorsicht zu bewerten, da anhand der vorliegenden Messwerte der Sättigungswert für $I_{act_{rel}}$ in Chloridlösung nicht klar ist.

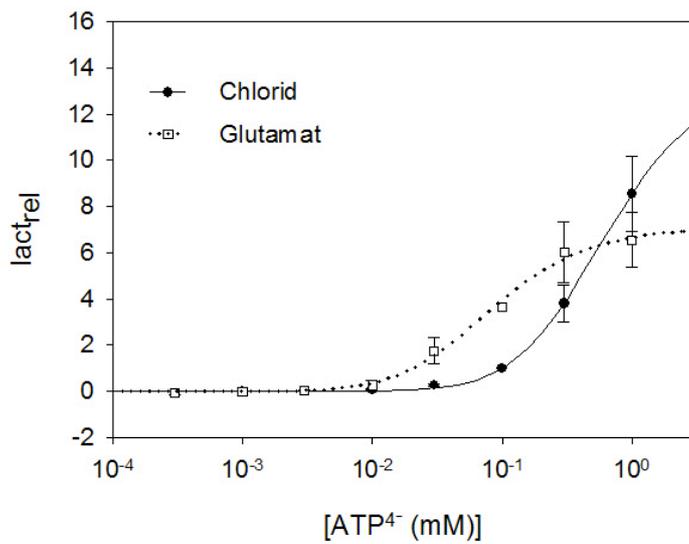


Abb. 2: ATP⁴⁻-Konzentrations-Wirkungs-Kurven des murinen P2X7-Rezeptors in RAW-Makrophagen in Abhängigkeit vom extrazellulären Anion

$I_{act,rel}$ (s. Gl. 1). Die Approximationen erfolgten mittels Gl. 2. Es wurde ein Koeffizient von 2 verwendet, da sich die ATP⁴⁻-Konzentrationsabhängigkeit des murinen P2X7-Rezeptors hiermit am besten approximieren ließen (Klapperstück et al., 2001; Becker et al., 2008; Flittiger et al., 2010). MW \pm SD von 4-11 Messungen/Lösung an 51 RAW-Makrophagen. $V_h = -40$ mV.

$$I_{act,rel} = \frac{I_{rel, \max}}{\left(1 + \frac{10^{pKD}}{[ATP^{4-}]}\right)^2} \quad (2)$$

pKD ist der negativ dekadische Logarithmus der scheinbaren Dissoziationskonstante der ATP⁴⁻-Aktivierungsstellen. $I_{rel, \max}$ ist der Wert für den approximierten maximal aktivierenden Strom.

Tabelle 2: **Einfluss des extrazellulären Anions auf das Konzentrations-Wirkungs-Verhalten des murinen P2X7 Rezeptors an RAW-Makrophagen**

Werte der Approximation aus Abb. 2; Die zur Veranschaulichung dargestellten EC_{50} Werte wurden mittels Gleichung 3 ermittelt.

$$EC_{50} = \frac{10^{pKD}}{\sqrt{2} - 1} \quad (3)$$

Extrazelluläres Anion	$I_{rel, max} \pm SD$	$pKD \pm SD$	$EC_{50} \text{ (mM)}$
Chloridlösung	13,75±0,25	3,57±0,14	0,65
Glutamatlösung	7,12±0,20*	4,47±0,04*	0,08*

* signifikanter Unterschied zu extrazellulärer Chloridlösung (Lösung 1, Tab. 1)

4.1.3 Strom-Spannungs-Charakteristiken

Um den Effekt extrazellulärer Glutamationen weiter zu untersuchen, wurden Messungen mit Strom-Spannungs-Charakteristiken an RAW-Makrophagen durchgeführt. Abb. 3a zeigt exemplarisch eine solche Strom-Spannungs-Charakteristik mit der Approximation des Anstiegs des Strom-Spannungs-Graphen um das Umkehrpotential (U_{rev}). Abb. 3b veranschaulicht, dass es keinen signifikanten Einfluss unterschiedlicher Extrazellulärlösungen auf die Lage von U_{rev} gibt. Die ATP^4 -induzierten Leitfähigkeiten (G) im Bereich von U_{rev} sind in extrazellulärer Glutamatlösung mehr als fünffach gegenüber Chloridlösung erhöht (Abb. 3c). Da Messungen an RAW-Makrophagen stets Ca^{2+} -Ionen in der Extrazellulärlösung erfordern, lassen sich sekundäre Ca^{2+} induzierte Stromkomponenten nicht sicher ausschließen. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt, welche Messungen in Ca^{2+} freier Extrazellulärlösung erlauben. Auf die Ergebnisse dieser Messungen wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

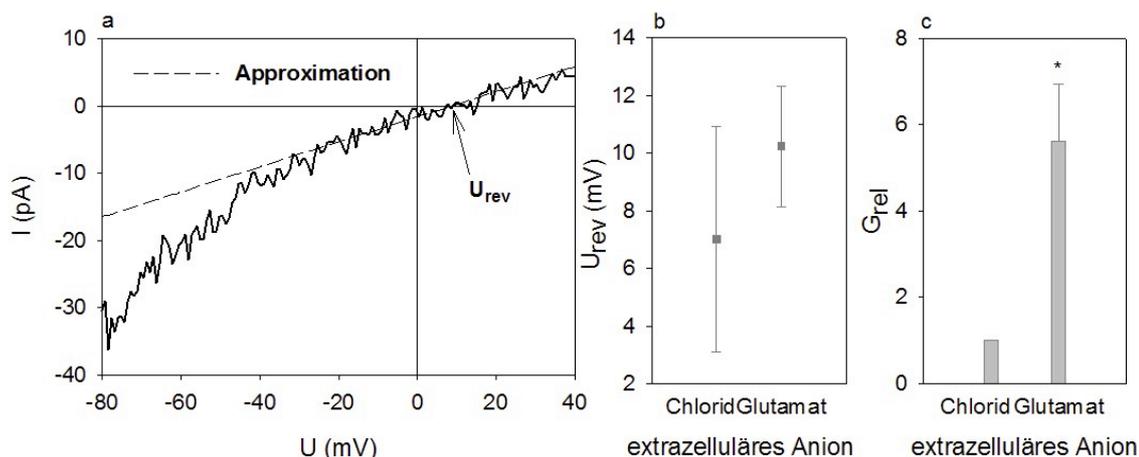


Abb. 3: Umkehrpotentiale (U_{rev}) und relative Leitfähigkeiten (G_{rel}) in der Nähe des Umkehrpotenzials ATP⁴⁻-induzierter Ströme am mP2X7 in RAW-Makrophagen

a: Exemplarische Darstellung eines durch Applikation von 0,1 mM ATP⁴⁻ induzierten Stroms während einer 300 ms dauernden Spannungsrampe in Chlorid-Lösung (Lösung 1, Tab. 1). Die Bestimmung des Umkehrpotentials (U_{rev}) bei 7,0 mV mittels linearer Approximation ist dargestellt. Die Steigung der Approximationsgeraden ergibt die Leitfähigkeit G am Umkehrpotential (U_{rev}). b: Darstellung der Umkehrpotentiale bei extrazellulärer Chlorid- sowie Glutamat-Lösung (Lösung 1, 2, Tab. 1); c: Relative Leitfähigkeiten (G_{rel} (Ermittlung entspricht Methodik bei $I_{act,rel}$ (s. Gl. 1*))) um U_{rev} bei extrazellulärer Chlorid- sowie Glutamat-Lösung (Lösung 1, 2, Tab. 1) *: signifikanter Unterschied zu Chloridlösung, MW \pm SD von 6-10 Messungen/Lösung an 8 RAW-Makrophagen.

4.2 Einfluss von extrazellulären Anionen auf humane und murine P2X7-Rezeptoren sowie die humane P2X7^{S339Y}-Rezeptormutante heterolog exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten

4.2.1 Relative Amplituden ATP⁴⁻-induzierter Ströme am humanen und murinen P2X7-Rezeptor

Die Arbeit an heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten P2X7-Rezeptoren besitzt neben der bereits erwähnten Möglichkeit, mit Ca²⁺-freien Lösungen zu arbeiten, auch die Option, speziesdifferente P2X7-Rezeptoren im gleichen Expressionsmodell zu erforschen. Analog zu den Messungen an Mausmakrophagen wurden die relativen Amplituden bei verschiedenen Extrazellulärlösungen gemessen. Als Bezugsgröße diente an Oozyten die ATP⁴⁻-induzierte Amplitude in Ca²⁺-freier Chloridlösung. Mit Ausnahme der Ca²⁺-haltigen Chlorid- und Glutamatlösung erfolgten alle Messungen an Oozyten in Ca²⁺-freiem Milieu. Neben den

bereits an RAW-Makrophagen verwendeten Anionen (Abb. 1c) wurde an den *Xenopus laevis* Oozyten zusätzlich die Beeinflussung durch Aspartat und Nitrat untersucht (Abb. 2i).

Wurde die extrazelluläre Chloridlösung ohne Ca^{2+} -Ionen durch eine extrazelluläre Lösung mit einem anderen Halogenid, dem Jodid, oder den anorganischen Anionmolekülen Nitrat und Sulfat ersetzt, kam es zu einer signifikanten Verminderung der relativen Stromamplituden mit der größten Ausprägung bei Verwendung von Jodidionen. Speziespezifisch sind die relativen Amplituden bei ebengenannten Lösungen am mP2X7 signifikant kleiner als am hP2X7. Beinhaltet die extrazelluläre Lösung größere Anionen organischer Natur in Form der Aminosäuren Glutamat oder Aspartat (ohne Ca^{2+} -Ionen) kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude mit einer Ausnahme von Glutamatlösung am mP2X7. Beim speziesdifferenten Vergleich der P2X7-Rezeptoren kommt es hingegen bei den organischen Anionen im Gegensatz zu den anorganischen Anionen zu keiner signifikanten Verminderung der relativen Amplituden am murinen Rezeptor gegenüber dem humanen Rezeptor. Um die Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten mit den in Punkt 1 dargelegten Ergebnissen an RAW-Makrophagen vergleichbar zu machen, wurden der extrazellulären Chlorid- und Glutamatlösung zusätzlich Ca^{2+} -Ionen hinzugefügt. Dies bewirkt bei extrazellulärer Glutamatlösung mit Ca^{2+} -Ionen eine beachtliche speziesunspezifische signifikante Erhöhung der Stromamplitude im Vergleich zu Strömen in Ca^{2+} -freier und Ca^{2+} -haltiger Chloridlösung.

Die ausgeprägte Stromhemmung durch extrazelluläre Jodidionen wird im Folgenden mittels verschiedener Jodidionenkonzentrationen genauer untersucht. Des Weiteren wird auf den Einfluss von Ca^{2+} -freier Glutamat- und Jodid-Extrazellulärlösung auf die ATP^{4-} -Konzentrations-Wirkungs-Beziehung genauer eingegangen.

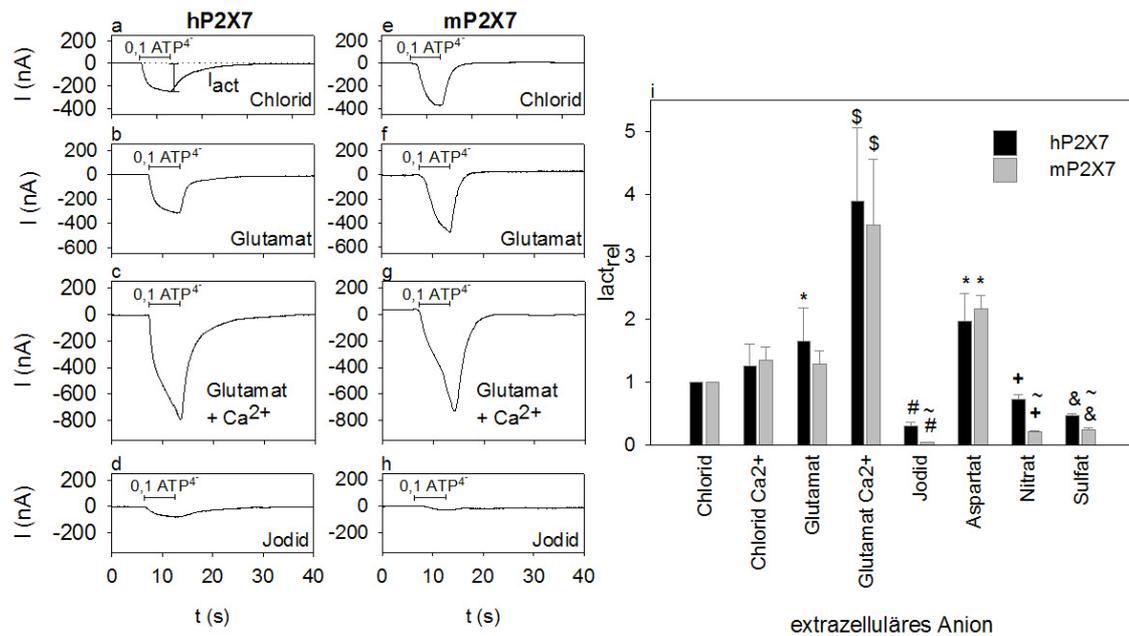


Abb. 4: **Abhängigkeit ATP⁴-induzierter Ganzzellströme vom extrazellulären Anion am humanen und murinen P2X7-Rezeptor in *Xenopus laevis* Oozyten**

a - h: Exemplarisch dargestellt sind typische ATP⁴-induzierte Ströme von *Xenopus laevis* Oozyten, in denen der humane (a-d) bzw. murine (e-h) P2X7-Rezeptor exprimiert wurde, in Extrazellulärlösungen mit den oben angegebenen Anionen. Die horizontalen Balken stellen die 6 Sekunden andauernde Applikation von jeweils 0,1 mM ATP⁴ dar. In a ist zusätzlich die Amplitude des aktivierenden Stroms (I_{act}) dargestellt. i: Relative Amplituden I_{act,rel} (s. Gl. 1) bei unterschiedlichen extrazellulären Anionen (Lösungen 11 - 18, Tab. 1) an *Xenopus laevis* Oozyten normiert auf extrazelluläre Ca²⁺-freie Chloridlösung. ~: signifikante Differenz zwischen humanem und murinem Rezeptor bei gleicher Lösung. Unterschiedliche Symbole stehen für signifikant verschiedene Mittelwerte am jeweiligen Rezeptor gegenüber Ca²⁺-freier Chloridlösung, MW ± SD von 6-12 Messungen/Lösung an 41 Oozyten, V_h = -40 mV. Ein Potenzial von -10 mV bei Glutamatlösung mit und ohne Ca²⁺-Ionen an der Agar-Elektrode wurde einberechnet.

4.2.2 Jodid-Konzentrations-Wirkungs-Kurven am humanen und murinen P2X7-Rezeptor

Wie bereits im vorausgehenden Abschnitt beschrieben, weist die komplette Substitution von extrazellulären Chloridionen durch Jodidionen die stärkste gemessene Hemmung der P2X7-Rezeptorantwort auf. Aus diesem Grund wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei verschiedenen Jodidkonzentrationen erstellt, welche diesen Effekt der Hemmung genauer untersuchen (Abb. 5). Auch hier zeigen sich speziesspezifisch signifikante Unterschiede im Rezeptorverhalten. Beim murinen P2X7-Rezeptor erfolgt die halbmaximale Hemmung bei einer

signifikant niedrigeren Jodidionenkonzentration als beim humanen P2X7-Rezeptor, das heißt der Maus-P2X7-Rezeptor ist jodidempfindlicher als der P2X7-Rezeptor des Menschen (Tab. 3).

