

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

Einfluss des pH-Wertes auf die Funktion von P2X₇-Rezeptoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Bente Flittiger

geboren am 13.11.1982

in Rendsburg

Betreuer: Prof. Dr. Fritz Markwardt

Gutachter: 1. Prof. Dr. F. Markwardt

2. Prof. Dr. K. Benndorf (Jena)

3. Prof. Dr. Dr. h.c. P. Illes (Leipzig)

11.05.2010

07.12.2010

Referat

Humane purinerge P2X₇-Rezeptoren (P2X₇R) werden auf einer Reihe von Zelltypen, insbesondere auf B-Lymphozyten und Makrophagen exprimiert. Den P2X₇R werden wichtige Funktionen bei pathophysiologischen Vorgängen wie Hypoxie und Inflammation zugeschrieben. Hypoxie und Inflammation verursachen einen niedrigen pH-Wert, also einen hohen Gehalt an freien Protonen im Extrazellularraum. Ziel dieser Arbeit war es, eine differenzierte Betrachtung der Beeinflussung der P2X₇R-abhängigen Ströme durch Protonen vorzunehmen. Die P2X₇R-Aktivierung erfolgte durch die Applikation der Agonisten ATP und BzATP an hP2X₇R heterolog exprimierenden *Xenopus laevis*-Oozyten. Zusätzlich zur Untersuchung des P2X₇R erfolgte die experimentelle Untersuchung der Mutante hP2X₇^{S339Y}R und des humanen P2X₂R.

Es konnte belegt werden, dass der P2X₇R über Ligandenbindungsstellen unterschiedlicher Affinität verfügt. Es zeigte sich weiterhin, dass der Rezeptor einer komplexen Beeinflussung durch Protonen unterliegt. Zum einen erfolgt eine elektrovalente Bindung des ATP durch Protonen, wodurch der Anteil des freien ATP (ATP⁴⁻, respektive BzATP⁴⁻) abnimmt. Hiermit erfolgt eine Erniedrigung der Potenz der Agonisten ATP bzw. BzATP bei niedrigen pH-Werten. Zum anderen erfolgt eine allosterische Beeinflussung des P2X₇R durch Protonen, die eine Erniedrigung der Wirksamkeit der Agonisten verursacht.

Die Untersuchung der Mutante hP2X₇^{S339Y}R zeigte, dass diese ausschließlich über eine funktionelle Ligandenbindungsstelle von hoher Affinität verfügt und dass hier im Gegensatz zum Wildtyp keine allosterische Beeinflussung des Rezeptorproteins durch Protonen erfolgt.

Die Untersuchung des hP2X₂R ergab keine Abhängigkeit der ATP-induzierten Ströme von der freien Protonen-Konzentration.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	III
1.	Einleitung.....	1
1.1	Purinozeptoren.....	1
1.2	P2X-Rezeptoren.....	2
1.3	Der P2X ₂ -Rezeptor	5
1.3.1	Agonisten.....	6
1.3.2	Antagonisten.....	6
1.3.3	pH-Abhängigkeit des P2X ₂ -Rezeptors	7
1.4	Der P2X ₇ -Rezeptor	8
1.4.1	Lokalisation und biologische Bedeutung.....	9
1.4.2	Die Rezeptorstruktur.....	11
1.4.3	Signaltransduktion	12
1.4.4	Agonisten.....	13
1.4.5	Antagonisten und Inaktivierung	14
1.4.6	Leitfähigkeitseigenschaften und Porenbildung.....	15
1.4.7	pH-Abhängigkeit des P2X ₇ -Rezeptors	18
2.	Zielstellung	19
3.	Material und Methodik	20
3.1	Material.....	20
3.2	Methodik.....	20
3.2.1	RNS-Präparation.....	20
3.2.2	Behandlung der Oozyten	20
3.2.3	Elektrophysiologie.....	21
3.2.4	Die freie ATP-Konzentration	23
4.	Ergebnisse.....	26
4.1	Der P2X ₇ -Rezeptor	26
4.1.1	Einfluss des pH auf die Dosisabhängigkeit P2X ₇ -Rezeptor-abhängiger Ströme.....	26
4.1.2	Einfluss des pH auf die P2X ₇ -Rezeptor-abhängigen Ströme bei konstanter Agonisten-Konzentration.....	32
4.1.3	Effekt des pH-Wechsels während der Agonistenapplikation	37
4.2	Der hP2X ₇ ^{S339Y} -Rezeptor	39
4.3	Einfluss der Protonen auf die Deaktivierungskinetik des P2X ₇ -Rezeptors	43
4.4	Der hP2X ₂ -Rezeptor	45
5.	Diskussion	46

5.1	Die pH-Abhängigkeit der Rezeptoren der P2X-Rezeptor-Familie.....	46
5.2	Die pH-Abhängigkeit des hP2X ₂ -Rezeptors.....	48
5.3	Die pH-Abhängigkeit der hochaffinen und niedrigaffinen Ligandenbindungsstellen des hP2X ₇ Rezeptors.....	50
5.3.1	Die pH-Abhängigkeit der hochaffinen Ligandenbindungsstelle	51
5.3.2	Die pH-Abhängigkeit der niedrigaffinen Ligandenbindungsstelle.....	53
5.4	Die Bedeutung der pH-Abhängigkeit des P2X ₇ -Rezeptors	53
6.	Zusammenfassung	58
7.	Literaturverzeichnis	60
8.	Thesen.....	72

Anhang

A1.	Tabellarischer Lebenslauf	
A2.	Selbständigkeitserklärung.....	
A3.	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
A4.	Publikationen	
A5.	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

2-meSATP	2-methyl-thio-Adenosintri-phosphat
A-740003	N-(1-[[[(cyanoimino)(5-quinoliny-lamino) methyl] amino]-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
[ATP ⁴⁺]	Freies Adenosin-5`-triphosphat
ATP _γ S	5`-O-(3-thiotriphosphat)
Ba ⁺	Bariumion
BzATP	3`-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP
Bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalziumion
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase-1	Interleukin-1- Converting (verarbeitendes)-Enzym
Cd ²⁺	Cadmiumion
Co ²⁺	Cobaltion
Cu ²⁺	Kupferion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNS (DNA)	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonukleinacid)
EMP	Epitheliale Membranproteine
ERK 1/2	Durch extrazelluläres Signal regulierte Proteinkinase
Gl.	Gleichung
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
HCl	Hydrochlorid (Salzsäure)
HEK293-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
hP2X ₇ ^{S339Y} R	Mutante des hP2X ₇ R mit Austausch der Aminosäure Serin gegen Tyrosin an Position 339 der Aminosäure-Sequenz
Hsp	Hitzeschockprotein
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-5`-trisphosphat
KCl	Kaliumchlorid

K_D -Wert	Dissoziationskonstante
KN-04	N-[1-[N-methyl-p-(5-isoquinoline sulphonyl)benzyl]-2-(4-phenylpiperazine)ethyl]-5-isoquinolinesulphonamid
KN-62	1-[N,O-bis(5-isoquinolinsulfonyl)-N-Methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin
LPS	Lipopolysaccharid
MAGuK	Membran-assoziierte Guanylatcyclase
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEKK-Kinase	aktiviert MAP-Kinase durch Phosphorylierung
Mg^{2+}	Magnesiumion
Mn^{2+}	Manganion
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NF279	8,8'-(carbonylbis(imino-4,1-phenylenecarbonylimino-4,1-phenylenecarbonylimino))bis(1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid)
Ni^{2+}	Nickelion
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
oATP	Oxidiertes ATP (2',3'-Dialdehyd-ATP)
o.g.	oben genannt
ORi	Oozyten-Ringer-Lösung
(h)P2X ₂ R	(Humaner) P2X ₂ -Rezeptor
(h)P2X ₇ R	(Humaner) P2X ₇ -Rezeptor
oATP	Oxidiertes Adenosintri-phosphat
P2XR	P2X-Rezeptoren
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der freien Protonen-Konzentration
PI4K	Phosphatidylinositol-4-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PKC	Proteinkinase C
pK_D -Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLD	Phospholipase D
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonat
rP2X ₂ R	P2X ₂ -Rezeptor, der aus der DNS der Ratte kloniert wurde
RNS (RNA)	Ribonukleinsäure (Ribonukleinacid)
RPTP β	Rezeptorprotein Tyrosinphosphatase- β

s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Sr^{2+}	Strontiumion
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethylammonium
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
wt	Wildtyp
YO-PRO 1	fluoreszierende Propidium-Verbindung
Zn^{2+}	Zinkion

1. Einleitung

1.1 Purinozeptoren

Purine und Pyrimidine sind im menschlichen Organismus ubiquitär vorkommende Moleküle. Sie sind das Grundgerüst der DNS und RNS und haben größte Bedeutung bei jeglicher Stoffwechselaktivität der Zellen. Doch neben der intrazellulären Funktion ist insbesondere die extrazelluläre Mediatoreigenschaft der Purine zunehmend von Interesse.

Schon 1929 wurden durch die Applikation von Adenosinmonophosphat (AMP) biologische Effekte wie Störungen der Erregungsleitung des Herzens, Vasodilatation, Blutdruckabfall und eine Abnahme der intestinalen Peristaltik beschrieben (Drury and Szent-Györgyi 1929). Die Relevanz zeigt sich heute beispielsweise bei dem Einsatz von intravenös injiziertem Adenosin bei paroxysmalen supraventrikulären Tachykardien im Kindesalter. Bereits fünf Jahre nachdem Drury et al. die ersten Untersuchungen publiziert hatten, erfolgte eine differenziertere Betrachtung der verschiedenen Adenosinderivate. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deaminierung der Moleküle die pharmakologische Wirksamkeit vermindert, eine Entfernung des Pentose-Zuckers einen Wirksamkeitsverlust bewirkt und eine Dephosphorylierung sowohl die pharmakologische Potenz vermindert als auch den Antworttyp beeinflusst. So wurde mit abnehmender Zahl der Phosphatgruppen eine zunehmende Vasodilatation und Blutdrucksenkung verursacht (Gillespie 1934).

Die Adenosinderivate haben neben ihrem Einfluss auf die glatte Muskulatur der Gefäße und des Intestinaltraktes auch Bedeutung bei neurohumoralen Prozessen. So wurde gefunden, dass es bei antidromer Nervenstimulation zu einer ATP-Freisetzung kommt (Holton and Holton 1953; Holton 1959). Erst wesentlich später konnte die Bedeutung des ATP als Transmitter und Cotransmitter und des Adenosins als Neuromodulator näher charakterisiert werden (Edwards and Gibb 1993; White et al. 1995).

Neben den beobachteten Effekten der Adenosinderivate ist für die biologische Bedeutung entscheidend, welcher Stimulus eine Freisetzung bewirkt und aus welchen Zellen die Freisetzung erfolgt. In den siebziger Jahren setzte sich zunehmend der Standpunkt durch, dass Adenosinderivate an der metabolischen Blutflussregulation beteiligt sind, da gezeigt werden konnte, dass es infolge einer Herzmuskelhypoxie zu einer Adenosinfreisetzung (Berne 1963; Gerlach et al. 1963) und infolge einer Belastung der Skelettmuskulatur zu einer ATP-Freisetzung kommt (Boyd and Forrester 1968; Forrester and Lind 1969).

Inzwischen wird den Adenosinderivaten eine vielschichtige Bedeutung bei der Hämatopoese, der Immunantwort, der Schmerzauslösung, der Plättchenaggregation und der Kontraktion der glatten Muskulatur beigemessen. Des Weiteren haben sie kardiozirkulatorischen Effekte,

funktionieren als exokrine und endokrine Mediatoren und dienen als Neurotransmitter (North 2002).

Die unterschiedlichen biologischen Effekte und relativen Potenzen der verschiedenen Adenosinderivate führten im Jahr 1978 zu einer in modifizierter Form bis heute bestehenden Unterteilung der purinergen Rezeptoren in P₁- und P₂-Rezeptoren (Burnstock 1978).

Die P₁-Rezeptoren sind dadurch klassifiziert, dass Adenosin der wirksamste natürliche Agonist ist. Daher sind die Begriffe P₁-Rezeptor und Adenosin-Rezeptor Synonyma. Weiterhin werden diese Rezeptoren durch einen selektiven Antagonismus von Methylxanthin und durch ihren Einfluss auf den intrazellulären Gehalt von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) charakterisiert. Anhand der verschiedenen Molekülstrukturen, pharmakologischen Eigenschaften und dem Vorkommen in verschiedenen Geweben werden die P₁-Rezeptoren in vier verschiedene Subtypen (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) unterteilt. Alle Subtypen sind G-Protein-gekoppelte Membranproteine mit teilweise unterschiedlichen intrazellulären Signalwegen: Es erfolgt entweder eine Aktivierung (A_{2A}) oder Hemmung (A₁, A₃) der Adenylatcyclase und/ oder eine Aktivierung der Phospholipase C (A₁, A_{2B}, A₃).

Die wirksamen Agonisten der P₂-Rezeptoren sind Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Uridindiphosphat (UDP) und Uridintriphosphat (UTP). Die Aktivierung der P₂-Rezeptoren hat entscheidenden Einfluss auf die intrazelluläre Prostaglandinsynthese (Burnstock 1978).

Nachdem sowohl die Existenz von ATP-aktivierten Ionenkanälen 1987 (Benham and Tsien 1987) als auch von G-Protein-gekoppelten ATP-Rezeptoren 1991 (Dubyak 1991) nachgewiesen werden konnte, erfolgte zur systematischen Klassifikation eine Unterteilung der P₂-Rezeptoren anhand der verschiedenen Signaltransduktionsmechanismen in P_{2X}-Rezeptoren (ligandenaktivierte Ionenkanäle) und P_{2Y}-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) (Fredholm et al. 1994; Abbraccio and Burnstock 1994).

Mit der erfolgreichen Klonierung der ersten P_{2X}-Rezeptoren 1994 (Valera et al. 1994; Brake et al. 1994) wurde zum einen die Voraussetzung für eine weiterführende Charakterisierung der einzelnen Subtypen geschaffen, zum anderen wurde offenbar, dass P_{2X}-Rezeptoren in vielerlei Geweben exprimiert werden.

1.2 P_{2X}-Rezeptoren

Die Rezeptoren der P_{2X}-Rezeptor-Familie haben eine weite Verbreitung in vielfältigen Geweben und haben funktionelle Bedeutung in Neuronen, Neuroglia, Epithelien, Gefäßmuskulatur, Knochen, Skelettmuskulatur, Hypophyse und in hämatopoetischem Gewebe. Während den P_{2X}₁₋₆-Rezeptoren vor allem Bedeutung bei der neuronalen Signaltransduktion

zugeschrieben wird, hat der P2X₇-Rezeptor (P2X₇R) seine hauptsächliche physiologische Bedeutung im Bereich der Immunmodulation und Entzündungsantwort (North 2002).

P2X-Rezeptoren (P2XR) sind ligandenaktivierte Ionenkanäle mit einer kurzen Reaktionszeit (< 10 ms). Die Quartärstruktur der Ionenkanäle ist untersucht worden. Diese Untersuchungen legen nahe, dass die Ionenkanäle sich aus drei Rezeptorproteinen zusammensetzen (Nicke et al. 1998, 2008; Barrera et al. 2005; Mio et al. 2005). Die einzelnen Rezeptorproteine sind somit als Untereinheiten des Ionenkanals zu betrachten. Jedes Rezeptorprotein setzt sich aus 384 (P2X₄R) bis 595 Aminosäuren (AS) (P2X₇R) zusammen, bildet zwei transmembranäre Sequenzen, zwischen denen eine extrazelluläre etwa 280 AS lange Sequenz gelegen ist, und intrazellulär gelegene N-terminale und C-terminale Proteinabschnitte. Die Ligandenbindungsstelle liegt in dem schleifenähnlichen extrazellulären Polypeptid (North 2002). Die C-terminalen Sequenzen der Subtypen unterscheiden sich wesentlich, wobei der P2X₇R die längste Sequenz hat. Insgesamt liegt die Sequenzhomologie der Rezeptorproteine bei 40-55 %, wobei der P2X₄R die größte und der P2X₇R die geringste Homologie mit anderen Subtypen aufweist. Es gibt keine Sequenzhomologie mit anderen bekannten Proteinen. Eine gewisse Ähnlichkeit ist nur für die Aminoacyl-tRNS-Synthetase der Klasse II beschrieben worden (Freist et al. 1998). Alle P2XR weisen in der extrazellulären Domäne zehn konservierte Cysteinreste auf, die einen Einfluss auf die Tertiärstruktur im Sinne der Ausbildung von Disulfidbrücken oder einen Einfluss auf die Proteinkonformation durch die Bindung von Kationen haben könnten (Clyne et al. 2002b). Die Rezeptoren der P2XR-Familie haben N-glykosylierbare Sequenzen, denen entscheidende Bedeutung für den Transport an die Zelloberfläche zugewiesen wird (North 2002). Weiterhin scheint für die Lokalisation und die Stabilisierung des Proteins in der Zellmembran eine in allen Subtypen konservierte Sequenz zwischen der zweiten Transmembrandomäne und dem C-Terminus essenziell zu sein, da Veränderungen der AS-Sequenz in diesem Bereich eine verminderte Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche zeigen (Chaumont et al. 2004). Die kürzlich erfolgte Röntgenstrukturanalyse eines Kristalls des P2X₄R des Zebrafisches bestätigte diese durch funktionelle Untersuchungen vermutete Tertiärstruktur der P2XR (Kawate et al. 2009).

Eine Unterscheidung der verschiedenen P2XR kann zum einen anhand ihres pharmakologischen Profils, zum anderen anhand ihres Desensitivierungsverhaltens erfolgen. Pharmakologisch unterscheiden sich die Rezeptoren in $\alpha\beta$ -methyl-ATP-sensitive (P2X₁, P2X₃) und -insensitive (P2X₂, P2X₄₋₇) Subtypen mit unterschiedlicher Antagonistensensitivität.

Das Desensitivierungsverhalten bezeichnet die abnehmende Rezeptorantwort der P2XR-abhängigen Ionenströme auf kontinuierliche oder wiederholte Applikation des Agonisten. Zu den schnell desensitivierenden Rezeptoren zählen der P2X₁R (Rettinger and Schmalzing 2003) und der P2X₃R (Sokolova et al. 2004). Die anderen P2XR werden den nicht (P2X₇R) beziehungsweise langsam desensitivierenden Rezeptoren zugerechnet.

Alle Subtypen der P2XR-Familie sind permeabel für kleine monovalente Kationen, während die Permeabilität für Kalziumionen oder Anionen spezifisch für den jeweiligen Rezeptor ist. Die P2XR sind bei kurzzeitiger Applikation eines Agonisten nahezu impermeabel für Kationen mit einem Molekulargewicht über 200 Da. Die langdauernde Aktivierung der Rezeptoren hP2X_{2,4,7} induziert eine zunehmende Permeabilität der Zellmembran für große organische Kationen (Virginio et al. 1999). Diese Permeabilitätssteigerung ist im Falle des P2X₂R und des P2X₄R schnell reversibel und führt im Gegensatz zum P2X₇R nicht zur Zytolyse (s.u.).

Die P2XR unterscheiden sich in ihrem Aktivierungsverhalten in Abhängigkeit von der Anwesenheit extrazellulärer divalenter Kationen. Ca²⁺ und Mg²⁺ wirken in unterschiedlichem Ausmaß inhibierend auf die Aktivierung aller P2XR (Brake et al. 1994; Stoop et al. 1997; Ding and Sachs 1999a). Die Anwesenheit von Zn²⁺ und Cu²⁺ beeinflusst die Subtypen der P2XR-Familie in unterschiedlicher Weise. Die Anwesenheit von Zn²⁺ (<100 µM) führt zu einer gesteigerten Aktivierung der P2X_{2,4,5,6}R (Le et al. 1998; Xiong et al. 1999), einem unveränderten Aktivierungsverhalten des P2X₃R und einer Inhibition der P2X₁₊₇R (Virginio et al. 1997).

Cu²⁺ inhibiert die Aktivierung des P2X₇R (Virginio et al. 1997; Acuna-Castillo et al. 2000), potenziert die Aktivierung des P2X₂R und bewirkt keine Veränderung in der Aktivierung des P2X₄R (Xiong et al. 1999). Diese verschiedenen Effekte divalenter Kationen legen nahe, dass unterschiedliche Mechanismen für die Beeinflussung der Rezeptoren verantwortlich sind oder dass die Beeinflussung durch verschiedene Bindungsstellen der Rezeptorproteine für divalente Kationen zu Stande kommt.

Die pH-Abhängigkeit der P2XR ist sowohl in neuronalem Gewebe als auch in Zellen des Immunsystems relevant. Im Nervengewebe erfolgt die ATP-Speicherung in präsynaptischen Vesikeln mit saurem pH-Wert (Hollins and Ikeda 1997). Bei der Freisetzung von ATP kommt es auch zu einer Freisetzung von Protonen und somit zu einem Wechsel des pH-Wertes. Eine pH-bedingte veränderte ATP-Empfindlichkeit der Zellen ist wahrscheinlich, zumal gezeigt werden konnte, dass Protonen einen modulierenden Einfluss auf die Funktion der Rezeptoren der P2XR-Familie haben (Stoop et al. 1997; Dixon et al. 2004).

Bei zellulären Belastungssituationen wie bei einer intensiven neuronalen Stimulation, Ischämie oder Entzündung kommt es neben der Freisetzung von Zytokinen zu einer Ansäuerung des Extrazellularraums. Es ist von hohen Protonenkonzentration in entzündetem Gewebe (pH 5,4), nach chirurgischen Eingriffen (pH 5,5), bei kardialer Ischämie (pH 5,7) und in malignen Tumoren berichtet worden (Gerevich et al. 2007). Verlässliche Messungen legen einen Abfall des pH-Wertes auf 6,9 im entzündeten Gewebe nahe (Punna-Moorthy 1987).

Eine Beeinflussung der P2XR durch Protonen kann über verschiedene Mechanismen erfolgen.

Protonen können (Gerevich et al. 2007)

- zur ionischen Bindung von ATP führen,
- die Affinität des Rezeptors für den Agonisten beeinflussen,
- die Aktivierung des Kanals nach der Bindung des Agonisten beeinflussen,
- die Ionenpermeabilität beeinflussen.

1.3 Der P2X₂-Rezeptor

Der P2X₂-Rezeptor (P2X₂R) hat funktionelle Bedeutung bei der Signaltransduktion im zentralen und peripheren Nervensystem. Er wurde erstmals aus Phäochromozytom-(PC12)-Zellen der Ratte kloniert (Brake et al. 1994), während die humane cDNA 1999 aus der Hypophyse amplifiziert werden konnte (Lynch et al. 1999). Das Rezeptorprotein setzt sich aus 472 AS zusammen, wobei die extrazelluläre Sequenz etwa 280 AS beträgt und zehn Cystein- und neun Histidylreste enthält (North 2002).

Verschiedene Splice-Varianten mit unterschiedlicher zytoplasmatischer carboxyterminaler Sequenz sind nachgewiesen und untersucht worden. Sie zeigen eine ähnliche ATP-Sensitivität (EC₅₀), aber eine unterschiedliche Desensitivierungskinetik. Infolge dieser Beobachtung wurde die Hypothese über einen Zusammenhang zwischen der carboxyterminalen Sequenz und dem Desensitivierungsverhalten formuliert (Brändle et al. 1997; Simon et al. 1997; Koshimizu et al. 1998).

Unklar ist nach wie vor die genaue Lokalisation der ATP-Bindungsstelle. Wasserstoffbrücken in der extrazellulären Schleife sind ebenso wie die AS Isoleucin an Position 67 (Ile⁶⁷) und Lysin an Position 69 (Lys⁶⁹) und 308 (Lys³⁰⁸) an der Ausbildung der Bindungsstelle beteiligt (Jiang et al. 2000b; Wilkinson et al. 2006), wobei Lys³⁰⁸ eine Funktion bei der Kanalaktivierung zugeschrieben wird (Cao et al. 2007). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Bindung des ATP zwischen den Untereinheiten des P2X₂R (Marquez-Klaka et al. 2007).

Aller Wahrscheinlichkeit nach liegt der hP2X₂R im nativen Gewebe sowohl als homomerer als auch als heteromerer Komplex vor, da experimentelle Untersuchungen ergeben haben, dass die Eigenschaften der klonierten homomeren und heteromeren Rezeptoren gut mit den Eigenschaften im nativen Gewebe übereinstimmen. Potenziell ist eine Assoziation mit den Untereinheiten der hP2X₁-, P2X₃-, P2X₅- und P2X₆-Rezeptoren möglich (Torres et al. 1999). Ein heteromerer Rezeptor aus hP2X₂- und hP2X₃-Untereinheiten mit eigenen von den homomeren hP2X₂- und hP2X₃-Rezeptoren differierenden kinetischen Eigenschaften konnte nach Koinjektion der RNS beobachtet werden (Radford et al. 1997). Weiterhin wurde der biologische Nachweis der Heteromerenbildung aus hP2X₂R- und hP2X₃R-Untereinheiten in sensorischen Neuronen erbracht (Lewis et al. 1995; McGaraughty et al. 2003; Wu et al. 2004).

Der hP2X₂R wird vor allem in neuronalem Gewebe wie sensiblen Neuronen des Nervus trigeminus und des Hinterhornes des Rückenmarks, in sensorischen Neuronen (gustatorischen Neuronen, Neuronen der Retina, Neuronen des Bulbus olfactorius), in autonomen Ganglienzellen (Neuronen des gastrointestinalen Plexus myentericus, Chemorezeptoren des Glomus caroticum) und in zahlreichen zentralnervösen Strukturen (Substantia nigra, Locus coeruleus, Area tegmentalis ventralis) exprimiert (Buell et al. 1996; Vulchanova et al. 1996). Die funktionelle Bedeutung in den verschiedenen Expressionsgeweben ist nicht abschließend geklärt. Es besteht Evidenz für eine Bedeutung des hP2X₂R bei sensorischer Wahrnehmung, viszeraler Relaxation, neuropathischem Schmerz, Chemorezeption und für eine modulierende Eigenschaft bei neuronaler Signaltransduktion (North 2002; Gever et al. 2006; Surprenant and North 2008).

1.3.1 Agonisten

Bisher sind keine selektiven Agonisten für den P2X₂R bekannt. Eine Aktivierung des Rezeptors erfolgt nahezu äquivalent durch ATP, ATP_γS und 2-meSATP. Die halbmaximale Aktivierung (EC₅₀) des Rezeptors erfolgt bei $19 \pm 3 \mu\text{M}$ ATP (Virginio et al. 1999). Der hP2X₂R ist insensitiv gegenüber α,β -methyl-ATP sowie gegenüber β,γ -methyl-ATP (Valera et al. 1994; Brake et al. 1994; Evans et al. 1995). Cytosin-5'-triphosphat (CTP) und ATP sind die einzigen natürlich vorkommenden auf den P2X₂R wirksamen Triphosphate, während UTP, Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Inosin-5'-triphosphat (ITP) unwirksam sind (King et al. 1997).

Potenzierend auf die Kanalaktivierung wirken niedrige Konzentrationen von freien Zink- und Kupferionen, die dazu in der Lage sind, die ATP-Antwort bis zu verzweifach zu erhöhen (Wildman et al. 1998; Xiong et al. 1999). Einzelkanaluntersuchungen haben ergeben, dass erst die Bindung von drei ATP-Molekülen eine Aktivierung bewirkt, dass die Bindung der verschiedenen ATP-Moleküle nicht unabhängig voneinander, sondern chronologisch und kooperativ erfolgt und dass der Kanal, um in zwei verschiedene Öffnungszustände zu gelangen, vier verschiedene geschlossene Zustände durchläuft (Ding and Sachs 1999a, b, 2000).

1.3.2 Antagonisten

Zurzeit sind keine selektiven Antagonisten für den hP2X₂R bekannt. Die Anwesenheit von divalenten Kationen, ausgenommen Kupfer und Zink (s.o.), wirkt der Kanalaktivierung entgegen. Hemmend auf den Ioneneinstrom wirken mit absteigender Potenz Mangan (Mn^{2+}) > Magnesium (Mg^{2+}) > Kalzium (Ca^{2+}) > Barium (Ba^{2+}). Die Stärke der Hemmung korreliert positiv mit der Ionengröße (Ding and Sachs 1999b, 2000), welches die Vermutung stützt, dass die Blockade durch eine Bindungsstelle für divalente Kationen in der Kanalpore verursacht wird. Hemmend auf die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals wirken die divalenten Kationen in der Potenz $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ (Evans et al. 1996; North 2002). Unter der

Anwesenheit von Ca^{2+} nimmt die maximale Stromstärke ab und es wird eine Desensitivierung des Kanals ausgelöst (Ding and Sachs 2000). Die halbmaximale Inaktivierungskonzentration (IC_{50}) für extrazelluläres Ca^{2+} beträgt 5 mmol/l (Virginio et al. 1998; Ding and Sachs 2000).

Nicht-kompetitive Antagonisten sind Trinitrophenol-ATP, Coomassie Brilliant Blue, Suramin, PPADS und Pyridoxal-5-Phosphat, die aber unspezifisch auch auf andere P2XR wirken (Evans et al. 1995).

1.3.3 pH-Abhängigkeit des P2X₂-Rezeptors

Die pH-Abhängigkeit des P2X₂R ist von besonderem Interesse, da die in Neuronen mit Katecholaminen vergesellschaftete ATP-Speicherung in präsynaptischen Vesikeln bei azidotischem pH (pH 5,4) erfolgt (Hollins and Ikeda 1997). Daher ist bei einer Freisetzung der Transmitter von einer simultanen Beeinflussung des hP2X₂R durch ATP und Hydroniumionen auszugehen. Weiterhin kommt es im Falle von zerebraler Ischämie, Hypoxie oder Schlaganfällen ebenfalls zu einem Absinken des pH-Wertes (s.a 1.2), was einen Einfluss auf die im zentralen und peripheren Nervensystem weit verbreiteten P2X₂R haben kann.

