Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Michael Georgieff

Charakterisierung von Cyclothiazid als Antagonist von humanen $P2X_7$ Rezeptoren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Sascha-Imre Palaskali

Göttingen

2010

Amtierender Dekan:	Herr Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Herr PD Dr. Karl Föhr
2. Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. Henry Weigt
Tag der Promotion:	10.11.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1 Die purinergen Rezeptoren 1

1.2 P2X Rezeptoren 1

1.3 Der $P2X_7$ Rezeptor 2

1.4 Rolle der $P2X_7R$ bei entzündlichen Prozessen 5

1.5 Membranblebbing durch $P2X_7$ Rezeptoren 6

1.6 Porenbildung nach $P2X_7$ Stimulation 6

1.7 $P2X_7$ Rezeptor Antagonisten 7

1.8 Pathophysiologische Rolle der $P2X_7$ Rezeptoren 9

1.9 Zielsetzung 12

2. Material und Methoden 13

2.1 Zellkultur 13

2.2 Die Patch-Clamp-Technik 15

2.3 Praktische Durchführung der Experimente 18

2.4 Datenauswertung 20

3. Ergebnisse 21

3.1. Verwendete Zellsysteme 21

3.2 Untersuchungsmethoden 21

3.3 Charakterisierung des $P2X_7$ Rezeptors an humanen dendritischen Zellen 21

3.4 Untersuchungen an kloniertenp $P2X_7$ Rezeptoren 27

3.5 Charakterisierung der Cyclothiazidhemmung 31

3.6 Untersuchungen zur Selektivität von CTZ 36

3.7 Untersuchung weiterer Substanzen an $P2X_7$ Rezeptoren 37

4. Diskussion 39

4.1 Besondere Eigenschaften des $P2X_7R$ 39

4.2 Wirkungsverlust von CTZ bei wiederholter ATP- Applikation 44

4.3 Einfluss der Substanzstruktur auf die Hemmung des $P2X_7R$ 44

4.4 Hemmung anderer Rezeptoren durch Cyclothiazid 45

4.5 Hemmungsmechanismus von Cyclothiazid 46

4.6 Speziesspezifische Hemmung durch Cyclothiazid 48

4.7 Mögliche klinische Einsatzgebiete für $P2X_7$ Antagonisten 49

5. Zusammenfassung 51

6. Literaturverzeichnis 52

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazol-propionat
ATP	Adenosintriphosphat
BzATP	2-,3-O-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP
CTZ	Cyclothiazid
EC_{50}	halbamximale Aktivierungskonzentration
EGTA	ethylene-glycol-tetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HCT	Hydrochlorothiazid
HEK293	menschliche embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hP2X7R	humaner purinerger-2X7-Rezeptor
IC_{50}	halbmaximal inhibierende Konzentration
IFNγ	Interferon Gamma
IL-1β	Interleukin-1β
LPS	Lipopolysaccharide
LD-Objektiv	Long-Distance-Objektiv
MEM	Minimum Essential Media
P2XR	purinerger-2X-Rezeptor
P2YR	purinerger-2Y-Rezeptor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PPADS	pyridoxal-phosphat-6-azophenyl-,2',4'-disulfonsäure
rP2X7R	purinerger-2X7-Rezeptor der Ratten
TM1/2	Transmembranerabschnitt ½
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Yo-Pro-1	Propidiumjodid Farbstoff

1. Einleitung

Der gezielte Informationsaustausch zwischen einzelnen Zellen war ein wichtiger Schritt bei der Entstehung vielzelliger Organismen. Hierzu war die Ausbildung von Signalmolekülen und entsprechenden zellulären Rezeptoren notwendig. In Abhängigkeit davon wie die Signaltransduktion erfolgt, unterscheidet man metabotrope von ionotropen Rezeptoren. Erstere vermitteln ihre Signale meist über zwischengeschaltete G-Proteine, während letztere einen Ionenkanal steuern. Die ionotropen Rezeptoren unterteilt man weiter in spannungs- und ligandengesteuerte Ionenkanälen, d.h. die Aktivierung des Ionenkanals erfolgt in Abhängigkeit des Membranpotentials oder über die Bindung eines spezifischen Liganden. Es gibt Rezeptoren, die sowohl in ionotroper als auch in metabotroper Form vorkommen. Zu ihnen zählen u.a. die GABA-ergen, glutamatergen oder purinergen Rezeptoren. Die Namen der Rezeptoren leiten sich aus ihren Liganden ab. Die GABAergen werden durch GABA (Gamma-Aminobuttersäure), die glutamatergen durch Glutamat und die purinergen durch Adenosintriphosphat (ATP) aktiviert.

1.1 Die purinergen Rezeptoren

Purinerge Rezeptoren kommen in verschiedensten Geweben vor und ermöglichen eine große Bandbreite an pharmakologischen Ansätzen (Burnstock et al. 1985). Gemeinsam ist diesen Rezeptoren, dass alle durch extrazelluläres ATP aktiviert werden. Da jedoch die Signaltransduktion unterschiedlich geschieht, werden die purinergen Rezeptoren in 2 Gruppen eingeteilt (North et al. 1997). P2X- und P2Y Rezeptoren (Burnstock et al. 1985). P2X sind ionotrope Rezeptoren, wohingegen die P2Y metabotrope Rezeptoren sind. Bei den P2Y Rezeptoren unterscheidet man zwischen 8 (Burnstock 2007), in der Familie der P2X Rezeptoren zwischen 7 Subtypen (Buell et al. 1996).

1.2 P2X Rezeptoren

P2X Rezeptoren sind am häufigsten auf erregbaren Zellen beziehungsweise in endo- und epithelialem Gewebe zu finden (Burnstock 2004). Der Ionenkanal der P2X Rezeptoren ist aus bis zu 3 Untereinheiten aufgebaut. Jede dieser Untereinheiten besitzt zwei Transmembrandomänen, die jeweils mit großen extrazellulären Aminosäurekettenschleifen verbunden sind. In diesen befinden

sich 10 Cysteinreste, die Disulfidbrücken ausbilden und dadurch 6 ß-Faltblattstruckturen darstellen. Dieser Bereich stellt die Bindungstelle für ATP dar (Brake et al. 1994) und befindet sich bei allen 7 P2X Rezeptoren an gleicher Stelle. Wird ATP gebunden, kommt es zur Aktivierung des Rezeptors mit darauf folgender Öffnung des Ionenkanals. Unter physiologischen Bedingungen strömen dann Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle und K^+ aus der Zelle heraus (Khakh et al. 2006). Das führt zu einem intrazellulären Anstieg der Ca^{2+}- und Na^+-Konzentration und zu einem Sinken der K^+-Konzentration. Durch die resultierende Veränderug der Ionenverhältnisse depolarisiert die Zelle. Der Anstieg der Ca^2-Konzentration im Zytoplasma geschieht nicht nur durch das Einströmen über den P2X Ionenkanal, sondern auch durch die Depolarisation bedingte Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanälen. Sowohl der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, als auch die Depolarisation sind Mechanismen der Signaltransduktion der Zelle (Di Virgilio et al. 2001).

1.3 Der $P2X_7$ Rezeptor

Der $P2X_7$ Rezeptor wurde zu Beginn seiner Entdeckung bis 1996 als cytolytischer P2Z Rezeptor bezeichnet. Bis dahin galt er noch als unabhängiger Rezeptor. Nach der Sequenzierung des Rezeptors wurde er als weitere Isoform ($P2X_7$) der P2X-Familie zugeordnet (Surprenant et al. 1996).

1.3.1 Struktur des P2X7 Rezeptors

Mit 595 Aminosäuren sind die Untereinheiten des $P2X_7$ Rezeptors die größten in der P2X-Familie. Auch der intrazelluläre C-terminale Anteil ist mit 244 Aminosäuren deutlich länger als bei den anderen Mitgliedern der P2X Familie. Lange galt der $P2X_7$ Rezeptor als einziger Rezeptor, der sich aus drei gleichen Untereinheiten zusammensetzt. Jedoch deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass nicht nur homotrimere, sondern auch heterotrimere $P2X_7$ Rezeptoren existieren, die sich aus $P2X_4$ und $P2X_7$ Untereinheiten zusammensetzen (Guo et al. 2007) (Dubyak 2007). Ansonsten unterscheidet sich der $P2X_7$ im Verhältnis zu den anderen P2X Rezeptoren kaum, da die P2X Proteine in Bezug auf die grobe Struktur recht konservativ sind.

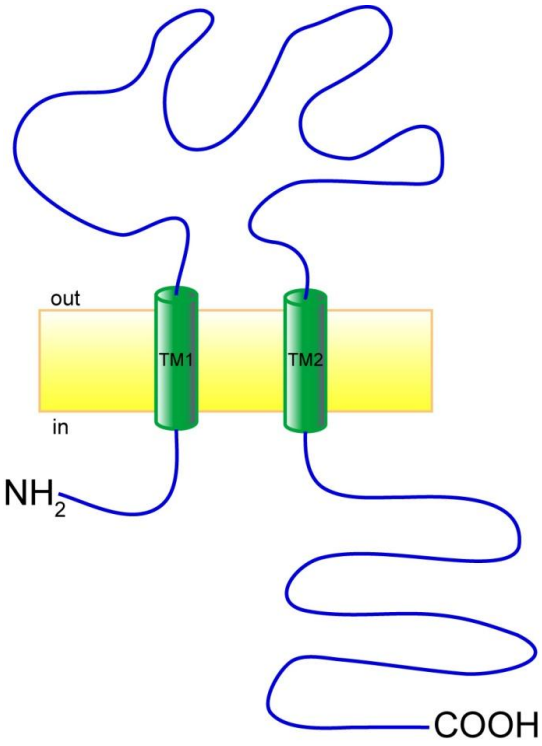


Abb.1 Schematische Darstellung des $P2X_7$ Rezeptors. N- und C-Terminus liegen intrazellulär und sind mit NH2 und COOH symbolisiert. IN und OUT bezeichnen den jeweiligen intrazellulären und extrazellulären Anteil des Rezeptors. Die zwei transmembranösen Abschnitte TM1 und TM2 sind über eine extrazelluläre Schleife miteinander verbunden.

1.3.2 Vorkommen des $P2X_7$ Rezeptors

Am häufigsten findet man den $P2X_7$ Rezeptor auf Zellen des hämatopoetischen Systems. Hier sind sie in hoher Anzahl auf Mastzellen, Erythrozyten, Monozyten peripheren Makrophagen, dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten und epidermalen Langerhans Zellen anzutreffen (North 2002). In Bezug auf das ZNS wurden funktionelle $P2X_7$ Rezeptoren auf Mikroglia (Ferrari et al. 1996), Schwann Zellen (Collo et al. 1997) und Astrozyten (Sim et al. 2004) gefunden.

1.3.3 Besondere Eigenschaften des $P2X_7$ Rezeptors

Der einzig bekannte physiologische Agonist für den $P2X_7R$ ist der Energielieferant ATP. Ein künstlicher Aktivator des $P2X_7$ ist das 2-,3-O-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP) mit einer 10-100fach höheren agonistischen Aktivität als gewöhnliches ATP (Surprenant et al. 1996). Für die Aktivierung des $P2X_7$ Rezeptors werden ungewöhnlich hohe ATP-Konzentrtionen benötigt (North et al. 2000). Extrazellulär kommen solch hohe ATP Konzentrationen physiologischerweise nicht vor. Innerhalb von Zellen kommt ATP in millimolaren Konzentrationen vor. Wenn also Gewebe verletzt wird und ATP aus Zellen austritt, kann die ATP-Konzentration so stark zunehmen, dass eine Aktivierung des $P2X_7$ Rezeptors möglich wird (Dubyak et al. 1993). Das lässt daraus schließen, dass eine Aktivierung des Rezeptors und dessen hauptsächliche Bedeutung in der zellulären Reaktion auf Verletzung und Untergang von Zellen und Geweben liegen könnte. Weitere Studien zeigten eine mögliche Freisetzung von ATP durch aktivierte Immunzellen (Filippini et al. 1990), Makrophagen (Sikora et al. 1999), Mikroglia (Ferrari et al. 1997) und Thrombozyten (Beigi et al. 1999). Die Sensitivität mit der die einzelnen P2X Rezeptoren den Agonisten binden, ist sehr unterschiedlich. So hat zum Beispiel der humane $P2X_7$ ($hP2X_7$) Rezeptor eine halbmaximale Aktivierungskonzentration von etwa 1 mM und der humane $P2X_4$ von 7,5 µM (Soto et al. 1996). P2X Rezeptoren unterscheiden sich auch in ihrem Desensitivierungsverhalten. Darunter versteht man die Abnahme der Signalamplitude bei fortwährender Gegenwart des Agonisten. Der $P2X_7$ Rezeptor desensitiviert so gut wie gar nicht, wohingegen die Ionenströme des $P2X_1$ Rezeptors rapide sistieren (North 2002). Appliziert man wiederholt ATP an $P2X_7$ exprimierenden Zellen, ändert sich sowohl die Amplitude als auch die Kinetik der Ionenströme (Hibell et al. 2000). Zu Beginn steigt die Signalamplitude beständig an, fällt dann wieder ab und bleibt zuletzt konstant auf einem Niveau (Klapperstuck et al. 2001). Eine weitere außergewöhnliche Eigenschaft des $P2X_7$ Rezeptors ist die inhibitorische Wirkung von extrazellulärem Ca^{2+} und Mg^{2+}. Dadurch sind Messungen von agonistischen oder antagonistischen Substanzen unter physioloigschen Verhältnissen hinsichtlich divalenter Kationen erschwert. Man geht davon aus, dass die Hemmung durch die divalenten Kationen allosterischer Natur ist (Virginio et al. 1999).

1.4 Rolle der $P2X_7R$ bei entzündlichen Prozessen

Auch bei entzündlichen Prozessen (Lazarowski et al. 2000) und als Reaktion auf Hypoxie oder Ischämie (Nieber et al. 1999) steigt die extrazelluläre ATP Konzentration an. Zusätzlich findet bei Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen bei Kontakt mit bakteriellen Substanzen, wie zum Beispiel den Lipopolysacchariden (LPS), eine Hochregulierung der Expression und Sensitivierung von $P2X_7$ Rezeptoren statt (Humphreys et al. 1998a),(Narcisse et al. 2005).

1.4.1 $P2X_7$ bedingte IL-1β-Freisetzung

Es stellte sich heraus, dass die Rolle des $P2X_7$ Rezeptors bei entzündlichen Reaktionen die Prozessierung und Ausschüttung von IL-1β ist. Schon in frühen Studien zeigte sich, dass ATP ein starker Reiz ist, IL-1β freizusetzen (Hogquist et al. 1991, Perregaux et al. 1994, Griffiths et al. 1995). Da zusätzlich ein starker K^+-Efflux zu messen war, ist man davon ausgegangen, dass ein Rezeptor in Form eines Ionenkanals an der Freisetzung beteiligt sein muss (Perregaux et al. 1994, Steinberg et al. 1987b, Di Virgilio et al. 1996). Experimente mit Mäusen lieferten letztendlich den Beweis, dass der $P2X_7$ Rezeptor für die Ausschüttung von IL-1β verantwortlich ist (Labasi et al. 2002), (Chessell et al. 2005). Über die Aktivierung des $P2X_7$ mit ATP wird durch bisher ungeklärte Mechanismen Caspase-1 aktiviert. Beides führt zur massiven Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration, was für die Reifung des IL-1β unerlässlich ist (Gudipaty et al. 2003),(Cheneval et al. 1998). Die Freisetzung des IL-1β erfolgt nicht auf herkömmliche Weise durch klassische Exozytose Vesikel aus dem Golgi-Apparat, da es ohne Leaderpeptid synthetisiert und im Zytosol gespeichert wird. Es werden 2 verschiedene Theorien diskutiert. Bei der ersten wird angenommen, dass IL-1β zusammen mit Caspase-1 in sekretorischen Lysosomen akkumuliert. Durch den $P2X_7$ bedingten Verlust an intrazellulären K^+ Ionen wird eine Phosphatidylcholin spezifische Phospholipase C aktiviert und führt zum intrazellulärem Anstieg von Ca^{2+}. Dadurch wird eine Ca^{2+} -abhängige Phospholipase A2 aktiviert, und daraus resultiert die Exozytose des Lysosoms (Andrei et al. 2004). Bei dem zweiten Model werden Mikrovesikel mit einer Größe von 200nm bis 1 mm postuliert. Diese werden durch Membranblebbing abgeschnürt und enthalten das IL-1β (MacKenzie et al. 2001). Die größeren Membranblebbs, die bei der Aktivierung des $P2X_7$ Rezeptors

entstehen, unterscheiden sich von den hier beschriebenen Mikrovesikeln. Diese sind vielmehr verwandt mit den Gewebsfaktor enthaltenen Mikropartikel, die von verschiedenen Zellen ausgeschüttet werden (Morel et al. 2004). Phosphatidylserin Flip und Verlust der Membransymmetrie leitet die Bildung und Freisetzung der Mikrovesikel ein (MacKenzie et al. 2001).

