

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

Einfluss des P2X₇-Rezeptors auf das B-Zell- Rezeptor-induzierte Ca²⁺-Signal

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin / Dr. med.

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

von Björn Roland Beßler
geboren am 15.05. 1982 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. Fritz Markwardt

Gutachter: 1. Prof. Dr. F. Markwardt
2. Prof. Dr. I. Illes (Leipzig)
3. Prof. Dr. G.Reiser (Magdeburg)

06.04.2010

14.10.2010

Meinen Eltern gewidmet

Referat

Viele physiologische Prozesse des B-Lymphozyten wie Proliferation, Differenzierung und Immunglobulin-Synthese werden durch den B-Zell-Rezeptor (BZR) vermittelt. Dabei induziert die BZR-Aktivierung eine biphasische Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Dies geschieht zum einen durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und zum anderen durch einen Ca^{2+} -Freisetzungs-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran. Der Einstrom ist abhängig vom Membranpotenzial, das unter dem Einfluss diverser Kanäle steht. Dabei zeigt der typische zeitliche $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Verlauf einen anfänglichen Gipfel, gefolgt von einer Plateauphase.

Beim purinergen P2X_7 -Rezeptor ($\text{P2X}_7\text{R}$) handelt es sich um einen Kationenkanal, der vor allem von Zellen des Immunsystems und dementsprechend auch von B-Lymphozyten exprimiert wird.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob möglicherweise die zusätzliche Aktivierung des $\text{P2X}_7\text{R}$ das zeitliche und quantitative Auftreten des BZR-Zweitbotenstoffs Ca^{2+} verändert. Dies ist in sofern von Bedeutung, da verschiedene $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalmuster unterschiedliche biologische Funktionen auszulösen scheinen.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der Fluoreszenz-Mikroskopie konnte an humanen tonsillären B-Lymphozyten nachgewiesen werden, dass der $\text{P2X}_7\text{R}$ einen depolarisierenden Na^+ -Einstrom erzeugt, der die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Einstrom verkleinert. Dadurch wird die initiale, transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Amplitude teilweise und die daran anschließende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Plateauphase des BZR-induzierten Ca^{2+} -Signals nahezu vollständig reduziert. Der Depolarisationsgrad ist dabei von der Stärke der $\text{P2X}_7\text{R}$ -Aktivierung abhängig. Eine vollständige Hemmung des Ca^{2+} -Einwärtsstroms konnte mit ATP im Konzentrationsbereich von 87-120 μM erreicht werden. Der mehr selektive $\text{P2X}_7\text{R}$ -Agonist BzATP zeigte zu dem zusätzlich einen $\text{P2X}_7\text{R}$ -abhängigen- Ca^{2+} -Einstrom, der die depolarisationsbedingte Reduzierung der treibenden Kraft für Ca^{2+} durch eine Erhöhung der Gesamtleitfähigkeit für Ca^{2+} kompensierte. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass extrazelluläres ATP, das beispielsweise während inflammatorischer Prozesse in Konzentrationen bis 100 μM im Extrazellularraum auftritt, in der Lage ist, dass BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal zu modulieren.

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1	Purinorezeptoren	1
1.1.1	Historischer Rückblick	1
1.1.2	Die P2X-Rezeptorfamilie	2
1.1.3	Der P2X ₇ -Rezeptor	3
1.2	Die Signalkaskade des B-Lymphozyten	7
1.2.1	Der B-Zell-Rezeptor	7
1.2.2	Der DAG/IP ₃ -Signalweg	8
1.2.3	Freisetzung und Einstrom des zweiten Botenstoffes [Ca ²⁺] _i	9
1.2.4	Die Frequenz- und Amplitudenmodulation des [Ca ²⁺] _i -Signals	11
<u>2</u>	<u>Zielstellung</u>	<u>13</u>
<u>3</u>	<u>Material und Methoden</u>	<u>14</u>
3.1	Chemikalien, Medien, Puffer	14
3.1.1	Chemikalien	14
3.1.2	Medien	15
3.1.3	Lösungen	15
3.2	Geräte	16
3.3	Biologisches Untersuchungsmaterial	16
3.4	Versuchsaufbau	17
3.4.1	Durchflusszytometrie	17
3.4.2	Fluoreszenz-Mikroskopie	19
3.5	Versuchsdurchführung	21
3.5.1	Durchflusszytometrie	21
3.5.2	Fluoreszenz-Mikroskopie	21

3.6	Datenerhebung	22
3.6.1	Durchflusszytometrie	22
3.6.2	Fluoreszenz-Mikroskopie	23
3.7	Statistische Auswertung	23
<u>4</u>	<u>Ergebnisse</u>	<u>26</u>
4.1	Isolierung humaner tonsillärer B-Lymphozyten	26
4.2	Das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Signal	27
4.3	Einfluss des Membranpotenzials auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Signal	28
4.4	Der Einfluss des P2X₇R-Agonisten BzATP auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Signal	33
4.5	Der Einfluss des P2X₇R-Agonisten ATP auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Signal	45
<u>5</u>	<u>Diskussion</u>	<u>52</u>
<u>6</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>60</u>
<u>7</u>	<u>Literatur</u>	<u>62</u>
<u>8</u>	<u>Tabellenanhang</u>	<u>72</u>
8.1	Pufferlösungen	72
8.2	P2X₇R-Agonisten	73
<u>9</u>	<u>Thesen</u>	<u>75</u>

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calcium-Ionen-Konzentration
A23187	5-(methylamino)-2-({(2R,3R,6S,8S,9R,11R)-3,9,11-trimethyl-8-[(1S)-1-methyl-2-oxo-2-(1H-pyrrol-2-yl)ethyl]-1,7-dioxaspiro[5.5]undec-2-yl} methyl)-1,3-benzoxazole-4-carboxylic acid (Ca ²⁺ -Ionophor)
A-804598	[3H]A-804598([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	One-way repeated measures analysis of variance
anti-IgM	Immunglobulin-M-Antikörper
AP 1	Aktivatorprotein 1
ATP	Adenosintri-phosphat
AZ11645373	3-[1-[[[(3'-Nitro[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy]methyl]-3-(4-pyridinyl)propyl]-2,4-thiazolidinedione
Blk	B cell lymphoma kinase
BLNK	B-Zell-Linker-Protein
Btk	Bruton Tyrosinkinase
BzATP	2'3'-O-(4benzoyl)-benzoyl-ATP
BZR	B-Zell-Rezeptor
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
CD **	Cluster of Differentiation **
DAG	Diacylglycerol
DiBac4(3)	Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dok	Downstream of tyrosine kinase
DT40	Hühner B-Zelllinie eines Vogel-Leukämie-Virus-induzierten Lymphoms
EC ₅₀	halbmaximale Aktivierungskonzentration
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
[K ⁺] _e	Extrazelluläre K ⁺ -Konzentration
EF-Hand	Ca ²⁺ -bindendes Aminosäurenmotiv
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinase
Fc **	Fragment crystallizable **
FCS	Fetal Calf Serum

Fluo-4	Glycine,N-[4-[6-[(acetyloxy)methoxy]-2,7-difluoro-3-oxo-3H-xanthen-9-yl]-2-[2-[2-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]amino]-5-methylphenoxy]-ethoxy]phenyl]-N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]-,(acetyloxy)methyl-ester
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fyn	fgr/yes-related novel kinase
Grb2	Growth-factor-receptor-protein 2
HEK293	Human Embryonic Kidney 293
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperaziny)-Ethansulfonsäure
HSP **	Hitzeschockprotein **
I _{ARC}	arachidon acidactivated Ca ²⁺ -channels
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
ICCD	Intensified Charge-Coupled Device
I _{CRAC}	calcium release-activated calcium current
Ig *	Immunglobulin *
IL-1 β	Interleukin-1 β
Indo-1	2-[4-(bis(carboxymethyl)amino)-3-[2-[2-(bis(carboxymethyl)amino)-5-methylphenoxy]ethoxy]phenyl]-1H-indole-6-carboxylic acid
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor
ITAM	Immunorezeptor-Tyrosin-abhängige Aktivierungsmotive
I- κ B	Inhibitor of κ b
JNK	C_Jun N-terminal Kinase
KN-62	1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-pehnylpiperazin
Lck	leukocyte-specific protein tyrosine kinase
LPS	Lipopolysaccharid
Lyn	lck/yes-related novel kinase
MAP	Mitogen-Activated Protein
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NANC	Non Adreneric, Non Cholinergic
NF279	8,8`-(carbonylbis(imino-4,1-Phenylencarbonylimino-4,1-Phenylencarbonylimino))bis(1,3,5-Naphtalentrifosulfonsäure)
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF κ b	Nuclear Factor of κ b
NTAL	Non-T-cell Activation Linker
oATP	oxidiertes ATP (2',3'-Dialdehyd-ATP)

P2X ₇ R	P2X ₇ -Rezeptor
P2XR	P2X-Rezeptor
PE	Phycoerythrin
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphat
PMCA	Zellmembran-assoziierten-Ca ²⁺ -ATPase
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonicacid
RAW 264,7	Monozyten-Zelllinie der Maus, induziert durch belson murine leukemia virus
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
SAM	sterile α motif
SH2	SRC-homology 2
SHIP	SH2-domain-containing-inositolpolyphosphat- 5' phosphatase
SHP1	SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase1
SMOC	Second Messenger-Operated Ca ²⁺ -Channels
SOC	Store-Operated Ca ²⁺ -Channels
Tris ⁺	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
TRPC	Transient Receptor Potential (Canonical)
TRPM	Transient Receptor Potential (Melastatin)
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
Yo-Pro-1	Quinolinium,4-[3-methyl-2-(3H)-benzoxazolylden]methyl-1-[3-(triethylammonium)propy]di-Iodid

1 Einleitung

1.1 Purinorezeptoren

Purine und Pyrimidine sind ein grundlegender Bestandteil der Biochemie des Lebens. Dabei soll ATP bereits eine entscheidende Bedeutung in der frühen Evolution gespielt haben. Mit Ausnahme des Wassers scheint kein anderes Molekül an so vielen verschiedenen chemischen Reaktionen beteiligt zu sein (Burnstock 1996). Neben ihrer Schlüsselfunktion im Energiestoffwechsel und als Grundbausteine der Nucleinsäuren spielen Purine wie Pyrimidine ebenfalls als extrazelluläre Signalmoleküle eine wichtige Rolle und vermitteln über Membranrezeptoren, den so genannten Purinorezeptoren, verschiedenste biologische Effekte (Ralevic and Burnstock 1998).

1.1.1 Historischer Rückblick

ATP wurde 1929 von Fiske, Subbarow und Lohmann unabhängig voneinander entdeckt und aus Muskelzellen isoliert (Burnstock 1996). Im selben Jahr wiesen bereits Drury & Szent-Györgyi endokrine Wirkungen der Adenylsäuren nach. Sie beschrieben negativ chronotrope und dromotrope Effekte an Säugetierherzen, die Senkung des Blutdrucks sowie Kontraktionen der Darmmuskulatur nach Zugabe einer aus Ochsenherzen isolierten Lösung (Drury and Szent-Györgyi 1929). Durch die Suche nach dem genauen Wirkstoff fanden sich erste Hinweise auf eine unterschiedliche Potenz und Wirkung der einzelnen Adenosinderivate. So erkannte Wedd 1931, dass Adenosin stärkere koronardilatatorische Effekte als ATP erzeugt (Wedd 1931) und Ostern und Paranas schrieben ATP eine wesentlich stärkere kardiologische Wirkung im Vergleich zu Adenosin zu (Ostern and Parnas 1932). Gillespie konnte bestätigen, dass mit zunehmender Dephosphorylierung von ATP über AMP zu Adenosin der koronardilatative und auch blutdrucksenkende Effekt zunimmt, die kardiodepressive Wirkung und die Potenz, Uteruskontraktionen zu erzeugen jedoch abnimmt. Weiterhin bestätigte er, dass auch die Desaminierung die Wirkung reduziert und die Spaltung der Purinbase von der Pentose die biologische Wirkung aufhebt (Gillespie 1934). Im Jahr 1948 beschrieben Emmelin und Feldberg zentral neuronale Effekte an Katzen nach Injektion von ATP-Lösung in die Hirnventrikel (Emmelin and Feldberg 1948). Fünf Jahre später wies Holten nach, dass sensorische Nervendigungen nach Stimulation ATP sezernieren (Holton 1959). Burnstock stellte 1972 Ergebnisse vor, die belegten, dass ATP als Neurotransmitter in NANC Neuronen (NonAdrenergic, NonCholinergic) dient (Burnstock 1972). In jener Zeit ergaben sich auch Hinweise auf die Bedeutung von ATP als Ko-Transmitter, die das bis dato vorherrschende „Ein-Neuron-Ein-Transmitter“-Konzept (Dale Prinzip) in Frage stellten. Heute ist allgemein akzeptiert, dass ATP als Ko-Transmitter im peripheren und zentralen Nervensystem eine Rolle spielt (Burnstock 2006). Aufgrund der Neurotransmitter-Hypothese und der Erkenntnisse über unterschiedliche biologische Effekte von Adenosin und ATP nahm Burnstock 1978 eine Unterteilung in Adenosin- und ATP-Rezeptoren (P1- und P2-Rezeptoren) vor, die das Wissen über die Purinwirkung neu systematisierte (Burnstock

1978). Aufgrund pharmakologischer Kriterien diskutierten Burnstock und Kennedy eine weitere Unterteilung der P2-Rezeptoren in P2X und P2Y (Burnstock and Kennedy 1985). Durch Isolierung neuer Subtypen, biochemische Analyse und neue Erkenntnisse bezüglich der Signaltransduktion wurde die Unterteilung weiter vorangetrieben und ist heute allgemein akzeptiert (Fredholm *et al.* 1997).

Nach der heutigen Nomenklatur werden die P1-Rezeptoren, die alle G-Protein gekoppelt sind und Adenosin als Agonisten haben, nach molekularen und pharmakologischen Gesichtspunkten in vier Adenosinrezeptor-Subtypen unterteilt (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , und A_3). P2-Rezeptoren reagieren im Gegensatz zu P1-Rezeptoren auf ATP, ADP, UTP und UDP. Gemeinsames Merkmal der P2Y-Rezeptoren ist die G-Protein-Kopplung. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind acht verschiedene P2Y-Rezeptoren bekannt: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ (Jacobson *et al.* 2006). Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle, von deren Untereinheiten bisher sieben Subtypen (P2X₁₋₇) isoliert worden sind (Ralevic and Burnstock 1998).

1.1.2 Die P2X-Rezeptorfamilie

Die P2X-Rezeptoren stellen neben der Glutamat- und der nicotinergen Acetylcholin-Rezeptor-Superfamilie die dritte Gruppe der bekannten, ligandengekoppelten Ionenkanäle dar. Der Unterschied zu den erstgenannten Rezeptorfamilien besteht in der Struktur der Untereinheiten. Während die Untereinheiten der nicotinergen Rezeptoren vier und die Glutamat-Rezeptoren drei transmembrane Abschnitte besitzen, enthalten die Untereinheiten der P2X-Rezeptoren zwei Bereiche, welche die Plasmamembran durchdringen. Letzteres lässt sich aufgrund der Primärstruktur und verschiedener funktioneller Untersuchungen an mutierten Rezeptoren schlussfolgern (Abbraccio and Burnstock 1998). Dabei scheint die zweite Transmembrandomäne an der Ausbildung der Kanal-Pore beteiligt zu sein (Egan *et al.* 1998). Beide der hydrophoben Transmembrandomänen sind durch eine große, extrazellulär liegende Polypeptidsequenz verbunden. Diese enthält zehn konstant verteilte Cysteinreste, die wahrscheinlich durch Ausbildung von 5 Disulfidbrücken an der Ausprägung der Tertiärstruktur beteiligt sind. Amino- und Carboxylatende des Proteins sind intrazellulär lokalisiert. Insgesamt haben die Untereinheiten eine Länge von 384 bis 595 Aminosäuren. Diese prinzipielle Struktur wurde durch die Röntgenstrukturanalyse kristallisierter P2X₄-Rezeptoren des Zebrafisches bestätigt (Kawate *et al.* 2009).

Die verschiedenen P2X-Rezeptoruntereinheiten sind in ihrem extrazellulären Anteil zu 40 bis 55 % identisch und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem intrazellulär lokalisierten Carboxylatende. Alle Subtypen besitzen eine unterschiedliche Anzahl von Konsensus-Sequenzen für N-Glykosylierungen. Diese scheinen eine Bedeutung während der Integration in die Zellmembran zu haben (North 2002). Der vollständige Ionenkanal setzt sich wahrscheinlich aus drei Untereinheiten zusammen (Nicke *et al.* 1998; Stoop *et al.* 1999). Dabei soll sich die erste Transmembrandomäne der einen Untereinheit an die zweite Transmembrandomäne der nächsten Untereinheit anlagern (Jiang *et al.* 2003). Da auch heteromere Formen möglich sind, ergeben sich nicht nur durch die alleinige Exis-

tenz verschiedener Untereinheiten, sondern auch durch ihre Kombination untereinander eine Reihe von P2XR-Subtypen. Jedoch existieren nicht alle theoretisch möglichen Formen. Zurzeit sind sechs homomere Formen (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇) und sechs heteromere Formen (P2X₁/P2X₂, P2X₁/P2X₄, P2X₁/P2X₅, P2X₂/P2X₃, P2X₂/P2X₆, P2X₄/P2X₆) in Oozyten und Säugetierzellen nachgewiesen (Dubyak 2007). Von einigen P2XR-Untereinheiten sind außerdem Spleißvarianten bekannt.

Die P2X-Subtypen unterscheiden sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften. Agonisten wie ATP, ADP, BzATP oder Isomere von methylierten ATP, aber auch Antagonisten wie Suramin oder TNP-ATP besitzen unterschiedliche Effektivität und Wirksamkeit an den jeweiligen P2XR-Subtypen (North and Surprenant 2000). Funktionelle Mutationsstudien legen nahe, dass an der Ausbildung der ATP-Bindungsstelle positiv geladene Lysinreste (68, 70, 309 beim P2X₁), welche wahrscheinlich die negativ geladenen Phosphatgruppen des ATP koordinieren, sowie zwei aromatische Regionen (P2X₁: F185T186 und N290F291R292), welche die Adeninstruktur binden, beteiligt sind (Evans 2009). Ein gemeinsames Merkmal aller P2X-Rezeptoren ist die nach Agonistenbindung innerhalb von etwa 10 ms ablaufende Öffnung eines unselektiven Kanals für Kationen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺). Dies führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und zu einer Depolarisation des Membranpotenzials (Bean 1992). Besondere Eigenschaften besitzt hierbei der P2X₇-Rezeptor (P2X₇R), die im Kapitel 1.1.3 beschrieben sind.

Auch wenn sich die P2X-Subtypen bezüglich der Signaltransduktion ähneln, so zeigen sie deutliche Unterschiede im Desensitivierungsverhalten. Dabei unterscheiden sich vor allem P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren, welche innerhalb von 100 bis 300 ms schnell desensitivieren von den anderen „nicht desensitivierenden“ Subtypen, die erst innerhalb von einigen Sekunden oder gar nicht desensitivieren (Ralevic and Burnstock 1998). Auch die Spleißvarianten zeigen ein unterschiedliches Desensitivierungsverhalten, das zum Beispiel für P2X₂-Spleißvarianten nachgewiesen worden ist (Brändle *et al.* 1997). Weiterhin konnte am P2X₂-Rezeptor gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von zwei Threoninresten am intrazellulären N-Terminus durch die Proteinkinase C und die Interaktion zweier Untereinheiten für das langsame Desensitivierungsverhalten verantwortlich ist (Boue-Grabot *et al.* 2000).

1.1.3 Der P2X₇-Rezeptor

Aufgrund der Beobachtung, dass extrazelluläres ATP die Fähigkeit zur Porenbildung an Makrophagen und verwandten Zelltypen besitzt, wurde die Existenz eines P2Z-Rezeptors postuliert. Erst im Jahr 1996 konnten mit der DNA-Isolierung diese ungewöhnlichen pharmakologischen Eigenschaften dem bis dato unbekanntem P2X₇-Rezeptor zugeordnet werden.

Die Untereinheit des P2X₇R besteht aus 595 Aminosäuren. Dabei stimmen die ersten 395 Aminosäuren zu 30 bis 40 % mit den anderen P2XR-Subtypen überein. Einzigartig an der P2X₇R-

Untereinheit ist jedoch das um 120 bis 200 Aminosäuren länger ausgebildete intrazelluläre Carboxylatende (Surprenant *et al.* 1996). Dieser strukturelle Unterschied könnte verantwortlich dafür sein, dass die P2X₇R-Untereinheit nicht mit anderen P2X-Untereinheiten koimmunoprezipitiert werden kann (Torres *et al.* 1999). Weiterhin verleiht das Carboxylatende dem homomeren P2X₇R seine besonderen funktionellen Eigenschaften, welche über die Funktion einfacher, ligandengekoppelter Ionenkanäle hinausgehen. So führt das Kürzen des Carboxylatendes um 177 Aminosäuren zu einem Verlust der Potenz Poren für große organische Kationen auszubilden, bewahrt aber die prinzipielle Funktion als Liganden-gesteuerter Ionenkanal für kleine anorganische Kationen (Virginio *et al.* 1997). Allerdings geht die C-terminale Verkürzung mit einer deutlichen Verkleinerung des Ionenstroms und einer Veränderung der Ionenkanalkinetik einher (Becker *et al.* 2008).

Somit stellt der P2X₇R einen bifunktionalen Ionenkanal dar. Kurzzeitige Aktivierung für wenige Sekunden führt ähnlich wie bei anderen P2X-Rezeptortypen durch Kationen-Einstrom zur Zelldepolarisation. Charakteristisch für den P2X₇R ist dabei die biphasische Aktivierung wie Deaktivierung, welche abhängig von der Agonisten-Konzentration ist. Bei heterolog in *Xenopus*-Oozyten exprimierten, humanen P2X₇R steigt mit zunehmender Agonistenkonzentration der Ionenstrom anfänglich exponentiell, bei höheren Konzentration dann aber weiter linear an. Weiterhin kann eine langsame von einer schnellen Deaktivierung unterschieden werden. Letztere tritt nur bei höheren Agonistenkonzentration auf. Dies sind Hinweise für die Existenz zweier unterschiedlicher ATP-Bindungsstellen, deren Affinität sich etwa um den Faktor 50 unterscheidet. Für die Funktion der niedrig affinen Bindungsstelle scheinen N- und C-terminale Domänen eine wichtige Rolle zu spielen (Klapperstück *et al.* 2001; Becker *et al.* 2008).

Längere bzw. wiederholte Aktivierungen und eine geringe extrazelluläre Konzentration von divalenten Kationen führt darüber hinaus zur Ausbildung von Poren, die neben Na⁺, Ca²⁺ und K⁺ ebenfalls auch die Permeation kleiner Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 900 Da (bei Lymphozyten bis 200 Da) zulässt. Dieser Effekt wirkt sich meist zytotoxisch aus (Ralevic and Burnstock 1998). Dabei ist der genaue Mechanismus der Porenausbildung bisher umstritten. Zum einen gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass der aus P2X₇-Untereinheiten geformte Kationenkanal durch anhaltende Aktivierung nach 25 s bis auf maximal 3-5 nm dilatiert (Virginio *et al.* 1999). Auch die Tatsache, dass die maximale Größe der permeierenden Kationen proportional zur Dauer der P2X₇R-Aktivierung ist, unterstützen das Modell der P2X₇R-Porenbildung (North 2002). Andererseits gibt es auch Argumente, die dafür sprechen, dass die Porenbildung nicht durch den P2X₇R selbst, sondern durch zusätzliche Proteine realisiert wird. So konnten Experimente zeigen, dass die Applikation von Maitotoxin ebenfalls zur Bildung von Poren führen kann, deren pharmakologischen Eigenschaften identisch mit P2X₇R-induzierten Poren sind, die jedoch unabhängig vom P2X₇R entstehen (Schilling *et al.* 1999). Die extrazelluläre Applikation des Calmodulin-Inhibitors Calmidazolium bewirkt eine 90 % Hemmung des initialen Ionenstromes, verhindert aber keine Porenbildung (Virginio *et al.* 1997). Weiterhin

konnte an Makrophagen nachgewiesen werden, dass das Protein Pannexin 1 als Halbkanal fungiert, welches vom P2X₇R aktiviert werden kann und dass Pannexin-Expression Voraussetzung für P2X₇R-induzierte Porenbildung bei anhaltender P2X₇R-Aktivierung ist (Pelegriin and Surprenant 2006). Auch die Tatsache, dass die gemessenen Porenströme kein Korrelat in Einzelkanalmessungen finden, spricht für die Beteiligung zusätzlicher Proteine an der Porenausbildung (Riedel *et al.* 2007).

Hinsichtlich der pharmakologischen Eigenschaften unterscheidet sich der P2X₇R in einigen Punkten deutlich von anderen P2X-Rezeptortypen. Für seine Aktivierungen werden ATP-Konzentrationen von mehr als 100 µM benötigt (Ralevic and Burnstock 1998). Weiterhin besitzt 2',3'-(benzoyl)-ATP (BzATP) eine drei- bis zwanzigfach größere Potenz als ATP. Somit ist BzATP für die gezielte Untersuchung des P2X₇R verwendbar, jedoch nicht für diesen selektiv (North and Surprenant 2000). Eine weitere Besonderheit des P2X₇R ist die Veränderung des Schaltverhaltens und der Ionenströme nach wiederholter Aktivierung. Am P2X₇R der Ratte führt wiederholte Applikation von 30 µM BzATP in Mg²⁺-armer Lösung zu einer verlangsamten Abschaltkinetik, die bis zu 20 min andauert (Surprenant *et al.* 1996). Am menschlichen P2X₇R zeigt wiederholte, submaximale Aktivierung eine zunehmende Steigerung der Ionenströme (Hibell *et al.* 2000). Die genauen Mechanismen dieser Kinetikveränderungen sind bisher unbekannt.

Die Konzentration von extrazellulären divalenten Kationen beeinflusst maßgebend die Aktivität von ATP und BzATP. So führt die Reduzierung der extrazellulären Mg²⁺- und Ca²⁺-Konzentration zu anderen Dosis-Wirkungskurven für ATP und BzATP hinsichtlich der EC₅₀ und den maximalen Ionenströmen (Surprenant *et al.* 1996). Bisher ist nicht sicher geklärt, ob diesem Phänomen allosterische Effekte zugrunde liegen und/oder ob divalente Kationen die Menge an freiem ATP bzw. BzATP reduzieren. Der antagonistische Effekt von Mg²⁺ und Ca²⁺ ist auch bei anderen P2X-Rezeptortypen in geringerem Grade nachweisbar. Jedoch wirken am P2X₇R zusätzlich auch Kationen wie Cu²⁺ und Zn²⁺ inhibitorisch (Virginio *et al.* 1997).

Neben Kationen existieren noch eine Reihe weitere Antagonisten, die am P2X₇R wirken. Hierzu gehören die generellen P2X-Rezeptorblocker. Dabei zeigen die Antagonisten Suramin (IC₅₀ > 300 µM) und Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonicacid (PPADS) (IC₅₀ > 50 µM) am Ratten-P2X₇R vergleichsweise geringe Wirkung (Surprenant *et al.* 1996). Potenter wirkt das Suramin Analog NF279 mit einer IC₅₀ = 10 µM (Klapperstück *et al.* 2000b). Am selektivsten inhibiert unter den P2X-Antagonisten Brilliant Blue G den P2X₇R mit IC₅₀ Werten von 10 nM an Ratten und 200 nM am humanen P2X₇R, die im Vergleich zum P2X₄-Rezeptor um das 1000fache niedriger liegen (Jiang *et al.* 2000). Einen weiteren P2XR-Antagonisten stellt oxidiertes ATP dar, das im Gegensatz zu andern P2X-Rezeptoren eine irreversible Inhibition am P2X₇R auslöst (Murgia *et al.* 1993; Wiley *et al.* 1994; North and Surprenant 2000). Schließlich finden sich Antagonisten, die selektiv am P2X₇R Wirkung zeigen. Dazu zählt Calmidazolium, das nicht-kompetitiv mit einer IC₅₀ von ca. 13 nM den Ionenstrom blockiert (Virginio *et al.* 1997). Weiterhin besitzt das Steroidhormon 17β-Östradiol nicht-genomische, kompeti-

tiv antagonistische Potenz am menschlichen P2X₇R mit einer IC₅₀ von 3 µM (Cario-Toumaniantz *et al.* 1998). Schließlich zeigt auch das Isoquinolinderivat KN-62, das ebenfalls einen selektiven Antagonisten der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) darstellt, antagonistische Effekte am menschlichen P2X₇R mit einer IC₅₀ von 13 nM (Gargett and Wiley 1997). Die Forschung ist hier nicht abgeschlossen, da P2X₇R-Antagonisten in Zukunft therapeutische Bedeutung gewinnen können. So wurden in jüngerer Vergangenheit beispielsweise mit dem Amid Adamantane, AZ11645373 (Stokes *et al.* 2006; Broom *et al.* 2008) und mit dem Phenylethyl-quinolin-5-ylguanidine A-804598 (Donnelly-Roberts *et al.* 2009) weitere selektive P2X₇R-Antagonisten gefunden.

Nach heutigem Wissensstand stellt extrazelluläres ATP einen wichtigen inflammatorischen Botenstoff dar. Relativ große Mengen von ATP und UTP werden von Epithelzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Gliazellen, Fibroblasten und Hepatozyten während mechanischer Reizung, Zellstress, Nekrose, Apoptose oder vaskulärer Verletzungen freigesetzt (Di Virgilio *et al.* 2001; North 2002). Der P2X₇R wird vor allem von Lymphozyten, Zellen des mononukleären Phagozytose-System und Mastzellen exprimiert und scheint wichtige immunologische Funktionen zu beeinflussen (Carroll *et al.* 2009; Di Virgilio 2007; Hughes *et al.* 2007; Chen and Brosnan 2006). So spielt P2X₇R-Stimulation eine entscheidende Rolle bei der posttranslationalen Reifung und Freisetzung von Interleukin 1β (IL1β) aus Monozyten. Die Anwesenheit von bakteriellen Toxinen wie LPS führt zur Synthese eines IL1β-Vorläuferproteins, das sich dispers im Zytosol anreichert. Die Reifung und Freisetzung erfolgt erst mittels eines zweiten, zusätzlichen Stimulus (Ferrari *et al.* 1997). Der P2X₇R-induzierte K⁺-Ausstrom scheint dabei eine essentielle Bedeutung für die Aktivierung der Caspase 1 zu haben, welche das bedeutendste Enzym für die Aktivierung von IL-1β darstellt (Perregaux *et al.* 2001). Über den genauen Mechanismus der Freisetzung gibt es zwei Hypothesen, nämlich: die Freisetzung aus Lysosomen oder durch Mikrovesikel (Ferrari *et al.* 2006). Unstrittig ist jedoch, dass die Freisetzung P2X₇R-induziert ist und die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration eine Rolle spielt (Gudipaty *et al.* 2003). In B-Lymphozyten vermittelt der P2X₇R den Verlust von CD23 und L-Selektin in der Zellmembran (Gu *et al.* 1998) (Sluyter and Wiley 2002; Jamieson *et al.* 1996).

Der P2X₇R stellt somit funktionell nicht nur einen isolierten Kanal oder Porenbildner dar, sondern wirkt auch durch direkte Interaktion mit Proteinen. Es konnten 11 Proteine identifiziert werden, die mit dem P2X₇R einen Multiproteinkomplex zu bilden scheinen. Zu diesen Proteinen gehören Laminin α3, Integrin β2, β Aktin, α-Aktinin, Phosphatidylinositol-4kinase, Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase-β (RPTP β) und die Hitzeschockproteine HSP70, HSP71 und HSP90. Somit könnte dieser Komplex Interaktionen zwischen extrazellulärer Matrix, dem Zytoskelett und internen Signalkaskaden ermöglichen. Zum anderen konnte auch gezeigt werden, dass der P2X₇R nach Aktivierung durch RPTP β an Tyr³⁴³ dephosphoryliert wird, welches die Ionenströme reduziert und somit eine negative Rückkopplungskontrolle für den P2X₇R darzustellen scheint (Kim *et al.* 2001). Dies zeigt auch die Beobachtung an RAW-264.7-Makrophagen, wo P2X₇R-Stimulation zu einer Reorganisation des

Aktinkeletalts und zur Membranabschnürung führt. Diese Prozesse werden durch die (mitogen-activated-protein) MAP-Kinase p38 und die Rho-Kinase vermittelt (Pfeiffer *et al.* 2004). Damit besitzt der P2X₇R auch die Fähigkeit Zweit-Botenstoff-Signale innerhalb der Zelle zu aktivieren, welche die Bandbreite seiner physiologischen Funktionen komplex erweitert. An Glandula-Parotis-Drüsenazinzellen der Ratte konnte eine Ca²⁺-unabhängige Aktivierung der Proteinkinase C δ via P2X₇R-Stimulation nachgewiesen werden. Diese Proteinkinase führt weiterhin zur Aktivierung der Proteinkinase D (C γ) und der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (Bradford and Soltoff 2002). Dabei scheint der N-Terminus des P2X₇R essentiell für diesen Signalweg zu sein (Amstrup and Novak 2003). An human T-Zellen führt die Stimulierung des P2X₇R zu einer Ca²⁺-abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung von p56^{lck} mit anschließender Aktivierung der c-Jun N-terminal kinase (JNK), der extracellular-signal regulated kinase (ERK) und dem Aktivatorprotein AP1 (Budagian *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die P2X₇R-induzierte ERK1/2-Aktivierung zu einer gesteigerten Lymphozyten-Proliferation (Adinolfi *et al.* 2005) und einer erhöhten Expression des Chemokine-Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in Astrozyten führt (Baricordi *et al.* 1999; Panenka *et al.* 2001). In verschiedenen Mastzelllinien verursacht P2X₇R-Stimulation eine Jak 2-, Stat 6-, Caspase 3- und Caspase 8-Aktivierung, sowie Zytokinexpression (Bulanova *et al.* 2005).