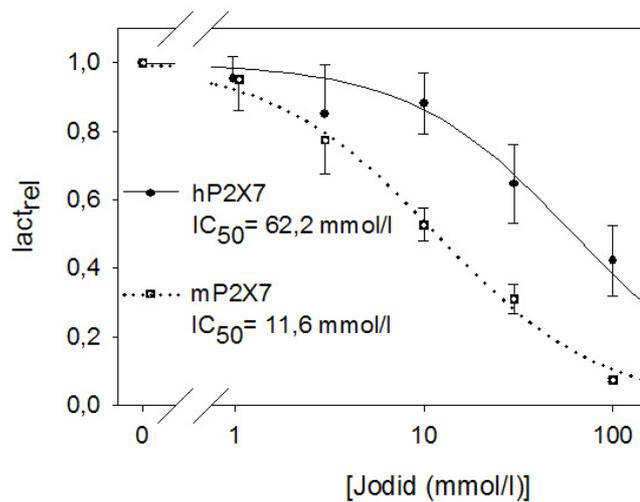


Abb. 5: **Jodid-Konzentrations-Wirkungs-Kurven des humanen und murinen P2X7-Rezeptors in *Xenopus laevis* Oozyten**

$I_{act,rel}$ (s. Gl. 1) am hP2X7 und mP2X7 nach Applikation von 0,1 mM ATP⁴⁻ in Extrazellulärlösungen mit den in der Abszisse angegebenen unterschiedlichen Jodid-Konzentrationen. Die IC₅₀-Werte und die Approximationen wurden mittels Gl. 4 ermittelt.

$$I_{act,rel} = \frac{1}{\left(1 + \frac{[J^-]}{10^{pKD}}\right)} \quad (4)$$

pKD entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der Jodid-Konzentration, bei der eine halbmaximale Hemmung des in Chlorid-Lösung gemessenen Stroms auftritt. [J⁻] steht für die extrazelluläre Jodidkonzentration. Um die Anionenkonzentration (100 mmol/l) konstant zu halten, wurden die zu 100 mmol/l fehlenden Jodidionen als entsprechende Menge an Chloridionen supplementiert. MW ± SD von 6-13 Messungen/Lösung an 31 Oozyten.

Tabelle 3: **Konzentrationsabhängige Hemmung des durch 0,1 mM ATP⁴⁻ induzierten Stroms humaner und muriner P2X7-Rezeptoren heterolog exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten**

Bestimmung nach Gl. 4; Zur Anschaulichkeit sind wie bereits in Abb. 5 die sich aus den pKD-Werten ergebenden IC₅₀ Werte angegeben.

Rezeptor	pKD ± SD	IC ₅₀ (mmol/l)
hP2X7	1,21 ± 0,07	62,2
mP2X7	1,93 ± 0,03\$	11,6\$

\$: signifikant verschieden gegenüber dem hP2X7

4.2.3 ATP⁴⁻-Konzentrations-Wirkungs-Kurven am humanen P2X7-Rezeptor

Wie bereits in der Einleitung in Punkt 1.4.1. (Molekulare Eigenschaften) erwähnt, deuten beim humanen P2X7-Rezeptor die ATP⁴⁻-Konzentrations-Wirkungs-Kurven auf hochaffine sowie niedrigaffine Aktivierungsstellen hin. So ließen sich die Kurven nicht wie beim murinen P2X7-Rezeptor mittels einer einfachen Hill-Gleichung (Gl. 2) approximieren. Vielmehr wurde analog zu den bereits veröffentlichten ATP⁴⁻-Konzentrationsabhängigkeiten des humanen P2X7-Rezeptors (Klapperstück et al., 2001; Becker et al., 2008; Flittiger et al., 2010) Gl. 5 als Summe zweier Hillfunktionen verwendet.

$$I_{act,rel} = \frac{I_{rel,max,1}}{\left(1 + \frac{10^{pKD_1}}{[ATP^{4-}]}\right)^2} + \frac{I_{rel,max,2}}{\left(1 + \frac{10^{pKD_2}}{[ATP^{4-}]}\right)^2} \quad (5)$$

pKD₁ und pKD₂ sind die negativen dekadischen Logarithmen der Agonisten-Dissoziationskonstanten für die hochaffine und niedrigaffine Aktivierungsstelle. I_{rel,max,1} und I_{rel,max,2} sind die approximierten maximal aktivierenden Ströme der hochaffinen beziehungsweise der niedrigaffinen Agonistenbindungsstellen.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven deuten sowohl in Chlorid-, als auch in Glutamat- sowie Jodid-haltiger Extrazellulärlösung auf hoch- und niedrigaffine ATP⁴⁻-Aktivierungsstellen hin (Abb. 6 a/b). In Abb. 6a sind die Anteile der hoch- und niedrigaffinen Aktivierungsstellen nach Approximation mittels Gl. 5 graphisch dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde hier auf die Darstellung der Standardabweichungen verzichtet. Bei Betrachtung der hochaffinen Aktivierungsstelle in Abb. 6b zeigt sich eine leichte Erniedrigung der Wirksamkeit bei extrazellulärer Jodidlösung gegenüber Chlorid- und Glutamatlösung. Die approximierten pKD₁-Werte sind jedoch nicht signifikant voneinander verschieden. An der niedrigaffinen

Aktivierungsstelle ist die Wirksamkeit bei extrazellulärer Glutamatlösung gegenüber Chloridlösung deutlich erhöht, bei Verwendung von extrazellulärem Jodid deutlich vermindert. Die Substitution mit Glutamat hat eine Linksverschiebung, mit Jodid eine Rechtsverschiebung gegenüber Chlorid zur Folge. Die ATP-Affinitäten, repräsentiert durch die pKD_2 -Werte, sind bei Glutamat und Jodidlösung signifikant voneinander verschieden. Die approximierten Werte sind ergänzend in Tabelle 4 übersichtlich aufgeführt.

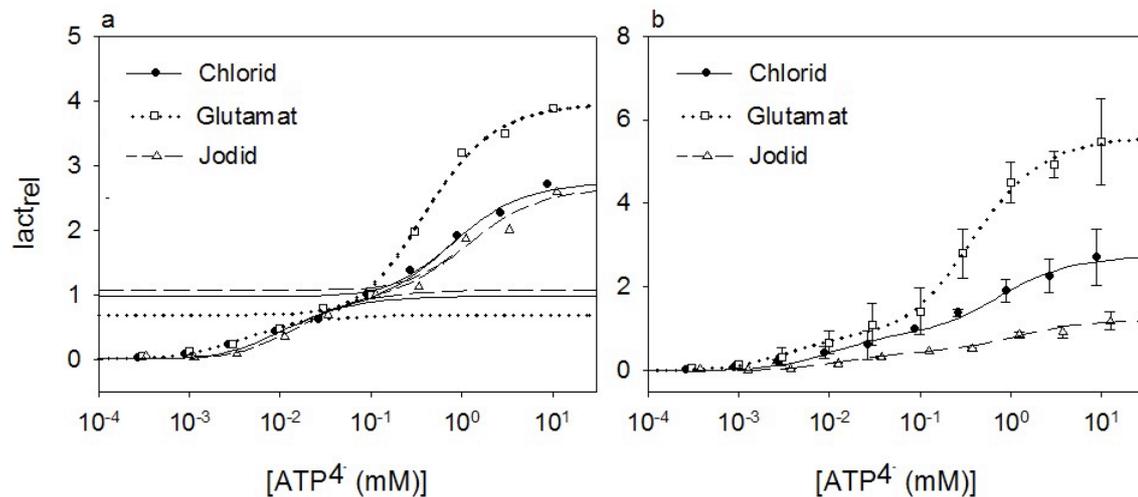


Abb. 6a-b: ATP⁴⁻-Konzentrations-Wirkungs-Kurven des humanen P2X7-Rezeptors in *Xenopus laevis* Oozyten in Abhängigkeit vom extrazellulären Anion

In 6a bezieht sich lact_{rel} jeweils auf die Applikation von 0,1 mM ATP⁴⁻ in Chlorid-, Glutamat- bzw. Jodid-Lösung (Lösung 11, 13, 15, Tab. 1). Die horizontalen Linien zeigen rechts die Approximation für den oberen Anteil der hochaffinen und links für den unteren Anteil der niedrigaffinen ATP⁴⁻-Aktivierungsstellen.

In Abb. 6b wurden alle konzentrationsabhängigen Stromamplituden aus Abb. 6a in Relation zu den Amplituden der durch 0,1 mM ATP⁴⁻ ausgelösten Ströme in Chlorid-Lösung gesetzt (Analog zu Abb. 2). MW ± SD von 5 bis 13 Messungen/Lösung in insgesamt 77 Oozyten. Die Approximationen (durchgezogene Linien) erfolgten mittels Gl. 5.

Tabelle 4: **Einfluss des extrazellulären Anions auf das Konzentrations-Wirkungs-Verhalten des humanen P2X7-Rezeptors**

Die Berechnung erfolgte mittels Gleichung 5. Vgl. Abb. 6b. Die zur Veranschaulichung dargestellten EC_{50} Werte wurden mittels Gleichung 3 ermittelt.

Extrazelluläres Anion	$I_{rel,max,1} \pm SD$	$pKD_1 \pm SD$	EC_{50_1} (mM)	$I_{rel,max,2} \pm SD$	$pKD_2 \pm SD$	EC_{50_2} (mM)
Chlorid	$0,98 \pm 0,43$	$5,28 \pm 0,51$	0,013	$1,77 \pm 0,44\$$	$3,44 \pm 0,38$	0,88
Glutamat	$0,96 \pm 0,54$	$5,74 \pm 0,71$	0,004	$4,62 \pm 0,58^*$	$3,77 \pm 0,19^*$	0,41*
Jodid	$0,49 \pm 0,24$	$5,13 \pm 0,56$	0,018	$0,73 \pm 0,26\§$	$3,25 \pm 0,55\§$	1,36§

*,§: Unterschiedliche Symbole weisen auf signifikant verschiedene Mittelwerte hin.

4.2.4 ATP^{4-} -Konzentrations-Wirkungs-Kurven am murinen P2X7-Rezeptor

Im Gegensatz zum humanen P2X7-Rezeptor lassen sich in ATP^{4-} -Konzentrations-Wirkungs-Kurven am murinen P2X7-Rezeptor keine hoch- und niedrigaffinen Komponenten abgrenzen (Abb. 7a/b). Beim Einsatz von extrazellulärer Glutamat- bzw. Jodidlösung zeigen sich im Vergleich zum humanen P2X7-Rezeptor unterschiedliche Effekte. So kommt es bei extrazellulärer Glutamatlösung zu einer ATP^{4-} -Potenzerhöhung mit Linksverschiebung der ATP^{4-} -Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die Wirksamkeit von ATP^{4-} dargestellt durch den approximierten Wert $I_{rel,max}$ (Abb. 7b) ist hingegen in Glutamatlösung deutlich und signifikant vermindert gegenüber Messungen in extrazellulärer Chlorid- sowie Jodidlösung. Die approximierten Werte der ATP^{4-} -Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei extrazellulärer Jodidlösung sind signifikant verschieden gegenüber Chlorid- sowie Glutamat-Außenlösung (Tab. 5). In Jodidlösung vollzieht sich eine Vergrößerung von $I_{rel,max}$ wohingegen die Potenz des Agonisten ATP^{4-} herabgesetzt ist. Die approximierten Werte sind ergänzend in Tab. 5 übersichtlich aufgeführt.

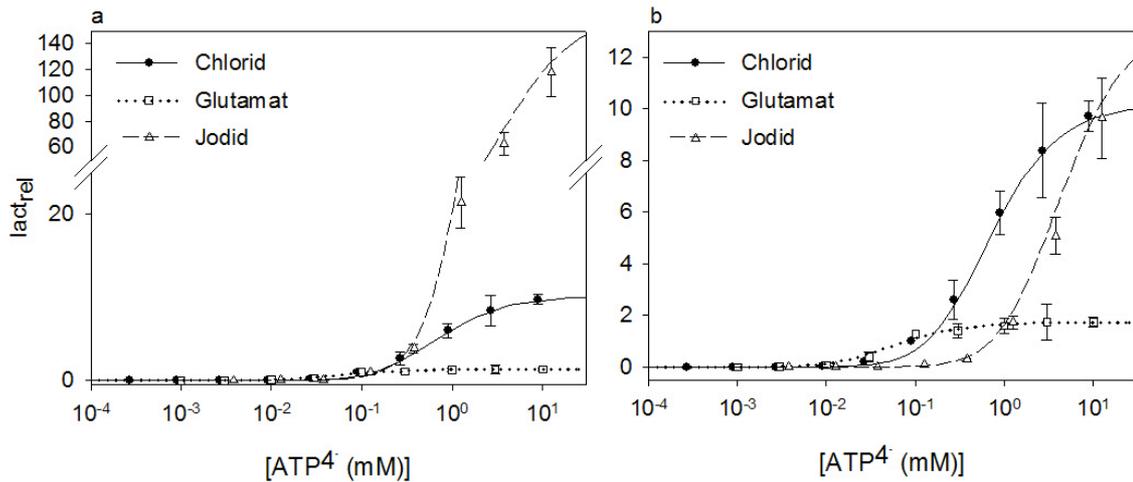


Abb. 7a-b: ATP⁴⁻-Konzentrations-Wirkungs-Kurven des murinen P2X7-Rezeptors in *Xenopus laevis* Oozyten in Abhängigkeit vom extrazellulären Anion

7a und 7b zeigen die Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei extrazellulärer Chlorid-, Glutamat- bzw. Jodid-Lösung (Lösung 11, 13, 15, Tab. 1). In 7a bezieht sich I_{act,rel} auf die Stromamplituden bei Applikation von 0,1 mM ATP⁴⁻ in der jeweiligen entsprechenden Extrazellulärlösung (Analog zur Abbildung 6a).

In 7b wurden die gemessenen Stromamplituden in Relation zu den Stromamplituden der untersuchten Zelle bei Applikation von 0,1 mM ATP⁴⁻ in Chlorid-Lösung (Lösung 11, Tab. 1) gesetzt (Analog zu den Abbildungen 2 & 6b). Die Approximationen erfolgten mittels Gl. 2. MW ± SD von 6-17 Messungen pro Lösung an insgesamt 88 Oozyten.

Tabelle 5: Einfluss der extrazellulären Lösung auf das ATP⁴⁻-Konzentrations-Wirkungs-Verhalten des murinen P2X7-Rezeptors

Die Berechnung von I_{rel,max} sowie der pKD-Werte erfolgte mittels Gl. 2. Die zur Veranschaulichung dargestellten EC₅₀ Werte wurden mittels Gl. 3 ermittelt.

Extrazelluläres Anion	I _{rel,max} ± SD	pKD ± SD	EC ₅₀ (mM)
Chlorid	10,18 ± 0,45*	3,53 ± 0,07	0,71
Glutamat	1,43 ± 0,13\$	4,59 ± 0,19\$	0,06\$
Jodid	13,55 ± 0,42*	2,73 ± 0,03*	4,50*

*,\$: Unterschiedliche Symbole weisen auf signifikant verschiedene Mittelwerte hin (vgl. Abb. 7b).