1.5 Membranblebbing durch $P2X_7$ Rezeptoren

Bei wiederholter oder länger dauernder ATP-Applikation an $P2X_7$ exprimierenden Zellen reagiert das Cytoskelett mit einer Reorganisation durch Actin und anderen Adhesionsmolekülen, was zur Bildung von Membranblebbs führt (Pfeiffer et al. 2004). Diese Ausstülpungen der Zellmembran, die sich anschließend abschnüren, sieht man häufig bei apoptotischen Prozessen. Solange die Stimulation des $P2X_7$ Rezeptors mit ATP unter 10 bis maximal 15 Minuten bleibt, ist der Vorgang noch reversibel (Mackenzie et al. 2005),(Morelli et al. 2003). Überschreitet man dieses Zeitfenster, wird die Zelle über Caspasen und andere Signaltransduktionen in die Apoptose überführt.

1.6 Porenbildung nach $P2X_7$ Stimulation

Findet eine langandauernde Aktivierung des $P2X_7$ Rezeptors statt, so bilden sich cytolytische Poren in der Membran. Durch diese können Moleküle bis zu einer Größe von 900 Dalton passieren. Durch den fluoresziernden Farbstoff Yo-Pro-1, der mit einer Größe von 629 Da durch die Pore, nicht jedoch durch die Zellmembran gelangen kann, konnte man die Porenbildung beweisen. Nach der Applikation von Yo-Pro-1 und repetetiver Stimulation mit ATP konnte durch Fluoreszenzmessung der Farbstoff im Zellkern der Zelle nachgewiesen werden, da Yo-Pro-1 in der DNA interkaliert. Ohne wiederholte ATP Gabe konnte Yo-Pro-1 die Zellmembran nicht überqueren und dementsprechend auch nicht im Zellkern gemessen werden (Rassendren et al. 1997). Dieses Phänomen erklärt die Tatsache, dass die Sensitivität des Rezeptors gegenüber ATP nach wiederholter Stimulation ansteigt. Man geht davon aus, dass die Porenbildung durch das Pannexin-1 geschieht, ein Membranprotein, welches strukturelle Ähnlichkeiten mit den Connexinen aufweist (Pelegrin et al. 2006). Im Vergleich zu den anderen P2X Rezeptoren hat der $P2X_7$ einen signifikant längeren C-Terminus, und gerade diese

strukturelle Besonderheit ist essentiell für die Porenbildung. Vor allem die letzten 177 Aminosäuren des C-Terminus spielen eine wichtige Rolle, da ohne diesen Anteil eine Kanalbildung zwar noch möglich ist, eine Porenbildung jedoch nicht mehr (Surprenant et al. 1996).

1.7 $P2X_7$ Rezeptor Antagonisten

Klinisch hätte die Anwendung eines Antagonisten des humanen $P2X_7$ Rezeptors aufgrund seiner häufigen Beteiligung an pathologischen Prozessen eine große Bedeutung.

Alle Antagonisten zeigten eine unterschiedliche Pharmakologie zwischen dem humanen- und dem $P2X_7$ Rezeptor der Ratte. Höchstwahrscheinlich hängt dieses Phänomen mit dem unterschiedlichen Aufbau der Rezeptoren zusammen. Nur 80% der Aminosäuresequenz stimmen bei den humanen und $rP2X_7$ Rezeptor überein. Das ist deutlich weniger als bei den anderen P2X Rezeptoren. Vergleicht man hier den humanen und den P2X Rezeptor von Ratten, so finden sich Sequenzübereinstimmungen von 90-99% (North 2002). Problematisch wird es bei Antagonisten, die eine hohe Selektivität des humanen $P2X_7$ Rezeptors aufweisen. Zum Beispiel hat KN-62 keine Wirkung auf den $rP2X_7$ Rezeptor und könnte somit nicht an Tiermodellen getestet werden. Die Reversibilität, Wirkung in An- und Abwesenheit divalenter Kationen und die Prüfung des kompetitiven oder nicht-kompetitiven Wirkungsverhaltens sind neben der Speziesspezifität wichtige Unterscheidungsmerkmale hinsichtlich des Hemmungsmechanismus der Antagonisten.

Die geläufigsten P2X7 Antagonisten sind:

Oxidiertes ATP. Inkubiert man Zellen, die den $P2X_7$ Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, für mindestens 2 Stunden mit 100µM oxidiertem ATP, so findet eine irreversible Hemmung des $P2X_7$ Rezeptors statt (Surprenant et al. 1996). Dieser Effekt tritt nicht nur bei den $P2X_7$ Rezeptoren auf, sondern auch bei anderen P2X Rezeptoren, wie zum Beispiel $P2X_1$ und $P2X_2$ (Evans et al. 1995).

Calmidazolium. Dieser $P2X_7$ Antagonist hemmt den humanen $P2X_7$ nicht-kompetitiv mit einer IC_{50} von 100 nM (Chessell et al. 1998). Mit einer IC_{50} von 10nM wird der $rP2X_7$ stärker als der Humane antagonisiert und hat keine Wirkung an anderen P2X Rezeptoren von Ratten (Virginio et al. 1997). Die Hemmung ist reversibel und spannungsunabhängig. Es werden viele weitere Rezeptoren blockiert, unter anderem Calmodulin und die Kalzium-Calmodulin Kinase 2, wofür das Calmidazolium eigentlich bekannt ist (Braun et al. 1995).

KN-62. Das Isoquinolen Derivat KN-62 hemmt nicht-kompetitiv mit einer IC_{50} von 25 nM den humanen $P2X_7$ Rezeptor (Chessell et al. 1998). Der $P2X_7$ von Ratten wird nicht gehemmt (Humphreys et al. 1998b). Der Antagonist wirkt trotz einer Auswaschphase von 20 Minuten nicht reversibel (Chessell et al. 1998). Wie das Calmidazolium, ist KN-62 für seine Hemmung der Kalzium-Calmodulin Kinase 2 und von Calmodulin bekannt (Braun et al. 1995).

PPADS. Die pyridoxal-phosphat-6-azophenyl-,2',4'-disulfonsäure (PPADS) ist ein nicht selektiver P2X Rezeptor Antagonist, welcher nicht kompetitiv mit einer IC_{50} von 1µM den humanen $P2X_7$ Rezeptor hemmt (Chessell et al. 1998). Die Hemmung ist nicht vollständig reversibel und abhängig von der Inkubationszeit.

Suramin. Das farblose Analogon des Azofarbstoffs Trypanblau zählt wie PPADS zu den nicht selektiven P2X Rezeptor Antagonisten. Den humanen $P2X_7$ Rezeptor hemmt es kompetitiv mit einer IC_{50} von 70 µM. Die Hemmung ist nicht vollständig reversibel (Chessell et al. 1998).

Brilliant Blue G. Mit einer IC_{50} von 265 nM hemmt der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G nicht kompetitiv den humanen $P2X_7$ Rezeptor. Der $rP2X_7$ wird mit einer IC_{50} von 10 nM antagonisiert (Jiang et al. 2000). Die Hemmung ist nicht vollständig reversibel, spannungsunabhängig und im mikromolaren Bereich nicht selektiv. Es werden zusätzlich zu dem $P2X_7$ andere P2X und P2Y Rezeptoren gehemmt (Stokes et al. 2006). Unter anderem der $P2X_2$ von Ratten und der humane $P2X_4$ Rezeptor, der mit einer IC_{50} von 3,2 µM blockiert wird (Jiang et al. 2000).

AZ11645373. Dieser Antagonist zählt zu den zyklischen Imiden und hemmt den humanen $P2X_7$ Rezeptor nicht kompetitiv mit einer IC_{50} von 7nM. Unter Verwendung von weniger als 1µM des Antagonisten ist die Hemmung reversibel, bei höheren Konzentrationen wird die Hemmung irreversibel. Das Membranpotential und die Konzentration von divalenten Kationen in der extrazellulären Lösung beeinträchtigen die Wirkung des zyklischen Imides nicht. Effekte an den anderen P2X Rezeptoren konnten selbst bei Konzentrationen von mehr als 10 µM nicht gemessen werden. Der $P2X_7$ von Ratten wies eine Hemmung von weniger als 40 % bei einer Antagonisten-Konzentration von 10µM auf (Stokes et al. 2006).

1.8 Pathophysiologische Rolle der $P2X_7$ Rezeptoren

In Studien mit $P2X_7$ defizienten Mäusen zeigte sich die Bedeutung des Rezeptors bezüglich Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel bei der rheumatoiden Arthritis. Findet sich eine Deletion des $P2X_7$ Gens, kann die ATP vermittelte Freisetzung von IL-1β nicht mehr stattfinden. Dadurch waren diese Mäuse gegen ein Auftreten von Symptomen und Schädigung von Knorpel durch Antikollagen Antikörper geschützt (Labasi et al. 2002). Ergebnisse aus anderen Studien zeigten auch eine mögliche Beteiligung an chronischen und akuten Schmerzzuständen (Khakh et al. 2006).

1.8.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wird vermutet, dass entzündliche Prozesse im zentralen Nervensystem mit besonderem Hinblick auf Mikroglia eine entscheidende Rolle bezüglich der Pathophysiologie spielen. IL-1β ist einer der wichtigsten Mediatoren bei neurodegenerativen Vorgängen und da der $P2X_7$ Rezeptor zur Prozessierung und Freisetzung von IL-1β befähigt ist, könnte er hier für das Zugrundegehen von Nervenzellen verantwortlich sein (Allan et al. 2001). Bei einer weiteren Studie wurde Hippocampusgewebe von Mäusen mit LPS und ATP inkubiert und anschließend auf Zellschäden untersucht. Man fand apoptotische und stark aktivierte Mikroglia Zellen mit massiver Freisetzung von IL-1β, was auf eine intensive $P2X_7$ Rezeptor Stimulation hinweist (Bernardino et al.

2008). Nicht nur bei bakteriellen Infekten, sondern auch bei Rückenmarksverletzungen scheint die Aktivierung von $P2X_7$ Rezeptoren eine wichtige Rolle zu spielen. Es zeigten sich in der peritraumatischen Zone abnormal hohe und lange ATP Freisetzungen. Nach Gabe eines $P2X_7$ Antagonisten in der Akutphase fand eine funktionelle Erholung von beschädigtem Gewebe und eine Verminderung von Zellsterben in dem Bereich der Verletzung statt (Wang et al. 2004). Weitere Studien deuten auf eine Beteiligung des $P2X_7$ Rezeptors an der Pathogenese von Amyotropher Lateral Sklerose und Multipler Sklerose hin (Yiangou et al. 2006). Zudem findet nach Ischämien in der zerebralen Cortex eine Hoch-Regulation von $P2X_7$ Rezeptoren in dem betroffenen Bereich statt (Franke et al. 2004). Zusammenfassend kann man festhalten, dass ATP über den $P2X_7$ Rezeptor den Gesundheitszustand der neuronalen Zellen reguliert und der $P2X_7$ Rezeptor ein wichtiger Bestandteil des neuroinflammatorischen Prozesses ist. Antagonisten des $P2X_7$ Rezeptors könnten daher ein wichtiges Werkzeug in der Therapie gegen neurodegenerative Erkrankungen und zerebrale Ischämien sein, indem sie die pathologische Aktivierung von Gliazellen verhindern.

1.8.2 Neuropathische Schmerzen

ATP ist ein Schlüsselelement in der Weiterleitung sensorischer Information von der Peripherie in das zentrale Nervensystem (Burnstock et al. 1996). Sowohl sensorische Neurone als auch Gliazellen, die sich innerhalb und außerhalb des ZNS befinden, setzen ATP frei, um Signale an ihre Umgebung weiterzuleiten (Jahr et al. 1983),(Werry et al. 2006). In einer Studie mit Mäusen, denen der $P2X_7$ Rezeptor fehlte, konnte bewiesen werden, dass entzündliche und neuropathische Überempfindlichkeit weder durch mechanische noch durch thermische Stimuli provoziert werden konnten. Zudem konnte bei Patienten mit chronischen neuropathischen Schmerzen eine Hoch-Regulation des $P2X_7$ Rezeptors in den betroffenen Nerven und in den dorsalen Stammganglien festgestellt werden (Chessell et al. 2005). Studien mit strukturell unterschiedlichen $P2X_7$ Rezeptor Antagonisten zeigten positiven therapeutischen Effekt auf neuropathisch induzierte Allodynie (McGaraughty et al. 2007). Diese Erkenntnisse deuten auf eine mögliche therapeutische Wirkung von $P2X_7$ Rezeptor Antagonisten bei neuropathischen Schmerzen.

1.8.3 Depression

Depressionen kommen gehäuft bei Erkrankungen mit proinflammatorischer Komponente vor. Diese schließen Krankheiten mit infektiöser, autoimmuner und neurodegenerativer Genese ein. Zytokine wie TNFa, IFNy und auch IL-1β in hohen Konzentrationen könnten ursächliche Faktoren für die Entstehung einer Depression sein (Smith 1991). Auf dieser Grundlage haben Forscher Tieren zentral und systemisch proinflammatorische Zytokine verabreicht. Dies induzierte bei den Versuchstieren Symptome, die denen einer Depression bei Menschen gleichen (Pollak et al. 2002). Bei einer weiteren Studie untersuchte man einen Nukleotidpolymorphismus in dem $P2X_7$ Gen einer französischen Population. Das untersuchte Nukleotid liegt C-Terminal und ist für das normale Funktionieren des $P2X_7$ Rezeptors essentiell. Polymorphismen in diesem Nukleotid erwiesen sich als potentielle Faktoren, die eine Anfälligkeit gegenüber Depressionen und bipolaren Störungen fördern (Lucae et al. 2006)(Hejjas et al. 2009). Diese Umstände deuten eine mögliche Beteiligung des $P2X_7$ Rezeptors an der Pathogenese der Depression an und würden ein weiteres Ziel für $P2X_7$ Rezeptor Antagonisten bieten.

1.9 Zielsetzung

Die Aktivierung des $P2X_7$ Rezeptor spielt bei vielen pathologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Geeignete P2X7 Antagonisten sind somit von höchstem klinischen Interesse. Es sind bisher verschiedene Substanzen bekannt, die den $P2X_7$ Rezeptor hemmen. Keiner dieser Antagonisten, wie ATP-Analoga (oxidiertes ATP), Farbstoffe (Brilliant Blue G), Tyrosin Derivate (KN-62), zyklische Imide, Adamantan Derivate, Steroide und Arylalkyl Hydrazide weisen zufriedenstellende Eigenschaften in Bezug auf ihre Sensitivität, Speziesspezifität, Wirkung in hoher und niedriger divalenter Kationenkonzentration und in ihrem Hemmungsmechanismus auf (Carroll et al. 2007, Shemon et al. 2004, Guile et al. 2009, Nelson et al. 2008). Daher ist die Suche nach einem idealen Wirkstoff noch nicht beendet. Während Screening-experimenten wurde in diesem Labor die antagonistische Wirkung des Cyclothiazids an $P2X_7$ Rezeptoren entdeckt. Ziel dieser Arbeit war es, diese Substanz bezüglich ihrer $P2X_7$ antagonisierenden Wirkung zu untersuchen. Die anstehenden Untersuchungen sollten mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik zuächst an nativen humanen dendritischen Zellen durchgeführt werden. Zu einem späteren Zeitpunkt (ab Verfügbarkeit klonierter P2X7-Rezeptoren von Mensch und Ratte) sollten dann auch vergleichende Untersuchungen zur Speziesspezifität von Cyclothiazid durchgeführt werden. Insgesamt sollten die anstehenden Experimente Auskunft über Effektivität, Sensitivität, Speziesspezifität und den Wirkungsmechanismus von Cyclothiazid erbringen.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für die Experimente an P2X7 Rezeptoren wurden zwei unterschiedliche Zelltypen verwendet. Es handelte sich dabei zum einen um humane dendritische Zellen, welche natürlicherweise den P2X7 Rezeptor exprimieren und zum anderen um TsA-Zellen, die mit dem P2X7 Rezeptor von Ratte oder Mensch transfiziert wurden.