Weiterhin wird die LPS-induzierte Transkription der mRNA für die induzierbare NO-Synthase und ebenfalls die NO-Produktion durch P2X₇R-Stimulation erhöht (Hu *et al.* 1998). Die geschieht über den Transkriptionsfaktor NF- κ b via P2X₇R-induzierte MAP Kinasen (Aga *et al.* 2004).

1.2 Die Signalkaskade des B-Lymphozyten

1.2.1 Der B-Zell-Rezeptor

Der B-Zell-Rezeptor (BZR) spielt eine zentrale Rolle in der Kommunikation der B-Lymphozyten mit ihrer Umgebung. Dabei übernimmt dieser Rezeptor nicht nur die Aufgabe der Erkennung und Aufnahme von körperfremden Antigenen. Der mehrstufige Prozess lymphozytärer Proliferation und Differenzierung wird ebenfalls durch ihn vermittelt. Komodulatorisch wirkende Signale, induziert z.B. über CD19, CD22 und den Fc-Rezeptor Fc γ RIIB, führen dabei zu abgestimmten, situationsabhängigen, biologischen Reaktionen (Kurosaki 1997; Pleiman *et al.* 1994).

Der BZR gehört gemeinsam mit dem T-Zell-Rezeptor und den Fc-Rezeptoren für IgE und IgG zu einer Rezeptorklasse, die durch eine komplexe heterooligomere Struktur charakterisiert ist. Dabei sind die molekularen Bereiche der Liganden-Bindungsstellen von den Signal-weiterleitenden Abschnitten räumlich getrennt auf unterschiedliche Rezeptor-Untereinheiten verteilt (Kurosaki 1997). Der B-Zell-Rezeptor ist aus einem membrangebundenen Immunglobulin und zwei transmembran verlaufenden Heterodimeren, bestehend aus den Polypeptiden I α und I β (CD79 α , CD79 β), aufgebaut. Das membrangebundene Immunglobulin, zusammengesetzt aus jeweils zwei identischen schweren und leichten Ketten, dient als tetramerer Komplex der Antigenerkennung. Die N-terminale hypervariable Region

der schweren und leichten Kette stellt die Epitop-Bindungsstelle dar und sorgt für Antigenselektivität. Die $Ig\alpha/Ig\beta$ -Heterodimere sind für die Weiterleitung bzw. Initiierung entsprechender intrazellulärer Signalkaskaden verantwortlich. Sie besitzen an ihren intrazellulären Abschnitten Immunorezeptor-Tyrosin-abhängige Aktivierungsmotive (ITAMs), die eine Länge von ungefähr 26 Aminosäuren haben (Reth *et al.* 1991).

Der BZR als Ganzes ist als Monomer auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Bindung von multivalenten Antigenen führt zur Aggregation von mehreren BZR-Monomeren. Diese Quervernetzung initiiert die Phosphorylierung der $Ig\alpha/Ig\beta$ -ITAMs durch Tyrosinkinase der src-Familie (Lyn, Lck, Blk, Fyn) mit nachfolgender Konformationsänderung der intrazellulären BZR-Domänen (Wienands 2005; Tolar *et al.* 2005). Dabei scheint die src Kinase Lyn die wichtigste Rolle zu spielen (Caballero *et al.* 2006; Chan *et al.* 1997). Über ihre SH2-Bindungsstelle kann sie auch an phosphorylierten ITAMs binden und damit zusätzlich ihre eigene Aktivität erhöhen (Kurosaki 1997). Die Phosphorylierungen scheinen in sphingolipid- und cholesterolreichen Plasmamembran-Mikrodomänen, genannt lipid rafts, stattzufinden. Die lipid rafts enthalten unter anderem die Tyrosinkinase Lyn (ohne ihren Inhibitor CD45). Es konnte gezeigt werden, dass nach Kreuzvernetzung eine Translokation der BZR-Monomere in die lipid rafts stattfindet (Cheng *et al.* 2001; Guo *et al.* 2000). Dennoch ist das Modell der lipid rafts noch nicht in allen Details geklärt. So ist ihre Bedeutung für die BZR-Internalisation unklar (Caballero *et al.* 2006). Die weitere essentielle Station der Signalleitung stellt die Syk-Kinase dar. So verlieren zum Beispiel Syk-negative B-Lymphozyten die Fähigkeit der IP_3 -Synthese und Ca^{2+} -Mobilisation nach Aktivierung (Takata *et al.* 1994). Durch Anlagerung der Syk-Kinase an die ITAMs über ihre SH2-Bindungsdomäne wird ihre Empfänglichkeit zur Phosphorylierung und somit Aktivierung durch die Lyn-Kinase erhöht (Kurosaki 1997).

1.2.2 Der DAG/ IP_3 -Signalweg

Die Phospholipase $C\gamma 2$ ist das Schlüsselenzym in B-Lymphozyten für die Hydrolyse von DAG (Diacylglycerol) und IP_3 (Inositol-1,4,5-triphosphat) aus Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (PIP_2). Ihre Aktivierung erfolgt über Tyrosinphosphorylierung (Coggeshall *et al.* 1992). Dafür bedarf es eines Komplexes diverser Effektorproteine, der als Signalosom bezeichnet wird (Geisberger *et al.* 2003).

Nach BZR-Stimulation phosphoryliert die aktivierte Tyrosinkinase Syk das Adapterprotein BLNK (B-Zell-Linker-Protein) (Kurosaki and Tsukada 2000), das an der Aktivierung der Lipidkinase Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) beteiligt ist (Kurosaki 2000). Die PI3K besteht aus der katalytischen Untereinheit p110 und aus einer Regulationsuntereinheit p85 (Engelke *et al.* 2007). Es phosphoryliert das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3). Durch diese Phosphorylierung kann sich die Bruton-Tyrosinkinase (Btk) über ihre PH (Pleckstrin-Homologie)-Domäne an PIP_3 anlagern. Dies bringt sie in räumliche Nähe mit membranassoziierten Kinasen und fördert somit ihre Phosphorylierung und Aktivierung. Über die SH2-Domäne der Btk kann sich nun das phosphorylierte BLNK anlagern, das mit der Phospholipase $C\gamma 2$

assoziiert ist (Hashimoto *et al.* 1999). Dies ermöglicht nun der Btk, die Phospholipase C γ 2 durch Phosphorylierung an den Tyrosinen Y753 und Y759 zu aktivieren. Neben der Btk, die für mehr als 60% dieser Phosphorylierungen verantwortlich ist, scheinen dazu aber auch andere Kinasen wie Syk und Lyn in der Lage zu sein (Kim *et al.* 2004). Das Substrat der Phospholipase C γ 2 ist wie bei der PI3K das PIP $_2$. Es gibt Hinweise darauf, dass für eine ausreichende Synthese von IP $_3$ und DAG eine Neusynthese von PIP $_2$ notwendig ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Btk-Kinase auch als Transport-Vehikel für die Phosphatidylinositol-4phosphat 5-kinase fungiert, welche wiederum eine ausreichende Substratmenge an PIP $_2$ gewährleistet (Saito *et al.* 2003).

Mit der Synthese von IP $_3$ und DAG durch die Phospholipase C γ 2 entstehen wichtige zweite Botenstoffe, die am Anfang zweier unterschiedlicher Signalkaskaden stehen. DAG initiiert die ras/raf Signalkaskade mittels der Proteinkinase C (Becker and Hannun 2005) und IP $_3$ setzt Ca $^{2+}$ aus intrazellulären Speichern frei (Berridge and Tayler 1988).

1.2.3 Freisetzung und Einstrom des zweiten Botenstoffes [Ca $^{2+}$] $_i$

Ca $^{2+}$ stellt wie in fast allen Zellarten auch im B-Lymphozyten einen wichtigen zweiten Botenstoff dar, welcher hier vor allem durch den BZR initiiert wird. Dabei setzt sich das BZR-induzierte [Ca $^{2+}$] $_i$ -Signal aus zwei miteinander gekoppelten Phasen zusammen: zum einem aus der IP $_3$ -vermittelten Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und zum anderen aus einem Ca $^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran (Chung *et al.* 2007).

Das via Phospholipase C γ 2 synthetisierte IP $_3$ verteilt sich frei im Zytosol und bindet an IP $_3$ -Rezeptoren (IP $_3$ R) des ER (Berridge 1993; Taylor 1998). Diese ligandengekoppelten Ionenkanäle führen zu einem Ca $^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER entlang des Konzentrationsgradienten mit der Folge eines rapiden und großen Anstiegs der zytosolischen Ca $^{2+}$ -Konzentration. Gegenwärtig sind drei strukturell ähnliche Subtypen der IP $_3$ R isoliert und beschrieben worden, die ubiquitär exprimiert werden und deren jeweilige Expressionsstärke vom Entwicklungsstand der B-Lymphozyten abhängig ist. Die Tyrosinkinase Lyn kann die Phosphorylierungen des IP $_3$ -Rezeptors induzieren, was den IP $_3$ R-abhängigen Ca $^{2+}$ -Ausstrom verlängert (Engelke *et al.* 2007).

Die IP $_3$ -induzierte Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER führt zu einem so genannten kapazitiven Ca $^{2+}$ -Einstrom über store-operated Ca $^{2+}$ -Kanäle (SOCs) der Plasmamembran. Den wichtigsten SOC der Lymphozyten stellt der I $_{CRAC}$ dar, welcher in den letzten Jahren im Fokus intensiver Forschung stand (Engelke *et al.* 2007). Dabei wurde die große Bedeutung der Stim- und Orai-Proteine für den I $_{CRAC}$ entdeckt. Das bereits als Adhäsionsprotein bekannte Stim gleicht einem Typ(I)-Transmembranprotein und befindet sich innerhalb der Membran des ER. In Säugetierzellen konnten die Subtypen Stim 1 und Stim 2 isoliert werden. Der im ER liegende N-Terminus umfasst eine Ca $^{2+}$ -bindende EF-Hand und eine Protein-Interaktionsdomäne SAM (sterile α motif). Der zytoplasmatische Anteil umfasst eine coiled-coil Domäne, verschiedene Serin/Threonine-Phosphorylierungsstellen und ein lysinreiches Helix-turn-Helixmotiv (Engelke *et al.* 2007). Es konnte an Drosophila-Fliegenzellen und humanen T-

Zellen nachgewiesen werden, dass Stim 1 als Ca^{2+} -Sensor fungiert, der nach Entleerung des ER in der Lage ist, I_{CRAC} -Kanäle zu aktivieren. Nach heutiger Vorstellung stabilisiert Ca^{2+} durch Bindung an der EF-Hand die Lage von Stim 1 am ER (Roos *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2005). Das Abdissoziieren von Ca^{2+} führt zu einer Konformationsänderung am Molekül mit nachfolgender Translokation und Aggregation von Stim-Proteinen (Liou *et al.* 2005). Diese Aggregate lagern sich in Bereichen der endoplasmatischen Membran an, die sich in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran befinden und als „puncta“ bezeichnet werden (Feske 2007). Dabei scheinen die Stim-Aggregate essentiell für die I_{CRAC} -Aktivierung zu sein (Luik *et al.* 2008). Das Protein Stim 2 funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie Stim 1 und ist ebenfalls befähigt einen I_{CRAC} zu aktivieren. Jedoch besitzt Stim 2 eine geringere Affinität zu Ca^{2+} . Es konnte gezeigt werden, dass Stim 2 für die basale Ca^{2+} -Konzentration im ER verantwortlich ist bzw. erst bei submaximaler Entleerung aktiv wird (Brandman *et al.* 2007). Die eigentliche Struktur des I_{CRAC} Kanals blieb lange Zeit ein Geheimnis. Experimente in jüngerer Zeit konnten jedoch zeigen, dass die Überexpression des Orai-Proteins (auch CRACM genannt) in Kombination mit Stim 1 den I_{CRAC} Strom in Hek-Zellen 20fach steigert (Mercer *et al.* 2006). Gegenwärtig spricht vieles dafür, dass Orai-Moleküle als Untereinheit am Aufbau des I_{CRAC} -Kanals beteiligt sind (Prakriya *et al.* 2006; Yeromin *et al.* 2006). Nach heutiger Vorstellung befinden sich im Ruhezustand Orai-Moleküle als Dimere auf der Plasmamembran. Nach Aktivierung durch die C-terminale coiled-coil Domäne von Stim dimerisieren sie zu Tetrameren und formen damit die Ca^{2+} -selektive Pore. Dabei beträgt der Abstand zwischen Stim und Orai an den Punctae 17 ± 10 nm (Oh-Hora and Rao 2008). Unklar ist derzeit, ob Stim zusätzlich noch auf die Konformität der Orai-Proteine Einfluss nimmt und ob dies für die vollständige Kanalaktivierung notwendig ist (Hoek *et al.* 2006; Penna *et al.* 2008).

Eine wichtige Charakteristik des SOC ist seine schwellenwertabhängige Arbeitsweise. Erst eine ausreichende Entleerung des endoplasmatischen Ca^{2+} -Reservoirs führt zu einer Aktivierung der SOCs. Dies bedeutet, dass erst eine bestimmte Menge an IP_3 in der Lage ist, einen Ca^{2+} -Freisetzung-induzierten Ca^{2+} -Einstrom zu generieren. Diese Schwellenwertarbeitsweise erzeugt sehr unterschiedliche $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalmuster. Starke Aktivität der Phospholipase $\text{C}\gamma 2$ führt zu einem deutlichen und lang anhaltenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal, vermittelt durch ER-Entleerung und Ca^{2+} -Einstrom. Geringe Aktivität der Phospholipase $\text{C}\gamma 2$ erzeugt nur ein geringes und schnell abklingendes bzw. oszillierendes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal, da durch die Aktivität von Ca^{2+} -Pumpen die kleine Menge an freiwerdendem Ca^{2+} rasch aus dem Zytosol entfernt wird (Scharenberg *et al.* 2007).

Neben den SOCs scheinen bei B-Lymphozyten auch second messenger-operated Ca^{2+} -channels (SMOC) zu existieren, die ebenfalls einen Beitrag für den BZR-induzierten Ca^{2+} -Einstrom leisten. Zu diesen Kanälen gehören wahrscheinlich die transient receptor potential (TRP) Kanäle (Engelke *et al.* 2007). Insgesamt sind 28 Mitglieder, verteilt auf drei Untergruppen an Säugetierzellen beschrieben worden. Die sieben Mitglieder der TRPC-Untergruppe werden durch die Aktivität der Phospholipase C gesteuert. TRPC 3, -6, -7 werden durch einen von der Proteinkinase C unabhängigen, DAG-

basierenden Mechanismus und TRPC 1, -4, -5 durch einen DAG-unabhängigen Mechanismus aktiviert (Smyth *et al.* 2006). Dies konnte experimentell in B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Venkatachalam *et al.* 2003; Lievremont *et al.* 2005). Ferner scheinen die TRPC, vermittelt durch Stim 1, auch eine Rolle als SOC zu spielen (Engelke *et al.* 2007). Zu den SMOCs zählen laut Definition auch IP₃-Rezeptoren, die nicht nur auf der endoplasmatischen Membran, sondern auch auf der Plasmamembran exprimiert sein können, welches an DT40 B-Zellen nachgewiesen werden konnte (Engelke *et al.* 2007).

1.2.4 Die Frequenz- und Amplitudenmodulation des [Ca²⁺]_i-Signals

BZR-induzierte Signale stehen am Anfang vieler Entwicklungs- und Funktionsprozesse. Dazu gehören beispielsweise die Differenzierungsschritte von der pro-B-Zelle über die pre-B-Zelle zur unreifen B-Zelle im Knochenmark, die Induktion der somatischen Hypermutation, die B-Zell-Selektion in Germinalszentren und die von Antigenen induzierte Antikörpersynthese (Scharenberg *et al.* 2007). B-Zellen besitzen dafür verschiedene Mechanismen, das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal durch kommodulatorische Signale zu verändern (Engelke *et al.* 2007). So ist es möglich, dass unterschiedliche biologische Effekte durch den BZR und schließlich auch durch Ca²⁺ gesteuert werden können. Dabei ist auf vielen Stationen von der BZR-Kreuzvernetzung bis zum [Ca²⁺]_i-Signal eine Einflussnahme auf die Signalkaskade durch diverse Rezeptoren und Kanäle möglich.

Eine wichtige Modulationsebene stellt das Signalosom dar, das die Aktivierung der Phospholipase C_γ2 und somit das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal vermittelt. Positive wie negative Regulationswege sind entdeckt und beschrieben worden. Einer der wichtigsten Modulatoren stellt der Korezeptor CD19 dar. Komplement-gebundene Pathogene verstärken die Rekrutierung eines trimeren Komplexes, bestehend aus CD19, CD21 und CD81 in unmittelbarer Nähe zum aktivierten BZR (Scharenberg *et al.* 2007). Nach Tyrosinphosphorylierung von CD19 durch Lyn kann die Untereinheit p85 der PI3K über ihre SH2-Bindungsdomäne an CD19 binden und ihre Aktivität erhöhen. Somit führt CD19 zu einer Vergrößerung der BZR-induzierten [Ca²⁺]_i-Antwort bzw. senkt damit die B-Zell-Aktivierungsschwelle (Engelke *et al.* 2007). Dies verstärkt nicht nur die Immunreaktion, sondern spielt auch für die Selektion im Germinalszentrum eine wichtige Rolle (Scharenberg *et al.* 2007). Weiterhin scheint auch der non-T-cell activation linker (NTAL), der verstärkt bei reifen B-Zellen exprimiert wird, einen positiven Einfluss auf das [Ca²⁺]_i-Signal zu haben. Im phosphorylierten Zustand kann dieser das growth-factor-receptor-protein 2 (Grb2) binden. Dadurch wird es von seinem eigentlichen Bindungspartner Dok-3 getrennt, die als Komplex einen Inhibitor der Btk darstellen. Die durch Grb2/Dok-3 hervorgerufene Hemmung könnte eine Bedeutung für die Begrenzung des [Ca²⁺]_i-Signals in unreifen B-Zellen haben (Engelke *et al.* 2007). Zu den inhibitorisch wirkenden Membranrezeptoren gehören der Fc-Rezeptor Fc_γRIIB1 und CD22. Koaktiviert mit dem BZR führen diese Rezeptoren zur Rekrutierung der SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP1) und der SH2-domain-containing-inositolpolyphosphat- 5' phosphatase (SHIP). Dabei scheint der inhibitorische Effekt von Fc_γRIIB1

vor allem durch SHIP und der von CD22 durch SHP1 vermittelt zu sein. SHP1 reduziert das $[Ca^{2+}]_i$ -Signal durch die Dephosphorylierung von CD19 und durch die Aktivitätserhöhung der plasmamembranären Ca^{2+} -ATPase PMCA4. SHIP wiederum reduziert die Konzentration von PIP_3 , das wiederum für die Funktion der Btk notwendig ist (Engelke *et al.* 2007).

Eine weitere wichtige Einflussgröße auf das $[Ca^{2+}]_i$ -Signals stellt die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Einstrom über SOCs bzw. SMOCs dar. Die treibende Kraft kann durch das Membranpotenzial verändert werden, das wiederum unter dem Einfluss einer Fülle von unterschiedlichen Ionenkanälen steht. Dabei scheinen vor allem spannungsabhängige und Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle eine Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von B-Zell-Subtypen eine unterschiedliche Komposition von K^+ -Kanälen exprimieren, die das BZR-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal via Membranpotenzial modulieren und für den jeweiligen Subtyp spezifisch anpassen (Scharenberg *et al.* 2007). Eine weitere wichtige Kanalgruppe, die wahrscheinlich das Membranpotenzial beeinflusst, gehört zur Familie der TRPM. Vertreter dieser Familie, TRPM4 und TRPM5, werden durch intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen aktiviert. An T-Zellen konnte eine Reduzierung der treibenden Kraft für Ca^{2+} durch TRPM-abhängige Depolarisation des Membranpotenzials nachgewiesen werden. Dieser Mechanismus wird ebenfalls bei B-Lymphozyten für möglich gehalten (Scharenberg *et al.* 2007).

Ingesamt gesehen existieren somit zahlreiche Faktoren, die auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal modulierenden Einfluss nehmen. Die dadurch entstehenden $[Ca^{2+}]_i$ -Signalmuster, die sich in $[Ca^{2+}]_i$, Frequenz und Zeitdauer voneinander unterscheiden, scheinen auch abgestimmte biologische Effekte zu bewirken. So konnte eine $[Ca^{2+}]_i$ -Signalmuster-abhängige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B nachgewiesen werden (Scharenberg *et al.* 2007). NFAT ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für Zytokine wie Interleukin 4. Es wird durch eine zeitlich lang anhaltende, moderate $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung bzw. durch $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen aktiviert, indem es durch Dephosphorylierung die Möglichkeit zur Kerntranslokation erhält. Im Gegensatz dazu sind kurzzeitige aber hohe $[Ca^{2+}]_i$ -Gipfel notwendig um die Phosphorylierung und damit den Abbau des NF- κ B-Inhibitors I- κ B zu induzieren. NF- κ B verstärkt die Synthese von apoptotisch wirkenden Proteinen und fördert die Proliferation. Die Bedeutung der unterschiedlichen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren konnten Healy und Dolmetsch zeigen. Sie wiesen nach, dass naive B-Zellen auf ein Fremdartigen mit einer deutlich ausgeprägten biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Signal-Antwort reagieren, die zur Aktivierung von NF- κ B, NFAT, JNK und ERK/pp90rsk führt. Selbsttolerante B-Zellen reagieren auf Körperantigene mit der Ausbildung eines kleiner ausgebildeten, oszillierenden $[Ca^{2+}]_i$ -Signals, dass nur NFAT und ERK/pp90rsk aktiviert (Healy *et al.* 1997).

2 Zielstellung

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass B-Lymphozyten die Fähigkeit zur Expression des P2X₁-, P2X₂-, P2X₄- und P2X₇-Rezeptors haben (Sluyter *et al.* 2001). Weiterhin konnte an CLL-Lymphozyten die Expression des P2Y₁₁-Rezeptors nachgewiesen werden (Conigrave *et al.* 2001). An tonsillären und Epstein-Barr Virus transformierten B-Zellen zeigten jedoch Patch-Clamp Messungen von ATP-induzierten Strömen nur Charakteristika des P2X₇R (Bretschneider *et al.* 1995; Löhn *et al.* 2001). Gegenwärtig können bereits eine Reihe von Eigenschaften und biologischen Wirkungen dem auf B-Lymphozyten exprimierten P2X₇R zugeschrieben werden:

- Die P2X₇R-induzierte Aktivierung der Phospholipase D (Fernando *et al.* 1999; Gargett *et al.* 1996).
- Das Abtrennen („Shedding“) von L-Selektin und CD23 von der Membranoberfläche (Gu *et al.* 1998; Sluyter and Wiley 2002; Jamieson *et al.* 1996).
- Ein P2X₇R-vermittelter, extrazellulärer Einstrom von Ca²⁺ und Ba²⁺ (Wiley *et al.* 1993; Löhn *et al.* 2001).
- Die Aufnahme von Ethidium⁺ oder Yo-Pro 1 durch P2X₇R-induzierte Porenbildung (Gu *et al.* 2000; Nakanishi *et al.* 1996; Wiley *et al.* 1993).

Effekte, die von der Porenbildung abhängig sind (siehe Kap. 1.1.3), wie die Aufnahme von Ethidium⁺ oder Yo-Pro 1, wurden mit hohen Konzentrationen von ATP (bis 1 mM) bzw. BzATP (bis 0,1 mM) ausgelöst. Patch-Clamp-Einzelkanalmessungen an tonsillären und Epstein-Barr-Virus-transformierten B-Lymphozyten zeigten ein anderes, P2X₇R-abhängiges Verhalten. Hier erzeugte der Einsatz von BzATP und ATP in millimolaren Konzentrationen Öffnungen von einzelnen Ionenkanälen mit einer Leitfähigkeit von 9 pS, die für kleine Ionen wie Na⁺ und Ca²⁺, nicht aber für größere Moleküle wie Cholin permeabel waren. Ferner gab es keine Hinweise auf P2X₇R-abhängige Porenbildungen (Bretschneider *et al.* 1995; Markwardt *et al.* 1997). Dies spricht dafür, dass der auf B-Lymphozyten exprimierte P2X₇R vornehmlich als unselektiver Kationkanal fungiert, der möglicherweise in der Lage ist Einfluss auf das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal zu nehmen. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung, ob der P2X₇R die Fähigkeit besitzt, das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal zu modulieren. Eine mögliche Interaktion wäre die P2X₇R-vermittelte Depolarisation des Membranpotenzials, welche die treibende Kraft für den extrazellulären Ca²⁺-Einstrom des BZR-induzierten [Ca²⁺]_i-Signals reduziert. Zum anderen könnte aber der extrazelluläre Ca²⁺-Einstrom via P2X₇R zu einer zusätzlichen Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führen. Ferner könnten auch von Ionenströmen unabhängige, P2X₇R-induzierte Effekte auf die BZR-Signalkaskade mit nachfolgender Veränderung des [Ca²⁺]_i-Signals möglich sein. Die Untersuchungen können dazu beitragen, die Modulation der Immunantwort im Entzündungsherd, wo ATP in den Extrazellularraum freigesetzt wird, besser zu verstehen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Medien, Puffer

3.1.1 Chemikalien

Tab. 1: Chemikalien, Hersteller und Firmensitz

Fluo-4, AM F14210	Molecular Probes	Leiden, Niederlande
Indo-1, AM	Molecular Probes	Leiden, Niederlande
DiBac4(3)	Molecular Probes	Leiden, Niederlande
APC-anti-CD5	BD Pharmingen	Heidelberg, Deutschland
FITC-anti-CD19	BD Pharmingen	Heidelberg, Deutschland
DMSO	Sigma Chemical Co.	St.Louis, USA
Gramicidin G5002	Sigma Chemical Co.	St.Louis, USA
Valinomycin Ready-Made V3639	Sigma Chemical Co.	St.Louis, USA
A23187	Sigma Chemical Co.	St.Louis, USA
Ionomycin	Sigma Chemical Co.	St.Louis, USA
Poly-L-Lysin	Sigma Chemical Co.	St.Louis, USA
BzATP	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
ATP	Roche	Basel, Schweiz
F(ab') ₂ -Fragment anti-IgM (Ziege anti-human)	Dianova	Hamburg, Deutschland
Anti-P2X ₇ R-Antikörper	monoklonal, gegen die native extrazelluläre Domäne	zur Verfügung gestellt von Ian Chesse
Ficoll-Hypaque	Amersham Biosciences	Freiburg, Deutschland
EGTA	Serva	Heidelberg, Deutschland
Fixationspuffer (BD Cytotfix)	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Antikörper gegen P2X ₇ R	Alomone	Israel

3.1.2 Medien

Tab. 2: Gebrauchsmedium RPMI, Zusammensetzung, Hersteller und Firmensitz

500 ml RPMI 1640 mit Hepes, ohne Glutamin	PAA	Pasching, Österreich
5 ml L-Glutamin stabil (200 mmol/l)	PAA	Pasching, Österreich
5 ml MEM Na-Pyruvat (100fach, verdünnt 1:100)	PAA	Pasching, Österreich
5 ml MEM nichtessentielle Aminosäuren ohne Glutamin	PAA	Pasching, Österreich
0,5 ml Fungizone (Amphotericin B 250 µg/ml)	Gibco	Gaithersburg, USA
0,375 ml Refobazin (Gentamycin, 80 mg/2ml)	Ratiopharm	Ulm, Deutschland
0,275 ml 2-Mercaptoethanol (0,79% Stamm = 0,1 mmol/l)	Serva	Heidelberg, Deutschland

Tab. 3: Gebrauchsmedium + 10% FCS, Zusammensetzung, Hersteller und Firmensitz

450 ml Gebrauchsmedium		
50 ml FCS	PAA	Pasching, Österreich
Schafsblut-Erythrozyten	Siemens	Berlin, Deutschland

3.1.3 Lösungen

Die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen, sowie die freie Konzentration von Ca^{2+} , BzATP und ATP wurden mit Hilfe eines Computerprogramms berechnet (Schubert 1990). Wenn nicht ausdrücklich erwähnt, entsprechen die Bezeichnungen der Lösungen der jeweiligen freien Konzentration der Purine und Ionen. Die genaue Zusammensetzung der in dieser Arbeit erstellten und verwendeten Lösungen ist im Anhang (9.1) tabellarisch aufgeführt.

3.2 Geräte

Tab. 4: Geräte, Hersteller und Firmensitz

Umkehrphasenkontrastmikroskop Diaphot TMD	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Objektiv Fluor (40x/1,3 Öl)	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Filterblock (B-2A Blue)	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Xenon-Lampe	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Temperatur-Steuereinheit TC-324B	Warner Instruments	Juarez/Mexico
Inline Heater	Warner Instruments	Juarez/Mexico
Intensified charge coupled device (ICCD) Kamera C2400	Hamamatsu	Hamamatsu, Japan
Bildverstärker	Hamamatsu	Hamamatsu, Japan
Video-to-Fire-Wire-Konverter DFG/13994	Hamamatsu	Hamamatsu, Japan
Vakuum-Pumpe	VEB-Elno	DDR
Personal-Computer	Hewlett-Packard	Austin, USA
Thermostat 5320	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
LSRII	Beckton Dickinson	Franklin Lakes New Jersey, USA

3.3 Biologisches Untersuchungsmaterial

Als biologisches Untersuchungsmaterial dienten humane B-Zellen. Diese wurden aus Tonsillen isoliert, die Kindern im Alter von 2 bis 10 Jahren medizinisch indiziert durch klassische Tonsillektomie entfernt worden sind. Postoperativ wurden die Tonsillen bis zur weiteren Behandlung im Medium (RPMI 5%, FCS 4 °C) aufbewahrt. Die Zellgewinnung erfolgte stets innerhalb der nächsten Stunde. Durch mechanische Zerkleinerung und Durchspülung der Tonsillen konnte eine Gewebesuspension gewonnen werden. Die Isolierung der mononukleären Zellen erfolgte durch einen Ficoll-Dichtegradienten. Entsprechend wurden auf 4 ml Ficoll 8 ml Gewebesuspension überschichtet. Nach 30 min Zentrifugation (900 *g) wurden mononukleären Zellen an der Grenzschicht entnommen und

einmal mit PBS gewaschen und pelletiert (8 min, 450*g). Dieses Pellet wurde in 10 ml RPMI 10% FCS resuspendiert. Die Suspension wurde in Kulturflaschen überführt und im Brutschrank mindestens 6 Stunden aufbewahrt. In diesem Zeitraum hefteten sich die Monozyten an den Flaschenböden. Die überstehende Zellsuspension enthielt dann T- und B-Lymphozyten. Ein mittels PBS auf 1/10 verdünntes Aliquot diente der Zellzahlbestimmung in der Fuchs-Rosenthal-Kammer, um die Lymphozytenanzahl pro ml zu berechnen. Daraufhin erfolgte die Abtrennung der T-Lymphozyten durch Rosettierung nach einem modifizierten Protokoll von Invitrogen. Demnach wurde nach Pelletierung der restlichen 9 ml Zellsuspension (8 min, 450*g) die Lymphozyten in RPMI 10% FCS entsprechend auf 10^7 Zellen pro ml resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Mischung von 5 ml Zellsuspension mit 2,5 ml FCS und 2,5 ml Neuraminidase-behandelter Schafsblut-Erythrozyten (5% in RPMI ohne FCS), gefolgt von einer 10minütiger Inkubation bei 37 °C. Um die Rosettierung zu fördern wurde die Suspension zentrifugiert (10 min, 150*g) und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach vorsichtiger Resuspension des Pellets erfolgte die Aufteilung der Zellsuspension auf 15 ml Röhrchen zu je 10 ml. Anschließend wurde die Suspension mit je 4 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet. Nach 25minütiger Zentrifugation (400*g) konnten die B-Zellen an der Zwischenschicht entnommen werden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die B-Zellen in RPMI 10% FCS Medium resuspendiert und bis zu den Messungen bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt.

3.4 Versuchsaufbau

Die Untersuchung des biologischen Zellmaterials erfolgte durch die Durchflusszytometrie und die Fluoreszenz-Mikroskopie. Das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal wurde durch einen F(ab')₂-Fragment-anti-IgM-Antikörper ausgelöst. Durch das Fehlen der Fc-Region am Antikörper konnten mögliche FcγRIIB1-Rezeptor-abhängige Inhibitionseffekte auf die Signalkaskade ausgeschlossen werden.

3.4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde mit dem Gerät Beckton Dickinson LSRII durchgeführt. Als Ca^{2+} -sensitiver Farbstoff wurde Indo1-AM verwendet. Der maximale Absorptionsbereich dieses Fluoreszenzfarbstoffes liegt bei 351-364 nm. Bildet Indo1 einen Komplex mit Ca^{2+} wird eine Fluoreszenzemission mit einem Maximum bei 475 nm erzeugt (Indo-violett). Ohne Ca^{2+} -Komplexierung fluoresziert Indo1 mit einem Maximum im Wellenlängenbereich von 401 nm (Indo-Blue). Der Strahlengang und die Filterkonfiguration sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Die semiquantitative Messung von Membranpotenzialveränderungen erfolgte simultan zur $[Ca^{2+}]_i$ -Messung mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DIBAC₄(3). Dieser Farbstoff kann bei Depolarisation über die Membran in die Zelle eindringen, wo er an intrazelluläre Proteine bindet und ein Fluoreszenzmaximum im Wellenlängenbereich von 515 nm erzeugt (Abb. 2d).

Zum Nachweis von Zellmembranproteinen kamen Fluochrom-gekoppelte Antikörper (PerCP, PE und FITC) mit einem jeweiligen Emissionsmaximum von 678 nm, 575 nm bzw. 519 nm zum Einsatz (Abb. 2b-d).