Zahlreiche Untersuchungen der pH-Abhängigkeit der Rezeptoraktivierung und der Stromstärke sind unternommen worden (King et al. 1997; Stoop et al. 1997; Wildman et al. 1998; Ding and Sachs 1999b, 2000; Clyne et al. 2002a, b). Es wurde gezeigt, dass ein saures Milieu (pH-Wert im Bereich von 6,3) fünf- bis zehnfach potenzierend auf die P2X₂R-abhängige ATP-Antwort wirkt. Dabei kommt es zu einer Linksverschiebung der ATP-Dosis-Wirkungs-Kurve ohne Änderung der maximalen Reizantwortstärke bzw. des maximal aktivierenden Stromes. Umgekehrt führt eine Alkalisierung der extrazellulären Lösungen zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve; die Rezeptoraffinität zeigte sich bei einem pH-Wert von 8 vier- bis fünffach vermindert (Ding and Sachs 1999b). Dieser Potenzierungseffekt im sauren Milieu ist einheitlich für ATP-Konzentrationen kleiner als 100 μM beschrieben worden. Im Falle höherer ATP-Dosen ($> 100 \mu\text{M}$) wurden unterschiedliche Ergebnisse publiziert: Einige Arbeiten zeigten, dass der maximal aktivierende Strom vom pH-Wert unbeeinflusst ist (Stoop et al. 1997; Clyne et al. 2002a), andere, dass es im aziden Milieu zu einer Erniedrigung des maximal aktivierenden Stromes kommt (Stoop and Quayle 1998; Skorinkin et al. 2003).

Die differenzierteste Untersuchung der pH-Abhängigkeit des P2X₂R erfolgte durch Ding and Sachs 1999. Sie konnten anhand von Einzelkanaluntersuchungen zeigen, dass es bei Absenkung des pH-Wertes von 7,4 auf 6,3 zu einer Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit und der Aktivierungsrate kommt, während die Amplitude des einzelnen Stroms unverändert bleibt (Ding and Sachs 1999b).

Die Angaben für die maximale Potenzierung der Rezeptoraktivierung differieren von pH 5,5 (Wildman et al. 1998) über pH 6,3 (Stoop et al. 1997) bis pH 6,5 (King et al. 1997). Bei weiterem Absinken des pH-Wertes konnte jeweils keine weitere Steigerung der

Rezeptoraffinität erzielt werden. Die Potenzierung von niedrigem pH und Zn^{2+} scheint nicht additiv zu sein (Wildman et al. 1998), was einen gleichgerichteten Wirkmechanismus nahelegt. Um die durch die Kationen verursachten Effekte genauer zu erklären, wurde durch den Austausch der neun extrazellulären Histidinreste eine Veränderung der Potenzierungseigenschaften untersucht (Clyne et al. 2002a). Bei einer der veränderten Mutanten (His³¹⁹Ala) wurde die Potenzierung durch Protonen aufgehoben, während zwei andere Mutanten (His¹²⁰Ala und His²¹³Ala) den Einfluss von Zink auf die Reizantwort aufhoben. Die daraus abgeleitete Hypothese ist, dass die Histidinreste wesentlich an der Reizantwortstärke beteiligt sind und dass die Bindungsstellen von H^+ und Zn^{2+} an verschiedenen Stellen lokalisiert sind. Die Beobachtung, dass eine Behandlung des Rezeptorproteins mit Diethylpyrocarbonat (DEPC), welches Histidylreste irreversibel denaturiert, ohne Einfluss auf die Rezeptoraffinitätssteigerung war, spricht allerdings dagegen. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass DEPC die Histidinreste überhaupt nicht erreichte und somit keine Denaturierung stattfand (Wildman et al. 1998). Eine Veränderung der ebenfalls extrazellulär lokalisierten Cysteinreste hatte keinen Einfluss auf die pH-Abhängigkeit der Stromstärke, aber auf die Potenzierung durch Zn^{2+} und auf die Potenz der Agonisten (Clyne et al. 2002b).

1.4 Der P2X₇-Rezeptor

Der P2X₇-Rezeptor (P2X₇R) wurde erstmals 1996 von Surprenant et al. aus Makrophagen und Rattenhirn kloniert (Surprenant et al. 1996), 1997 folgte die humane cDNS-Klonierung aus Monozyten (Rassendren et al. 1997). Die Transkription der cDNS des humanen (hP2X₇R) und des Ratten-P2X₇-Rezeptors (rP2X₇R) führt zu einem zu 80 % identischem Rezeptorprotein. Der hP2X₇R ist weniger sensitiv für Agonisten und zeigt schneller deaktivierende Ströme nach Ende der Applikation des Agonisten. In geringerem Ausmaß als der rP2X₇R neigt der hP2X₇R bei langandauernder Applikation eines Agonisten zur Induktion einer Zellmembranpermeabilität für Moleküle mit höherem Molekulargewicht (YO-PRO 1) (Rassendren et al. 1997).

Der P2X₇R ist identisch mit dem früher in Mastzellen, Makrophagen, Fibroblasten, Lymphozyten, Erythrozyten und Leukozyten beschriebenen zytolytischen P2Z-Rezeptor (Dahlquist and Diamant 1974; Gordon 1986; Surprenant et al. 1996).

Im Vergleich zu den anderen Rezeptoren der P2XR-Familie benötigt er für die Aktivierung wesentlich höhere Agonisten-Konzentrationen im Bereich von über 100 μ M ATP (Jacobson et al. 2002), obwohl am hP2X₇R eine weitere hochaffine Bindungsstelle im niedrig mikromolaren Bereich beschrieben worden ist (Klapperstück et al. 2001). Weiterhin wird beim P2X₇R keine Verstärkung, sondern nur eine Hemmung der Aktivierung durch die divalenten Kationen Cu^{2+} und Zn^{2+} verursacht. P2X₇R lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, die für andere P2XR so nicht beschrieben sind (s.u.).

1.4.1 Lokalisation und biologische Bedeutung

Der P2X₇R zeigt die höchste Expression in Epithelzellen und Zellen des Immunsystems. Er ist in Zellen des Knochenmarks und des Bronchialepithels, in Makrophagen und Histozyten (gewebeständigen Makrophagen beispielsweise in Leber und Milz), Lymphozyten und dendritischen Zellen, Zellen der Retina, Osteoblasten und Osteoklasten zu finden (Surprenant et al. 1996; Collo et al. 1997; Mutini et al. 1999; Di Virgilio et al. 2001; Gartland et al. 2001). Dem Rezeptor wird eine Bedeutung bei der Modulation von Immunantwort, Entzündung, Zellproliferation, Zelltod, Elimination intrazellulärer Pathogene, Knochenaufbau und Knochenresorption zugeschrieben (Jiang 2008). Nach der Aktivierung des P2X₇R erfolgt nicht nur die Öffnung eines Ionenkanals, sondern eine vielfältige Antwort auf den Stimulus in Form einer zytoskelettalen Reorganisation, einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und einer Apoptose oder Nekrose (Chen and Brosnan 2006b).

Die Beteiligung des P2X₇R an der Entzündungsantwort wird unter anderem durch die Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 β aus Makrophagen vermittelt. Diese Zytokine binden sich an Rezeptoren der Zielzellen und bewirken dort die Hochregulation von an der Entzündungsantwort mitwirkenden Genprodukten wie Matrix-Metalloproteinasen, Cyclooxygenase-2, IL-6 und zellulären Adhäsionsmolekülen (Solle et al. 2001; Samad et al. 2001). Gleichzeitig erfolgt durch Zytokine wie IL-1 β im Sinne einer proinflammatorischen Stimulation der Leukozyten eine verstärkte Expression und Sensibilisierung des P2X₇R für den Agonisten BzATP (Humphreys and Dubyak 1998; Narcisse et al. 2005). Der P2X₇R spielt somit eine entscheidende Rolle in der Amplifikation der Entzündungsantwort.

Weiterhin hat der P2X₇R eine essenzielle Bedeutung für die Differenzierung und Proliferation der Lymphozyten (Baricordi et al. 1999; Budagian et al. 2003; Tsukimoto et al. 2006), der Differenzierung der antigenpräsentierenden Zellen (Mutini et al. 1999) sowie bei der Entstehung von mehrkernigen Riesenzellen (Chiozzi et al. 1997; Di Virgilio et al. 1999). Der P2X₇R hat Relevanz für die Expression von Oberflächenmolekülen wie L-Selektin (CD62L) und dem Komplement-Rezeptor Typ II (CD21), welche die Leukozytenmigration und die Aktivierung von B-Lymphozyten beeinflussen (Sengstake et al. 2006; Chen and Brosnan 2006b).

Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Polymerisation von Aktinfilamenten in Makrophagen, was eine entscheidende Bedeutung bei der Phagozytose, der Zellmigration und der Fusion von Phagosomen und Lysosomen besitzt (Kuehnel et al. 2009a, 2009b).

Aus den vielfältigen belegten Beeinflussungsmechanismen der Immunantwort durch den P2X₇R und den Untersuchungen von P2X₇R-defizitären Mäusen wird offenbar, dass der P2X₇R ein zentraler Regulator der Entzündungsreaktion ist (Chen and Brosnan 2006b).

Der P2X₇R zeigt auch Verbreitung in neuronalem Gewebe wie Astrozyten und Gliazellen mit der Funktion der Neurotransmitter- respektive der Zytokinfreisetzung (Duan et al. 2003; McGaraughty et al. 2007).

Vielerlei weitere Expressionsorte sind von möglicher physiologischer und pathophysiologischer Bedeutung etwa beim Schmecken (Expression in Zellen der Geschmacksknospe) (Surprenant and North 2008), der Alzheimer Krankheit (Parvathenani et al. 2003), der Depression (Lucae et al. 2006), der interstitiellen renalen Fibrose durch Apoptose von mesangialen Zellen des Nierenglomerulus (Surprenant and North 2008) und der Arthritis (Labasi et al. 2002; Caporali et al. 2008).

Des Weiteren ist der P2X₇R in die Schmerzwahrnehmung involviert (McGaraughty and Jarvis 2006; Shieh et al. 2006). Bei Einsatz der P2X₇R-Antagonisten (5-Quinolyyl, A-740003) und bei der Beobachtung von P2X₇R-defizitären Mäusen konnte die antinozizeptive Wirkung einer Ausschaltung des P2X₇R insbesondere bei Inflammation und neuropathischen Schmerzen nachgewiesen werden (Honore et al. 2006; McGaraughty et al. 2007; Hughes et al. 2007; Romagnoli et al. 2008; Carroll et al. 2008b).

Die Aktivierung von Makrophagen, Lymphozyten und dendritischen Zellen als Zellen des Immunsystems erfolgt bei zellulären Belastungssituationen wie Entzündung, Infektion und Gewebeerstörung. Hierbei kommt es neben der Freisetzung von Zytokinen auch zu einem Absinken des extrazellulären pH-Wertes (Gerevich et al. 2007). Das Entzündungsgeschehen ist somit typischerweise mit Azidose vergesellschaftet (Punna-Moorthy 1987; Dray 1995; Marchand et al. 2005), und zahlreiche Nozizeptoren werden durch Protonen aktiviert und sensibilisiert (McCleskey and Gold 1999; Kress and Zeilhofer 1999; Wemmie et al. 2006). Der Effekt der Protonen auf den P2X₇R ist daher von großem Interesse, um die Funktion der P2X₇R in entzündetem Gewebe zu verstehen.

Anhand der gut belegten antinozizeptiven Wirkung der P2X₇R-Antagonisten überschlug sich die Entwicklung im Bereich der Erforschung von selektiven Antagonisten, so dass sich seit Oktober 2008 ein hP2X₇R-Antagonist als Wirkstoff zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und anderen entzündlichen Systemerkrankungen in der Erprobung befindet (klinische Phase-I-Studie, (Evotec AG 2009)).

Eine weitere interessante Beobachtung mit möglicher therapeutischer Relevanz ist das Auftreten des P2X₇R in Tumorzellen wie Neuroblastomzellen, Hautkrebszellen, präinvasiven Mammakarzinomzellen, Prostatakarzinomzellen und B-Lymphozyten bei chronisch lymphatischer Leukämie (Adinolfi et al. 2005). Bei den Lymphomzellen kommt es bei geringer tonischer Aktivierung des P2X₇R zu einer gesteigerten Proliferationsrate der entarteten Zellen, während eine starke akute Stimulation des P2X₇R durch Nukleotidanaloga zum Zelltod führt (Adinolfi et al. 2002). Angesichts der progredienten Inzidenz der chronisch lymphatischen Leukämie und der nach wie vor eingeschränkten Therapieoptionen bei allen oben genannten

Karzinomen bietet die weite Verbreitung des hP2X₇R im entarteten Gewebe eine Grundlage für weitere Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet.

1.4.2 Die Rezeptorstruktur

Im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der P2XR-Familie hat der P2X₇R die längste Aminosäuresequenz (595 AS), die längste carboxyterminale zytoplasmatische Domäne (244 AS) mit einer zusätzlichen hydrophoben Sequenz (zwischen AS an Position 510 und 530) und die geringste Sequenzhomologie mit den anderen Mitgliedern der P2X-Rezeptor-Familie (< 25 %) (North 2002). Die Stöchiometrie des hP2X₇R ist nicht abschließend geklärt, die aktuelle Datenlage lässt jedoch behaupten, dass der Kanal als Multimer und insbesondere als Trimer vorliegt (Nicke et al. 1998, 2008).

Es wurde lange davon ausgegangen, dass die Untereinheiten des hP2X₇R keine Heteromerenbildung mit Untereinheiten der anderen hP2XR zeigen (Torres et al. 1999). In der jüngeren Vergangenheit hat sich jedoch ein Anhalt für eine Heteromerenbildung von Untereinheiten des hP2X₇R mit dem hP2X₄R gezeigt (Guo et al. 2007; Dubyak 2007). Dennoch ist davon auszugehen, dass die homomere Assoziation von P2X₇R-Untereinheiten der dominante Assoziationsstatus ist (Nicke 2008).

Die Ligandenbindungsstelle des hP2X₇R liegt im Bereich der etwa 280 AS langen extrazellulären Schleife. Positiv geladene Lysinreste (Lys¹⁹³, Lys³¹¹) sind entscheidend für die Bindung des negativ geladenen ATP am P2X₇R (Worthington et al. 2002). Die trimere Struktur des Rezeptors legt nahe, dass zur vollständigen Aktivierung die Bindung dreier Liganden erforderlich ist.

Der hP2X₇R hat eine biphasische Aktivierungskinetik, da er über verschiedene ATP-Bindungsstellen mit unterschiedlichem Effekt auf die Rezeptoraktivierung verfügt, die sich durch eine unterschiedliche Affinität für Agonisten auszeichnen. Die hochaffine Bindungsstelle hat einen K_D-Wert (K_{D,1}) im Bereich von 4 μM ATP⁴⁻, während die niedrigaffine Bindungsstelle nur bei höheren Agonisten-Konzentrationen besetzt wird und einen K_D-Wert (K_{D,2}) von etwa 220 μM ATP⁴⁻ besitzt. Offen bleibt, ob die Bindung eines Moleküls ATP⁴⁻ im Sinne einer negativen Kooperativität die Bindung eines weiteren ATP⁴⁻-Moleküls hemmt oder ob die Bindungsstellen von vorneherein von unterschiedlicher Affinität sind (Klapperstück et al. 2001). Ersteres erscheint anhand der vermutlich homotrimeren Struktur des hP2X₇R (Nicke 2008) wahrscheinlicher. Die Aktivierung und die Deaktivierung des P2X₇R zeichnen sich durch eine Zweiphasigkeit aus: Der aktivierende Strom besteht aus einer exponentiellen sättigenden und aus einer linear zunehmenden Komponente, die beide mit zunehmender Agonisten-Konzentration ansteigen. Auch bei der Deaktivierung des hP2X₇R können zwei, nämlich eine schnell und eine langsam exponentiell abklingende Stromkomponente unterschieden werden (Klapperstück et al. 2001).

Der P2X₇R assoziiert mit verschiedenen anderen Proteinen, denen entscheidende Bedeutung für die Besonderheiten der Signaltransduktion zugeschrieben wird. Mittels Proteomanalyse wurde die Interaktion des hP2X₇R mit elf verschiedenen Proteinen beschrieben (Kim et al. 2001). Diese Proteine sind dem Zytoskelett zuzuordnen (Integrin β 2, Laminin- α 3, β -Aktin, α -Aktinin, Supervillin), sind entscheidend für die Signaltransduktion (Integrin β 2, Membran-assoziierte Guanylatzyklase, Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI4K) und Rezeptorprotein Tyrosinphosphatase β (RPTP β)) oder sind Hitzeschockproteine (Hsp 90, Hsp 70, Hsc 71).

Die PI4K könnte durch PIP₂-Bildung bei Einwirkung der Phospholipase C den IP₃- und Diacylglycerin-Signalweg aktivieren oder aber eine direkte Aktivierung der Phospholipase D bewirken (Kim et al. 2001). Die RPTP β ist auf niedrigem Niveau konstant aktiv. Zu einer gesteigerten Aktivität der RPTP β kommt es bei Ligandenaktivierung des P2X₇R-Kanals durch eine supramaximale Agonisten-Konzentration. Dieses bewirkt eine verminderte Bindung an das Zytoskelett und eine Desensitivierung des Kanals. Es könnte sich somit um einen Mechanismus der Autoregulation beziehungsweise der Herunterregulation des Rezeptors handeln und damit eine Schutzfunktion der Zelle vor hohen Nukleotidmengen darstellen, um die Zellintegrität zu bewahren (Kim et al. 2001). Die Assoziation des Hitzeschockproteins Hsp 90 mit dem hP2X₇R ist näher untersucht worden. Die Phosphorylierung des Hsp 90 in Assoziation mit dem P2X₇R hemmt die Rezeptoraktivierung und ist ein möglicher weiterer Mechanismus der Herunterregulation des P2X₇R (Adinolfi et al. 2003). Weiterhin konnte der Einfluss des hP2X₇R auf das Zytoskelett anhand seiner Beteiligung an der Aktivierung der Aktin-Polymerisierung gezeigt werden (Kuehnel et al. 2009a, 2009b).

Eine Interaktion des rP2X₇R ist auch mit den epithelialen Membranproteinen (EMP-1, EMP-2, EMP-3 und PMP-22) beobachtet worden. EMP-2 ist ein 167 AS langes Protein mit vier Transmembrandomänen und zeigt eine direkte Interaktion mit der C-terminalen Domäne des P2X₇R. Bei Abwesenheit der C-terminalen Domäne erfolgt keine Assoziation und es kommt bei der Aktivierung des Kanals zu einer verminderten Permeabilitätszunahme (s.u.) des Kanals. Eine Überexpression der epithelialen Membranproteine durch einen bis dato unklaren Wirkmechanismus führt zu Zellhydrops, Membranabschnürungen und einer Reduktion der Überlebensrate der Zellen. Die EMP sind ubiquitär vorkommende Moleküle. Möglicherweise stellt eine Aktivierung des hP2X₇R einen Triggerfaktor zum Zellhydrops durch die EMP dar (Wilson et al. 2002).

1.4.3 Signaltransduktion

Als Folge der P2X₇R-Aktivierung kommt es zu einer Reihe von Second-messenger-abhängigen Effekten. Es kommt zur Aktivierung der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase D (PLD) in humanen und murinen Makrophagen (El-Moatassim and Dubyak 1992, 1993; Humphreys and Dubyak 1996) und in humanen leukämischen Lymphozyten (Gargett et al.

1996). An der Aktivierung der PLD sind die gesteigerte zytosolische Konzentration von divalenten Kationen wie Ca^{2+} , Ba^{2+} und Sr^{2+} (Gargett et al. 1996) und die PI4K (s.o.) beteiligt. Die Aktivierung der PLD durch die BzATP-induzierte P2X₇R-Aktivierung ist vom pH-Wert abhängig. Die Aktivierung der PLD ist im physiologischen pH-Bereich (7,5) maximal und im alkalischen und sauren Milieu geringer. Hingegen ist die Depolarisation der Zellen nach der BzATP-abhängigen Aktivierung des P2X₇R bei verschiedenen pH-Werten unverändert. Die Aktivierung der PLD ist somit keine Voraussetzung für die P2X₇R-abhängige Porenbildung (El-Moatassim and Dubyak 1993).

Weiterhin gibt es auch Hinweise für die P2X₇R-abhängige Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) (Alzola et al. 1998), die an der Synthese von Arachidonsäurederivaten beteiligt ist.

Die Aktivierung der hP2X₇R durch ATP ist ein Stimulus für die Freisetzung von IL-1 β (und IL-18) aus mit Lipopolysaccharid-vorbehandelten Monozyten und Makrophagen (Mehta et al. 2001; Perregaux et al. 2001; Ferrari et al. 2006; Chen and Brosnan 2006b). Der erste Schritt zur Interleukin-Freisetzung wird durch entzündungsassoziierte Stimuli wie die Lipopolysaccharid-Vorbehandlung der Zellen initiiert, die zu einer gesteigerten Produktion von biologisch inaktivem Prointerleukin-1 β , aber nur zu einer geringen Freisetzung von reifem IL-1 β führt. In einem zweiten Schritt sind Sekretionsstimuli wie ATP (aber auch bakterielle Toxine oder unter experimentellen Bedingungen K⁺-Ionophore wie Nigericin) notwendig. Hierdurch kommt es zu einem Ausstrom von K⁺-Ionen aus der Zelle, was das Interleukin-1-convertierende Enzym (Caspase-1) enthemmt. Folglich wird die posttranslationale Prozessierung von IL-1 β durch die Caspase-1 beschleunigt und die IL-1 β -Freisetzung forciert (Solle et al. 2001; Mehta et al. 2001; Perregaux et al. 2001; Le Feuvre et al. 2002).

Neben der Beeinflussung der Zelle auf translationaler Ebene hat die Aktivierung des P2X₇R auch Einfluss auf die Transkription, wie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und die mögliche Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und CREB zeigt (Chen and Brosnan 2006b).

Aus den aufgeführten Erkenntnissen wird offenbar, dass der hP2X₇R auf mehreren Ebenen in den Zellmetabolismus eingreift und vielfältige Interaktionen mit anderen Signalkaskaden eingeht.

1.4.4 Agonisten

Der potenteste bekannte Aktivator des P2X₇R ist 2,3'-O-(4-benzoyl)-benzoyl-ATP (BzATP). Darauf folgen in absteigender Effektivität ATP, 2-meATP, ATP γ S und ADP (Surprenant et al. 1996). Jedoch erwies sich ADP in Einzelkanalmessungen am hP2X₇R als wirkungslos (Markwardt et al. 1997; Riedel et al. 2007a). Als unwirksam sind $\alpha\beta$ -methyl-ATP, $\beta\gamma$ -Methyl-ATP, UTP und Adenosin beschrieben worden (Surprenant et al. 1996). Es konnte jedoch auch eine Aktivierung des P2X₇R durch $\alpha\beta$ -methyl-ATP nachgewiesen werden (Seyffert et al. 2004).

BzATP ist an allen anderen P2XR weniger oder höchstens genauso potent wie ATP, im Fall des P2X₇R hingegen ist BzATP ein zehnfach bis dreißigfach potenterer Aktivator als ATP (North 2002; Gevert et al. 2006). Als der aktive Ligand wird vielfach das freie, vierfach negativ geladene ATP [ATP⁴⁻] diskutiert (North 2002), welches in Abhängigkeit vom Ionenmilieu und pH-Wert nur einen Teil des gesamten gelösten ATP ausmacht. Dieses würde erklären, dass relativ hohe ATP-Konzentrationen (~100 µM) für die Aktivierung des Rezeptors benötigt werden (Jacobson et al. 2002). Diese These wird weiterhin gestützt durch die inhibitorische Wirkung von divalenten Kationen auf die Kanalaktivierung (s.u.) und die Tatsache, dass bei Abwesenheit sämtlicher divalenter Kationen durch [ATP⁴⁻] ein hP2X₇R-abhängiger Strom auslösbar ist, dessen Amplitude sich nicht wesentlich von der in Ba²⁺-haltigen Medien gemessenen Strömen unterscheidet (Klapperstück et al. 2001).

1.4.5 Antagonisten und Inaktivierung

Historisch etablierte potente Antagonisten des hP2X₇R, aber nicht des rP2X₇R, sind KN-62, KN-04 (Gargett and Wiley 1997) und Coomassies Brilliant Blue G (Jiang et al. 2000a). Ein weiterer Antagonist ist oxidiertes ATP (oATP), das nach einer mehrstündigen Inkubationszeit den Kanal irreversibel inaktiviert (Wiley et al. 1994; Surprenant et al. 1996; Humphreys and Dubyak 1996). Weiterhin sind Suramin, das Suramin-Analogon NF279 und PPADS in relativ hoher Konzentration Kanalblocker (Rassendren et al. 1997; Klapperstück et al. 2000b).

Eine nicht-kompetitive Hemmung des rP2X₇R-abhängigen Ionenkanals wird auch durch Calmidazolium verursacht mit der Besonderheit, dass es den Kationeneinstrom hemmt, aber die Aufnahme von größeren Moleküle wie beispielsweise YO-PRO 1 (629 Da) unbeeinflusst lässt (Virginio et al. 1997). Calmidazolium hemmt direkt spannungsabhängige Ionenkanäle und ist außerdem bei zytoplasmatischer Lokalisation in der Lage, die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase zu hemmen. Aus der Tatsache, dass nur extrazellulär appliziertes Calmidazolium den rP2X₇R-abhängigen Ionenkanal beeinflusst (Virginio et al. 1997), lässt sich schließen, dass Calmidazolium an der extrazellulären Oberfläche des Rezeptors ansetzt und somit Calmodulin-unabhängig entweder eine direkte selektive Kanalblockade ohne Beeinflussung der Porenbildung oder aber eine allosterische Veränderung des Rezeptors bewirkt.

Die oben genannten nicht-selektiven Antagonisten sind abgelöst worden von einer Reihe neuer Moleküle mit hoher Diversität in ihrer molekularen Struktur (zyklische Imide, Diarylimidazoline, adamantane Amide, Cyanoguanidine und substituierte Aryltetrazole, Arylhydrazide). Diese Moleküle befinden sich in der Erprobung, um selektive, therapeutisch nutzbare Antagonisten für den hP2X₇R zu etablieren (Nelson et al. 2008; Carroll et al. 2008a).

Der hP2X₇R ist sensitiv gegenüber dem extrazellulären Ionenmilieu. Folgende divalente Kationen haben mit absteigender Potenz hemmende Wirkung auf die Kanalaktivierung (Cu²⁺ > Cd²⁺ = Zn²⁺ > Ni²⁺ > Mg²⁺ = Co²⁺ > Mn²⁺ > Ca²⁺ = Ba²⁺ > Sr²⁺). Die Hemmung ist

konzentrationsabhängig (Virginio et al. 1997). Der Mechanismus der Hemmung ist bisher nicht abschließend geklärt. Verschiedene Mechanismen werden diskutiert: Zum einen können die divalenten Kationen eine Komplexbildung des ATP (MgATP^{2-} , CaATP^{2-}) bewirken und damit die freie ATP^{4-} -Konzentration vermindern (Klapperstück et al. 2001). Die Annahme, dass ATP^{4-} anstelle von MgATP^{2-} der wirksame Agonist ist, kann die aus der Anwesenheit von divalenten Kationen resultierende Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die absolute ATP-Konzentration erklären (Di Virgilio et al. 1998). Zum anderen könnte die direkte Blockade der Ionenkanalpore eine Rolle spielen. Dagegen spricht allerdings, dass die Hemmung spannungsunabhängig ist (Virginio et al. 1997). Die experimentellen Untersuchungen von Virginio et al schließen nicht aus, dass diese zwei Faktoren eine Rolle spielen, legen aber in einer dritten Hypothese nahe, dass die Anwesenheit von Kationen einen allosterischen Effekt hat, der eine verminderte Affinität der Ligandenbindungsstelle verursacht oder das Öffnen des Kanals nach Agonistenbindung beeinflusst (Virginio et al. 1997). Es bestehen Hinweise darauf, dass es Mg^{2+} -Bindungsstellen in der extrazellulären AS-Sequenz des $\text{P2X}_7\text{R}$ gibt (His^{130} , His^{201}), die für die Inhibition durch Mg^{2+} essenziell sind (Acuna-Castillo et al. 2007).

1.4.6 Leitfähigkeitseigenschaften und Porenbildung

Der $\text{hP2X}_7\text{R}$ ist ein bifunktionales Molekül. Zum einen bewirkt eine kurze Aktivierung (1-3 s) durch BzATP und ATP eine reversible schnelle Membrandepolarisation mit einem einwärtsgerichteten Kationenstrom, der intrazelluläre Signalkaskaden nach sich zieht (s.o.). Zum anderen kommt es bei andauernder oder wiederholter Aktivierung des $\text{P2X}_7\text{R}$ zu zunehmender Permeabilität der Zellmembran für Moleküle bis 831 Da (in B-Lymphozyten bis 200-300 Da) (Steinberg et al. 1987; Surprenant et al. 1996; Rassendren et al. 1997). Die Permeabilitätssteigerung wird auch bei den $\text{P2X}_2\text{R}$ und $\text{P2X}_4\text{R}$ beobachtet (Virginio et al. 1999), einzigartig ist aber die als Folge der Permeabilitätssteigerung auftretende Zytotoxizität der $\text{P2X}_7\text{R}$ -Aktivierung. Die Stimulation des $\text{P2X}_7\text{R}$ kann zur Apoptose und/ oder Nekrose der Zelle führen. Ob die Permeabilitätssteigerung durch die Dilatation des Ionenkanals oder durch die Assoziation der $\text{P2X}_7\text{R}$ mit einem kanalbildenden Protein zu Stande kommt, ist ungeklärt (North 2002). Porenbildenden Membranproteinen wie Pannexin 1 (Pelegriin and Surprenant 2006; Di Virgilio 2007) wird ebenso eine Bedeutung zugeschrieben wie intrazellulären Signalkaskaden mit Aktivierung der Caspase-1 (Perregaux et al. 2001). Die Aktivierung der Caspase-1 scheint jedoch keine zwingende Voraussetzung für den Zelltod zu sein, da die Zytolyse auch in Caspase-1-defizitären Zellen beobachtet werden konnte (Le Feuvre et al. 2002; Chen and Brosnan 2006b). In Thymozyten konnte die Beteiligung der durch extrazelluläre Signale regulierten Proteinkinase ERK 1/2 am Zelltod nachgewiesen werden. Des Weiteren

konnte gezeigt werden, dass die Porenbildung aber auch unabhängig von der ERK 1/2-Aktivierung ablaufen kann (Auger et al. 2005). Die P2X₇R-abhängige Porenbildung ist abhängig von der intrazellulären Kalzium-Konzentration und der Aktivierung der MAP-Kinase (Lajdova et al. 2004; Faria et al. 2005).