Humane dendritische Zellen

Für die Messungen der humanen dendritischen Zellen wurden Zellkulturen angelegt, die aus mononukleären Zellen bestanden. Diese Zellen wurden aus peripherem Blut gewonnen und anschließend in einem RPMI 1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 25 mM HEPES Puffer und Antibiotika kultiviert. Nach 2 bis 3 Wochen Kultivierung haben sich unreife dendritische Zellen gebildet. Diese Zellen wurden in Anwesenheit von 100 ng/ml TNF-α für 8 bis 14 Tage rekultiviert, bevor die dann reifen dendritischen Zellen für die Experimente verwendet werden konnten.

TsA-Zellen

Die TsA201 Zelllinie ist ein Abkömmling der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 (ATCC#CRL1537), welche ein T-Antigen gegen das Simian-Virus-40 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Sie wurden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 95% O_2 und 5% CO_2 kultiviert. Das Nährmedium setzte sich aus MEM mit 50 U Penicillin/ml, 50 µg/ml Streptomycin (Gibco, Eggenstein, Deutschland), 2 mM L-Glutamin (Boehringer, Mannheim, Deutschland), und 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (Gibco) zusammen. Die Zellen wurden auf poly-Ornithin beschichteten Schalen kultiviert und wiesen bei Transfektion etwa 40% Konfluenz auf. Für die Transfektion wurde der Trans-Fektion^{TM} kit (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Die cDNA´s, welche für $P2X_7$-Rezeptoren von Mensch und Ratte kodieren, wurden freundlicherweise von A. Suprenant (Manchester) zur Verfügung gestellt.

Durchführung der Transfektion

Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde jeweils 100 µl OPTI-MEM Medium (Gibco) in 2 Eppendorfgefäße (A,B) vorgelegt. Nun wurde in Ansatz A 1 µg DNA des jeweiligen Ionenkanals, und 0,5 µg DNA für den Marker Green Fluorescent Protein (GFP) zugegeben. In Ansatz B wurden 6 µl Transfektionsreagenz pipettiert. Nach 5 minütiger Inkubation wurde Ansatz A tropfenweise unter Vortexen in Ansatz B überführt. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation wurde der Ansatz auf die vorbereiteten Zellen pipettiert. Diese wurden zuvor einmal mit PBS gewaschen und mit 0,8 ml Medium (ohne FCS und Antibiotika) überschichtet. Nach 4-5 Std wurde der Transfektionsansatz wieder entfernt und die Zellen über Nacht mit normalem Medium kultiviert. Die transfizierten Zellen wurden am Folgetag für Untersuchungen herangezogen.

Vor Messbeginn wurden die konfluent gewachsenen Zellen vereinzelt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und anschließend für 5 min mit Accutase (PAA, Pasching, Österreich) bei 37 °C behandelt. Danach wurde die Accutase entfernt, die Zellen mit Medium trituriert und anschließend auf mehrere Schalen verteilt.

2.2 Die Patch-Clamp-Technik

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik ist es möglich, Membranbezirke elektrisch zu isolieren. Dazu wird eine fein ausgezogene Glaskapillare an eine Zelle herangeführt und durch Anlegen eines Unterdrucks ein sehr hoher Abdichtwiderstand („Gigaseal“) mit der Zellmembran hergestellt. Durch eine Spannungsklemme (Abb.2) kann das Membranpotential einer Zelle auf einen vorgegebenen Wert konstant gehalten oder entsprechend verändert werden. Die Spannungsklemme ermöglicht die exakte Einstellung einer vom Benutzer definierten Membranspannung (Haltepotential, V_H), indem eine Verstärkereinheit den Strom liefert, um die Abweichung vom vorgegebenen Wert zu kompensieren. Der dazu verwendetet Schaltkreis ist nahe der Glaspipette im sogenannten Vorverstärker untergebracht.

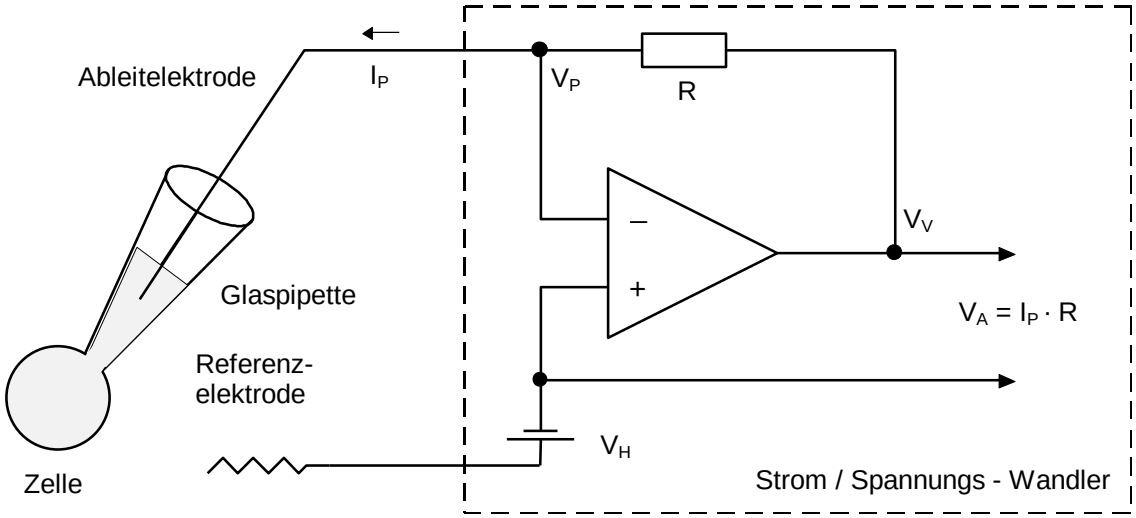


Abb.2 Vereinfachtes Ersatzschaltbild einer Spannungsklemme. Fließt über die Zelle (und die Pipette) ein Strom I_P, so tritt eine Differenz zwischen dem Haltepotential V_H und dem Pipettenpotential V_P auf, die an den Eingängen des Verstärkers anliegt. Dadurch wird das Potential V_V am Verstärkerausgang geregelt, der Verstärker fungiert als spannungsgesteuerte Spannungsquelle. V_V fällt über den Messwiderstand R auf V_P ab, um I_P nachzuliefern. Aus der Differenzspannung $V_A = V_V - V_H$ lässt sich dann indirekt der Pipettenstrom I_P berechnen.

2.2.1 Eigenschaften der Whole-Cell-Konfiguration

Die wesentliche Eigenschaft der Whole-cell-Konfiguration ist die elektrische Erfassung der Ströme durch die gesamte Zellmembran. Nach dem Zustandekommen des Gigaseals wird ein elektrischer Kontakt zwischen der Ableitelektrode und dem Inneren der Zelle hergestellt, indem der von der Glaspipette eingegrenzte Membranbezirk aufgebrochen wird. Nach Durchbrechung der Zellmembran besteht eine direkte Verbindung der Lösung im Pipetteninneren mit dem Inneren der Zelle, so dass nach der Äquilibrierungszeit Zell- und Pipetteninhalt identisch sind.

2.2.2 Aufbau der Applikationssysteme

Cyclothiazid und ATP wurden mit Hilfe eines computergesteuerten Substanz-applikationssystems (L/M.SPS-8; List, Darmstadt) zugegeben (Abb. 3). In diesem System standen 4 bis 13 getrennte Vorratsgefäße für Lösungen mit Testsubstanzen zur Verfügung. Um ein sicheres Anfluten der Lösungen durch die einzelnen Kanäle zu gewährleisten, wurden sämtliche Vorratsgefäße mit einem Drucksteuersystem (MPCU-3; Lorenz, Lindau) verbunden. Dieses übte zusätzlich zur Schwerkraft einen Druck von zirka 10 - 12cm H_2O auf die Vorratsgefäße aus. Vom Boden der Vorratsgefäße ging jeweils ein Schlauch aus. Die Enden der Schläuche wurden je nach Experiment an eine 4, 7, 8 oder 13 –Kanal Perfusionsnadel angeschlossen, in deren distalen Teil sich die Substanzzuflüsse vereinten. Die Spitze der Perfusionsnadel wurde unter Zuhilfenahme eines 3-Achs-Mikromanipulators gegenüber der Absaug-/Überlaufnadel ca. 50-100 µm vom Messfeld entfernt in die Messkammer eingebracht. Der Substanzfluss durch die Schläuche wurde durch Magnetklemmventile gesteuert. Eine Steuerungseinheit gestattete sowohl die manuelle Bedienung jedes einzelnen Ventils als auch die Ansteuerung über einen Computer. Die Messkammer stellte eine konventionelle 35 mm Petrischale dar, die in etwa 2 ml extrazelluläre Lösung enthielt. Diese Lösung wurde während den Messungen fortlaufend ausgetauscht, indem über eine Schlauchpumpe mit einer Geschwindigkeit von 4,5 ml/min kontinuierlich extrazelluläre Lösung zugeführt wurde. Das Volumen der Messkammer wurde sowohl über ein lokales Absaugsystem (ca. 1ml/min) durch eine Membranpumpe als auch über einen Überlauf durch eine Vakuumpumpe wieder entfernt, so dass zusammen mit dem Zulauf eine kontinuierliche

Durchströmung der Messkammer mit extrazellulärer Lösung erzielt wurde. Die Kanülen beider Absaugsysteme wurden circa 300 µm vom Messfeld entfernt positioniert. Dabei befanden sich der Überlauf an der Flüssigkeitsoberfläche und die lokale Absaugung am Boden des Messgefäßes knapp oberhalb des Schalenbodens. Der Überlauf gewährleistete einen konstanten Flüssigkeitspegel unabhängig von der diskontinuierlichen Zuführung der Testsubstanzen. Die lokale Absaugung verhinderte eine Akkumulation von Testsubstanz im Messbereich. Die applizierten Substanzen erreichten daher nur eine Fläche von den Ausmaßen 300µm x 100µm innerhalb der Messkammer, sodass ein Kontakt von zu testender Substanz und Zellen, die sich außerhalb des Testbereichs befanden, weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

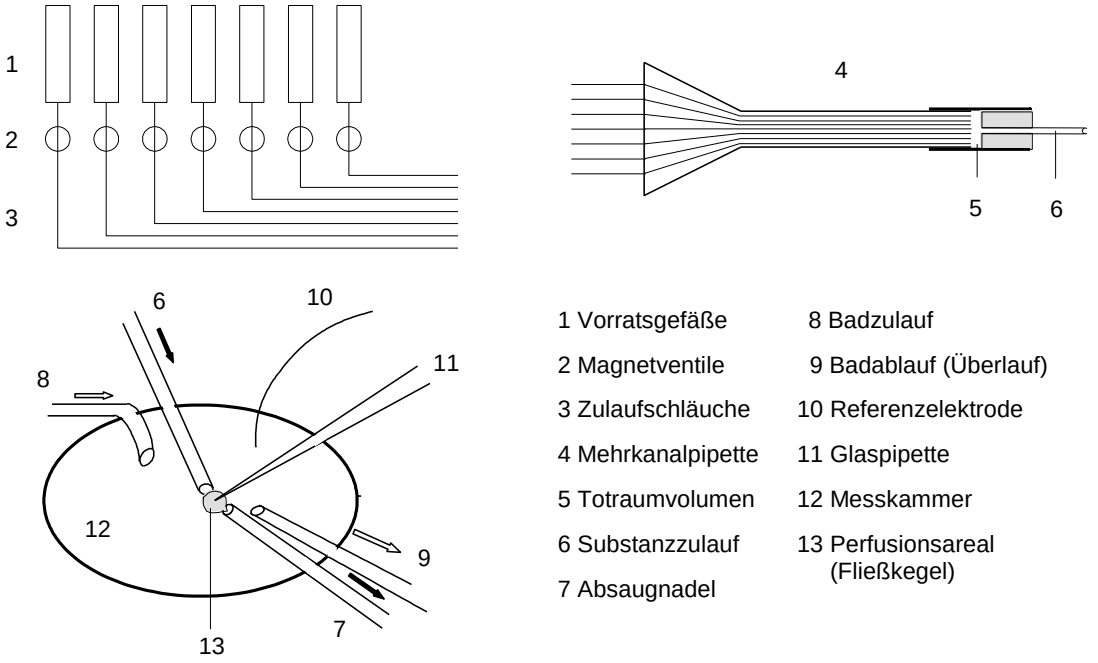


Abb.3 Schematische Abbildung der Messkonfiguration und des Applikationssystem für Testsubstanzen. Über den Substanzzulauf (6) wird die zu testende Substanz in das Perfusionsareal (13) appliziert. In diesem Bereich befindet sich die Zelle, die über eine Glaspipette perforiert wurde. In dieser Glasnadel befindet sich die Ableitelektrode (11). Am Rand der Messkammer (12) befindet sich die Referenzelektrode (10) und der Badzulauf (8), da sie im Bereich der Messung nicht benötigt werden und dort nur stören würden. Gegenüber des Substanzzulaufes befindet sich die Absaugnadel, welche die über den Substanzzulauf zugeführten Substanzen aus dem Perfusionsareal entfernt. Zusätzlich befindet sich dort eine höher liegende Absaugung (9), welche den Flüssigkeitsspiegel konstant hält und ein Überlaufen verhindert.

2.3 Praktische Durchführung der Experimente

Die überwiegende Zahl an Messungen bestand aus Applikationen von ATP und Cyclothiazid, die mit Hilfe des L/M-SPS-8-Perfusionssystems durgeführt wurden.

2.3.1 Geräte

Alle Untersuchungen an den Zellen wurden über ein Mikroskop (Axiovert, Zeiss) verfolgt. Die Steuerung des eingesetzten Patch-Clamp-Verstärkers EPC-9 (List, Darmstadt) übernahm ein Rechner, der mit TIDA-Software (HEKA, Lambrecht) ausgestattet ist. Die Software ermöglichte über einen 16 Bit-Analog-/Digital-Wandler die Einstellung des Potentials und gleichzeitig die direkte Ansteuerung des Perfusionssystems L/M-SPS-8. Zu diesem Zweck wurden mit der TIDA-Software eigene Programme erstellt.

2.3.2 Lösungen

Vor Messbeginn wurden die Zellen zweimal mit externer Lösung gespült, welche eine „niedrige“ Konzentration an divalenten Kationen enthielt. Wenn nicht ausdrücklich anders beschrieben, wurde diese extrazelluläre Lösung bei allen Experimenten verwendet. Dies Zusammensetzung der Lösung war (in mM) 140 NaCl, 2.7 KCl, 0,3 $CaCl_2$, 10 Glukose und 12 HEPES (pH 7.3). Im Unterschied dazu wurden bei der externen Lösung, die „normale“ divalente Kationen beinhaltet, 1 mM $MgCl_2$ und 1.5 mM $CaCl_2$ verwendet. Die Pipettenlösung enthielt (in mM) 140 $CsCl_2$, 2 $MgCl_2$, 2 ATPx2Na, 2 EGTA und 10 HEPES bei einem pH von 7.2.