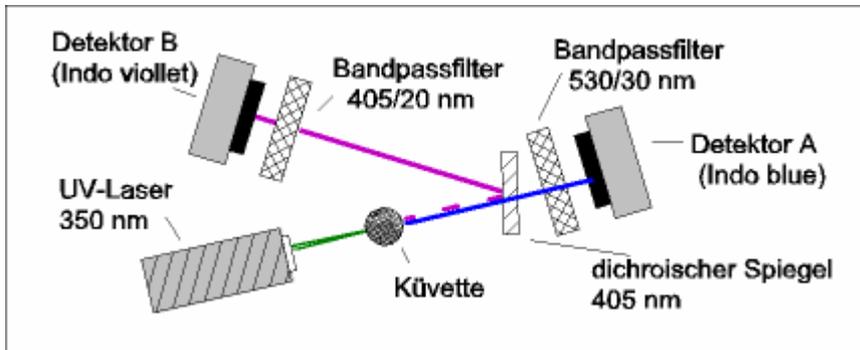


Abb. 1: Strahlengang und Filterkonfiguration für Indo 1-AM am Durchflusszytometer

Messung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration durch Indo 1-AM. Die Anregung erfolgte durch einen **UV-Laser** (350 nm He/Cd). Ein **dichroischer Spiegel** diente der Auftrennung der Fluoreszenzwellenlängen. Für die selektive Fluoreszenz-Detektion kamen der **Bandpassfilter (530/30nm)** für Indo-Blue und der **Bandpassfilter (405/20nm)** für Indo-Violett zum Einsatz.

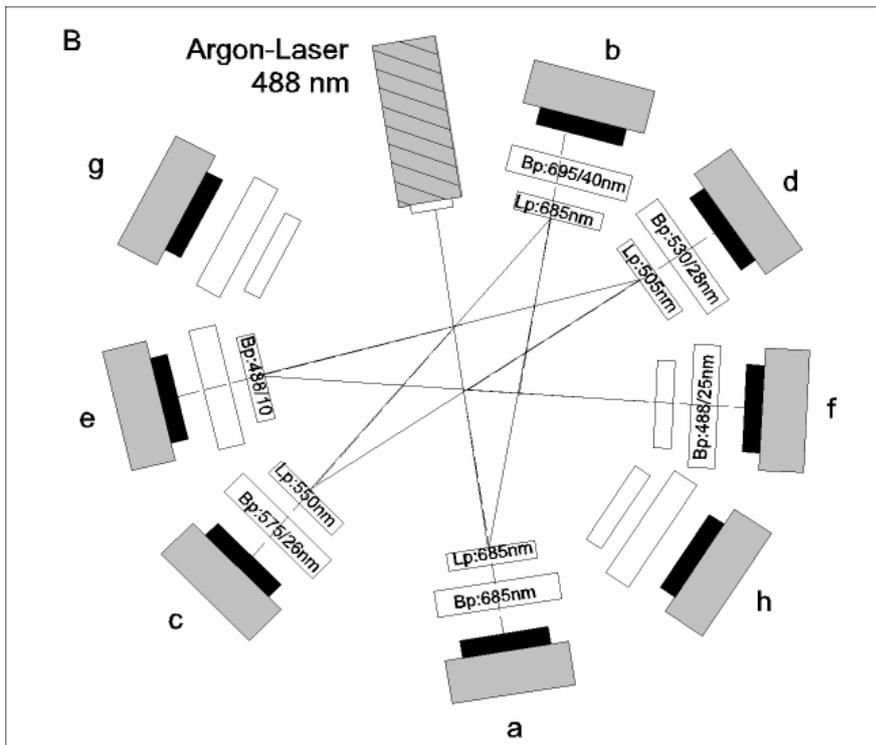


Abb. 2: Strahlengang und Filterkonfiguration des Argon-Lasers am Durchflusszytometer

Die Fluoreszenz wird nach Farbstoff-Emissionswellenlänge durch dichroische Spiegel (**Lp**) aufgetrennt, durch Bandpassfilter (**Bp**) gefiltert und den jeweiligen Detektoren (**a-h**) zugeführt. Folgende an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe kamen zum Einsatz: PerCp: (**b**); PE; DiBAC₃(4): (**c**), FITC: (**d**). Zusätzlich wurden die Lymphozyten anhand ihrer charakteristischen Vorwärts- (FSC: (**f**)) und Seitwärtsstreuung (SSC: (**e**)) detektiert.

3.4.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Für die genauere Analyse des Zeitverlaufs des zellbezogenen $[Ca^{2+}]_i$ -Signalmusters bei Körpertemperatur erfolgten Fluoreszenzmessungen an Einzelzellen, welche zuvor mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM beladen wurden. Dieser Farbstoff wird durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. Die über einhundertfach stärkere maximale Fluoreszenz-Emission liegt bei 520 nm. Eine schematische Übersicht des Versuchsaufbaus zeigt Abb. 3.

Die mit Fluo-4 AM beladenen Zellen hafteten dabei am Boden einer mit Poly-L-Lysin vorbehandelten Kammer. Die Kammer verfügte über einen Zu- und Ablauf, sodass sich die Zellen in einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom befanden, welcher aber auch gestoppt werden konnte. Mit Hilfe eines vorgeschalteten, temperierbaren Verteilers (Inline-Heater) konnte durch Ventile die Zusammensetzung des Flüssigkeitsstroms während der Messung verändert werden. Kammer wie Verteiler wurden jeweils auf

eine Temperatur von 37 °C beheizt (TC-324B), die durch zwei separate Temperatur-Regelkreise konstant gehalten wurde.

Die Fluoreszenz-Messungen erfolgten mit Hilfe des Umkehrphasenkontrastmikroskops Diaphot TMD mit dem Objektiv Fluor 40/1,3 Öl. Als Lichtquelle diente eine 75 W Xenon Lampe. Als Fluoreszenzfilterblock kam der B-2A Blue zum Einsatz mit einem Exzitationsfilter für den Wellenlängenbereich 450-490 nm. Der dichroische Spiegel reflektiert Licht mit Wellenlängen <500 nm. Durch den im Filterblock eingebauten Langpassfilter wurden nur Fluoreszenzsignale mit Wellenlängen >515 nm in den Kamera-Strahlengang weitergegeben. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte über eine analoge Video-Kamera. Nach Helligkeitsverstärkung durch einen Bildverstärker erfolgte eine Digitalisierung des Videofilms über einen Video-to-FireWire-Converter, der mit einem Personalcomputer durch die Software Wasabi 1.5 (Hamamatsu) aufgezeichnet wurde.

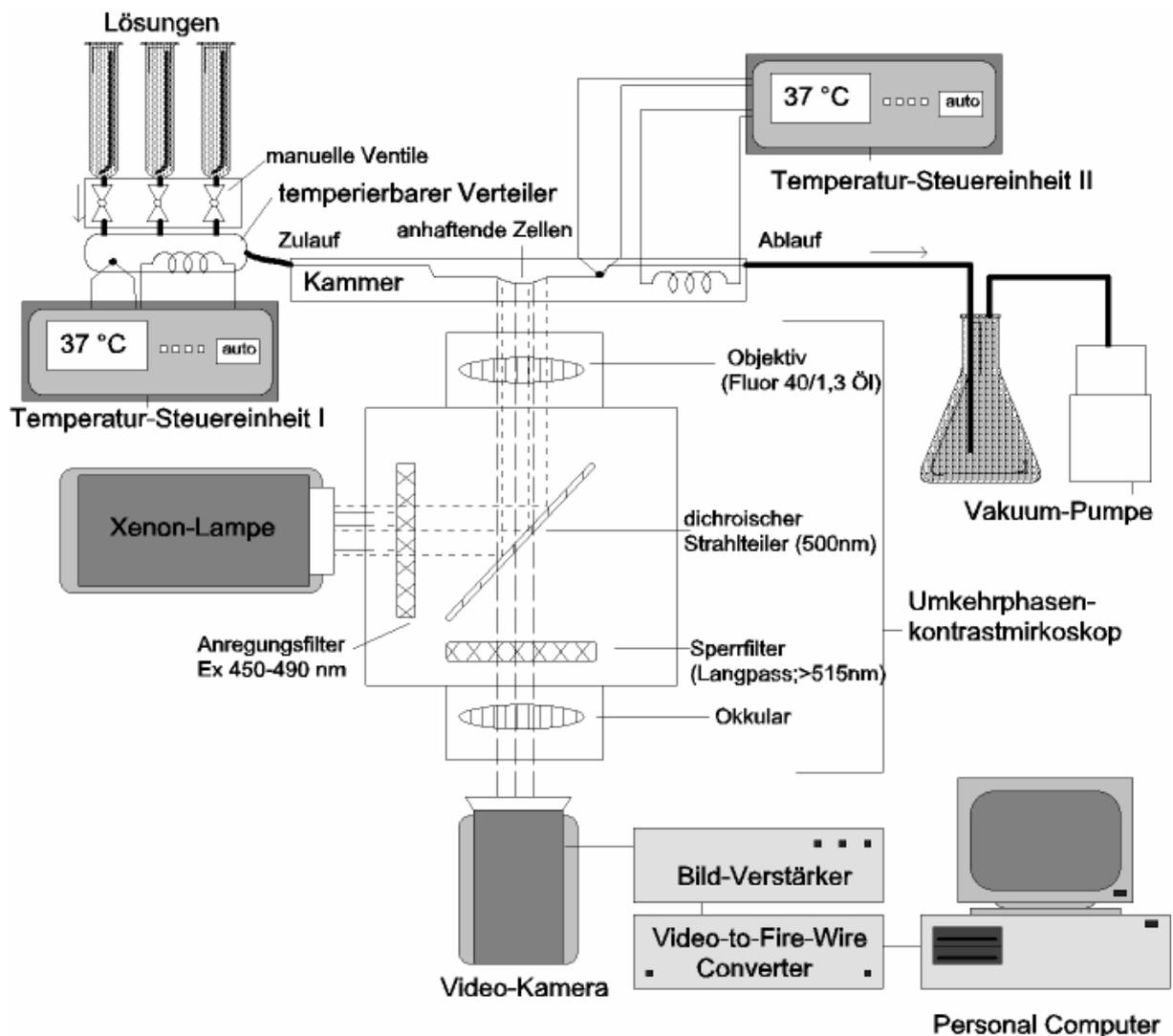


Abb. 3: schematischer Strahlengang und Messplatzaufbau der Fluoreszenz-Mikroskopie

3.5 Versuchsdurchführung

3.5.1 Durchflusszytometrie

Farbstoff-Inkubation

Die zu untersuchenden Zellen wurden gezählt und auf 10^6 Zellen in 50 μl PBS-Puffer eingestellt. Die verwendeten Antikörper wurden in ein Gemisch mit einer Gesamtmenge von 20 μl mit der Zellsuspension gemischt. Darauf folgte eine Inkubationszeit in dunkler Umgebung bei 4 °C für 30 min. Danach sorgte die Zentrifugation (5 min, 200*g) für die Trennung der Zellen vom Färbepuffer. Nach anschließendem Waschen mit PBS-Puffer und erneuter Resuspendierung in 1 ml PBS-Puffer standen die Zellen für die Messung zur Verfügung. Wenn die unmittelbare Messung zeitlich nicht möglich war, wurden die Zellen fixiert. Das gewaschene und gelockerte Zell-Pellet wurde in diesem Fall in 1 ml Fixationspuffer resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation in dunkler Umgebung erfolgte die Abzentrifugation und Resuspendierung in PBS-Puffer mit 2 % BSA und 0,1 % Natriumazid. Nach dunkler und kühler Lagerung konnten die Messungen dann im Zeitraum der nächsten 24 Stunden erfolgen. Zur Messung von Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden die Zellen mit Indo-1-AM in Zellkulturmedium mit einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{mol/l}$ bei 37°C 30 min lang beladen. Die Zellen wurden gewaschen und in HEPES-gepufferter Extrazellulärlösung aufgenommen und zwecks Hydrolyse des AM-Esters 30 min inkubiert. Für die Untersuchungen wurden die Zellen zentrifugiert, in entsprechenden Puffer resuspendiert und vor der Messung 15 min bei 37°C präinkubiert. Zur gleichzeitigen Messung von Membranpotenzialänderungen erfolgte während dieser Inkubation die Beladung mit 200 nmol/l DiBac4(3).

Die Fluoreszenz-Messung

Die Zellsuspensionen wurden über die Proben-Injektionsnadel des Durchflusszytometers der Messung zugeführt. Während der zeitabhängigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - und Membranpotenzialmessung wurde für die Wirkstoff-Applikationen die Messung jeweils kurzzeitig unterbrochen. Daher zeigen die zeitlichen Darstellungen während der Applikation von Substanzen keine Fluoreszenz-Werte.

3.5.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Farbstoff-Inkubation

50 μg Fluo 4-AM wurden in 47,7 μl gefrieretrocknetem DMSO gelöst (entspricht einer Konzentration von 1 mM). Je nach Zelldichte wurden 250-750 μl Zellsuspension vom Medium abzentrifugiert (5 min, 300*g). Anschließend erfolgte eine Resuspendierung in 250 μl Standard-Extrazellulärlösung (Lösung A) und die Zugabe von 0,8 μl 1 mM Fluo-4 AM (gelöst in DMSO). Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden die Zellen mit Lösung A gewaschen und anschließend in 250 μl der Lösung A resuspendiert. Nach einer 15minütigen Inkubation bei 37 °C konnten die Messungen durch-

geführt werden. Die gefärbte 250 µl Zellsuspension ermöglichte vier Messungen. Die so klein gehaltene Verarbeitungszeit gewährleistete eine annähernd konstante zelluläre Farbstoffkonzentration.

Die Fluoreszenz-Messung

Die temperierte Kammer wurde vor der Messung mit 50 µl poly-L-Lysin für 5 min inkubiert, um die Zellanheftung an den Kammerboden zu ermöglichen. Nach Absaugen der poly-L-Lysin-Lösung erfolgte die Applikation von 50 µl Zellsuspension in die Kammer. Ab diesem Zeitpunkt verhinderte eine dunkle Umgebung am Messplatz das Ausbleichen des Farbstoffes. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Kammer mit der ersten, im entsprechenden Versuch verwendeten Extrazellulärlösung gespült. Dies beseitigte lose und nicht fest am Kammerboden haftende Zellen.

Der Lösungswechsel erfolgte während der Messung durch Öffnen und Schließen von Ventilen. So wurden Lösungswechsel beispielsweise von Standard-Extrazellulärlösung auf BzATP-, ATP- oder K^+ -haltige Lösung vorgenommen. Dadurch konnte während der Messung eine konstante Konzentration der Lösungsinhalte gewährleistet werden. Substanzen wie anti-IgM, Gramicidin, Valinomycin und A23187 wurden direkt bei stehender Kammerlösung appliziert. Sie wurden zuvor in entsprechender Konzentration in dem Puffer gelöst, der bereits vor ihrer Applikation die Kammer durchströmte (97 µl Puffer + 3 µl anti-IgM bzw. A23187). Vor Wirkstoffgabe wurde erst der Strömungszulauf, dann die Absaugung gestoppt. Da eine Vertiefung in der Kammer das vollständige Leerpumpen verhinderte, verblieben immer 150 µl Restlösung in der Kammer und über den Zellen. Anschließend wurden 100 µl der zuvor auf 37 °C temperierten Substanz-Lösung direkt via Pipette in die Kammer appliziert und somit auf eine Konzentration von 40% verdünnt. Nach entsprechender Wirkdauer wurde dann die Strömung reaktiviert und der Wirkstoff ausgewaschen. Vor dem Ende jeder Messung erfolgte die Applikation des Ca^{2+} -Ionophors A23187. Die dadurch entstehende maximale $[Ca^{2+}]_i$ -Fluoreszenz F_{max} diente als Bezugspunkt zur Normalisierung der zeitlichen Fluoreszenz jeder Zelle und ermöglichte Vergleiche zwischen verschiedenen Messungen.

3.6 Datenerhebung

3.6.1 Durchflusszytometrie

Die am Durchflusszytometer gewonnenen Daten wurden mit dem Programm WinMDI 2.8 von Joseph Trotter verarbeitet und ausgewertet. Dafür wurden die Fluoreszenz-Werte der zeitabhängigen $[Ca^{2+}]_i$ - und Membranpotenzial-Messungen entsprechend der Zell-Fluss-Geschwindigkeit für 1 s arithmetisch gemittelt. Diese Sekunden-Mittelwerte, die somit immer von unterschiedlichen Zellen erhoben wurden, sind in dieser Arbeit in Fluoreszenz-Zeit-Diagrammen dargestellt. Die Diagramm-Erstellung erfolgte mit dem Programm Sigma Plot (Systat Software Inc). Die Applikation von Substanzen und die verwendeten Lösungen sowie die Dauer ihrer Anwendungen sind über den Diagrammen als beschriftete Balken dargestellt.

3.6.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Der durch die Software Wasabi erzeugte Graustufen-Videofilm wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 1 Bild/s in Einzelbilder exportiert. Die Auswertung der so entstandenen Bildersequenz erfolgte mit der Software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Zunächst wurden Helligkeitsschwankungen, die durch Streustrahlung fluoreszierender Zellen entstehen, mittels Subtraktion der Fluoreszenz des zellfreien Hintergrunds aus den Bildern beseitigt. Danach erfolgte die Auswahl und Markierung der Zellen nach folgenden Kriterien: Die Zellen mussten eine konstante Basal-Fluoreszenz in Standard-Extrazellulärlösung und eine deutliche Reaktion auf das Ionophor A23187 zeigen, um ausgewählt zu werden. In den Messungen des BZR-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signals mussten die Zellen zusätzlich ein anti-IgM-abhängiges Fluoreszenz-Signal zeigen. Apoptotische Zellen mit spontanen Fluoreszenz-Anstiegen gelangten nicht in die Auswertung. Die Software Image J ermittelte für jede ausgewählte Zelle und Einzelbild den Durchschnittshelligkeitswert (0-255). So entstand für jede Zelle ein Datensatz mit Helligkeitswerten in einer zeitlichen Auflösung von 1 Wert pro Sekunde.

Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software Excel 2003 (Microsoft). Dies soll am Beispiel einer Zelle erläutert werden: Der erste Schritt bestand in der Normalisierung der Fluoreszenz-Werte bezüglich der Maximal-Fluoreszenz nach A23187-Applikation. Hierfür wurde jeweils der Fluoreszenz-Mittelwert aus 10 aufeinander folgenden Datenwerten (=10 s) am Anfang (F_0) und am Ende der Messung nach A23187-Applikation (F_{max}) gebildet. Die Normalisierung der Einzel-Fluoreszenzwerte je

Zeit wurde dann nach folgender Formel berechnet:
$$F(t) = \frac{F - F_0}{F_{max} - F_0}$$

Die somit entstandenen, normalisierten und zeitabhängigen Fluoreszenzwerte sind in dieser Arbeit auch als Einzelzell-Beispiele dargestellt. Für die Darstellungen der Mittelwert-Fluoreszenz je Zeit, die ebenfalls in dieser Arbeit zu finden sind, wurden der Mittelwert und die Standardabweichung von n Zellen pro Zeiteinheit berechnet. Die Einzel- bzw. Mittelwert-Fluoreszenzwerte sind in dieser Arbeit in Fluoreszenz/Zeit-Diagrammen dargestellt. Die Diagramm-Erstellung erfolgte mit dem Programm Sigma Plot (Systat Software Inc). Entsprechend der Versuchsdurchführung sind über den Diagrammen die Applikationen bzw. die Lösungswechsel der verschiedenen Substanzen und Extrazellulärlösungen sowie die Dauer ihrer Anwendung durch beschriftete Balken dargestellt.

3.7 Statistische Auswertung

Um die Zellreaktionen statistisch auswerten zu können, wurden in dieser Arbeit vier Größen definiert, die als Maß bestimmter zellulärer Reaktionen verstanden werden können. Diese Größen wurden an jeder Einzelzelle separat bestimmt (Abb. 4).

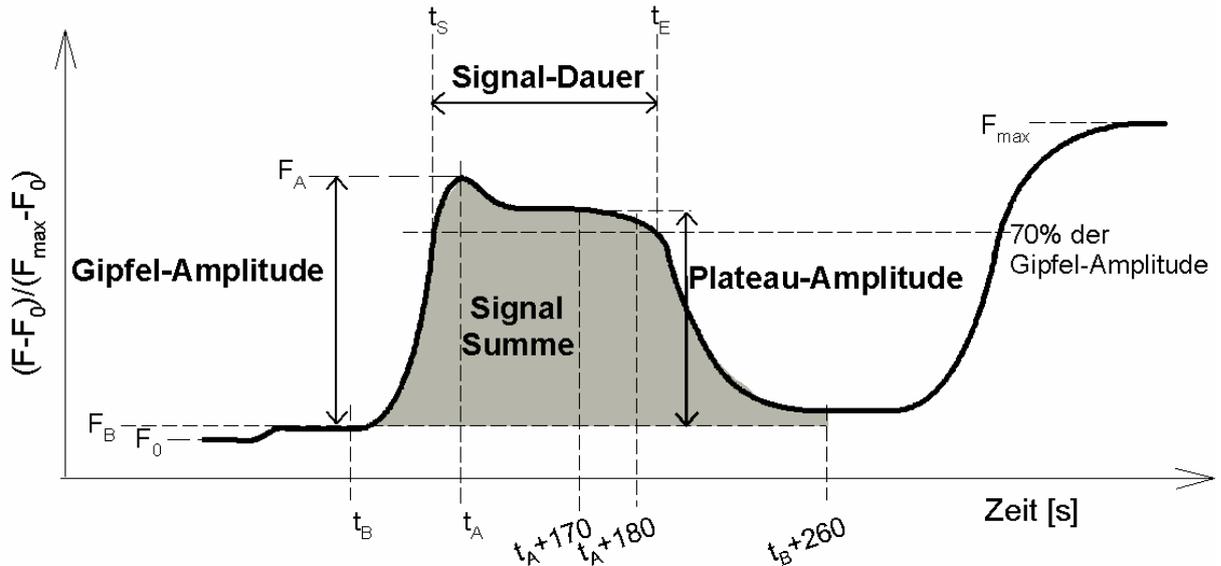


Abb. 4: schematische Darstellung der vermessenen und berechneten Variablen und Größen

Schematische Darstellung der erhobenen Größen **Gipfel-Amplitude**, **Plateau-Amplitude**, **Signal-Dauer** und **Signal-Summe** (graue Fläche). F_0 : Fluoreszenz am Anfang der Messung; F_A : initiale maximale Fluoreszenz nach anti-IgM-Gabe; F_B : Fluoreszenz vor anti-IgM-Gabe; F_{\max} : Fluoreszenz nach Applikation von A23187; t_A : Zeitpunkt des Erreichens der Gipfel-Amplitude; t_B : Zeitpunkt der anti-IgM-Applikation; t_S : Zeitpunkt, bei dem die Fluoreszenz Werte über 70% der Gipfel-Amplitude erreicht; t_E : Zeitpunkt, bei dem die Fluoreszenz auf Werte unter 70% der Gipfel-Amplitude absinkt.

Die erste vermessene Größe ist das initiale transiente Fluoreszenz-Maximum des BZR-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signals. Diese Gipfel-Amplitude wird zum einen durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und zum anderen durch extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom erzeugt (Oh-Hora and Rao 2008). Für die Berechnung wurde die Differenz aus Spitzenwertfluoreszenz (F_A) und Basal-Fluoreszenz (F_B) vor anti-IgM Applikation gebildet (s. Abb. 4):

$$\text{Gipfel - Amplitude} = F_A - F_B$$

Die zweite ermittelte Größe ist die Signal-Dauer. Sie ist als die Zeitspanne definiert, in der die Fluoreszenz kontinuierlich größer als 70% der Gipfel-Amplitude ist. Sie ist somit ein relatives Maß für den Zeitraum, in dem das entsprechende $[Ca^{2+}]_i$ -Signal aufrechterhalten wird (s. Abb. 4).

$$\text{Signal - Dauer} = t_e - t_s$$

Die dritte berechnete Größe ist die durchschnittliche Fluoreszenz drei Minuten nach initialem Fluoreszenzmaximum. Sie charakterisiert die Plateauphase des BZR-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signals und wurde in dieser Arbeit als Plateau-Amplitude bezeichnet. Hierfür wurden die Fluoreszenzwerte von 170 s bis 180 s nach dem Erreichen der Gipfel-Amplitude zum Zeitpunkt t_A gemittelt und davon der zehntausendfache Mittelwert der basalen Fluoreszenz unmittelbar vor anti-IgM Applikation (t_B) subtrahiert. Die Plateau-Amplitude wird vor allem vom extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom beeinflusst (Abb. 4).

$$Plateau - Amplitude = \frac{1}{10} \sum_{170+t_A}^{180+t_A} F(t) - \frac{1}{10} \sum_{t_B-10}^{t_B} F(t)$$

Als vierte Größe wurde die Signal-Summe ermittelt. Sie berechnet sich aus der Summe der normalisierten und anti-IgM abhängigen Fluoreszenz-Zuwächsen in einem Zeitraum von 260 s nach Wirkstoffapplikation (Abb. 4). Die Signal-Summe ist ein relatives, quantitatives Maß für die Menge an kumulativen Ca^{2+}_i in den ersten 260 s Sekunden nach B-Zell-Rezeptor-Stimulation.

$$Signal - Summe = \sum_{t_B}^{260+t_B} \frac{F(t) - F_0}{F_{max} - F_0} - 260 * \frac{1}{10} \sum_{t_B-10}^{t_B} F(t)$$

Alle vier Größen werden nicht nur vom Ausmaß der Ca^{2+} -Freisetzung und des extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms, sondern ebenfalls von der Aktivität $[Ca^{2+}]_i$ -reduzierender Mechanismen beeinflusst. Zu letzteren gehören die an der Plasmamembran lokalisierten Na^+/Ca^{2+} -Austauscher und Ca^{2+} -Pumpen sowie die an der endoplasmatischen Membran lokalisierten Ca^{2+} -Pumpen (Scharenberg *et al.* 2007). Weiterhin nehmen Mitochondrien die Funktion als Ca^{2+} -Puffer wahr und haben möglicherweise noch darüber hinaus Einfluss auf den intrazellulären Ca^{2+} -Kreislauf (Duszynski *et al.* 2006).

Die zuvor definierten Größen wurden für jede Einzelzelle berechnet. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden für die Gesamtheit aller n Zellen ermittelt und entsprechend in dieser Arbeit dargestellt. Die Prüfung des Vorliegens statistisch signifikanter Unterschiede wurde mit dem Programm SigmaStat V. 2,03 (Jandel.Scientific) durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte durch die one-way repeated measures analysis of variance (ANOVA). Danach wurden die einzelnen Mittelwerte auf statistisch signifikante Differenzen durch den multiplen t-Test überprüft. Dabei wurden Unterschiede bei $P < 0,05$ als signifikant angenommen und sind in den Abbildungen mit „*“ markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung humaner tonsillärer B-Lymphozyten

Humane tonsilläre B-Lymphozyten wurden entsprechend Kapitel 3.3.1 isoliert. Ergebnisse zur Überprüfung der Methode am Durchflusszytometer mit dem FITC-markierten CD19-Antikörper und dem APC-markierten CD5-Antikörper stellt Abb. 5 dar. Hier zeigte sich nach T-Lymphozyten-Abtrennung durch Rosettierung eine deutliche Reduktion des T-Lymphozyten-Anteiles auf unter 1%.

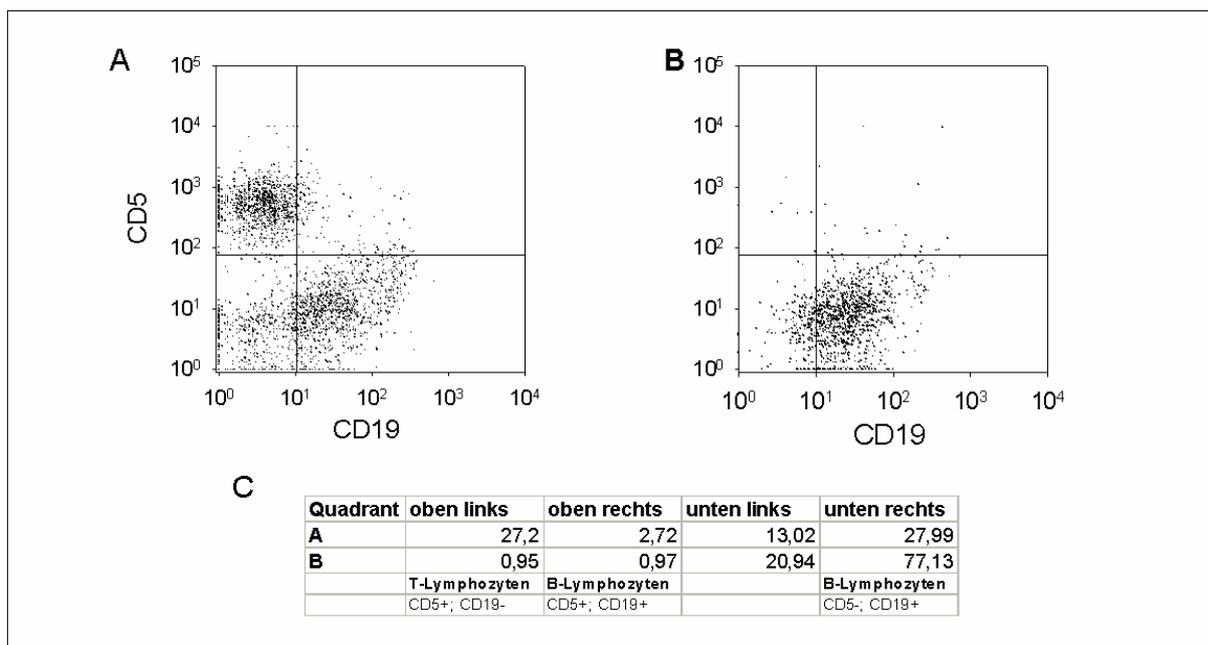


Abb. 5: Isolierung tonsillärer B-Lymphozyten aus der mononukleären Zell-Suspension

Quadranten-Diagramm der am Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenz tonsillärer Leukozyten, die mit einem APC-CD5-Antikörper und einem FITC-CD19-Antikörper markiert wurden. Zellsuspension **A**: vor und **B**: nach Abtrennung der T-Lymphozyten. **C**: prozentuale Verteilung der Zellregistrierungen auf die Quadranten.

Sowohl bei den mononukleären Zellen als auch bei den isolierten B-Lymphozyten konnte mit Hilfe eines PE-markierten anti-P2X₇-Antikörpers eine P2X₇R-Expression nachgewiesen werden (Abb. 6).

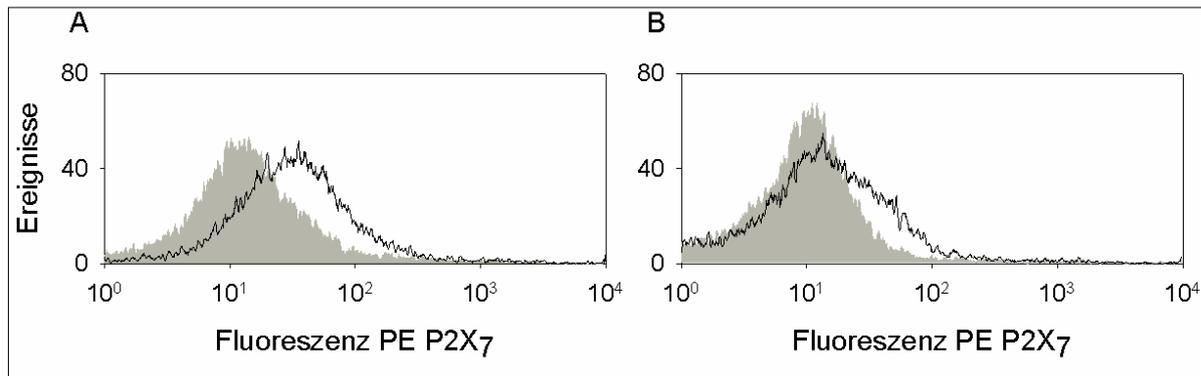


Abb. 6: P2X₇R-Expressionsstärke isolierter mononukleären Zellen und B-Lymphozyten

Histogramm der am Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenz tonsillärer Leukozyten, die mit einem PE-markierten anti-P2X₇-Antikörper (schwarze Linie) markiert wurden (grau: Isotypenkontrolle). **A:** Tonsilläre, mononukleäre Zellen zeigten eine mittelwertige Fluoreszenzwert-Verschiebung von $12,89 \pm 46,40$ auf $31,57 \pm 34,86$. **B:** nach 3.3.1 isolierte B-Lymphozyten zeigten eine mittelwertige Fluoreszenzwert-Verschiebung von $46,36 \pm 540,48$ auf $74,46 \pm 376,50$.

Aufgrund der B-Zell-Isolierung aus Tonsillen und der Verwendung eines anti-IgM-Antikörpers ist davon auszugehen, dass es sich bei den reagierenden Zellen der nachfolgenden Messungen vor allem um Mantel-Zellen (B1-Zellen) handelt. Diese zeigen eine hohe Expression an membrangebundenen IgM und reagieren ausgeprägt auf IgM-Kreuzvernetzung (Dono *et al.* 2003).

4.2 Das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal

Die Aktivierung der BZR-induzierten Signalkaskade führt wie in Kapitel (1.2) beschrieben zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) mit einem charakteristischen Zeitverlauf.