Mittlerweile gewonnene Erkenntnisse sind: Die Prozesse, die zur Zytolyse führen, sind abhängig von der Dauer der Inkubation, der ATP-Konzentration und dem P2X₇R-exprimierenden Zelltyp (Chen and Brosnan 2006b). Die IL-1 β -Freisetzung findet unabhängig von der Porendilatation statt (Grahames et al. 1999; Chessell et al. 2001). Die IL-1 β - und IL-18-Freisetzung der ATP-exponierten Zelle setzt ein, bevor es zur Freisetzung von mit Apoptose vergesellschafteten Proteinen kommt (Ferrari et al. 1997). Bei höherer Expressionsdichte des P2X₇R kommt es schneller zur Permeabilitätssteigerung der Zellmembran (Chessell et al. 2001). Der Kanal verbleibt Kationen-selektiv und die Permeabilitätssteigerung ist progredient (Virginio et al. 1999). Die Porenbildung ist nicht abhängig vom Ionenstrom über den ligandenaktivierten Kanal (Surprenant et al. 1996; Virginio et al. 1997), ist aber an die Expression und Funktion des P2X₇R geknüpft, da sich bei P2X₇R-defizitären Mäusen keine Permeabilitätssteigerung zeigt (Chen and Brosnan 2006a).

Die lange carboxyterminalen Sequenz beziehungsweise die Interaktion dieser Sequenz mit assoziierten Membranproteinen (Wilson et al. 2002) scheint eine Voraussetzung für die Permeabilitätssteigerung zu sein, da ein verkürzter Kanal (C-terminal um 177 AS gekürzt) zwar eine analoge kurze Kanalaktivierung zeigt, jedoch bei längerer Applikation eines Agonisten keine Permeabilitätssteigerung zu beobachten ist (Surprenant et al. 1996). Allerdings sind die ATP-induzierten Stromamplituden bei trunkierten hP2X₇R deutlich gegenüber dem Volllängenrezeptor reduziert und die Kanalkinetik wird durch die Entfernung des C-Terminus deutlich verändert (Becker et al. 2008).

Zwei verschiedene Erklärungsmodelle für die Permeabilitätssteigerung werden diskutiert (North 2002; Liang and Schwiebert 2005):

1. Die Permeabilitätssteigerung kommt durch eine zunehmende Dilatation des Ionenkanals zu Stande. Dafür spricht,
 - dass der Permeabilitätszuwachs progredient ist (Virginio et al. 1999),
 - dass in der Regel Kanalblocker beide Komponenten betreffen (Coomassie Brilliant Blue, divalente Kationen, Suramin, oATP),
 - dass die Porenbildung in heterologen Expressionssystemen beobachtet werden kann,
 - dass auch andere Rezeptoren der P2XR-Familie einen Permeabilitätszuwachs zeigen.
2. Der Ionenkanal und die Pore sind zwei verschiedene Lokalisationen. Dafür spricht,
 - dass es gelungen ist, hemmende Wirkstoffe zu finden, die nur den Kationeneinstrom (Calmidazolium, s.o.) beeinflussen (Virginio et al. 1997),

- dass bei einem C-terminal verkürzten (s.o.) Mutanten die Kanalaktivität erhalten ist, während die Porenbildung unterbleibt (Surprenant et al. 1996),
- dass ohne eine Beteiligung von zweiten Botenstoffen wie Ca^{2+} , MAP-Kinase und MEKK-Kinase keine Zytolyse stattfindet (Lajdova et al. 2004; Faria et al. 2005),
- dass Maitotoxin eine Pore mit sehr ähnlichen Eigenschaften öffnen kann, ohne den P2X₇R zu beeinflussen (Schilling et al. 1999),
- dass in bestimmten Expressionssystemen wie bei der Expression des hP2X₇R in *Xenopus*-Oozyten (Klapperstück et al. 2000a) oder in B-Lymphozyten (Bretschneider et al. 1995; Löhn et al. 2001) keine Porenbildung beobachtet wird,
- dass in Einzelkanalexperimenten keine Anzeichen für eine Porendilatation wie ein Anstieg des Einzelkanalstroms oder Veränderungen des Permeationsverhaltens einzelner hP2X₇R-abhängiger Ionenkanäle gefunden wurden (Riedel et al. 2007a, b),
- dass eine Beteiligung von Pannexin-1 an der apoptotischen Zellantwort nachgewiesen ist (Pelegriin and Surprenant 2006; Locovei et al. 2007; Pelegriin and Surprenant 2007).

Die aktuelle Datenlage stützt eher das zweite Erklärungsmodell (Liang and Schwiebert 2005; Di Virgilio 2007). Nach wie vor bleiben jedoch einige Fragen offen zu der genauen Struktur und zu der Aktivierung des Komplexes, der für die Permeabilitätssteigerung verantwortlich ist.

Die Experimente dieser Arbeit betreffen nur die Funktion des hP2X₇R als ligandenaktivierten Ionenkanal, da die Applikation der Agonisten nur kurzzeitig mit anschließender dreiminütiger Erholungsphase erfolgte und da gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des hP2X₇R bei der Expression in Oozyten nicht zur Porenbildung führt (Klapperstück et al. 2000a, 2001; Boldt et al. 2003; Riedel et al. 2007a, b).

Es ist beschrieben worden, dass der hP2X₇R bei wiederholter Exposition mit submaximalen ATP- und BzATP-Konzentrationen einen progredienten Zuwachs der Stromgröße zeigt (Hibell et al. 2000). Ob die Ursache dafür eine Porendilatation oder vielmehr eine Affinitätssteigerung für Agonisten ist, bleibt ungeklärt. Weiterhin ist gezeigt worden, dass nach Applikation von ATP die Sensitivität des Rezeptors für dessen Metabolite, ADP und AMP, zunimmt (Chakfe et al. 2002). Die Relevanz ergibt sich aus der physiologisch vorkommenden Degradation von ATP zu ADP, AMP und Adenosin im Extrazellulärraum (Zimmermann 1996). Im Widerspruch dazu steht, dass an Einzelkanaluntersuchungen am hP2X₇R keinerlei Aktivierbarkeit durch ADP beobachtet wurde (Markwardt et al. 1997; Riedel et al. 2007a).

Kim et al. konnten hingegen zeigen, dass bei supramaximalen Agonisten-Konzentration eine Desensitivierung des hP2X₇R erfolgt (Kim et al. 2001).

Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass die Sensitivierung eine erhöhte Adaptationsfähigkeit der Zelle auf das extrazelluläre Milieu bewirkt, während die Desensitivierung im Sinne einer Protektion vor der Zytolyse stattfindet. Andererseits sind die Ergebnisse durch Messungen

P2X₇R-abhängiger Ganzzellströme oder durch noch indirektere Methoden der P2X₇R-Charakterisierung (P2X₇R-abhängige Ca²⁺-Erhöhung im Zytosol oder Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoffen) gewonnen worden. Hierbei ist immer die Kontamination durch zusätzliche indirekt durch die Aktivierung des P2X₇R induzierte Permeationswege möglich.

1.4.7 pH-Abhängigkeit des P2X₇-Rezeptors

Die Funktion des P2X₇R ist pH-abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Kanals im aziden Bereich geringer ist (Rozenfurt et al. 1977; Steinberg et al. 1987; Dubyak and El-Moatassim 1993).

1997 untersuchten Virginio et al. den Einfluss von Protonen auf den P2X₇R (Virginio et al. 1997). Sie konnten zeigen, dass eine Steigerung der Hydroniumionen-(H⁺)-Konzentration bei einer festgelegten BzATP-Konzentration eine Abnahme des maximalen Ionenstroms und der YO-PRO 1-Aufnahme bewirkt. Die Untersuchungen des H⁺-Einflusses erfolgte im H⁺-Konzentrationsbereich von 0,015 µM bis 100 µM, was einem pH von 4,0 bis 7,8 entspricht. Michel et al. maßen 1999 die H⁺-Abhängigkeit der YO-PRO 1-Aufnahme im pH-Bereich von 5 bis 9 und zeigten, dass die YO-PRO 1-Aufnahme mit steigendem pH-Wert sukzessive zunahm, während die Affinität des Agonisten im Bereich von pH 7,5 am größten war (Michel et al. 1999).

Die zahlreichen möglichen Effekte der Protonen auf den P2X₇R (s.o.) komplizieren die Untersuchung und erschweren das Verständnis der Beeinflussung. Weiterhin erschweren indirekte Messmethoden wie die fluorimetrische Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration oder die Aufnahme von fluoreszierenden Farbstoffen die Beurteilung der tatsächlichen Beeinflussung des P2X₇R, da Protonen mit verschiedenen Ebenen der komplexen Signalkaskade (z.B. mit den Farbstoffen) interagieren könnten. Auch wenn das frühe Signal der P2X₇R-Aktivierung in Form des Ionenstromes gemessen wird, kann die zusätzliche sekundäre Erhöhung der Leitfähigkeit von Ionenströmen durch den P2X₇R (Faria et al. 2005; Pelegrin and Surprenant 2006; Iglesias et al. 2008; Schachter et al. 2008) zu Fehlinterpretationen der Effekte der Protonen auf den P2X₇R führen.

Daher war das Ziel, die Versuchsbedingungen für die Messung der Beeinflussung des P2X₇R durch Protonen so einfach wie möglich zu halten. Die Messung der P2X₇R-abhängigen Ströme in *Xenopus*-Oozyten ermöglichte die experimentelle Untersuchung in Lösungen, die frei von divalenten Kationen waren. Dieses vereinfacht die Messbedingungen, da die komplexierenden Effekte von Ca²⁺ und Mg²⁺ auf ATP und mögliche Effekte dieser Kationen auf den P2X₇R wegfallen. Zusätzlich findet in hP2X₇R-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten keine Porenbildung statt (Klapperstück et al. 2000a) und geht somit nicht in die Betrachtung ein.

2. Zielstellung

In dieser Arbeit sollte für humane P2X₇R untersucht werden, ob die Aktivierung des hP2X₇R durch typische Agonisten eine pH-Abhängigkeit zeigt. Hierbei sollte die Art der Beeinflussung der hP2X₇R-abhängigen Ströme beschrieben werden.

Die Zielstellung erstreckt sich nicht auf das zytolytische Verhalten des hP2X₇R, sondern lediglich auf die Eigenschaft als ligandenaktivierter Ionenkanal.

Es war Ziel dieser Arbeit, zu beleuchten, ob Protonen einen unterschiedlichen Einfluss auf die zwei funktionell verschiedenen Ligandenbindungsstellen des hP2X₇R haben, die sich durch ihre Affinität für Agonisten und ihre Wirkung auf die Ionenkanalaktivierung unterscheiden (Klapperstück et al. 2001). Weiterhin sollte eruiert werden, ob die vorhandene pH-Abhängigkeit für verschiedene Agonisten (ATP, BzATP) ein gleichsinniges Verhalten zeigt.

Untersucht werden sollte, ob die Rezeptoren hP2X₂R und hP2X₇^{S339Y}R, die ausschließlich über funktionell hochaffine Bindungsstellen verfügen, eine ähnliche und vergleichbare pH-Wert-Abhängigkeit zeigen.

3. Material und Methodik

3.1 Material

Soweit nicht anders vermerkt, stammen die verwendeten Chemikalien von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Na₂ATP wurde von Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen. Als Bezugsquelle der *Xenopus laevis* Frösche diente die African Xenopus Facility (Knysna, Republik Südafrika).

3.2 Methodik

3.2.1 RNS-Präparation

Die RNS-Präparation erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. G. Schmalzing (RWTH Aachen). Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Experimente RNS des hP2X₂R und hP2X₇R verwandt. Außerdem wurde eine Mutante des hP2X₇R untersucht, der hP2X₇^{S339Y}-Rezeptor (hP2X₇^{S339Y}R).

Für die Herstellung der cDNS wurden zunächst die aus bereits publizierten Studien bekannten Sequenzen des hP2X₂R (Brake et al. 1994) und des hP2X₇R (Surprenant et al. 1996; Rassendren et al. 1997) mittels PCR amplifiziert. Es erfolgte die Ligation der cDNS mit dem Plasmid pNKS2, dem Oozyten-Expressionsvektor (Gloor et al. 1995). Für die Synthese der Mutante, hP2X₇^{S339Y}R, erfolgte mithilfe eines Kits (QuickChange Site-directed mutagenesis kit, Stratagene, Heidelberg, Deutschland) ein Triplett-Austausch in der cDNS, um im RNS-Endprodukt an Position 339 anstelle der Aminosäure Serin ein Tyrosin-Molekül zu erhalten.

3.2.2 Behandlung der Oozyten

Für die Präparation der Oozyten wurden die Krallenfrösche in einer wässrigen Lösung mit dem Zusatz von 2 g/l Tricain und 5 mM Hepes anästhesiert (Lösung a, Tab. 1). Es erfolgte eine Teilresektion des Ovars nach einer kleinen bauchseitigen Inzision. Um die Oozyten von bindegewebigen und folliculären Anteilen zu befreien, wurde dem Resektat für vier bis sechs Stunden Kollagenase zugesetzt (Lösung b, Tab. 1) (Worthington, Biochrom, Berlin, Deutschland). Hiernach erfolgte eine zehnmündige Inkubation und mehrmalige Auswaschung der Kollagenase in Ca²⁺-freier Lösung (Lösung c, Tab. 1). Nachfolgend wurden die Oozyten in Petri-Schalen in Ringer-Lösung (Lösung d, Tab. 1) verwahrt.

Zeitnah erfolgte die Injektion von in 23 nl gelöster RNS (0,5 µg/µl) in verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:2, 1:5). Die Zellen inkubierten bis zur Durchführung der Spannungsklemmexperimente für ein bis drei Tage bei 19°C in Antibiotika-haltiger Lösung (Lösung d, Tab. 1) in Petrischalen.

3.2.3 Elektrophysiologie

Die Erhebung der Daten erfolgte durch elektrophysiologische Messungen an den Oozyten mittels der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmmethode (Voltage-Clamp-Methode, Cole 1949, (Schwarz and Rettinger 2000)) unter Verwendung des Spannungsklemmverstärkers OC-725C (Hamdon, USA). Das Prinzip der Spannungsklemme besteht darin, dass das Zellmembranpotential auf einen definierten Wert fixiert wird und jeglichem entstehenden Strom (wie zum Beispiel durch P2X-Rezeptor-abhängige Ionenkanäle), der Änderungen des transmembranären Potentials verursachen würde, durch einen entgegengerichteten Kompensationsstrom des Spannungsklemmverstärkers entgegengewirkt wird. Eine Mikroelektrode dient dabei der Messung des Membranpotentials und eine zweite der Strominjektion. Dadurch wird es möglich, bei konstanter treibender Kraft Änderungen der transmembranären Ionenströme zu erfassen.

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur ($\approx 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) durchgeführt. Während der Messungen befanden sich die Oozyten in einer 0,1 ml fassenden Badkammer. Die Durchflussgeschwindigkeit der Extrazellulärlösung betrug etwa $75\text{ }\mu\text{l/s}$, die Einwaschzeit $1210 \pm 70\text{ ms}$ und die Auswaschzeit $1770 \pm 170\text{ ms}$ (Bretschneider and Markwardt 1999; Klapperstück et al. 2000a). Die Mikroelektroden wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren ausgezogen und mit 3 M KCl gefüllt. Es wurden Elektroden mit einem Widerstand von 0,9-1,5 M Ω verwendet. Der Abgleich von Elektroden- und Diffusionspotentialen erfolgte in Oozyten-Ringer-Lösung (ORi, Lösung e, Tab. 1). Die Klemmenspannung betrug bei allen Versuchen -40 mV.

Um einen schnellen und reproduzierbaren Lösungswechsel zu ermöglichen, wurde die Durchströmung der Badkammer mit extrazellulären Lösungen durch drei computergesteuerte Magnetventile reguliert. Die Applikation der Testlösungen erfolgte dabei über ein modifiziertes U-Rohr-System (Bretschneider and Markwardt 1999).

Die einzelnen Applikationen der Lösungen mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen erfolgten in zufälliger Reihenfolge in einem Abstand von mindestens drei Minuten. Die Dauer einer einzelnen Applikation betrug jeweils 6 s, in einzelnen Versuchsreihen auch 3 s. Sowohl in den Testintervallen als auch während der Applikation von ATP oder BzATP wurden die Oozyten mit einer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Oozyten-Ringer-Lösung (ORi, Lösung f, Tab. 1) umspült. Der indizierte pH-Wert der Lösungen wurde durch Titration mit 1 mM NaOH oder 2 M HCl hergestellt und immer am Ende der Versuchsreihen kontrolliert. Es zeigte sich keine Veränderung des pH-Wertes im Verlauf der Versuche.

Es erfolgte die Verwendung einer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Lösung, um endogene durch den Ca^{2+} -Einstrom induzierte Ströme und Ca^{2+} - und Mg^{2+} -bedingte Komplexbildungen des ATP zu vermeiden. Da die Abwesenheit extrazellulärer divalenter Kationen einen Leckstrom durch Cl^- -Kanäle verursacht, wurde zu dessen Unterdrückung der Lösung der Cl^- -Kanal-Blocker

Flufenaminsäure (0,1 mM) zugesetzt (Weber et al. 1995; Klapperstück et al. 2000a). Es ist zu berücksichtigen, dass die Flufenaminsäure die ATP-induzierten P2X₇R-abhängigen Ströme um den Faktor $1,25 \pm 0,14$ verstärkt (Klapperstück et al. 2000a).

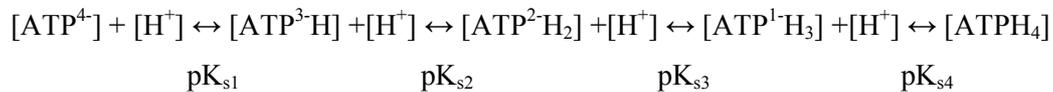
Die Aufzeichnungen wurden bei 100 Hz gefiltert, mit 85 Hz digitalisiert und durch eine im physiologischen Institut entwickelte Software ausgewertet. Die Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt mittels der Programme Lotus (Lotus Development Corporation, Cambridge, USA) und Sigma Plot 8.0 (SPSS, Chicago, USA). Die berechneten Mittelwerte werden jeweils \pm Standardabweichung angegeben. N bezeichnet die Anzahl der Zellen. Die nichtlinearen Approximationen wurden mit SPSS durchgeführt. Die daraus resultierenden Parameter werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels ANOVA ($p < 0,05$). Die daraus resultierenden signifikanten Differenzen zwischen Mittelwerten wurden mit dem multiplen t-test (Bonferroni) verifiziert.

Um den unterschiedlichen Expressionsgrad der verschiedenen Zellen zu berücksichtigen, sind die Ergebnisse in Relation zum an der gleichen Zelle gemessenen Strom bei 0,1 mM ATP pH 7,4 gesetzt, soweit es nicht anders beschrieben ist.

Um die Zwei-Phasen-Kinetik der Deaktivierung (Klapperstück et al. 2001) zu berücksichtigen, wurde der schnelle Anteil des deaktivierenden Stroms 3504 ms nach dem Applikationsende gemessen und auf den gesamten deaktivierenden Strom bezogen.

3.2.4 Die freie ATP-Konzentration

In Abhängigkeit vom pK_s -Wert einer Säure (S) verändert sich bei Änderungen des pH-Wertes der Anteil der protonierten Säure, da durch die Änderung des pH-Wertes der Anteil der freien Wasserstoffionen (H^+) zu- oder abnimmt:



Wobei $[ATP^{4-}]$ dem freien ATP und $[ATPH_n]$ der n-fach protonierten Form entspricht. $[ATP^{4-}]$ hat entsprechend den vier Protonenbindungsstellen vier pK_s -Werte, wobei pK_{s1} $6,51 \pm 0,03$ und pK_{s2} $4,05 \pm 0,05$ betragen (Martell and Smith 1990). pK_{s3} und pK_{s4} liegen weiter im aziden Bereich als pK_{s2} und haben damit im experimentell untersuchten Bereich der vorliegenden Arbeit keine Relevanz.

Für die Berechnung des freien BzATP $[BzATP^{4-}]$ wurde der pK_{s1} -Wert von ATP genutzt.

Die Konzentration des freien ATP $[ATP^{4-}]$ beziehungsweise des freien BzATP $[BzATP^{4-}]$ lässt sich aus der abgeleiteten Henderson-Hasselbach-Gleichung errechnen:

$$pH = pK_s + \log_{10} ([Salz] / [Säure])$$

daraus ergibt sich

Gleichung 1 $[agonist^{4-}] = \frac{[agonist]}{1 + 10^{pK - pH}}$

Unter Abwesenheit von divalenten Kationen erfolgt also keine Komplexierung des ATP, sondern die Bindung des H^+ an ATP^{4-} durch elektrostatische Anziehung in Abhängigkeit von der freien Protonenkonzentration. Das freie, nicht-gebundene ATP^{4-} bei der gleichen gesamten gelösten ATP-Menge bei verschiedenen pH-Werten lässt sich ebenso anhand von Gl. 1 berechnen (Tab. 2) wie die notwendige ATP-Menge, um äquivalente freie ATP^{4-} -Konzentrationen herzustellen (Tab. 3).

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen. Soweit nicht anders vermerkt, werden die Konzentrationen in mmol/l, bei pH 7,4 angegeben.

Verwendung	Anästhesie	Kollagenase	Auswaschen der Kollagenase	Inkubation	Bad- lösung	Badlösung während der Versuche
Lösung	a	b	c	d	e	f
NaCl		100	100	100	100	100
KCl		1	1	1	2,5	2,5
CaCl ₂		1		1	1	
MgCl ₂		1	1	1	1	
Hepes	5	5	5	5	5	5
Flufenamin- säure						0,1
EGTA						0,1
Tricain (g/l)	2					
Kollagenase (mg/ml)		1,5				
Penicillin (U/ml)				100		
Streptomycin (µg/ml)				100		

Tab. 2: Freie ATP-Menge ($[\text{ATP}^{4-}]$) und Anteil des $[\text{ATP}^{4-}]$ an der gesamten gelösten ATP-Menge ($[\text{ATP}_{\text{ges}}]$) in Abhängigkeit vom pH-Wert (nach Gl. 1).

pH-Wert	$[\text{ATP}_{\text{ges}}]$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[\text{ATP}^{4-}]$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[\text{ATP}^{4-}]/[\text{ATP}_{\text{ges}}]$ (%)
5,7	100	13,4	13,4
6,4	100	43,7	43,7
6,7	100	60,8	60,8
7,0	100	75,6	75,6
7,4	100	88,6	88,6
7,7	100	93,9	93,9
8,0	100	96,9	96,9
8,4	100	98,7	98,7

Tab. 3: Totale ATP-Konzentration für die Herstellung von ATP-Lösungen mit äquivalenter freier ATP^{4-} -Konzentration in Abhängigkeit vom pH-Wert (nach Gl. 1).

pH-Wert	$[\text{ATP}^{4-}]$ ($\mu\text{mol/l}$)	$[\text{ATP}_{\text{ges}}]$ ($\mu\text{mol/l}$)
5,7	100	745,7
6,4	100	228,8
6,7	100	164,6
7,0	100	132,4
7,4	100	112,9
7,7	100	106,5
8,0	100	103,2
8,4	100	101,3

4. Ergebnisse

4.1 Der hP2X₇-Rezeptor

Die Messung von P2X₇-abhängigen Strömen an *Xenopus*-Oozyten in Abwesenheit von extrazellulären divalenten Kationen vereinfacht die Messung der pH-Abhängigkeit. Hiermit stellen Protonen (H⁺) die einzigen relevanten Bindungspartner für ATP⁴⁻ dar, die in der Lage sind, die Konzentration des P2X₇-Agonisten zu beeinflussen.

4.1.1 Einfluss des pH auf die Dosisabhängigkeit P2X₇-abhängiger Ströme

In Abb. 1 sind typische Ganzzellströme der hP2X₇-exprimierenden Oozyten nach der Applikation von 0,1 mM ATP bei den pH-Werten 6,4, 7,4 und 8,4 dargestellt. Aus dem mittleren Graphen (pH 7,4) werden der Zeitverlauf der Aktivierung und Deaktivierung, das Prinzip der Messung der Amplitude des aktivierenden Stroms sowie die durch die Approximation ermittelten Anteile des schnell ($I_{\text{deact,fast}}$) und des langsam deaktivierenden ($I_{\text{deact,slow}}$) Stromes ersichtlich.

Der Zeitverlauf des aktivierenden Stromes, $I_{\text{act}}(t)$, wurde approximiert mit

$$\text{Gleichung 2} \quad I_{\text{act}}(t) = I_{\text{act},\infty} \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{\text{act}}}}\right) + s \cdot t + I_0,$$

wobei t die Zeit, I_0 der unter Abwesenheit von ATP gemessene Leckstrom, s der Anstieg einer linear zunehmenden Stromkomponente, τ_{act} die Zeitkonstante für den exponentiell sättigenden aktivierenden Strom und $I_{\text{act},\infty}$ der maximal aktivierende Strom durch den betreffenden Agonisten sind.

Die Annäherung an den Stromverlauf des deaktivierenden Stromes, $I_{\text{deact}}(t)$, erfolgte mit Hilfe von

$$\text{Gleichung 3} \quad I_{\text{deact}}(t) = I_{\text{deact,fast}} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{\text{deact,fast}}}} + I_{\text{deact,slow}} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{\text{deact,slow}}}} + I_0.$$

$\tau_{\text{deact,fast}}$ und $\tau_{\text{deact,slow}}$ stellen die Zeitkonstanten, $I_{\text{deact,fast}}$ und $I_{\text{deact,slow}}$ die Anfangsamplituden der schnell bzw. langsam deaktivierenden Stromanteile dar (Klapperstück et al. 2001; Becker et al. 2008).

Das Absenken des pH-Wertes der ATP-Lösung von pH 7,4 auf pH 6,4 bewirkte eine deutliche Verminderung der Stromamplitude. Die Alkalisierung der Lösung von pH 7,4 auf pH 8,4 bewirkte eine geringfügige Zunahme der Stromamplitude (Abb. 1).

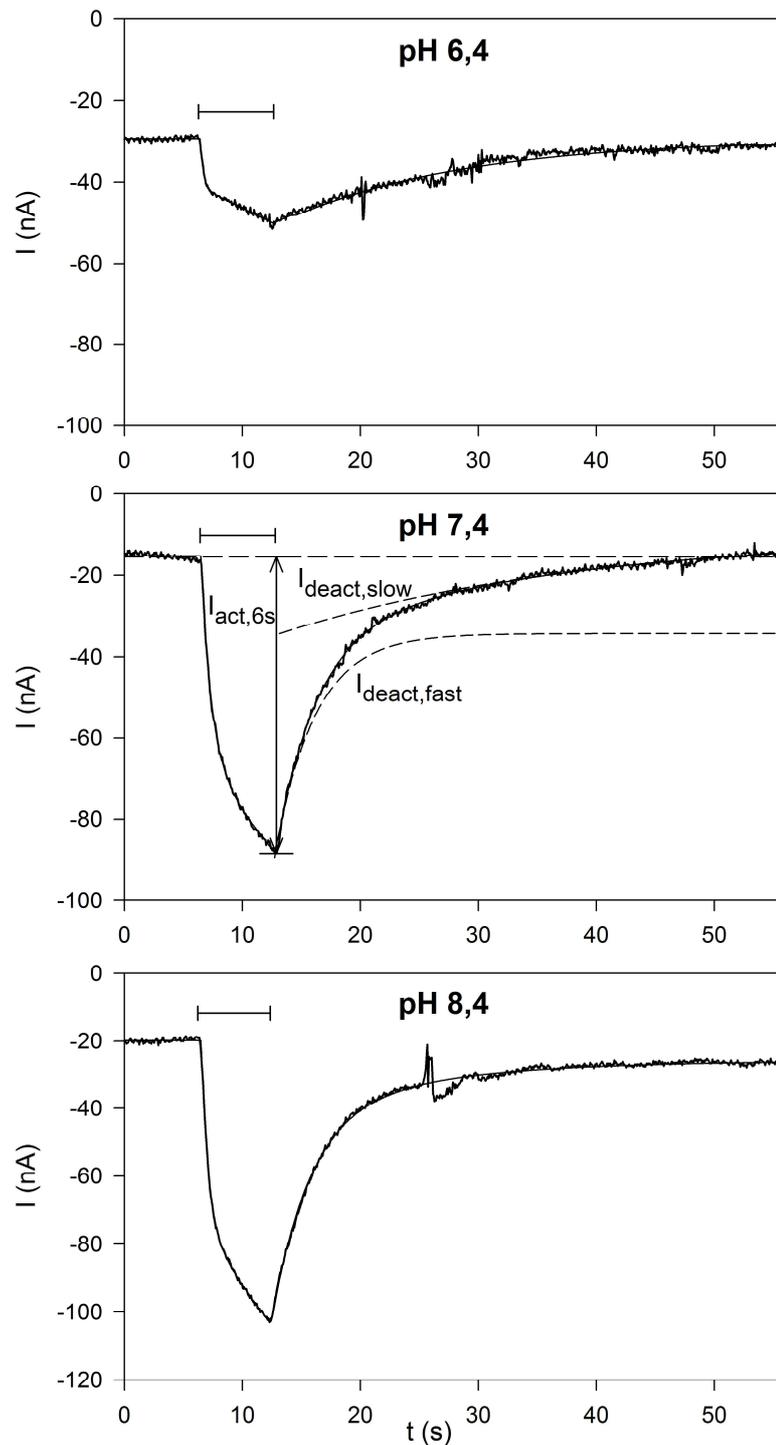


Abb. 1: Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf hP2X₇R. Typische Beispiele hP2X₇R-abhängiger Ströme bei unterschiedlichem extrazellulärem pH-Wert wie angegeben. Die horizontalen Balken geben die Zeit der Applikation von 0,1 mM ATP an. Die Stromverläufe wurden mittels Gl. 2 (Aktivierungszeitverlauf während der ATP-Applikation) bzw. Gl. 3 (Deaktivierungszeitverlauf nach der ATP-Applikation während des Auswaschens von ATP) approximiert. Die mittlere Abbildung zeigt das Prinzip der Messung der Amplitude des aktivierenden Stromes ($I_{\text{act,6s}}$) sowie die durch die Approximation ermittelten Anteile des schnell ($I_{\text{deact,fast}}$) und des langsam ($I_{\text{deact,slow}}$) deaktivierenden Stromes.