2.3.3 Durchführung der Messung in Whole-Cell-Konfiguration

Zur Herstellung der Ableitelektroden wurden filamentfreie Glaskapillaren durch einen DMZ-Universalpuller in einem dreistufigen Arbeitsprozess gezogen. Diese wurden danach unter Verwendung eines Bunsenbrenners an den stumpfen Enden geglättet, um die teilweise mit Teflon beschichtete Ableitelektrode des Vorverstärkers nicht zu beschädigen. Durch Erzeugen eines Unterdrucks mit einer Spritze, die durch einen Schlauch an dem stumpfen Ende der Glaskapillare verbunden war, wurde die Kapillarenspitze mit Pipettenlösung gefüllt. Anschließend wurde die andere Seite mit Hilfe eines Mikroloaders mit derselben Flüssigkeit beladen. Um den Sealing-Prozess zu erleichtern wurde die Pipettenspitze anschließend in Dimethyldichlorsilan (2% in Methylenchlorid) getaucht. Über einen Silberdraht wurde die Glaskapillare dann an der Halterung des Vorverstärkers angebracht, um eine elektrische Verbindung der Pipettenlösung mit dem Vorverstärker zu erhalten. Als Referenzelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht verwendet, der sich in der Messkammer befindet. Vor dem Eintauchen der Elektrode in die Flüssigkeit wurde ein Überdruck von etwa 10 cm H_2O angelegt, um Verunreinigungen im Bereich der Glaspipettenspitze zu vermeiden. Die so vorberteiteten Glaskapillaren wiesen einen Pipettenwiderstand von 3-6 MegaOhm auf. Die entsprechenden Zellen wurden unter Betrachtung mit dem LD-Objektiv ausgewählt. Unter Zuhilfenahme des Mikromanipulators (Eppendorf) wurde die Glaspipettenspitze an die Zelle herangeführt. Ein Testpuls in Form einer Rechteckspannung diente der Bestimmung des Pipettenwiderstandes. Nachdem sich der Pipettenwiderstand nach Annäherung an die Zelle um etwa ein Viertel vergrößert hatte, wurde der Überdruck zurückgenommen, und es wurde ein Unterdruck erzeugt wodurch sich die Spitze der Pipette an die Zelle saugte. Auf diese Weise wurde bei fast jeder Zelle ein Giga-Seal erreicht. Anschließend wurde die Zellmembran mit kurzen Stromstößen aufgebrochen, wodurch die Whole-Cell Konfiguration entstand. Diese Konfiguration wurde bei allen Experimente verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde ein Membranpotential von -80 mV verwendet.

2.4 Datenauswertung

2.4.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurve

Um den Zusammenhang zwischen dem Agonisten oder dem Antagonisten und der Wirkung auf die Ionenströme der Membran zu untersuchen, wurde die Konzentrations-Wirkungs-Kurve angefertigt. Hierzu werden bei unterschiedlichen Konzentrationen die Amplituden der induzierten Ströme bestimmt und die Werte durch eine logistische Funktion der folgenden Form angenähert:

$$I = I_{Max} \cdot \frac{[A]^n}{EC_{50}^n + [A]^n} \quad (1)$$

I_{Max} bezeichnet den maximal induzierbaren Strom, [A] die verwendete Agonisten- bzw. Antagonistenkonzentration und n den Hillkoeffizienten als Maß der Kurvensteigung. EC_{50} ist bei einer Agonisten-Konzentrations-Wirkungs-Kurve die Konzentration, bei der 50% des maximalen Stromes erreicht wird. Um die Messungen von Zellen mit verschiedenen absoluten Amplituden vergleichen zu können, werden die Ströme I und I_{Max} auf den bei einer sättigenden Konzentration gemessenen maximalen Strom normiert. Zur Bestimmung der gesuchten Parameter I_{Max}, EC_{50} und n stand das Programm SigmaPlot zur Verfügung. Bei der Konzentrations-Wirkungs-Kurve eines Antagonisten, die auch als Hemmkurve bezeichnet und bei einer konstanten Agonistenkonzentration gemessen wird, kann entsprechend dem Parameter EC_{50} in Gl. (1) ein IC_{50}-Wert ermittelt werden. Die Steigung n der Kurve ist in diesem Fall negativ. Die Hemmkurve bezieht sich auf einen Strom, der durch eine konstante Agonistenkonzentration hervorgerufen wird.

2.4.2 Statistik

Zusätzlich zu den genannten Methoden wurde zur Auswertung der Ergebnisse bezüglich Wirkung und Selektivität der verwendeten Substanzen, das arithmetische Mittel berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Verwendete Zellsysteme

Im Rahmen der Untersuchung zur Wirkung von Cyclothiazid (CTZ) an $P2X_7$ Rezeptoren wurden verschiedene Zellsysteme verwendet. Zuerst wurden die $P2X_7$ Rezeptoren auf humanen dendritischen Zellen charakterisiert, bei denen die hemmende Wirkung von Cyclothiazid innerhalb eines Screenings aufgefallen war. Daneben wurden auch Experimente mit Zellen durchgeführt, die mit $P2X_7$ Rezeptoren von Mensch ($hP2X_7$) und Ratte ($rP2X_7$) transfiziert wurden.

3.2 Untersuchungsmethoden

Alle Untersuchungen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durchgeführt, bei der Signalform und Größe der durch ATP ausgelösten Ionenströme detektiert wurden. Wenn nicht anders vermerkt, wurde ATP in einer Konzentration von 1 mM und ein Haltepotential von -80 mV verwendet.

3.3 Charakterisierung des $P2X_7$ Rezeptors an humanen dendritischen Zellen

3.3.1 Selektive Aktivierung des $P2X_7$ Rezeptors

Dendritische Zellen exprimieren nicht nur den $P2X_7$ Rezeptor, sondern auch andere purinerge Rezeptoren. Daher mussten in einem ersten Schritt Bedingungen gefunden werden, die eine selektive Aktivierung des $P2X_7R$ erlaubten.

In Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass bei der jeweils ersten ATP-Applikation (1mM) ein desensitivierendes Signal auftrat, das auch durch eine niedrige ATP-Konzentration aktiviert werden konnte. Bei wiederholten ATP-Applikationen traten nur noch nicht-desensitiviernde Signale auf. Die desensitivierenden Signale können von den $P2X_1$- oder $P2X_3$ Rezeptoren stammen, die bei weniger als 30 µM ATP aktiviert werden. Durch wiederholte ATP-Applikation, die zu Beginn jeder Messung erfolgte, wurden diese P2X Rezeptoren inaktiviert, so dass die desensitivierenden Signale nicht mehr auftraten. In anschließenden Experimenten waren durch wiederholte Vorstimulation selbst bei 100 µM ATP keine Signale mehr vorhanden (vgl. Abb.6). Durch die wiederholte ATP-Applikation war es somit möglich, selektiv den $P2X_7$ Rezeptor zu messen.

3.3.2 Veränderung der Signalamplitude

Nicht nur die Signalform, sondern auch die Signalamplitude ändert sich bei repetitiver Stimulation mit ATP. Am häufigsten stieg die Signalamplitude zu Beginn an, und nach einigen weiteren Applikationen blieb die Signalamplitude konstant (Abb.4).

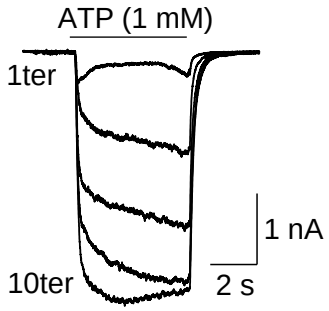


Abb. 4: Anstieg der Signalamplitude nach repetitiver ATP-Stimulation.
Beispielmessung von 10 aufeinanderfolgenden ATP-Applikationen an einer humanen dendritischen Zelle. Für die Applikationen wurde 1 mM ATP (Adenosintriphosphat) verwendet.

Ähnlich häufig fiel die Signalamplitude nach dem anfänglichen Anstieg ab und glich sich danach einem Plateauniveau an (Abb.6). In seltenen Fällen erreichten die Signalamplituden kein Plateau und wurden nach dem Anstieg konstant kleiner. Aus diesem Grund wurde vor jeder Messung die Zelle soweit stimuliert, bis die Signale konstant blieben (Abb.5). Konnte keine Plateauphase durch diese Vorstimulation erreicht werden, wurde die Zelle verworfen.

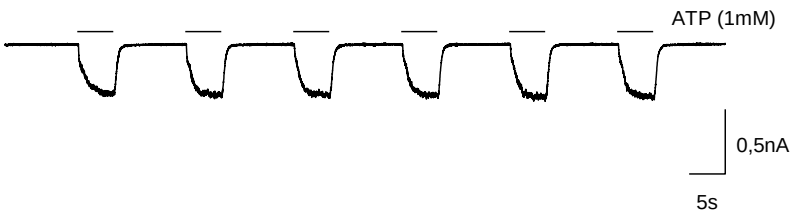


Abb. 5: Repetitive Stimulation einer dendritischen Zelle mit ATP. Beispiel für eine konstante Signalamplitude bei wiederholter ATP-Applikation. Die Zugabedauer von 1 mM ATP (Adenosintriphosphat) ist durch schwarze Striche gekennzeichnet.

3.3.3 Veränderung der Membrankapazität

In vorangegangenen Experimenten zeigte sich häufig, dass während der wiederholten ATP-Applikation die Membrankapazität abnahm. Da bei vielen Zellen die Signalamplitude unter repetitiver Gabe von ATP wieder abnahm, wurde im Folgenden untersucht, ob die Abnahme der Stromamplitude durch die Verringerung der Oberfläche der Zellmembran zustande kam. Dazu wurde bei humanen dendritischen Zellen während 30 aufeinander folgenden ATP-Applikationen sowohl die Signalamplitude als auch die Membrankapazität bestimmt (Abb. 6). Abbildung 6 zeigt eine häufige Beispielmessung, bei der die Signalamplitude anfangs zunimmt und dann wieder auf ein Plateau abnimmt. Die Membrankapazität wird sofort nach Beginn der Applikationen kleiner und erreicht im Laufe der Messungen ein konstantes Niveau (Abb.6).

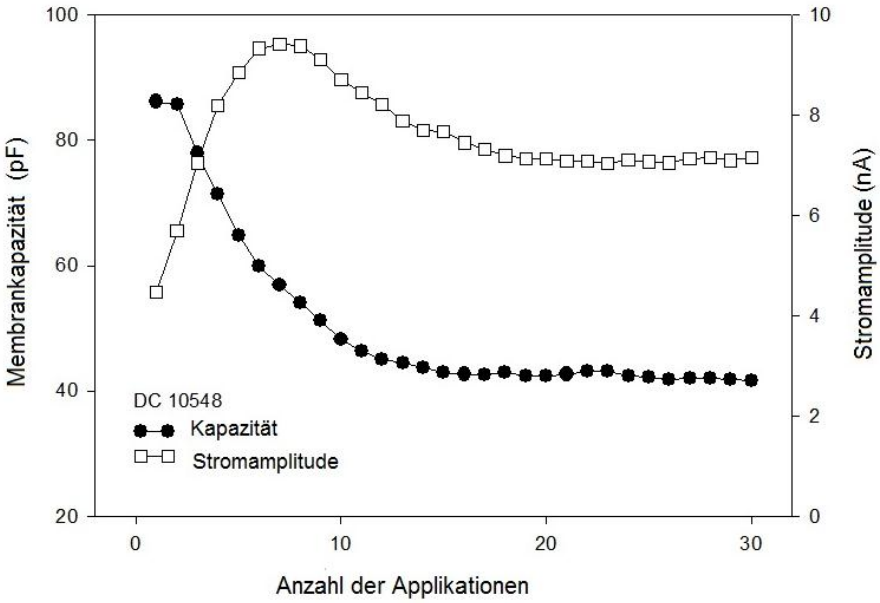


Abb. 6: Veränderung der Signalamplitude und Membrankapazität bei repetitiver ATP-Applikation an humanen dendritischen Zellen. Die weißen Quadrate zeigen die Veränderungen der Signalamplitude bei 30 aufeinanderfolgenden Stimulationen mit 1 mM ATP (Adenosintriphosphat). Die schwarzen Kreise stellen den Verlauf der Membrankapazität dar, die parallel zu den Stromamplituden gemessen wurde.

Insgesamt scheint es keinen Zusammenhang zu geben, da die Stromamplitude und die Membrankapazität zu Beginn in entgegengesetzter Richtung verlaufen und erst im weiteren Verlauf einen einheitlichen Trend fortsetzen. Dass die Signalamplitude unabhängig von der Membrankapazität abnimmt, bestätigte sich in weiteren Messungen, bei denen die Stromamplitude kleiner wurde, obwohl die Membrankapazität nicht bzw. nur sehr wenig abgenommen hatte.

3.3.4 Bestimmung der EC_{50} für ATP bei humanen dendritischen Zellen

Im folgenden Experiment war die Fragestellung, in welchem Konzentrationsbereich von ATP die halbmaximale Aktivierung (EC_{50}) der P2X7 Rezeptoren liegt. Ein weiteres Ziel dieses Experimentes war es, einen Orientierungswert für die Stimulation der Zellen zu erhalten, um daran die hemmende Wirkung des Cyclothiazids messen zu können. Für den humanen $P2X_7$ Rezeptor ist es typisch, dass ATP Konzentrationen von mehr als 100 µM benötigt werden, um messbare Einwärtsströme zu erzeugen. Daher wurde ATP in Konzentrationen von 0,1, 0,3, 1, 3, 10 mM verwendet. In Abständen von 10 Sekunden wurde aufsteigend 0,1 -10 mM ATP appliziert (Abb.7). Wenn nicht anders beschrieben, wurde nach jeder Applikation einer Substanz mit extrazellulärer Lösung (E13) gespült.

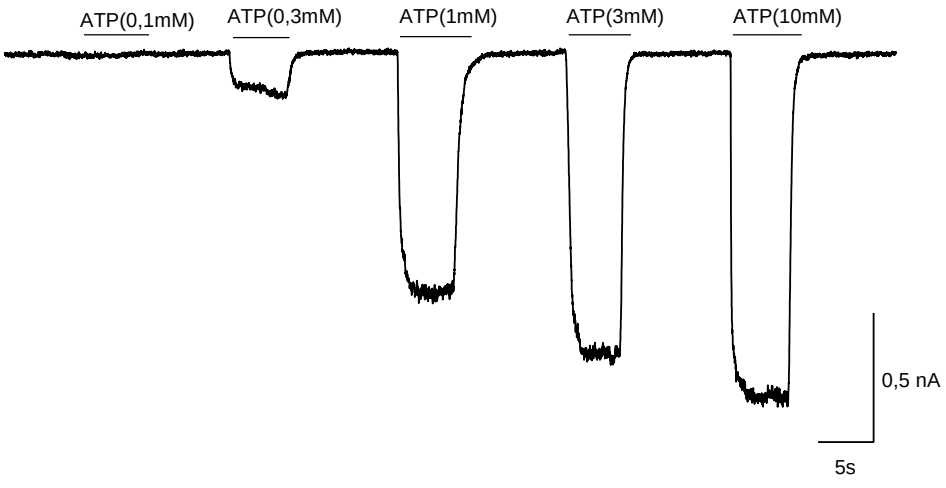


Abb. 7: ATP-Konzentrationsreihe bei einer humanen dendritischen Zelle. Typische Messreihe, bei der ATP (Adenosintriphosphat) als stimulierende Substanz, aufsteigend in Konzentrationen von 0,1 – 10 mM an eine humane dendritische Zelle appliziert wurde. Die jeweiligen Applikationen durch ATP (5s) werden anhand von Balken symbolisiert.

Für die Auswertung wurden die einzelnen Signalamplituden jeweils am Ende der ATP-Applikation gemessen. Anschließend wurden die Werte normiert und mit Hilfe der Hill-Gleichung angeglichen. Dabei wurden die höchsten Werte, die bei 10 mM gemessen wurden, als 1 gesetzt. Diese Ergebnisse wurden als Konzentrations-Wirkungs-Kurve dargestellt, bei der gleichzeitig die halbmaximale Aktivierungs-konzentration (EC_{50}) für ATP berechnet wurde. Für die humanen dendritischen Zellen wurde eine EC_{50} von 1,01 ± 0,21 mM ATP ermittelt (Abb.8).