Für die zeitliche Darstellung des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals wurde die Fluoreszenz von Fluo4-AM beladenen B-Zellen nach Zugabe von anti-IgM gemessen. Abb. 7 zeigt beispielhaft den zeitlichen Verlauf an einer Zelle. Nach einer Latenzzeit von 10-60 s konnte nach anti-IgM-Applikation ein schneller und ausgeprägter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg beobachtet werden. Nach dem Erreichen dieser transienten Gipfel-Amplitude schloss sich eine Plateauphase mit etwas kleinerer, konstanter oder langsam abnehmender Fluoreszenz an. Am Ende der Messung erfolgte die Applikation des Ionophors A23187 um eine Maximal-Fluoreszenz zu erhalten, die der Normalisierung und damit der Vergleichbarkeit diente (s. Kapitel 3.7 und Abb. 4).

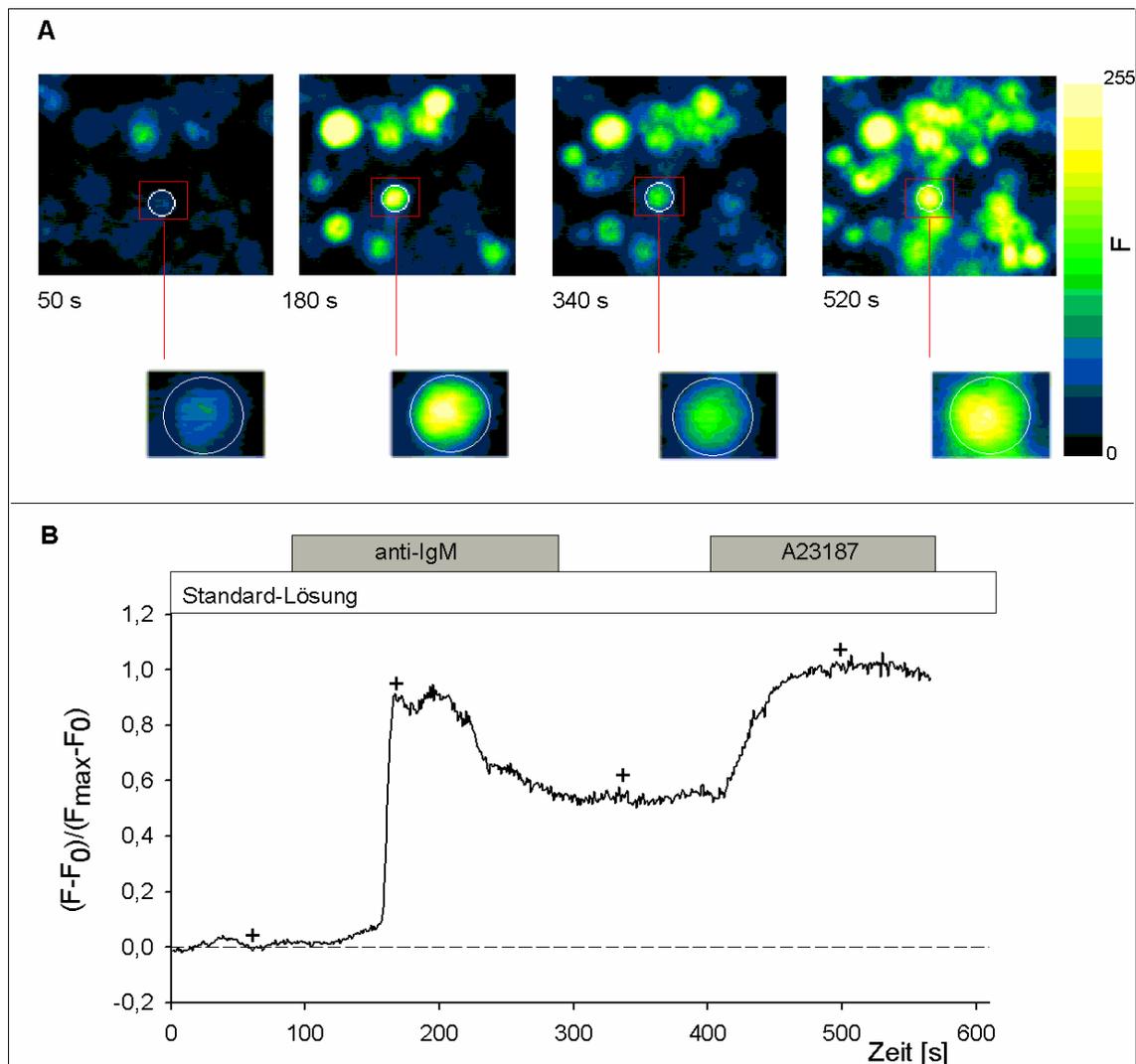


Abb. 7: Beispiel des anti-IgM abhängigen Fluoreszenz-Signals einer Einzelzelle

A: Farbkodierte Fluoreszenz-Bilder einer Messung mit anti-IgM und A23187-Applikation zu unterschiedlichen Zeiten. Das rote Rechteck markiert eine Zelle, welche darunter nochmals vergrößert dargestellt ist. Der weiße Kreis zeigt die genaue Markierung der Einzelzelle für die Fluoreszenz-Wert-Berechnung. Ordinate F entspricht der Skalierung des in Graustufen (0-255) gemessenen Fluoreszenz-Signals in farbkodierter Darstellung. **B:** Zeitabhängigkeit der relativen Fluoreszenz der unter (A) markierten Einzelzelle. +: zeigt die zeitliche Position der unter (A) dargestellten Fluoreszenz-Bilder.

4.3 Einfluss des Membranpotenzials auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal

Um den Einfluss des Membranpotenzials auf das BZR-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal darzustellen, wurden die Zellen während der Fluoreszenz-Messung depolarisiert. Dies erfolgte zum einem durch den Einsatz von K^+ -reicher Extrazellulärlösung (Lösung E, F) und zum anderen durch das Na^+ -Ionophor Grammidin.

Die durch 70 mM K^+ -Lösung induzierte Veränderung des Membranpotenzials konnte am Durchflusszytometer nachgewiesen werden (Abb. 8). Die Depolarisation bewirkte eine Verminderung des anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals. Besonders die $[Ca^{2+}]_i$ -abhängige Fluoreszenz während der Plateauphase wurde durch Zugabe von K^+ verkleinert.

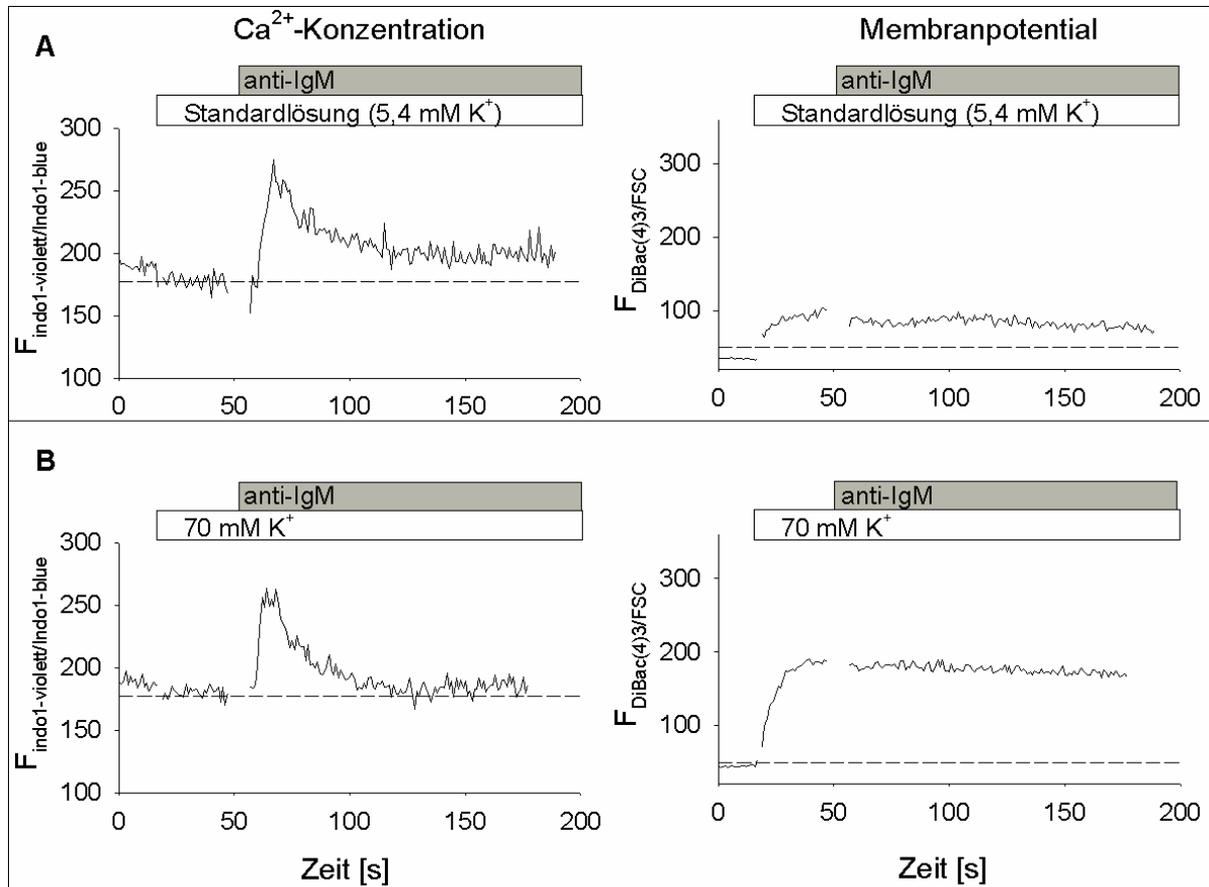


Abb. 8: Einfluss der extrazellulären K^+ -Konzentration auf das Membranpotential und das BZR induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal

Darstellung des am Durchflusszytometer gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals (links) und **Membranpotenzials** (rechts) **A**: nach BZR-Stimulation in Standardlösung (Lösung A) und **B**: in 70 mM K^+ -Lösung (Lösung E). Die Linie gibt den Verlauf des arithmetischen Mittels der Fluoreszenz von etwa 100 Zellen pro s an.

Für die nähere Charakterisierung des Zeitverlaufs potenzialabhängiger $[Ca^{2+}]_i$ -Signal-Veränderungen wurden Fluoreszenz-Einzelzellmessungen durchgeführt. Abb. 9 B und C zeigen den zeitlichen Fluoreszenzverlauf während Depolarisation mittels 70 mM und 140 mM K^+ -Lösung. Entsprechend dem Nernst-Gleichgewicht erzeugen diese Lösungen bei einer angenommenen intrazellulären K^+ -Konzentration von 150 mM Membranpotenziale von -21 mV bzw. -1,2 mV. Den Einfluss des depolarisierenden Na^+ -Ionophors Gramicidin auf das anti-IgM abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal zeigt Abb. 9D.

Bei den Einzelzellmessungen verminderten alle Depolarisationsmanöver sowohl den transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Gipfel als auch das anschließende $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau gegenüber der Kontroll-Messung in Stan-

dardlösung. Abb. 10 stellt diese Veränderung zusammenfassend dar. Es zeigt sich, dass die Depolarisation die Plateauphase noch stärker reduziert als den anfänglichen, transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Gipfel. Dies wird noch deutlicher, wenn die Verminderung der Plateau- und transienten Gipfel-Amplitude entsprechend ihres Leerwertes normalisiert werden (Abb. 11). Die naheliegendste Erklärung hierfür ist, dass die Depolarisation die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran signifikant verkleinert. Die ebenfalls reduzierte Gipfel-Amplitude untermauert die Vorstellung, dass neben der Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern auch der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom durch die Zellmembran einen Beitrag zur Ausbildung des initialen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs leistet. Die ausgeprägte depolarisationsbedingte Verkleinerung der Signal-Summe spricht für eine große Bedeutung des Einstroms von extrazellulärem Ca^{2+} für die BZR-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

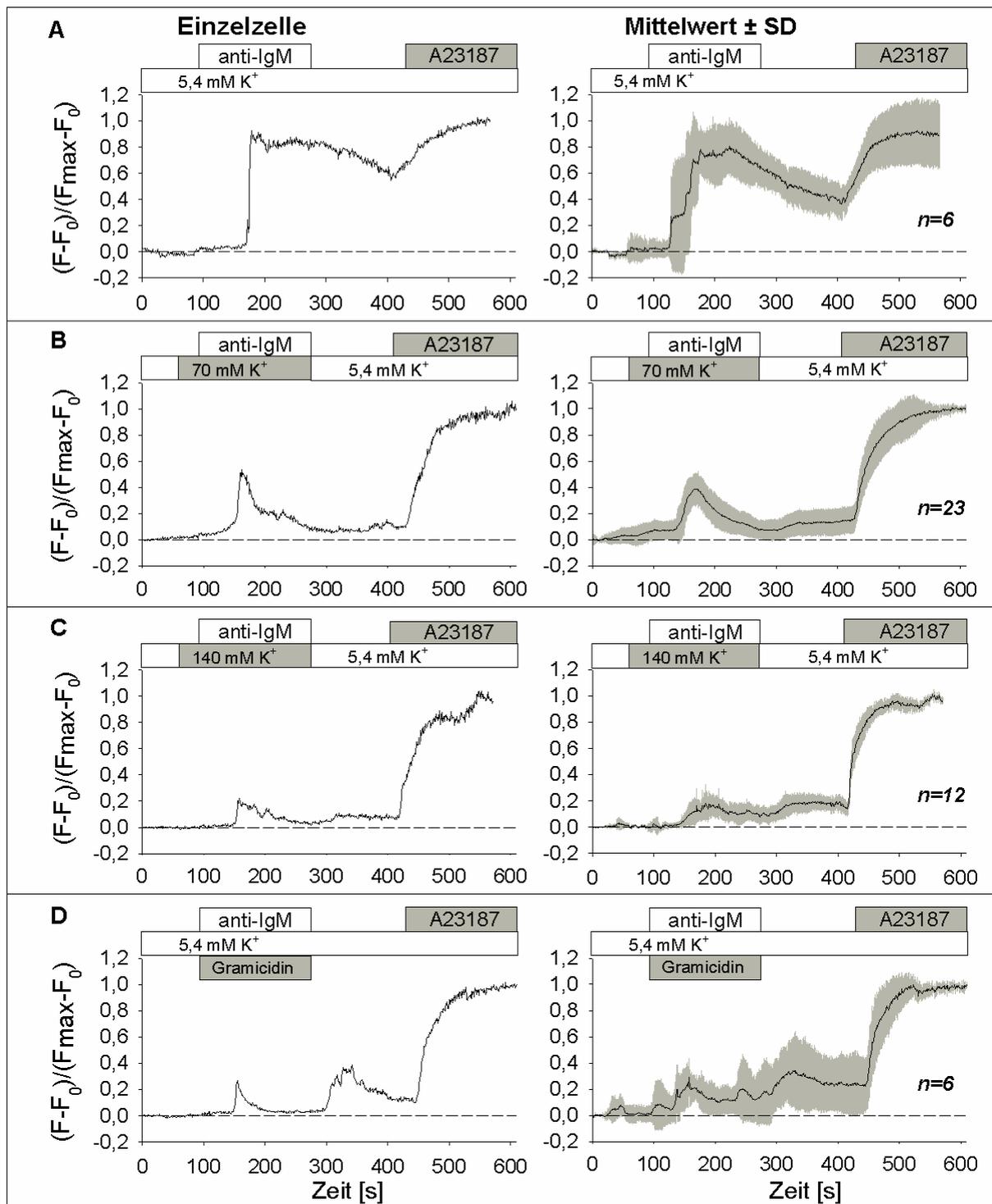


Abb. 9: Einfluss des Membranpotenzials auf $[Ca^{2+}]_i$ nach BZR-Stimulation

Links: Einzelzellmessung, rechts: Mittelwerte. A: Fluoreszenz nach anti-IgM Zugabe in Standard-Extrazellulärlösung (Lösung A). Veränderung der anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Fluoreszenz durch anhaltende Depolarisation mit B: 70 mM K⁺-Lösung (Lösung E), C: 140 mM K⁺-Lösung (Lösung F) und D: 4 μ M Gramicidin. Maximale Fluoreszenz nach Applikation des Ionophors A23187. Anzahl **n** der gemessenen Zellantworten wie angegeben.

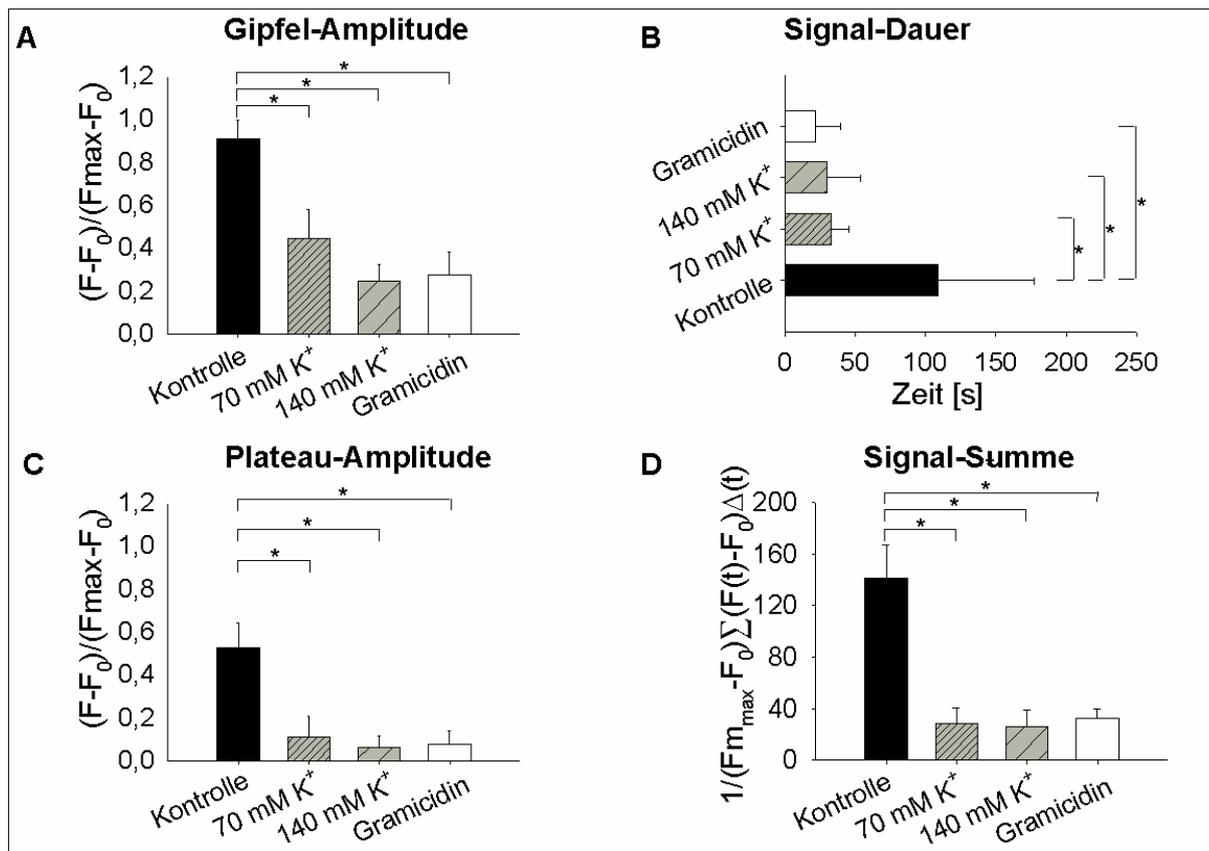


Abb. 10: Statistik der depolarisationsbedingten Veränderung der Größen Signal-Amplitude, Plateau-Amplitude, Signal-Dauer und Signal-Summe des anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals

A: Gipfel-Amplitude, **B:** Signal-Dauer, **C:** Plateau-Amplitude und **D:** Signal-Summe des anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals vor und während anhaltender Depolarisation durch K^+ -reiche Lösungen bzw. Gramicidin. $n=6-23$ Zellen. *: statistisch signifikante Veränderungen.

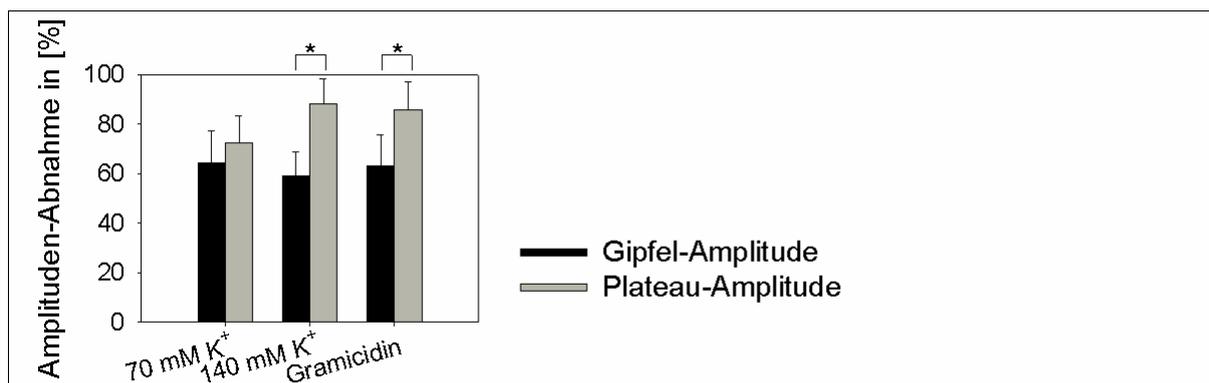


Abb. 11: Statistischer Vergleich der depolarisationsinduzierten Veränderung von Gipfel- und Plateau-Amplitude des anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals

Relative Verkleinerung der **Gipfel-Amplitude** (schwarz) und **Plateau-Amplitude** (grau) bei unterschiedlichen, depolarisierenden Lösungen (siehe Abb. 10). $n=6-23$ Zellen. *: statistisch signifikante Unterschiede.

4.4 Der Einfluss des P2X₇R-Agonisten BzATP auf das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal

Für die Charakterisierung des alleinigen Einflusses des typischen P2X₇R-Agonisten Benzoyl-ATP (BzATP) auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wurden Einzelzellmessungen mit Verwendung unterschiedlicher BzATP-Konzentration durchgeführt. Abb. 12 stellt die gemittelten Fluoreszenzwerte 1 min und 3 min nach BzATP-Applikation und die über die Zeit gemessene Fluoreszenz-Summen dar. Dabei zeigte sich in Ca²⁺-haltiger Extrazellulärlösung ein von der BzATP-Konzentration abhängiger [Ca²⁺]_i-Anstieg. Die Fluoreszenz, gemessen 1 min nach Applikation, steigt erst bei BzATP-Konzentrationen >10 µM an, hingegen konnte ein deutlicher Fluoreszenzanstieg 3 min nach Applikation bereits ab BzATP-Konzentrationen >0,01 µM gemessen werden (Abb. 12A). Bei Verwendung Ca²⁺-freier Extrazellulärlösung wurde kein [Ca²⁺]_i-Anstieg beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass BzATP einen P2X₇R-vermittelten Ca²⁺-Einstrom erzeugt, deren Stärke konzentrationsabhängig ist und bei geringen BzATP-Konzentrationen (≤10 µM) sehr langsam, d.h. innerhalb mehrerer Minuten, erfolgt.

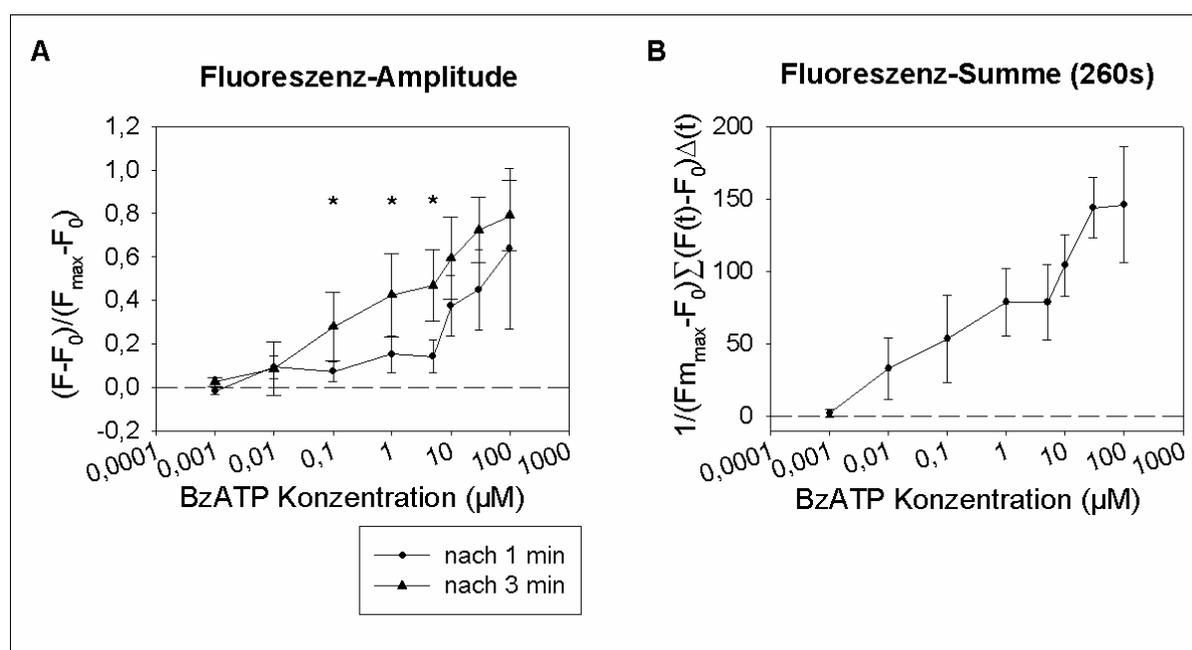


Abb. 12: Einfluss von BzATP auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration

A: durchschnittliche [Ca²⁺]_i-abhängige Fluoreszenz 1 min und 3 min nach BzATP-Applikation. *: statistisch signifikante Fluoreszenz-Unterschiede zwischen den Messzeiten. **B:** Fluoreszenz-Summe (Summe aus den Fluoreszenz-Werten bis 260 s nach BzATP-Applikation, äquivalent zur Signal-Summe des anti-IgM-abhängigen [Ca²⁺]_i-Signals). Anzahl der gemessenen Zellantworten n=10-47.

Um den Einfluss des P2X₇R auf das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal zu untersuchen, wurde vor und während der BZR-Stimulation der P2X₇R-Agonist BzATP appliziert. Abb. 13 zeigt die dabei am Durchflusszytometer gleichzeitig gemessenen Änderungen von Membranpotenzial und [Ca²⁺]_i. Die

Applikation von BzATP 30 s vor der anti-IgM-Applikation führten zu ähnlichen Depolarisationseffekten, wie sie bei Verwendung K^+ -reicher Extrazellulärlösung beobachtet worden sind (vgl. Abb. 8). Dabei unterschieden sich die Effekte, ausgelöst durch 5 μM und 10 μM BzATP, kaum voneinander (Abb. 13B und C). Der Einsatz von 100 μM BzATP erzeugte eine noch höhere Depolarisation, die auch während der anti-IgM-Applikation noch zunahm. Bei der Kostimulation mit 5 μM BzATP war das transiente, anti-IgM-abhängige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal noch deutlich erkennbar. Mit höheren BzATP-Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) wurde es jedoch zunehmend durch den BzATP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom maskiert und war bei 100 μM BzATP nicht mehr erkennbar. Diese Tatsache lenkte die Aufmerksamkeit auf geringere BzATP-Konzentrationen ($< 10 \mu\text{M}$). Daher erfolgten für die genauere Untersuchung der P2X₇R-bedingten Modulation des BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals Einzelzellmessungen mit BzATP-Konzentrationen zwischen 0,01 und 5 μM .

Abb. 14 und Abb. 15 zeigen zeitliche Fluoreszenzverläufe an Einzelzellen während Kostimulation des P2X₇R und des BZR. Bei diesen Messungen zeigte sich, dass BzATP konzentrationsabhängig das anti-IgM-abhängige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal verändert. Mit zunehmender BzATP-Konzentration sank die Gipfel-Amplitude des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals in ähnlicher Form, wie es unter Depolarisationsbedingungen an Einzelzellen gemessen worden ist. So findet man beispielsweise während Kostimulation mit 5 μM BzATP eine ähnliche große Gipfel-Amplitude (Abb. 16A) wie unter Depolarisationsbedingungen, hervorgerufen durch 140 mM K^+ -Lösung (Abb. 10A). Dies spricht dafür, dass der P2X₇R als Kationkanal durch die Erzeugung eines depolarisierenden Na^+ -Einwärtsstroms in der Lage ist, die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Einstrom zu reduzieren. Im Vergleich zu den Effekten in 140 mM K^+ -Lösung (Abb. 10D) zeigte die Kostimulation mit 5 μM BzATP (Abb. 16D) eine größere Signal-Summe und damit im zeitlichen Durchschnitt eine höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen. Der Unterschied entsteht durch eine BzATP-induzierte Verminderung der Plateau-Amplitude (Abb. 16C). Diese erreichte ihr Minimum bei 1 μM BzATP, sank jedoch bei Verwendung von 5 μM BzATP nicht weiter. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass mit zunehmender BzATP-Konzentration der Ca^{2+} -Einstrom über den P2X₇R zunahm, wie es auch bei alleiniger BzATP-Applikation ($\geq 1 \mu\text{M}$) nach 3 min gemessen wurde (s. Abb. 12). Das bedeutet, dass die P2X₇R-abhängige Verringerung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Plateaus mit steigender BzATP-Konzentration zunehmend durch den erhöhten direkten P2X₇R-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom kompensiert wird. Der geringe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg eine Minute nach alleiniger BzATP-Applikation bei Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ (Abb. 12A) lässt schlussfolgern, dass P2X₇R abhängige Ca^{2+} -Einströme im zeitlichen Bereich der Signal-Amplitude des anti-IgM-abhängigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal nicht ins Gewicht fielen, weil BzATP- und anti-IgM-Applikation innerhalb einer Minute erfolgten. Dadurch erreichte vermutlich die Gipfel-Amplitude des anti-IgM-abhängigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals bei 1 μM BzATP nicht ihr Minimum, sondern sank im Gegensatz zur Plateau-Amplitude auch bei Verwendung von 5 μM BzATP weiter.

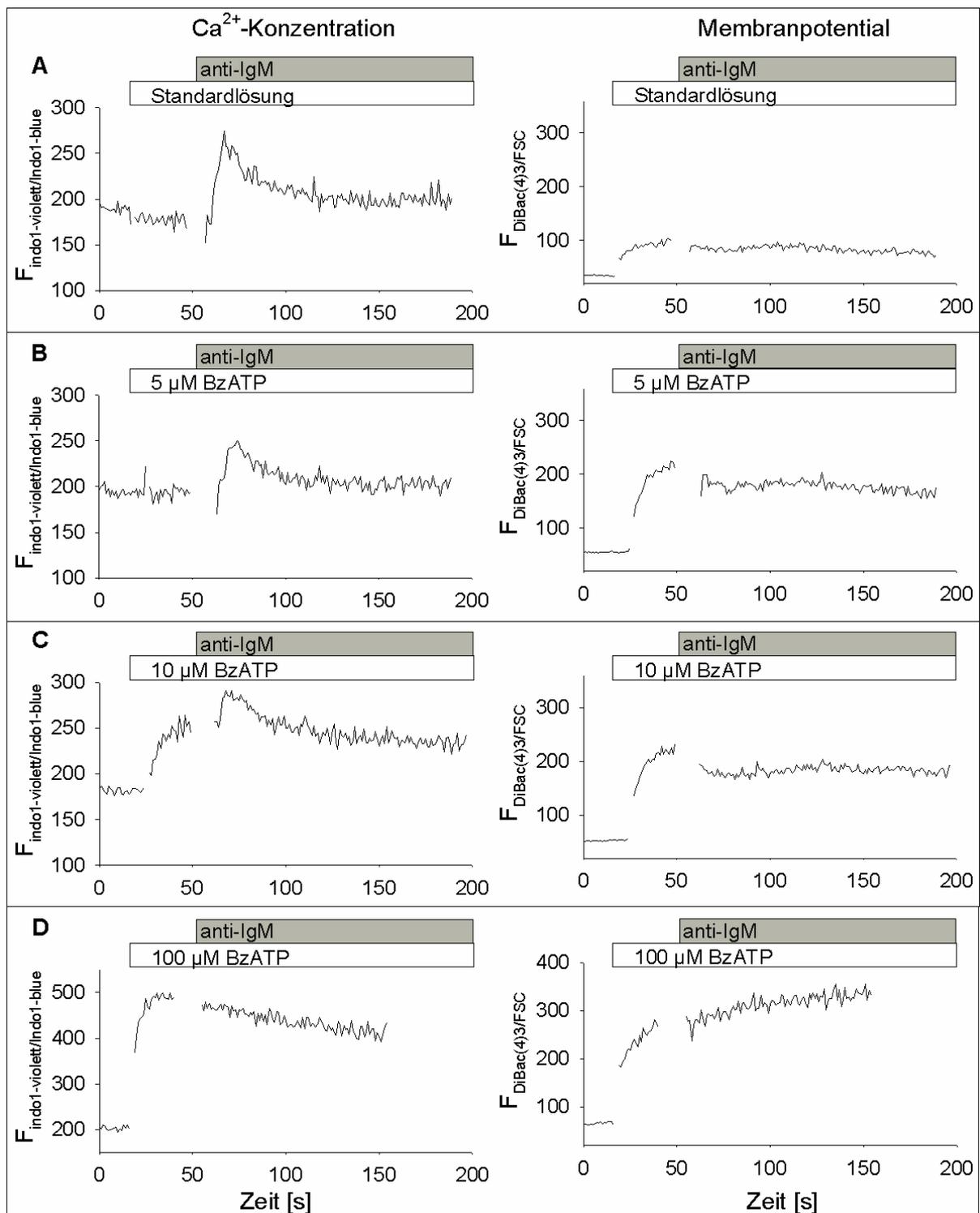


Abb. 13: Einfluss von BzATP auf Membranpotential und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration während BZR-Aktivierung

Darstellung des am Durchflusszytometer gemessenen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals (links) und Membranpotentials (rechts). **A**: anti-IgM-Signal ohne $\text{P2X}_7\text{R}$ -Stimulation. **B-D**: Zusätzliche Applikation von **B**: 5 μM BzATP (Lösung BzD), **C**: 10 μM BzATP (Lösung BzC) und **D**: 100 μM BzATP (Lösung BzA). Dargestellt ist der Verlauf des arithmetischen Mittels der Fluoreszenz von etwa 100 Zellen pro s.