4.2.5 Strom-Spannungs-Charakteristiken am humanen und murinen P2X7-Rezeptor

Analog zu den Messungen an RAW-Makrophagen wurden die Strom-Spannungs-Charakteristiken der in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten humanen sowie murinen P2X7-Rezeptoren mittels Spannungsrampen untersucht. Abb. 8 stellt exemplarisch eine solche Strom-Spannungs-Charakteristik dar und veranschaulicht die Methode der Auswertung. Der Großteil der ermittelten Umkehrpotentiale lag im Bereich zwischen -8 und -14 mV. Beinhaltete die Extrazellulärlösung jedoch Glutamat mit Ca^{2+} -Ionen, so verschob sich das Umkehrpotential in einen signifikant positiveren Bereich. Diese auffällige Verschiebung von U_{rev} fand speziesunabhängig, jedoch mit stärkerer Ausprägung am hP2X7 gegenüber dem mP2X7 statt (Abb. 9).

Die ermittelten Leitfähigkeiten (Abb. 10) um U_{rev} bei den verschiedenen Extrazellulärlösungen verhielten sich weitgehend analog zu den Amplituden der bei konstantem Haltepotenzial von -40 mV gemessenen Strömen (Abb. 4g). Abweichungen zwischen den relativen Leitfähigkeitswerten und ATP^{4-} -induzierten Stromamplituden finden sich bei extrazellulärer Glutamatlösung mit und ohne Ca^{2+} -Ionen. Hier ist die relative Leitfähigkeit am mP2X7-Rezeptor bei Glutamatlösung ohne Ca^{2+} -Ionen signifikant gegenüber Chloridlösung erhöht. An der relativen Amplitude zeigt sich hingegen keine signifikante Differenz. Weiterhin kommt es bei Glutamatlösung mit und ohne Ca^{2+} -Ionen indes zu einer Umkehr der Speziesdifferenz. D.h. beim hP2X7 sind die Leitfähigkeiten gegenüber dem mP2X7 bei Glutamat mit und ohne Ca^{2+} -Ionen verringert. Die relativen Amplituden nehmen hingegen am hP2X7 größere Werte an. Jedoch ist zu erwähnen, dass weder an den relativen Amplituden noch an den Leitfähigkeitswerten bei den Glutamatlösungen speziesdifferente signifikante Unterschiede bestehen.

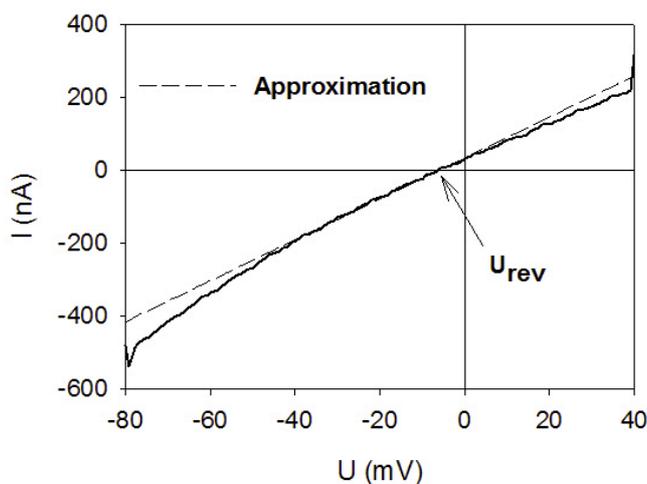


Abb. 8: Strom-Spannungs-Charakteristik eines ATP^{4-} -induzierten Stroms am humanen P2X7-Rezeptor in *Xenopus laevis* Oozyten

Exemplarische Darstellung eines durch Applikation von 0,1 mM ATP⁴⁻-induzierten Stroms während einer 300 ms dauernden Spannungsrampe in Chlorid-Lösung ohne Ca²⁺-Ionen (Lösung 11, Tab. 1) am hP2X7. Die Bestimmung des Umkehrpotentials (U_{rev}) bei -6,0 mV mittels linearer Approximation ist dargestellt. Die Steigung der Approximationsgeraden ergibt die Leitfähigkeit G am Umkehrpotential. Man beachte die Ordinate (I (nA)) gegenüber den Messungen an RAW-Makrophagen (Abb. 3a (I (pA))).

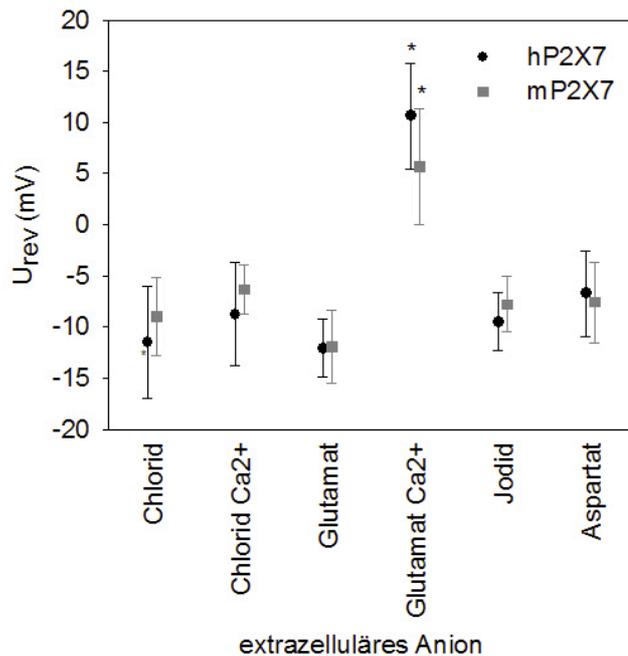


Abb. 9: **Umkehrpotentiale (U_{rev}) humaner und muriner P2X7-Rezeptor-abhängiger Ströme in *Xenopus laevis* Oozyten in Abhängigkeit vom extrazellulären Anion**

Aufreihung der Umkehrpotentiale bei verschiedenen Anionenlösungen (Lösung 11, 12, 13, 14, 15, 16) aus Strom-Spannungscharakteristiken, welche wie in Abb. 8 exemplarisch dargestellt ermittelt wurden. *: Signifikante Differenz gegenüber den anderen Werten am entsprechenden humanen bzw. murinen Rezeptor. MW \pm SD von 5-10 Messungen pro Lösung an insgesamt 15 Oozyten. Ein Potenzial von -10 mV bei Glutamatlösung mit und ohne Ca²⁺-Ionen an der Agar-Elektrode wurde einberechnet.

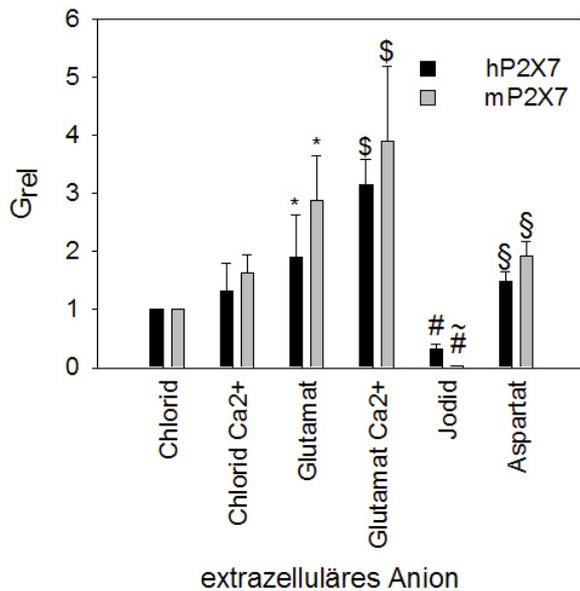


Abb. 10: **Relative Leitfähigkeiten (G_{rel}) humaner und muriner P2X7-Rezeptor-abhängiger Ströme in *Xenopus laevis* Oozyten in Abhängigkeit vom extrazellulären Anion**

Die Leitfähigkeiten bei verschiedenen Anionenlösungen (Lösung 11 - 16) wurden wie in Abb. 8 gezeigt ermittelt und entsprechend auf Ca^{2+} -freie Chlorid-Lösung (Lös. 11 aus Tab. 1) s. Gl. 1* normiert. ~: Signifikante Differenz zwischen humanem und murinem Rezeptor bei gleicher Lösung, unterschiedliche Symbole stehen für signifikant verschiedene Mittelwerte am jeweiligen Rezeptor gegenüber Chloridlösung ohne Ca^{2+} -Ionen. MW \pm SD von 6-9 Messungen pro Lösung an 15 Oozyten.

4.2.6 Relative Stromamplituden an der humanen P2X7^{S339Y}-Rezeptormutante

Um den Einfluss extrazellulärer Anionen auf die hochaffine ATP⁴-Aktivierungsstelle des humanen P2X7-Rezeptors gesondert zu untersuchen, bedurfte es weiterer Messungen. Hierzu eignete sich die Rezeptormutante hP2X7^{S339Y}, welche durch die Substitution von Tyrosin anstelle von Serin an Position 339 gekennzeichnet ist. Bei dieser Mutante ist die niedrigaffine Aktivierungsstelle nicht funktionell, die Rezeptoraktivierung erfolgt ausschließlich über die hochaffine Aktivierungsstelle (Flittiger et al., 2010).

Es zeigte sich eine Steigerung der Stromamplitude bei Verwendung extrazellulärer Glutamatlösung mit Ca^{2+} -Ionen gegenüber Chloridlösung ohne Ca^{2+} -Ionen sowie Jodidlösung (Abb. 11). Im Gegensatz zu den Wildtyprezeptoren hP2X7 und mP2X7, an denen extrazelluläres Jodid eine ausgeprägte inhibierende Wirkung aufweist, ist die relative Stromamplitude an der hP2X7^{S339Y}-Rezeptormutante nicht vermindert. Auch die Amplitude bei

Glutamat ohne Ca^{2+} -Ionen zeigt keinen signifikanten Unterschied gegenüber Messung in Chloridlösung.

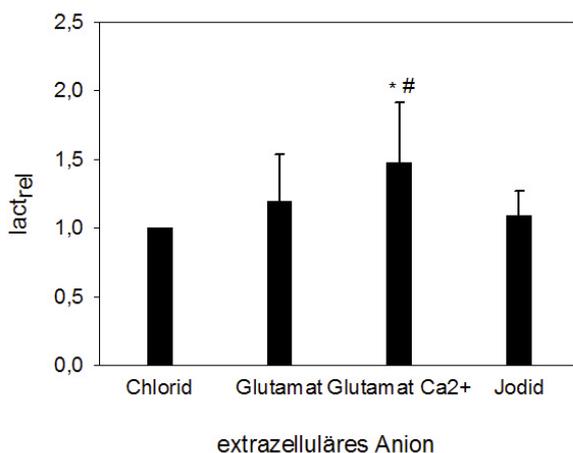


Abb. 11: **Abhängigkeit ATP^{4-} -induzierter Ganzzellströme (lact_{rel}) vom extrazellulären Anion der humanen Rezeptormutante $\text{P2X7}^{\text{S339Y}}$ in *Xenopus laevis* Oozyten**

Relative Amplituden lact_{rel} (s. Gl. 1) der durch $0,1 \text{ mM ATP}^{4-}$ induzierten Ströme bei unterschiedlichen Typen extrazellulärer Anionen wie in der Abszisse angegeben (Lösungen 11, 13, 14, 15, Tab. 1). *: Signifikant verschieden zu Chloridlösung, # signifikante Differenz zu Jodidlösung, MW \pm SD von 8-16 Messungen/Lösung an 16 Oozyten.

4.2.7 Strom-Spannungs-Charakteristiken an der humanen $\text{P2X7}^{\text{S339Y}}$ -Rezeptormutante

Die Messmethodik sowie die Ermittlung der Lage des Umkehrpotentials (U_{rev}) und der Leitfähigkeit bei U_{rev} erfolgten analog zu den Untersuchungen des mP2X7-Rezeptors an RAW-Makrophagen und des hP2X7- und mP2X7-Rezeptors in *Xenopus laevis* Oozyten (s. 4.1.3 und 4.2.5).

Die Lage des Umkehrpotentials unterliegt an der Rezeptormutante hP2X7^{S339Y} wie auch beim Wildtyp hP2X7 einer Beeinflussung durch extrazelluläre Anionen. So kommt es wie in Abb. 12a ersichtlich bei Ca^{2+} -haltiger Glutamatlösung zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials um ca. 20 mV auf +10 mV im Vergleich zu Chloridlösung und Glutamatlösung ohne Ca^{2+} -Ionen und Jodidlösung, deren Umkehrpotentiale etwa bei -11, -15 und -13 mV liegen. Diese Ergebnisse an der Mutante stehen in Einklang zu den Messungen an den humanen und murinen Wildtyprezeptoren.

Bei Betrachtung der Leitfähigkeiten an der hP2X7^{S339Y}-Rezeptormutante (Abb. 12b) zeigen sich um ca. dreißig Prozent erhöhte und signifikant verschiedene Leitfähigkeiten bei Ca^{2+} -haltiger Glutamatlösung gegenüber den weiteren Lösungen. Die relativen Leitfähigkeiten an den Wildtyp hP2X7- und mP2X7-Rezeptoren nehmen bei extrazellulärer Ca^{2+} -haltiger

Glutamatlösung ebenso signifikant höhere Werte an. Ca^{2+} -freie Glutamatlösung hat hingegen keine Beeinflussung der relativen Leitfähigkeit gegenüber Chloridlösung zur Folge.

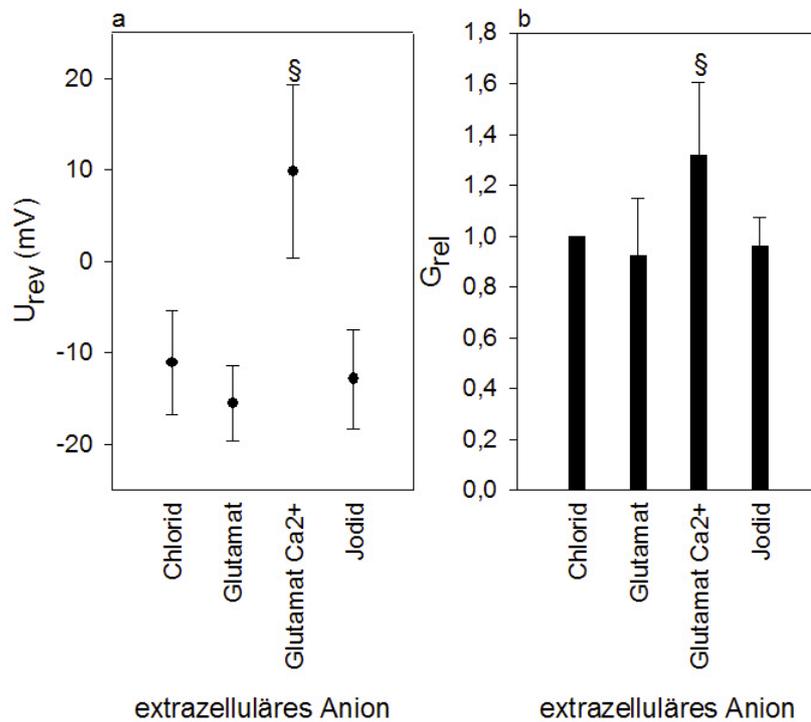


Abb. 12 a-b: Umkehrpotentiale (U_{rev}) und relative Leitfähigkeiten (G_{rel}) der humanen Rezeptormutante $\text{P2X7}^{\text{S339Y}}$ in *Xenopus laevis* Oozyten in Abhängigkeit vom extrazellulären Anion

Die in (a) und (b) verwendeten Lösungen (Lösungen 11, 13, 14, 15, Tab. 1) entsprechen denen aus Abb. 11. a: Aufreihung der Umkehrpotentiale aus Strom-Spannungscharakteristiken am $\text{hP2X7}^{\text{S339Y}}$, welche wie bereits in Abb. 8 dargestellt ermittelt wurden. §: Signifikante Differenz zu U_{rev} bei den restlichen Lösungen; b: Die Leitfähigkeiten wurden wie in Abb. 8 gezeigt ermittelt. G_{rel} wurde entsprechend Gl. 1* auf Ca^{2+} -Ionen freie Chlorid-Lösung (Lösung 11, Tab. 1) normiert. §: Signifikante Differenz zu U_{rev} bei den restlichen Lösungen; MW \pm SD von 5-12 Messungen pro Lösung an insgesamt 9 Oozyten.