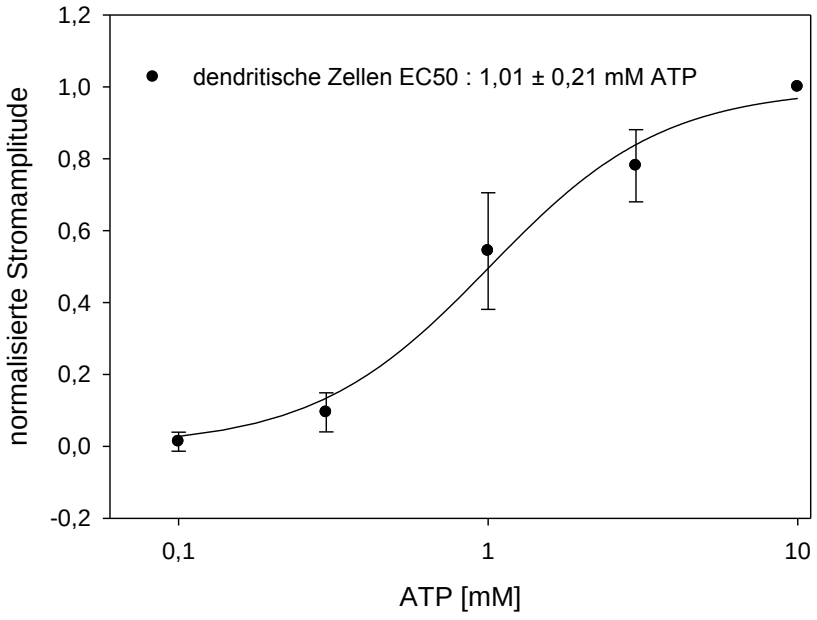


Abb. 8: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von ATP an humanen dendritischen Zellen. Der jeweils höchste Wert in einer Messreihe war bei 10 mM und wurde als 1 gesetzt. An diesen Wert wurden die restlichen Ergebnisse der jeweiligen Messreihe normiert.

3.3.5 Hemmwirkung von CTZ an humanen dendritischen $P2X_7$ Rezeptoren

Für das Experiment wurden 1 mM ATP verwendet, das in etwa der halbmaximalen Aktivierungskonzentration entspricht und ausreichend große Signale generiert. Zu Beginn wurde als Kontrollwert 1 mM ATP gegeben. Nach 5 Sekunden wurde zusätzlich für 10 Sekunden Cyclothiazid appliziert (Abb.9), woraufhin die Signalamplitude zeitabhängig abnahm und dann einen Plateauwert erreichte. Nach kurzzeitiger Applikation von Kontrolllösung zeigte die darauffolgende Messung mit 1mM ATP eine nahezu identische Signalamplitude. Die Hemmwirkung von Cyclothiazid ist somit schnell und vollständig reversibel (Abb.9). Dieser Versuchsaufbau wurde für Cyclothiazid in den Konzentrationen von 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 und 300 µM verwendet.

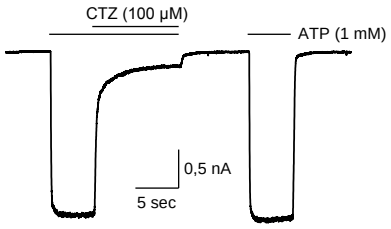


Abb. 9: Hemmung von ATP induzierten Strömen durch CTZ an einer humanen dendritischen Zelle. Die Applikation von 100 µM CTZ (Cyclothiazid) und 1 mM ATP (Adenosintriphosphat) werden durch schwarze Striche dargestellt.

Für die Bestimmung der Hemmwirkung wurde die Signalamplitude am Ende der Co-applikation von ATP und Cyclothiazid in Relation zur vorausgehenden Kontrolle (= 100%) gesetzt (Abb.9). Aus den Messungen mit aufsteigenden Cyclothiazidkonzentrationen kann man dann korrespondierend zur EC_{50} von ATP eine halbmaximal inhibierende Konzentration für Cyclothiazid bestimmen, die IC_{50}. Für die humanen dendritischen Zellen wurde eine halbmaximal inhibierende Konzentration von 13,6 ± 1,4 µM Cyclothiazid ermittelt (Abb.10).

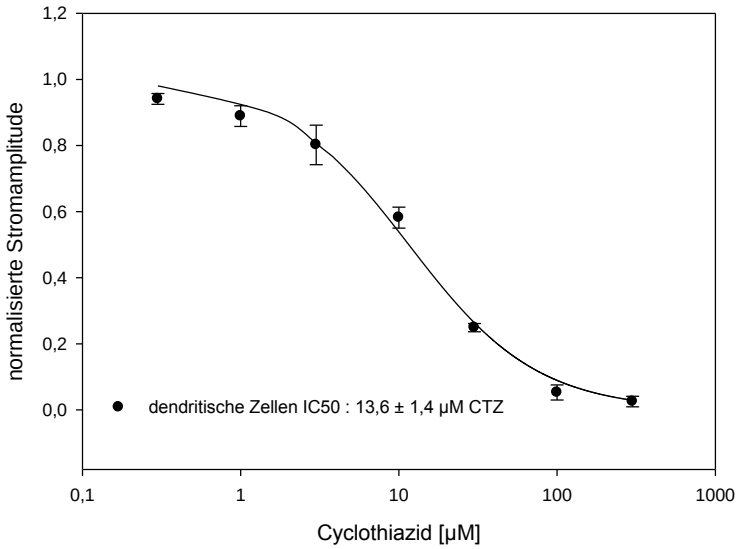


Abb. 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Cyclothiazid (CTZ) an humanen dendritischen Zellen. Für die Bestimmung der IC_{50} (halbmaximal inhibierende Konzentration) wurde 1 mM ATP (Adenosintriphosphat) verwendet. Wie bei der EC_{50} (halbmaximale Aktivierungskonzentration) wurden auch hier die Messungen der Signalamplituden normiert. Die maximale Signalamplitude entspricht dem Wert 1.

3.4 Untersuchungen an klonierten $P2X_7$ Rezeptoren

Da eine genauere Charakterisierung der Wirkung von Cyclothiazid auf den $P2X_7$ Rezeptor nur möglich ist, wenn man die Aktivität des Rezeptors isoliert betrachten kann, wurden auch Experimente an klonierten $P2X_7$ Rezeptoren von Mensch ($hP2X_7$) und Ratte ($rP2X_7$) durchgeführt. Ein entscheidender Unterschied ist, dass im Vergleich zu den humanen dendritischen Zellen bei den Transfizierten ausschließlich $P2X_7$ Rezeptoren in die Zellmembran eingebaut sind.

3.4.1 Bestimmung der EC_{50} für ATP bei den $hP2X_7$ und $rP2X_7$ Rezeptoren

Wie bei den human dendritischen Zellen, wurden die transfizierten Zellen zuerst mit aufsteigenden Konzentrationen von ATP stimuliert. Da die $rP2X_7$ Rezeptoren sensitiver auf ATP Stimulationen reagierten, wurden hier Konzentrationen auch unterhalb von 100 µM verwendet. Die niedrigste Konzentration war 30 µM ATP bei den klonierten $rP2X_7$ und 100 µM ATP bei den humanen Rezeptoren. Der Ablauf des Experimentes war wie bei den human dendritischen Zellen. Die Auswertung der Messungen ergab eine EC_{50} von 125,4 ± 60 µM ATP bei den $rP2X_7$ Rezeptoren und 925 ± 280 µM ATP bei den $hP2X_7$ Rezeptoren (Abb.11). Die Messungen zeigen, dass $rP2X_7$ Rezeptoren eine circa 10-fach höhere Affinität für ATP haben als die humanen $P2X_7$ Rezeptoren.

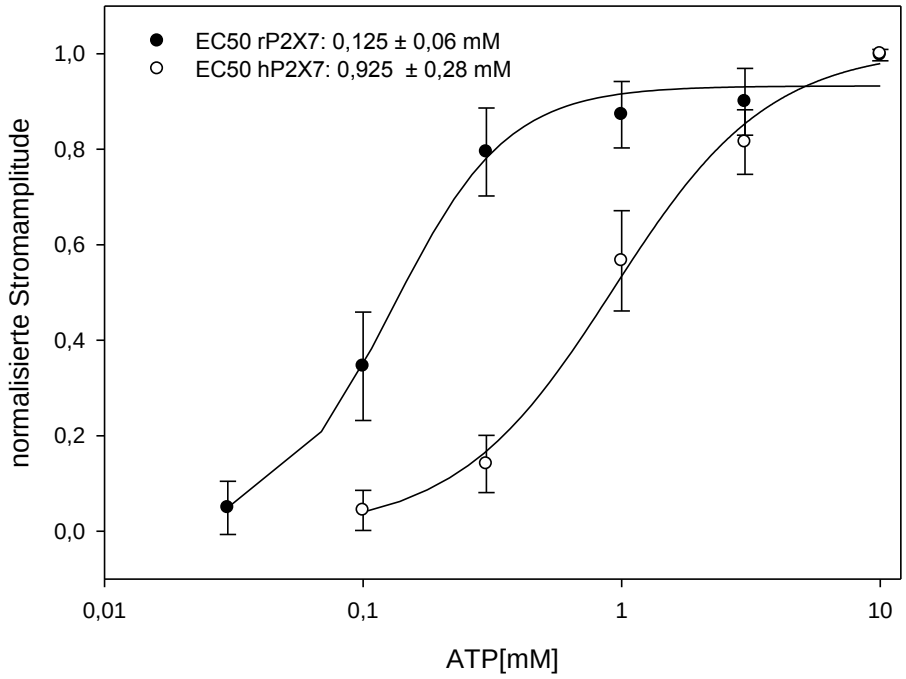


Abb. 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von ATP an klonierten $hP2X_7$ und $rP2X_7$ Rezeptoren. Die schwarzen Kreise zeigen die Werte der $rP2X_7$ ($P2X_7$ der Ratten) und die weißen die der $hP2X_7$ (humane $P2X_7$) Rezeptoren. Die Messwerte von 10 mM wurden in beiden Kurven auf den Wert 1 normiert.

3.4.2 Bestimmung der IC_{50} für CTZ bei $hP2X_7$ und $rP2X_7$ Rezeptoren

Genau wie bei den humanen dendritischen Zellen wurde nach der Bestimmung der EC_{50} eine ATP-Konzentration ausgewählt, die ausreichend große Signalamplituden generierte, um die hemmende Wirkung des Cyclothiazids gut erfassen zu können. Bei beiden $P2X_7$ Rezeptoren wurde 1 mM ATP als Stimulation verwendet. Der Versuchsablauf ist der gleiche wie bei den humanen dendritischen Zellen. Auch hier wurden Cyclothiazid-Konzentrationen von 0,3 bis 300 µM verwendet.

Die hemmende Wirkung des Cyclothiazids wurde für beide $P2X_7$ Rezeptoren wie bei den humanen dendritischen Zellen ermittelt, indem die Signalamplitude der ATP-Stimulation mit der darauffolgenden Co-applikation von Cyclothiazid verglichen wurde. Diese Ergebnisse wurden normiert und als Konzentrations-Wirkungs-Kurve dargestellt (Abb.12). Daraus ergab sich eine halbmaximal inhibierende Konzentration von 16,1 ± 1,7 µM für die humanen und 123,1 ± 7,7 µM Cyclothiazid für die $rP2X_7$ Rezeptoren.

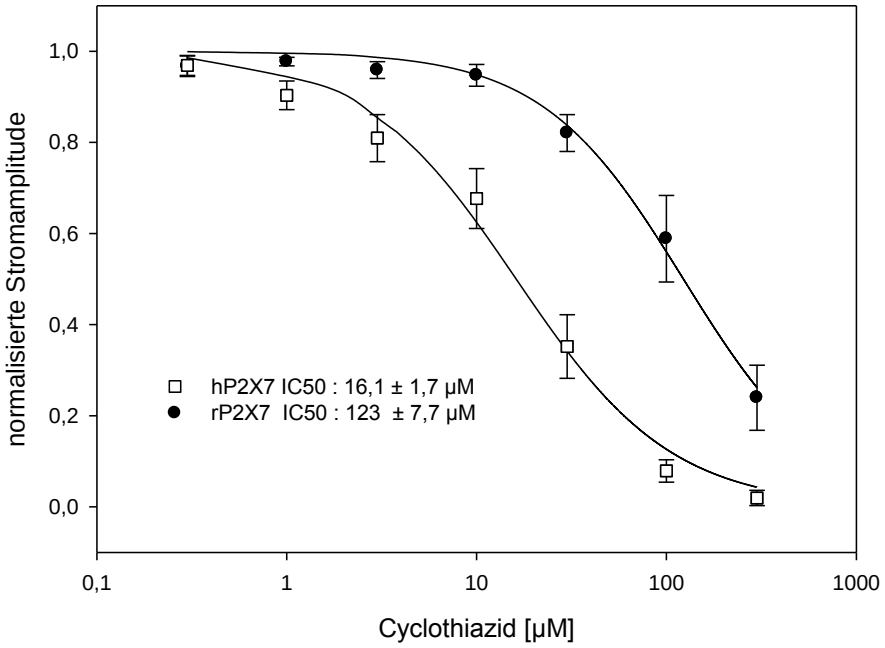


Abb. 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für CTZ bei den $P2X_7$ Rezeptoren von Ratte und Mensch. Die schwarzen Kreise zeigen die Werte der $rP2X_7$ ($P2X_7$ der Ratten) und die weißen Quadrate die der $hP2X_7$ (humane $P2X_7$) Rezeptoren. Die normierten Signalamplituden wurden prozentual dargestellt.

Anhand dieser Daten lässt sich eine ungefähr gleiche Sensitivität der nativen dendritischen Zellen (13,6 ± 1,4µM CTZ) und der $hP2X_7$ Rezeptoren ableiten. Die $rP2X_7$ Rezeptoren haben hingegen eine in etwa 10-fach niedrigere Sensitivität für Cyclothiazid. Wie auch bei den human dendritischen Zellen, ist die Hemmung durch Cyclothiazid vollständig reversibel.

3.4.3 Cyclothiazidhemmung in Abhängigkeit divalenter Kationen

Diverse Studien mit dem $P2X_7$ Rezeptor zeigten, dass die Signalgröße von der Konzentration divalenter Kationen abhängt. Große Signale entstehen, wenn die Messungen in Ca^{2+}- und Mg^{2+}-reduzierten Lösungen durchgeführt werden. Diese Lösungen werden normalerweise bei Experimenten mit dem $P2X_7$ Rezeptor verwendet. So wurden in allen bisherigen Messungen -wie angegeben- solche Kationenverhältnisse verwendet. Da nicht nur die Signalamplitude, sondern auch die Hemmwirkung von $P2X_7$-Antagonisten wie Suramin und PPADS durch die divalente Kationenkonzentrationen verändert kann, wurde in den folgenden

Experimenten untersucht, ob Änderungen der Kationenverhältnisse ebenfalls Auswirkungen auf die Hemmung von Cyclothiazid haben. Zu Beginn wurde die EC_{50} für ATP neu bestimmt, da sie bekanntermaßen bei höheren divalenten Kationenkonzentrationen ansteigt. So zeigte sich auch hier eine Erhöhung der EC_{50} bei den Messungen mit dem $rP2X_7$ von 0,125 ± 0,06 mM ATP in niedrigen (Abb.11), auf 1,87 ± 0,035 mM ATP in normalen Kationenverhältnissen (Abb.13B). Die Versuche mit dem $hP2X_7$ Rezeptor zeigten ebenfalls ein Anstieg der EC_{50} von 0,925 ± 0,28 mM ATP in reduzierter (Abb.11), auf 4,27 ± 0,27 mM ATP in normalen Kationenkonzentrationen (Abb.13A).