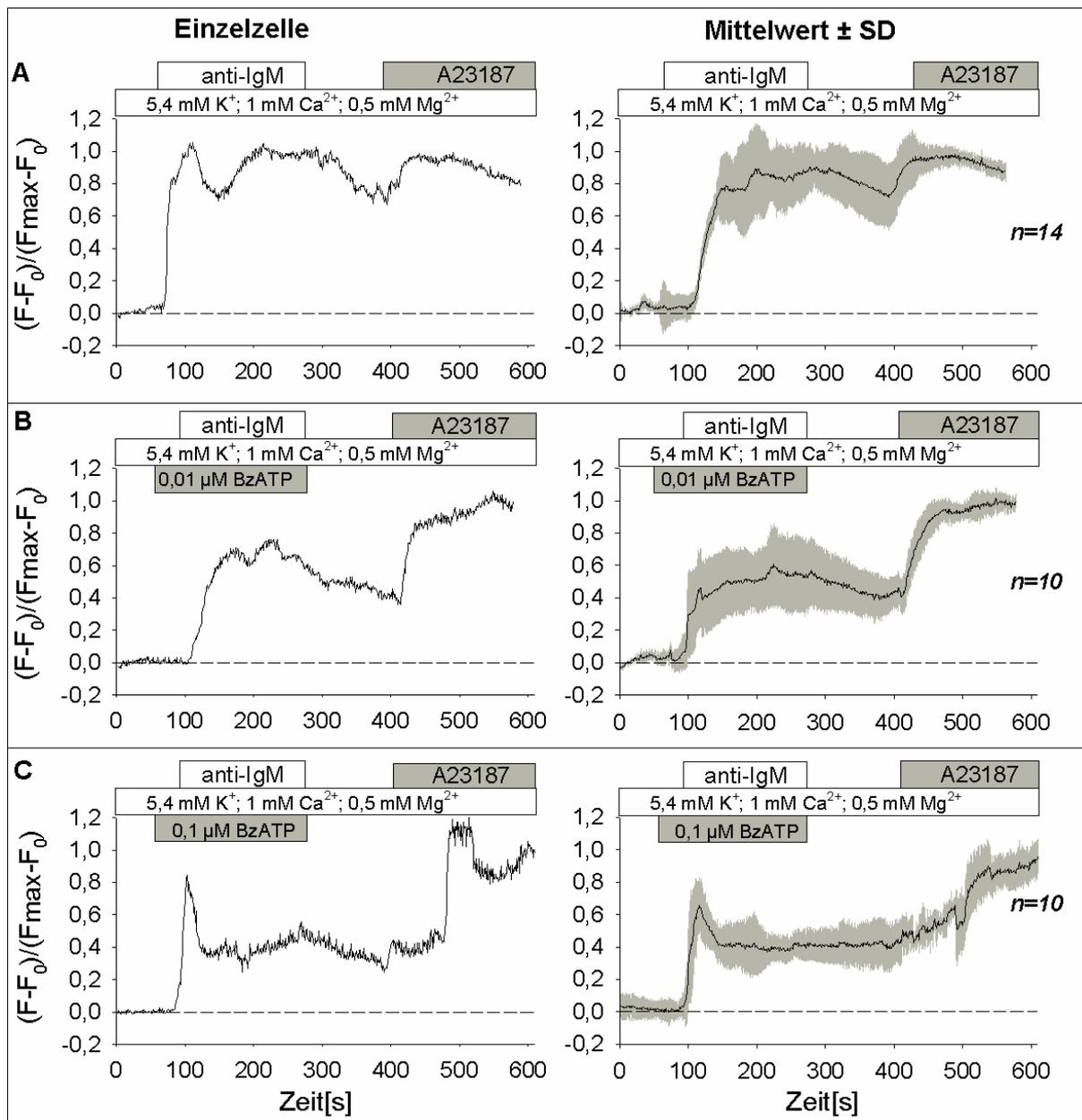


Abb. 14: Einfluss von BzATP ($<1\mu\text{M}</math>) auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach BZR-Stimulation auf Einzelzellniveau$

Links: Einzelzellmessung, rechts: Mittelwerte. **A**: Fluoreszenz nach anti-IgM-Applikation in Standardlösung (Lösung A). **B-C**: Veränderung der anti-IgM-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Fluoreszenz durch **B**: $0,01\ \mu\text{M}$ BzATP (Lösung BzG) und **C**: $0,1\ \mu\text{M}$ BzATP (Lösung BzF). Die Applikation des Ionophors A23187 erzeugt maximale Fluoreszenz. **n**: =Anzahl der gemessenen Zellen.

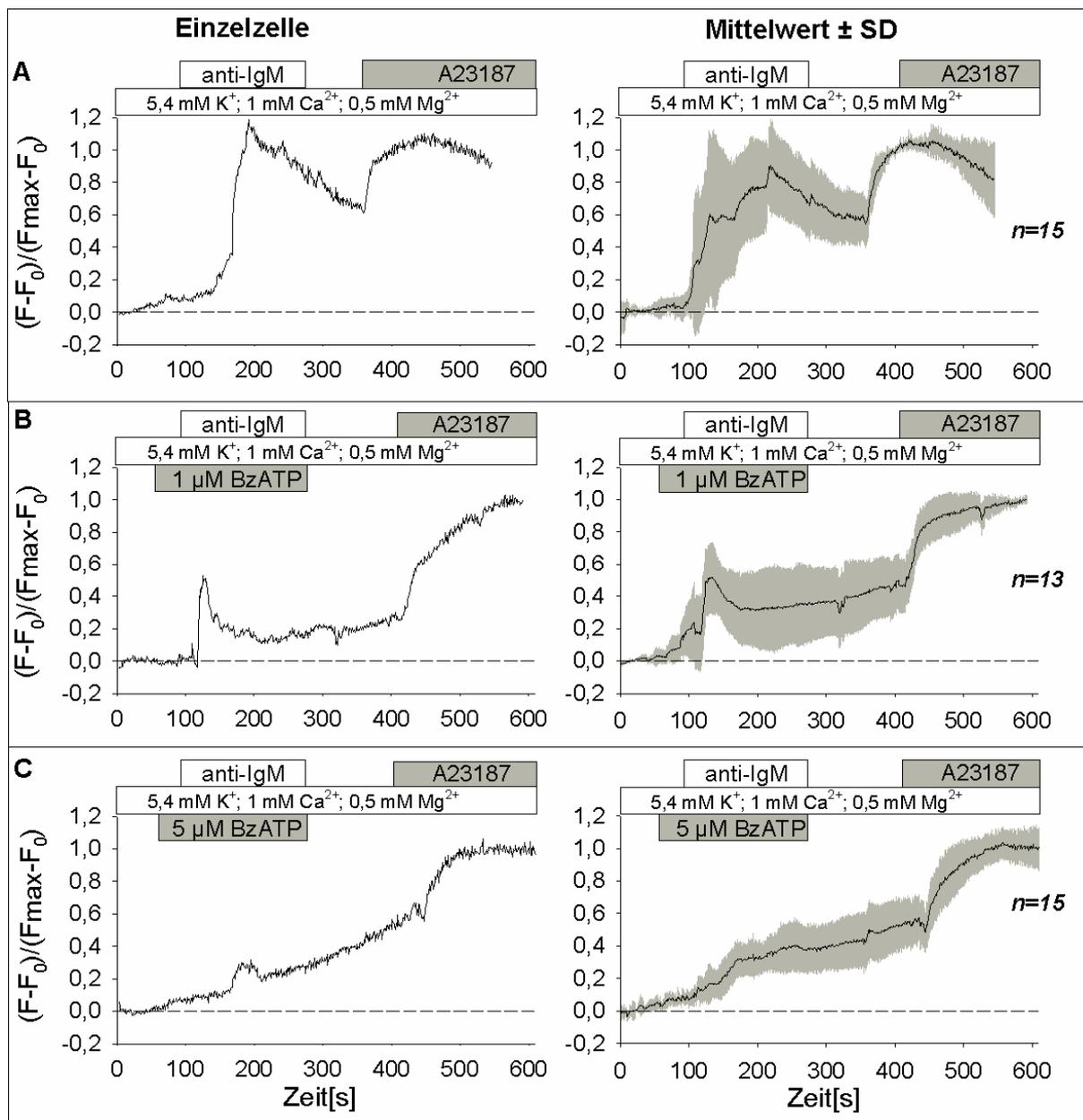


Abb. 15: Einfluss von BzATP ($\geq 1\mu\text{M}$) auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach BZR-Stimulation auf Einzelzellniveau

Links: Einzelzellmessung, rechts: Mittelwerte. **A:** Fluoreszenz nach anti-IgM-Applikation in Standardlösung (Lösung A). **B-C:** Veränderung der anti-IgM-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Fluoreszenz durch **B:** $1\mu\text{M}$ BzATP (Lösung BzE) und **C:** $5\mu\text{M}$ BzATP (Lösung BzD). Weitere Erläuterungen siehe Abb. 14.

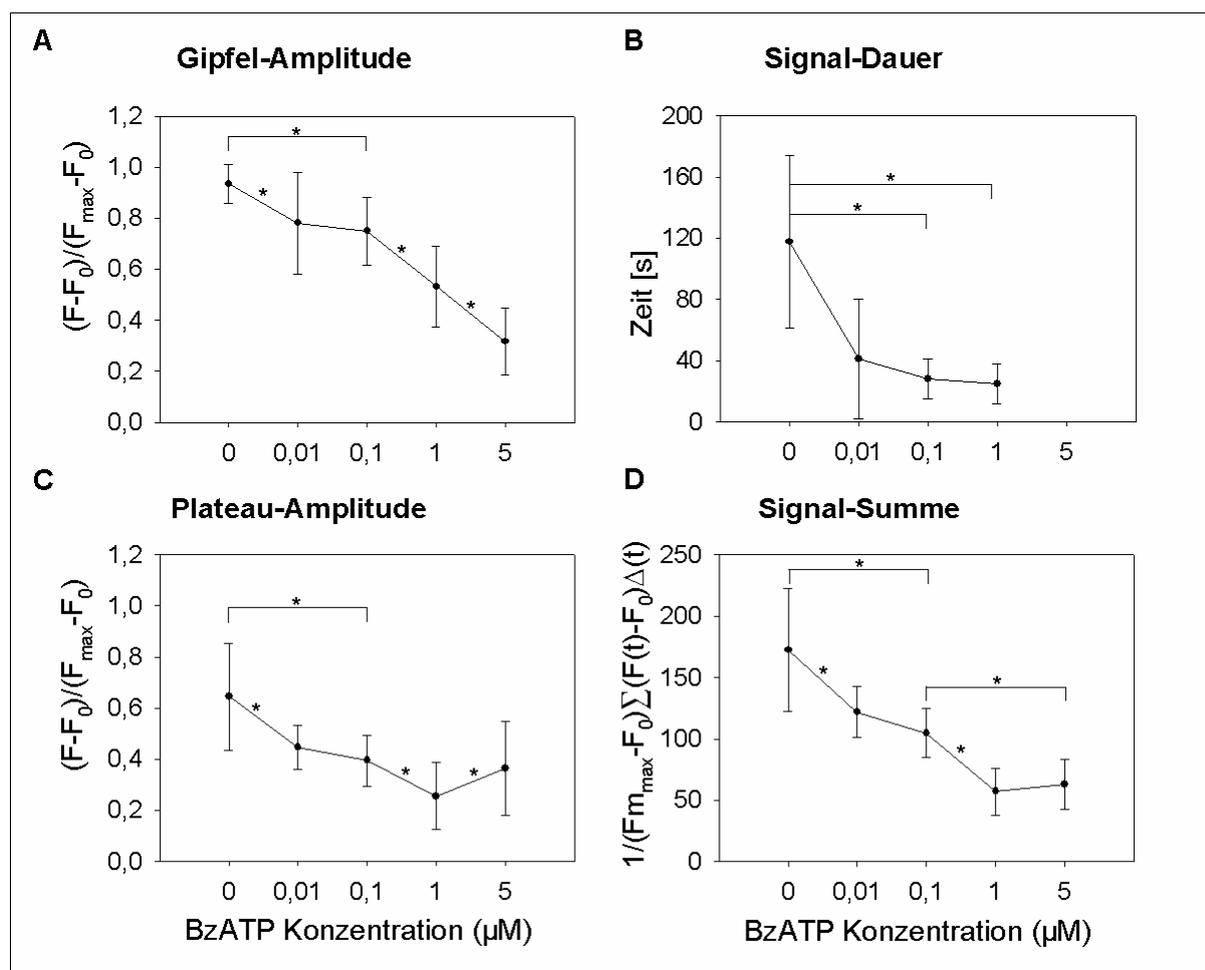


Abb. 16: Konzentrationsabhängigkeit der BzATP-bedingten Veränderung des anti-IgM-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals

Abhängigkeit der **A**: Gipfel-Amplitude, **B**: Signal-Dauer, **C**: Plateau-Amplitude und **D**: Signal-Summe des anti-IgM-abhängigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals von der BzATP-Konzentration. Bei $5 \mu\text{M}$ BzATP ist die Signal-Dauer nicht eindeutig bestimmbar, bedingt durch die kleine Gipfel-Amplitude und den BzATP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom. Anzahl der gemessenen Zellantworten $n=10-27$. *: statistisch signifikante Veränderungen.

Um P2X₇R-abhängige Effekte auf den transmembranären Ca^{2+} -Einstrom von denen, die möglicherweise auf die BZR-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung wirken, abzugrenzen, wurden Messungen der BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen in Ca^{2+} -freier Extrazellulärlösung mit und ohne $1 \mu\text{M}$ BzATP durchgeführt (Abb. 17). Der Zeitverlauf des BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals in Ca^{2+} -freier Extrazellulärlösung ähnelt den unter Depolarisationsbedingungen gemessenen Verläufen, da in all diesen Fällen der transmembrane Ca^{2+} -Einstrom stark reduziert ist oder fehlt.

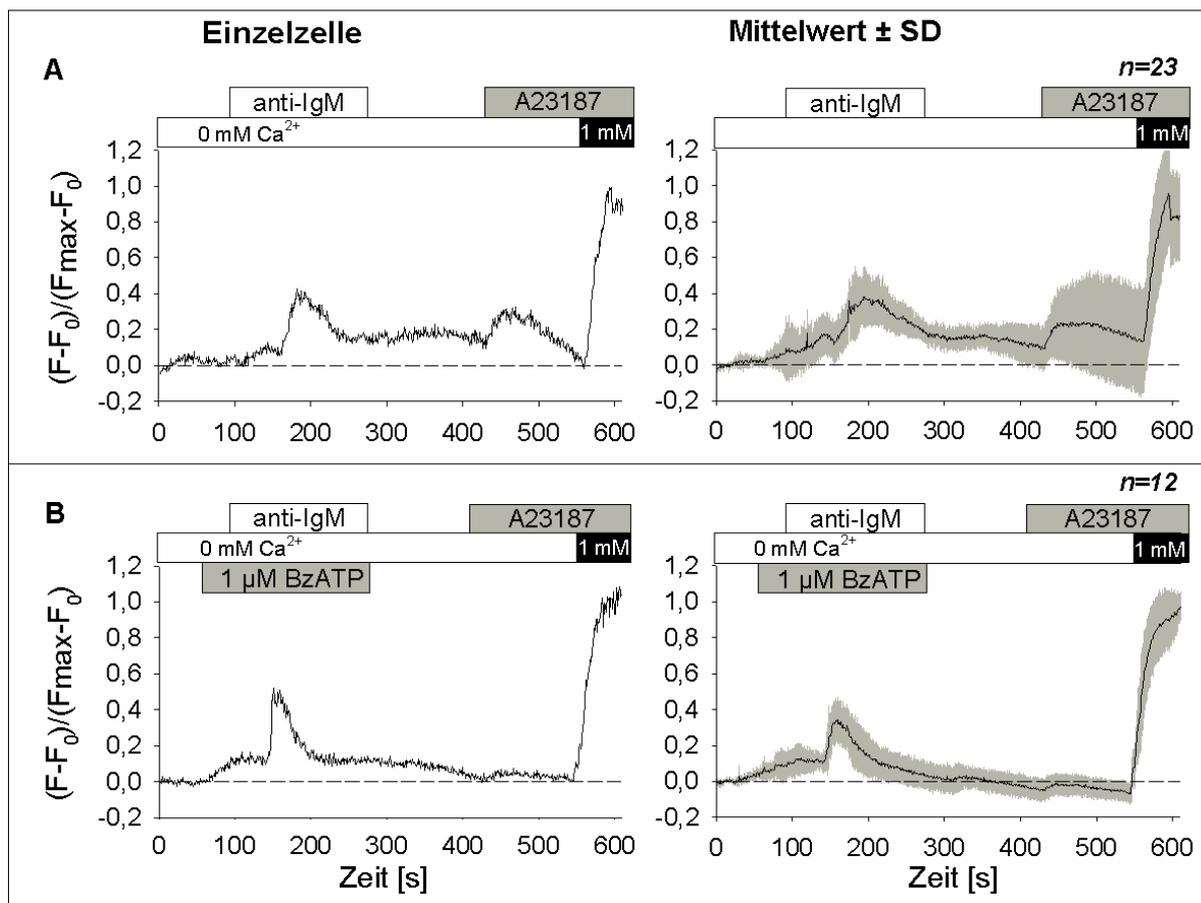


Abb. 17: Einfluss von BzATP auf das anti-IgM-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal in Ca^{2+} -freier Extrazellulärlösung

Links: Einzelzellmessung, rechts: Mittelwerte. Fluoreszenz-Signale in Standard-Extrazellulärlösung ohne Ca^{2+} (Lösung B) **A**: nach alleiniger anti-IgM Gabe und **B**: in Kombination mit $1 \mu M$ BzATP (Lösung BzL). Lösungswechsel auf $1 mM$ Ca^{2+} -Extrazellulärlösung ist mit schwarzen Balken markiert. Die Applikation des Ionophors A23187 erzeugt maximale Fluoreszenz. Anzahl **n** der Zellantworten wie angegeben.

Die zusätzliche Applikation von BzATP erzeugte in Ca^{2+} -freier Extrazellulärlösung keine signifikanten Effekte auf die Gipfel-Amplitude des BZR-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signals (Abb. 18 A). Die Plateau-Amplitude wurde tendenziell durch BzATP verringert, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen (Abb. 18 C). Die Signal-Dauer und die Signal-Summe wurden durch BzATP signifikant verkleinert (Abb. 18 B und D).

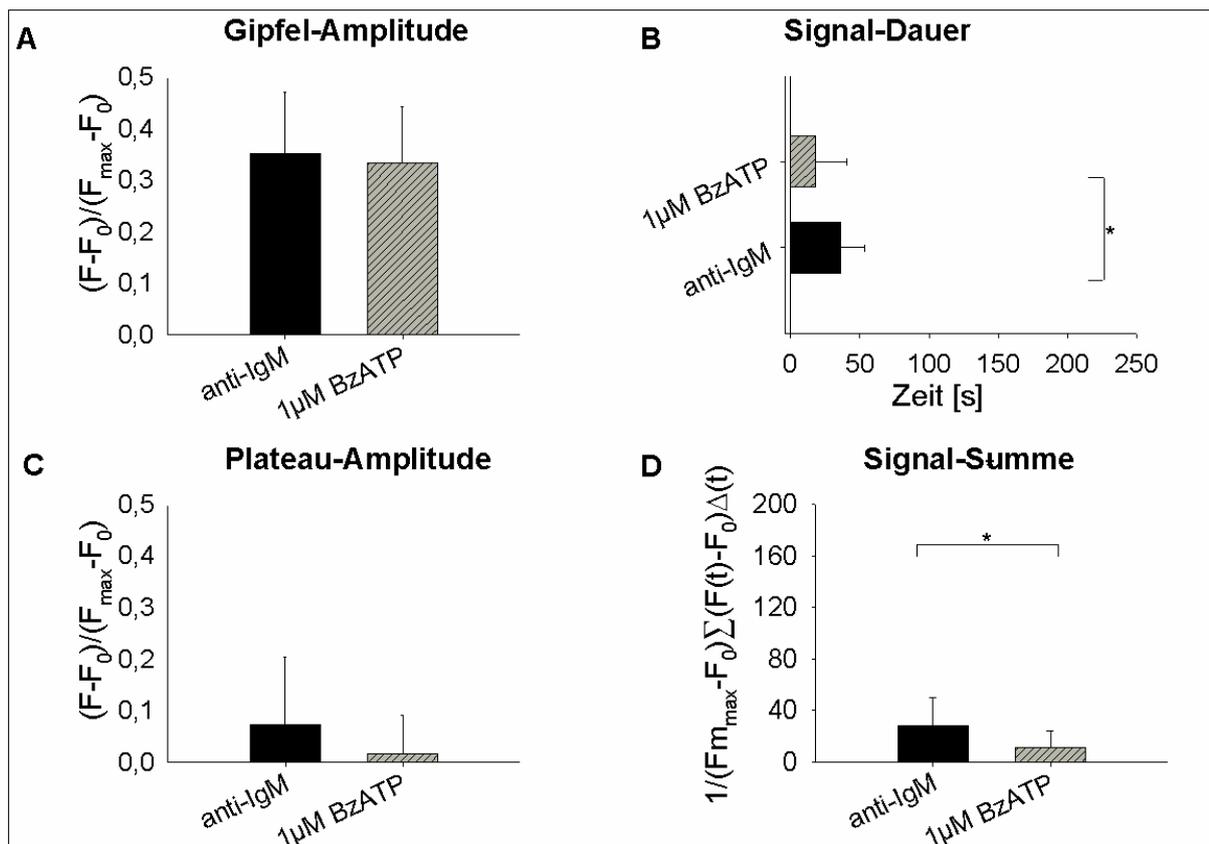


Abb. 18: Statistischer Vergleich des Einflusses der P2X₇R-Stimulation auf das anti-IgM-abhängige [Ca²⁺]_i-Signal in Ca²⁺-freier Lösung

A: Gipfel-Amplitude **B:** Signal-Dauer, **C:** Plateau-Amplitude und **D:** Signal-Summe des anti-IgM-abhängigen [Ca²⁺]_i-Signals in Ca²⁺-freier Lösung. Schwarze Säule: Stimulation durch anti-IgM, schraffierte Säule: Stimulation durch anti-IgM und BzATP. Anzahl der gemessenen Zell-Antworten **n**: =12-23. *: signifikante Veränderungen.

Um die These zu festigen, dass die P2X₇R-abhängige Verminderung des [Ca²⁺]_i-Signals aufgrund der Zellmembran-Depolarisation erfolgt, wurde in Einzelmessungen versucht, den P2X₇R-abhängigen Depolarisationseffekt durch das Ionophor Valinomycin aufzuheben, das durch den Einbau von K⁺-selektiven Poren einen hyperpolarisierenden Effekt auf das Membranpotenzial entfaltet. Den zeitlichen Fluoreszenzverlauf stellt Abb. 19 C dar. Dabei wurde eine Abschwächung der P2X₇R-abhängigen Effekte auf das anti-IgM-abhängige [Ca²⁺]_i-Signal beobachtet (Abb. 20).

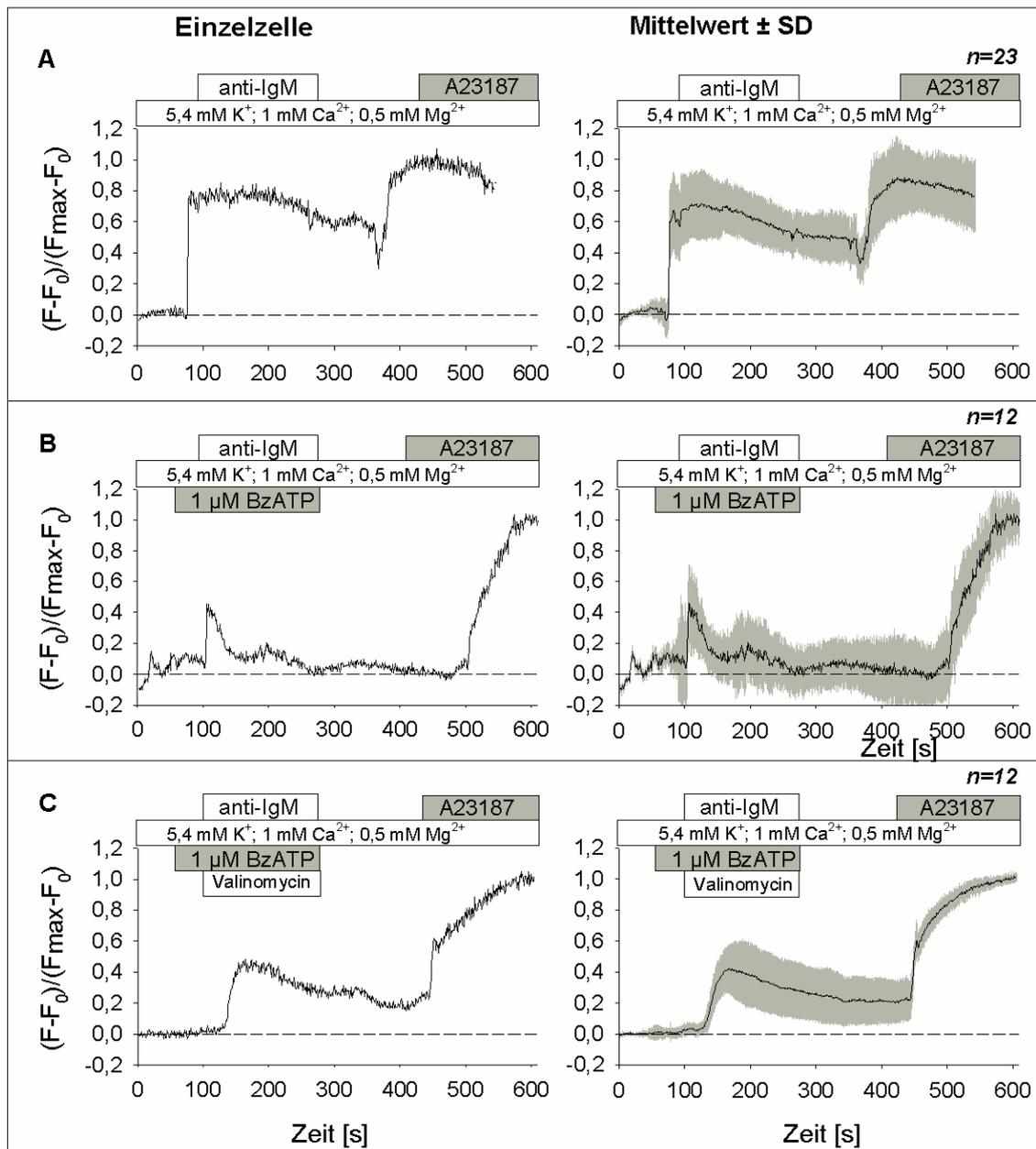


Abb. 19: Wirkung von BzATP in Kombination mit dem Ionophor Valinomycin auf das anti-IgM-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal

Links: Einzelzellmessung, rechts: Mittelwerte. Anti-IgM-abhängiges $[Ca^{2+}]_i$ -Signal in **A**: Standardlösung, **B**: bei vorheriger BzATP-Applikation (Lösung BzE), sowie **C**: bei vorheriger BzATP Applikation und gleichzeitiger Gabe von Valinomycin. Die Applikation des Ionophors A23187 erzeugte maximale Fluoreszenz. Anzahl der gemessenen Zellantworten n wie angegeben.

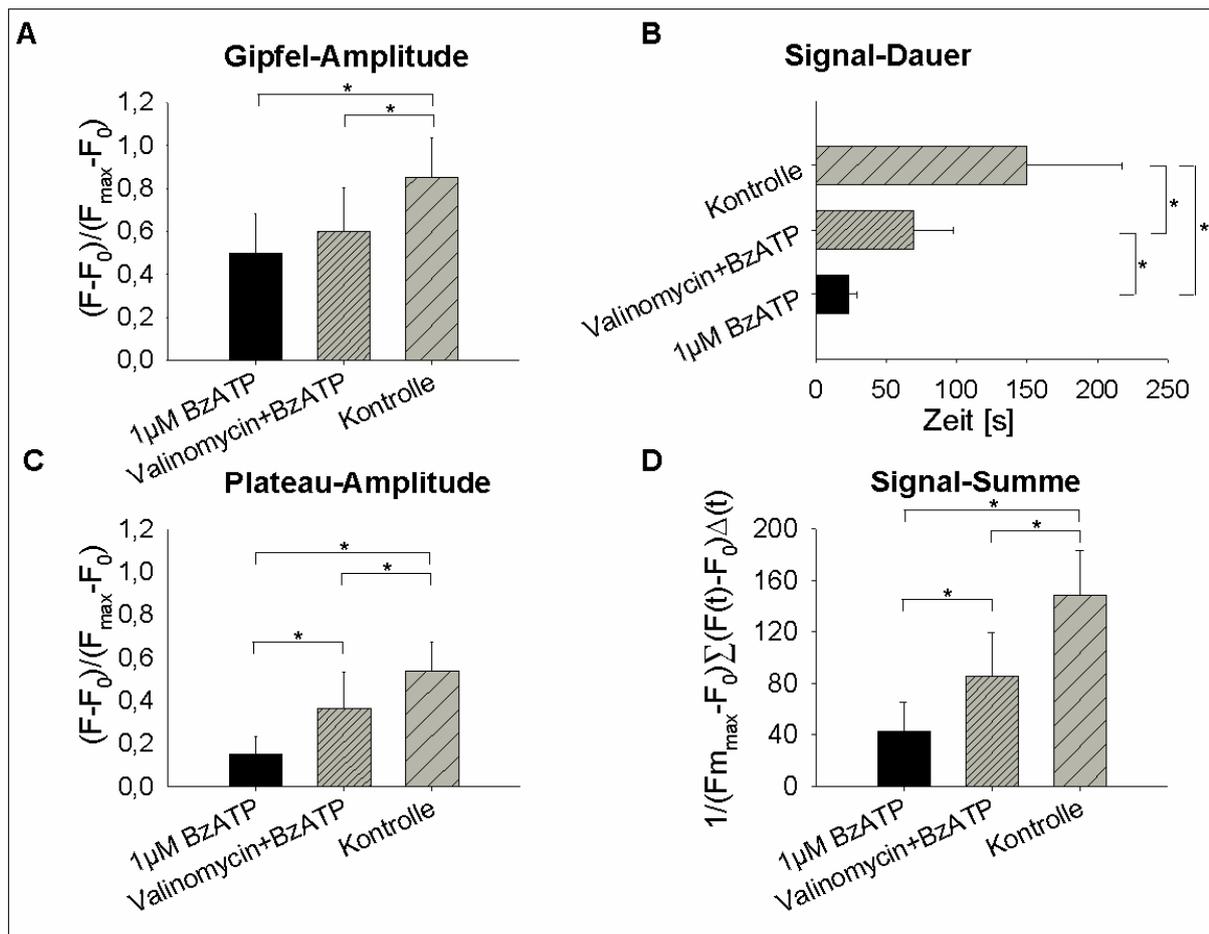


Abb. 20: Statistischer Vergleich des Einflusses von BzATP und Valinomycin auf das IgM-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal

Dargestellt wurden **A**: Gipfel-Amplitude, **B**: Signal-Dauer, **C**: Plateau-Amplitude und **D**: Signal-Summe des anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals. Anzahl der gemessenen Zellantworten: $n = 12-23$. *: statistisch signifikante Veränderungen.

Anschließend wurde versucht, den P2X₇R-bedingten Effekt auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal durch Erhöhung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration aufzuheben. Mg^{2+} ist ein effektiver Hemmer von P2X₇R-vermittelten Ionenströmen (Seyffert *et al.* 2004). Dabei kamen 2,5 mM und 5,5 mM Mg^{2+} -Lösungen zum Einsatz. 2,5 bzw. 5,5 mM Mg^{2+} reduzieren die freie BzATP⁴⁻-Konzentration der ursprünglichen 1 μ M BzATP-Lösung auf 0,35 bzw. 0,18 μ M (Berechnung siehe Kap. 3.1.3). Abb. 21 zeigt die gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ -Verläufe.