BzATP ist ein typischer hP2X₇R-Agonist und verursacht vor allem eine Aktivierung der niedrigaffinen Ligandenbindungsstelle des wt hP2X₇R (Abb. 3). Im Vergleich zu ATP zeichnet sich BzATP weiterhin durch eine höhere Potenz (niedrigerer K_D-Wert) und eine höhere Wirksamkeit (größerer Strom bei sättigenden Konzentrationen des aktivierenden Agonisten) aus (Abb. 3, (Klapperstück et al. 2000a)).

In Abb. 2 sind typische Ganzzellströme der wt hP2X₇R-exprimierenden Oozyten nach der Applikation von 0,01 mM BzATP bei den pH-Werten 6,4, 7,4 und 8,4 dargestellt. Das Absenken des pH-Wertes der BzATP-Lösung von 7,4 auf 6,4 bewirkt eine deutliche Verminderung der Stromamplitude. Die Alkalisierung der Lösung von pH 7,4 auf 8,4 bewirkte eine moderate Zunahme der Stromamplitude.

Um den Zusammenhang zwischen Agonisten-Konzentration und pH-Abhängigkeit der hP2X₇R-abhängigen Ströme genauer zu analysieren, erfolgte die Erstellung von ATP- und BzATP-Konzentrations-Wirkungskurven bei verschiedenen pH-Werten (Abb. 3).

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven zeigen deutlich einen biphasischen Verlauf. Das heißt, dass sich alle Konzentrations-Wirkungs-Kurven des wt hP2X₇R besser durch ein Modell mit zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Ligandenbindungsstellen beschreiben lassen als durch ein Modell mit nur einer Sorte Ligandenbindungsstellen (Horn 1987). Dieses stimmt überein mit dem Vorhandensein von mindestens zwei Ligandenbindungsstellen unterschiedlicher Affinität, die für den hP2X₇R nachgewiesen werden konnten (Klapperstück et al. 2001). Dementsprechend wurden die Agonisten-Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen mittels der Summe aus zwei Hillfunktionen approximiert:

Gleichung 4

$$I_{\text{rel}}([\text{agonist}]) = \frac{I_{\text{act},6s}(\text{pH}, [\text{agonist}])}{I_{\text{act},6s}(7.4, [0.1\text{mM ATP}])} = \frac{I_{\text{rel},\infty,1}}{\left(1 + \frac{10^{\text{pK}_{D,1}}}{[\text{agonist}]}\right)^2} + \frac{I_{\text{rel},\infty,2}}{\left(1 + \frac{10^{\text{pK}_{D,2}}}{[\text{agonist}]}\right)^2}$$

$I_{\text{act},6s}$ wurde gemessen, wie in Abb. 1 gezeigt. $\text{pK}_{D,1}$ und $\text{pK}_{D,2}$ sind die negativen dekadischen Logarithmen der Agonisten-Dissoziationskonstanten für hochaffine und niedrigaffine Bindungsstellen (Klapperstück et al. 2001; Becker et al. 2008). $I_{\text{rel},\infty,1}$ und $I_{\text{rel},\infty,2}$ sind die maximal aktivierenden Ströme der hochaffinen respektive der niedrigaffinen Ligandenbindungsstellen. Bei allen Konzentrations-Wirkungs-Kurven ergab ein Hill-Koeffizient von jeweils 2 für die unterschiedlichen Ligandenbindungsstellen eine größere Korrelation mit den erhobenen Daten als Hill-Koeffizienten von kleiner 1 oder größer 2. Die ATP-Bindungsstellen werden im Folgenden als die hochaffine und die niedrigaffine Bindungsstelle benannt, um zu veranschaulichen, dass die Aktivierung des Rezeptors bei niedrigen bzw. höheren ATP-Konzentrationen durch unterschiedliche ATP-Bindungsstellen erfolgt.

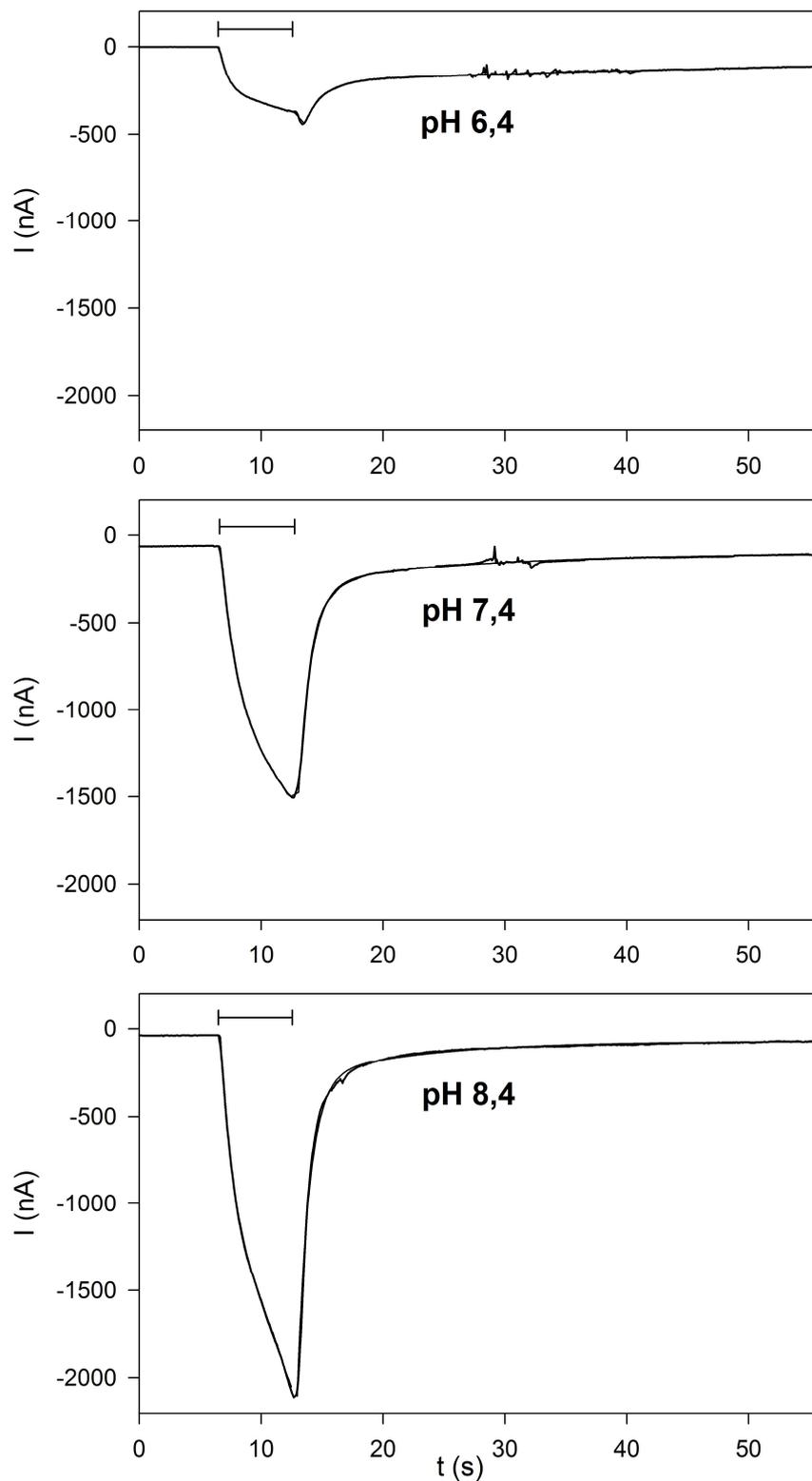


Abb. 2: Modulation BzATP-induzierter hP2X₇R-abhängiger Ströme durch extrazelluläre H⁺-Ionen. Typische Beispiele von Strömen bei unterschiedlichem extrazellulären pH-Wert (wie angegeben), die durch den P2X₇R-Agonisten BzATP (Applikation von 0,01 mM als Balken symbolisiert) ausgelöst wurden. Die Stromverläufe wurden mittels Gl. 2 und Gl. 3 approximiert.

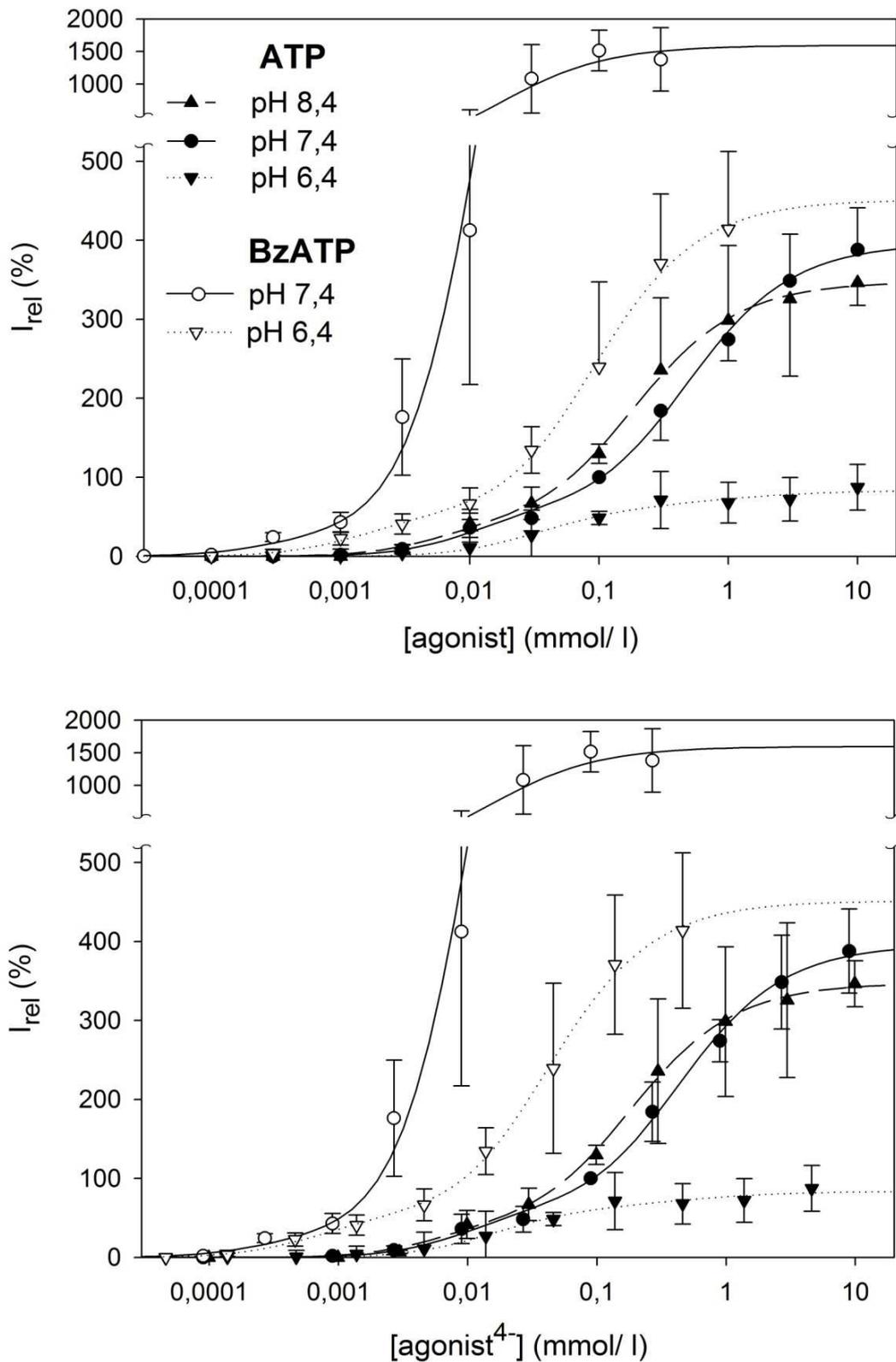


Abb. 3: Beeinflussung der Konzentrations-Abhängigkeit der Aktivierung von hP2X₇R durch den pH-Wert. Die Amplituden der durch totale (oben) bzw. freie (unten) Agonisten-Konzentrationen induzierten hP2X₇R-abhängigen Ströme wurden nach Gl. 4 normiert und approximiert. Die errechneten Parameter zeigt Tab. 4. Messungen an N = 4 - 26.

Betrachtet man das totale ATP als Agonist (Abb. 3 oben), zeigt sich, dass die Ansäuerung der ATP-Lösung (pH 6,4) eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve verursacht. Die Rechtsverschiebung der ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve bedeutet eine Abnahme der Potenz des ATP als hP2X₇R-Agonist im niedrigen pH-Wert-Bereich. Dementsprechend ist der pK_D-Wert für die hochaffine Bindungsstelle (pK_{D,1}) bei pH 6,4 signifikant verschieden von dem pK_{D,1} bei pH 7,4 (Tab. 4).

Die Wirksamkeit eines Agonisten bezeichnet die Größe des maximal aktivierenden Stromes ($I_{rel,\infty}$), der durch den betreffenden Agonisten verursacht werden kann. Die Wirksamkeit von ATP an der hochaffinen Bindungsstelle ($I_{rel,\infty,1}$) unterscheidet sich bei pH 6,4 nicht signifikant von der Wirksamkeit bei pH 7,4 (Tab. 4).

Die hochaffine Bindungsstelle unterliegt bei ATP und BzATP einer gleichartigen Beeinflussung durch die freie Protonenkonzentration. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des Agonisten BzATP bei pH 6,4 im Verhältnis zu pH 7,4 zeigt im Bereich der hochaffinen Bindungsstelle ebenfalls eine signifikante Rechtsverschiebung, also eine Abnahme der Potenz des Agonisten im aziden Bereich, gemessen am pK_{D,1}-Wert (Tab. 4). Die Wirksamkeit des BzATP auf die hochaffine Bindungsstelle ($I_{rel,\infty,1}$) unterscheidet sich nicht signifikant bei pH 6,4 und pH 7,4 (Abb. 3, Tab. 4).

BzATP weist wie an der hochaffinen auch an der niedrigaffinen Bindungsstelle eine höhere Potenz als ATP auf (höherer pK_{D,2}-Wert). Zusätzlich ist der maximal aktivierende Strom im Bereich der niedrigaffinen Bindungsstelle im Vergleich zum ATP signifikant größer ($I_{rel,\infty,2}$, Tab. 4). Das bedeutet, dass an der niedrigaffinen Bindungsstelle BzATP der deutlich wirksamere Agonist ist.

Bei pH 6,4 im Vergleich zu pH 7,4 ist bei der niedrigaffinen Ligandenbindungsstelle eine geringere Potenz (niedrigerer pK_{D,2}-Wert) und eine geringere Wirksamkeit (verringerte relative maximale Stromgröße, $I_{rel,\infty,2}$, Tab. 4) beider untersuchter Agonisten zu beobachten.

Der inhibitorische Effekt der Protonen auf die Potenz des ATP und des BzATP kann durch die Bindung der Protonen an den freien Agonisten ATP⁴⁻ bzw. BzATP⁴⁻ erklärt werden. Die Abb. 3 unten berücksichtigt dieses und zeigt die relative Stromgröße in Abhängigkeit von der freien ATP- und BzATP-Konzentration ($[Agonist^{4-}]$) bei den verschiedenen pH-Werten. Im Bereich der hochaffinen Bindungsstelle sind die Kurvenverläufe bei gleicher $[Agonist^{4-}]$ -Konzentration und unterschiedlichem pH-Wert nahezu deckungsgleich und die berechneten pK_{D,1}-Werte nicht signifikant verschieden (Tab. 4). Dieses weist darauf hin, dass der pH-Effekt an der hochaffinen Bindungsstelle ausschließlich durch den ATP-bindenden Effekt der Protonen zu Stande kommt. Der inhibitorische Effekt der Protonen auf die Potenz der niedrigaffinen Bindungsstelle kann ebenfalls durch die elektrovalente Bindung des ATP und BzATP erklärt werden. Dieses wird daraus ersichtlich, dass die pK_{D,2}-Werte der absoluten Agonisten-Konzentrationen sich bei pH 6,4 und pH 7,4 signifikant unterscheiden, was bei den freien Agonisten-Konzentrationen

nicht der Fall ist (Tab. 4). Darüber hinaus erfolgt durch die Protonen eine Reduktion der Wirksamkeit des ATP und BzATP an der niedrigaffinen Bindungsstelle und damit eine Reduktion des maximal aktivierenden Stromes ($I_{rel,\infty,2}$, Tab. 4).

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei pH 7,4 und pH 8,4 unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 3, Tab. 4).

Der fehlende Effekt auf die Potenz des Agonisten lässt sich mit dem K_D -Wert für die Bindung von H^+ am ATP^{4-} und der daraus folgenden nahezu gleichen Menge an freiem ATP^{4-} bei pH 7,4 und pH 8,4 erklären. (Gl. 1, Tab. 2). Ein wesentlich stärker bindender Effekt von H^+ auf das ATP ist dagegen für die Ansäuerung auf pH 6,4 nachweisbar, wobei das freie ATP dann nur noch etwa 44 % des gesamten ATP ausmacht.

Tab. 4: Einfluss des extrazellulären pH-Wertes und des verwendeten Agonisten auf das Konzentrations-Wirkungs-Verhalten des wt hP2X₇R. Die Berechnung der Parameter erfolgte mittels Gl. 4.

P2X ₇ R	$I_{rel,\infty,1}$ (%)	$I_{rel,\infty,2}$ (%)	$pK_{D,1}$ (Agonist)	$pK_{D,1}$ (Agonist ⁴⁻)	$pK_{D,2}$ (Agonist)	$pK_{D,2}$ (Agonist ⁴⁻)
wt, ATP pH 6,4	70 ± 9	13 ± 9 *	4,8 ± 0,1 *	5,1 ± 0,1	3,2 ± 0,5	3,5 ± 0,5
wt, ATP pH 7,4	80 ± 15	317 ± 14	5,2 ± 0,2	5,2 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3
wt, ATP pH 8,4	64 ± 14	284 ± 13	5,4 ± 0,2	5,4 ± 0,2	4,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1
wt, BzATP pH 6,4	67 ± 15	384 ± 15 *	6,1 ± 0,2 *	6,4 ± 0,3	4,4 ± 0,2 *	4,7 ± 0,2
wt, BzATP pH 7,4	50 ± 23	1554 ± 163	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,2	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2

*: Signifikanter Unterschied zu pH 7,4.

4.1.2 Einfluss des pH auf die P2X₇R-abhängigen Ströme bei konstanter Agonisten-Konzentration

Abb. 4 veranschaulicht die Verminderung des durch 0,1 mM ATP induzierten Stromes bei Erhöhung der H^+ -Konzentration. Dieser Effekt bleibt, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß, erhalten, wenn die freie ATP^{4-} -Konzentration konstant gehalten wird. Dieses legt wie Abb. 3 nahe, dass nur ein Teil des inhibitorischen Effektes der Protonen durch die ionische Bindung am ATP^{4-} erklärt werden kann und dass es einen weiteren inhibitorischen Effekt auf die Größe der hP2X₇R-abhängigen Ströme geben muss.

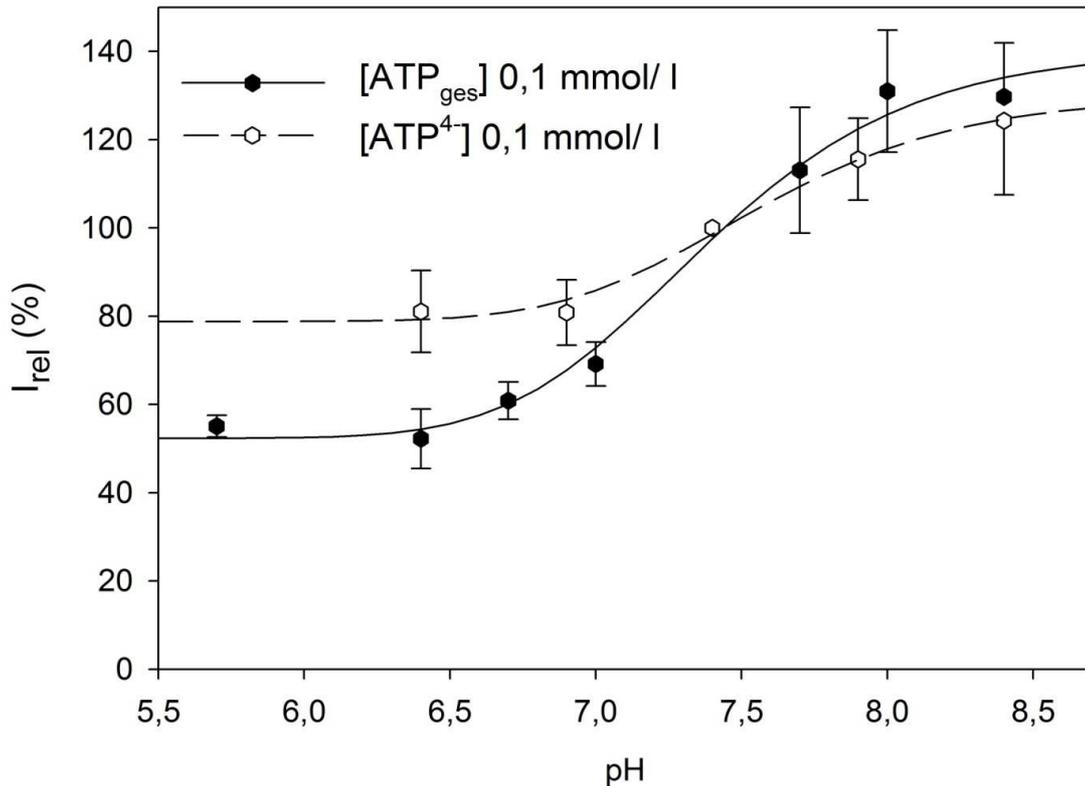


Abb. 4: Beeinflussung hP2X₇R-abhängiger Ströme durch Agonist und pH. Darstellung der pH-Abhängigkeit hP2X₇R-abhängiger Ströme bei Applikation von freiem ([ATP⁴⁻]) bzw. absolutem ([ATP_{ges.}]) ATP in der Konzentration von 0,1 mmol/l. Die Stromamplituden nach 6 s ATP-Applikation (I_{act,6s}, s. Abb. 1) wurden auf einen extrazellulären pH von 7,4 normiert und mittels Gl. 5 approximiert (Parameter in Tab. 5). N = 4 - 20.

Für den Vergleich der pH-Abhängigkeit der Stromgröße erfolgte eine Anpassung der Kurvenverläufe durch Gl. 5.

Gleichung 5

$$I_{\text{rel}}([\text{pH}]) = \frac{I_{\text{act},6\text{s}}(\text{pH}, [\text{agonist}])}{I_{\text{act},6\text{s}}(7.4, [\text{agonist}])} = \frac{I_{\text{rel},\infty}}{\left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{\text{pK}_H}}\right)^3} + c$$

I_{act,6s} wurde gemessen, wie in Abb. 1 gezeigt. I_{rel,∞} ist der pH-abhängige, maximal aktivierende Strom durch den betreffenden Agonisten (0,1 mM ATP_{ges.} oder 0,1 mM ATP⁴⁻), pK_H der negative dekadische Logarithmus der approximierten H⁺-Dissoziationskonstante und c die extrapolierte Stromamplitude bei unendlich hoher H⁺-Konzentration. Ein Hill-Koeffizient von drei ergab die höchste Korrelation bei der Approximation der Kurven.

Abb. 5 zeigt, dass die Beeinflussung der hP2X₇R-abhängigen Ströme durch den pH-Wert auch von der absoluten Agonisten-Konzentration (0,1 mM bzw. 0,01 mM ATP) abhängt. Der Kurvenverlauf der ATP-Konzentration von 0,1 mM ATP zeigt eine Rechtsverschiebung im Vergleich zum Kurvenverlauf bei 0,01 mM ATP (s. Tab. 5). Dieses legt nahe, dass H⁺-Ionen

entweder mit verschiedenen, von der ATP-Konzentration abhängigen Zuständen des hP2X₇R interagieren oder die ATP-Bindung am hP2X₇R beeinflussen.

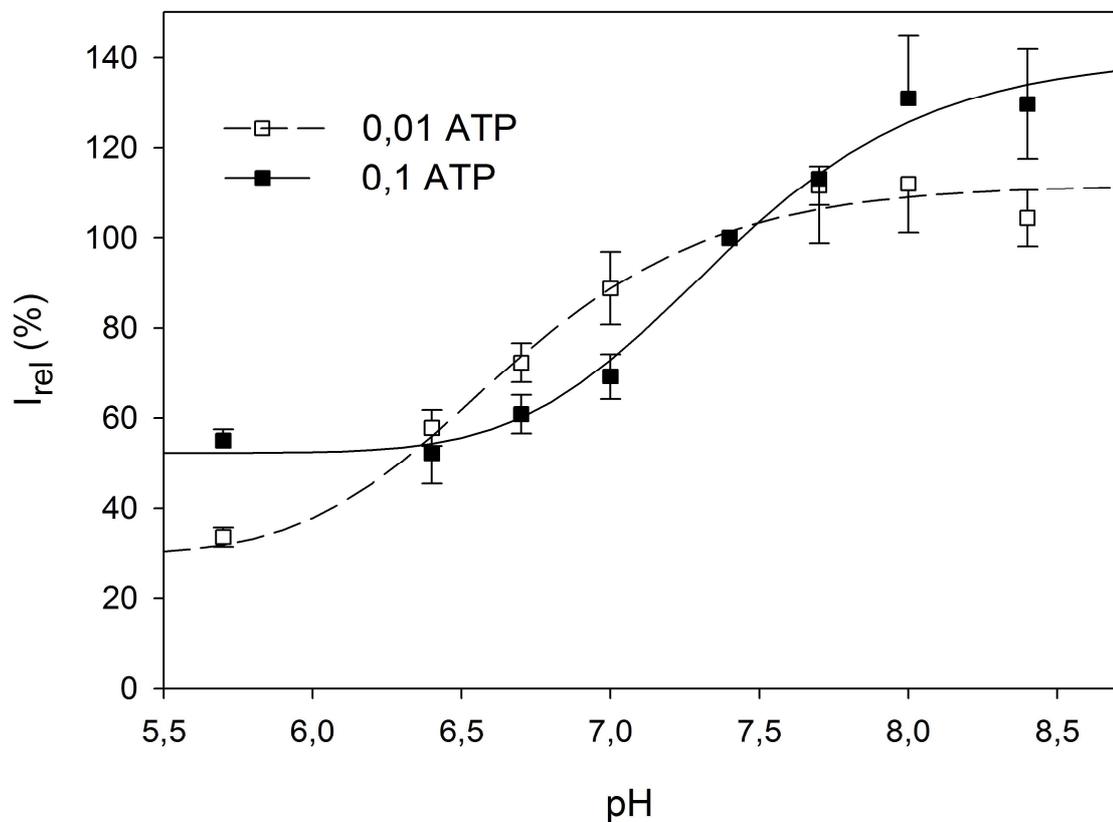


Abb. 5: Beeinflussung hP2X₇R-abhängiger Ströme durch Agonistenkonzentration und pH.

Es ist die Abhängigkeit der ATP-induzierten Ströme vom extrazellulären pH-Wert bei zwei verschiedenen absoluten ATP-Konzentrationen (mmol/l) dargestellt. Die Stromamplituden nach 6 s ATP-Applikation wurden auf einen extrazellulären pH von 7,4 normiert und entsprechend Gl. 5 approximiert. N = 4 - 20.

Abb. 6 zeigt die Statistik der pH-Abhängigkeit bei zwei verschiedenen absoluten BzATP-Konzentrationen. Eine BzATP-Konzentration von 1 μ M (0,001 mM) bewirkt vor allem eine Aktivierung der hochaffinen Ligandenbindungsstelle, während eine Konzentration von 10 μ M (0,01 mM) BzATP beide Ligandenbindungsstellen aktiviert, wobei bei Letzterem die Amplitude des Stroms, der durch die niedrigaffine Bindungsstelle aktiviert wird, überwiegt (Abb. 3). Die Erhöhung der BzATP-Konzentration von 1 μ M auf 10 μ M führt zu einer stärkeren pH-Abhängigkeit der Stromamplituden (gesteigerte Wirksamkeit von H⁺). Zusätzlich führt die höhere BzATP-Konzentration zu einer Rechtsverschiebung des Kurvenverlaufes der pH-Abhängigkeit, also zu einer gesteigerten Protonenempfindlichkeit (gesteigerte Potenz der Beeinflussung durch H⁺) des hP2X₇R.