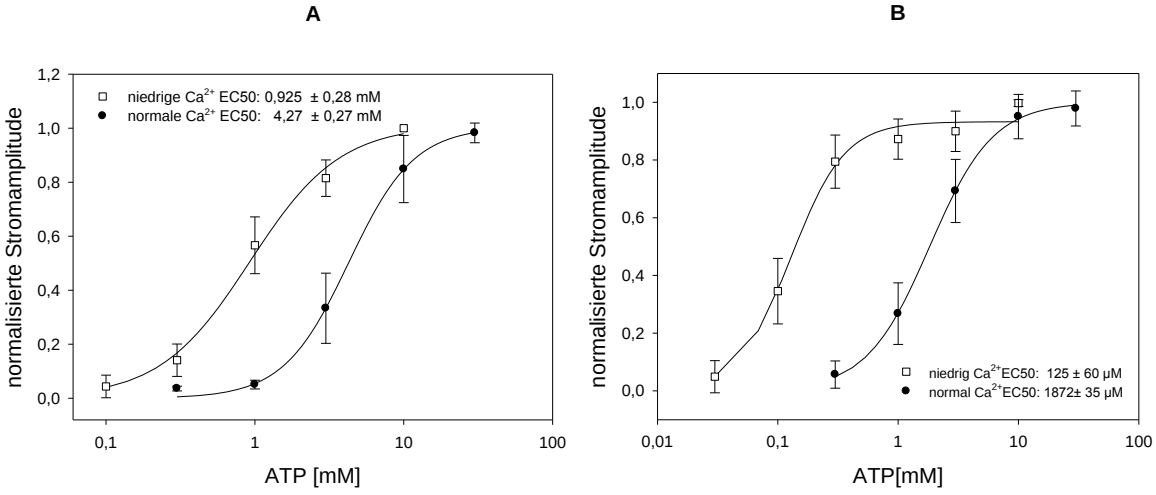


Abb. 13: Dosis-Wirkungs-Kurven von ATP bei niedriger normaler und divalenter Kationenkonzentration. Bei A wurden die humanen- und bei B die $rP2X_7$ ($P2X_7$ der Ratten) Rezeptoren verwendet. Die weißen Quadrate stellen die Werte für die Experimente in niedriger Kationenkonzentration dar, während die schwarzen Kreise die Werte für normale Kationenkonzentrationen abbilden.

Um ausreichend große Signalamplituden zu erhalten, wurden für die Bestimmung der IC_{50}, ATP-Konzentrationen verwendet, die in etwa der doppelten EC_{50} bei normaler Kationenkonzentration entsprachen. Dementsprechend wurden beim $hP2X_7$ und $rP2X_7$ Rezeptor 10 beziehungsweise 3 mM ATP verwendet. Bei den $rP2X_7$ Rezeptor ergab sich eine IC_{50} von 54,62 ± 5,164 µM Cyclothiazid in physiologischer Kationenkonzentration. Aus den Messungen mit dem $hP2X_7$ resultierte eine IC_{50} von 21,2 ± 1,19 µM Cyclothiazid.

3.5 Charakterisierung der Cyclothiazidhemmung

3.5.1 Cyclothiazidhemmung nach wiederholten ATP- und CTZ- Applikationen

In vorherigen Experimenten wurde des Öfteren beobachtet, dass nach längerer Behandlung einer Zelle die Hemmwirkung des Cyclothiazid abnahm. Um diese Beobachtung näher charakterisieren zu können, wurde ein Experiment gestaltet, bei dem die Auswirkung wiederholter ATP- und Cyclothiazid-Applikation auf die hemmende Wirkung von Cyclothiazid untersucht wurde. Der Versuchsablauf wurde wie in Abbildung 14 durchgeführt. Bei dem $hP2X_7$ Rezeptor wurden 1 mM ATP mit 20 µM Cyclothiazid und bei den $rP2X_7$ Rezeptoren 0,5 mM ATP und 120 µM Cyclothiazid verwendet.

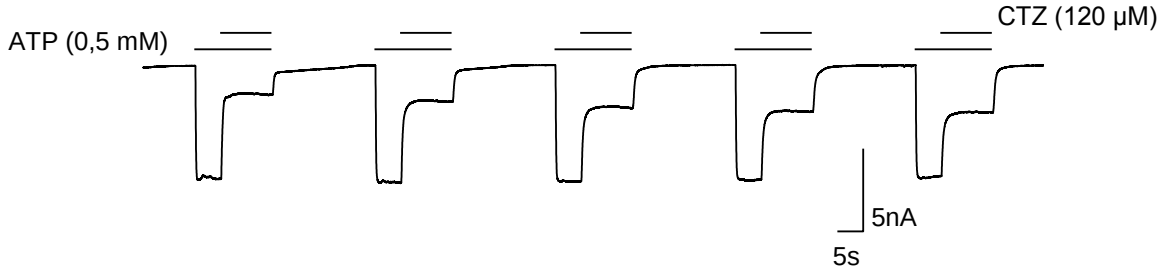


Abb. 14: Veränderung der CTZ-Hemmung nach wiederholten Applikationen. Exemplarische Messung an dem $rP2X_7$ Rezeptor. Die Applikation von 0,5 mM ATP (Adenosintriphosphat) wird durch die unteren Balken, die Applikation von 120 µM Cyclothiazid (CTZ) durch die oberen symbolisiert.

Bei den rP2X$_7$ Rezeptoren ergab sich zwischen der ersten und fünften Messung eine Abnahme der Hemmung um 30%. Die Hemmung des hP2X$_7$ nahm um 5.5% ab (Abb.15).

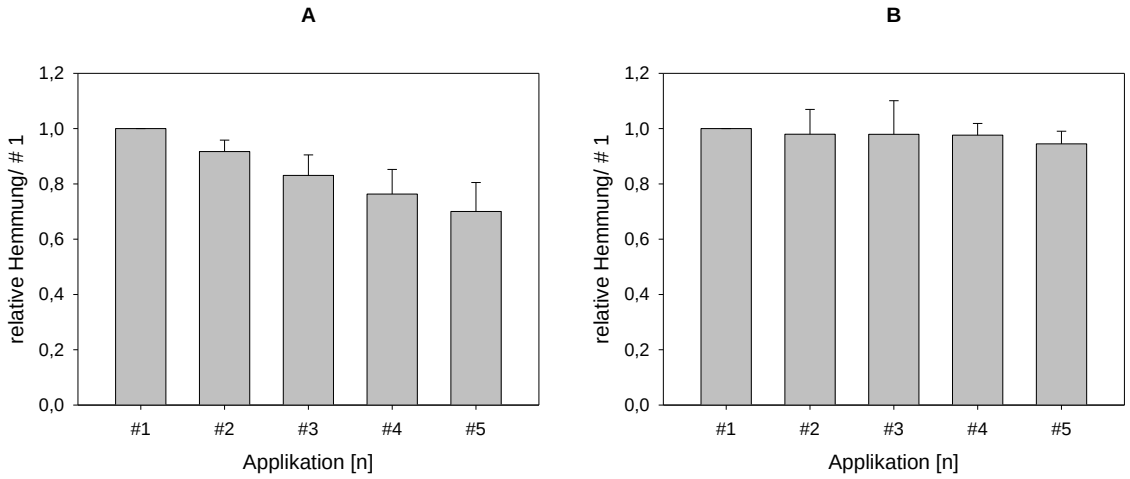


Abb. 15: Hemmung durch Cyclothiazid nach wiederholter CTZ- und ATP-Applikation. A zeigt die Ergebnisse für den rP2X$_7$ (P2X$_7$ der Ratten) und B die für den hP2X$_7$ (humaner P2X$_7$) Rezeptor. Der Wert 1 gibt die Hemmung bei der ersten Applikation an. Darauffolgende Messungen wurden im Verhältnis zu diesem Wert normiert. Bei dem hP2X$_7$ Rezeptor wurden 1 mM ATP (Adenosintriphosphat) mit 20 µM Cyclothiazid und bei den rP2X$_7$ Rezeptoren 0,5 mM ATP und 120 µM Cyclothiazid verwendet.

3.5.2 Hemmwirkung von CTZ bei unterschiedlichem Membranpotential

In allen bisherigen Experimenten wurde das Membranpotential konstant bei -80 mV gehalten. Da Studien über Antagonisten des P2X$_7$ Rezeptors eine Abhängigkeit ihrer Wirkung vom Membranpotential zeigten, wurde im Folgenden untersucht, ob die hemmende Wirkung von Cyclothiazid ebenfalls vom Membranpotential abhängig ist. Für die Messungen an den hP2X$_7$ und rP2X$_7$ Rezeptoren wurden Membranpotentiale im Bereich von -80 mV bis +40 mV in 20 mV Abständen untersucht, wobei die Reihenfolge der einzelnen Membranpotentiale zufällig gewählt wurde. da bei einem Membranpotential von 0 mV keine Ionenströme messbar sind, wurde dieser Wert nicht in die Experimente aufgenommen. Um einen Drift der Signalamplituden abschätzen zu können, wurde zu Beginn und am Ende jeder Messreihe beim Potentialwert von -80 mV getestet.

Die Messung verlief wie in Abbildung 16 dargestellt und wurde bei sämtlichen Membranpotentialen angewendet. Für die $hP2X_7$ Rezeptoren wurden 20µM Cyclothiazid und 1mM ATP verwendet und für den rP2X7 120µM Cyclothiazid und 0,5mM ATP.

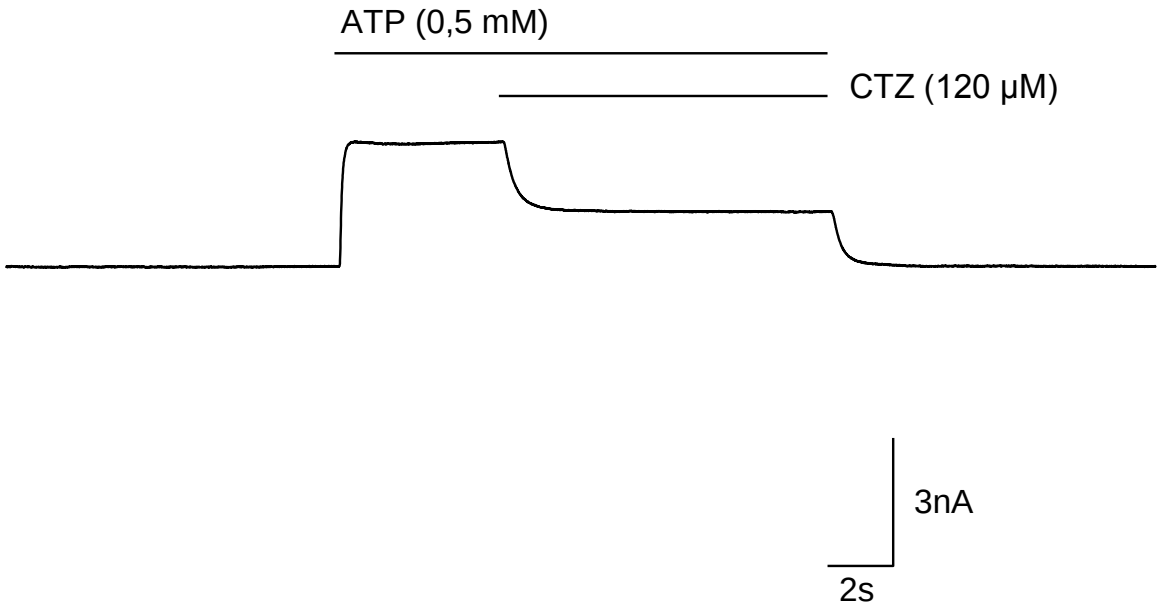


Abb. 16: Messablauf zur Untersuchung der potentialabhängigen Hemmung von P2X7 Rezeptoren durch Cyclothiazid. Beispielmessung am $rP2X_7$ ($P2X_7$ der Ratten) Rezeptor bei +40 mV. Es wurden 0,5 mM ATP (Adenosintriphosphat) und 120 µM Cyclothiazid (CTZ) verwendet. Anm. Da hier ein positives Membranpotential verwendet wurde, resultierten unter den gewählten Bedingungen Auswärtsströme, die per Definition mit positiven Ausschlägen dargestellt werden.

Die Veränderung des Membranpotentials hat keine Auswirkungen auf die Hemmung des $hP2X_7$ durch Cyclothiazid (Abb.17A). Beim $rP2X_7$ nimmt die Hemmwirkung mit positiv werdendem Potential ab. Da dies dem allgemeinen Trend folgt (vgl. erste und letzte Messung bei -80 mV), ist die Abnahme insgesamt gering (Abb.17B).

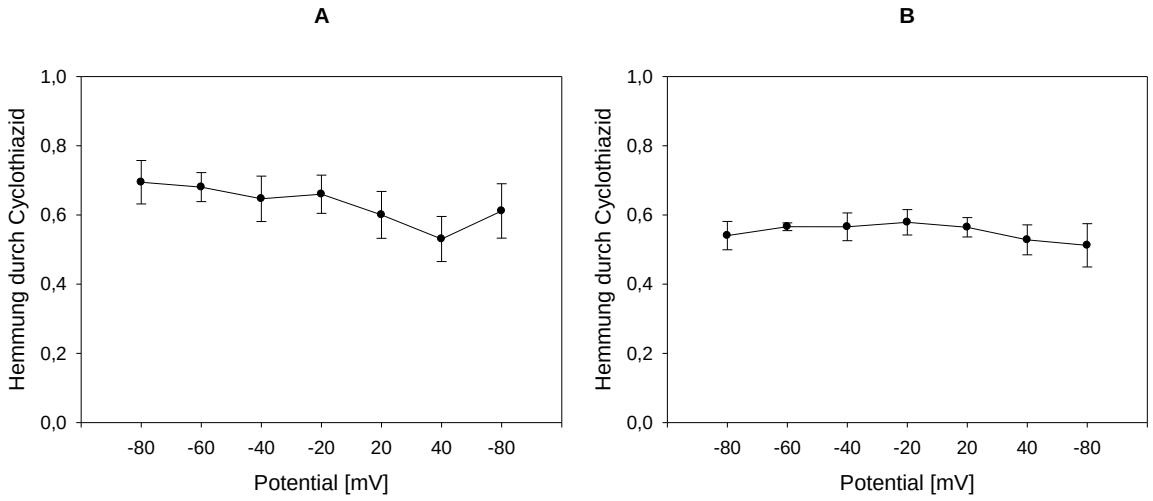


Abb. 17: Hemmungwirkung von CTZ bei verschiedenen Membranpotentialen. Abbildung 17A zeigt den $rP2X_7$ ($P2X_7$ der Ratten) und 17B den $hP2X_7$ (humaner $P2X_7$) Rezeptor. Die Werte für die Hemmung durch Cyclothiazid wurden normiert, wobei der Wert 1 eine vollständige und 0 keine Hemmung bezeichnet. Da -80 mV jeweils zu Beginn und am Ende des Experiments gemessen wurde, wurden diese beiden Werte auch in der Abbildung als erster und letzter Wert dargestellt, um den Trend zu verdeutlichen.

3.5.3 Untersuchung zum Hemmungsmechanismus von CTZ

In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Hemmung durch Cyclothiazid kompetitiv oder nicht kompetitiv ist. Dazu wurden ATP-Konzentrationen von 0,03 bis 10 mM und Cyclothiazid bei der jeweiligen halbmaximal inhibierenden Konzentration verwendet. Beim $rP2X_7$ wurde dementsprechend 120 µM CTZ und beim $hP2X_7$ 15 µM verwendet. Der Versuchsaufbau für sämtliche Konzentrationen wird in Abbildung 18 dargestellt. Die Reihenfolge der einzelnen Applikationen wurde wie bei der Potentialmessung zufällig gewählt.

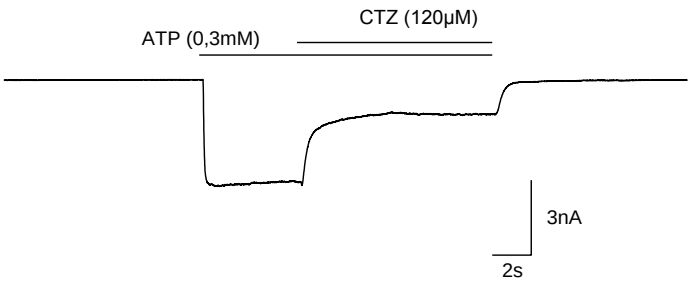


Abb. 18: Hemmung durch CTZ bei Stimulation mit ATP. Beispielmessung am $rP2X_7$ ($P2X_7$ der Ratten) Rezeptor. Die obere Linie zeigt den Bereich, in dem 120 µM Cyclothiazid (CTZ) gegeben wurde, und die untere beschreibt die Applikation von 0,3 mM ATP (Adenosintriphosphat).