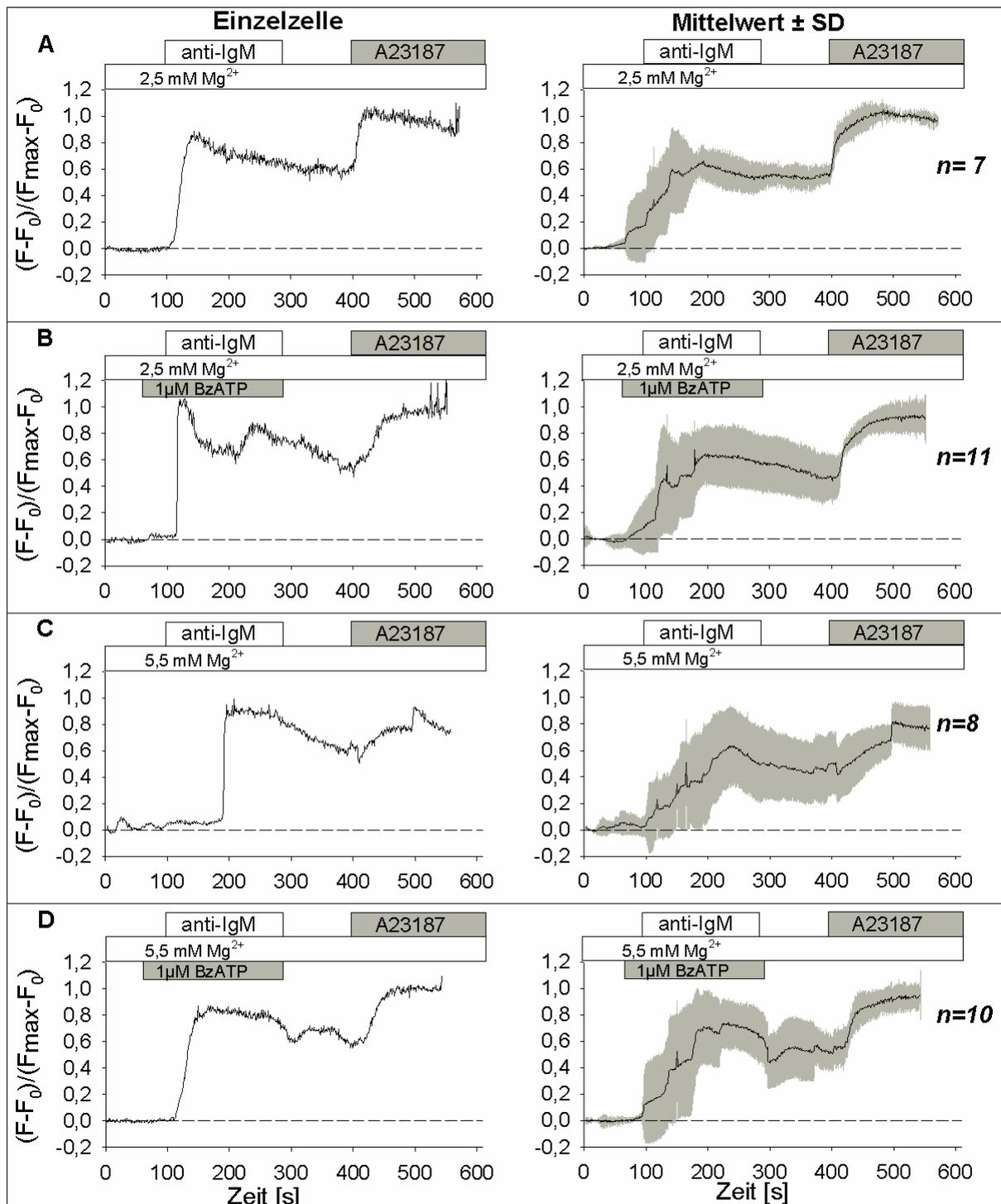


Abb. 21: Einfluss der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration auf das durch BzATP modulierte BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal

Rechts: Einzelzellmessung, links: Mittelwerte. Anti-IgM-abhängiges Fluoreszenz-Signal in Extrazellulärlösung mit A: 2,5 mM Mg^{2+} (Lösung C) und C: 5,5 mM Mg^{2+} (Lösung D), sowie B/D: mit vorheriger BzATP-Gabe. Maximale Fluoreszenz nach Applikation des Ionophors A23187. Anzahl der gemessenen Zellantworten n wie angegeben.

Beim Einsatz von 2,5 mM und 5,5 mM Mg^{2+} -Lösungen traten keine $P2X_7R$ -abhängige Effekte auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal auf (Abb. 21). Dies spiegelt auch die statistische Auswertung (Abb. 22) wider. Verglichen mit den Effekten von 0,1 bzw. 1 μM BzATP in Standard-Extrazellulärlösung (Abb. 16) zeigt sich eine stärkere Mg^{2+} -vermittelte Hemmung des $P2X_7R$, als man bei den berechneten, freien Konzentrationen an BzATP erwarten würde.

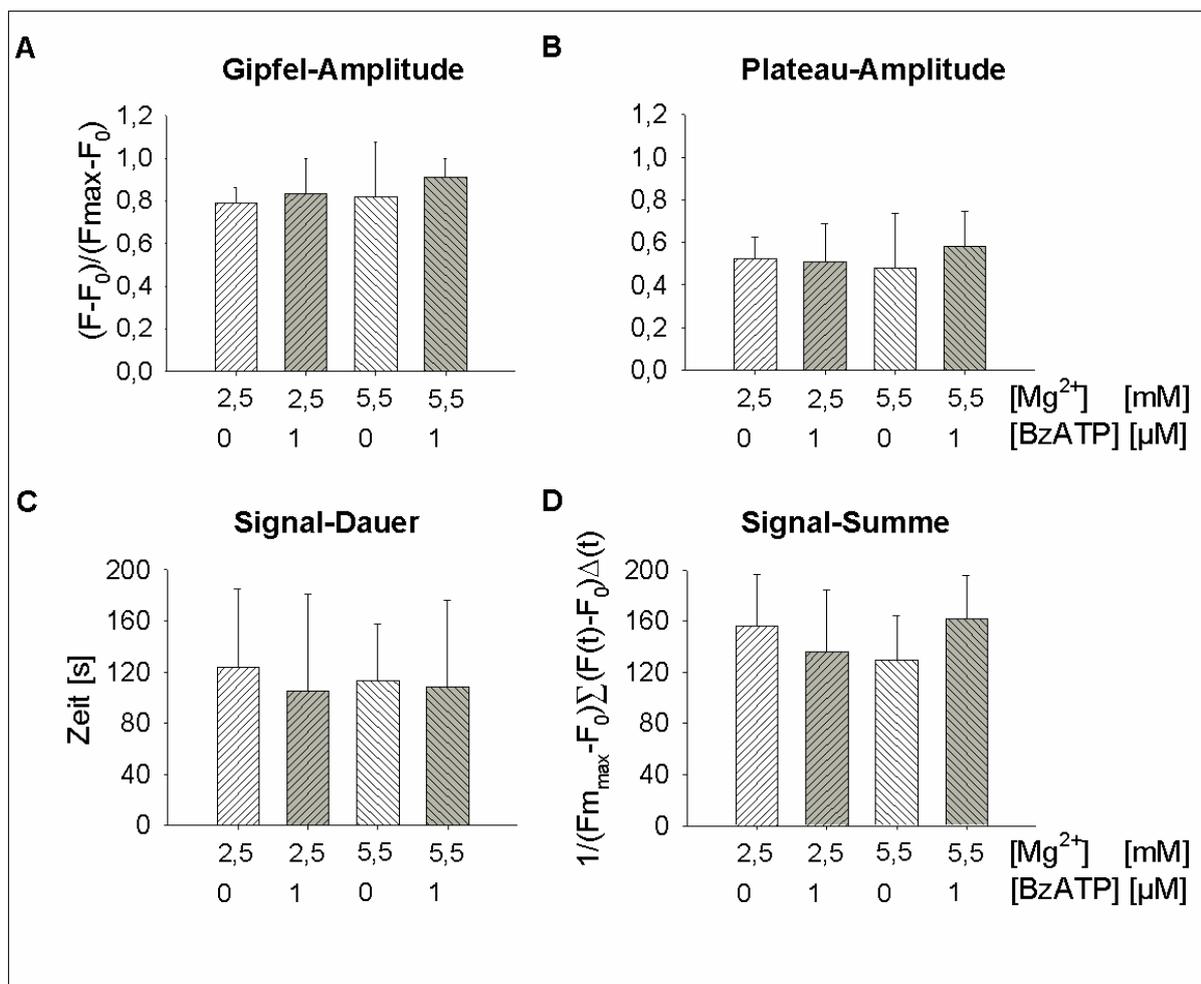


Abb. 22: Statistischer Vergleich des anti-IgM abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals in Abhängigkeit von der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration.

Darstellung von **A**: Gipfel-Amplitude, **B**: Plateau-Amplitude, **C**: Signal-Dauer und **D**: Signal-Summe des anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals in Mg^{2+} -reicher Lösung. Anzahl der gemessenen Zellantworten $n=7-10$ Zellen.

4.5 Der Einfluss des P2X₇R-Agonisten ATP auf das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal

Nach der Verwendung von BzATP wurde untersucht, ob der natürliche P2X₇R-Agonist ATP ebenfalls P2X₇R-abhängige Effekte auf das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal erzeugt.

Bei der alleinigen Applikation von ATP ($\leq 120 \mu\text{M}$) wurde im Gegensatz zur BzATP-Applikation kein P2X₇R-bedingter Ca²⁺-Einstrom gemessen (Abb. 23). Jedoch zeigte ATP, ähnlich wie BzATP, Effekte auf das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal. Abb. 24 und Abb. 25 stellen hierzu die zeitlichen Fluoreszenzverläufe an Einzelzellen dar. ATP-Applikation führte mit steigender Konzentration zu einer Senkung von Gipfel-Amplitude, Plateau-Amplitude, Signal-Summe und Signal-Dauer (Abb. 26). Dabei trat bei Verwendung von ATP im Konzentrationsbereich $\geq 87 \mu\text{M}$ eine annähernd maximale P2X₇R-abhängige Hemmung des BZR-induzierten [Ca²⁺]_i-Signal auf, die durch Verwendung von $120 \mu\text{M}$ ATP nur noch gering zunahm.

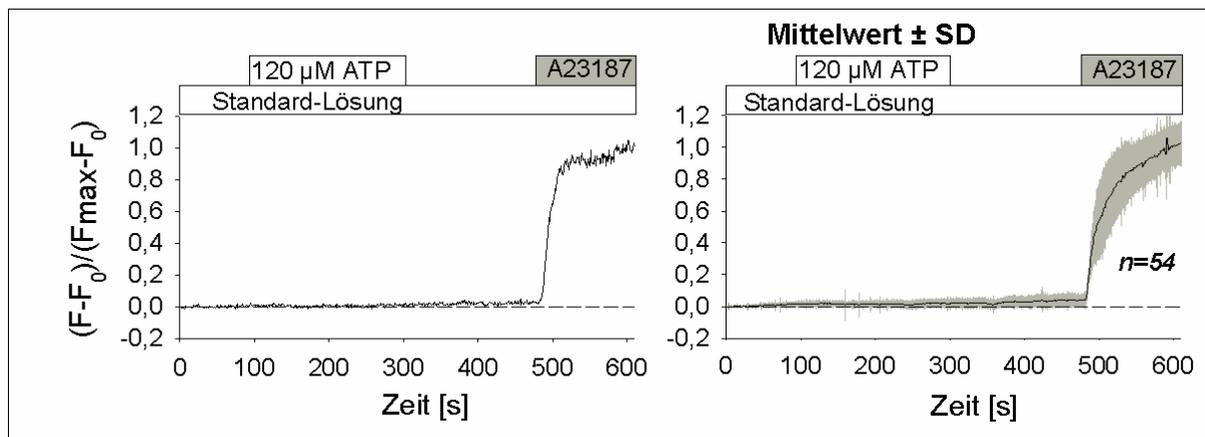


Abb. 23: Einfluss von $120 \mu\text{M}$ ATP auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration

Links: Einzelzellmessung, rechts: Mittelwerte. **A**: Fluoreszenz nach Applikation von $120 \mu\text{M}$ ATP (Lösung AA) in Standard-Lösung (Lösung A). Die Applikation des Ionophors A23187 erzeugt maximale Fluoreszenz. **n**: =Anzahl der gemessenen Zellen.

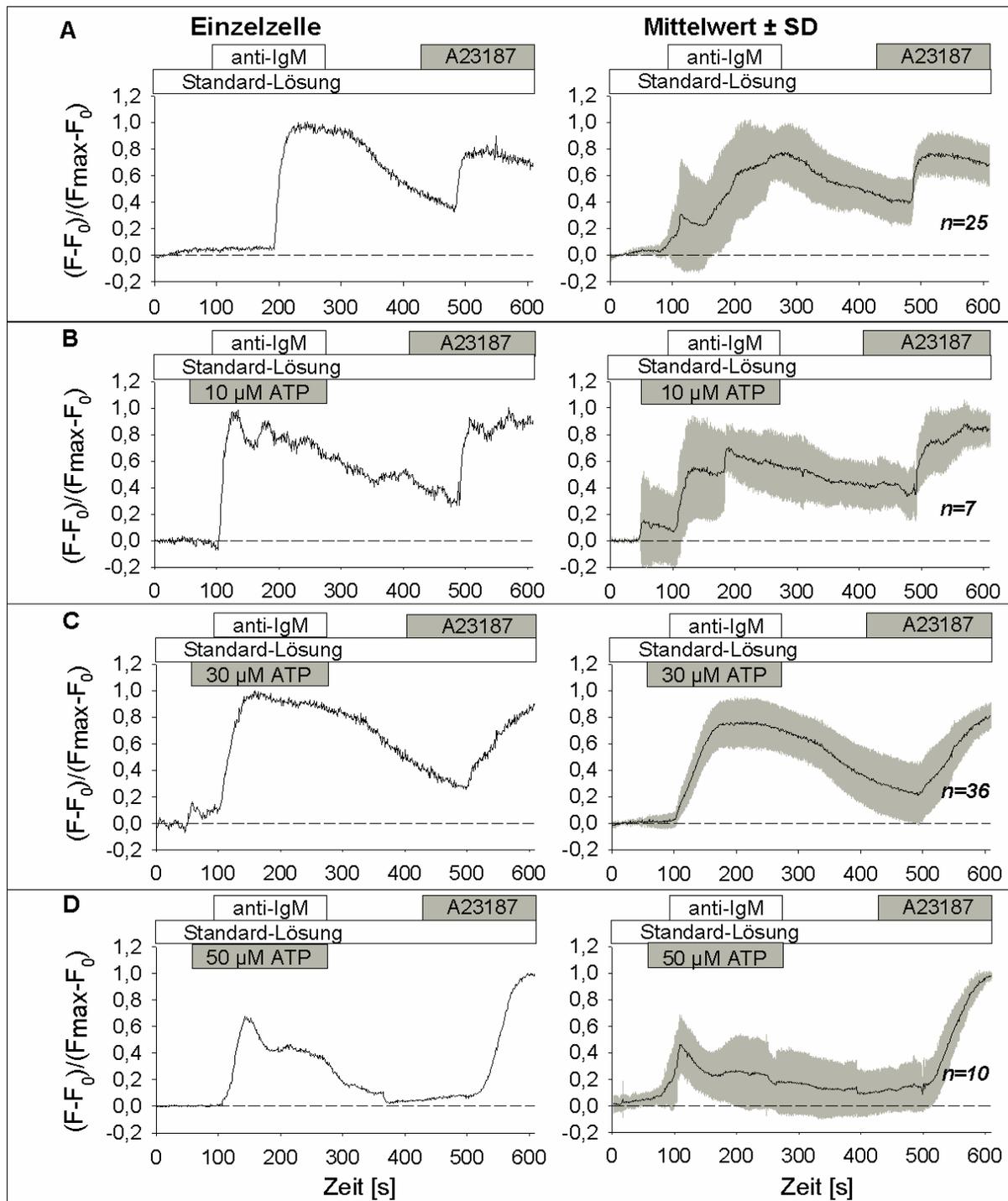


Abb. 24: Einfluss von ATP ($\leq 50 \mu\text{M}$) auf das anti-IgM-abhängige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal auf Einzelzellniveau

Links: Einzelzellmessung, rechts: Mittelwerte. **A:** Fluoreszenz nach anti-IgM-Applikation in Standard-Lösung (Lösung A), und mit zusätzlicher, vorangegangener Applikation von **B:** $10 \mu\text{M}$ ATP (Lösung AF), **C:** $30 \mu\text{M}$ ATP (Lösung AE) bzw. **D:** $50 \mu\text{M}$ ATP (Lösung AD). Die Applikation des Ionophors A23187 erzeugt maximale Fluoreszenz. Anzahl **n** der gemessenen Zellantworten wie angegeben.

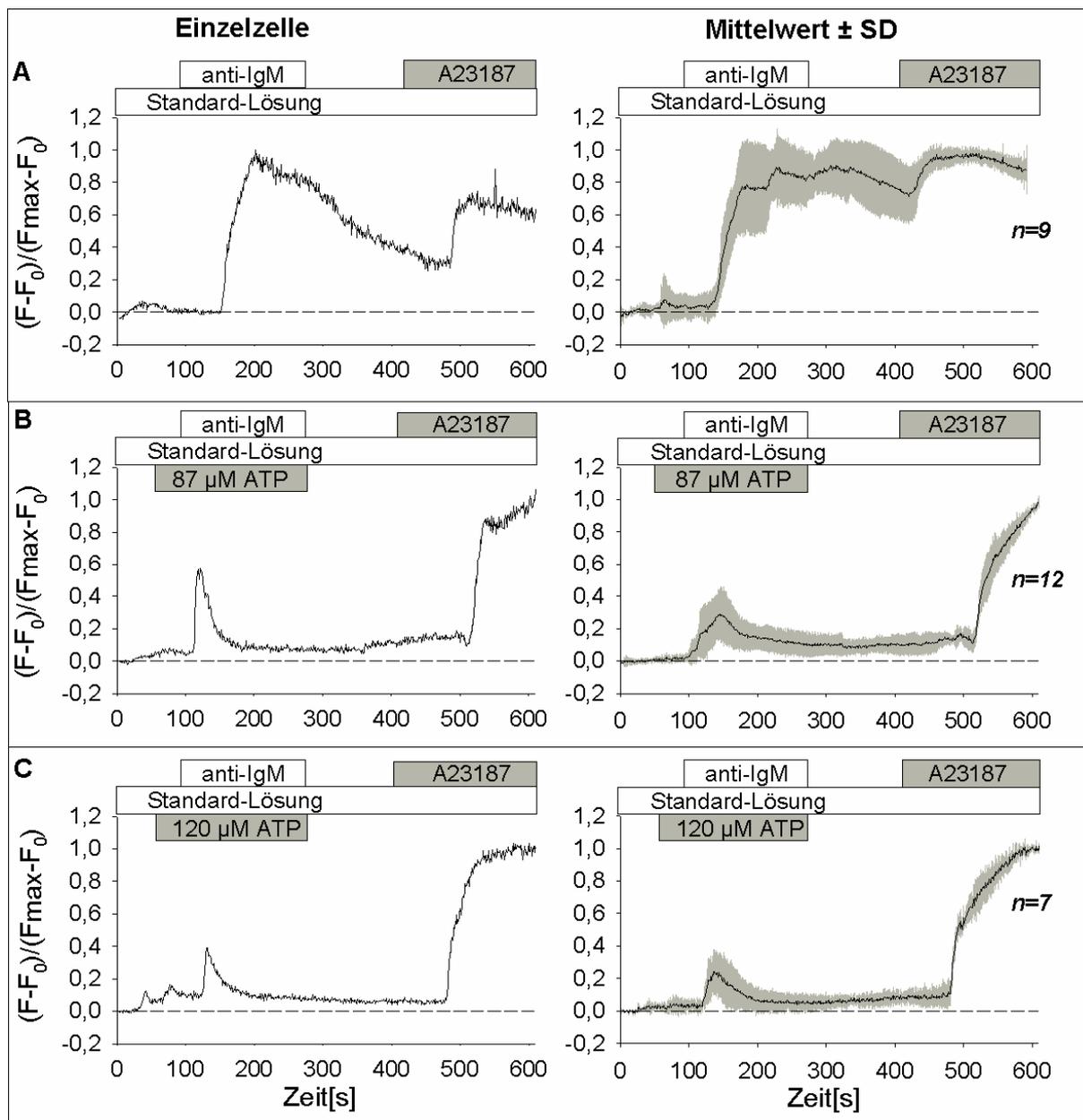


Abb. 25: Einfluss von ATP ($\geq 50 \mu\text{M}$) auf das anti-IgM-abhängige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal auf Einzelzellniveau

Links: Einzelzellmessung, rechts: Mittelwerte. A: Fluoreszenz nach anti-IgM-Applikation in Standard-Lösung (Lösung A), und mit zusätzlicher, vorangegangener Applikation von B: $87 \mu\text{M}$ ATP (Lösung AB) bzw. C: $120 \mu\text{M}$ ATP (Lösung AA). Weitere Erläuterungen siehe Abb. 23.

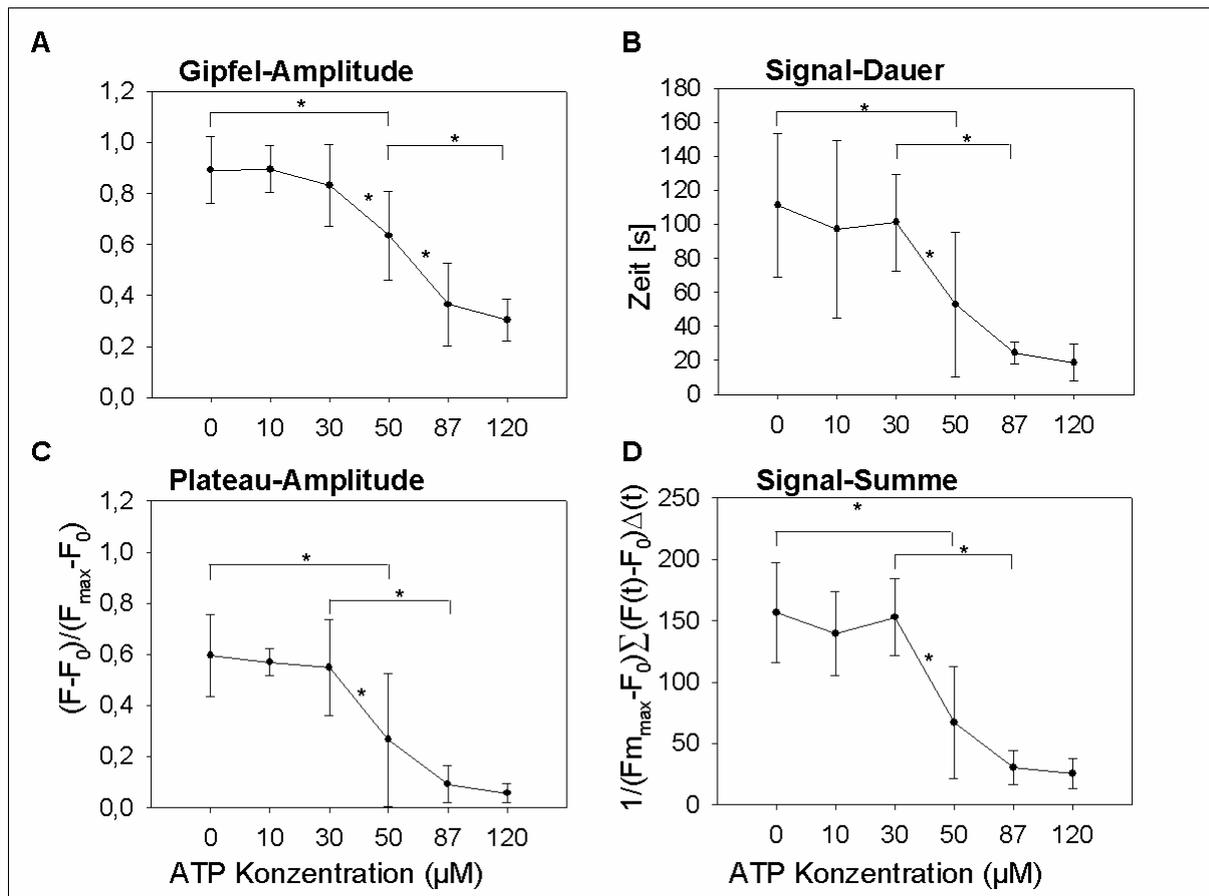


Abb. 26: Statistische Veränderung des anti-IgM-abhängigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration

Darstellung von **A**: Gipfel-Amplitude, **B**: Signal-Dauer, **C**: Plateau-Amplitude und **D**: Signal-Summe des anti-IgM-abhängigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals. Anzahl der gemessenen Zellantworten $n = 7-36$. *: statistisch signifikante Unterschiede.

Den exemplarischen Vergleich der modulierenden Wirkungen von $87 \mu\text{M}$ ATP, $1 \mu\text{M}$ BzATP und 140 mM K^+ -Lösung auf das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal zeigt Abb. 27. Hier wurden die zuvor schon gewonnenen statistischen Größen bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert bei alleiniger anti-IgM-Applikation normalisiert. Dabei wird deutlich, dass sich die Effekte von 140 mM K^+ -Lösung und $87 \mu\text{M}$ ATP auf das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal in den vier statistisch ermittelten Größen nicht unterscheidet. Dies untermauert die These, dass die ATP-abhängigen Effekte lediglich durch Membrandepolarisation hervorgerufen werden. In vorherigen Messungen zeigte $1 \mu\text{M}$ BzATP maximale P2X₇R-abhängige Hemmeffekte auf die Plateau-Amplitude, Signal-Summe und Signal-Dauer. Lediglich die Gipfel-Amplitude wurde noch deutlich stärker durch Verwendung von $5 \mu\text{M}$ BzATP gesenkt. Vergleicht man die Wirkung von $1 \mu\text{M}$ BzATP mit der von $87 \mu\text{M}$ ATP, so zeigten beide P2X₇R-Agonisten gleiche submaximale Effekte auf die Signal-Dauer. Die mit $1 \mu\text{M}$ BzATP erreichten BzATP-abhängigen Effekte auf die Signal-Summe und die Plateau-Amplitude sind jedoch kleiner als die von ATP, wahrscheinlich bedingt durch den BzATP-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom.

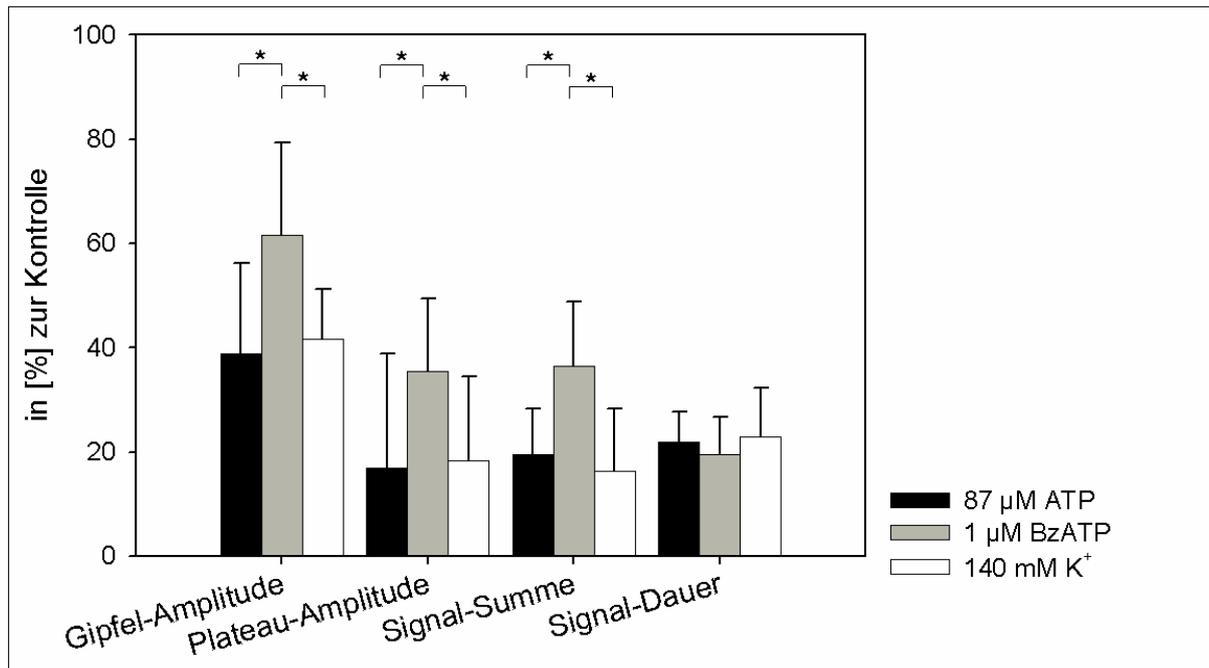


Abb. 27: Statistischer Vergleich der Veränderung des anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals durch 87 μM ATP, 5 μM BzATP und 140 mM K^+ -Lösung

Prozentuale Veränderung der Gipfel-Amplitude, Plateau-Amplitude und Signal-Summe durch 87 μM ATP (**schwarz**), 1 μM BzATP (**grau**) und 140 mM K^+ -Lösung (**weiß**) im Vergleich zu den Kontrollwerten, gemessen nach alleiniger anti-IgM-Applikation. *: statistisch signifikante Unterschiede.

Abschließend wurde versucht den depolarisierenden Effekt von ATP aufzuheben. Dafür wurde im extrazellulären Milieu Na^+ entfernt und für die Beibehaltung der Osmolarität durch Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ($Tris^+$) ersetzt. Im Gegensatz zu Na^+ -haltiger Lösung zeigt ATP in Na^+ -freier Lösung einen $P2X_7R$ -bedingten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 28 B). Andererseits wurden in Na^+ -freier Lösung keine ATP-abhängigen Effekte auf das anti-IgM-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal gemessen (Abb. 28 C). Dies ergab auch die statistischen Auswertung (s. auch Abb. 29).

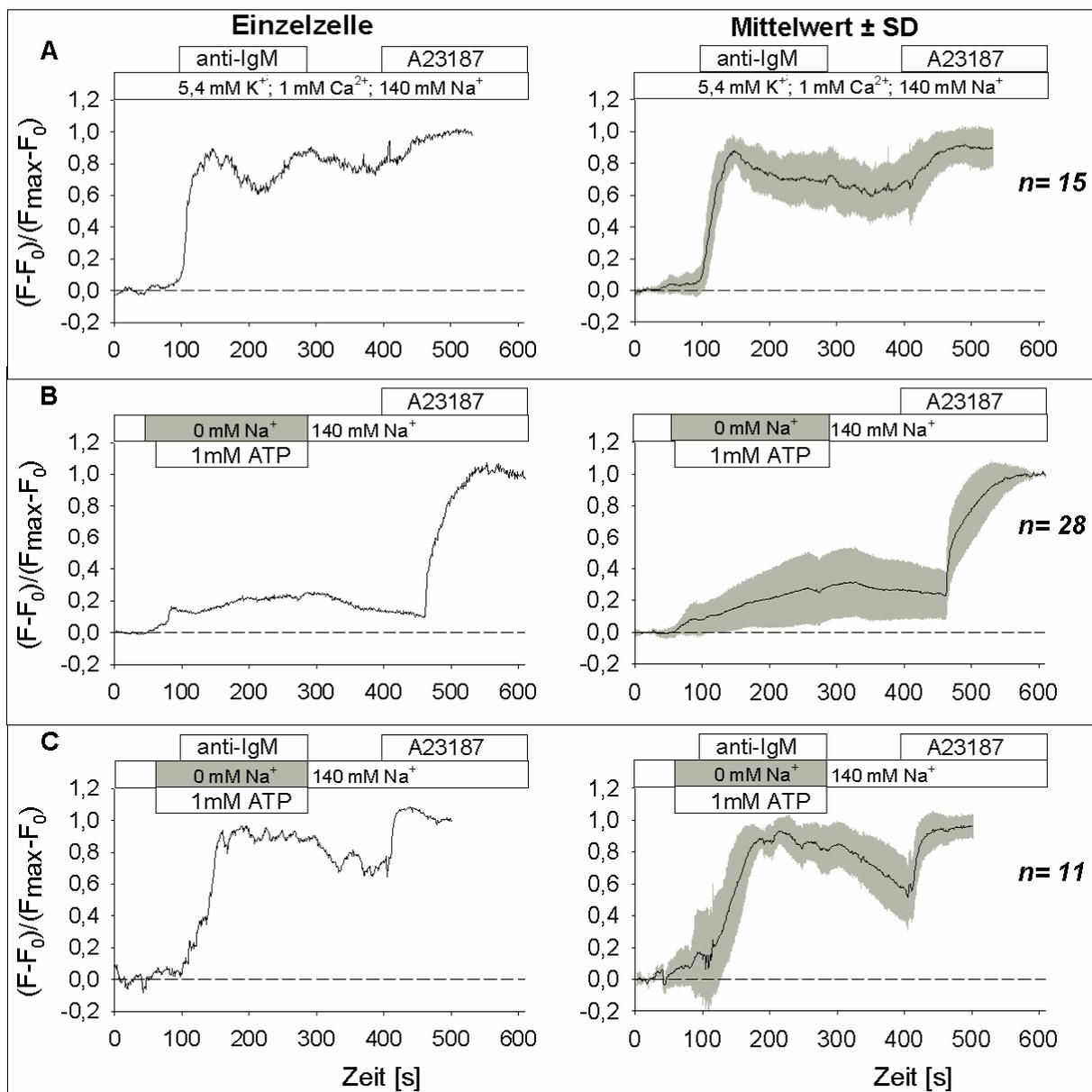


Abb. 28: Einfluss von ATP in Na⁺-freier Lösung auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und auf das anti-IgM-abhängige [Ca²⁺]_i-Signal

Links: Einzelzellmessung, rechts: Mittelwerte Fluoreszenz nach **A**: anti-IgM-Applikation in Extrazellulärlösung (Lösung A), **B**: Applikation von 1 mM ATP (Lösung AG) und **C**: Applikation von 1 mM ATP und anti-IgM in Na⁺-freier Lösung (Lösung G). Die Applikation des Ionophors A23187 erzeugt maximale Fluoreszenz. Anzahl **n** der gemessenen Zellantworten wie angegeben.