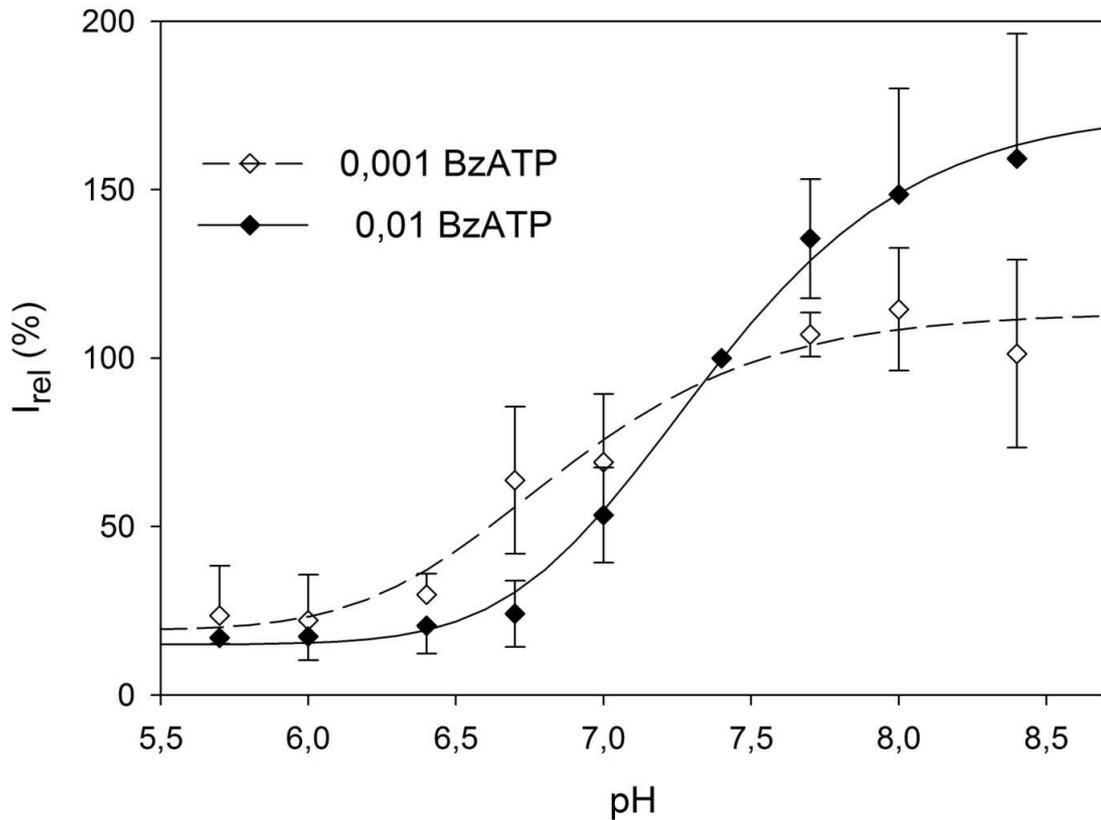


Abb. 6: Beeinflussung hP2X₇R-abhängiger BzATP-induzierter Ströme durch den extrazellulären pH-Wert. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte analog zu Abb. 5. Es ist die Abhängigkeit der BzATP-induzierten Ströme vom extrazellulären pH-Wert bei zwei unterschiedlichen BzATP-Konzentrationen (mmol/l) dargestellt. Die Stromamplituden nach 6 s BzATP-Applikation wurden auf einen extrazellulären pH-Wert von 7,4 normiert und entsprechend Gl. 5 approximiert. N = 4 – 16.

Die gleiche Beobachtung konnte im Vergleich der ATP-Konzentrationen von 0,1 mM und 0,01 mM ATP (Abb. 5), welches einer zehnfach höheren als der BzATP-Konzentration entspricht, gemacht werden. Dieses ist in Übereinstimmung mit der Beschreibung des BzATP als eines zehn- bis dreißigfach potenteren Agonisten des P2X₇R als ATP (North 2002; Gever et al. 2006) und legt nahe, dass ATP- und BzATP-aktivierte hP2X₇R einer gleichartigen Beeinflussung durch die Protonenkonzentration unterliegen, die sich im Fall der Erhöhung der Agonisten-Konzentration verstärkt.

Die Unterschiede in der pH-Abhängigkeit des hP2X₇R bei verschiedenen Agonisten-Konzentrationen können erklärt werden durch verschiedene Beeinflussungsmechanismen, die durch die freien H⁺-Ionen zu Stande kommen. Einer dieser Effekte ist die ionische Bindung des H⁺ an ATP, welche einen pK_D von 6,51 (Martell and Smith 1990) hat. Dieser ATP-bindende Aspekt der Protonen erniedrigt den aktivierenden Effekt des ATP auf die hochaffine wie die

niedrigaffine Bindungsstelle. Der andere Aspekt der Beeinflussung des hP2X₇R betrifft ausschließlich die niedrigaffine Bindungsstelle. Dieser Angriffsort der Protonen ist aller Wahrscheinlichkeit nach im P2X₇R-Protein lokalisiert. Dieser Effekt ist dominant bei der Aktivierung des hP2X₇R durch 10 µM BzATP oder 0,1 mM ATP. Aus den entsprechenden in Abb. 5 und 6 dargestellten Messungen kann ein pK_H-Wert von 6,8 für die Bindung von H⁺ an diese Stelle angenommen werden (Tab. 5).

Da H⁺-Ionen in Abhängigkeit von der Agonisten-Konzentration unterschiedliche Effekte auf den hP2X₇R haben, ist der in den Abb. 5 und 6 dargestellte pH-Effekt eine Kombination aus ATP⁴⁻-Bindung und allosterischer Unterdrückung der Wirkung der niedrigaffinen Bindungsstelle auf die hP2X₇R-Aktivierung. Die Approximation der Daten anhand von Gl. 5 ist eine Simplifizierung der Sachlage und kann darum nur als quantitative und nicht als kausale Beschreibung betrachtet werden.

Tab. 5: Effekt der extrazellulären H⁺-Konzentration auf die Aktivierung des hP2X₇R (s. Abb. 4, 5 und 6). Die angegebenen Agonist-Konzentrationen in mmol/l. Die Berechnung der Parameter erfolgt mittels Gl. 5.

	I _{rel,∞} (%)	c (%)	pK _H
0,1 ATP ⁴⁻	51 ± 4*	79 ± 2*	7,0 ± 0,1
0,1 ATP _{ges}	88 ± 4	52 ± 3	6,8 ± 0,1
0,01 ATP	82 ± 4	30 ± 4*	6,1 ± 0,1*
0,001 BzATP	94 ± 7	19 ± 6	6,3 ± 0,1
0,01 BzATP	159 ± 4*	15 ± 3	6,8 ± 0,1*

*: signifikanter Unterschied zu 0,1 ATP_{ges} bzw. zu 0,001 BzATP.

4.1.3 Effekt des pH-Wechsels während der Agonistenapplikation

Die Abb. 7A-D zeigen die Veränderung der Stromgröße bei andauernder ATP-Applikation und einem pH-Wert von 7,4 und kurzzeitigem (6 s) pH-Wert-Wechsel zu 6,4 oder 8,4. Die Experimente erfolgten mit konstant gehaltener freier (ATP^{4-}) oder absoluter (ATP) ATP-Konzentration. Die pH-bedingten Änderungen des aktivierten $\text{hP2X}_7\text{R}$ wurden, wie in Abb. 7B dargestellt, ausgemessen und entsprechend Gl. 6 quantifiziert.

Gleichung 6

$$\Delta I_{act,pH,rel} = \frac{I_{act,7.4} + \Delta I_{act,pH}}{I_{act,7.4}} - 1$$

Die statistische Auswertung (Abb. 7E) ergibt, dass eine akute Ansäuerung den ATP-induzierten Strom vermindert, eine Alkalisierung ihn verstärkt. Die Effekte sind auch bei Konstanthaltung der freien ATP^{4-} -Konzentration vorhanden, jedoch signifikant vermindert.

Im Fall von pH 6,4 entspricht dieses dem Erwartungswert (Abb. 3). Im Fall von pH 8,4 ist die signifikante Stromvergrößerung überraschend, da die ATP-Konzentrations-Wirkungskurve weder im Fall der niedrigaffinen noch im Fall der hochaffinen Bindungsstelle eine signifikante Veränderung der Potenz oder der Wirksamkeit zeigte (Abb. 3). In jedem Fall wäre zu erwarten gewesen, dass die Veränderung der Stromgröße eine stärkere pH-Abhängigkeit bei einer Ansäuerung als bei einer Alkalisierung der Lösung zeigt. Eine abschließende Erklärung für den stärker ausgeprägten Effekt bei pH 8,4 nach vorheriger ATP-Applikation bei pH 7,4 kann nicht erbracht werden. Es ist zu berücksichtigen, dass bei einer Alkalisierung der Lösungen möglicherweise eine signifikante Steigerung der Wirksamkeit der Agonisten besteht. Dass dieses in Abb. 3 nicht offenbar wird, kann durch die große Streuung der gemessenen Werte bedingt sein. Die große Standardabweichung in Abb. 3 wird verursacht durch die Applikation von sättigenden Agonisten-Konzentrationen, die vor allem im neutralen und alkalischen Bereich zu absoluten Strömen führen, die eine kritische Größe erreichen und die Zellintegrität gefährden. Eine weitere mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass während der langandauernden ATP-Applikation sekundär andere (z.B. dehnungsabhängige) Ionenkanäle aktiviert werden, die pH-abhängig sind.

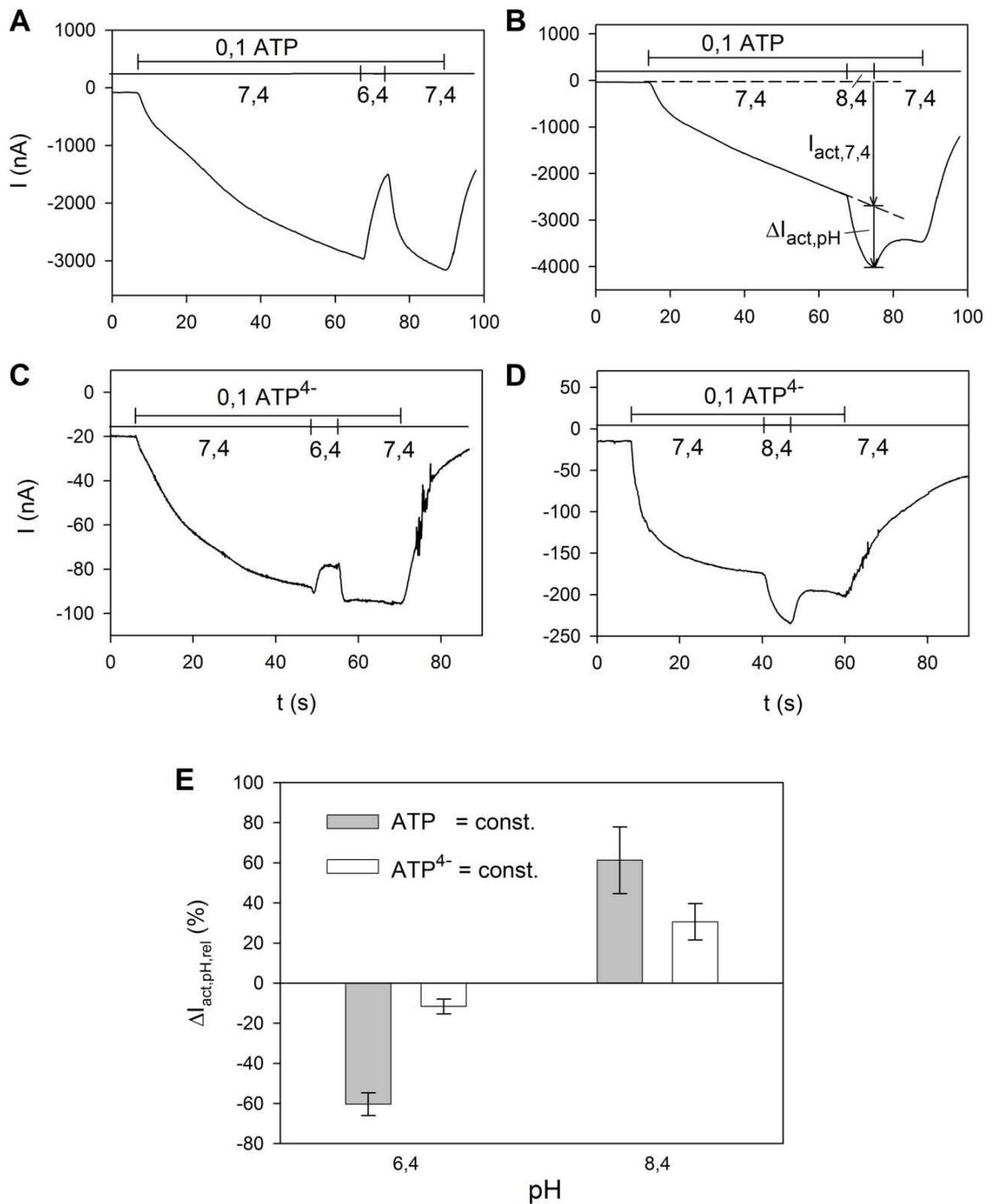


Abb. 7: Einfluss einer pH-Änderung auf ATP-aktivierte Ströme des hP2X₇R.

A-D: Typische Registrierungen. Die Applikation von 0,1 mM ATP sowie Änderungen des pH-Wertes der Badlösung sind durch horizontale Balken gekennzeichnet. Während der Aktivierung der hP2X₇R durch 0,1 mM ATP wurde der pH-Wert für 6 s von 7,4 auf 6,4 (A, C) bzw. 8,4 (B, D) verändert. Dabei wurde entweder die absolute (A, B) ATP- oder die freie ATP⁴⁻-Konzentration (C, D) konstant gehalten. E: statistische Auswertung. Die pH-bedingten Änderungen wurden entsprechend Gl. 6 quantifiziert. Alle Werte sind signifikant voneinander verschieden. N = 6 - 10.

4.2 Der hP2X₇^{S339Y}-Rezeptor

Um die Beeinflussung der hochaffinen Bindungsstelle des hP2X₇R durch den extrazellulären pH-Wert unabhängig vom Effekt der niedrigaffinen Bindungsstelle zu untersuchen, erfolgte die Expression der Mutante hP2X₇^{S339Y}R in *Xenopus*-Oozyten. Typische Ganzzellströme der hP2X₇^{S339Y}R-exprimierenden Oozyten nach der Applikation von 0,1 mM ATP bei den pH-Werten 6,4, 7,4 und 8,4 sind in Abb. 8 dargestellt.

hP2X₇^{S339Y}R-abhängige Ströme sind gekennzeichnet durch eine monophasische ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit einer ATP-Dissoziationskonstante von etwa 0,5 μ M. Die Sättigung des Rezeptors erfolgt also bei ATP-Konzentrationen im mikromolaren Bereich (Abb. 10). Dieses gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass ausschließlich die hochaffine Bindungsstelle zur Aktivierung des hP2X₇^{S339Y}R führt. Darüber hinaus führt die Verwendung von BzATP als Agonist zu einer höheren Potenz, aber einer unveränderten Wirksamkeit gegenüber dem ATP (Abb. 10A). Das Absenken des pH-Wertes von 7,4 auf 6,4 hat einen wesentlich geringeren Effekt auf die Potenz des Agonisten, wenn man die freie ATP-Konzentration ($[Agonist^{4+}]$) als Agonisten und H⁺ als ATP-bindendes Agens betrachtet (vgl. Abb. 10A und B, Tab. 6).

Bei einer absoluten ATP-Konzentration von 0,1 mM ATP erfolgt keine Veränderung der Stromgröße des hP2X₇^{S339Y}R in Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 8, 9). Die Erklärung wird offensichtlich bei der Betrachtung der ATP-Konzentrations-Wirkungskurve des hP2X₇^{S339Y}R (Abb. 10). Das Absenken des pH auf 5,7 bewirkt die Reduktion der freien ATP-Konzentration von 0,1 mM auf 0,013 mM (Gl. 1, Tab. 2), welches wie 0,1 mM eine nahezu sättigende Konzentration darstellt. Der hemmende Effekt der Protonen auf die Stromgröße des hP2X₇^{S339Y}R bei einer absoluten ATP-Konzentration von 0,01 mM ATP kann vollständig durch den ATP-bindenden Effekt der Protonen erklärt werden. Abb. 10B demonstriert dieses, indem eine parallele Darstellung der pH-Effekte bei einer absoluten ATP-Konzentration von 0,01 mmol/l und des Effektes von unterschiedlichen freien ATP-Konzentration bei konstantem pH erfolgt.

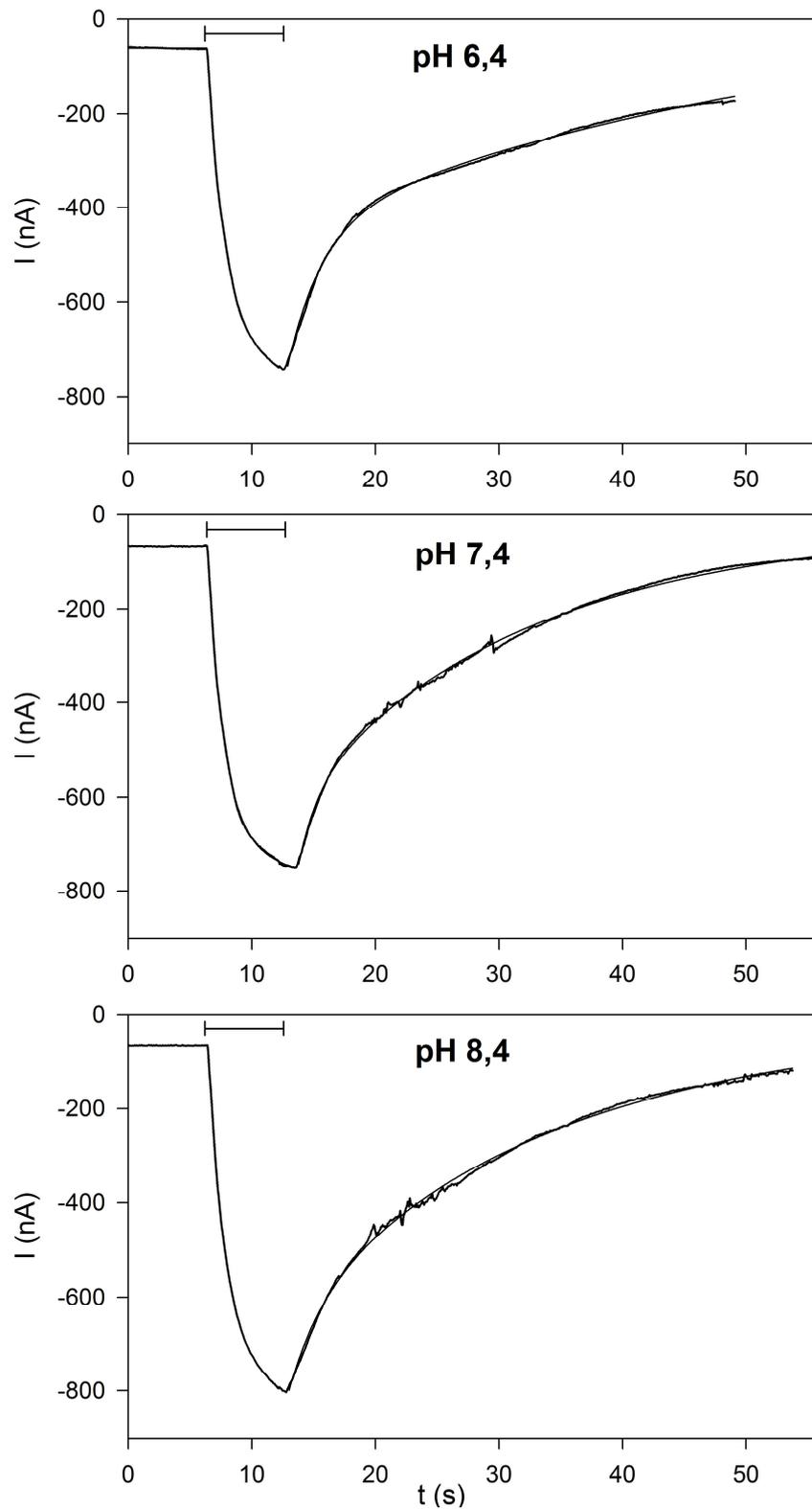


Abb. 8: Einfluss des extrazellulären pH auf mutierte P2X₇R ohne funktionelle niedrigaffine Ligandenbindungsstelle. Typische Beispiele hP2X₇^{S339Y}R-abhängiger Ströme bei unterschiedlichem extrazellulären pH-Wert wie angegeben. Die horizontalen Balken geben die Zeit der Applikation von 0,1 mM ATP an. Die Stromverläufe wurden mittels Gl. 2 und Gl. 3 approximiert.

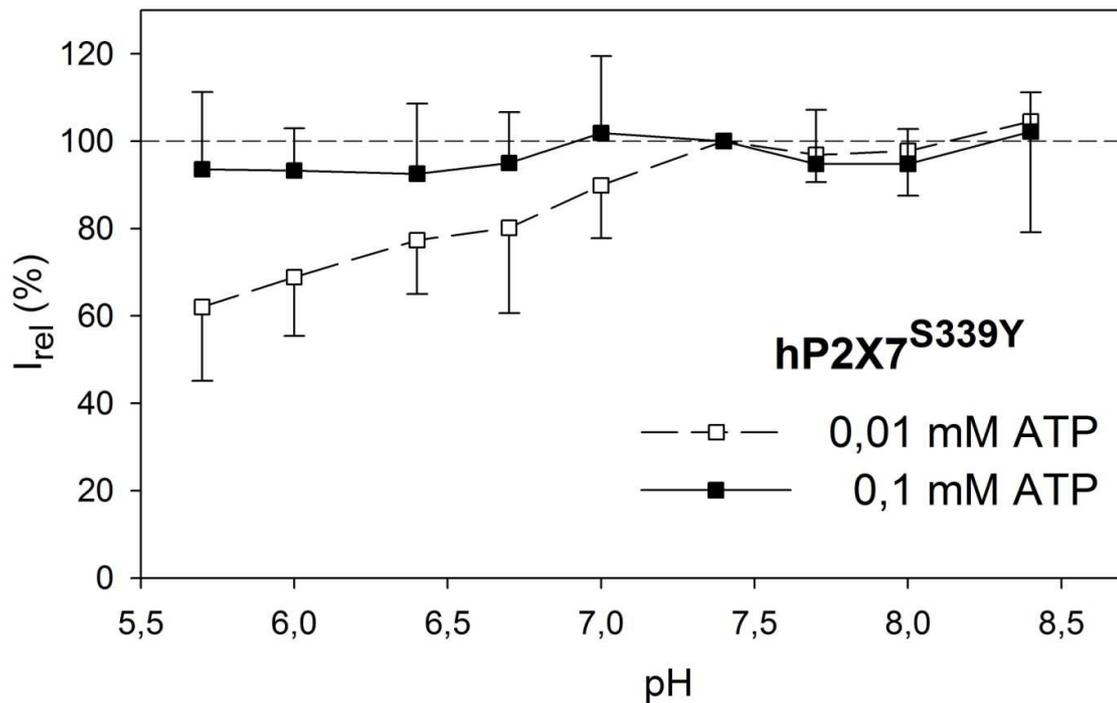


Abb. 9: Beeinflussung ATP-induzierter Ströme des hP2X₇^{S339Y}R durch den extrazellulären pH-Wert. Die Stromamplituden nach 6 s ATP-Applikation von 0,01 bzw. 0,1 mM ATP wurden auf einen pH-Wert von 7,4 normiert. N = 4 - 12.

Tab. 6: Einfluss des extrazellulären pH-Wertes und des verwendeten Agonisten auf das Konzentrations-Wirkungs-Verhalten des hP2X₇^{S339Y}R. Die Berechnung der Parameter erfolgte mittels Gl. 4.

P2X ₇ R	I _{rel,∞,1} (%)	pK _{D,1} (Agonist)	pK _{D,1} (Agonist ⁴⁺)
S339Y, ATP pH 6,4	105 ± 4	5,5 ± 0,1 *	5,9 ± 0,1 \$,*
S339Y, ATP pH 7,4	102 ± 2	6,2 ± 0,05	6,2 ± 0,05
S339Y, BzATP pH 7,4	101 ± 2	6,9 ± 0,05 *	6,9 ± 0,05 *

*: signifikanter Unterschied zu den bei pH 7,4 kalkulierten Parametern.

\$: signifikanter Unterschied zwischen den kalkulierten Werten bei freier (Agonist⁴⁺) und totaler (Agonist) ATP-Konzentration.

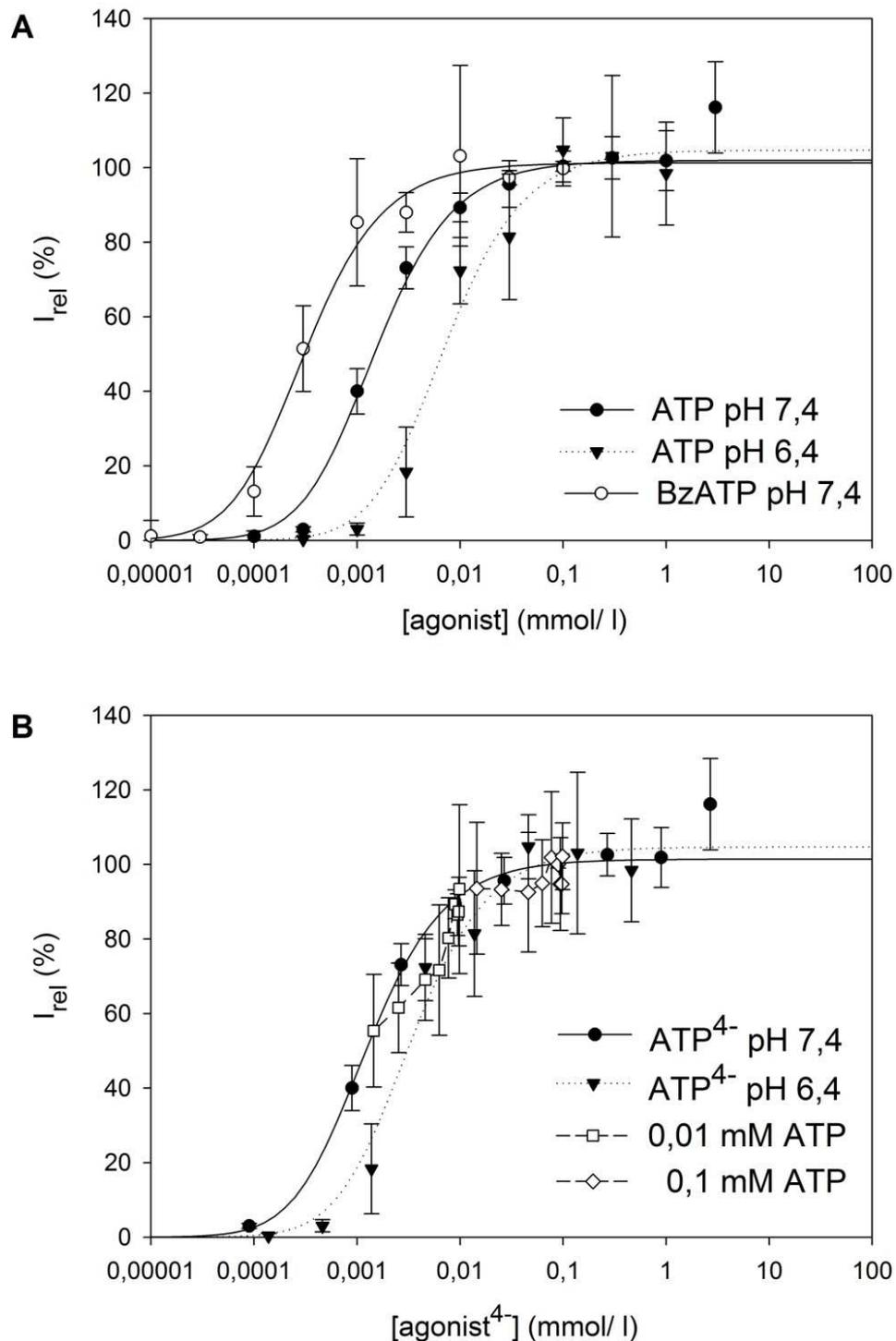


Abb. 10: Beeinflussung der Aktivierung des hP2X₇^{S339Y}R durch Art und Konzentration des Agonisten und den pH-Wert. Die Amplituden der durch totale (A) bzw. freie (B) Agonistenkonzentrationen induzierten hP2X₇R-abhängigen Ströme wurden nach Gl. 4 (mit $I_{rel,\infty,2} = 0$) normiert und approximiert. B: Die offenen Symbole □, ◇ repräsentieren Daten aus Abb. 9 und stellen diese als Abhängigkeit der relativen aktivierenden Stromgröße von der freien ATP⁴⁻-Konzentration dar. Die Errechnung der freien ATP-Konzentrationen erfolgte mittels Gl. 1. Die Parameter der Approximation sind aus Tab. 6 zu entnehmen. N = 4 – 19.