5. Diskussion

5.1 Datenlage

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und inwieweit verschiedene extrazelluläre Anionenlösungen den P2X7-Rezeptor beeinflussen können. Zum Einsatz kamen neben dem physiologisch auftretenden Chloridion ein weiteres Halogen, das Jodidion, die anorganischen Moleküle Nitrat und Sulfat sowie die organischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat. Die Untersuchungen umfassten zwei speziesdifferente P2X7-Rezeptoren, die des Menschen (hP2X7) und der Maus (mP2X7) an teils unterschiedlichen Expressionssystemen. Hinzu kam die humane Rezeptormutante P2X7^{S339Y}, welche durch die alleinige Wirksamkeit der hochaffinen ATP⁴⁻-Aktivierungsstelle charakterisiert ist. An RAW-Makrophagen wurde der in diesen Zellen natürlich vorkommende mP2X7 und in *Xenopus laevis* Oozyten wurden nach heterologer Expression der mP2X7, der hP2X7 und die humane Mutante P2X7^{S339Y} untersucht. Die drei verschiedenen P2X7-Rezeptoren zeigen teils unterschiedliche Rezeptorantworten in Bezug zu den jeweiligen extrazellulären Anionen. Am hP2X7 kommt es ausschließlich zu einer Beeinflussung der Wirksamkeit bei Applikation von ATP⁴⁻ wohingegen sich am mP2X7 ebenfalls eine Veränderung der Potenz des Agonisten aufzeigt.

Die verwendeten anorganischen Anionen führen zu einer Reduktion der Rezeptorantwort. Im Falle von Sulfat und Jodid wurde der ebengenannte Sachverhalt auch in Unabhängigkeit vom Expressionssystem an Makrophagen und Oozyten nachgewiesen. Anhand der Bestimmung der relativen Amplituden bei den organischen Anionen Glutamat und Aspartat an RAW-Makrophagen und *Xenopus laevis* Oozyten (Abb. 1c/4g) lässt sich hingegen eine Steigerung des durch 0,1 ATP⁴⁻-induzierten Stroms feststellen. Speziesdifferenzen in Bezug zu den relativen Amplituden zeigen sich zwischen humanen und murinen Rezeptoren lediglich bei den verwendeten anorganischen Anionen in Form eines ausgeprägteren Effekts am mP2X7. Neben diesen ermittelten Ergebnissen ist der unterschiedliche Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurven bei den speziesdifferente Rezeptoren sowie die Beeinflussung der Strom-Spannungscharakteristiken durch extrazelluläre Ca²⁺-Ionen zu diskutieren.

Vorhergehende Arbeiten, welche sich mit dem Einfluss extrazellulärer Anionen auf den P2X7-Rezeptor beschäftigen, beziehen sich teils auf den P2X7-Rezeptor der Maus bzw. der Ratte oder des Menschen. Verhoef et al. untersuchten die Einflussnahme extrazellulärer Anionen auf die P2X7-Rezeptor vermittelte Prozessierung von pro-IL-1 β zum Entzündungsmediator IL-1 β durch Caspase 1 mit der sich anschließenden Freisetzung des Entzündungsmediators IL-1 β an murinen Bac1-Makrophagen und Monozyten (Verhoef et al., 2005). Auch hier zeigte sich eine starke Inhibition durch extrazelluläre Jodidionen und eine Potenzierung durch extrazelluläre

Glutamat- und Glukonationen. Die Substitution extrazellulärer Natriumchloridlösung in Konzentrations-Wirkungs-Kurven durch Natriumglukonat steigerte die ATP-induzierte IL-1 β Freisetzung etwa um das Zehnfache. Neben dieser Erhöhung der Wirksamkeit kommt es ebenso zu einer Steigerung der Potenz des verwendeten Agonisten ATP um das fünffache bei Natriumglukonatlösung.

Kaiho et al. fanden eine Steigerung des maximal aktivierenden Stroms, sowie eine Linksverschiebung in Konzentrations-Wirkungs-Kurven unter Aspartatsubstitution an Maus/Ratte Neuroblastom-Gliomhybridzellen (NG108-15 Zellen). Der EC₅₀-Wert verschiebt sich von $94,0 \pm 1,3 \mu\text{M ATP}$ zu $20,6 \pm 1,2 \mu\text{M ATP}$ nach Aspartatsubstitution (Kaiho et al., 1997).

An HEK293 Zellen, welche mit dem hP2X7-Rezeptor transfiziert wurden, ergaben wechselnde Anionenkonzentrationen nach BzATP-Stimulation folgende pEC₅₀-Werte 6,14 (Aspartat), 6,07 (Glutamat), 5,19 (Chlorid) und 4,53 (Jodid) bezogen auf die halbmaximale YO-PRO-1 Aufnahme. Patch-Clamp Untersuchungen an HEK293 Zellen brachten ebenfalls eine Linksverschiebung bei Stimulation mit BzATP von 4,20 (Chlorid) zu 5,55 (Glutamat) und bei Stimulation mit ATP von 3,22 (Chlorid) zu 4,18 (Glutamat) mit sich (Michel et al., 1999).

Experimente von Gudipathy et al. an humanen Monozyten erbrachten nach Substitution von Natriumchloridlösung mit Kaliumglutamatlösung eine Steigerung der ATP⁴⁻-induzierten YO-PRO-1 Aufnahme um ein Vielfaches. Ebenso führte eine alleinige Substitution des Glutamat anions zu einer gesteigerten ATP-induzierten YO-PRO-1 Aufnahme (Gudipathy et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Veränderungen der pKD-Werte des hP2X7 an der hoch- (pKD₁) sowie niedrigaffinen (pKD₂) Aktivierungsstelle bei Glutamat- bzw. Jodidsubstitution gegenüber Chloridlösung gefunden (s. Tab. 4). Am mP2X7 ließen sich hingegen Rechtsverschiebungen bei Jodid beziehungsweise Linksverschiebungen bei Glutamat auch in Unabhängigkeit vom Expressionssystem in Konzentrations-Wirkungs-Kurven gegenüber Chloridaußenlösung nachweisen (s. Tab. 2 & 5). Die Differenzen der vorliegenden Arbeit zu vorhergehenden Untersuchungen könnten in den unterschiedlichen Methoden begründet sein. Untersuchungen, welche die Freisetzung von IL-1 β oder die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoff YO-PRO-1 zur Ermittlung der Rezeptorantwort verwenden, vermitteln lediglich indirekte Informationen über die Aktivierung der P2X7-Rezeptoren, welche Störfaktoren unterliegen können. Diese Sachverhalte komplizieren die Deutung von Ganzzellexperimenten zum Verständnis des Hemmmechanismus am P2X7. Weiterhin tolerieren Patch-Clamp Untersuchungen keine Ca²⁺-Ionen freien Lösungen, so dass sekundäre Ca²⁺ Effekte nicht sicher auszuschließen sind. Voltage-clamp Experimente an *Xenopus laevis* Oozyten ermöglichen bei Verwendung von Flufenaminsäure die Arbeit mit Ca²⁺-freien

Lösungen. Somit können sekundär Ca^{2+} -aktivierte Effekte vermieden werden. Zusatz von Ca^{2+} -Ionen zu Glutamatlösungen vergrößerte die ATP^{4-} -induzierten Stromamplituden signifikant (Abb. 4i). Somit ist auch von einer deutlichen Steigerung der Effektivität bei Zusatz von Ca^{2+} -Ionen in Konzentrations-Wirkungs-Kurven auszugehen, welche wiederum mit einer Steigerung der Potenz des Agonisten einhergeht (Colquhoun, 1998). Die Arbeiten der genannten Autoren benutzten keine Ca^{2+} -freien Medien, so dass auch darin ein Grund für abweichende Ergebnisse in Bezug zur Potenz am hP2X7 liegen könnte. Nichtsdestominder deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine Speziesdifferenz im Ausmaß der Beeinflussung durch extrazelluläre Anionen hin.

5.2 Anionenimpermeabilität der P2X7-Rezeptoren

Nach der Ermittlung des Ausmaßes der Beeinflussung des humanen und murinen P2X7-Rezeptors durch extrazelluläre Anionen, war es ebenfalls Ziel dieser Arbeit herauszufinden auf welche Art und Weise extrazelluläre Anionen die P2X7-Rezeptorantwort modulieren. Eine Möglichkeit der Beeinflussung des Ionenstroms durch den P2X7-Rezeptorkanal wäre gegeben, wenn die Ionenkanalpore unterschiedliche Leitfähigkeiten für die verwendeten Anionen Chlorid, Jodid oder Glutamat hätte. Die ermittelten Umkehrpotentiale (U_{rev}) zeigten keine signifikanten Differenzen (Abb. 3b, 9) bei Verwendung unterschiedlicher extrazellulärer Anionen. Dies spricht somit gegen eine Beeinflussung der Rezeptorantwort durch eine differierende Permeabilität extrazellulärer Anionen. Eine Ausnahme bilden die Umkehrpotentiale (U_{rev}) an *Xenopus laevis* Oozyten unter Zugabe von Ca^{2+} -Ionen. Auf diesen Sachverhalt wird gesondert in Punkt 5.7 der Diskussion eingegangen. Weiterhin zeigten Einzelkanalmessungen bei unterschiedlichen extrazellulären Anionenlösungen am hP2X7 konstante Einzelkanalleitfähigkeiten (Kubick et al., 2011). Diese Daten unterstützen die Meinung, dass es sich bei P2X7-Rezeptoren um anionenundurchlässige und somit kationenselektive Ionenkanäle handelt. Dies steht im Gegensatz zu vorhergehenden Untersuchungen, welche möglicherweise von einer Permeabilität für Anionen wie Chlorid, Glutamat und sogar ATP^{4-} ausgehen (Pellegatti et al., 2005; Kuehnel et al., 2009a). Im Folgenden der Diskussion wird von einer alleinigen extrazellulären Modulation des Schaltverhaltens der humanen und murinen P2X7-Rezeptoren durch Anionen ausgegangen.

5.3 Allosterische Beeinflussung der ATP⁴⁻-Bindungsstelle am murinen P2X7-Rezeptor

Die signifikant verschiedenen pKD-Werte am mP2X7 deuten auf eine allosterische Beeinflussung der ATP⁴⁻-Bindungsstelle hin. So stellt sich die Frage, wie extrazelluläre Anionen in unterschiedlichen Ausmaßen den mP2X7 hemmen. Ein Erklärungsmodell liefern die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der verwendeten Anionen. Bei einer systematischen Untersuchung des Einflusses durch Anionen aus der Gruppe der Halogene mit Fluorid (F⁻), Chlorid (Cl⁻), Bromid (Br⁻) und Jodid (I⁻) diskutieren Kaiho et al. die Bedeutung des Ionenradius und der daraus resultierenden Hydratationsenergie (Kaiho et al., 1997). Je kleiner der Ionenradius, desto größer ist die benötigte Energie (Hydratationsenthalpie) um die Wasserhülle abzustreifen. Für die Halogene sind folgende Daten publiziert worden: Ionenradius in Å (Shannon, 1976)/Hydratationsenergie ΔG in kJ mol⁻¹ (Marcus, 1987) F⁻ 1.33/-510, Cl⁻ 1.81/-367, Br⁻ 1.96/-336, I⁻ 2.2/-291. Die von Kaiho et al. ermittelten Werte für den maximalen Strom (I_{max}) und die halbmaximale Aktivierung (EC₅₀) korrelierten weitgehend in der Reihenfolge mit den genannten Ionenradien und Hydratationsenthalpien. So könnte ein Hemmmechanismus der Halogene in der Konkurrenz mit der ATP⁴⁻-Bindungsstelle nach Abstreifen der Wasserhülle liegen. Umso geringer demnach die Hydratationsenthalpie, desto ausgeprägter die Hemmung des murinen P2X7-Rezeptors.

Betrachtet man ergänzend die in der vorliegenden Arbeit verwendeten anorganischen kleinen Anionen Nitrat und Sulfat kommt man zu unterschiedlichen Ergebnissen. Wohingegen sich Nitrat mit seinem Ionenradius von 1.79 Å (Shannon, 1976) und ΔG mit -312 kJ mol⁻¹ (Marcus, 1987) entsprechend der relativen Amplitude zwischen Chlorid und Jodid einreicht, versagt jenes Modell beim Sulfation mit einem Ionendurchmesser von 2.3 Å (Shannon, 1976) und ΔG mit -1035 kJ mol⁻¹ (Marcus, 1987). So erscheint eine allosterische Beeinflussung der ATP⁴⁻-Bindungsstelle des Sulfations nach Abstreifen der Wasserhülle aufgrund der hohen Hydratationsenthalpie unwahrscheinlich. Eventuell sorgt jedoch die zweifach negative Ladung des Sulfations für eine gesteigerte Affinität an der ATP⁴⁻-Bindungsstelle. So könnte sich die vergleichsweise hohe Hydratationsenthalpie in diesem Modell relativieren. Die vergleichsweise großen organischen Anionen mit einerseits zwar geringen Hydratationsenthalpien (ΔG in kJ mol⁻¹) von -34,09 bei Glutamat und von -33,38 bei Aspartat (Ooi et al., 1987) scheinen andererseits als vergleichbar große Moleküle gegenüber den anorganischen Anionen keine oder nur eine verringerte allosterische Hemmung am mP2X7 aufzuweisen. Dies weist darauf hin, dass die allosterische Beeinflussung von P2X7-Rezeptoren durch Anionen nicht allein durch die Hydratationsenthalpie bestimmt wird.