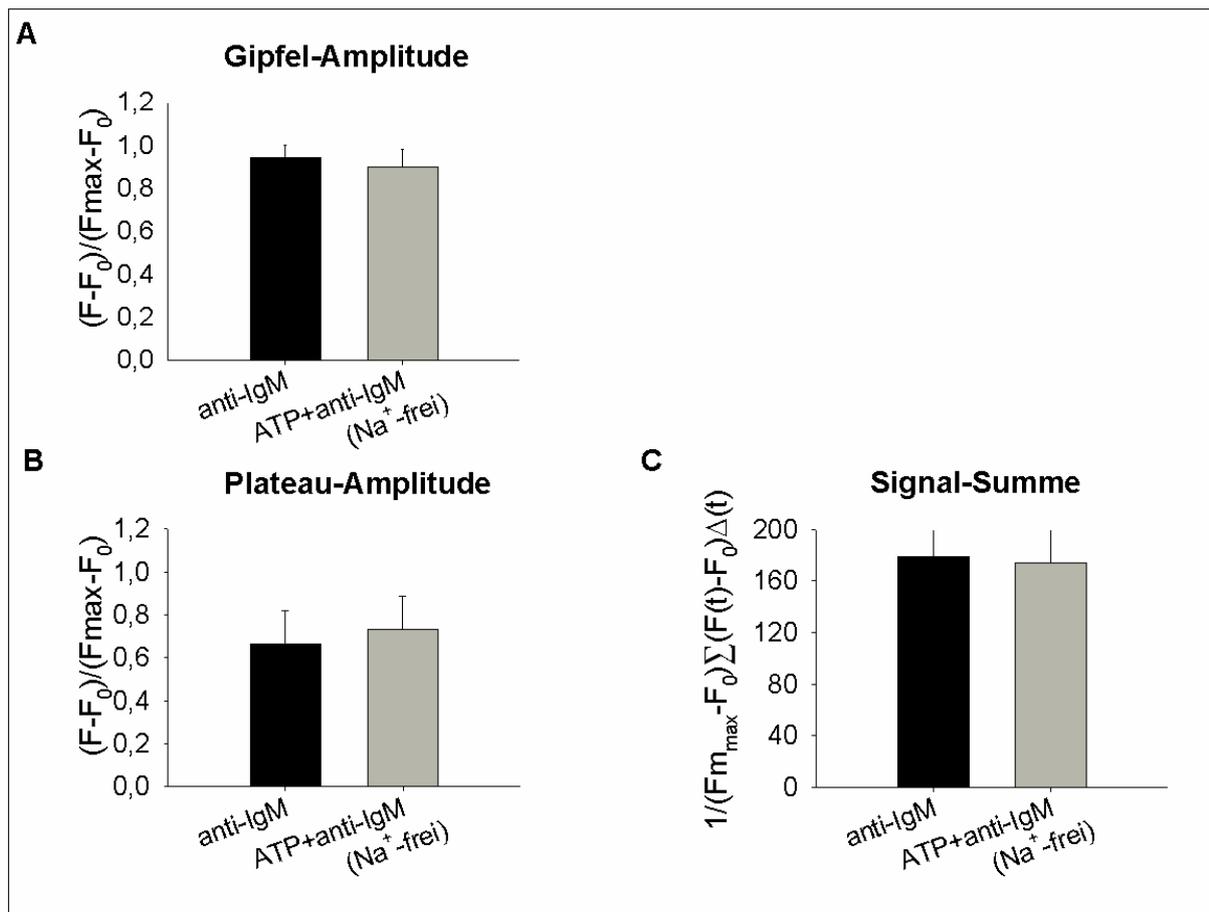


Abb. 29: Statistischer Vergleich des Einflusses von ATP auf das anti-IgM abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signals in Na^+ -freier Lösung

A: Gipfel-Amplitude, **B:** Plateau-Amplitude und **C:** Signal-Summe des anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals. Anzahl der gemessenen Zellantworten $n=11-15$.

5 Diskussion

Die B-Zell-Rezeptor-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signalkaskade

Der B-Zell-Rezeptor (BZR) nimmt in B-Lymphozyten eine Schlüsselstellung für die Steuerung verschiedener Funktionsprozesse ein. So werden sowohl lymphozytäre Proliferation und Differenzierung wie auch Immunglobulin-Synthese über diesen Rezeptor und die nachfolgenden Signalkaskaden gesteuert. Zahlreiche rezeptorvermittelte, modulierende Einflüsse wie über CD19, FcγRIIB1 oder CD22 greifen dabei in die BZR-induzierte Signalkaskade ein und sorgen für abgestimmte Reaktionen. Dies ermöglicht ein breites Spektrum an Funktionen, vermittelt über ein zentrales Rezeptor-Signal.

Ein wichtiger Zweitbotenstoff der BZR-induzierten Signalkaskade stellt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration dar. In vielen Arbeiten der vergangenen Jahre wurde eine differenzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von Form und Größe des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals als generelles Genregulationsmodell beschrieben (Berridge 1997). Dabei scheinen nicht nur die Amplitude und Dauer, sondern auch die Frequenzmodulation des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals Einfluss auf die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren zu nehmen (Dolmetsch *et al.* 1997). Dies ist auch für Lymphozyten beschrieben worden. So konnte eine vom $[Ca^{2+}]_i$ -Signalmuster abhängige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF-κB nachgewiesen werden (Scharenberg *et al.* 2007). NFAT wird durch eine zeitlich lang anhaltende, moderate $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung bzw. durch $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen aktiviert. Im Gegensatz dazu sind kurzzeitige aber hohe $[Ca^{2+}]_i$ -Gipfel notwendig um die Phosphorylierung und damit den Abbau des Inhibitors (I-κB) von NF-κB zu induzieren. Neben dieser Amplitudenmodulation ist auch eine Frequenzmodulation beschrieben worden, welche die c-fos Gen-Expression reguliert (Fujii and Kawashima 2000).

Einen wichtigen Einfluss auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal besitzt die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Einstrom, die vom Membranpotenzial abhängig ist. Letzteres wird wiederum von einer Reihe von Ionenkanälen beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von B-Zell-Subtypen eine unterschiedliche Komposition von K^+ -Kanälen exprimieren, die das BZR-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal via Membranpotenzial modulieren (Scharenberg *et al.* 2007).

Der P2X₇R - ein multifunktionaler Rezeptor

Der P2X₇-Rezeptor (P2X₇R) ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} . Er wird vor allem von Lymphozyten, von Zellen des mononukleären Phagozytose-System und von Mastzellen exprimiert und scheint wichtige immunologische Funktionen zu beeinflussen (Carroll *et al.* 2009; Di Virgilio 2007; Hughes *et al.* 2007; Chen and Brosnan 2006). Hinsichtlich seiner Struktur und seiner funktionellen Eigenschaften unterscheidet sich dieser Rezeptor deutlich von anderen Vertretern der P2X-Rezeptorfamilie. Einzigartig an der P2X₇R-Untereinheit ist das um 120-200 Aminosäuren länger ausgebildete intrazelluläre C-terminale Ende (Surprenant *et al.* 1996). Dies verleiht ihm über die Akti-

vierung eines Kationenflusses hinausgehende Funktionen (Worthington *et al.* 2002; Smart *et al.* 2003; Le Stunff *et al.* 2004; Gu *et al.* 2001). So führt P2X₇R-Stimulation in B-Lymphozyten zur Aktivierung der Phospholipase D (Fernando *et al.* 1999; Gargett *et al.* 1996), sowie zur Abtrennung („Shedding“) von L-Selektin und CD23 von der Membranoberfläche (Gu *et al.* 1998; Sluyter and Wiley 2002; Jamieson *et al.* 1996). Längere bzw. wiederholte Aktivierungen und eine geringe extrazelluläre Konzentration von divalenten Kationen führt zur Ausbildung von Poren, die neben Na⁺, Ca²⁺ und K⁺ ebenfalls auch die Permeation kleiner Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 200 Da bei Lymphozyten zulässt (Ralevic and Burnstock 1998). Jedoch ist umstritten, ob sich dabei die Ionenkanal-Pore des P2X₇R erweitert oder ob zusätzliche Proteine die Porenbildner sind (Schilling *et al.* 1999) (Pelegrin and Surprenant 2006). Ferner sind zytotoxische Porenbildungen mit unphysiologisch hohen Agonistenkonzentrationen erreicht worden (Di Virgilio *et al.* 1998).

Mögliche Interaktion zwischen BZR-induzierten [Ca²⁺]_i-Signal und P2X₇R

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob der P2X₇R Einfluss auf das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal nimmt. ATP spielt als inflammatorischer Botenstoff eine wichtige Rolle und wird beispielsweise während der Blutgerinnung von Blutplättchen oder unter Hypoxie-Bedingungen von Zellen sezerniert, kann aber auch unspezifisch durch Gewebsuntergang in den Extrazellularraum gelangen (Di Virgilio *et al.* 1996; Di Virgilio *et al.* 2001). Dabei kann die normalerweise im nanomolaren Bereich befindende extrazelluläre ATP-Konzentration bis auf 100 µM ansteigen (Di Virgilio *et al.* 1996; Burnstock 2007). Neben den komplexen, lymphozytären Proliferations- und Differenzierungsvorgängen vermittelt die Aktivierung der BZR-induzierten Signalkaskaden auch die Differenzierung zur Plasmazelle und die Immunglobulin-Synthese (Harnett 2006). Weiterhin vermittelt der BZR die Aufnahme von Antigenen für die nachfolgende Präsentation über MHC II Moleküle (Vascotto *et al.* 2007). Somit ist es denkbar, dass BZR- und P2X₇R-Aktivierung simultan unter pathophysiologischen Bedingungen auftreten können und dass dieses zeitnahe Zusammentreffen funktionelle Bedeutung hat.

Für mögliche Interaktion zwischen beiden Rezeptoren waren im Vorfeld dieser Arbeit drei hypothetische Möglichkeiten denkbar: erstens P2X₇R-abhängige Effekte auf das Membranpotential; zweitens P2X₇R-bedingter extrazellulärer Ca²⁺-Einstrom; drittens Ionenstrom-unabhängige, P2X₇R-induzierte Effekte auf die BZR-Signalkaskade mit nachfolgender Veränderung des [Ca²⁺]_i-Signals.

Eigenschaften des BZR-induzierten [Ca²⁺]_i-Signals

Das BZR-induzierte [Ca²⁺]-Signal stellte sich in Einzelzellmessungen als biphasische Funktion dar. Auf einen anfänglichen, transienten [Ca²⁺]_i-Gipfel folgte ein zeitlich länger bestehendes [Ca²⁺]_i-Plateau. In Ca²⁺-freier Extrazellularlösung verschwindet diese Plateauphase. Dies steht im Einklang mit dem bisherigen Modell des BZR-induzierten [Ca²⁺]_i-Signals und wurde auch in vorherigen Arbeiten durch Fluoreszenz-Einzelzellmessungen gezeigt (Nishida *et al.* 2003). Das Entfernen der extrazellulären Ca²⁺-Ionen reduzierte in den Messungen der hier vorgelegten Arbeit die initiale Gipfel-

Amplitude auf ungefähr 37 ± 15 % des Wertes in $[\text{Ca}^{2+}]$ -haltiger Extrazellulärlösungen. Dies spricht dafür, dass die initiale Phase des BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals nicht nur durch die Ca^{2+} -Freisetzung, sondern ebenfalls und größtenteils vom extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom getragen wird. Dem Quotienten aus den Signal-Summen in An- und Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} zu Folge leistet die Ca^{2+} -Freisetzung einen Beitrag von 25 ± 10 % an der Ausbildung des BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals. Dies steht im Einklang mit BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhungen an B-Lymphozyten der Maus, bei denen ein 25%iger Ca^{2+} -Freisetzungsanteil gefunden wurde (Dolmetsch *et al.* 1997).

Einfluss des Membranpotenzials auf den Ca^{2+} -Einstrom

Zunächst wurde untersucht, in welcher Form und in welchem Maß das Membranpotenzial Einfluss auf das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal nimmt. Durch die Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Depolarisation und eine Veränderung des anti-IgM-abhängigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals nachgewiesen. Durch Einzelzellmessungen konnte mittels K^+ -Lösungen bzw. Gramicidin gezeigt werden, dass die Membrandepolarisation zu einer Verkleinerung der initialen transienten Gipfel-Amplitude, der darauf folgenden Plateau-Amplitude, der Signal-Dauer und der zeitlich summierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration führt. Die naheliegendste Erklärung hierfür ist, dass die Membrandepolarisation die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum reduziert. Dies steht auch im Einklang mit Messungen, die an Ebstein-Barr-Virus-transformierten B-Lymphozyten (Löhn *et al.* 2001), an Mastzellen (Penner *et al.* 1988) und an myeloischen Zellen (Demaurex *et al.* 1992) durchgeführt worden sind. Ebenfalls bestätigt sich die große Bedeutung des Ca^{2+} -Einstroms für die Ausbildung der initialen Gipfel-Amplitude. Die Tatsache, dass eine verstärkte Depolarisation durch Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration von 70 mM auf 140 mM keine zusätzliche Verminderung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals hervorruft, könnte darauf zurückgeführt werden, dass bereits bei Verwendung der 70 mM K^+ -Lösung eine Membrandepolarisation entsteht, die den Ca^{2+} -Einstrom maximal hemmt.

Veränderung des BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals durch den $\text{P2X}_7\text{R}$ -Agonisten BzATP

Für die Untersuchung der biologischen Effekte des $\text{P2X}_7\text{R}$ auf das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal wurde zunächst BzATP verwendet. BzATP wird als nahezu spezifischer Agonist für humane $\text{P2X}_7\text{R}$ betrachtet, der an diesen eine etwa 10fach höhere Potenz (Rassendren *et al.* 1997) und eine deutlich höhere intrinsische Aktivität (Klapperstück *et al.* 2000a) als ATP besitzt. An anderen P2X -Rezeptoren ($\text{P2X}_{1,2,4}$) ist die BzATP-Potenz meistens und die intrinsische Aktivität immer geringer als die von ATP (Sperlagh *et al.* 2006). Heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimierte humane P2X_1 -Rezeptoren wurden durch 10 μM BzATP gar nicht und humane P2X_4 -Rezeptoren deutlich schwächer aktiviert als durch ATP (Labor Markwardt, persönliche Mitteilung). BzATP ist auch als Agonist der G-Protein-abhängigen P2Y_{11} -Rezeptoren beschrieben worden (von Kügelgen 2006). Das Fehlen von BzATP-

induzierter, rapider $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen in Ca^{2+} -freier Lösung spricht jedoch dafür, dass in den hier untersuchten Zellen BzATP keine Ca^{2+} -Freisetzung über P2Y-Rezeptoren auslöst.

Alleinige Applikation von BzATP führt konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Durch das Fehlen dieses Effektes bei Verwendung Ca^{2+} -freier Extrazellulärlösung kann dies auf einen P2X₇R-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom zurückgeführt werden.

Am Durchflusszytometer konnte gezeigt werden, dass BzATP konzentrationsabhängig eine P2X₇R-abhängige Membrandepolarisation erzeugt. Bei niedrigen BzATP-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 5 μ M ist das typische anti-IgM-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal erkennbar. In diesem Konzentrationsbereich zeigt sich eine P2X₇R-bedingte Veränderung des BZR-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signals, ähnlich wie unter Depolarisationsbedingungen (K^+ , Gramicidin) gemessen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der P2X₇R durch Membrandepolarisation den BZR-induzierten Ca^{2+} -Einstrom verkleinert. BzATP führt jedoch auch zu einem P2X₇R-bedingten Ca^{2+} -Einstrom, welcher drei Minuten nach Applikation bereits ab einer Konzentration von 0,1 μ M BzATP deutlich wird. Daraus resultiert eine zunehmende Kompensation des P2X₇R-bedingten Depolarisationseffektes durch den P2X₇R-bedingten Ca^{2+} -Einstrom mit der Folge, dass die Plateau-Amplitude nicht so reduziert wurde, wie sie unter Depolarisationsmanövern mit K^+ -Lösungen oder Gramicidin gemessen worden ist. BzATP Konzentrationen \geq 10 μ M erzeugten einen so großen Ca^{2+} -Einstrom, dass das BZR-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal maskiert bzw. überlagert wurde.

Die P2X₇R-abhängige, depolarisationsbedingte Senkung der Gipfel-Amplitude wurde in den Messungen dieser Arbeit nicht durch einen P2X₇R-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom überlagert bzw. kompensiert. Dies liegt wahrscheinlich am zeitlichen Messablauf, der eine BzATP-Gabe eine Minute vor anti-IgM-Applikation vorsah. Während dieser Zeit trat bei niedrigen BzATP-Konzentrationen ($< 10 \mu$ M) noch keine nennenswerte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf. Jedoch könnten diese niedrigen BzATP-Konzentrationen theoretisch auch P2X₇R-abhängige Ca^{2+} -Einströme erzeugen, welche die Gipfel-Amplitude steigern, wenn sie beispielsweise 3 min vor anti-IgM appliziert werden würden. Höhere BzATP-Konzentrationen maskierten die transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Gipfel völlig, sodass der BzATP-Einfluss da nicht ausgemessen werden konnte.

Für die P2X₇R-bedingte Reduzierung der treibende Kraft für Ca^{2+} -Ionen spricht auch die Tatsache, dass die durch 1 μ M BzATP erzeugten Effekte durch Valinomycin teilweise aufgehoben werden konnten. Dass der P2X₇R-abhängige Effekt nicht vollständig blockierbar war, kann zum Teil damit erklärt werden, dass Valinomycin nicht zeitgleich mit BzATP appliziert wurde und somit erst verzögert die Depolarisation aufhob. So ist auch die ähnliche Ausprägung der Gipfel-Amplitude mit und ohne Valinomycin zu erklären. Andererseits könnte auch die erzeugte Valinomycin-induzierte K^+ -Leitfähigkeit zu klein gewesen sein, um die BzATP-induzierte Depolarisation zu verhindern.

Extrazelluläre Mg^{2+} -Ionen sind ein potenter Hemmer von P2X₇R-bedingten Ionenströmen (Wiley *et al.* 1993; Virginio *et al.* 1997). Es konnten die Effekte von 1 μ M BzATP auf das anti-IgM-abhängige

$[Ca^{2+}]_i$ -Signal durch die Erhöhung des extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration auf 2,5 mM bzw. 5,5 mM Mg^{2+} vollständig aufgehoben werden. Damit zeigte sich eine stärkere Mg^{2+} -bedingte Hemmung des $P2X_7R$ als man theoretisch bei der Mg^{2+} -abhängigen Reduktion der freien Konzentration an $BzATP^{4-}$ auf 0,35 μM bzw. 0,18 μM erwarten würde, denn in 0,5 mM Mg^{2+} -Extrazellulärlösung zeigte 0,1 bzw. 1 μM freies $BzATP^{4-}$ deutliche Effekte auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal. Dies steht im Einklang mit den von Virginio publizierten Ergebnissen. Auch hier stellte sich bei der Erhöhung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration eine zusätzliche, vom freien $BzATP^{4-}$ unabhängige Hemmung heraus, die als allosterische Hemmung am $P2X_7R$ gedeutet wurde (Virginio *et al.* 1997).

In Ca^{2+} -freier Lösung ist das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Plateau stark reduziert, da der Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum in das Zytosol fehlt und somit das zytosolische $[Ca^{2+}]_i$ -Signal nur durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern erzeugt wird. Hierbei zeigt die Kostimulation des $P2X_7R$ mittels $BzATP$ keine zusätzlichen Effekte auf die Gipfel- und Plateau-Amplitude des anti-IgM-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls dafür, dass sich $P2X_7R$ -bedingte Effekte auf das BZR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Signal lediglich auf den Ca^{2+} -Einstrom beschränken. Die Tatsache, dass sich unter Ca^{2+} -freien Bedingungen die Signal-Summe und tendenziell auch die Plateau-Amplitude während der Kostimulation mit $BzATP$ verkleinern (Abb. 18) ist wahrscheinlich in der $P2X_7R$ -bedingten Erhöhung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit und dem hier auswärtsgerichteten Konzentrationsgefälle für Ca^{2+} begründet. Das bedeutet, dass die Öffnung von $P2X_7R$ -Kanälen hier zu einem Ca^{2+} -Ausstrom führt, der besonders während der lang dauernden Plateauphase die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration senkt, der aber während der kurzen anfänglichen transienten Gipfel-Amplitude nicht ins Gewicht fällt. Ursächlich hierfür könnte die relativ zeitnahe Applikation von $BzATP$ und anti-IgM innerhalb einer Minute sein.

Veränderung des BZR-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signals durch ATP

Neben $BzATP$ kam weiterhin der natürliche $P2X_7R$ -Agonist ATP zum Einsatz um zu untersuchen, ob die zuvor beobachteten $P2X_7R$ -bedingten Effekte auch unter physiologischen Bedingungen möglich sind. ATP soll in Konzentrationen bis 100 μM als inflammatorischer Botenstoff Bedeutung haben (Di Virgilio *et al.* 1996). In diesem Konzentrationsbereich wurde in Einzellmessungen der Einfluss von ATP auf das anti-IgM-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Signal untersucht. In *Xenopus*-Oozyten exprimiert zeigt der humane $P2X_7R$ eine EC_{50} von 400 μM ATP^{4-} (Klapperstück *et al.* 2000a), und an B-Lymphozyten konnte ein EC_{50} von 200 μM ATP^{4-} gemessen werden (Bretschneider *et al.* 1995). B-Lymphozyten exprimieren ebenfalls den $P2X_1R$, $P2X_2R$ und $P2X_4R$, wenn auch in geringerer Expressionsstärke verglichen mit der des $P2X_7R$ (Sluyter *et al.* 2001). Da diese Rezeptoren aber eine 10-100fach kleinere EC_{50} für ATP besitzen, können purinerge, $P2X_7R$ -unabhängige Effekte nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Jedoch zeigten Patch-Clamp Messungen von ATP-induzierten Strömen an Virus transformierten B-Zellen nur Charakteristika des $P2X_7R$ (Bretschneider *et al.* 1995; Löhn *et al.* 2001).

Außerdem wirkt ATP an P2Y-Rezeptoren als Agonist. ATP-induzierte, P2Y-abhängige Ca^{2+} -Freisetzungen scheinen jedoch in B-Lymphozyten nicht zu existieren (Wiley and Dubyak 1989; Löhn *et al.* 2001). ATP-vermittelte, P2Y-induzierte Ca^{2+} -Freisetzungen bei T-Lymphozyten (Baricordi *et al.* 1996) konnten durch ihr frühzeitigeres Auftreten von BZR-induzierten Ca^{2+} -Freisetzungen abgegrenzt werden.

Alleinige ATP-Applikation im Konzentrationsbereich bis 120 μM zeigten keinen P2X₇R-bedingten Ca^{2+} -Einstrom. Dies steht auch im Einklang mit veröffentlichten Ergebnissen, die an mehreren B-Zell-Linien erhoben wurden. Danach soll die P2X₇R-bedingte Depolarisation den P2X₇R-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom durch Reduktion der treibenden Kraft für Ca^{2+} hemmen (Löhn *et al.* 2001). Die Kostimulation der BZR-Signalkaskade und des P2X₇R via ATP zeigten ebenfalls wie bei Verwendung von BzATP eine Reduzierung der initialen transienten Gipfel-Amplitude, Plateau-Amplitude, Signal-Dauer und Signal-Summe. Aufgrund des fehlenden ATP-induzierten P2X₇R-abhängigen Ca^{2+} -Einstroms senkte ATP noch stärker als BzATP die Plateau-Amplitude, Signal-Dauer und Signal-Summe des BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals.

Bei der Verwendung von ATP in Na^+ -freier Lösung konnte ein P2X₇R-bedingter Ca^{2+} -Einstrom gemessen werden. Ursache hierfür ist vermutlich die fehlende Na^+ -abhängige Depolarisation (Löhn *et al.* 2001). Aus dem gleichen Grund konnte selbst die Verwendung von hohen ATP-Konzentrationen im millimolaren Bereich in Na^+ -freier Lösung keinen Effekt auf das BZR-abhängige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal erzielen. Dies untermauert ebenfalls die Vorstellung, dass sich der ATP-induzierte, P2X₇R-abhängige Effekt auf eine Na^+ -abhängige Zelldepolarisation beschränkt. Jedoch scheint die Plateau-Amplitude und Signal-Summe bei Kostimulation von ATP und anti-IgM in Na^+ -freier Lösung im Vergleich zur alleinigen anti-IgM-Stimulation nicht signifikant erhöht. Dies hätte durch die P2X₇R-bedingte Erhöhung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit erwartet werden können. Andererseits ist bereits das anti-IgM-abhängige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal auf so hohem Niveau, das es möglicherweise nicht mehr nennenswert durch eine zusätzliche ATP-induzierte Erhöhung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit gesteigert werden kann.

Einflussnahme auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen

Zyklische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Schwankungen (Oszillationen) können in vielen Zellarten beobachtet werden und sollen physiologische Bedeutung haben. Die Mechanismen scheinen vielfältig. Erzeugt werden die Oszillationen durch interne Ca^{2+} -Freisetzung und/oder durch Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum je nach Zellart (Taylor and Tovey 2005). In B-Lymphozyten scheinen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen ebenfalls physiologischen Einfluss zu haben (Fujii and Kawashima 2000). Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillation in B-Lymphozyten aus dem Zusammenspiel von IP₃R-abhängiger Ca^{2+} -Freisetzung und endoplasmatischer Ca^{2+} -ATPase-Aktivität erzeugt werden (Miyakawa *et al.* 1999; Choquet *et al.* 1994). Extrazelluläre Ca^{2+} -Einströme sollen lediglich Ca^{2+} -Verluste, hervorgeru-

fen durch die Plasmamembran-assoziierte Ca^{2+} -ATPase, kompensieren (Bird and Putney 2005; Sneyd *et al.* 2004).

In den Einzelzellmessungen der vorliegenden Arbeit konnten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen nur relativ selten beobachtet werden (ca. in 6 % der Messungen). Auffällig war dabei, dass oszillierende Zellen vermehrt in bestimmten B-Zell-Präparationen und nicht generell in jeder Messung auftraten. Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten Oszillationen von bisher unbekanntem, nicht provozierbarem und reproduzierbarem Einflussgrößen abhängen. Ursächlich könnte beispielsweise die Ca^{2+} -Belastung der Zellen (Sneyd *et al.* 2004) oder der von der Differenzierung abhängige Expressionsgrad der unterschiedlichen IP_3 -Rezeptor-Untertypen (Engelke *et al.* 2007) sein. Einige der oszillierenden Zellen zeigten initial eine stabile intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, die nach anti-IgM-Gabe zyklisch an- und abstieg. Andere Zellen zeigten bereits eine basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen, deren Frequenz nach anti-IgM-Applikation zunahm, deren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Spitzenwerte jedoch in der Regel konstant blieben. Dies steht auch im Einklang mit den von Bird und Putney veröffentlichten Ergebnissen. An Hek293-Zellen konnten hier ebenfalls Oszillationen beobachtet werden, deren Frequenz abhängig von der auslösenden Agonistenkonzentration war und deren Amplituden dabei unbeeinflusst blieben (Bird and Putney 2005). Da oszillierende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale die Ausnahme blieben, konnte der Einfluss des $\text{P2X}_7\text{R}$ auf diese nicht eindeutig bestimmt werden. Oszillationen traten während Depolarisationsmanöver bzw. $\text{P2X}_7\text{R}$ -Kostimulation nicht gehäuft auf, andererseits blieben bereits bestehende Oszillationsmuster erhalten.

Der $\text{P2X}_7\text{R}$ als Modulator der BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalkaskade

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass das gleichzeitige Auftreten von ATP mit einem Antigen die BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Antwort entscheidend verringert. Die pathophysiologische Bedeutung dieser möglichen Funktion bleibt vorerst unklar und spekulativ. Denkbar wäre zum einen eine ATP-abhängige Modulation des BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals, das wiederum Einfluss auf die Genexpression nehmen könnte. Dafür spricht beispielsweise der Nachweis der vom $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalmuster abhängigen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κB (Scharenberg *et al.* 2007). Andererseits könnte auch der lokal wirkende Entzündungsbotenstoff ATP das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal unterdrücken und andere BZR-abhängige Funktionen wie beispielsweise die lymphozytäre Antigen-Präsentation in den Vordergrund stellen. Diese über MHC II-Moleküle vermittelte Funktion ist wichtig für die Aktivierung von CD4^+ -T-Zellen und somit für die vollständige Aktivierung der Immunantwort. Dabei scheint der BZR-vermittelte Prozess der Antigenaufnahme unabhängig von lipid rafts und von der Aktivierung der SRC-Kinasen zu sein (Caballero *et al.* 2006). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal keine oder nur geringe Bedeutung für die Aufnahme und Präsentation von Antigenen besitzt. Darüber hinaus spielt das Aktin-Zytoskelett bei der Antigenaufnahme und beim Transport zu den Endosomen eine entschei-

dende Rolle (Brown and Song 2001), das wiederum mit dem P2X₇R in enger Wechselwirkung zu stehen scheint (Kim *et al.* 2001; Pfeiffer *et al.* 2004). Somit könnten auch noch zusätzliche, [Ca²⁺]_i-unabhängige P2X₇R-Effekte auf die Antigenaufnahme möglich sein. Eine ähnliche Funktion ist bei Schilddrüsenzellen nachgewiesen worden. Hier zeigte sich nach P2X₇R-Stimulation eine [Ca²⁺]_i-unabhängige Steigerung der Endozytose (Kochukov and Ritchie 2005). Welche pathophysiologische Bedeutung nun simultane ATP-Stimulation und Antigen-Kontakt für die Reaktion von B-Lymphozyten hat, müssen weitere Untersuchungen ergeben.

6 Zusammenfassung

ATP tritt im Rahmen von Entzündungsprozessen im Extrazellularraum auf und stellt ein wichtiges, frühzeitig auftretendes Gefahrensignal dar, das auf Zellen der Immunabwehr Einfluss nimmt (Di Virgilio *et al.* 1996). P2-Rezeptoren werden durch extrazelluläres ATP stimuliert. Diese lassen sich unterscheiden in P2Y-Rezeptoren, die alle G-Protein gekoppelt sind, und in P2X-Rezeptoren, die ligandengekoppelte Ionenkanäle darstellen (Ralevic and Burnstock 1998). Zu den P2X-Rezeptoren gehört auch der lange Zeit als P2Z beschriebene P2X₇-Rezeptor. Er unterscheidet sich deutlich von anderen P2X-Rezeptoren und wird vor allem von Lymphozyten und Makrophagen exprimiert. Dabei übertreffen seine Funktionen die von herkömmlichen ligandengekoppelten Ionenkanälen. So führt P2X₇R-Stimulation in B-Lymphozyten auch zur Aktivierung der Phospholipase D, zur Abtrennung („Shedding“) von L-Selektin und CD23 von der Membranoberfläche und unter besonderen Bedingungen auch zur Ausbildung von Poren bei Verwendung hoher Agonistenkonzentrationen (Fernando *et al.* 1999) (Gu *et al.* 1998) (Gu *et al.* 2000).

Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von B-Lymphozyten spielt die über den B-Zell-Rezeptor (BZR)-induzierte Signalkaskade. Sie führt unter anderem zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i). Dieses BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: Zunächst führt BZR-Aktivierung zu einer IP₃-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Anschließend induziert die Ca²⁺-Freisetzung einen Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran. Dieser sogenannte I_{CRAC}-Ca²⁺-Einstrom wird vom Membranpotenzial beeinflusst, das wiederum durch andere, transmembranäre Ionenströme beeinflusst wird (Engelke *et al.* 2007). Unterschiedliche [Ca²⁺]_i-Signalmuster beeinflussen maßgeblich die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF-κB (Scharenberg *et al.* 2007).

Ziel dieser Arbeit war es, eine möglicherweise vorhandene Einflussnahme des P2X₇-Rezeptors auf das BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Signal zu untersuchen.

Dabei stand vor allem eine physiologische Rezeptoraktivierung mit entsprechend niedrigen ATP-Konzentrationen (≤ 120 μM) im Vordergrund. Untersucht wurden dazu tonsilläre B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-Einzellzellmessungen. Es konnte nachgewiesen werden, dass ATP P2X₇R-abhängig durch die Erzeugung eines Na⁺-Einstroms depolarisierend auf das Membranpotenzial wirkt. Dies reduziert die treibende Kraft für den Ca²⁺-Einstrom vom Extrazellularraum in das Zytosol und verringert somit den BZR-abhängigen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Mit steigender P2X₇R-Aktivierung wird der initiale, transiente [Ca²⁺]_i-Gipfel teilweise und das anschließende [Ca²⁺]_i-Plateau annähernd vollständig vermindert. Gleiche Effekte konnten ebenfalls durch gezielte Depolarisation mit K⁺-reicher Lösungen und dem Na⁺-Ionophor Gramacidin erzeugt werden. Im Gegensatz zu ATP führt die Verwendung von BzATP nicht nur zu einer Depolarisation der Zellmembran, sondern außerdem zu einem P2X₇R-bedingten Ca²⁺-Einstrom. Dieser kom-

pensiert die depolarisationsbedingte Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms. Bei höheren BzATP-Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) wird so ein $\text{P2X}_7\text{R}$ -abhängiger Ca^{2+} -Einstrom erzeugt, der zunehmend das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal maskiert und quantitativ übertrifft. Der $\text{P2X}_7\text{R}$ -abhängige Effekt auf das BZR-abhängige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal konnte durch die Erhöhung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration, durch Na^+ -freie Lösungen oder durch die Verwendung des hyperpolarisierenden K^+ -Ionophors Valinomycin aufgehoben werden, was die These des $\text{P2X}_7\text{R}$ -abhängigen, depolarisationsbedingten Effektes auf das BZR induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal untermauert.

Unter pathophysiologischen Bedingungen können ATP-Konzentrationen bis $100 \mu\text{M}$ im Extrazellularraum auftreten (Di Virgilio *et al.* 1996), die sich normalerweise nur im nanomolaren Bereich befinden (Burnstock 2007). Aus den hier gewonnenen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass extrazelluläres ATP in mirkomolaren Konzentrationen die Potenz besitzt, das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal zu modulieren. Dies stellt möglicherweise eine neue immunologische Funktion des $\text{P2X}_7\text{R}$ dar, da viele $\text{P2X}_7\text{R}$ -induzierte Zellwirkungen bisher nur nach langer Stimulation mit millimolaren Konzentrationen von ATP gezeigt wurden. Der modulierende Einfluss des $\text{P2X}_7\text{R}$ auf das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal könnte womöglich Auswirkung auf nachfolgende Signale, wie die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und $\text{NF-}\kappa\text{B}$ oder die Antigen-Aufnahme haben. Ob dies tatsächlich der Fall ist, müssen weitere Untersuchungen in diesem Bereich ergeben.