4.3 Einfluss von Protonen auf die Deaktivierungskinetik des P2X₇R

Beim wt P2X₇R kommt für die beiden Agonisten ATP und BzATP die Reduktion des deaktivierenden Stromes augenscheinlich vor allem auf Kosten der schnell deaktivierenden Komponente zu Stande (Abb. 1, Abb. 2). Es besteht eine signifikante Reduktion des Anteils des schnell deaktivierenden Stromes am gesamten deaktivierenden Strom bei pH 6,4 im Vergleich zu pH 7,4 und pH 8,4 (Abb. 11).

Der schnell deaktivierende Strom wird verursacht durch die Deaktivierung der niedrigaffinen ATP-Bindungsstelle des P2X₇R (Klapperstück et al. 2001; Becker et al. 2008). Die in Abb. 11 dargestellten Effekte der Konzentrationen 0,1 mM ATP und 0,01 mM BzATP verursachen im Fall des wt P2X₇R vor allem eine Aktivierung der niedrigaffinen Bindungsstelle (Abb. 3). Der signifikante Unterschied bei diesen Konzentrationen mit verschiedenen pH-Werten belegt eine starke Beeinflussung der niedrigaffinen Bindungsstelle durch Protonen.

Die Deaktivierung des hP2X₇^{S339Y}R erfolgt langsam, was kennzeichnend ist für Ströme, die durch die hochaffine Bindungsstelle verursacht werden (Klapperstück et al. 2001; Becker et al. 2008). Die Zeitkurve der Deaktivierung unterliegt keiner Beeinflussung durch die Veränderung des pH-Wertes (Abb. 8, Abb. 11). Legt man zugrunde, dass diese Mutante lediglich eine Aktivierung über die hochaffinen Bindungsstellen aufweist, belegt dieses die Hypothese, dass extrazelluläre Wasserstoffionen die Deaktivierungskinetik des hP2X₇R vorrangig über die Beeinflussung der niedrigaffinen Bindungsstelle verändern.

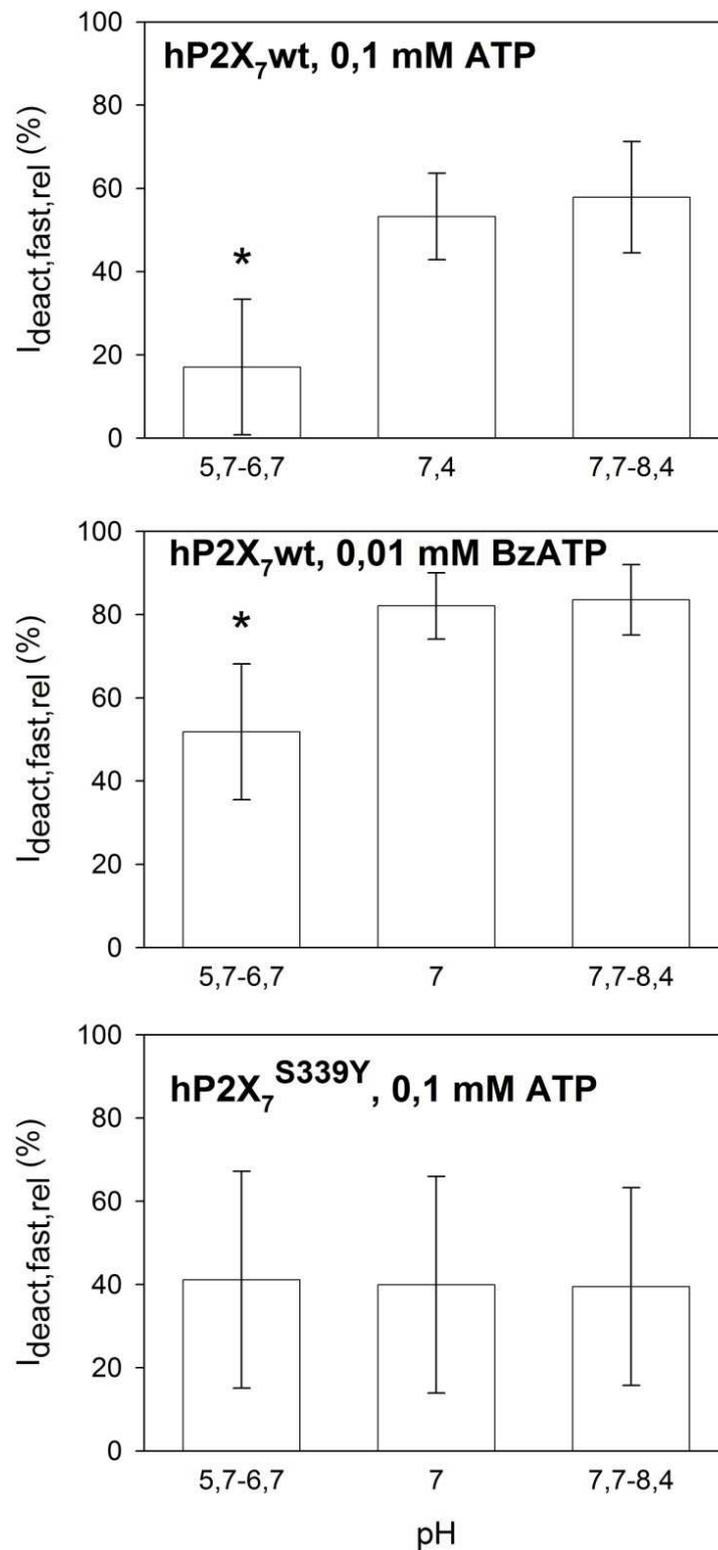


Abb. 11: Beeinflussung des Deaktivierungszeitverhaltens hP2X₇R-abhängiger Ströme durch den pH-Wert. Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf den Anteil des schnell deaktivierenden Stromes ($I_{\text{deact,fast,rel}} = I_{\text{deact,fast}} / (I_{\text{deact,fast}} + I_{\text{deact,slow}})$, s. Gl. 3) auf hP2X₇R-abhängige Ströme, die durch 0,1 mM ATP (oben) oder 0,01 mM BzATP (Mitte) ausgelöst wurden sowie auf durch 0,1 mM ATP induzierte Ströme der Mutante hP2X₇^{S339Y}R (unten). N = 7 – 27. Signifikant verschiedene Mittelwerte sind durch * gekennzeichnet.

4.4 Der hP2X₂-Rezeptor

Um einen weiteren Rezeptor der P2X-Familie mit ausschließlich hochaffiner Ligandenbindungsstelle in Bezug auf den Einfluss freier Protonen auf die Wirksamkeit und Potenz des ATP zu untersuchen, erfolgte die experimentelle Untersuchung des hP2X₂R.

Die hP2X₂R-abhängigen Ströme zeigen keine pH-Abhängigkeit der Stromgröße bei 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M ATP. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Ganzzellströme im Bereich des pH von 5,7 bis 8,4 nachgewiesen werden (Abb. 12).

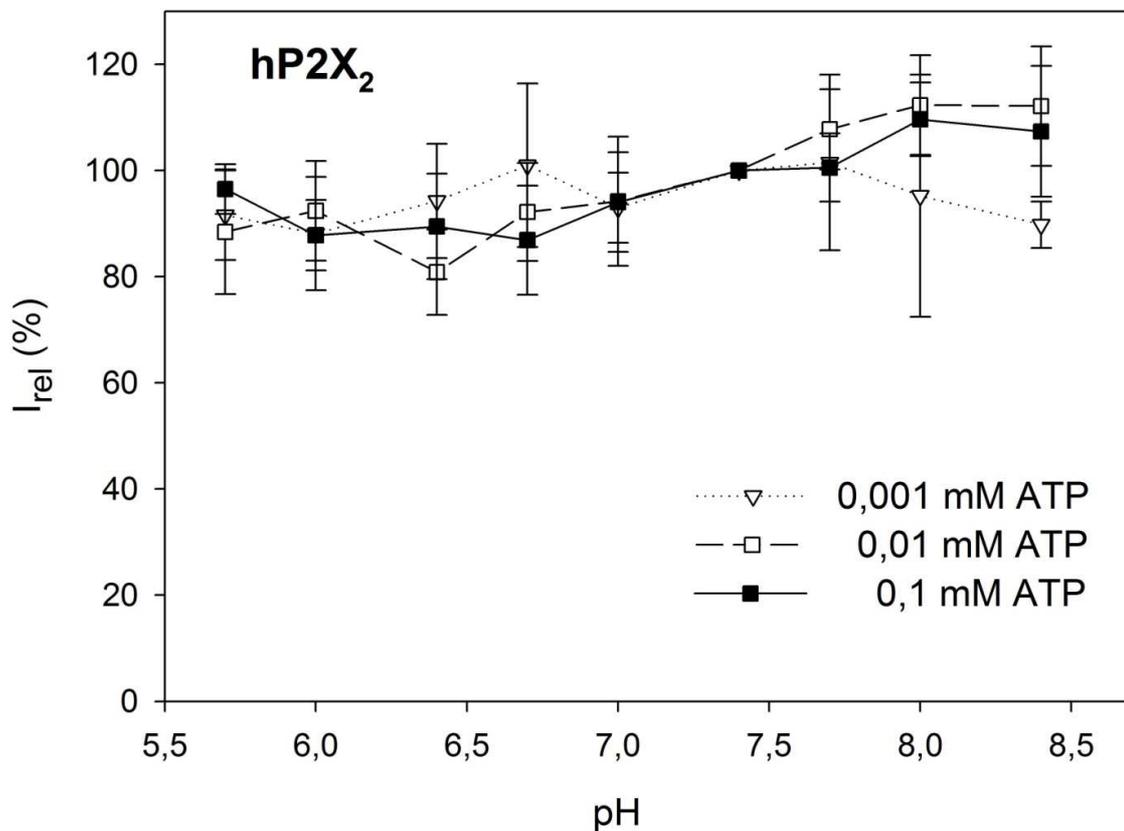


Abb. 12: Beeinflussung hP2X₂R-abhängiger ATP-induzierter Ströme durch den extrazellulären pH-Wert. Die Stromamplituden nach 6 s ATP-Applikation wurden auf einen extrazellulären pH-Wert von 7,4 normiert. N = 5 – 23.

5. Diskussion

5.1 Die pH-Abhängigkeit der Rezeptoren der P2X-Rezeptor-Familie

Extrazelluläre H^+ -Ionen verursachen verschiedene Effekte an den einzelnen Rezeptoren der P2XR-Familie. Beschrieben worden ist, dass ein Absenken des pH-Wertes die Aktivierung der $P2X_1$ -, $P2X_3$ -, $P2X_4$ - und $P2X_5$ -Rezeptoren hemmt und dass es zu einer Rechtsverschiebung der ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei erniedrigtem pH-Wert im Verhältnis zu pH 7,3 kommt, während die Alkalisierung der applizierten Lösung nur eine geringgradige Linksverschiebung der ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve verursachte (Stoop et al. 1997; Haines et al. 1999; Wildman et al. 2002).

Weiterhin unterscheiden sich die P2XR bezüglich der pH-Abhängigkeit der Wirksamkeit der Agonisten. Der $P2X_1$ R zeigt keine Veränderung des maximal aktivierenden Stromes bei variablem pH-Wert (Stoop et al. 1997). Im Fall des $P2X_3$ R ist die Datenlage inhomogen. Es wurde sowohl eine Zunahme des maximal aktivierenden Stromes bei hohen ATP-Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{mol/l}$ $\alpha\beta$ -Methyl-ATP) im sauren Milieu (pH 5,8) (Gerevich et al. 2007) als auch eine Erniedrigung des maximal aktivierenden Stromes bei vermindertem pH-Wert beschrieben (Wirkner et al. 2008). Für den $P2X_4$ R ist sowohl ein unveränderter maximal aktivierender Strom (Stoop et al. 1997) als auch eine Erniedrigung des maximal aktivierenden Stroms beschrieben worden (Clarke et al. 2000). Der $P2X_5$ R-abhängige maximal aktivierende Strom ist bei der Applikation saurer Lösungen erniedrigt (Wildman et al. 2002). Ganz anders verhält sich der $P2X_2$ R, wenn man die aktuelle Studienlage berücksichtigt. Bei niedrigen pH-Werten nimmt die Potenz der Agonisten des $P2X_2$ R zu, für den maximal aktivierenden Strom liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (s.u.).

Durch lokalisationspezifische Mutagenese konnte gezeigt werden, dass Histidinreste der extrazellulären AS-Sequenz essenziell für die pH-Abhängigkeit des $P2X_2$ R (His³¹⁹) (Clyne et al. 2002a), des $P2X_3$ R (His²⁰⁶) (Gerevich et al. 2007) und des $P2X_4$ R (His²⁸⁶) (Clarke et al. 2000; Yan et al. 2005) sind.

Der Wildtyp (wt) des $rP2X_4$ R zeigt bei einem niedrigen pH-Wert eine Rechtsverschiebung der ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Stoop et al. 1997), während bei der Mutation des Histidins zu Alanin an Position 286 (His²⁸⁶Ala) keine pH-Abhängigkeit der $rP2X_4$ R-abhängigen Ströme mehr nachzuweisen ist (Clarke et al. 2000; Yan et al. 2005).

Der $rP2X_3$ R zeigt ebenfalls eine Rechtsverschiebung der ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei niedrigem pH-Wert (pH 6,3) (Stoop et al. 1997; Gerevich et al. 2007). Zu der pH-Abhängigkeit der Wirksamkeit der Agonisten des $P2X_3$ R liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (s.o.). Gerevich et al. zeigten, dass der maximal aktivierende Strom bei niedrigem pH-Wert und hohen Agonisten-Konzentrationen zunimmt und dass diese pH-Abhängigkeit durch die Mutation His²⁰⁶Ala aufgehoben wird (Gerevich et al. 2007). Weiterhin konnte eine Beteiligung

von Asparaginen (Asn) in der extrazellulären AS-Sequenz des P2X₃R an der pH-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Die daraus abgeleitete Hypothese ist, dass eine vollständige N-Glykosylierung für eine reguläre Beeinflussung des P2X₃R durch den externen pH notwendig ist (Wirkner et al. 2008).

Im Vergleich mit dem P2X₇R wird deutlich, dass auch die ATP-Konzentrations-Wirkungskurven der Rezeptoren P2X₁, P2X₃, P2X₄ und P2X₅ rechtsverschoben sind. Die Frage, ob dieser Rechtsverschiebung die gleiche Kausalität, also die Protonierung des ATP, zugrunde liegt, kann nur teilweise beantwortet werden.

Der P2X₁R wird in Abwesenheit von Ca²⁺ und Mg²⁺ aktiviert, welches zeigt, dass ATP⁴⁻ ein wirksamer Agonist ist (Seyffert et al. 2004). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Protonierung des ATP⁴⁻ die Potenz des Agonisten des P2X₁R vermindert.

Im Fall der Rezeptoren P2X₃ und P2X₄ erscheint dieses unwahrscheinlich, da die Mutanten mit dem Austausch einer Aminosäure vom pH-Wert unabhängig werden (s.o., Skorinkin et al. 2003; Gerevich et al. 2007). Dieses legt nahe, dass der Effekt der Protonen hauptsächlich durch eine allosterische Beeinflussung zu Stande kommt. Es ist also davon auszugehen, dass entweder das freie ATP⁴⁻ nicht der aktive Ligand ist oder aber dass eine stattfindende ionische Bindung des ATP⁴⁻ durch die Protonen keinen Effekt hat, da die Affinität der Rezeptoren zum ATP wesentlich höher ist als der elektrovalente Effekt der Protonen oder dass die Annäherung des ionengebundenen ATP an die ATP-Bindungsstelle der P2XR die Ionenbindung schwächt.

Der P2X₅R ist experimentellen Untersuchungen schwierig zugänglich. Divalente Kationen haben stark differierende Effekte auf die Aktivierung des Rezeptors. Die divalenten Kationen Ca²⁺ und Zn²⁺ potenzieren die P2X₅R-abhängigen Ströme jeweils bei niedrigen Konzentrationen und hemmen diese bei hohen Konzentrationen (Wildman et al. 2002). Es ist aus der aktuellen Studienlage nicht möglich, Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von freiem ATP und den Effekt der ionischen Bindung des ATP durch divalente Kationen und Protonen beim P2X₅R zu ziehen. Weiterhin ist bei den desensitivierenden Rezeptoren P2X₁, P2X₃ und auch P2X₄ zu berücksichtigen, dass die verwendeten Messverfahren mit ihren im Vergleich zur Rezeptorkinetik langsamen Lösungswechseln (z.B. bei der Messung von Ganzzellströmen innerhalb von mehr als hundert Millisekunden (Hamill et al. 1981; Fenwick et al. 1982)) keine Aktivierung der Rezeptoren im Gleichgewicht ermöglichen (Rezeptoraktivierung und Rezeptordesensitivierung deutlich schneller (North 2002)) und somit die Interpretationen von Konzentrations-Wirkungs-Kurven erschweren. So wurde bei genauerer Analyse der ATP-Konzentrationsabhängigkeit des P2X₁R eine Aktivierung bereits in nanomolaren Bereich gefunden (Rettinger and Schmalzing 2003), während ansonsten von einer Aktivierung durch Konzentrationen im mikromolaren Bereich berichtet wird (North 2002).

5.2 Die pH-Abhängigkeit des hP2X₂-Rezeptors

Die Untersuchung des hP2X₂R erfolgte, um neben dem hP2X₇^{S339Y}R einen weiteren Vergleich mit einem P2XR mit ausschließlich hochaffinen Bindungsstellen zu haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei der Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes bei 1 µM, 10 µM und 100 µM ATP keine signifikanten Veränderungen der P2X₂R-abhängigen Ganzzellströme im Bereich des pH von 5,7 bis 8,4 entstehen (Abb. 12). Es zeigt sich weder eine Veränderung der Potenz noch der Wirksamkeit des Agonisten ATP.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den bisher publizierten Ergebnissen zur pH-Abhängigkeit des P2X₂R, die zumindest eine gesteigerte Potenz des Agonisten ATP erwarten lassen (King et al. 1997; Stoop et al. 1997; Wildman et al. 1998; Ding and Sachs 1999b; Clyne et al. 2002a; Skorinkin et al. 2003).

Die o.g. Untersuchungen zeigen, dass ein niedriger pH-Wert eine gesteigerte Affinität des P2X₂R für Agonisten und somit eine Linksverschiebung der ATP-Konzentrations-Wirkungskurve bewirkt. Die Größe des P2X₂R-abhängigen maximal aktivierenden Stromes zeigte sich in der Mehrzahl der Untersuchungen vom pH-Wert unbeeinflusst (King et al. 1997; Stoop et al. 1997; Ding and Sachs 1999b; Clyne et al. 2002a).

Allerdings wurde ebenfalls berichtet, dass bei höheren ATP-Konzentrationen (> 100 µM) im sauren Milieu im Vergleich zum neutralen Milieu eine Verminderung des maximal aktivierenden Stromes resultiert (Stoop and Quayle 1998; Skorinkin et al. 2003).

Die ATP-Konzentrations-Wirkungskurven von Skorinkin et al. (Skorinkin et al. 2003) zeigen bei einer ATP-Konzentration von 100 µmol/l einen relativen aktivierenden Strom von gleicher Größe für den pH-Wert von 6,0 im Vergleich zu 7,4. Dies ist im o.g. Fall der Schnittpunkt der beiden Kurven, der durch die Linksverschiebung der ATP-Konzentrations-Wirkungskurve bei pH 6,0 und die gleichzeitige Erniedrigung der Größe des maximal aktivierenden Stromes bei pH 6,0 zu Stande kommt. Dieses wäre eine Erklärung für die bei 100 µM ATP gemessene fehlende pH-Abhängigkeit in den hier vorliegenden Experimenten. Es liefert aber keine Erklärung für die fehlende pH-Abhängigkeit bei 1 µM und 10 µM ATP.

Die Versuchsbedingungen, unter denen die hier präsentierten Werte erhoben wurden, unterscheiden sich von den Versuchsbedingungen der anderen Studien: Für die Versuche dieser Arbeit wurde die RNS des humanen P2X₂-Rezeptors injiziert. Die oben genannten Untersuchungen erfolgten unter Verwendung der RNS des P2X₂R der Ratte (King et al. 1997; Stoop et al. 1997; Wildman et al. 1998; Ding and Sachs 1999b; Clyne et al. 2002a; Skorinkin et al. 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass die für die pH-Abhängigkeit relevanten Aminosäuren sich in den speziestypischen RNS unterscheiden.

Clyne et al. untersuchten die Eigenschaften des polaren Cysteins und des positiv geladenen Histidins in der extrazellulären AS-Sequenz des rP2X₂R (Clyne et al. 2002a, b). Sie konnten zeigen, dass bei Austausch eines der Histidine gegen Alanin (His³¹⁹Ala) eine Mutante entsteht,

die keine pH-Abhängigkeit zeigt (Clyne et al. 2002a). Die humane RNS unterscheidet sich an dieser Position nicht von der RNS der Ratte (Lynch et al. 1999). Jedoch sollte der Effekt der Mutation His³¹⁹Ala durch die Expression der humanen RNS mit der entsprechenden Mutation verifiziert werden.

Neben der speziesdifferenten RNS unterschieden sich die Versuchsbedingungen weiterhin in der verwendeten Badlösung. Es wurde bei allen oben genannten Publikationen entweder mit Ca²⁺-haltiger (Wildman et al. 1998), mit Mg²⁺-haltiger (Clyne et al. 2002a) oder mit Ca²⁺- und Mg²⁺-haltiger Badlösung (King et al. 1997; Stoop et al. 1997; Ding and Sachs 1999b; Skorinkin et al. 2003) experimentiert. Vor der Etablierung der Verwendung von Flufenaminsäure in der Badlösung wurden fortwährend Badlösungen mit divalenten Kationen verwendet, da Oozyten unter Abwesenheit von Flufenaminsäure und divalenten Kationen auf Grund eines Leckstroms (Klapperstück et al. 2000a) die experimentellen Gegebenheiten nicht tolerieren. Für divalente Kationen und insbesondere für Ca²⁺ ist beschrieben worden, dass sie einen hemmenden Effekt auf die Kanalaktivierung des rP2X₂R haben und dass eine Desensitivierung des rP2X₂R nur in Anwesenheit von Ca²⁺ stattfindet (Ding and Sachs 2000). Es ist nicht auszuschließen, dass die Anwesenheit von Kalzium die Proteinkonformation und damit den pH-Effekt beeinflusst und somit auch die Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen für den potenzierenden Effekt der H⁺-Ionen am rP2X₂R erforderlich ist.

Die Möglichkeit, dass ein pH-abhängiger unterschiedlicher Dissoziierungsgrad der Flufenaminsäure einen Effekt auf die pH-Abhängigkeit des P2X₂R hat, ist unwahrscheinlich, da Flufenaminsäure mit einem pK_S-Wert von 3,6 bis 4,0 (Hill et al. 2004) im experimentellen pH-Bereich kaum eine Veränderung der Protonierung des Moleküls aufgewiesen haben kann.

Die endgültige Erklärung für die Divergenz zwischen der bestehenden Studienlage und dieser Arbeit kann an dieser Stelle nicht erbracht werden und erfordert weitere Untersuchungen.

Im Kontrast zum P2X₇R zeigt sich laut der vorbestehenden Datenlage im Fall des P2X₂R im aziden Bereich eine gesteigerte Affinität des Rezeptors für Agonisten, während die pH-Abhängigkeit des maximal aktivierenden Stromes im Bereich höherer ATP-Konzentrationen kontrovers diskutiert wird (s.o.). Die Mutation von Histidin an Position 319 (His³¹⁹Ala) hebt die pH-Abhängigkeit der Affinität des rP2X₂R für Agonisten bei saurem pH-Wert auf. Zusätzlich zeigt die Mutante His³¹⁹Ala eine deutliche Erniedrigung des maximal aktivierenden Stromes bei hohen ATP-Konzentrationen im sauren Milieu (Clyne et al. 2002a). Interessant ist, dass diese Erniedrigung des maximal aktivierenden Stromes durch einen niedrigen pH-Wert beim Wildtyp zu den diskutierten und nicht abschließend geklärten Phänomenen gehört. Aus den genannten Beobachtung lässt sich ableiten, dass Protonen die ATP-Affinität der Ligandenbindungsstelle des rP2X₂R erhöhen, aller Wahrscheinlichkeit nach über die Beeinflussung des His³¹⁹. Eine mögliche und die einfachste Erklärung hierfür ist eine stärker positive Ladung der Bindungsstellen durch die Protonierung. Diese Beeinflussung liefert aber keine Erklärung für

die diskutierte Erniedrigung des maximal aktivierenden Stromes. Dass dieser Effekt bei der Mutante des rP2X₂R sehr deutlich zu Tage tritt, lässt Raum für die Spekulation, dass es neben His³¹⁹ eine weitere Protonenbindungsstelle gibt, die bei der Ausschaltung der ersten Protonenbindungsstelle (His³¹⁹) eine gesteigerte Bedeutung erlangt.

5.3 Die pH-Abhängigkeit der hochaffinen und niedrigaffinen Bindungsstellen des hP2X₇-Rezeptors

Die Untersuchungen des hP2X₇R haben das bekannte Phänomen der zweifach sigmoiden Beziehung zwischen der ATP-Konzentration und der Kanalaktivierung im Sinne einer Bindung von mindestens zwei ATP-Molekülen bestätigt (Abb. 3, Klapperstück et al. 2001). Die vorliegende detaillierte Untersuchung des hP2X₇R zeigt, dass die Modulation des hP2X₇R durch Protonen sehr komplex ist und dass sowohl die hochaffine als auch die niedrigaffine Bindungsstelle (Klapperstück et al. 2001) durch extrazelluläre H⁺-Ionen beeinflusst werden. Zur Unterscheidung der pH-Effekte auf die Funktion dieser verschiedenen Bindungsstellen wurden verschiedene Ansatzpunkte genutzt:

- I. Verwendung niedriger und hoher Agonist-Konzentrationen, um jeweils nur die hochaffine oder niedrigaffine Bindungsstelle zu aktivieren,
- II. Untersuchung der Mutante hP2X₇^{S339Y}R, die nur die Effekte der hochaffinen Bindungsstelle aufweist,
- III. Verwendung hoher BzATP-Konzentration, um eine vornehmliche Untersuchung der niedrigaffinen Bindungsstelle zu ermöglichen.

Betrachtet man die bestehende Studienlage, so belegen die Ergebnisse dieser Studie die getroffene Aussage, dass die Aktivierung des Kanals im aziden Bereich geringer ist (Rozenfurt et al. 1977; Steinberg et al. 1987; Dubyak and El-Moatassim 1993). Ebenso konnten wir bestätigen, dass der maximal aktivierende Strom mit zunehmender Protonenkonzentration kleiner wird (Virginio et al. 1997; Acuna-Castillo et al. 2007; Liu et al. 2009).

Die YO-PRO 1-Aufnahme ist ein sehr indirektes Maß für die Kanalaktivierung, da nach dem Übertritt des Moleküls in die Zelle zunächst eine Bindung an die DNS erfolgen muss, bevor die Fluoreszenz-Messung erfolgen kann. Des Weiteren setzt die YO-PRO 1-Aufnahme eine Permeabilitätssteigerung des P2X₇R voraus. Dennoch zeigt auch die YO-PRO 1-Aufnahme eine gleichsinnige pH-Abhängigkeit in Form einer verminderten Aufnahme von YO-PRO 1 in die Zelle bei der P2X₇R-Aktivierung unter dem Einfluss eines niedrigen pH-Wertes. Die YO-PRO 1-Aufnahme war allerdings auch unter alkalischen Bedingungen vermindert (Steinberg et al. 1987; Virginio et al. 1997; Michel et al. 1999).

Der Vergleich der äquivalenten freien und der absoluten ATP-Konzentration von 0,1 mmol/l ergab für beide H⁺-Konzentrations-Wirkungs-Kurven eine Beeinflussung der hP2X₇R-

abhängigen Stromgröße (Abb. 4). Diese ist im Fall der absoluten ATP-Abhängigkeit wesentlich stärker ausgeprägt. Im Nachfolgenden soll auf diesen Unterschied, der durch zwei unterschiedliche Phänomene bedingt ist, eingegangen werden.

5.3.1 Die pH-Abhängigkeit der hochaffinen Ligandenbindungsstelle

Die hochaffine Bindungsstelle des hP2X₇R wird bei Applikation eines Agonisten zuerst aktiviert und macht insbesondere bei niedrigen Agonisten-Konzentrationen den Hauptteil des aktivierenden Stromes aus (Klapperstück et al. 2001).

Die in Abb. 3 ersichtliche Rechtsverschiebung der ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve im Bereich der hochaffinen Bindungsstelle war ebenso im Fall der P2X₇R-abhängigen Stromgröße von der absoluten ATP-Konzentration wie im Fall der Abhängigkeit von der absoluten BzATP-Konzentration ([Agonist]) bei pH 6,4 im Vergleich zu pH 7,4 signifikant (Tab. 4). Diese Rechtsverschiebung lässt sich vollständig durch die ionische Bindung der H⁺-Ionen an das ATP⁴⁻ bzw. an das BzATP⁴⁻ und damit durch die Verringerung der freien Agonisten-Konzentration ([Agonist⁴⁻]) erklären.

Um die Hypothese zu untermauern, dass vor allem die elektrovalente Bindung des ATP durch Protonen einen Einfluss auf die hochaffine Bindungsstelle hat, erfolgte die Untersuchung einer Mutante, des hP2X₇^{S339Y}R. Die Aktivierung dieser Mutante erfolgt ausschließlich durch die hochaffine Bindungsstelle. Zum einen wird dieses belegt durch die Sättigung des Rezeptors im Bereich mikromolarer ATP-Konzentrationen und die monophasische ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Zum anderen sind die unveränderte Wirksamkeit bei gleichzeitig höherer Potenz von BzATP im Vergleich zu ATP (Abb. 10) und die langsame Deaktivierungskinetik (Abb. 11) typische Merkmale der hochaffinen Ligandenbindungsstelle bei P2X₇R-abhängigen Strömen (Klapperstück et al. 2001; Becker et al. 2008).