5.4 Mechanismus der Beeinflussung durch extrazelluläre Anionen am humanen P2X7-Rezeptor

Wie bereits erwähnt deuten die in verschiedenen Anionenlösungen nicht signifikant verschiedenen pKD-Werte am hP2X7 auf eine fehlende Beeinflussung der ATP⁴⁻-Bindungsstelle durch extrazelluläre Anionen hin. Einzelkanalmessungen am hP2X7 (mit 0,5 mM Ca²⁺ extrazellulär aber zusätzlich starker intrazellulärer Ca²⁺-Pufferung, welche den [Ca²⁺]_i-Anstieg verhindert) zeigten eine deutliche Einflussnahme auf die Offenwahrscheinlichkeit des hP2X7 bei konstanten Kanaloffenzeiten, Stromamplituden und Einzelkanalleitfähigkeiten. Das heißt bei extrazellulärer Jodidlösung steigt die mittlere Geschlossenzeit am Einzelkanal, wohingegen sich diese bei Glutamatlösung verringert (Kubick et al., 2011). Diese Ergebnisse sprechen für eine extrazellulär gelegene allosterische Anionenbindungsstelle am hP2X7-Rezeptor, welche Einfluss auf das Gating nimmt. So ist es denkbar, dass extrazelluläre Anionen diese Anionenbindungsstelle ebenfalls entsprechend ihrer Hydratationsenergien in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen können. Beeinflusst wird jedoch nur das Gating über die niedrigaffine ATP⁴⁻-Aktivierungsstelle, da in Einzelkanalexperimenten nur die niedrigaffine Aktivierungsstelle dargestellt wird (Riedel et al., 2007a). Dies bestätigend, ergaben die Messungen an der hP2X7^{S339Y}-Rezeptormutante, sowie die Approximationen der hochaffinen Aktivierungsstelle keine signifikanten Differenzen bei extrazellulären Jodid- und Glutamationen.

5.5 Hypothese des unterschiedlichen Einflusses auf die Potenz des Agonisten am humanen und murinen P2X7-Rezeptor

Wie im vorangehenden Abschnitt diskutiert, kommt es an der ATP⁴⁻-Bindungsstelle am hP2X7 im Gegensatz zum mP2X7 zu keiner allosterischen Beeinflussung der ATP⁴⁻-Bindung durch Anionen. Eine Ursache für diese Speziesdifferenz kann bei Betrachtung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven hypothetisch erstellt werden. An den Kurven des hP2X7 finden sich zwei ausgeprägte Komponenten, benannt entsprechend ihrer Affinität in hoch- und niedrigaffin. Am mP2X7 lässt sich hingegen keine separate hochaffine Komponente bei den erstellten ATP⁴⁻-Konzentrations-Wirkungs-Kurven abgrenzen. Messungen am nativen mP2X7-Rezeptor in RAW-Mausmakrophagen zeigten, dass dort die Aktivierung über die hochaffine Bindungsstelle im Vergleich zum hP2X7-Rezeptor sehr klein ist (Kuehnel et al., 2009a).

Man geht davon aus, dass für die vollständige Aktivierung des P2X7-Rezeptors drei ATP⁴⁻-Moleküle am Rezeptor binden müssen. Die Aktivierung der hochaffinen Komponente erfolgt bereits nach dem Binden eines ATP⁴⁻-Moleküls. Die vollständige Aktivierung über die niedrigaffine Komponente vollzieht sich nach dem Binden des zweiten und dritten ATP⁴⁻-

Moleküls (Klapperstück et al., 2001; Riedel et al., 2007a). Da es sich bei P2X7-Rezeptoren um Trimere handelt, welche sich aus drei homologen Proteinen zusammensetzen, scheint eine vorbestehende unterschiedliche Affinität der ATP⁴⁻-Aktivierungsstellen unwahrscheinlich (Nicke, 2008; Kawate et al., 2009). Vielmehr hemmt vermutlich die Bindung des ersten ATP⁴⁻-Moleküls die Bindung des zweiten und dritten Moleküls im Sinne einer negativen Kooperativität (Klapperstück et al., 2001).

Geht man am hP2X7 nach dem Binden des ersten ATP⁴⁻-Moleküls von einer Veränderung der Quartärstruktur des Rezeptormoleküls aus, welche eine Konformationsänderung der zweiten und dritten ATP⁴⁻-Bindungsstelle mit daraus resultierender verminderter Affinität gegenüber dem Agonisten nach sich zieht, könnte darin die Ursache für den fehlenden Einfluss von Anionen auf die Potenz des Agonisten liegen. Die Bindung des ersten ATP⁴⁻-Moleküls am hP2X7 erfährt aufgrund der hohen Affinität zum Agonisten in Unabhängigkeit vom extrazellulären Anion (s. Tab. 4) keine Konkurrenz durch Anionen. Nach der sich anschließenden Konformationsänderung des Rezeptorproteins könnte der ATP⁴⁻-Bindungsstelle nun keine allosterische Beeinflussung durch extrazelluläre Anionen mehr widerfahren. Letztlich bedarf diese Hypothese jedoch weiterer tiefgreifenderer Bindungsstudien.

Geht man also davon aus, dass die Abgrenzung von hoch- und niedrigaffiner Aktivierungsstelle am hP2X7 eine bedeutende Rolle für die fehlende Beeinflussung der Potenz des Agonisten zukommt, so stellt sich die Frage, warum sich diese am mP2X7 nicht abgrenzen lässt. Denkbar ist einerseits eine fehlende negative Kooperativität nach dem Binden des ersten ATP⁴⁻-Moleküls, welche folglich keine Abgrenzung zweier Affinitätskomponenten ermöglicht. Somit müsste der pKD-Wert am murinen Rezeptor höhere Werte im Vergleich zum pKD2-Wert am hP2X7 annehmen. Jedoch nimmt der pKD2-Wert am hP2X7 gegenüber den pKD-Werten am mP2X7 in Oozyten und RAW-Makrophagen bei Chloridlösung vergleichbare Werte an. Die ähnlichen KD-Werte für hP2X7 und mP2X7 widersprechen zum Teil den Ergebnissen aus der Literatur (s. 1.4.7). Dies könnte am Fehlen einer Stromkomponente am mP2X7, die über eine hochaffine ATP-Bindungsstelle aktiviert wird, liegen. Glaubt man nun unseren Ergebnissen vergleichbarer pKD Werte scheint es wahrscheinlicher, dass das Binden des ersten ATP⁴⁻-Moleküls am mP2X7 noch keine adäquate Ionenkanalporenöffnung nach sich zieht und die Rezeptorantwort somit vorwiegend über die niedrigaffine Aktivierungsstelle getragen wird, welche im Gegensatz zum hP2X7 einer Konkurrenz zu extrazellulären Anionen unterliegt. Wenn gleich diese Hypothese jedoch weiterer Untersuchungen bedarf, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aus zwei unterschiedlichen Expressionssystemen jedoch auf eine Konkurrenz zwischen extrazellulären Anionen und ATP⁴⁻ um die Agonistenbindungsstelle am mP2X7, nicht jedoch am hP2X7 hin.

5.6 Speziesdifferenzen relativer Amplituden bei anorganischen Anionen

Die Messergebnisse an *Xenopus laevis* Oozyten verdeutlichen eine signifikant stärker ausgeprägte Hemmung der drei anorganischen Anionen Jodid, Nitrat und Sulfat am mP2X7 gegenüber dem hP2X7 auf die relative Stromamplitude (Abb. 4g). Der am stärksten ausgeprägte hemmende Effekt wird durch extrazelluläres Jodid hervorgerufen. Jodid-Konzentrations-Wirkungs-Kurven am hP2X7 und mP2X7 bestätigen die ausgeprägte Inhibition mit speziesdifferentem Unterschied im Ausmaß der Hemmung. So trat eine halbmaximale Inhibition bereits bei 11,6 mmol/l am murinen Rezeptor auf, wohingegen der humane Rezeptor erst bei einer deutlich höheren Jodidionenkonzentration von 62,6 mmol/l eine halbmaximale Hemmung aufwies. Die weitere Betrachtung der Wirkung des Jodidions in ATP⁴⁻-Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Abb. 6a-b/7a-b) zeigt an den speziesdifferenten P2X7-Rezeptoren ebenfalls unterschiedliche Effekte. Es zeigt sich eine ausgeprägtere Hemmung am mP2X7 in Form einer signifikanten Rechtsverschiebung bei extrazellulärer Jodidlösung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Am hP2X7 hingegen bleibt eine Veränderung der Potenz des Agonisten in Jodidlösung aus. Die erhöhte Wirksamkeit gegenüber Chloridlösung am mP2X7 gemessen am approximierten maximal aktivierenden Strom I_{act} am mP2X7 (Abb. 7a-b) widerspricht den Ergebnissen der Amplitudenmessungen nicht, da sich die Steigerung erst bei Konzentrationen größer als 1 mM ATP⁴⁻ vollzieht und die Amplitudenmessungen in Abbildungen 1 und 4 mit der Applikationen von 0,1 mM ATP⁴⁻ erfolgten. Diese genannten Ergebnisse unterstreichen die Speziesdifferenz in Form der stärkeren jodidvermittelten Hemmung des mP2X7 gegenüber dem hP2X7, ohne jedoch eine Erklärung zu liefern.

Die Untersuchungen der Rezeptormutante ergaben hingegen keine Verminderung des ATP-aktivierten Stroms durch extrazelluläre Jodidionen (Abb. 11). Ausgerechnet hierin ist die Ursache der Speziesdifferenz zu suchen. Es verdeutlicht, dass eine Jodidion-vermittelte Hemmung des hP2X7-Rezeptors nur über die niedrigaffine ATP⁴⁻-Aktivierungsstelle stattfindet und die messbare hochaffine Komponente unberührt bleibt (Abb. 6b/Tab. 4).

Somit lässt sich die Speziesdifferenz anhand des deutlich ausgeprägteren Effektes der hochaffinen Komponente am hP2X7 gegenüber dem mP2X7 erklären. Rechnerisch wird die hochaffine Komponente am hP2X7 bereits bei einer Konzentration von 0,0074 mmol/l ATP⁴⁻ (pK_D=2,13) halbmaximal aktiviert. Der relative maximal aktivierende Strom von 0,49 der hochaffinen Komponente beträgt am relativen Gesamtstrom beider Komponenten am hP2X7 von 1,22 (siehe Tab. 4) somit immerhin zwei Fünftel. So hat die hochaffine Komponente bei Messungen mittels 0,1 ATP⁴⁻ in Jodidlösung einen bedeutenden Anteil am Gesamtstrom am hP2X7, welcher den Unterschied der größeren relativen Amplitude am hP2X7 gegenüber dem mP2X7 erklärt. D.h. dass in Wirklichkeit nicht die halbmaximale Hemmung signifikant verschieden ist, sondern das maximale Ausmaß der Hemmung.

5.7 Bedeutung des Ca^{2+} -Ions auf die Messung von Ganzzellströmen

Wie bereits erwähnt, tolerieren Patch-Clamp Untersuchungen keine Ca^{2+} -freien Extrazellulärlösungen. Der Großteil der publizierten P2X7-Daten, welche über den Einfluss durch extrazelluläre Anionen Auskunft geben, wurde mit Ca^{2+} -haltigen Untersuchungsmedien gewonnen. Es wurde in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Charakterisierung des P2X7-Rezeptors in Ca^{2+} -freien Medium gelegt. Vergleichend wurden den extrazellulären Chlorid- und Glutamatlösungen Medien gegenübergestellt, welche zusätzlich Ca^{2+} -Ionen beinhalteten. In diesen Ca^{2+} -ionenhaltigen Extrazellulärmedien zeigten sich signifikant gesteigerte speziesunabhängige Stromamplituden und Leitfähigkeiten am Umkehrpotential im Vergleich zu den Ca^{2+} -ionenfreien Chlorid- und Glutamatlösungen (Abb. 4 & 10). In Ca^{2+} -freier Lösung wurde Flufenaminsäure benutzt, um endogene Anionenkanäle der Oozyten, die bei Entzug extrazellulärer divalenter Kationen aktiviert werden, zu blockieren (Weber et al., 1995). Dass das Fehlen der Flufenaminsäure in Ca^{2+} -haltiger Badlösung zusätzliche Chloridkanäle aktiviert hat, ist unwahrscheinlich, da frühere Messungen zeigten, dass Zugabe von Flufenaminsäure in Ca^{2+} -haltiger Extrazellulärlösung den ATP-induzierten P2X7-Rezeptor-abhängigen Einwärtsstrom bei -40 mV gering erhöht hat (Klapperstück et al., 2000a). Flufenaminsäure könnte in Ca^{2+} -freier Badlösung zusätzliche Ca^{2+} -aktivierbare Anionenkanäle hemmen, zumal bekannt ist, dass die strukturell ähnliche Nifluminsäure die endogenen Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanäle von *Xenopus laevis* hemmt (Machaca et al., 2002). Die alleinige Zugabe von 0,5 mmol/l Ca^{2+} -Ionen erhöht folglich die Anzahl der Kationen, welche in der Lage sind den P2X7-Rezeptorionenkanal zu permeieren. Es scheint jedoch sehr unwahrscheinlich, dass dies allein zu einer solch starken Erhöhung der relativen Amplituden führen kann. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es nach der Ionenkanalaktivierung zu einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration nahe der Zellmembran kommt, welche Ca^{2+} -ionenabhängige Chloridkanäle aktiviert. Dieser Effekt wird durch die erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des P2X7-Rezeptors bei Glutamatlösung noch gesteigert. Diese Annahme wird durch folgende Ergebnisse gestützt:

- I) In Ca^{2+} -freien Glutamatlösungen kommt es zu einer Steigerung der Amplituden um etwa 200% (Abb. 4i), wohingegen in Ca^{2+} -haltigen Glutamatlösungen die relative Amplitude um etwa 400% (Abb. 1c, 4i) steigt.
- II) Es kommt zu einer Änderung der Aktivierungskinetik in Ca^{2+} -haltigen Glutamatlösungen, welche sich in Form einer Zunahme der schnell aktivierenden Stromkomponente zeigt (Abb. 4 b,c,f,g).
- III) An der anionenunempfindlichen hP2X7^{S339Y}-Rezeptormutante kommt es bei Zugabe von Ca^{2+} -Ionen in Glutamatlösung ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der relativen Amplitude.

- IV) Glutamat verschiebt das Umkehrpotential ATP⁴⁻-induzierter Ströme lediglich in Ca²⁺-ionenhaltigen Medium in signifikant positivere Bereiche. In Ca²⁺-ionenhaltiger Chloridlösung kommt es hingegen nur zu einer schwachen nicht signifikanten Verschiebung des Umkehrpotentials.

Letzteres könnte darin begründet sein, dass das geringere Ausmaß der Ionenkanalaktivierung bei Cloridlösung noch zu keiner nennenswerten Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Ionenkonzentration führt. Kommt es jedoch wie bei extrazellulärer Glutamlösung mit Ca²⁺-Ionen zu einer nennenswerten Steigerung der intrazellulären Ca²⁺-Ionenkonzentration, führt dies zu einem Ausstrom von Chloridionen durch Chloridkanäle. Ein Ausstrom negativer Ladungsträger entspricht elektrophysiologisch dem Einstrom positiver Ladungsträger und führt somit zu einer Depolarisation der Zellmembran mit konsekutiver Erniedrigung des gemessenen Einwärtsstroms. Unter Bedingungen der Spannungsklemme wird dieser Effekt bei einem konstanten Membranpotential vermieden. Dies führt dementsprechend zu einer Steigerung des gemessenen Einwärtsstroms. Physiologische Bedeutung kommt den durch Ca²⁺-Ionen aktivierten Chloridkanälen (CaCCs) an *Xenopus laevis* Oozyten bei der Verhinderung einer Polyspermie durch Membrandepolarisation zu (Machaca et al., 2002). Ebenso finden sich CaCCs in Epithelzellen, olfaktorischen Rezeptoren, Neuronen, Photorezeptoren und glatten Muskelzellen. Dort kommt Ihnen neben der bereits erwähnten Amplifikation der Rezeptorantwort eine Beteiligung bei der Elektrolytsekretion zu (Hartzell et al., 2005; Galiotta, 2009). Um welchen Typ der CaCCs es sich in *Xenopus laevis* Oozyten handelt bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es deutet darauf hin, dass es sich um den kürzlich geklonten ANO-1 Kanal handeln könnte (Weber, 1999; Machaca et al., 2002; Galiotta, 2009; Fallah et al., 2011).