Die Auswertung der Messungen ergab eine halbmaximale Aktivierungskonzentration von 1218 ± 73 µM für den $hP2X_7$ Rezeptor (Abb.19). Dieser Wert ist nicht signifikant höher als der in Abwesenheit von Cyclothiazid (925 ± 280 µM ATP) und deutet daher auf einen nicht kompetitiven Mechanismus. Bei dem $rP2X_7$ Rezeptor hingegen hat sich ein Wert von 533 ± 140 µM ATP ergeben (Abb.19). Ohne CTZ ergab sich ein viel niedrigerer Wert von nur 125 µM ATP. Daher ist eine kompetitive Hemmung des $rP2X_7$ Rezeptors durch Cyclothiazid wahrscheinlich.

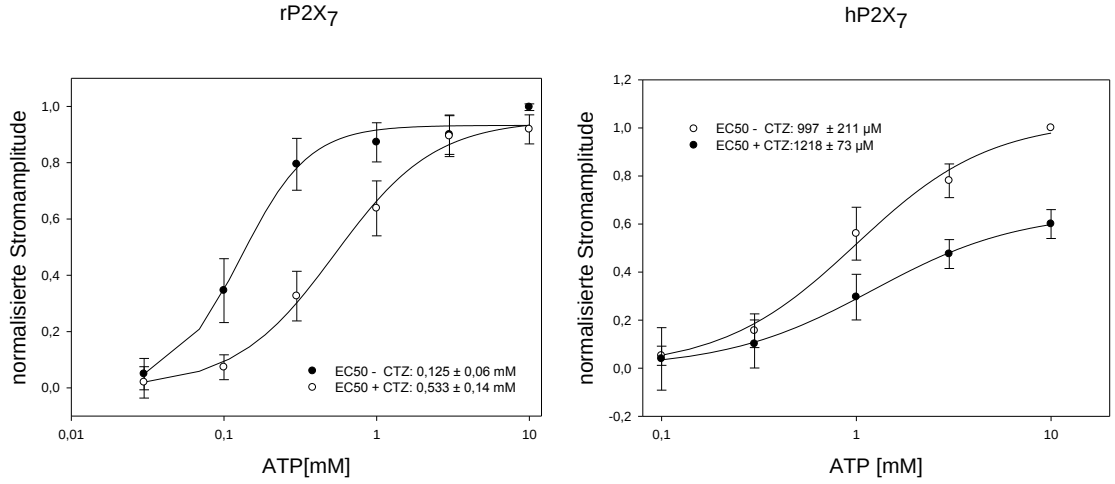


Abb. 19: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von ATP mit- und ohne Applikation von CTZ. Bei der Kurve mit den schwarzen Kreisen wurde nur ATP (Adenosintriphosphat) verwendet und bei der Kurve mit den weißen Kreisen zusätzlich Cyclothiazid (CTZ). Die Werte der Stromamplitude wurden normiert, wobei 1 die größten gemessenen Signalamplituden darstellt.

Bezüglich des Hemmungsmechanismus durch Cyclothiazid scheint sich der humane $P2X_7$ Rezeptor deutlich von dem der Ratte zu unterscheiden. Aufgrund des überraschenden Befundes, dass Cyclothiazid den humanen $P2X_7$ nicht-kompetitiv und den der Ratte kompetitiv blockiert, wurden die Bestimmungen zur IC_{50} für den $rP2X_7$ Rezeptor wiederholt, da mit 1 mM ATP eine stark von der EC_{50} abweichende Aktivatorkonzentration verwendet wurde. Diese Versuche wurden daher mit einer ATP-Konzentration von 125 µM ATP wiederholt, die exakt der EC_{50} des $rP2X_7$ Rezeptors entsprach. Unter diesen Bedingungen resultierte eine halbmaximale Hemmung von 18,7 ± 3,24 µM Cyclothiazid, was die tatsächliche IC_{50} darstellt. Die halbmaximal inhibierende Konzentration beider $P2X_7$ Rezeptoren ist somit gleich, in Bezug auf den Hemmungsmechanismus unterscheiden sie sich jedoch komplett, da der humane $P2X_7$ kompetitiv und der $rP2X_7$ Rezeptor nicht kompetitiv durch CTZ gehemmt wird.

3.6 Untersuchungen zur Selektivität von CTZ

Um die Wirkung des Cyclothiazids weiter abgrenzen zu können, wurde die Wirkung des Cyclothiazids auch an anderen P2X-Rezeptoren untersucht. Für diese Untersuchung standen der humane $P2X_4$ und $P2X_5$ Rezeptor zur Verfügung. Der $hP2X_4R$ wurde mit 20µM und der $hP2X_5R$ mit 10µM ATP stimuliert. An beiden Rezeptoren wurde Cyclothiazid in einer Konzentration von 300 µM getestet. Es ergab sich eine Rest-Rezeptoraktivität von 44,9 ± 9 % für den $hP2X_4$ Rezeptor. Die Werte für den $hP2X_5R$ waren 0,4 ± 0,1 % und 2 ± 1,7 % für den $hP2X_7$ Rezeptor (Abb.20).

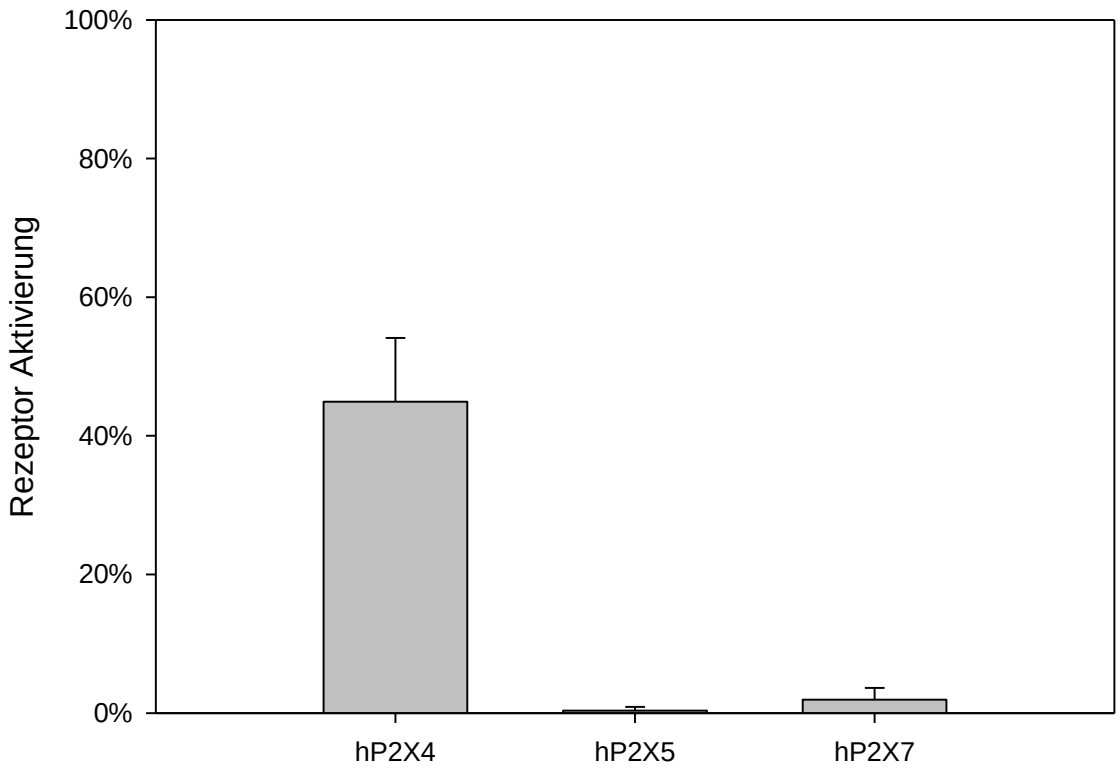


Abb. 20: Cyclothiazidwirkung an diversen humanen P2X-Rezeptoren. Es wurden 20 µM, 10 µM und 1 mM ATP (Adenosintriphosphat) für die $hP2X_4$, $hP2X_5$ und $hP2X_7$ Rezeptoren verwendet. Getestet wurde jeweils 300 µM Cyclothiazid.

3.7 Untersuchung weiterer Substanzen an $P2X_7$ Rezeptoren

Neben dem Cyclothiazid wurden weitere Substanzen, die in ihrer Struktur dem Cyclothiazid sehr ähnlich sind, auf eine hemmende Wirkung des $P2X_7$ Rezeptors von Ratte und Mensch getestet. In den vorherigen Versuchen war die höchste Cyclothiazidkonzentration 300 µM, daher wurden die Substanzen Hydrochlorothiazid. Norbornen und Diazoxid in einer Konzentration von 300 µM und einer ATP-Konzentration von 1 mM untersucht (Abb.21).

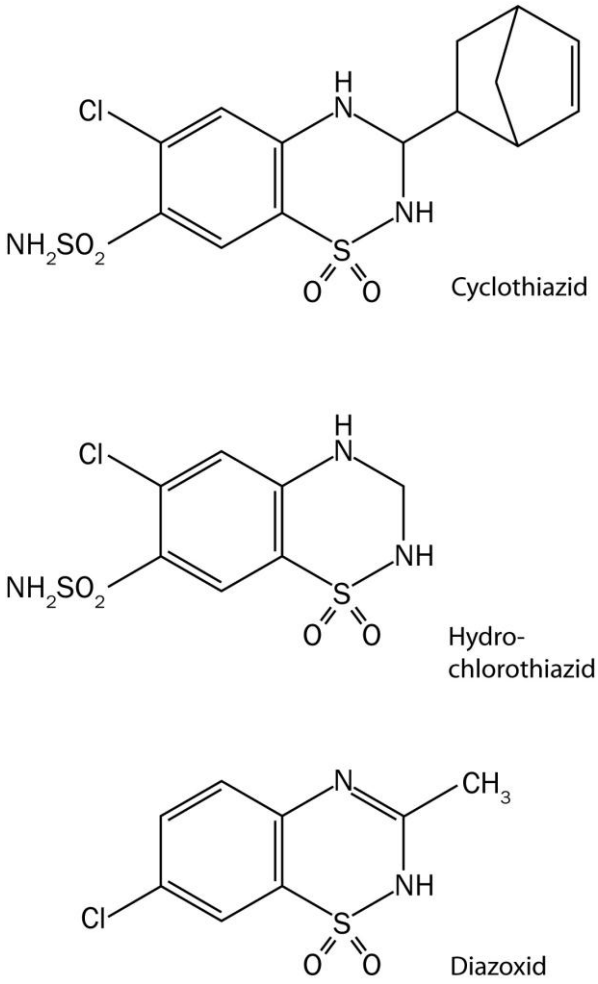


Abb. 21: Strukturformeln von Cyclothiazid, Hydrochlorothiazid und Diazoxid. Es werden die unterschiedlichen Strukturen der getesteten Substanzen im Vergleich zum Cyclothiazid dargestellt.

Zuerst wurde das Hydrochlorothiazid getestet, da es als Medikament schon zugelassen ist (Abb.22). Der Unterschied zum Cyclothiazid besteht darin, dass dem Hydrochlorothiazid der Norbornenrest fehlt. Für den humanen P2X7 Rezeptor ergab sich eine Rest-Rezeptoraktivität von 78,6 ± 4,5 % und für den der Ratte von 92,7 ± 6,2 %. Da die sehr stark verminderte Hemmwirkung durch das Fehlen des Norbornenrestes zustande kam, wurde im Folgenden Norbornen getestet. Auch hier hat sich gezeigt, dass die Rezeptoraktivität nur wenig vermindert war. Unter Norbornen ergab sich eine Rest-Rezeptoraktivität von 80 ± 5,3 % beim $hP2X_7$ und 90 ± 4,3 % beim $rP2X_7$. Schließlich wurde Diazoxid getestet. Ein entscheidender Unterschied zum CTZ ist eine Methyl-Gruppe, die sich anstelle des Norbornenrestes befindet. Unter Diazoxid zeigte sich eine Rest-Rezeptoraktivität von 92 ± 5,4 % für den humanen und 92 ± 11 % für den $P2X_7$ Rezeptor der Ratten.

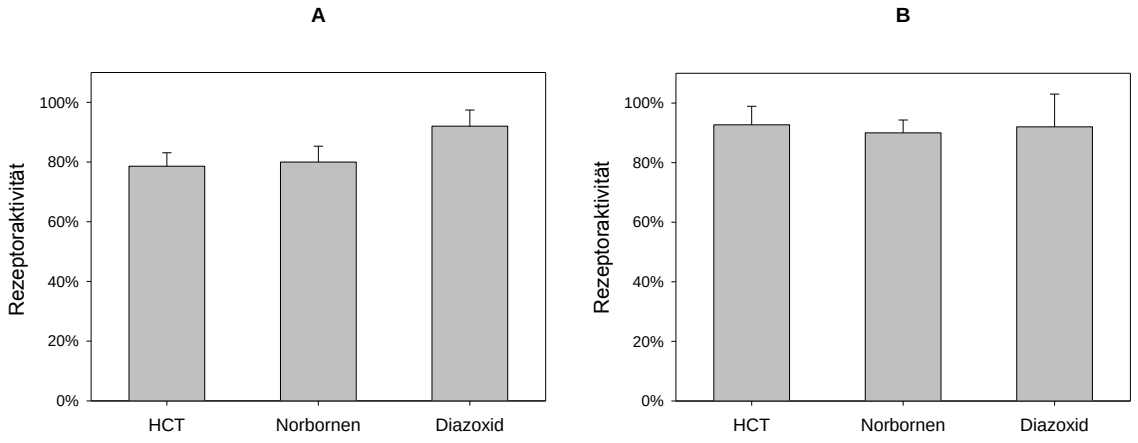


Abb. 22: Wirkung von HCT, Norbornen und Diazoxid auf die P2X7 Rezeptoraktivität. Links wird die Wirkung an humanen P2X7 Rezeptoren und rechts die der Ratten gezeigt. Die Testsubstanzen wurden alle in einer Konzentration von 300 µM und einer ATP (Adenosintriphosphat)-Konzentration von 1 mM untersucht. Die Werte wurden normiert und prozentual dargestellt.

4. Diskussion

Cyclothiazid, ein Benzothiazid, wurde ursprünglich in die Klinik als Diuretikum bzw. Hypertensivum eingeführt. In der Grundlagenforschung ist Cyclothiazid vor allem dafür bekannt, dass es die Desensitivierung von AMPA Rezeptoren aufhebt (Partin et al. 1994). Außerdem wirkt es auch als Blocker von ionotropen GABA-A Rezeptoren (Deng et al. 2003). Innerhalb von Screening Untersuchungen wurde nun in dieser Arbeitsgruppe eine weitere Eigenschaft von Cyclothiazid entdeckt: die hemmende Wirkung auf $P2X_7$ Rezeptoren. Gegenstand dieser Arbeit war es die Wirkung von Cyclothiazid auf $P2X_7$ Rezeptoren eingehend zu untersuchen. Ein neuartiger $P2X_7$ Antagonist wäre von generellem Interesse, da es derzeit nur wenige $P2X_7$ Rezeptor-antagonisten gibt, die günstige Eigenschaften bezüglich Speziesspezifität oder Sensitivität aufweisen. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik zunächst an humanen dendritischen Zellen durchgeführt. Zu einem späteren Zeitpunkt waren dann auch clonierte P2X-Rezeptoren von Mensch und Ratte verfügbar, die in HEK-293 Zellen heterolog exprimiert wurden.