Die Beeinflussung des hP2X₇^{S339Y}R durch eine erhöhte Konzentration freier H⁺-Ionen führt zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für absolutes ATP ohne eine Veränderung des maximal aktivierenden Stromes (Abb. 10A). Dieses ist durch den ATP-bindenden Effekt der Protonen erklärbar (Abb. 10B, Tab. 6).

Die Hypothese, dass das freie ATP der wirksame Agonist des hP2X₇R ist und nicht MgATP²⁻ oder CaATP²⁻, wurde vielfach erwogen (Dahlquist and Diamant 1974; Cockcroft and Gomperts 1980; Steinberg et al. 1987; Di Virgilio et al. 1998; Klapperstück et al. 2001; North 2002).

Für die Hypothese spricht Folgendes:

- I. Bei erniedrigter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration bedarf es einer reduzierten ATP-Konzentration für die halbmaximale Aktivierung (EC_{50}) des Rezeptors (Di Virgilio et al. 1998).
- II. Bei Abwesenheit sämtlicher divalenter Kationen ist durch $[\text{ATP}^4]$ ein hP2X₇R-abhängiger Strom evozierbar, dessen Amplitude sich nicht wesentlich von der bei gleicher ATP^4 -Konzentration in Ba^{2+} -haltigen Medien gemessenen Strömen unterscheidet (Klapperstück et al. 2001).
- III. Es wurde der Nachweis erbracht, dass die hemmende Wirkung von Ca^{2+} - (Markwardt et al. 1997) und Mg^{2+} -Ionen (Klapperstück et al. 2001) auf die hP2X₇R-Aktivierung durch eine Komplexbildung mit ATP^4 zu Stande kommt.
- IV. Der hP2X₇R benötigt eine zehn- bis hundertfach höhere Agonisten-Konzentrationen für die Aktivierung als die anderen Rezeptoren der P2XR-Familie, da unter physiologischen Bedingungen das freie ATP nur etwa 1% ausmacht (Ralevic and Burnstock 1998).
- V. Sowohl der Ionenstrom als auch die Permeabilitätszunahme werden in Anwesenheit von divalenten Kationen inhibiert (Michel et al. 1999).
- VI. Die elektrovalente Bindung des freien ATP durch Protonen führt zu einer Rechtsverschiebung der ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (s.o.).

Folgende Argumente werden der Hypothese entgegen gesetzt:

- I. Die Effekte divalenter Kationen auf P2X₇R-abhängige Ströme können nicht alleine durch die Bindung des ATP erklärt werden (Virginio et al. 1997).
- II. Die Hemmung durch Zn^{2+} und Cu^{2+} kommt nicht durch die Komplexierung des ATP, sondern durch allosterische Modulation zu Stande (Liu et al. 2007).
- III. Es bestehen Hinweise darauf, dass es Mg^{2+} -Bindungsstellen in der extrazellulären AS-Sequenz des P2X₇R gibt (His^{130} , His^{201}), die für die Inhibition durch Mg^{2+} essenziell sind (Acuna-Castillo et al. 2007).

Sicher ist, dass ATP^4 ein wirksamer Agonist des hP2X₇R ist, da sonst kein charakteristischer hP2X₇R-abhängiger Strom in Abwesenheit divalenter Kationen erzielt werden könnte (Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und (Klapperstück et al. 2000a, 2001; Becker et al. 2008)). Ob CaATP^{2-} oder MgATP^{2-} ebenfalls wirksame Agonisten des hP2X₇R sind, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dieses ist jedoch unwahrscheinlich, da mittels Zugabe extrazellulärer Mg^{2+} -Ionen der ATP-induzierte Strom stark verringert wird (Seyffert et al. 2004).

Klare Hinweise gibt es dafür, dass die divalenten Kationen Zn^{2+} , Cu^{2+} und Mg^{2+} über eine allosterische Beeinflussung inhibitorisch auf die Aktivierung des P2X₇R wirken (Liu et al. 2007; Acuna-Castillo et al. 2007). Dieses schließt aber eine Komplexbildung des ATP durch diese Kationen nicht aus. Wie hier am Beispiel des H^+ gezeigt wurde, können Kationen sowohl zu einer ionischen Bindung des ATP als auch zu einer allosterischen Modifikation eines P2X-Rezeptors führen.

Aus der ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 3) wird ersichtlich, dass bei einer absoluten ATP-Konzentration von 0,1 mM eine vollständige Aktivierung der hochaffinen und eine partielle Aktivierung der niedrigaffinen Bindungsstelle vorliegt. Bei einer absoluten ATP-Konzentration von 0,01 mM ATP ist vorrangig eine Aktivierung der hochaffinen und kaum eine Aktivierung der niedrigaffinen Bindungsstelle anzunehmen (Abb. 3). Es ist davon auszugehen, dass die Beeinflussung der Stromgröße durch den pH-Wert im Fall von 0,1 mM ATP vor allem durch einen Effekt der Protonen auf die niedrigaffine Bindungsstelle verursacht wird und im Fall von 0,01 mM ATP auf den Effekt der Protonen auf die hochaffine Bindungsstelle zurückzuführen ist. Die aus diesen Messungen abgeleiteten Werte für eine halbmaximale Stromhemmung durch H^+ -Ionen (pK_H -Wert, s. Tab. 5) betragen für die niedrigaffine Bindungsstelle $6,8 \pm 0,1$ und für die hochaffine Bindungsstelle $6,1 \pm 0,1$. Damit ist die Beeinflussung der niedrigaffinen Bindungsstelle schon bei einer geringeren freien Protonenkonzentration manifest als die der hochaffinen Bindungsstelle. Dies bedeutet, dass der hP2X₇R bei geringeren aktivierenden ATP-Konzentrationen weniger pH-empfindlich ist.

5.3.2 Die pH-Abhängigkeit der niedrigaffinen Ligandenbindungsstelle

Die niedrigaffine Ligandenbindungsstelle des hP2X₇R zeigt ebenfalls eine pH-Abhängigkeit. Neben der Beeinflussung der Potenz des Agonisten durch H^+ -Ionen ist ein weiterer Effekt auf die P2X₇R-abhängige Stromgröße zu beobachten.

Die Rechtsverschiebung der ATP- und BzATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei erhöhter freier H^+ -Konzentration ist für die niedrigaffine Ligandenbindungsstelle ebenso zu beobachten wie für die hochaffine Ligandenbindungsstelle (Abb. 3, Tab. 4). Die Ursache hierfür ist auch im Fall der niedrigaffinen Bindungsstelle die Reduktion des freien ATP durch die ionische Bindung an Protonen. Die Beeinflussung beider Ligandenbindungsstellen durch einen ATP-bindenden Effekt von Kationen konnte bereits für Mg^{2+} beschrieben werden (Klapperstück et al. 2001). Eine Alkalisierung (auf pH 8,4) der Badlösung verändert weder im Fall der hochaffinen noch im Fall der niedrigaffinen Bindungsstelle die Potenz des ATP. Dieses ist erklärbar durch die geringgradige Veränderung der Protonierung des ATP^{4-} bei dieser pH-Wert-Veränderung (Tab. 2).

Die [Agonist⁴⁻]-Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind auch bei der Berücksichtigung der ATP-Bindung durch Protonen bei den pH-Werten 6,4, 7,4 und 8,4 nicht deckungsgleich (Abb. 3).

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich die Protonierung des ATP unter den bei den vorliegenden Ergebnissen verwendeten Versuchsbedingungen von denen der publizierten H^+ -Bindungskonstante (Martell and Smith 1990) unterscheidet. Eine weitere mögliche Ursache ist, dass es neben der ionischen Bindung des ATP einen weiteren hemmenden Effekt der Protonen auf die ATP-Bindungsstelle gibt. Dieses würde im Kontrast zu den für den $P2X_2R$ beschriebenen Effekten der Protonen stehen, die vermutlich hier auf Grund ihrer Ladung die Bindung des negativ geladenen ATP^{4-} , $CaATP^{2-}$ oder $MgATP^{2-}$ fördern (Skorinkin et al. 2003). Zusätzlich zu dem ATP-bindenden Effekt der Protonen konnte in der vorliegenden Arbeit eine weitere Beeinflussung der $hP2X_7R$ -abhängigen Ströme durch eine erhöhte Konzentration freier H^+ -Ionen gezeigt werden. Eine Erniedrigung des pH-Wertes (auf pH 6,4) verursacht eine Reduktion des maximal aktivierenden Stromes der niedrigaffinen Bindungsstelle (Abb. 3, Tab 4). Dieser Effekt der Protonen lässt sich nicht durch die Bindung der Protonen an das ATP erklären, da alle dargestellten ATP-Konzentrations-Wirkungs-Kurven die Sättigung des Rezeptors erreichen.

Es ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser zusätzlichen Beeinflussung der niedrigaffinen Ligandenbindungsstelle um einen allosterischen Effekt der Protonen auf den $hP2X_7R$ handelt, da in Einzelkanaluntersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Permeationseigenschaften des $P2X_7R$ keine Beeinflussung durch Protonen zeigen (Flittiger et al. 2010). Dieser allosterische Effekt betrifft die extrazelluläre Aminosäure-(AS)-Sequenz des $hP2X_7R$, da die Applikationsdauer von 6 s sicher keinen Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert hat. Zudem geschieht der Eintritt des pH-Effektes bei kontinuierlicher Applikation eines Agonisten und akutem pH-Wechsel etwa mit der Geschwindigkeit des Lösungswechsels in der verwendeten Badkammer im Bereich von 1-2 s (Abb. 7) (Klapperstück et al. 2000a). Dieses spricht für einen extrazellulären Angriffspunkt der H^+ -Ionen.

Eine veränderte H^+ -Konzentration kann die Protonierung und Ladung und damit die Tertiärstruktur des Rezeptorproteins verändern. Orte der Protonierung eines Proteins sind insbesondere polare oder geladene AS, in dem beobachteten pH-Bereich vor allem die Aminosäure Histidin. Die Seitenkette des Histidins weist einen pK_S -Wert von 6,0 auf (Clyne et al. 2002a), was bedeutet, dass sich die Protonierung der Seitenkette sowohl im physiologischen als auch in dem von uns untersuchten pH-Wert-Bereich relevant verändert. Bei der Betrachtung der pK -Werte der Seitenketten ist jedoch auch zu berücksichtigen, dass die Protonierung dieser Seitenketten nicht alleine in Abhängigkeit vom pH-Wert variiert. Einfluss auf die Protonierung haben weiterhin die benachbarten AS-Seitenketten und deren Ladung, die räumliche Konfiguration des Proteins und die Elektrolytzusammensetzung des Mediums. Der pK_S -Wert der Seitenkette des Histidins in Proteinen ist als zwischen 5,0 und 8,0 variierend beschrieben worden (Kao et al. 2000).

Die aktuellen Studien zur mutagenetischen Analyse der extrazellulären AS-Sequenz sind am rP2X₇R und dessen Mutanten durchgeführt worden. Es konnten 14 potentielle Angriffsorte (fünf Histidin-, drei Glutamat-, zwei Aspartat- und vier Lysinreste) für modulatorische Ionen identifiziert werden, die ausschließlich in der extrazellulären Sequenz des P2X₇R und nicht in der Sequenz der Rezeptoren P2X₁₋₆ vorhanden sind (Liu et al. 2007). Liu et al. konnten den Nachweis erbringen, dass extrazelluläre AS des P2X₇R einen Effekt auf die Hemmung durch Cu²⁺ und Zn²⁺ (His⁶², Asn¹⁹⁷) haben und dass sie entscheidend für die Potenz des ATP (Asn²⁸⁴) und des BzATP (Lys¹²⁷, Asn²⁸⁴) sind.

Die Mutation von den sechs Histidinen zu Alanin in der extrazellulären Sequenz des rP2X₇R zeigte, dass die AS Histidin an Position 130 (His¹³⁰) eine Bedeutung bei der pH-Sensitivität des rP2X₇R hat (Acuna-Castillo et al. 2007). Der Austausch des Histidins gegen Alanin bewirkte im Vergleich zwischen dem Wildtypen und der Mutante His¹³⁰Ala eine geringere Hemmung durch einen niedrigen pH-Wert bei der Mutante, aber immer noch eine signifikante Hemmung gegenüber der Stromgröße bei pH 7,4. Alle anderen Mutanten zeigten sich bezüglich der pH-Abhängigkeit dem Wildtyp analog. His¹³⁰Ala zeigt im Vergleich zum Wildtyp ebenso eine verminderte Inhibition des Rezeptors durch Magnesiumionen, aber eine analoge Inhibition durch Zinkionen (Acuna-Castillo et al. 2007). Diese Untersuchungsergebnisse des rP2X₇R sind nicht auf den hP2X₇R übertragbar, da an Position 130 der AS-Sequenz des humanen P2X₇R die Aminosäure Serin lokalisiert ist (Rassendren et al. 1997). Es ist also nicht von einer analogen Beeinflussung auszugehen. Diese Studie liefert dennoch den Hinweis, dass ein Histidinrest in der extrazellulären Sequenz des hP2X₇R als allosterische Bindungsstelle für Protonen fungieren und einen Einfluss auf die pH-Abhängigkeit haben kann. Zudem zeigt sie auch, dass die allosterische Modifikation nur einen Teil der H⁺-bedingten Hemmung der P2X₇R-abhängigen Ströme verursacht. Dieses unterstützt die Hypothese, dass es sich um zwei verschiedene Mechanismen handelt, zum einen die allosterische Modifikation des Rezeptorproteins und zum anderen die ATP-bindende Eigenschaft der Protonen.

Weiterhin konnte jüngst gezeigt werden, dass der Austausch der AS an den Positionen 85 (His⁸⁵), 219 (His²¹⁹) und 137 (Lys¹³⁷) gegen Alanin eine gesteigerte Protonen-Empfindlichkeit des rP2X₇R bewirkt, während der Austausch der AS an Position 110 (His¹¹⁰) und Position 197 (Asp¹⁹⁷) gegen eine ladungsfreie AS die Hemmung des rP2X₇R-abhängigen Stromes durch einen niedrigen pH-Wert reduziert beziehungsweise aufhebt (Liu et al. 2009). Möglicherweise erfolgte hiermit die Lokalisation der relevanten AS für die pH-Abhängigkeit des P2X₇R. Die reduzierte pH-Abhängigkeit der Mutanten des rP2X₇R, His¹¹⁰Ala und Asp¹⁹⁷Ala (Liu et al. 2009), sollten am humanen P2X₇R verifiziert werden.

Da in den meisten Fällen Histidine für die Modulation von P2X-Rezeptor-Proteinen (s.o.) durch Protonen verantwortlich sind, könnten Untersuchungen mit dem Austausch von Histidinen in

der extrazellulären AS-Sequenz des hP2X₇R die allosterische Bindungsstelle für H⁺-Ionen identifizieren. Weitere mögliche Angriffspunkte für eine allosterische Beeinflussung des P2X₇R sind Histidine in der extrazellulären Sequenz des hP2X₇R an Position 155 (His¹⁵⁵), 268 (His²⁶⁸) und 270 (His²⁷⁰), die nicht in der extrazellulären Sequenz des rP2X₇R (Rassendren et al. 1997) vorhanden sind.

5.4 Die Bedeutung der pH-Abhängigkeit des P2X₇R

Unter Ruhebedingungen liegt die extrazelluläre ATP-Konzentration im Bereich von 1-10 nM (Di Virgilio 2005). Bei Sauerstoffmangel im Gewebe, Entzündungsreaktionen und mechanischer Belastung erfolgt eine Freisetzung von ATP in den extrazellulären Raum. Diese Freisetzung erfolgt über verschiedene, nicht abschließend geklärte Mechanismen. Exozytose, ATP-Transporter, vesikuläre Freisetzung und Diffusion durch Poren sind diskutierte Freisetzungsmechanismen (Schwiebert and Zsembery 2003; Burnstock 2007). Auf Grund der intrazellulären ATP-Konzentration im millimolaren Bereich werden bei der Nekrose von Zellen große ATP-Mengen freigesetzt (Ferrari et al. 2006).

Die genauen physiologisch vorkommenden extrazellulären ATP-Konzentrationen sind schwer fassbar und quantifizierbar, zum einen auf Grund der schwierigen Detektion, zum anderen auf Grund der Kurzlebigkeit der Moleküle. Die ATP-Moleküle werden nach der Freisetzung durch enzymatische Hydrolyse schnell abgebaut und inaktiviert (Zimmermann 1996, 2000). Die Messung von ATP-Konzentrationen an der Zelloberfläche nach der ATP-Freisetzung erbrachte Werte im Bereich von 10-20 µM bis hin zu 100-200 µM ATP (Beigi et al. 1999; Newman 2001; Pellegatti et al. 2005; Gourine et al. 2007). Wenn man die Kurzlebigkeit der ATP-Moleküle und die Komplexbildung des ATP⁴⁻ durch Ca²⁺ und Mg²⁺ mit in Betracht zieht, erscheinen ATP⁴⁻-Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich unmittelbar nach der Freisetzung realistisch. Dieses bedeutet, dass es im physiologischen und pathophysiologischen Bereich vor allem zu einer Aktivierung der hochaffinen Bindungsstelle und höchstens zu einer geringgradigen Aktivierung der niedrigaffinen Bindungsstelle kommt (Abb. 3), also dass die relative Wichtigkeit der hochaffinen Bindungsstelle überwiegt.

Im entzündeten Gewebe sind glaubhafte pH-Werte von 6,9 nachgewiesen worden (s.a. 1.2.) (Punna-Moorthy 1987). Unter diesen Bedingungen, die wahrscheinlich den Bedingungen entsprechen, in denen die Funktion der P2X₇R eine große Bedeutung hat, wird schon durch den reduzierten Anteil des freien ATP die Aktivierung der niedrigaffinen Bindungsstelle des P2X₇R geringer. Zusätzlich wird der allosterische Effekt der H⁺-Ionen die hP2X₇R-Aktivierung über die niedrigaffine Bindungsstelle weiter reduzieren.

Weiterhin ist die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass bei nekrotischem Gewebszerfall durchaus ATP-Konzentration im Bereich von 100-200 µM erreicht werden können (Pellegatti et

al. 2005). Hieraus würde dann zumindest eine partielle Aktivierung der niedrigaffinen Bindungsstelle resultieren (Abb. 3) und es würde zum Tragen kommen, dass die pH-Empfindlichkeit der niedrigaffinen Bindungsstelle höher ist als die der hochaffinen Bindungsstelle (s. pK_H -Werte, Tab. 5). Dieses bedeutet, dass der hP2X₇R im Fall hoher ATP-Konzentrationen empfindlicher für eine Ansäuerung des umgebenden Milieus ist und dass die Aktivierung des P2X₇R schon bei geringeren freien H⁺-Konzentrationen gehemmt wird. Dieses könnte neben der Desensitivierung des P2X₇R bei supramaximalen Agonist-Konzentrationen (Kim et al. 2001) einen weiteren Schutzmechanismus der Zelle vor hohen extrazellulären Nukleotid-Konzentrationen darstellen.

6. Zusammenfassung

Der P2X₂R hat funktionelle Bedeutung im zentralen und peripheren Nervensystem. Die pH-Abhängigkeit des P2X₂R ist von besonderem Interesse, weil die ATP-Speicherung in den Neuronen in präsynaptischen Vesikeln bei einem niedrigen pH-Wert erfolgt (pH 5,4). Daher ist von einer simultanen Beeinflussung des P2X₂R durch ATP und Protonen auszugehen.

Der P2X₂R zeigte in den vorliegenden Untersuchungen keine pH-Abhängigkeit. Dieses widerspricht der aktuellen Datenlage, die von einer Potenzierung des Stromes durch ein saures Milieu ausgeht. Die Unterschiede im Versuchsaufbau betreffen die Zusammensetzung der Lösungen und die speziesdifferenten RNS. Eine abschließende Erklärung für die vorliegenden, von den aktuellen Publikationen abweichenden Resultate kann nicht erbracht werden.

Der P2X₇R ist ein ligandenaktivierter Ionenkanal. Das Transkript der mRNA des hP2X₇R ist ein Protein, das aus 595 AS besteht und zwei Transmembrandomänen und eine lange carboxyterminale Sequenz (244 AS) beinhaltet. Der ligandenaktivierte Ionenkanal liegt als Multimer und insbesondere als Trimer der Rezeptorproteine vor. Der P2X₇R unterscheidet sich von den anderen Rezeptoren der P2XR-Familie durch die längste carboxyterminale Sequenz, eine geringe Sequenzhomologie mit den anderen Rezeptoren (< 25 %), eine nicht reversible Zytolyse nach langanhaltender Applikation eines Agonisten und die Gewebedistribution.

Während den P2X₁₋₆R vor allem eine Bedeutung bei der neuronalen Signaltransduktion zugeschrieben wird, hat der P2X₇R eine entscheidende Bedeutung bei Inflammation und Immunantwort. Inflammation, Hypoxie und Gewebeschädigung führen über die Freisetzung von Zytokinen, purinergen Metaboliten und azidotischen Valenzen zu einem Absinken des pH-Wertes im extrazellulären Milieu und zu einer gleichzeitigen Exposition des hP2X₇R mit ATP und Protonen.

Es wurde die Beeinflussung der hP2X₇R-abhängigen Ströme durch die freie H⁺-Konzentration untersucht. Hierzu wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven des P2X₇R für die Agonisten ATP und BzATP erstellt und Untersuchungen bei variablen pH-Werten (pH 5,7 - 8,4) und konstanten ATP-Konzentrationen (absolutes ATP (ATP_{ges}) und freies ATP (ATP⁴⁻)) vorgenommen. Weiterhin erfolgte die Untersuchung der Mutante hP2X₇^{S339Y}R.

Die Konzentrations-Wirkungskurven des P2X₇R zeigen einen biphasischen Verlauf, die das Vorliegen von Ligandenbindungsstellen von unterschiedlicher Affinität belegen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Agonisten-abhängige Aktivierung des P2X₇R pH-abhängig ist. Ein gesteigerter Anteil an freien Protonen erniedrigt die Potenz der Agonisten an der hochaffinen Bindungsstelle, während die Wirksamkeit der Agonisten hier pH-unabhängig ist.

Die Mutante des hP2X₇R, hP2X₇^{S339Y}R, verfügt ausschließlich über funktionelle Ligandenbindungsstellen von hoher Affinität. hP2X₇^{S339Y}R-abhängige Ströme zeigen entsprechend die Charakteristika der hochaffinen Bindungsstelle: Eine Sättigung des Rezeptors

im Bereich mikromolarer ATP-Konzentrationen, die langsame Deaktivierungskinetik und die höhere Potenz des BzATP im Vergleich zu ATP bei unveränderter Wirksamkeit.

Die pH-Abhängigkeit der Mutante hP2X₇^{S339Y}R besteht in einer Erniedrigung der Potenz des Agonisten im sauren Milieu. Die Wirksamkeit des Agonisten ist vom pH-Wert unabhängig. Dieses konnte analog für die hochaffine Bindungsstelle beschrieben werden.

Ein niedriger pH-Wert bewirkt im Fall der niedrigaffinen Bindungsstelle eine reduzierte Potenz des Agonisten und erniedrigt zusätzlich dessen Wirksamkeit, also den maximal aktivierenden Strom bei sehr hoher Agonisten-Konzentration.

Die kausale Erklärung für die Erniedrigung der Potenz der Agonisten sowohl an der hochaffinen als auch an der niedrigaffinen Ligandenbindungsstelle bei Absenkung des extrazellulären pH-Wertes ist die elektrovalente Bindung von Protonen an ATP⁴⁻, dem Agonisten am hP2X₇R.

Die Reduktion des maximal aktivierenden Stromes lässt sich weder durch den elektrovalenten Effekt der Protonen auf die Agonisten erklären, noch verändern sich die Permeationseigenschaften des P2X₇R bei der Anwesenheit von H⁺-Ionen wie weiterführende Einzelkanaluntersuchungen gezeigt haben. Daher ist von einem allosterischen Effekt der Protonen auf den P2X₇R auszugehen, der die erniedrigte Wirksamkeit des Agonisten an der niedrigaffinen Ligandenbindungsstelle bedingt.

Im Fall des rP2X₇R scheinen die Aminosäuren Histidin an Position 110 und Aspartat an Position 197 der AS-Sequenz des rP2X₇R entscheidende Bedeutung zu haben. Bei dem Austausch der AS gegen elektroneutrale AS resultiert eine Reduktion der pH-Abhängigkeit des rP2X₇R. Die Verifikation der Bedeutung dieser AS am humanen P2X₇R steht aus.

Eine Alkalisierung der Badlösung führt weder an der hochaffinen noch an der niedrigaffinen Bindungsstelle zu einer signifikanten Veränderung der Potenz und der Wirksamkeit der Agonisten.

7. Literaturverzeichnis

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

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

Acuna-Castillo C, Morales B, Huidobro-Toro JP (2000) Zinc and copper modulate differentially the P2X₄ receptor. *J Neurochem* 74: 1529-1537.

Adinolfi E, Kim M, Young MT, Di Virgilio F, Surprenant A (2003) Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X₇ receptor complex negatively regulates P2X₇ receptors. *J Biol Chem* 278: 37344-37351.

Adinolfi E, Melchiorri L, Falzoni S, Chiozzi P, Morelli A, Tieghi A, Cuneo A, Castoldi G, Di Virgilio F, Baricordi OR (2002) P2X₇ receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood* 99: 706-708.

Adinolfi E, Pizzirani C, Idzko M, Panther E, Norgauer J, Di Virgilio F, Ferrari D (2005) P2X₇ receptor: Death or life? *Purinergic Signal* 1: 219-227.

Alzola E, Perezetxebarria A, Kabre E, Fogarty DJ, Metioui M, Chaib N, Macarulla JM, Matute C, Dehaye JP, Marino A (1998) Activation by P2X₇ agonists of two phospholipases A₂ (PLA₂) in ductal cells of rat submandibular gland - coupling of the calcium-independent PLA₂ with kallikrein secretion. *J Biol Chem* 273: 30208-30217.

Auger R, Motta I, Benihoud K, Ojcius DM, Kanellopoulos JM (2005) A role for mitogen-activated protein kinase^{Erk1/2} activation and non-selective pore formation in P2X₇ receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem* 280: 28142-28151.

Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buell G, Di Virgilio F (1999) Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X₇ ATP receptor. *J Biol Chem* 274: 33206-33208.

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

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

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

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

Berne RM (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204: H317-H322.

- Boldt W, Klapperstück M, Büttner C, Sadtler S, Schmalzing N, Markwardt F (2003) Glu⁴⁹⁶Ala polymorphism of human P2X₇ receptor does not affect its electrophysiological phenotype. *Am J Physiol* 284: C749-C756.
- Boyd IA, Forrester T (1968) The release of adenosine triphosphate from frog skeletal muscle in vitro. *J Physiol (Lond)* 199: 115-135.
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371: 519-523.
- Brändle U, Spielmanns P, Osteroth R, Sim J, Surprenant A, Buell G, Ruppersberg JP, Plinkert PK, Zenner HP, Glowatzki E (1997) Desensitization of the P2X₂ receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett* 404: 294-298.
- Bretschneider F, Klapperstück M, Löhn M, Markwardt F (1995) Nonselective cationic currents elicited by extracellular ATP in human B-lymphocytes. *Pflügers Arch* 429: 691-698.
- Bretschneider F, Markwardt F (1999) Drug-dependent ion channel gating by application of concentration jumps using U-tube technique. *Methods Enzymol* 294: 180-189.
- Budagian V, Bulanova E, Brovko L, Orinska Z, Fayad R, Paus R, Bulfone-Paus S (2003) Signaling through P2X₇ receptor in human T cells involves p56^{lck}, kinases, and transcription factors AP-1 and NF-κB. *J Biol Chem* 278: 1549-1560.
- Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J* 15: 55-62.
- 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 (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87: 659-797.
- Cao L, Young MT, Broomhead HE, Fountain SJ, North RA (2007) Thr³³⁹-to-serine substitution in rat P2X₂ receptor second transmembrane domain causes constitutive opening and indicates a gating role for Lys³⁰⁸. *J Neurosci* 27: 12916-12923.
- Caporali F, Capecchi PL, Gamberucci A, Lazzerini PE, Pompella G, Natale M, Lorenzini S, Selvi E, Galeazzi M, Laghi PF (2008) Human rheumatoid synoviocytes express functional P2X₇ receptors. *J Mol Med* 86: 937-49.
- Carroll WA, Donnelly-Roberts D, Jarvis MF (2009) Selective P2X₇ receptor antagonists for chronic inflammation and pain. *Purinergic Signal* 5: 63-73.
- Chakfe Y, Seguin R, Antel JP, Morissette C, Malo D, Henderson D, Seguela P (2002) ADP and AMP induce interleukin-1 beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X₇ receptor channels. *J Neurosci* 22: 3061-3069.
- Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* 279: 29628-29638.
- Chen LF, Brosnan CF (2006a) Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X₇R^{-/-} mice: Evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol* 176: 3115-3126.