5.8 Bedeutung im Organismus

In erster Linie dient die vorliegende Arbeit der biophysikalischen Charakterisierung des Einflusses von Anionen auf P2X7-Rezeptoren. Die gewonnen Erkenntnisse lassen aber auch mögliche Schlussfolgerungen für Abläufe im Organismus zu. So unterliegt das Ausmaß der Rezeptorantwort nicht alleinig der vorliegenden Konzentration des Agonisten ATP⁴⁻, sondern erfährt auch eine Modulation durch die Extrazellulärlösung. Unter zellhomöostatischen Bedingungen liegt die extrazelluläre ATP-Konzentration in etwa bei 1-10 nM. Intrazellulär hingegen ist eine ATP-Konzentration von 5-10 mM beschrieben (Di Virgilio, 2005). Neben diesem Konzentrationsgradienten stellt ATP aufgrund seiner Wasserlöslichkeit und dem schnellen Abbau durch ATPasen (Zimmermann, 2000) einen geeigneten intrazellulär gespeicherten und extrazellulär wirkenden Transmitter dar (Di Virgilio, 2005). Eine Anreicherung von ATP im Extrazellulärraum ist durch drei unterschiedliche Mechanismen

beschrieben. So spielt neben der Zellyse unterschiedlichster Genese auch die Exozytose aus chromaffinen Granula in der Nebenniere oder im ZNS eine Rolle, sowie die Freisetzung mit Hilfe von ATP-Transportproteinen wie SLC17A9 (Beigi et al., 1999; Pankratov et al., 2006; Sawada et al., 2008). Neben dem während der Zellyse freigesetzten ATP kommt auch den die Läsion umgebenden vitalen Zellen bei der ATP-Freisetzung eine Bedeutung zu. Diskutiert wird eine anhaltende Bereitstellung energiebereitstellender Metabolite bei persistierenden gestörten Effluxmechanismen (Wang et al., 2004). So sind extrazelluläre ATP-Konzentrationen von 10-20 μM bis hin zu 100-200 μM gemessen worden. Wobei zu bemerken ist, dass die ATP-Konzentration an der Zelloberfläche die gemessenen Konzentrationen im Gesamtextrazellulärmedium um ein Vielfaches übersteigt (Beigi et al., 1999; Pellegatti et al., 2005; Gourine et al., 2007). So ist bei diesen maximalen extrazellulären ATP-Konzentrationen entsprechend der Ergebnisse aus Tab. 4 von einer Aktivierung sowohl der hoch- als auch der niedrigaffinen Aktivierungsstellen am hP2X7-Rezeptor auszugehen.

Neben der Beeinflussung der hP2X7-Aktivierung durch Natriumsubstitution mit K^+ , NMDA^+ oder 1MA^+ (Riedel et al., 2007b) spielen auch die sich in der Extrazellulärlösung befindlichen Anionen eine bedeutende Rolle. Unter physiologischen Bedingungen erwartet man ein chloridreiches Extrazellulärmilieu, welches in etwa der verwendeten Chloridlösung in der vorliegenden Arbeit entspricht. Jedoch treten unter pathophysiologischen Bedingungen aber auch in speziellen Kompartimenten des Organismus abweichende Extrazellulärlösungen auf.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, hat der P2X7-Rezeptor bei der Immunmodulation eine enorme Bedeutung. Während Entzündungsreaktionen unterschiedlicher Genese, wie zum Beispiel bei Infektionen, Hypoxie oder Gewebstraumatisierungen, kommt es unter anderem zu nekrotischen Gewebsuntergängen mit dem folglich Freiwerden von Intrazellulärflüssigkeit. So vollzieht sich eine Anreicherung des Extrazellulärmediums im Entzündungsbereich mit Kalium und Proteinen bei Auswaschung beziehungsweise Verdrängung von Natrium und Chlorid. Das auf diesem Wege mit Proteinen angereicherte Extrazellulärmilieu scheint mit den verwendeten Glutamat- und Aspartatlösungen durchaus vergleichbar. So ist es denkbar, dass sich in traumatisierten und entzündeten Geweben eine Verstärkung der P2X7-Rezeptorantwort vollzieht, welche unter anderem die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel IL-1 β , IL-18 und TNF α nach sich zieht (Di Virgilio, 2007).

Weiterhin gibt es Umgebungen im Organismus mit vom Extrazellulärmedium abweichenden Zusammensetzungen, in denen der P2X7-Rezeptor eine Funktion erfüllt. So findet sich der P2X7-Rezeptor ebenfalls in der Membran von Phagosomen. Die ATP⁴⁻-Bindungsstelle befindet sich im Inneren des Phagosomen und die N- und C-Termini des Rezeptortrimers folglich im Zytoplasma der Zelle. Phosphorylierte Lipide wie zum Beispiel S1P öffnen ADP Kanäle oder Transporter, welche ADP ins Phagosomeninnere transportieren. Dort werden je 2 ADP Moleküle mittels Adenylatkinasen zu ATP und AMP umgewandelt. Die folgende Stimulation

des P2X7-Rezeptors durch dies so gebildete ATP veranlasst eine Aktinvernetzung, welche zum Beispiel der Verschmelzung von Phago- und Lysosomen dient (Kuehnelt et al., 2009b). Obwohl Phagosomen durch den Prozess der Endozytose entstehen, ist von einem chloridarmen und proteinreichen Inhalt auszugehen, welcher somit eher dem Intrazellulärraum gleicht. Diese Annahme begründet sich aufgrund der hauptsächlichlichen Inkorporation von Bakterien und anderen Fremdantigenen. Des Weiteren werden im Verlauf neue Proteine biosynthetisch hinzugefügt oder aus dem Zellplasma herangezogen (Desjardins et al., 1994). Somit ist auch hier eine gesteigerte Rezeptoraktivierung durch das in den Phagosomen enthaltene ATP zu erwarten. Da der Aktinvernetzung eine enorme Bedeutung bei der Bildung von Phagolysosomen und der damit verbundenen Erregerelimination zukommt, spielt die Anionen-Zusammensetzung am P2X7-Rezeptor auch hier eine wichtige Rolle. Insbesondere die Abtötung des Tuberkuloseerregers *Mykobakterium tuberculosis* bedarf der ATP-induzierten Verschmelzung von Phagosomen und Lysosomen zu Phagolysosomen (Fairbairn et al., 2001). Eine Verringerung der Chloridionenkonzentration zugunsten von Polypeptiden und Proteinen im Phagosom würde eine erhöhte Rezeptoraktivierung bei geringen ATP-Konzentrationen ermöglichen.

Eine weitere P2X7-Lokalisation im Organismus in der sich vom gewöhnlichen Extrazellulärmilieu abweichende Anionenlösungen finden lassen, liegt im Zentralnervensystem. Unumstritten ist die Expression des P2X7-Rezeptors in Mikroglia und Astrozyten (Sperlagh et al., 2006). Eine gesteigerte Expression beziehungsweise Stimulation des P2X7-Rezeptors in Mikrogliazellen ist mit neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Alzheimer, Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose und der multiplen Sklerose assoziiert (Monif et al., 2010). Mikroglia und Astrozyten sind ebenfalls in der Lage, Glutamat freizusetzen und somit eine gesteigerte P2X7-Rezeptorantwort nach Exozytose ins extrazelluläre Medium zu bewirken. Interessanterweise kommt insbesondere dem P2X7-Rezeptor eine Funktion bei der Glutamatfreisetzung zu (Duan and Neary, 2006). Des Weiteren ist es denkbar, dass Glutamat aus dem synaptischen Spalt glutamaterger Neuronen durch funktionelle Interaktion und enge räumliche Beziehungen (Burnstock, 2007) eine P2X7-Rezeptormodulation auf Astrozyten und Mikroglia-Membranen bewirken kann.

Kontrovers diskutiert wird hingegen das direkte Vorliegen des P2X7-Rezeptors in Neuronen. Es finden sich Hinweise aus pharmakologischen P2X7-Profilen und Antikörperuntersuchungen über das Vorhandensein in Neuronen und somit auch im synaptischen Spalt (Anderson and Nedergaard, 2006; Sperlagh et al., 2006). So ist bei Expression des P2X7-Rezeptors im synaptischen Spalt von glutamatergen Neuronen ebenso von einer gesteigerten Rezeptorantwort bei gleichzeitigem Anstieg der extrazellulären ATP- und Glutamatkonzentration auszugehen. In mehreren Teilen des Rattenhirns (z.B. Hirnstamm, Hypothalamus, Hippocampus, Putamen und Hirnrinde) konnte die Coexpression von Glutamattransportern (VGLUT1/2) und dem P2X7-

Rezeptor nachgewiesen werden. Die Glutamatransporter VGLUT1/2 sind für die Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt verantwortlich und stellen einen Marker für glutamaterge Neurone dar (Atkinson et al., 2004). Es wird eine Beteiligung des P2X7-Rezeptors im Zentralnervensystem an der Neurotransmitterfreisetzung vermutet. Um das Vorliegen des Rezeptors in Neuronen zu sichern und dessen Funktion zu verstehen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Neben diesen Ionenmilieus, welche eine Zunahme der P2X7-Rezeptorantwort nach sich ziehen können, ist auch eine relevante inhibitorische Beeinflussung durch Jodid in der hormonproduzierenden Schilddrüse denkbar. Der P2X7-Rezeptor konnte in gesundem Schilddrüsen- wie auch im Schilddrüsenkarzinomgewebe nachgewiesen werden. Auffällig ist hierbei eine gesteigerte Expression im Karzinomgewebe mit erhöhter Produktion des unter anderem wachstumsfördernden IL-6. Weiterhin wurden erhöhte intra- wie extrazelluläre gesteigerte ATP-Konzentrationen nachgewiesen (Solini et al., 2008). Geht man im gesunden Schilddrüsen- wie auch im Schilddrüsenkarzinomgewebe durch aktive Transportprozesse ($2 \text{ Na}^+/\text{J}^-$ Kotransporter) (Kopp, 2008) von einer relevanten Jodidionenkonzentration um $60,0 \text{ mmol/l}$ aus, welche entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 5 in der Lage ist, den P2X7-Rezeptor entsprechend den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen zu hemmen, so könnte dieser hemmende Mechanismus im Karzinomgewebe aufgehoben sein. Ursächlich dafür wäre ein von Schlumberger beschriebener gestörter bis aufgehobener Jodidstoffwechsel im Schilddrüsenkarzinomgewebe (Schlumberger et al., 2007). Somit wäre bei fehlender Hemmung eine bereits beschriebene P2X7-vermittelte verstärkte Expression des Rezeptors und eine gesteigerte ATP Sekretion im Tumorgewebe denkbar.

Die Interaktion zwischen P2X7-Rezeptoren und Ca^{2+} -Ionen aktivierter Chloridkanäle (CaCCs) könnte eine Bedeutung in sekretorischen Epithelien wie zum Beispiel dem Pankreas und den Speicheldrüsen zukommen. Eine ATP-Sekretion in den Drüsenazinus nach muskarinenger Stimulation vermittelt eine P2X7 vermittelte Depolarisation mit konsekutiver Aktivierung Ca^{2+} -Ionen abhängiger Chloridkanäle (CaCCs) exprimiert in duktalem Drüsenzellen. Die Depolarisation der duktalem Epithelien führt zu einer erhöhten Triebkraft des Chloridioneneinstroms und somit möglicherweise zu einer gesteigerten Chloridreabsorption (Novak, 2011).

6. Zusammenfassung

P2X7-Rezeptoren sind durch extrazelluläres ATP aktivierbare kationenselektive Ionenkanäle, welche sich aus drei homologen Proteinen zu einem Rezeptortrimer zusammensetzen. P2X7-Rezeptoren werden auf Zellen unterschiedlicher Spezies exprimiert, mit teils unterschiedlichen Rezeptoreigenschaften in Bezug auf die Potenz und Wirksamkeit der Agonisten ATP und BzATP, die Antagonisierbarkeit und das Deaktivierungsverhalten. Eine Sonderstellung innerhalb der Gruppe der P2X-Rezeptoren nimmt der P2X7-Rezeptor aufgrund des langen C-Terminus von 237 Aminosäuren ein. Diesem langen C-Terminus wird eine Bedeutung bei der viel diskutierten Porenbildung des P2X7 sowie bei der Interaktion mit anderen zellulären Proteinen, insbesondere auf Zellen des Immunsystems (Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen), welche den P2X7-Rezeptor exprimieren, zugeschrieben. Besondere Bedeutung kommt dem P2X7-Rezeptor bei Prozessen wie Inflammation, Nozizeption, Hypoxie und Zellyse zu. Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen kommt es zum Beispiel durch Zellyse und konsekutiver Freisetzung intrazellulärer Proteine zu Veränderungen der Extrazellulärlösung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, inwieweit und auf welchem Wege wechselnde extrazelluläre Anionenkonzentrationen den P2X7-Rezeptor beeinflussen können. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Rezeptorantworten und Beeinflussungsmechanismen am humanen und murinen P2X7-Rezeptor unterscheiden.

Als Versuchsmodelle dienten neben nativ P2X7-Rezeptoren exprimierende RAW-Mausmakrophagen insbesondere heterolog P2X7-Rezeptoren exprimierende *Xenopus laevis* Oozyten, wobei letztere die Untersuchung speziesdifferenter P2X7-Rezeptoren im gleichen Expressionsmodell ermöglichten. Daneben tolerierten sie Experimente mit Ca^{2+} -Ionen freien Extrazellulärmedien. Somit ließen sich sekundär durch Ca^{2+} -Ionen aktivierte Prozesse ausschließen, wodurch die Deutung von Ganzzelleexperimenten weniger Störfaktoren unterlag.

Zur Ermittlung des Anioneneffektes wurden systematisch vergleichende Messungen durch Anionensubstitution gegen physiologisch vorkommende Natriumchloridlösung durchgeführt. Substituiert wurden extrazelluläre Chloridionen durch die organischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat sowie die anorganischen Anionen Jodid, Nitrat und Sulfat. Ergänzend wurden den Chlorid- und Glutamatlösungen vergleichend Ca^{2+} -Ionen zugesetzt. Zur Auswertung wurden relative Stromamplituden sowie Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt und mittels Strom-Spannungs-Charakteristiken Umkehrpotentiale und relative Leitfähigkeiten bestimmt.

Die organischen Anionen Glutamat und Aspartat führten bei Patch-clamp Experimenten an RAW-Makrophagen und Voltage-clamp Experimenten an *Xenopus laevis* Oozyten zu einer Steigerung der relativen Stromamplituden. Anorganische Anionen in Form von Jodid, Nitrat und Sulfat hatten hingegen eine Verminderung der relativen Stromamplituden zur Folge. Das

stärkste Ausmaß der Rezeptorinhibition fand sich speziesunspezifisch beim Jodidion. Bei weiteren tiefgreifenderen Untersuchungen mittels Konzentrations-Wirkungs-Kurven kam es am hP2X7 ausschließlich zu einer Beeinflussung der Wirksamkeit des Agonisten ATP⁴⁻, welche sich vorwiegend an der niedrigaffinen Stromkomponente vollzog. Analog zu den relativen Amplituden führten die organischen Anionen zu einer Steigerung und die anorganischen Anionen zu einer Verminderung der Wirksamkeit am hP2X7. Am mP2X7 hingegen veränderte sich die Potenz des Agonisten ATP⁴⁻, in Form einer Linksverschiebung durch organische Anionen und einer Rechtsverschiebung durch die verwendeten anorganischen Anionen.