7 Literatur

- Abbracchio MP, Burnstock G: Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78 (1998) 113-145
- Adinolfi E, Pizzirani C, Idzko M, Panther E, Norgauer J, Di Virgilio F, Ferrari D: P2X₇ receptor: Death or life? *Purinergic Signal* 1 (2005) 219-227
- Aga M, Watters JJ, Pfeiffer ZA, Wiepz GJ, Sommer JA, Bertics PJ: Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF- κ B signaling pathways in murine RAW 264.7 macrophages. *Am J Physiol* 286 (2004) C923-C930
- Amstrup J, Novak I: P2X₇ receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. *Biochem J* 374 (2003) 51-61
- Baricordi OR, Ferrari D, Melchiorri L, Chiozzi P, Hanau S, Chiari E, Rubini M, Di Virgilio F: An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood* 87 (1996) 682-690
- Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buell G, Di Virgilio F: Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X₇ ATP receptor. *J Biol Chem* 274 (1999) 33206-33208
- Bean BP: Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 13 (1992) 87-90
- Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, Markwardt F: The P2X₇ carboxyl tail is a regulatory module of P2X₇ receptor channel activity. *J Biol Chem* 283 (2008) 25725-25734
- Becker KP, Hannun YA: Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *CMLS-Cell Mol Life Sci* 62 (2005) 1448-1461
- Berridge MJ: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361 (1993) 315-325
- Berridge MJ: The AM and FM of calcium signalling. *Nature* 386 (1997) 759-760
- Berridge MJ, Tayler CW: Inositol triphosphate and calcium signaling. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 8 (1988) 927-933
- Bird GS, Putney JW: Capacitative calcium entry supports calcium oscillations in human embryonic kidney cells. *J Physiol (Lond)* 562 (2005) 697-706
- Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P: A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X₂ ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275 (2000) 10190-10195
- Bradford MD, Soltoff SP: P2X₇ receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *Biochem J* 366 (2002) 745-755

- Brändle U, Spielmanns P, Osteroth R, Sim J, Surprenant A, Buell G, Ruppersberg JP, Plinkert PK, Zenner HP, Glowatzki E: Desensitization of the P2X₂ receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett* 404 (1997) 294-298
- Brandman O, Liou J, Park WS, Meyer T: STIM2 Is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell* 131 (2007) 1327-1339
- Bretschneider F, Klapperstück M, Löhn M, Markwardt F: Nonselective cationic currents elicited by extracellular ATP in human B-lymphocytes. *Pflügers Arch* 429 (1995) 691-698
- Broom DC, Matson DJ, Bradshaw E, Buck ME, Meade R, Coombs S, Matchett M, Ford KK, Yu W, Yuan J, Sun SH, Ochoa R, Krause JE, Wustrow DJ, Cortright DN: Characterization N-(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-amino-pyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chloro-benzamide (AACBA), a P2X₇ antagonist in animal models of pain and inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 327 (2008) 620-633
- Brown BK, Song WX: The actin cytoskeleton is required for the trafficking of the B cell antigen receptor to the late endosomes. *Traffic* 2 (2001) 414-427
- Budagian V, Bulanova E, Brovko L, Orinska Z, Fayad R, Paus R, Bulfone-Paus S: Signaling through P2X₇ receptor in human T cells involves p56^{lck}, kinases, and transcription factors AP-1 and NF-κB. *J Biol Chem* 278 (2003) 1549-1560
- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Hein M, Petersen F, Thon L, Adam D, Bulfone-Paus S: Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X₇ receptor in murine mast cells. *J Immunol* 174 (2005) 3880-3890
- Burnstock G: Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24 (1972) 509-581
- Burnstock, G. (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*, pp. 107-118. Eds L. Bolis, R. W. Straub. New York.
- Burnstock G: Purinoceptors: Ontogeny and phylogeny. *Drug Dev Res* 39 (1996) 204-242
- Burnstock G: Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27 (2006) 166-176
- Burnstock G: Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87 (2007) 659-797
- Burnstock G, Kennedy C: Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor ? *Gen Pharmacol* 16 (1985) 433-440
- Caballero A, Katkere B, Wen XY, Drake L, Nashar TO, Drake JR: Functional and structural requirements for the internalization of distinct BCR-ligand complexes. *Eur J Immunol* 36 (2006) 3131-3145
- Cario-Toumaniantz C, Loirand G, Ferrier L, Pacaud P: Non-genomic inhibition of human P2X₇ purinoceptor by 17β-oestradiol. *J Physiol (Lond)* 508 (1998) 659-666
- Carroll WA, Donnelly-Roberts D, Jarvis MF: Selective P2X₇ receptor antagonists for chronic inflammation and pain. *Purinergic Signal* 5 (2009) 63-73

- Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA: Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* 7 (1997) 69-81
- Chen LF, Brosnan CF: Regulation of immune response by P2X₇ receptor. *Crit Rev Immunol* 26 (2006) 499-513
- Cheng PC, Cherukuri A, Dykstra M, Malapati S, Sproul T, Chen MR, Pierce SK: Floating the raft hypothesis: the roles of lipid rafts in B cell antigen receptor function. *Semin Immunol* 13 (2001) 107-114
- Choquet D, Ku G, Cassard S, Malissen B, Korn H, Fridman WH, Bonnerot C: Different patterns of calcium signaling triggered through two components of the B lymphocyte antigen receptor. *J Biol Chem* 269 (1994) 6491-6497
- Chung SC, Limnander A, Kurosaki T, Weiss A, Korenbrot JI: Coupling Ca²⁺ store release to Icrac channel activation in B lymphocytes requires the activity of Lyn and Syk kinases. *J Cell Biol* 177 (2007) 317-328
- Coggeshall KM, McHugh JC, Altman A: Predominant Expression and Activation-Induced Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase C γ 2 in Lymphocytes-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 5660-5664
- Conigrave AD, Fernando KC, Gu B, Tasevski V, Zhang WY, Luttrell BM, Wiley JS: P2Y₁₁ receptor expression by human lymphocytes: evidence for two cAMP-linked purinoceptors. *Eur J Pharmacol* 426 (2001) 157-163
- Demaurex N, Schlegel W, Varnai P, Mayr G, Lew DP, Krause KH: Regulation of Ca²⁺ influx in myeloid cells. Role of plasma membrane potential, inositol phosphates, cytosolic free [Ca²⁺], and filling state of intracellular Ca²⁺ stores. *J Clin Invest* 90 (1992) 830-839
- Di Virgilio F: Liaisons dangereuses: P2X₇ and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28 (2007) 465-472
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, Baricordi OR: Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* 5 (1998) 191-199
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR: Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97 (2001) 587-600
- Di Virgilio, F., Ferrari, D., Falzoni, S., Chiozzi, P., Munerati, M., Steinberg, T. H., and Baricordi, O. R. (1996) P2 purinoceptors in the immune system. In: *P2 Purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms*, pp. 290-305. Wiley: Chichester.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI: Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386 (1997) 855-858

- Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Surber B, Vaidyanathan SX, Perez-Medrano A, Wang Y, Carroll WA, Jarvis MF: [³H]A-804598 ([³H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X₇ receptors. *Neuropharmacology* 56 (2009) 223-229
- Dono M, Zupo S, Colombo M, Massara R, Gaidano G, Taborelli G, Ceppa P, Burgio VL, Chiorazzi N, Ferrarini M: The human marginal zone B cell. *Ann N Y Acad Sci* 987 (2003) 117-124
- Drury AN, Szent-Györgyi A: The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon mammalian heart. *J Physiol (Lond)* 68 (1929) 213-237
- Dubyak GR: Go it alone no more - P2X₇ joins the society of heteromeric ATP-gated ion channel receptors. *Mol Pharmacol* 72 (2007) 1402-1405
- Duszynski J, Koziel R, Brutkowski W, Szczepanowska J, Zablocki K: The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* 1757 (2006) 380-387
- Egan TM, Haines WR, Voigt MM: A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X₂ receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J Neurosci* 18 (1998) 2350-2359
- Emmelin N, Feldberg W: Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br J Pharmacol Chemother* 3 (1948) 273-284
- Engelke M, Engels N, Dittmann K, Stork B, Wienands J: Ca²⁺ signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev* 218 (2007) 235-246
- Evans RJ: Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors. *Eur Biophys J* 38 (2009) 319-327
- Fernando KC, Gargett CE, Wiley JS: Activation of the P2Z/P2X₇ receptor in human lymphocytes produces a delayed permeability lesion: involvement of phospholipase D₁. *Arch Biochem Biophys* 362 (1999) 197-202
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dalsusino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F: Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 159 (1997) 1451-1458
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F: The P2X₇ receptor: A key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176 (2006) 3877-3883
- Feske S: Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7 (2007) 690-702
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U, Williams M: Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18 (1997) 79-82
- Fujii T, Kawashima K: Ca²⁺ oscillation and c-fos gene expression induced via muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362 (2000) 14-21
- Gargett CE, Cornish EJ, Wiley JS: Phospholipase D activation by P2Z-purinoreceptor agonists in human lymphocytes is dependent on bivalent cation influx. *Biochem J* 313 (1996) 529-535

- Gargett CE, Wiley JS: The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 120 (1997) 1483-1490
- Geisberger R, Cramer R, Achatz G: Models of signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Immunology* 110 (2003) 401-410
- Gillespie JH: The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol (Lond)* 80 (1934) 345-349
- Gu B, Bendall LJ, Wiley JS: Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* 92 (1998) 946-951
- Gu BJ, Zhang WY, Bendall LJ, Chessell IP, Buell GN, Wiley JS: Expression of P2X₇ purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: Evidence for nonfunctional P2X₇ receptors. *Am J Physiol* 279 (2000) C1189-C1197
- Gu BJ, Zhang WY, Worthington RA, Sluyter R, Dao-Ung P, Petrou S, Barden JA, Wiley JS: A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X₇ receptor. *J Biol Chem* 276 (2001) 11135-11142
- Gudipaty L, Munetz J, Verhoef PA, Dubyak GR: Essential role for Ca²⁺ in regulation of IL-1 β secretion by P2X₇ nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells. *Am J Physiol* 285 (2003) C286-C299
- Guo BC, Kato RM, Garcia-Lloret M, Wahl MI, Rawlings DJ: Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity* 13 (2000) 243-253
- Harnett MM: B cells spread and gather. *Science* 312 (2006) 709-710
- Hashimoto S, Iwamatsu A, Ishiai M, Okawa K, Yamadori T, Matsushita M, Baba Y, Kishimoto T, Kurosaki T, Tsukada S: Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK - functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood* 94 (1999) 2357-2364
- Healy JI, Dolmetsch RE, Timmerman LA, Cyster JG, Thomas ML, Crabtree GR, Lewis RS, Goodnow CC: Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity* 6 (1997) 419-428
- Hibell AD, Kidd EJ, Chessell IP, Humphrey PPA, Michel AD: Apparent species differences in the kinetic properties of P2X₇ receptors. *Br J Pharmacol* 130 (2000) 167-173
- Hoek KL, Antony P, Lowe J, Shinnars N, Sarmah B, Wente SR, Wang DM, Gerstein RM, Khan WN: Transitional B cell fate is associated with developmental stage-specific regulation of diacylglycerol and calcium signaling upon B cell receptor engagement. *J Immunol* 177 (2006) 5405-5413
- Holton P: The liberation of ATP on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol (Lond)* 145 (1959) 494-504

- Hu Y, Fiset PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ: Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 273 (1998) 27170-27175
- Hughes J, Hatcher J, Chessell I: The role of P2X₇ in pain and inflammation. *Purinergic Signal* 3 (2007) 163-169
- Jacobson KA, Costanzi S, Kim SK, Roh E, Joshi BV, Tchilibon S, Duong HT, Gao ZG: Action of nucleosides and nucleotides at 7 transmembrane-spanning receptors. *Nucleos Nucleot Nucleic Acids* 25 (2006) 1425-1436
- Jamieson GP, Snook MB, Thurlow PJ, Wiley JS: Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors. *J Cell Physiol* 166 (1996) 637-642
- Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo XN, Surprenant A, North RA: Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 23 (2003) 8903-8910
- Jiang LH, MacKenzie AB, North RA, Surprenant A: Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X₇ receptors. *Mol Pharmacol* 58 (2000) 82-88
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E: Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state. *Nature* 460 (2009) 592-598
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A: Proteomic and functional evidence for a P2X₇ receptor signalling complex. *EMBO J* 20 (2001) 6347-6358
- Kim YJ, Sekiya F, Poulin B, Bae YS, Rhee SG: Mechanism of B-cell receptor-induced phosphorylation and activation of phospholipase C γ 2. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 9986-9999
- Klapperstück M, Büttner C, Böhm T, Schmalzing G, Markwardt F: Characteristics of P2X₇ receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1467 (2000a) 444-456
- Klapperstück M, Büttner C, Nickel P, Schmalzing G, Lambrecht G, Markwardt F: Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X₁ and P2X₇ receptors. *Eur J Pharmacol* 387 (2000b) 245-252
- Klapperstück M, Büttner C, Schmalzing G, Markwardt F: Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X₇ receptor. *J Physiol (Lond)* 534 (2001) 25-35
- Kochukov MY, Ritchie AK: P2X₇ receptor stimulation of membrane internalization in a thymocyte cell line. *J Membr Biol* 204 (2005) 11-21
- Kurosaki T: Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 9 (1997) 309-318
- Kurosaki T: Functional dissection of BCR signaling pathways. *Curr Opin Immunol* 12 (2000) 276-281
- Kurosaki T, Tsukada S: BLNK: Connecting Syk and Btk to calcium signals. *Immunity* 12 (2000) 1-5
- Le Stunff H, Auger R, Kanellopoulos J, Raymond MN: The Pro-451 to leu polymorphism within the C-terminal tail of P2X₇ receptor impairs cell death but not phospholipase D activation in murine thymocytes. *J Biol Chem* 279 (2004) 16918-16926

- Lievremont JP, Numaga T, Vazquez G, Lemonnier L, Hara Y, Mori E, Trebak M, Moss SE, Bird GS, Mori Y, Putney JW: The role of canonical transient receptor potential 7 in B-cell receptor-activated channels. *J Biol Chem* 280 (2005) 35346-35351
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Meyer T: STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr Biol* 15 (2005) 1235-1241
- Löhn M, Klapperstück M, Riemann D, Markwardt F: Sodium block and depolarization diminish P2Z-dependent Ca^{2+} entry in human B lymphocytes. *Cell Calcium* 29 (2001) 395-408
- Luik RM, Wang B, Prakriya M, Wu MM, Lewis RS: Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* (2008)
- Markwardt F, Löhn M, Böhm T, Klapperstück M: Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *J Physiol (Lond)* 498 (1997) 143-151
- Mercer JC, DeHaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS, Putney JW: Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem* 281 (2006) 24979-24990
- Miyakawa T, Maeda A, Yamazawa T, Hirose K, Kurosaki T, Iino M: Encoding of Ca^{2+} signals by differential expression of IP3 receptor subtypes. *EMBO J* 18 (1999) 1303-1308
- Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Rippa M, Di Virgilio F: Oxidized ATP - an irreversible inhibitor of the macrophage purinergic-P2Z receptor. *J Biol Chem* 268 (1993) 8199-8203
- Nakanishi T, Gu H, Momma K: Effect of acidosis on contraction, intracellular pH and calcium in the rabbit mesenteric small artery. *J Mol Cell Cardiol* 28 (1996) 1715-1726
- Nicke A, Bäumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G: P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: A novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17 (1998) 3016-3028
- Nishida M, Sugimoto K, Hara Y, Mori E, Morii T, Kurosaki T, Mori Y: Amplification of receptor signalling by Ca^{2+} entry-mediated translocation and activation of PLC γ 2 in B lymphocytes. *EMBO J* 22 (2003) 4677-4688
- North RA: Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82 (2002) 1013-1067
- North RA, Surprenant A: Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40 (2000) 563-580
- Oh-Hora M, Rao A: Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20 (2008) 250-258
- Ostern P, Parnas K: Über die Auswertung von Adenosinderivaten am überlebenden Froschherz. *Biochem Z* 248 (1932) 389-397
- Panenka W, Jijon H, Herx LM, Armstrong JN, Feighan D, Wei T, Yong VW, Ransohoff RM, MacVicar BA: P2X₇-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 21 (2001) 7135-7142

- Pelegrin P, Surprenant A: Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *EMBO J* 25 (2006) 5071-5082
- Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, Parker I, Cahalan MD: The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* 456 (2008) 116-120
- Penner R, Matthews G, Neher E: Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature* 334 (1988) 499-504
- Perregaux DG, Labasi J, Laliberte R, Stam E, Solle M, Koller B, Griffiths R, Gabel CA: Interleukin-1 β posttranslational processing - Exploration of P2X₇ receptor involvement. *Drug Dev Res* 53 (2001) 83-90
- Pfeiffer ZA, Aga M, Prabhu U, Watters JJ, Hall DJ, Bertics PJ: The nucleotide receptor P2X₇ mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J Leukoc Biol* 75 (2004) 1173-1182
- Pleiman CM, Dambrosio D, Cambier JC: The B-cell antigen receptor complex: Structure and signal transduction. *Immunol Today* 15 (1994) 393-399
- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG: Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443 (2006) 230-233
- Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50 (1998) 413-492
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A: The permeabilizing ATP receptor, P2X₇ - Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272 (1997) 5482-5486
- Reth M, Hombach J, Wienands J, Campbell KS, Chien N, Justement LB, Cambier JC: The B-cell antigen receptor complex. *Immunol Today* 12 (1991) 196-201
- Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F: Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X₇ receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 93 (2007) 846-858
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang SY, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA: STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169 (2005) 435-445
- Saito K, Tolias KF, Saci A, Koon HB, Humphries LA, Scharenberg A, Rawlings DJ, Kinet JP, Carpenter CL: BTK regulates PtdIns-4,5-P₂ synthesis: Importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity* 19 (2003) 669-678
- Scharenberg AM, Humphries LA, Rawlings DJ: Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol* 7 (2007) 778-789
- Schilling WP, Sinkins WG, Estacion M: Maitoxin activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X₇-like cytolytic pore in human skin fibroblasts. *Am J Physiol* 277 (1999) C755-C765
- Schubert R: A program for calculating multiple metal-ligand solutions. *Comp Meth Progr Biomed* 33 (1990) 93-94

- Seyffert C, Schmalzing G, Markwardt F: Dissecting individual current components of co-expressed human P2X₁ and P2X₇ receptors. *Curr Top Med Chem* 4 (2004) 1719-1730
- Sluyter R, Barden JA, Wiley JS: Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. *Cell Tissue Res* 304 (2001) 231-236
- Sluyter R, Wiley JS: Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X₇ receptors. *Int Immunol* 14 (2002) 1415-1421
- Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, Petrou S: P2X₇ receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem* 278 (2003) 8853-8860
- Smyth JT, Lemonnier L, Vazquez G, Bird GS, Putney JW: Dissociation of regulated trafficking of TRPC3 channels to the plasma membrane from their activation by phospholipase C. *J Biol Chem* 281 (2006) 11712-11720
- Sneyd J, Tsaneva-Atanasova K, Yule DI, Thompson JL, Shuttleworth TJ: Control of calcium oscillations by membrane fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 1392-1396
- Sperligh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P: P2X₇ receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78 (2006) 327-346
- Stokes L, Jiang LH, Alcaraz L, Bent J, Bowers K, Fagura M, Furber M, Mortimore M, Lawson M, Theaker J, Laurent C, Braddock M, Surprenant A: Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X₇ receptors, AZ11645373. *Br J Pharmacol* (2006)
- Stoop R, Thomas S, Rassendren F, Kawashima E, Buell G, Surprenant A, North RA: Contribution of individual subunits to the multimeric P2X₂ receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol Pharmacol* 56 (1999) 973-981
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G: The cytolytic P_{2Z} receptor for extracellular ATP identified as a P_{2X} receptor (P2X₇). *Science* 272 (1996) 735-738
- Takata M, Sabe H, Hata A, Inazu T, Homma Y, Nukada T, Yamamura H, Kurosaki T: Tyrosine kinases lyn and syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J* 13 (1994) 1341-1349
- Taylor CW: Inositol trisphosphate receptors: Ca²⁺-modulated intracellular Ca²⁺ channels. *Biochim Biophys Acta* 1436 (1998) 19-33
- Taylor CW, Tovey SC: What's in store for Ca²⁺ oscillations? *J Physiol (Lond)* 562 (2005) 645
- Tolar P, Sohn HW, Pierce SK: The initiation of antigen-induced B cell antigen receptor signaling viewed in living cells by fluorescence resonance energy transfer. *Nat Immunol* 6 (2005) 1168-1176
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM: Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits - Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274 (1999) 6653-6659

- Vascotto F, Le Rouz D, Lankar D, Faure-Andre G, Vargas P, Guermonprez P, Lennon-Dumenil AM: Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking. *Curr Opin Immunol* 19 (2007) 93-98
- Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL: Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 278 (2003) 29031-29040
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A: Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor. *Neuropharmacology* 36 (1997) 1285-1294
- Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A: Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X₇ receptor. *J Physiol (Lond)* 519 (1999) 335-346
- von Kügelgen I: Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110 (2006) 415-432
- Wedd AM: The action of adenosine and certain related compounds on the coronary flow of the perfused heart of the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 41 (1931) 355-366
- Wienands J: Unraveling B cell receptor mechanics. *Nat Immunol* 6 (2005) 1072-1074
- Wiley JS, Chen JR, Snook MB, Jamieson GP: The P_{2Z}-Purinoceptor of human lymphocytes: Actions of nucleotide agonists and irreversible inhibition by oxidized ATP. *Br J Pharmacol* 112 (1994) 946-950
- Wiley JS, Chen R, Jamieson GP: The ATP⁴⁻ receptor-operated channel (P_{2Z} class) of human lymphocytes allows Ba²⁺ and ethidium⁺ uptake: inhibition of fluxes by suramin. *Arch Biochem Biophys* 305 (1993) 54-60
- Wiley JS, Dubyak GR: Extracellular adenosine triphosphate increases cation permeability of chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood* 73 (1989) 1316-1323
- Worthington RA, Smart ML, Gu BJ, Williams DA, Petrou S, Wiley JS, Barden JA: Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X₇ receptor function. *FEBS Lett* 512 (2002) 43-46
- Yeromin AV, Zhang SYL, Jiang WH, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD: Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443 (2006) 226-229
- Zhang SYL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD: STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437 (2005) 902-905

8 Tabellenanhang

8.1 Pufferlösungen

Tab. 5: Zusammensetzung und die in der Arbeit verwendeten Kürzel der Pufferlösungen

Kürzel	Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	1,9 mM NaH ₂ PO ₄ ; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 154 mM NaCl; pH (7,2-7,4)
A	Standard-Lösung	140 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 10 mM Glukose; 10 mM Hepes; 0,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; pH (7,2)
B	Lösung ohne Ca ²⁺	140 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 10 mM Glukose; 10 mM Hepes; 0,5 mM MgCl ₂ ; 0 mM CaCl ₂ ; pH (7,2)
C	Lösung mit 2,5 mM Mg ²⁺	40 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 10 mM Glukose; 10 mM Hepes; 2,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; pH (7,2)
D	Lösung mit 5,5 mM Mg ²⁺	140 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 10 mM Glukose; 10 mM Hepes; 5,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; pH (7,2)
E	Lösung mit 70 mM K ⁺	75,5 mM NaCl, 70 mM KCl, 10 mM Glukose; 10 mM Hepes; 0,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; pH (7,2)
F	Lösung mit 140 mM K ⁺	5,4 mM NaCl; 140 mM KCl; 10 mM Glukose; 10 mM Hepes; 0,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; pH (7,2)
G	Na ⁺ -freie Lösung	140 mM Tris ⁺ ; 5,4 mM KCl; 10 mM Glukose; 10 mM Hepes; 0,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; pH (7,2)

8.2 P2X₇R-Agonisten

Tab. 6: Ionenkonzentration, Zusammensetzung und in der Arbeit verwendeten Kürzel der Agonisten-Lösungen

Kürzel	Bezeichnung	Zusammensetzung
BzA	100 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 0,5 mM Mg ²⁺)	Puffer (B); 1,68 mM CaCl ₂ ; 1,28 mM BzATP-Stammlösung
BzB	30 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 0,5 mM Mg ²⁺)	Puffer (B); 1,28 mM CaCl ₂ ; 0,448 mM BzATP-Stammlösung
BzC	10 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 0,5 mM Mg ²⁺)	Puffer (B); 1,069 mM CaCl ₂ ; 0,16 mM BzATP-Stammlösung
BzD	5 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 0,5 mM Mg ²⁺)	2,5 ml BzC ad 2,5 ml Puffer (A)
BzE	1 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 0,5 mM Mg ²⁺)	2,5 ml BzD ad 25 ml Puffer (A)
BzF	0,1 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 0,5 mM Mg ²⁺)	5 ml BzE ad 50 ml Puffer (A)
BzG	0,01 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 0,5 mM Mg ²⁺)	5 ml BzF ad 50 ml Puffer (A)
BzH	0,001 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 0,5 mM Mg ²⁺)	5 ml BzG ad 50 ml Puffer (A)
BzI	1 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 2,5 mM Mg ²⁺) = 0,35 μ M BzATP ⁴⁻ frei	5 ml BzE + 62 μ l MgCl ₂
BzJ	1 μ M BzATP (1 mM Ca ²⁺ ; 5,5 mM Mg ²⁺) = 0,18 μ M BzATP ⁴⁻ frei	5 ml BzE + 125 μ l MgCl ₂
BzK	10 μ M BzATP (0 mM Ca ²⁺ ; 0,5 mM Mg ²⁺)	Puffer (B); 0,1 mM EGTA; 0,088 BzATP Stammlösung

BzL	1 μ M BzATP (0 mM Ca^{2+} ; 0,5 mM Mg^{2+})	2,5 ml BzK ad 25 ml Puffer (B)
AA	120 μ M ATP	Puffer (B); 1,82 mM CaCl_2 ; 1,5mM Na-ATP
AB	87 μ M ATP	Puffer (B); 1,6 mM CaCl_2 ; 1 mM Na-ATP
AC	100 μ M ATP	Puffer (B); 1,68 mM CaCl_2 ; 1,28 mM Na-ATP
AD	50 μ M ATP	Puffer (B); 1,34 mM CaCl_2 ; 0,7 mM Na-ATP
AE	30 μ M ATP	0,3 ml AC ad 10ml Puffer (A)
AF	10 μ M ATP	0,1 ml AC ad 10ml Puffer (A)
AG	1 mM ATP (Na^+ -frei)	5 ml Puffer (G); 3,93 mM CaCl_2 , 6,45 mM Tris-ATP

9 Thesen

1. Wie in vielen Zellarten stellt auch in B-Lymphozyten Ca^{2+} einen wichtigen intrazellulären zweiten Botenstoff dar, der die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren steuert. In B-Lymphozyten wird eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) durch die B-Zell-Rezeptor (BZR)-induzierte Signalkaskade initiiert.
2. Das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal entsteht durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und einen Ca^{2+} -Freisetzung-induzierten Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum. Der zeitliche Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zeigt initial einen sich rasch aufbauenden, transienten Gipfel. Dieser wird zu ca. 25 % durch die Ca^{2+} -Freisetzung und zu 75% durch den Ca^{2+} -Einstrom erzeugt. Die sich daran anschließende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Plateauphase wird hauptsächlich vom Ca^{2+} -Einstrom getragen.
3. Die Größe des extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms wird durch die vom Membranpotenzial-abhängige treibende Kraft für Ca^{2+} beeinflusst. Depolarisationsmanöver durch K^+ -Lösungen oder durch das Na^+ -Ionophor Gramicidin erzeugen eine deutliche Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Plateauphase und der damit verbundenen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal-Dauer, senken in geringerem Maße aber auch den initialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Gipfel.
4. B-Lymphozyten exprimieren P2X_1 -, P2X_2 -, P2X_4 - und P2X_7 -Rezeptoren, jedoch zeigt ATP Stimulation nur P2X_7 R-vermittelte Ionenströme.
5. Alleinige Stimulation des P2X_7 R durch den nahezu P2X_7 R-selektiven Agonisten BzATP erzeugt konzentrationsabhängig eine Membrandepolarisation. Dies führt im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 5 μM BzATP zu einer P2X_7 R-abhängigen Verkleinerung des transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Gipfels und des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Plateaus des BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals.
6. Höhere BzATP Konzentration ($>5 \mu\text{M}$) induzieren neben einer Membrandepolarisation auch einen Ca^{2+} -Einstrom, der im Minutenbereich zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration führt, die das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal überlagert.
7. Die BzATP-abhängigen Effekte auf das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal werden durch Valinomycin (K^+ -Ionophor) via K^+ -Ausstrom kompensiert. Die Erhöhung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration verringert die freie BzATP^{4-} -Konzentration und hemmt wahrscheinlich noch anderweitig die P2X_7 R-abhängigen Effekte.
8. Alleinige Stimulation des P2X_7 R durch den P2X_7 R-Agonisten ATP ($\leq 120 \mu\text{M}$) erzeugt keinen P2X_7 R-vermittelten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg.
9. ATP-Konzentrationen von 50 μM bis 120 μM führen zu einer Verkleinerung des transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Gipfels und des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Plateaus des BZR-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals.
10. In Na^+ -freier Umgebung verschwinden die ATP-abhängigen Effekte auf das BZR-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal

11. Es gibt keine Hinweise auf P2X₇R-abhängige Effekte auf BZR-induzierte [Ca²⁺]_i-Oszillationsmuster.
12. Extrazelluläres ATP in Konzentrationen, wie sie unter pathophysiologischen Bedingungen beispielsweise im Entzündungsherd vorkommen, sind in der Lage das BZR-abhängige [Ca²⁺]_i-Signal zu modulieren. Die Größe der Modulationsstärke könnte Auswirkung auf nachfolgende Signale, wie die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF-κB haben.

Lebenslauf

Zur Person

Björn Roland Beßler
geboren am 15.05.1982 in Halle/Saale
Familienstand: ledig
wohnhaft in der Gartenstraße 31
in 06507 Bad Suderode

Schulbildung

1989-1993 Grundschole Bad Suderode
1993-2002 Dorothea-Erxleben-Gymnasium in Quedlinburg
2002 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

2002-2003 Ableistung des Zivildienstes in der Paracelsus-Harz-Klinik
in Bad Suderode

Berufliche Ausbildung

2003-2008 Studium der Zahnmedizin an der Medizinischen
Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2006 Beginn der Arbeit als Doktorand unter Betreuung von Prof.
Fritz Markwardt am Julius-Bernstein-Institut der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg
2008 Ablegen der zahnärztlichen Prüfung und Erlangung der Appro-
bation als Zahnarzt

Beruflicher Werdegang

ab 2009 Tätigkeit als Ausbildungsassistent in der Zahnarzt-Praxis Dr.
med. Roland Beßler in 06507 Bad Suderode

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Björn Beßler, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst und die benutzte Literatur, sowie Hilfsmittel vollständig erwähnt habe. Die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich unter Angabe der Quelle als solche kenntlich gemacht.

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

Abschließend versichere ich, dass ich bisher keine weiteren Promotionsversuche im In- oder Ausland unternommen habe und dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in modifizierter Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden ist.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Fritz Markwardt. Im vorklinischen Studium weckte er in mir die Faszination für Physiologie durch seine hervorragende Lehre. Das Interesse für zelluläre Funktionen erzeugte in mir den Wunsch unter seiner Betreuung in diesem Fachgebiet der Medizin promovieren zu dürfen. Im Laufe der letzten vier Jahre arbeitete ich stetig an meiner Promotion und Prof. Markwardt stand mir dabei immer mit vielen Anregungen zur Seite. Er half mir auch durch seine gewaltige Literatursammlung, welche ich uneingeschränkt nutzen durfte.

Außerdem möchte ich ganz besonders Frau Dr. Manuela Klapperstück danken, die in allen Problemlagen für mich da war. Von ihr lernte ich das Handwerkszeug zum Experimentieren. Gerade auf dem steinigen Weg der Methodenentwicklung war sie meine größte Hilfe. Des Weiteren möchte ich ihr für die Unterstützung bei der Tonsillenpräparation recht herzlich danke sagen.

Schließlich möchte ich noch Monika Schmidt für die Lösungsherstellung danken, was mein Vorkommen beschleunigte.

Zurückblickend kann ich sagen, dass ich mich in dieser Arbeitsgruppe sehr wohl gefühlt habe, was das Arbeiten unglaublich erleichterte. Auch wenn es manche experimentelle Hürden zu überwinden galt und ich gerade am Anfang meiner Arbeit nicht wusste, ob der eingeschlagene, experimentelle Weg zum Ziel führen würde, fühlte ich mich doch niemals allein, sondern aufgenommen in ein Team mit einem gemeinsamen Ziel.

Doch diese Forschungsarbeit wäre nicht möglich gewesen, wären da nicht meine Eltern gewesen, die mir in meiner Entwicklung gelehrt haben wie man sein eigenes Leben gestaltet und Träume in die Tat umsetzt. Wie in allen meinen bisherigen Lebensabschnitten unterstützen sie mich auch in meiner Studienzeit und gaben mir Rückhalt und Zuversicht. Aus diesem Grund widme ich Ihnen diese Arbeit aus tiefer Dankbarkeit und Liebe. Dabei denke ich ganz besonders an meine verstorbene Mutter, die zwar den Beginn, leider aber nicht mehr die Fertigstellung dieser Arbeit erleben durfte. Im Herzen weiß ich jedoch, wie sie sich mit uns gefreut hätte.