- Chen LF, Brosnan CF (2006b) Regulation of immune response by P2X₇ receptor. *Crit Rev Immunol* 26: 499-513.
- Chessell IP, Grahames CBA, Michel AD, Humphrey PPA (2001) Dynamics of P2X₇ receptor pore dilation: Pharmacological and functional consequences. *Drug Dev Res* 53: 60-65.
- Chiozzi P, Sanz JM, Ferrari D, Falzoni S, Aleotti A, Buell G, Collo G, Di Virgilio F (1997) Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X₇ receptor. *J Cell Biol* 138: 697-706.
- Clarke CE, Benham CD, Bridges A, George AR, Meadows HJ (2000) Mutation of histidine 286 of the human P2X₄ purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *J Physiol (Lond)* 523: 697-703.
- Clyne JD, LaPointe LD, Hume RI (2002a) The role of histidine residues in modulation of the rat P2X₂ purinoceptor by zinc and pH. *J Physiol (Lond)* 539: 347-359.
- Clyne JD, Wang LF, Hume RI (2002b) Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X₂ purinoceptor. *J Neurosci* 22: 3873-3880.
- Cockcroft S, Gomperts BD (1980) The ATP⁴⁻ receptor of rat mast cells. *Biochem J* 188: 789-798.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X₇ receptor. *Neuropharmacology* 36: 1277-1283.
- Dahlquist R, Diamant B (1974) Interaction of ATP and calcium on the rat mast cell: Effect on histamine release. *Acta Pharmacol Toxicol* 34: 368-384.
- Di Virgilio F (2005) Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal* 1: 205-209.
- Di Virgilio F (2007) Liaisons dangereuses: P2X₇ and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28: 465-472.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, Baricordi OR (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* 5: 191-199.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97: 587-600.
- Di Virgilio F, Falzoni S, Chiozzi P, Sanz JM, Ferrari D, Buell GN (1999) ATP receptors and giant cell formation. *J Leukoc Biol* 66: 723-726.
- Ding S, Sachs F (1999a) Ion permeation and block of P2X₂ purinoceptors: single channel recordings. *J Membr Biol* 172: 215-223.
- Ding SH, Sachs F (1999b) Single channel properties of P2X₂ purinoceptors. *J Gen Physiol* 113: 695-719.
- Ding SH, Sachs F (2000) Inactivation of P2X₂ purinoceptors by divalent cations. *J Physiol (Lond)* 522: 199-214.
- Dixon SJ, Yu RG, Panupinthu N, Wilson JX (2004) Activation of P₂ nucleotide receptors stimulates acid efflux from astrocytes. *Glia* 47: 367-376.

- Dray A (1995) Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 75: 125-131.
- Drury AN, Szent-Györgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon mammalian heart. *J Physiol (Lond)* 68: 213-237.
- Duan SM, Anderson CM, Keung EC, Chen YM, Chen YR, Swanson RA (2003) P2X₇ receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23: 1320-1328.
- Dubyak GR (1991) Signal transduction by P2-purinergeric receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4: 295-300.
- Dubyak GR (2007) Go it alone no more - P2X₇ joins the society of heteromeric ATP-gated ion channel receptors. *Mol Pharmacol* 72: 1402-1405.
- Dubyak GR, El-Moatassim C (1993) Signal transduction via P2-purinergeric receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: 577-606.
- Edwards FA, Gibb AJ (1993) ATP - a fast neurotransmitter. *FEBS Lett* 325: 86-89.
- El-Moatassim C, Dubyak GR (1992) A novel pathway for the activation of phospholipase-D by P_{2Z} Purinergeric Receptors in BAC1.2F5 Macrophages. *J Biol Chem* 267: 23664-23673.
- El-Moatassim C, Dubyak GR (1993) Dissociation of the pore-forming and phospholipase D activities stimulated via P_{2Z} purinergeric receptors in BAC1.2F5 macrophages - Product inhibition of phospholipase D enzyme activity. *J Biol Chem* 268: 15571-15578.
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* 48: 178-183.
- Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A, North RA (1996) Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol (Lond)* 497: 413-422.
- Evotec AG (2009): Evotec Announces the Successful Completion of the First Phase I Study with EVT 401, an Oral P2X₇ Receptor Antagonist - Very Good Safety Profile and Confirmed "On Target Activity"
[Online im Internet:] URL:
http://www.evotec.com/display/articleDetail/cms_article_id/1511/selected_category_id/
[Stand: 10.04.2010]
- Faria RX, DeFarias FP, Alves LA (2005) Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X₇ receptor? *Am J Physiol* 288: C260-C271.
- Fenwick EM, Marty A, Neher E (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol (Lond)* 331: 599-635.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dalsusino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F (1997) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergeric P_{2Z} receptor of human macrophages. *J Immunol* 159: 1451-1458.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F (2006) The P2X₇ receptor: A key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176: 3877-3883.

- Flittiger B, Klapperstück M, Schmalzing G, Markwardt F (2010) Effects of protons on macroscopic and single-channel currents mediated by the human P2X₇ receptor. *Biochim Biophys Acta Biomembranes* 1798: 947-957.
- Forrester T, Lind AR (1969) Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during and after sustained contractions. *J Physiol (Lond)* 204: 347-364.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 143-156.
- Freist W, Verhey JF, Stühmer W, Gauss DH (1998) ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett* 434: 61-65.
- Gargett CE, Cornish EJ, Wiley JS (1996) Phospholipase D activation by P2Z-purinoceptor agonists in human lymphocytes is dependent on bivalent cation influx. *Biochem J* 313: 529-535.
- Gargett CE, Wiley JS (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 120: 1483-1490.
- Gartland A, Hipskind RA, Gallagher JA, Bowler WB (2001) Expression of a P2X₇ receptor by a subpopulation of human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16: 846-856.
- Gerevich Z, Zadori ZS, Koles L, Kopp L, Milius D, Wirkner K, Gyires K, Illes P (2007) Dual effect of acid pH on purinergic P2X₃ receptors depends on the histidine-206 residue. *J Biol Chem* 282: 33949-33957.
- Gerlach E, Deuticke B, Dreisbach RH (1963) Der Nukleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Coronardurchblutung. *Naturwissenschaften* 50: 228-229.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford APDW (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflügers Arch* 452: 513-537.
- Gillespie JH (1934) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol (Lond)* 80: 345-349.
- Gloor S, Pongs O, Schmalzing G (1995) A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Gene* 160: 213-217.
- Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233: 309-319.
- Gourine AV, Dale N, Llaudet E, Poputnikov D, Spyer KM, Gourine VN (2007) Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: Real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. *J Physiol (Lond)* 585(Pt 1):305-16: 305-316.
- Grahames CBA, Michel AD, Chessell IP, Humphrey PPA (1999) Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1 β release in human monocytes. *Br J Pharmacol* 127: 1915-1921.
- Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD (2007) Evidence for functional P2X₄/P2X₇ heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 72: 1447-1456.
- Haines WR, Torres GE, Voigt MM, Egan TM (1999) Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X₁ and P2X₅ isoforms. *Mol Pharmacol* 56: 720-727.

- Hamill OP, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 319: 85-100.
- Hibell AD, Kidd EJ, Chessell IP, Humphrey PPA, Michel AD (2000) Apparent species differences in the kinetic properties of P2X₇ receptors. *Br J Pharmacol* 130: 167-173.
- Hill K, Benham CD, McNulty S, Randall AD (2004) Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology* 47: 450-460.
- Hollins B, Ikeda SR (1997) Heterologous expression of a P₂X-purinoceptor in rat chromaffin cells detects vesicular ATP release. *J Neurophysiol* 78: 3069-3076.
- Holton FA, Holton P (1953) The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol (Lond)* 119: 50P-51P.
- Holton P (1959) The liberation of ATP on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol (Lond)* 145: 494-504.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong CM, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF (2006) A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X₇ receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1376-1385.
- Horn R (1987) Statistical methods for model discrimination: Application to gating kinetics and permeation of the acetylcholine receptor channel. *Biophys J* 51: 255-263.
- Hughes J, Hatcher J, Chessell I (2007) The role of P2X₇ in pain and inflammation. *Purinergic Signal* 3: 163-169.
- Humphreys BD, Dubyak GR (1996) Induction of the P2z/P2X₇ nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN- γ in the human THP-1 monocytic cell line. *J Immunol* 157: 5627-5637.
- Humphreys BD, Dubyak GR (1998) Modulation of P2X₇ nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J Leukoc Biol* 64: 265-273.
- Iglesias R, Locovei S, Roque AP, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, Scemes E (2008) P2X₇ receptor-Pannexin1 complex: Pharmacology and signaling. *Am J Physiol* 295: C752-C760.
- Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M (2002) Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem* 45: 4057-4093.
- Jiang LH (2008) Inhibition of P2X₇ receptors by divalent cations: old action and new insight. *Eur Biophys J* 38(3): 339-46.
- Jiang LH, MacKenzie AB, North RA, Surprenant A (2000a) Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X₇ receptors. *Mol Pharmacol* 58: 82-88.
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA (2000b) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* 275: 34190-34196.

- Kao YH, Fitch CA, Bhattacharya S, Sarkisian CJ, Lecomte JT, Garcia-Moreno EB (2000) Salt effects on ionization equilibria of histidines in myoglobin. *Biophys J* 79: 1637-1654.
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state. *Nature* 460: 592-598.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X₇ receptor signalling complex. *EMBO J* 20: 6347-6358.
- King BF, Wildman SS, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G (1997) Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X₂ receptor. *Br J Pharmacol* 121: 1445-1453.
- Klapperstück M, Büttner C, Böhm T, Schmalzing G, Markwardt F (2000a) Characteristics of P2X₇ receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1467: 444-456.
- Klapperstück M, Büttner C, Nickel P, Schmalzing G, Lambrecht G, Markwardt F (2000b) Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X₁ and P2X₇ receptors. *Eur J Pharmacol* 387: 245-252.
- Klapperstück M, Büttner C, Schmalzing G, Markwardt F (2001) Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X₇ receptor. *J Physiol (Lond)* 534: 25-35.
- Koshimizu T, Tomic M, Koshimizu M, Stojilkovic SS (1998) Identification of amino acid residues contributing to desensitization of the P2X₂ receptor channel. *J Biol Chem* 273: 12853-12857.
- Kress M, Zeilhofer HU (1999) Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors. *Trends Pharmacol Sci* 20: 112-118.
- Kuehnel MP, Reiss M, Anand PK, Treede I, Holzer D, Hoffmann E, Klapperstück M, Steinberg TH, Markwardt F, Griffiths G (2009a) Sphingosine-1-phosphate receptors stimulate macrophage plasma-membrane actin assembly via ADP release, ATP synthesis and P2X₇R activation. *J Cell Sci* 122: 505-512.
- Kuehnel MP, Rybin V, Anand PK, Anes E, Griffiths G (2009b) Lipids regulate P2X₇-receptor-dependent actin assembly by phagosomes via ADP translocation and ATP synthesis in the phagosome lumen. *J Cell Sci* 122: 499-504.
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA (2002) Absence of the P2X₇ receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 168: 6436-6445.
- Lajdova I, Chorvat D, Spustova V, Chorvatova A (2004) 4-Aminopyridine activates calcium influx through modulation of the pore-forming purinergic receptor in human peripheral blood mononuclear cells. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 50-56.
- Le Feuvre RA, Brough D, Iwakura Y, Takeda K, Rothwell NJ (2002) Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X₇-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *J Biol Chem* 277: 3210-3218.
- Le KT, Babinski K, Seguela P (1998) Central P2X₄ and P2X₆ channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 18: 7152-7159.

- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995) Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377: 432-435.
- Liang LH, Schwiebert EM (2005) Large pore formation uniquely associated with P2X₇ purinergic receptor channels. Focus on "Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X₇ receptor?". *Am J Physiol* 288: C240-C242.
- Liu X, Ma W, Surprenant A, Jiang LH (2009) Identification of the amino acid residues in the extracellular domain of rat P2X₇ receptor involved in functional inhibition by acidic pH. *Br J Pharmacol* 156: 135-142.
- Liu X, Surprenant A, Mao HJ, Roger S, Xia R, Bradley H, Jiang LH (2007) Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X₇ receptors by zinc and copper. *Mol Pharmacol* 73: 252-259.
- Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X₇ receptor death complex. *FEBS Lett* 581: 483-488.
- Löhn M, Klapperstück M, Riemann D, Markwardt F (2001) Sodium block and depolarization diminish P2Z-dependent Ca²⁺ entry in human B lymphocytes. *Cell Calcium* 29: 395-408.
- Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagne B, Labbe M, Binder EB, Uhr M, Paez-Pereda M, Sillaber I, Ising M, Bruckl T, Lieb R, Holsboer F, Muller-Myhsok B (2006) P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet* 15: 2438-2445.
- Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van Biesen T, Kowaluk EA, Jarvis MF (1999) Molecular and functional characterization of human P2X₂ receptors. *Mol Pharmacol* 56: 1171-1181.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6: 521-532.
- Markwardt F, Löhn M, Böhm T, Klapperstück M (1997) Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *J Physiol (Lond)* 498: 143-151.
- Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, Nicke A (2007) Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X₁ receptor. *J Neurosci* 27: 1456-1466.
- Martell, A. M. and Smith, R. M.: Amines. Plenum Press: New York, 1990.
- McCleskey EW, Gold MS (1999) Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* 61: 835-856.
- McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Harris RR, Zhang XF, Shieh CC, Wismer CT, Zhu CZ, Gauvin DM, Fabiyi AC, Honore P, Gregg RJ, Kort ME, Nelson DW, Carroll WA, Marsh K, Faltynek CR, Jarvis MF (2007) P2X₇-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* 146: 1817-1828.
- McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P, Chu KL, Lee CH, Faltynek CR, Jarvis MF (2003) Effects of A-317491, a novel and selective P2X₃/P2X_{2/3} receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol* 140: 1381-1388.

- McGeraughty S, Jarvis MF (2006) Purinergic control of neuropathic pain. *Drug Dev Res* 67: 376-388.
- Mehta VB, Hart J, Wewers MD (2001) ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1 β and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 276: 3820-3826.
- Michel AD, Chessell IP, Humphrey PPA (1999) Ionic effects on human recombinant P2X₇ receptor function. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359: 102-109.
- Mio K, Kubo Y, Ogura T, Yamamoto T, Sato C (2005) Visualization of the trimeric P2X₂ receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 998-1005.
- Mutini C, Falzoni S, Ferrari D, Chiozzi P, Morelli A, Baricordi OR, Collo G, Ricciardicastagnoli P, Di Virgilio F (1999) Mouse dendritic cells express the P2X₇ purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol* 163: 1958-1965.
- Narcisse L, Scemes E, Zhao YM, Lee SC, Brosnan CF (2005) The cytokine IL-1 beta transiently enhances P2X₇ receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 49: 245-258.
- Nelson DW, Sarris K, Kalvin DM, Namovic MT, Grayson G, Donnelly-Roberts DL, Harris R, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA (2008) Structure-activity relationship studies on N'-aryl carbohydrazide P2X₇ antagonists. *J Med Chem* 51: 3030-3034.
- Newman EA (2001) Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J Neurosci* 21: 2215-2223.
- Nicke A (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X₇ subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 803-808.
- Nicke A, Bäumer HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: A novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17: 3016-3028.
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013-1067.
- Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R (2003) P2X₇ mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278: 13309-13317.
- Pelegri P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *EMBO J* 25: 5071-5082.
- Pelegri P, Surprenant A (2007) Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1 β release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem* 282: 2386-2394.
- Pellegatti P, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F (2005) A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell* 16: 3659-3665.

- Perregaux DG, Labasi J, Laliberte R, Stam E, Solle M, Koller B, Griffiths R, Gabel CA (2001) Interleukin-1 β posttranslational processing - Exploration of P2X₇ receptor involvement. *Drug Dev Res* 53: 83-90.
- Punna-Moorthy A (1987) Evaluation of pH changes in inflammation of the subcutaneous air pouch lining in the rat, induced by carrageenan, dextran and *Staphylococcus aureus*. *J Oral Pathol* 16: 36-44.
- Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA, Kawashima E (1997) Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X₂ and P2X₃ receptors. *J Neurosci* 17: 6529-6533.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X₇ - Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272: 5482-5486.
- Rettinger J, Schmalzing G (2003) Activation and desensitization of the recombinant P2X₁ receptor at nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol* 121: 451-461.
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F (2007a) Kinetics of P2X₇ receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 92: 2377-2391.
- Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F (2007b) Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X₇ receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 93: 846-858.
- Romagnoli R, Baraldi PG, Cruz-Lopez O, Lopez-Cara C, Preti D, Borea PA, Gessi S (2008) The P2X₇ receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 12: 647-661.
- Rozengurt E, Heppel LA, Friedberg I (1977) Effect of exogenous ATP on the permeability properties of transformed cultures of mouse cell lines. *J Biol Chem* 252: 4584-4590.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ (2001) Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410: 471-475.
- Schachter J, Motta AP, de Souza Zamorano AD, Silva-Souza HA, Guimaraes MZ, Persechini PM (2008) ATP-induced P2X₇-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J Cell Sci* 121: 3261-3270.
- Schilling WP, Wasylyna T, Dubyak GR, Humphreys BD, Sinkins WG (1999) Maitoxin and P2Z/P2X₇ purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. *Am J Physiol* 277: C766-C776.
- Schwarz, W. and Rettinger, J.: Foundations of electrophysiology. Shaker Verlag, Aachen, 2000.
- Schiebert EM, Zsembery A (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1615: 7-32.
- Sengstake S, Boneberg EM, Illges H (2006) CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X₇Rs. *Int Immunol* 18: 1171-1178.

- Seyffert C, Schmalzing G, Markwardt F (2004) Dissecting individual current components of co-expressed human P2X₁ and P2X₇ receptors. *Curr Top Med Chem* 4: 1719-1730.
- Shieh CC, Jarvis MF, Lee CH, Perner RJ (2006) P2X receptor ligands and pain. *Expert Opin Ther Patents* 16: 1113-1127.
- Simon J, Kidd EJ, Smith FM, Chessell IP, Murrell-Lagnado R, Humphrey PPA, Barnard EA (1997) Localization and functional expression of splice variants of the P2X₂ receptor. *Mol Pharmacol* 52: 237-248.
- Skorinkin A, Nistri A, Giniatullin R (2003) Bimodal action of protons on ATP currents of rat PC12 cells. *J Gen Physiol* 122: 33-44.
- Sokolova E, Skorinkin A, Fabbretti E, Masten L, Nistri A, Giniatullin R (2004) Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X₃ receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation. *Br J Pharmacol* 141: 1048-1058.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. *J Biol Chem* 276: 125-132.
- Steinberg TH, Newman AS, Swanson JA, Silverstein SC (1987) ATP⁴⁻ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem* 262: 8884-8888.
- Stoop R, Quayle JM (1998) Fading and rebound of P2X₂ currents at millimolar ATP concentrations caused by low pH. *Br J Pharmacol* 125: 235-237.
- Stoop R, Surprenant A, North RA (1997) Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J Neurophysiol* 78: 1837-1840.
- Surprenant A, North RA (2008) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* 71: 333-359.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P_{2X} receptor for extracellular ATP identified as a P_{2X7} receptor (P2X₇). *Science* 272: 735-738.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits - Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274: 6653-6659.
- Tsukimoto M, Maehata M, Harada H, Ikari A, Takagi K, Degawa M (2006) P2X₇ receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by dual signalling pathways. *J Immunol* 177: 2842-2850.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-519.
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor. *Neuropharmacology* 36: 1285-1294.
- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2: 315-321.
- Virginio C, North RA, Surprenant A (1998) Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X₂ and P2X₃ receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. *J Physiol (Lond)* 510: 27-35.

- Vulchanova L, Arvidsson U, Riedl M, Wang J, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R (1996) Differential distribution of two ATP-gated ion channels (P_{2X} receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8063-8067.
- Weber WM, Liebold KM, Reifarth FW, Uhr U, Clauss W (1995) Influence of extracellular Ca^{2+} on endogenous Cl^- channels in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* 429: 820-824.
- Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ (2006) Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci* 29: 578-586.
- White TD, Fredholm BB, Ribeiro JA, Edwards FA, Phillis JW (1995) Role of purines in the central nervous system. *Pharmacological Sciences: Perspectives for Research and Therapy* 0: 295-302.
- Wildman SS, Brown SG, Rahman M, Noel CA, Churchill L, Burnstock G, Unwin RJ, King BF (2002) Sensitization by extracellular Ca^{2+} of rat $P2X_5$ receptor and its pharmacological properties compared with rat $P2X_1$. *Mol Pharmacol* 62: 957-966.
- Wildman SS, King BF, Burnstock G (1998) Zn^{2+} modulation of ATP-responses at recombinant $P2X_2$ receptors and its dependence on extracellular pH. *Br J Pharmacol* 123: 1214-1220.
- Wiley JS, Chen JR, Snook MB, Jamieson GP (1994) The P_{2Z} -Purinoceptor of human lymphocytes: Actions of nucleotide agonists and irreversible inhibition by oxidized ATP. *Br J Pharmacol* 112: 946-950.
- Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, North RA (2006) Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric $P2X_{2/3}$ receptor. *Mol Pharmacol* 70: 1159-1163.
- Wilson HL, Wilson SA, Surprenant A, North RA (2002) Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the $P2X_7$ receptor C terminus. *J Biol Chem* 277: 34017-34023.
- Wirkner K, Stanchev D, Milius D, Hartmann L, Kato E, Zadori ZS, Mager PP, Rubini P, Nörenberg W, Illes P (2008) Regulation of the pH sensitivity of human $P2X_3$ receptors by N-linked glycosylation. *J Neurochem* 107: 1216-1224.
- Worthington RA, Smart ML, Gu BJ, Williams DA, Petrou S, Wiley JS, Barden JA (2002) Point mutations confer loss of ATP-induced human $P2X_7$ receptor function. *FEBS Lett* 512: 43-46.
- Wu G, Whiteside GT, Lee G, Nolan S, Niosi M, Pearson MS, Ilyin VI (2004) A-317491, a selective $P2X_3/P2X_{2/3}$ receptor antagonist, reverses inflammatory mechanical hyperalgesia through action at peripheral receptors in rats. *Eur J Pharmacol* 504: 45-53.
- Xiong KM, Peoples RW, Montgomery JP, Chiang YS, Stewart RR, Weight FF, Li CY (1999) Differential modulation by copper and zinc of $P2X_2$ and $P2X_4$ receptor function. *J Neurophysiol* 81: 2088-2094.
- Yan ZH, Liang ZD, Tomic M, Obsil T, Stojilkovic SS (2005) Molecular determinants of the agonist binding domain of a $P2X$ receptor channel. *Mol Pharmacol* 67: 1078-1088.
- Zimmermann H (1996) Extracellular purine metabolism. *Drug Dev Res* 39: 337-352.
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 299-309.

8. Thesen

1. Purinerge P2X-Rezeptoren sind ligandenaktivierte ATP-abhängige Kationenkanäle. Der P2X₇-Rezeptor unterscheidet sich von den anderen Rezeptoren der P2X-Rezeptor-Familie durch die längste Aminosäuresequenz (595 AS), die geringste Sequenzhomologie, die längste carboxyterminale Domäne, die Gewebedistribution und die biologische Bedeutung.
2. Die Aktivierung des hP2X₇-Rezeptors hat funktionelle Bedeutung bei Inflammation, Hypoxie und Zellzerfall. Diese zellulären Stresszustände führen zu der Freisetzung von ATP und purinergen Metaboliten und zu einem Absinken des pH-Wertes im Extrazellularraum. Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der P2X₇-Rezeptor-Aktivierung dient dazu, ein tieferes Verständnis der Funktion dieses Rezeptors unter häufig auftretenden pathophysiologischen Bedingungen zu erlangen.
3. Die Expression des P2X₇-Rezeptors in *Xenopus laevis*-Oozyten ermöglicht die Untersuchung dieses Kationenkanals ohne die in anderen Zellen auftretende Induktion einer irreversiblen Permeabilitätssteigerung für große organische Kationen durch den P2X₇-Rezeptor.
4. Die Verwendung von Flufenaminsäure als Cl⁻-Kanal-Blocker ermöglicht die Untersuchung des Aktivierungsverhaltens des P2X₇-Rezeptors in Abwesenheit sämtlicher divalenter Kationen. Dieses vereinfacht die Messbedingungen dadurch, dass die komplexierenden Eigenschaften der divalenten Kationen und die allosterische Beeinflussung des P2X₇-Rezeptors durch Mg²⁺ und Ca²⁺ die experimentellen Ergebnisse nicht beeinflussen.
5. Die Aktivierung des P2X₇-Rezeptors erfolgt über Ligandenbindungsstellen, die durch ihre unterschiedliche Affinität für Agonisten gekennzeichnet sind. Durch die sequentielle Aktivierung zeichnet sich der P2X₇R durch eine biphasische Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik und eine biphasische Agonisten-Konzentrations-Wirkungs-Kurve aus.

6. Extrazelluläre Protonen verändern das Aktivierungsverhalten des P2X₇-Rezeptors. Die Potenz der Agonisten des Rezeptors ist im aziden Milieu sowohl an der hochaffinen als auch an der niedrigaffinen Bindungsstelle vermindert. Die Wirksamkeit der Agonisten ist an der hochaffinen Bindungsstelle vom pH-Wert unbeeinflusst. An der niedrigaffinen Bindungsstelle ist die Wirksamkeit der Agonisten in einem sauren Milieu im Vergleich zu pH 7,4 erniedrigt.
7. Eine Erniedrigung der normalen extrazellulären Protonen-Konzentration (pH-Erhöhung von 7,4 auf 8,4) hat keinen Einfluss auf das Aktivierungsverhalten des P2X₇-Rezeptors.
8. ATP⁴⁻ und BzATP⁴⁻ sind wirksame Agonisten des P2X₇-Rezeptors. Die erniedrigte Potenz der Agonisten bei einer hohen freien Protonen-Konzentration ist deshalb auf die ionische Bindung von Protonen an ATP und die damit einhergehende Reduktion des freien ATP⁴⁻ zurückzuführen.
9. Die Reduktion der Wirksamkeit der Agonisten auf die niedrigaffine Ligandenbindungsstelle im sauren Milieu entsteht durch auf eine allosterische Beeinflussung des P2X₇-Rezeptors durch Protonen.
10. Die Mutante des hP2X₇-Rezeptors, der hP2X₇^{S339Y}-Rezeptor, zeichnet sich durch eine monophasische Aktivierungskinetik aus. Sie verfügt ausschließlich über funktionelle Ligandenbindungsstellen von hoher Affinität. Analog zur Beeinflussung der hochaffinen Bindungsstelle des hP2X₇-Rezeptors führt ein niedriger pH-Wert zu einer Erniedrigung der Potenz des Agonisten, ohne dass die Wirksamkeit des Agonisten beeinflusst wird.
11. Die pH-Abhängigkeit der Aktivierung des P2X₇-Rezeptors ist für die untersuchten Agonisten, ATP und BzATP, gleichsinnig.
12. Die Untersuchung des Aktivierungsverhaltens des hP2X₂-Rezeptors bei ATP-Konzentration im Bereich von 1 μM bis 100 μM und bei der Abwesenheit von divalenten Kationen in der Badlösung ergibt keine Beeinflussung des Rezeptors durch die freie Protonen-Konzentration.

A1. Tabellarischer Lebenslauf Bente Flittiger**Persönliche Daten**

Geburtsdatum/-ort	13.11.1982 in Rendsburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	keine

Schulische Ausbildung

08/1989- 06/1995	Dänische Grundschule in Gulde
07/1995- 06/2002	Dänisches Gymnasium Duborg-Skolen in Flensburg Abschluss mit Abitur (Note 1,2)

Studium

10/2002- 10/2008	Studium der Humanmedizin, MLU Halle Wittenberg
9/2004	1. Staatsexamen (Note 2,0)
10/2005-4/2010	Arbeit an der vorliegenden Dissertation
10/2008	2. Staatsexamen (Note 1,5)

Famulaturen

2-3/2005	Innere Medizin, Diakonissenkrankenhaus Flensburg
9/2005	Gynäkologie, Diakonissenkrankenhaus Flensburg
2-3/2006	Internistische Notfallambulanz, Universitätsklinik Halle
8-9/2006	Gynäkologie, Universitätsklinik Szeged in Ungarn
9/2006	Innere Medizin, Praxis Dr. C. Müller, Flensburg
10/2006	Internistische Notfallambulanz, Universitätsklinik Halle

Praktisches Jahr

8-12/2007	Anästhesie, Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannstrost in Halle
12/2007- 3/2008	Innere Medizin, St. Barbara und Elisabeth Krankenhaus in Halle
3-7/2008	Chirurgie, Kantonales Spital Herisau, Schweiz

Zusatzqualifikationen

10/2005-6/2006	freie Mitarbeit als Redakteurin, Cocomore AG, Frankfurt
----------------	---

Sprachkenntnisse

Fließend dänisch und englisch. Grundkenntnisse französisch.

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit 4/2009	Assistenzärztin Innere Medizin, Interdisziplinäre Klinik für Stammzelltransplantation im Onkologischen Zentrum des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
-------------	---

Ort, Datum

Bente Flittiger

A2. Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt zu haben. Alle öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Keine weiteren Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar Geldwerte für Leistungen erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ort, Datum

Bente Flittiger

A3. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Bente Flittiger

A4. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

- Flittiger B, Klapperstück M, Schmalzing G, Markwardt F (2010) Effects of protons on macroscopic and single-channel currents mediated by the human P2X₇ receptor. *Biochim Biophys Acta Biomembranes* 1798: 947-957.

A5. Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. F. Markwardt, der ein sehr geduldiger Ansprechpartner bei der Erstellung dieser Arbeit war. Von meiner Annäherung an den physiologischen Messplatz über die Arbeit an speziellen Software-Programmen bis hin zur Diskussion von Literaturquellen war er stets ein geduldiger, kompetenter und freundlicher Ansprechpartner mit viel Liebe zum Detail.

Ich möchte mich ebenso bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. F. Markwardt bedanken, die im Laboralltag stets hilfsbereit waren. Insbesondere möchte ich hierbei Frau Schmidt erwähnen, die mir eine große Hilfe war. Bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. G. Schmalzing für die RNS-Präparation.

Des Weiteren möchte ich meinen Eltern danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stehen. Ebenso sei all denen gedankt, die ein offenes Ohr für die Probleme, die dysthymen Episoden und die Fallstricke, die im Verlauf der Dissertation auftraten, hatten.