Des Weiteren zeigte sich ein speziesdifferenter Unterschied im Ausmaß der Hemmung durch anorganische Anionen mit stärkerer Ausprägung am mP2X7. Verantwortlich hierfür ist eine nur am hP2X7 messbare Stromkomponente, die bereits durch ATP⁴⁻-Konzentrationen im niedrigmikromolaren Konzentrationsbereich über eine hochaffine ATP-Bindungsstelle aktiviert und durch Anionen nicht beeinflusst wird. Der Anteil am Gesamtstrom, welcher über diese hochaffine Aktivierungsstelle am humanen Rezeptor vermittelt wird, nimmt bei der meist verwendeten ATP-Konzentration von 0,1 mmol/l bis zu vierzig Prozent an. Am murinen P2X7-Rezeptor scheint sich hingegen über die hochaffine Aktivierungsstelle noch keine ausreichende Stromaktivierung zu vollziehen, worin sich die speziesdifferente Inhibition durch anorganische Anionen begründet. Dies konnte in den erstellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sowie an Messungen mit der humanen Rezeptormutante P2X7^{S339Y}, welche durch das alleinige Vorliegen der hochaffinen Aktivierungsstelle charakterisiert ist, ermittelt werden.

In den mittels Stromspannungscharakteristiken bestimmten Umkehrpotentialen ließ sich eine Beeinflussung des P2X7-Rezeptors in Form einer Anionenpermeabilität ausschließen. Es kam lediglich beim Zusatz von Ca²⁺-Ionen in Glutamatlösung zu einer Verschiebung der Umkehrpotentiale in positivere Bereiche, verbunden mit einer Steigerung der Stromamplitude. Die Ursache dafür scheint in einer Aktivierung endogener Ca²⁺-aktivierter Chloridkanäle der *Xenopus laevis* Oozyten zu liegen.

Physiologische Bedeutung ist den Ergebnissen insofern zuzuschreiben, dass es bei zelllytischen Prozessen mit einem Anstieg der extrazellulären Proteinkonzentration und Abfall der extrazellulären Chloridkonzentration zu einer gesteigerten Rezeptorantwort im Sinne einer Amplifikation der Entzündungsantwort kommt. Daneben ist eine gleichsinnige Rezeptormodulation in P2X7 exprimierenden Neuronen mit glutamatergen Synapsen denkbar. Eine nachgewiesene Coexpression von Glutamattransportern (VGLUT1/2) und dem P2X7-Rezeptor in Rattenhirnen liefert Hinweise auf eine mögliche Interaktion. Ebenso exprimieren Mikroglia und Astrozyten den P2X7-Rezeptor, welche gleichzeitig durch Freisetzung von Glutamat in den Extrazellulärraum eine gesteigerte Rezeptorantwort nach sich ziehen können. Eine inhibitorische Bedeutung durch extrazelluläres Jodid ist in erster Linie im Schilddrüsengewebe anzunehmen. Hypothetisch ist eine gestörte Inhibition in

Schilddrüsenkarzinomen bei gestörtem Hormon- und Jodidstoffwechsel mit daraus resultierendem gesteigerten Wachstum.

7. Literaturverzeichnis

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

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

Adinolfi E, Callegari MG, Cirillo M, Pinton P, Giorgi C, Cavagna D, Rizzuto R, Di Virgilio F (2009) Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J Biol Chem* 284:10120-10128.

Anderson CM, Nedergaard M (2006) Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci* 29:257-262.

Atkinson L, Batten TFC, Moores TS, Varocqui H, Erickson JD, Deuchars J (2004) Differential co-localisation of the P2X₇ receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience* 123:761-768.

Barnard EA, Burnstock G, Webb TE (1994) G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 15:67-70.

Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X₂ receptors are trimers but that P2X₆ receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 280:10759-10765.

Bean BP (1992) Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 13:87-90.

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

Beigi R, Kobatake E, Aizawa M, Dubyak GR (1999) Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. *American Journal of Physiology* 276:C267-C278.

Benham CD, Tsien RW (1987) A novel receptor-operated Ca²⁺-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 328:275-278.

Berne RM (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204:317-322.

Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, van Biesen T (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 376:127-138.

Born GV (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194:927-929.

Boyd IA, Forrester T (1968) The release of adenosine triphosphate from frog skeletal muscle in vitro. *J Physiol* 199:115-135.

- Boyer JL, Waldo GL, Harden TK (1992) Beta gamma-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J Biol Chem* 267:25451-25456.
- Bretschneider F, Klapperstück M, Löhn M, Markwardt F (1995) Nonselective cationic currents elicited by extracellular ATP in human B-lymphocytes. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 429:691-698.
- Bretschneider F, Markwardt F (1999) Drug-dependent ion channel gating by application of concentration jumps using U-tube technique. *Methods Enzymol* 294:180-189.
- Burnstock G: A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Bolis L, Straub RW (ed): *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*. New York, 1978, pp. 107-118.
- Burnstock G (2006) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58:58-86.
- Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews* 87:659-797.
- Cabrini G, Falzoni S, Forchap SL, Pellegatti P, Balboni A, Agostini P, Cuneo A, Castoldi G, Baricordi OR, Di Virgilio F (2005) A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol* 175:82-89.
- Cario-Toumaniantz C, Loirand G, Ferrier L, Pacaud P (1998) Non-genomic inhibition of human P2X7 purinoceptor by 17beta-oestradiol. *J Physiol* 508 (Pt 3):659-666.
- Carroll WA, Donnelly-Roberts D, Jarvis MF (2009) Selective P2X(7) receptor antagonists for chronic inflammation and pain. *Purinergic Signal* 5:63-73.
- Chakfe Y, Seguin R, Antel JP, Morissette C, Malo D, Henderson D, Seguela P (2002) ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels. *J Neurosci* 22:3061-3069.
- Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* 279:29628-29638.
- Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA, Humphrey PPA (1998) Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Letters* 439:26-30.
- Chiozzi P, Sanz JM, Ferrari D, Falzoni S, Aleotti A, Buell GN, Collo G, Di Virgilio F (1997) Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X7 receptor. *J Cell Biol* 138:697-706.
- Clyne JD, LaPointe LD, Hume RI (2002) The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *J Physiol* 539:347-359.
- Cockcroft S, Gomperts BD (1980) The ATP4- receptor of rat mast cells. *Biochem J* 188:789-798.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1277-1283.

- Colquhoun D (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *British Journal of Pharmacology* 125:924-947.
- Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, Huber LA (1994) Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* 269:32194-32200.
- Di Virgilio F (2005) Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling* 1:205-209.
- Di Virgilio F (2007) Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signalling* 3:1-3.
- Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E (2009) P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal* 5:251-256.
- Di Virgilio F, Wiley JS (2002) The P2X7 receptor of CLL lymphocytes-a molecule with a split personality. *Lancet* 360:1898-1899.
- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 151:571-579.
- Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR, Jarvis MF (2004) Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1053-1061.
- Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, Jarvis MF (2009) Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 157:1203-1214.
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68:213-237.
- Duan SM, Neary JT (2006) P2X 7 receptors: Properties and relevance to CNS function. *Glia* 54:738-746.
- Dubyak GR (1991) Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:295-300.
- Dubyak GR (2007) Go it alone no more--P2X7 joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels. *Mol Pharmacol* 72:1402-1405.
- Egan TM, Khakh BS (2004) Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *Journal of Neuroscience* 24:3413-3420.
- Evans RJ (1996) Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells. *Neurosci Lett* 212:212-214.
- Fairbairn IP, Stober CB, Kumararatne DS, Lammas DA (2001) ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X7-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *Journal of Immunology* 167:3300-3307.

- Fallah G, Romer T, Detro-Dassen S, Braam U, Markwardt F, Schmalzing G (2011) TMEM16A(a)/anoctamin-1 Shares a Homodimeric Architecture with CLC Chloride Channels. *Mol Cell Proteomics* 10:M110 004697.
- Falzoni S, Munerati M, Ferrari D, Spisani S, Moretti S, Di Virgilio F (1995) The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *J Clin Invest* 95:1207-1216.
- Faria RX, Defarias FP, Alves LA (2005) Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C260-271.
- Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Goldberg H, Marks GB, Wiley JS, Britton WJ (2007) A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175:360-366.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176:3877-3883.
- Flittiger B, Klapperstück M, Schmalzing G, Markwardt F (2010) Effects of protons on macroscopic and single-channel currents mediated by the human P2X7 receptor. *Biochim.Biophys.Acta Biomembranes* 1798:947-957.
- Fonfria E, Clay WC, Levy DS, Goodwin JA, Roman S, Smith GD, Condreay JP, Michel AD (2008) Cloning and pharmacological characterization of the guinea pig P2X7 receptor orthologue. *Br J Pharmacol* 153:544-556.
- Forrester T, Lind AR (1969) Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during and after sustained contractions. *J Physiol* 204:347-364.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46:143-156.
- Freist W, Verhey JF, Stuhmer W, Gauss DH (1998) ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett* 434:61-65.
- Galiotta LJV (2009) The TMEM16 protein family: A new class of chloride channels? *Biophysical Journal* 97:3047-3053.
- Gargett CE, Wiley JS (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 120:1483-1490.
- Gerlach E, Deuticke B, Dreisbach RH (1963) Der Nukleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Koronardurchblutung. *Naturwissenschaften* 50:228-229.
- Gillespie JH (1934) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol* 80:345-359.
- Gloor S, Pongs O, Schmalzing G (1995) A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Gene* 160:213-217.

- Gourine AV, Dale N, Llaudet E, Poputnikov D, Spyer KM, Gourine VN (2007) Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: Real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. *Journal of Physiology (London)* 585:305-316.
- Grol MW, Panupinthu N, Korcok J, Sims SM, Dixon SJ (2009) Expression, signaling, and function of P2X7 receptors in bone. *Purinergic Signalling* 5:205-221.
- Gudipaty L, Humphreys BD, Buell G, Dubyak GR (2001) Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C943-953.
- Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 72:1447-1456.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hartzell C, Putzier I, Arreola J (2005) Calcium-activated chloride channels. *Annual Reviews of Physiology* 67:719-758.
- Herold CL, Li Q, Schachter JB, Harden TK, Nicholas RA (1997) Lack of nucleotide-promoted second messenger signaling responses in 1321N1 cells expressing the proposed P2Y receptor, p2y7. *Biochem Biophys Res Commun* 235:717-721.
- Hibell AD, Kidd EJ, Chessell IP, Humphrey PP, Michel AD (2000) Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors. *Br J Pharmacol* 130:167-173.
- Hibell AD, Thompson KM, Simon J, Xing M, Humphrey PP, Michel AD (2001) Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X7 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:639-648.
- Holton FA, Holton P (1953) The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol* 119:50P-51P.
- Holton P (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145:494-504.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF (2006) A-740003 [N-(1-{{(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl}amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1376-1385.
- Humphreys BD, Virginio C, Surprenant A, Rice J, Dubyak GR (1998) Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol* 54:22-32.
- Jacobson KA (2010) P2X and P2Y receptors. *Tocris Reviews* 33:1-16.
- Jacobson KA, King BF, Burnstock G (2000) Pharmacological characterization of P2 (nucleotide) receptors. *Celltransmissions* 16:3-16.

- Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol* 58:82-88.
- Jiang LH, Rassendren F, Mackenzie A, Zhang YH, Surprenant A, North RA (2005) N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1295-1302.
- Kaiho H, Kimura J, Matsuoka I, Nakanishi H (1997) Effects of anions on ATP-activated nonselective cation current in NG108-15 cells. *Journal of Neurophysiology* 77:2717-2722.
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature (London)* 460:592-598.
- King BF, Townsend-Nicholson A (2003) Nucleotide and nucleoside receptors. *Tocris Reviews* 23:1-11.
- King BF, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G (1996) Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH. *British Journal of Pharmacology* 117:1371-1373.
- Klapperstück M, Büttner C, Böhm T, Schmalzing G, Markwardt F (2000a) Characteristics of P2X7 receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1467:444-456.
- Klapperstück M, Büttner C, Nickel P, Schmalzing G, Lambrecht G, Markwardt F (2000b) Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X1 and P2X7 receptors. *European Journal of Pharmacology* 387:245-252.
- Klapperstück M, Büttner C, Schmalzing G, Markwardt F (2001) Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X7 receptor. *Journal of Physiology (London)* 534:25-35.
- Kopp PA (2008) Reduce, recycle, reuse--iodotyrosine deiodinase in thyroid iodide metabolism. *N Engl J Med* 358:1856-1859.
- Kubick C, Schmalzing G, Markwardt F (2011) The effect of anions on the human P2X7 receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808:2913-2922.
- Kuehnel MP, Reiss M, Anand PK, Treede I, Holzer D, Hoffmann E, Klapperstueck M, Steinberg TH, Markwardt F, Griffiths G (2009a) Sphingosine-1-phosphate receptors stimulate macrophage plasma-membrane actin assembly via ADP release, ATP synthesis and P2X7R activation. *J Cell Sci* 122:505-512.
- Kuehnel MP, Rybin V, Anand PK, Anes E, Griffiths G (2009b) Lipids regulate P2X7-receptor-dependent actin assembly by phagosomes via ADP translocation and ATP synthesis in the phagosome lumen. *J Cell Sci* 122:499-504.
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA (2002) Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 168:6436-6445.
- Le KT, Babinski K, Seguela P (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 18:7152-7159.
- Li C, Peoples RW, Weight FF (1997a) Mg²⁺ inhibition of ATP-activated current in rat nodose ganglion neurons: evidence that Mg²⁺ decreases the agonist affinity of the receptor. *J Neurophysiol* 77:3391-3395.

- Li Q, Olesky M, Palmer RK, Harden TK, Nicholas RA (1998) Evidence that the p2y3 receptor is the avian homologue of the mammalian P2Y6 receptor. *Mol Pharmacol* 54:541-546.
- Li Q, Schachter JB, Harden TK, Nicholas RA (1997b) The 6H1 orphan receptor, claimed to be the p2y5 receptor, does not mediate nucleotide-promoted second messenger responses. *Biochem Biophys Res Commun* 236:455-460.
- Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagne B, Labbe M, Binder EB, Uhr M, Paez-Pereda M, Sillaber I, Ising M, Bruckl T, Lieb R, Holsboer F, Muller-Myhsok B (2006) P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet* 15:2438-2445.
- Machaca K, Qu Z, Kuruma A, Hartzell HC, McCarty N (2002) The endogenous Ca-activated Cl channel in *Xenopus* oocytes: A physiologically and biophysically rich model system. *Current Topics in Membranes* 53:3-39.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15:825-835.
- Marcus Y (1987) The Thermodynamics of Solvation of Ions .2. The Enthalpy of Hydration at 298.15-K. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I* 83:339-349.
- Markwardt F, Löhn M, Böhm T, Klapperstück M (1997) Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *Journal of Physiology (London)* 498:143-151.
- McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Harris RR, Zhang XF, Shieh CC, Wismer CT, Zhu CZ, Gauvin DM, Fabiyi AC, Honore P, Gregg RJ, Kort ME, Nelson DW, Carroll WA, Marsh K, Faltynek CR, Jarvis MF (2007) P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* 146:1817-1828.
- Michel AD, Chessell IP, Humphrey PPA (1999) Ionic effects on human recombinant P2X7 receptor function. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv of Pharmacology* 359:102-109.
- Michel AD, Kaur R, Chessell IP, Humphrey PP (2000) Antagonist effects on human P2X7(7) receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br J Pharmacol* 130:513-520.
- Mio K, Kubo Y, Ogura T, Yamamoto T, Sato C (2005) Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem Biophys Res Commun* 337:998-1005.
- Monif M, Burnstock G, Williams DA (2010) Microglia: Proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1753-1756.
- Moore SF, MacKenzie AB (2007) Murine macrophage P2X7 receptors support rapid prothrombotic responses. *Cell Signal* 19:855-866.
- Muller T, Vieira RP, Grimm M, Durk T, Cicko S, Zeiser R, Jakob T, Martin SF, Blumenthal B, Soricter S, Ferrari D, Di Virgillio F, Idzko M (2011) A potential role for P2X7R in allergic airway inflammation in mice and humans. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44:456-464.
- Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N (2008) Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 371:707-712.

- Nakazawa K, Hess P (1993) Block by calcium of ATP-activated channels in pheochromocytoma cells. *J Gen Physiol* 101:377-392.
- Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207:123-131.
- Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, Grayson G, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Niforatos W, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA (2006) Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem* 49:3659-3666.
- Nelson DW, Sarris K, Kalvin DM, Namovic MT, Grayson G, Donnelly-Roberts DL, Harris R, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA (2008) Structure-activity relationship studies on N'-aryl carbohydrazide P2X7 antagonists. *J Med Chem* 51:3030-3034.
- Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F (1998) Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273:15177-15182.
- Nicke A (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 377:803-808.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17:3016-3028.
- Nino-Moreno P, Portales-Perez D, Hernandez-Castro B, Portales-Cervantes L, Flores-Meraz V, Baranda L, Gomez-Gomez A, Acuna-Alonzo V, Granados J, Gonzalez-Amaro R (2007) P2X7 and NRAMP1/SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 148:469-477.
- Noguchi K, Ishii S, Shimizu T (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* 278:25600-25606.
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.
- Novak I (2011) Purinergic signalling in epithelial ion transport: regulation of secretion and absorption. *Acta Physiol (Oxf)* 202:501-522.
- Ooi T, Oobatake M, Nemethy G, Scheraga HA (1987) Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3086-3090.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch* 452:589-597.
- Parvathani LK, Tertysnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R (2003) P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278:13309-13317.
- Pelegriin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071-5082.

- Pellegatti P, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F (2005) A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Molecular Biology of the Cell* 16:3659-3665.
- Perregaux D, Gabel CA (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269:15195-15203.
- Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Hawryluk N, Peurano H, Stam E, Egger J, Griffiths R, Dombroski MA, Gabel CA (2001) Identification and characterization of a novel class of interleukin-1 post-translational processing inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 299:187-197.
- Raffaghello L, Chiozzi P, Falzoni S, Di Virgilio F, Pistoia V (2006) The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res* 66:907-914.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 50:413-492.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272:5482-5486.
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F (2007a) Kinetics of P2X7 receptor-operated single channels currents. *Biophysical Journal* 92:2377-2391.
- Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F (2007b) Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X7 receptor-operated single channels currents. *Biophysical Journal* 93:846-858.
- Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I (2010) Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299:L774-783.
- Romagnoli R, Baraldi PG, Cruz-Lopez O, Lopez-Cara C, Preti D, Borea PA, Gessi S (2008) The P2X7 receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 12:647-661.
- Roman S, Cusdin FS, Fonfria E, Goodwin JA, Reeves J, Lappin SC, Chambers L, Walter DS, Clay WC, Michel AD (2009) Cloning and pharmacological characterization of the dog P2X7 receptor. *Br J Pharmacol* 158:1513-1526.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ (2001) Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410:471-475.
- Sattin A, Rall TW (1970) The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol Pharmacol* 6:13-23.
- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105:5683-5686.
- Schilling WP, Wasylyna T, Dubyak GR, Humphreys BD, Sinkins WG (1999) Maitotoxin and P2Z/P2X(7) purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. *Am J Physiol* 277:C766-776.

- Schlumberger M, Lacroix L, Russo D, Filetti S, Bidart JM (2007) Defects in iodide metabolism in thyroid cancer and implications for the follow-up and treatment of patients. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:260-269.
- Schubert R (1996) Multiple ligand-ion solutions: a guide for solution preparation and computer program understanding. *J Vasc Res* 33:86-98.
- Schwarz W, Rettinger J (2000). *Foundations of electrophysiology*. Aachen, Shaker Verlag.
- Shannon RD (1976) Revised Effective Ionic-Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A* 32:751-767.
- Sim JA, Young MT, Sung HY, North RA, Surprenant A (2004) Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *J Neurosci* 24:6307-6314.
- Skaper SD, Debetto P, Giusti P (2010) The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J* 24:337-345.
- Solini A, Cuccato S, Ferrari D, Santini E, Gulinelli S, Callegari MG, Dardano A, Faviana P, Madec S, Di Virgilio F, Monzani F (2008) Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? *Endocrinology* 149:389-396.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276:125-132.
- Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P (2006) P2X 7 receptors in the nervous system. *Prog.Neurobiol.* 78:327-346.
- Stoop R, Surprenant A, North RA (1997) Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *Journal of Neurophysiology* 78:1837-1840.
- Surprenant A, North RA (2009) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* 71:333-359.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-738.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998a) N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* 37:14845-14851.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998b) Topological analysis of the ATP-gated ionotropic [correction of ionotropic] P2X2 receptor subunit. *FEBS Lett* 425:19-23.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274:6653-6659.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371:516-519.
- Verhoef PA, Kertesy SB, Lundberg K, Kahlenberg JM, Dubyak GR (2005) Inhibitory effects of chloride on the activation of caspase-1, IL-1 beta secretion, and cytolysis by the P2X7 receptor. *Journal of Immunology* 175:7623-7634.

- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1285-1294.
- Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A (1999a) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol* 519 Pt 2:335-346.
- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999b) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2:315-321.
- Wang XH, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan PL, Li PJ, Xu QW, Liu QS, Goldman SA, Nedergaard M (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nature Medicine* 10:821-827.
- Weber WM (1999) Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*: recent developments. *J.Membr.Biol.* 170:1-12.
- Weber WM, Liebold KM, Reifarth FW, Uhr U, Clauss W (1995) Influence of extracellular Ca²⁺ on endogenous Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv* 429:820-824.
- Wiley JS, Dao-Ung LP, Gu BJ, Sluyter R, Shemon AN, Li C, Taper J, Gallo J, Manoharan A (2002) A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet* 359:1114-1119.
- Xiong K, Peoples RW, Montgomery JP, Chiang Y, Stewart RR, Weight FF, Li C (1999) Differential modulation by copper and zinc of P2X2 and P2X4 receptor function. *J Neurophysiol* 81:2088-2094.
- Young MT, Pelegrin P, Surprenant A (2007) Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol* 71:92-100.
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv of Pharmacology* 362:299-309.

8. Thesen

1. P2X-Rezeptoren sind kationenselektive ATP-abhängige Ionenkanäle, bei denen sich der Subtyp P2X7 durch die längste Aminosäuresequenz (595), die geringste Sequenzhomologie, die Gewebsexpression und folglich unterschiedlicher biologischer Bedeutung von den anderen P2X-Rezeptoren unterscheidet.
2. P2X7-Rezeptoren werden auf Zellen unterschiedlicher Spezies exprimiert, mit teils unterschiedlichen Rezeptoreigenschaften in Bezug auf die Potenz und Wirksamkeit der Agonisten ATP und BzATP, der Antagonisierbarkeit und dem Deaktivierungsverhalten.
3. Besondere Bedeutung kommt dem P2X7-Rezeptor bei Prozessen wie Entzündung, Nozizeption, Hypoxie und Zellyse aufgrund der Expression auf Zellen des Immunsystems zu. Insbesondere bei Zelluntergängen kommt es zu Veränderungen der Zusammensetzung des Extrazellulärmilieus durch freiwerdende organische Proteine mit konsekutiver Verdünnung des physiologischen, vorwiegend anorganischen Extrazellulärmilieus.
4. Elektrophysiologische Voltage-clamp Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten ermöglichen Untersuchungen in Ca^{2+} -freien Medien. Dadurch können sekundär induzierte Ca^{2+} -Effekte ausgeschlossen werden und die Interpretation der Anioneneffekte unterliegt weniger Störfaktoren.
5. Die organischen Anionen Glutamat und Aspartat führen zu einer Steigerung der relativen Stromamplituden am hP2X7 und mP2X7. Bei Zugabe von Ca^{2+} -Ionen kommt es zu einer Vervielfachung der Amplitudenvergrößerung.
6. Die anorganischen Anionen Nitrat, Sulfat und Jodid führen zu einer Verminderung der Rezeptorantwort mit größerem Ausmaß am mP2X7 gegenüber dem hP2X7. Der ausgeprägteste inhibitorische Effekt mit gleichsinniger Speziesdifferenz zeigt sich beim Jodidanion.
7. Am humanen P2X7-Rezeptor kommt es zu einer alleinigen Steigerung der Wirksamkeit durch organische Anionen, beziehungsweise zu einer Verminderung der Wirksamkeit durch anorganische Anionen. Am murinen P2X7-Rezeptor wird hingegen vorwiegend die Potenz des Agonisten ATP^{4-} bei unterschiedlichen Extrazellulärlösungen im gleichen Sinne beeinflusst.

8. Die Beeinflussung der relativen Stromamplituden und Potenzverschiebungen des Agonisten ATP^{4-} am murinen P2X7-Rezeptor zeigen sich unabhängig vom Expressionssystem in RAW-Makrophagen und *Xenopus-laevis* Oozyten.
9. Strom-Spannungscharakteristiken ergaben keine Verschiebung des Umkehrpotentials durch Anionensubstitution und sprechen folglich gegen eine Anionenleitfähigkeit beziehungsweise Anionenselektivität der murinen und humanen P2X7-Rezeptoren. Bei Zugabe von Ca^{2+} -Ionen in Glutamatlösung vollzieht sich eine speziesunspezifische Verschiebung der Umkehrpotentiale in positivere Bereiche durch sekundäre Aktivierung von Chloridkanälen.
10. Der humane P2X7-Rezeptor (hP2X7) weist sowohl hoch- als auch niedrigaffine ATP^{4-} -Aktivierungsstellen auf. Der Anteil des Stroms der hochaffinen Komponente am Gesamtstrom beträgt etwa 40 Prozent bei ATP-Konzentrationen von 0,1 mmol/l. Am murinen P2X7-Rezeptor kommt der hochaffinen Aktivierungsstelle keine Bedeutung zu. Die Rezeptorantwort der humanen P2X7-Rezeptormutante $\text{P2X7}^{\text{S339Y}}$ wird alleinig über die hochaffine Aktivierungsstelle getragen.
11. Anionensubstitutionen an der humanen Rezeptormutante $\text{P2X7}^{\text{S339Y}}$ zeigen keine Beeinflussung der relativen Stromamplituden mit Ausnahme von Ca^{2+} -ionenhaltigen Lösungen durch Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Chloridkanäle. Der größere Effekt der hochaffinen Aktivierungsstelle am Gesamtstrom am hP2X7 gegenüber dem mP2X7 bedingt das speziesdifferente stärkere Ausmaß der Inhibition am mP2X7 durch anorganische Anionen.
12. Eine Anreicherung des Extrazellulärmilieus mit organischen Anionen durch Prozesse wie Zellnekrosen oder der Exozytose glutamaterger Neurone in den synaptischen Spalt könnte zu einer Steigerung der P2X7-Rezeptorantwort führen.

A-I Lebenslauf-Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Christoph Kubick
Geburtsdatum: 07.02.1984
Geburtsort: Guben

Bildungsweg:

Schule:

1991 - 1993 Grundschole Peitz
1993 - 1996 Grundschole Dissenchen
1996 - 2003 Franz Groger-Gymnasium Peitz
Leistungskurse: Chemie und Biologie

Studium:

10/2003 Immatrikulation im Studiengang Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
09/2005 Absolvierung des 1. Staatsexamens
12/2009 Absolvierung des 2. Staatsexamens
01/2010 Ärztliche Approbation am 27.01.2010

Pflegepraktika (2004 - 2005):

Herzchirurgie, Urologie, Traumatologie, Psychiatrie

Famulaturen (2006 - 2009):

Kardiologie, Rechtsmedizin, Gynäkologie/Geburtshilfe,
Allgemeinmedizin und Orthopädie

Praktisches Jahr (08/2008 - 07/2009):

Innere Medizin (Pulmologie) - Krankenhaus Martha-Maria
Halle-Dölau

Pathologie - Institut für Pathologie der Martin-Luther
Universität (MLU) Halle/Saale

Chirurgie (Traumatologie) - Berufsgenossenschaftliche
Kliniken Bergmannstrost Halle/Saale

Promotion (10/2006 - 10/2011)

Julius Bernstein Institut für Physiologie zu Halle zum Thema
„Einfluss extrazellulärer Anionen auf den P2X7-Rezeptor“ bei
Prof. Dr. Fritz Markwardt

Studentischer Nebenerwerb / freiberufliche ärztliche Tätigkeit:

2005 - 2006	Fahrradkurier Cyclone Halle/Saale
2006 - 2010	Callcenter des ADAC mit telefonischen Impfberatungen, Reservierung von Krankenhausbetten für Patientenverlegungen, Benennung deutschsprachiger Ärzte im Ausland

Beruflicher Werdegang

04-10/2010	Obduzent im Institut für Rechtsmedizin der MLU-Halle/Saale Arzt beim Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes
Seit 02/2011	Beginn der Facharztausbildung am Institut für Pathologie der Universitätsklinik Leipzig AöR

Leipzig, 9. Oktober 2011

Ort, Datum

Christoph Kubick

A-II Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, das ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

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

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, das ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 15 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Leipzig, 9. Oktober 2011

Ort, Datum

Christoph Kubick

A-III Publikation

Influence of extracellular anions on purinergic P2X7 receptors. Abstract number: P274 Acta Physiologica 2011; Volume 201, Supplement 682 The 90th Annual Meeting of The German Physiological Society 26/03/2011-29/03/2011 Regensburg, Germany

Kubick C, Schmalzing G, Markwardt F (2011) The effect of anions on the human P2X7 receptor. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1808:2913-2922.

A-IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, welche mir die Anfertigung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Fritz Markwardt. Insbesondere sein herausragendes Engagement in der vorklinischen Lehre, gepaart mit seinen didaktischen Fähigkeiten bewogen mich dazu die Herausforderung einer experimentellen Arbeit anzunehmen. Er war mir ein stets verfügbarer, kompetenter und kollegialer Ansprechpartner.

Ein weiterer Dank gilt Frau Monika Schmidt für Ihre stets netten und motivierenden Worte, sowie ihrer Hilfe bei der Vorbereitung der verwendeten Lösungen, der Kultivierung der RAW-Makrophagen und der Präparation der *Xenopus laevis* Oozyten.

Abschließend danke ich meinen Eltern, welche mir das Studium der Humanmedizin sowie die Anfertigung der Promotion ermöglichten und stets Vertrauen in mein Handeln gesetzt haben.