4.1 Besondere Eigenschaften des $P2X_7R$

Eine Besonderheit des $P2X_7$ Rezeptors ist die Veränderung der Signale einer Zelle nach repetitiver oder anhaltender Agonisten Stimulation. In Studien wurde wiederholt ATP an $P2X_7$ exprimierenden Zellen appliziert, wobei sich sowohl die Größe als auch die Signalform änderte (North 2002). Gleiches wurde auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet. Dabei ist typischerweise die Signalamplitude zu Beginn angestiegen und nach weiterer ATP Applikation auf eine konstante Plateauphase abgesunken. Um Messungen mit dem $P2X_7$ weitestgehend zu standardisieren, so dass eine zuverlässige und vergleichbare Quantifizierung der Messergebnisse möglich war, wurde in dieser Arbeit vor jeder Messung solange repetitiv ATP appliziert, bis in etwa konstante Signalamplituden erreicht wurden. Es musste jedoch darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht zu lange mit ATP behandelt wurden, da die Zellen eine anhaltende ATP-Behandlung aufgrund zytolytischer Effekte nicht tolerierten (Donnelly-Roberts et al. 2009a). Häufig wurden in Studien mit $P2X_7$ Rezeptoren unterschiedliche Messbedingungen verwendet, was bei gleicher Fragestellung zu unterschiedlichen Ergebnissen führte (Virginio et al. 1997, Acuna-Castillo et al. 2007). Eine genaue

Dokumentation der Messbedingungen ist somit essentiell (Hibell et al. 2001). Werden diese speziellen Eigenschaften des $P2X_7$ Rezeptors nicht beachtet, ist eine allgemein gültige Charakterisierungen nahezu unmöglich. Weitere Besonderheiten der $P2X_7$ Rezeptoren sind hohe Aktivierungskonzentrationen von mehr als 100 µM ATP (Di Virgilio 1995) und eine Zunahme der Signalamplituden bei reduzierten divalenten Kationenverhältnissen um das 4- bis 6-fache (North et al. 2000, Dutot et al. 2008).

4.1.1 Signalanstieg bei wiederholter ATP-Applikation

Der initiale Anstieg der Signalamplitude bei wiederholter ATP-Applikation kann prinzipiell durch zwei unterschiedliche Mechanismen erklärt werden. Zum einen könnte eine Zunahme der Affinität des $P2X_7$ Rezeptors bei wiederholter ATP-Stimulation Grund für den Signalanstieg sein. Dafür spricht, dass bei Verwendung supramaximaler ATP-Konzentrationen, bei denen eine Sättigung der $P2X_7$ Rezeptoren erreicht wurde, die Signalamplituden nicht anstiegen (North et al. 2000, Hibell et al. 2000). Bei Verwendung submaximaler Agonisten-Konzentrationen wurde sowohl bei dem humanen als auch bei dem $P2X_7$ Rezeptor der Ratte eine Zunahme der Signalamplituden beobachtet (Hibell et al. 2000). Zum anderen wurde eine Porendilatation des $P2X_7$ Rezeptors als Ursache des Signalamplitudenanstiegs diskutiert (Rassendren et al. 1997, Chessell et al. 1998, Chessell et al. 1997). Dabei wurde nach anhaltender $P2X_7$ Stimulation der fluoreszierende Farbstoff Yo-Pro-1 in den Zellen detektiert. Mit 629 Dalton ist Yo-Pro-1 zu groß, um durch einen normalen Ionenkanal (den $P2X_7$ Rezeptor) zu gelangen. Daher wurde eine Dilatation des $P2X_7$ Rezeptors angenommen. Diese Theorie wurde jedoch in weiteren Studien widerlegt. Das Meerestoxin Maitotoxin führte nicht nur bei Zellen mit $P2X_7$ Rezeptor sondern auch bei Zellen die keinen $P2X_7$ Rezeptor besaßen, zu einer Anreicherung von Yo-Pro-1. Somit mussten Kanäle, beziehungsweise Poren, unabhängig vom $P2X_7$ Rezeptor für die Permeation verantwortlich sein (Schilling et al. 1999, Lundy et al. 2004). Letztendlich wurde bewiesen, dass Pannexine Poren bildeten, durch die Moleküle mit einer Größe von 900 Dalton gelangen (Rassendren et al. 1997, Pelegrin et al. 2006, Ma et al. 2009). Da diese Porenbildung erst nach wiederholter ATP Stimulation auftrat, wurde ein Zusammenhang mit dem Anstieg der

Signalamplitude vermutet. Repetitive Agonisten-Applikationen mit supramaximalen Konzentrationen führten bei dem $P2X_7$ Rezeptor von Ratte und Mensch nach 10 bis 30 Sekunden zu einer Anreicherung von Yo-Pro-1 im Zellinneren. Aber selbst nach mehreren Minuten war kein Anstieg der Signalamplitude zu messen (Hibell et al. 2000). Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Porenbildung durch Pannexine ursächlich für den initialen Anstieg der Signalamplitude bei wiederholter Agonisten-Applikation ist. Abschließend ist eine Zunahme der Ionenströme am wahrscheinlichsten durch Affinitätssteigerung der $P2X_7$ Rezeptoren zu begründen.

4.1.2 Abnahme der Signalamplitude bei wiederholter ATP-Applikation

Nach dem initialen Signalanstieg bei wiederholter ATP-Applikation wurde an humanen dendritischen Zellen in der Regel eine Signalabnahme beobachtet, die häufig mit einer Abnahme der Membrankapazität einherging. Eine Abnahme der Membrankapazität wurde auch an humanen THP-1-Monozyten und Zellen des HEK293 Expressionssystems nach repetitiver ATP-Applikation beobachtet (MacKenzie et al. 2001). Dabei zeigte sich, dass nach zweiminütiger Agonisten Applikation die Membrankapazität um 22 ± 2% abnahm. Eine signifikante Rolle spielten hierbei aber nur die ersten 2 bis 5 Minuten; danach war die Abnahme der Membrankapazität vernachlässigbar. In dieser Studie wurde lediglich die Abnahme der Membrankapazität untersucht. Auf einen möglichen Zusammenhang mit der Signalgröße wurde nicht eingegangen. In der vorliegenden Arbeit haben wir unter anderem untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Abnahme der Signalamplitude und Abnahme der Membrankapazität gibt. Unter der Voraussetzung, dass $P2X_7$ Rezeptoren gleichmäßig auf der Membran verteilt sind, würde sich bei einer Abnahme der Membrankapazität, die proportional zur Membranfläche ist, die Anzahl der $P2X_7$ Rezeptoren verringern, was die Signalabnahme erklären könnte. Insgesamt scheint ein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern jedoch unwahrscheinlich, da bei einigen Messungen die Signalamplitude abgenommen hatte, obwohl die Membrankapazität konstant blieb. Die Abnahme der Signalamplitude könnte auch mit dem Phosphorylierungsgrad des $P2X_7$ Rezeptors zusammenhängen. Es ist belegt, dass eine Abnahme der Signalamplitude durch Dephosphorylierung des $P2X_7$ Rezeptors zustande kommt, wenn dieser mit einer

supramaximalen Agonistenkonzentration stimuliert wird. Folgerichtig kommt es in Gegenwart eines Phosphatase-Inhibitors nach ATP-Stimulation zu keiner Abnahme der Signalamplitude (Kim et al. 2001). Da in den Versuchen dieser Arbeit nur submaximale ATP Konzentrationen verwendet wurden und die Signalamplituden erst später kleiner geworden sind, kann auch dieser Ansatz die Beobachtungen nur bedingt erklären.

4.1.3 Bestimmung der halbmaximalen Aktivierungskonzentration

Die Variabilität der Signale spielt auch bei der Bestimmung der halbmaximalen Aktivierungskonzentration von ATP eine entscheidende Rolle. Die Affinität der $P2X_7$ Rezeptoren nimmt bei wiederholten ATP Applikationen kontinuierlich zu, um schließlich einen konstanten Wert anzunehmen. Wie diese Affinitäts-veränderungen zustande kommen, ist noch nicht vollständig geklärt (Hibell et al. 2000). Unter reduzierten Kationenkonzentrationen wurde für den humanen $P2X_7$ Rezeptor eine EC_{50} von 925 ± 280 µM ATP und für den der Ratte eine EC50 von 125 ± 60 µM ermittelt. Beide Werte liegen am oberen Ende der Referenzskala. Unter vergleichbaren Bedingungen werden für den humanen $P2X_7$ Rezeptor EC_{50}-Werte von 300 µM (Riedel et al. 2007) bis 720 µM angegeben (Stokes et al. 2006). Die Werte für den $P2X_7$ der Ratte reichen von 3.6 µM bis 123 µM ATP (Rassendren et al. 1997, Young et al. 2007). Die große Spannbreite lässt sich durch die oben beschrieben Randparameter erklären (Markwardt 2007).

4.1.4 Wirkung divalenter Kationen auf $P2X_7$ Rezeptoren

$P2X_7$ Rezeptoren reagieren sehr sensibel auf divalente Kationen. So wirken schon mikromolare Konzentrationen inhibierend auf den $P2X_7$. Dadurch unterscheidet sich der $P2X_7$ von den restlichen P2X Rezeptoren, die erst bei deutlich höheren Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Konzentrationen gehemmt werden (Virginio et al. 1998, Ding et al. 1999). Interessanterweise hängt der Mechanismus, durch den divalente Kationen den $P2X_7$ Rezeptor hemmen, vom verwendeten Expressionssystem ab. Eine Zunahme divalenter Kationen bewirkt bei HEK293 Zellen eine nicht-kompetitive Hemmung und bei Xenopus Oozyten eine kompetitive Hemmung (Virginio et al. 1997, Acuna-Castillo et al. 2007). Eine frühe Theorie war, dass die Hemmung der $P2X_7$ Rezeptoren durch eine Reduktion von freiem ATP^{4-} zustande kam. Dabei zeigte sich, dass ATP^{4-} den $P2X_7$ Rezeptor aktiviert und im Komplex mit

Magnesium ($MgATP^{2-}$) keine Wirkung an dem $P2X_7$ Rezeptor entfalten konnte (Steinberg et al. 1987a). Neue Studien verfolgen die Theorie, dass divaltente Kationen direkt mit dem $P2X_7$ Rezeptor interagieren (Jiang 2009). Geeignete Interaktionsstellen stellen die Aminosäuren Histidin, Cystein, Lysin, Aspartat und Glutamat dar. Diese Aminosäuren sind häufig Bindungsstellen für divalente Kationen (Clyne et al. 2002, Mathie et al. 2006, Lorca et al. 2005, Wang et al. 1995, Laube et al. 2000, Paoletti et al. 2000, Chu et al. 2004). Werden die Aminosäuren His^{62} und Asp^{179} des $P2X_7$ Rezeptors der Ratten durch Alanin ersetzt, ist im HEK293 Expressionssystems die hemmende Wirkung von Kupfer und Zink nahezu vollständig aufgehoben (Liu et al. 2008). Folgerichtig müssen diese Aminosäuren bei der Formierung einer Bindungsstelle für Kupfer und Zink essentiell sein. Eine direkte Interaktion zwischen $P2X_7$ Rezeptor und divalenten Kationen ist somit äußerst wahrscheinlich (Liu et al. 2008). In einer ähnlichen Studie wurden anstelle des HEK293 Expressionssystems, Xenopus Oozyten verwendet (Acuna-Castillo et al. 2007). Hier zeigte sich jedoch keine Bedeutung der Aminosäure His^{62} bei der Hemmung durch Zink und Kupfer. Dafür hatte die Mutation von His^{267} einen kompletten Hemmungsverlust von Kupfer und Zink und bei Mutation der His^{201} ein Ausbleiben der Hemmung durch Magnesium zur Folge. Gründe für diese unterschiedlichen Studienergebnisse sind bisher noch nicht bekannt, aber vieles deutet darauf hin, dass die verschiedenen Expressionssysteme ein signifikanter Faktor sein könnten.

Die EC_{50} von humanen $P2X_7$ Rezeptoren ist von 0,925 ± 0,28 in niedriger auf 4,27 ± 0,27 mM ATP in normaler Kationenkonzentration angestiegen. Bei den $P2X_7$ Rezeptoren der Ratten hat sich die EC_{50} von 0,125 ± 0,06 in niedrigen auf 1,872 ± 0,035 mM ATP, in normalen Kationenkonzentrationen erhöht. Ähnliches zeigten diverse Studien, in denen ein Anstieg der EC_{50} in normalen Kationenkonzentrationen beschrieben wurde (Surprenant et al. 1996, North et al. 2000, Stokes et al. 2006).

4.2 Wirkungsverlust von CTZ bei wiederholter ATP- Applikation

Die im Vorfeld beobachteten Hemmungsverluste nach wiederholten Applikationen von CTZ konnten nur zum Teil bestätigt werden. Die humanen $P2X_7$ Rezeptoren zeigten selbst nach 5 Wiederholungen mit 5,5 % Verlust kaum Veränderung in ihrer Hemmung durch CTZ, wohingegen die $rP2X_7$ Rezeptoren mit 30 % Hemmungsverlust deutlich stärker beeinflusst wurden. Da die Porenbildung und der Hemmungsverlust mit wiederholter ATP Applikation auftreten, könnte dies der Grund für das unterschiedliche Verhalten beider Rezeptoren sein (Pelegrin et al. 2006). In diversen Studien mit $P2X_7$ Antagonisten wurde beschrieben, dass das Hemmungsverhalten der Antagonisten nach wiederholter ATP Gabe deutlich abnahm oder überhaupt nicht mehr vorhanden war (Buell et al. 1998)(Chessell et al. 1998, Buell et al. 1998)(Hibell et al. 2000). Möglicherweise kann CTZ bei den humanen $P2X_7$ Rezeptoren unabhängig von der Affinitätssteigerung des $P2X_7$ Rezeptors hemmen und bei den $P2X_7$ Rezeptoren der Ratte nicht. Speziesspezifische Unterschiede kann man somit nicht nur bei unterschiedlichen divalenten Kationenkonzentrationen, sondern auch bei repetitiver CTZ Applikation beobachten.

4.3 Einfluss der Substanzstruktur auf die Hemmung des $P2X_7R$

Die Experimente mit Substanzen, die dem Cyclothiazid strukturell ähnlich sind, zeigten, dass keiner dieser Stoffe eine nur annähernde Hemmwirkung wie CTZ aufwies. Das Diuretikum Hydrochlorothiazid (HCT) unterscheidet sich von Cyclothiazid durch einen Norbornenrestes und wird schon seit Jahren klinisch verwendet. Jedoch hatte HCT kaum Hemmwirkung an dem $P2X_7$ Rezeptor. Daher hätte das Schlüsselmolekül der Norbornenrest sein können. Aber auch das Norbornen hemmte den $P2X_7$ Rezeptor nur sehr gering. Somit ergibt sich die Vermutung, dass das Molekül Cyclothiazid als Ganzes für die Hemmwirkung verantwortlich sein muss. Bei anderen $P2X_7$ Antagonisten führten leichte Modifizierungen der Grundsubstanz zu einem veränderten Wirkungsverhalten. So zeigten Derivate des $P2X_7$ Antagonisten Adamantylmethyl-benzamids verbesserte physikalische Eigenschaften, wie höhere Löslichkeit und metabolische Stabilität. Ein weiterer Abkömmling konnte die orale Bioverfügbarkeit erhöhen und wies niedrigere Plasmaproteinbindung auf (Furber et al. 2007). Ein ähnliches Bild zeigte

sich bei Derivaten von Imidazolen (Gleave et al. 2010), Acetamiden (Beswick et al. 2010) und Cyanoguanidinen (Perez-Medrano et al. 2009). Häufig waren die vorgenommenen Veränderungen nur sehr gering, wie etwa ein Austausch ähnlicher Amine oder Amide (Furber et al. 2007).

4.4 Hemmung anderer Rezeptoren durch Cyclothiazid

Wie die meisten Substanzen wirkt auch Cyclothiazid nicht nur ausschließlich an einem einzigen Rezeptor, sondern teilweise auch an anderen. Getestet wurden zwei zu Verfügung stehende P2X Rezeptoren, der humane $P2X_5$ und der $P2X_4$ Rezeptor. In nicht-neuronalen Gewebe findet sich der humane $P2X_7$ Rezeptor häufig mit dem $P2X_4$ co-lokalisiert, daher ist die Wirkung an diesem Rezeptor besonders interessant (Tenneti et al. 1998). Der $P2X_7$ Rezeptor Antagonist Brilliant Blue G zum Beispiel hat eine nur 10-fach höhere Selektivität für den humanen $P2X_7$ im Verhältnis zum $P2X_4$ (Jiang et al. 2000). Eine gleichzeitige Hemmung beider Rezeptoren ist somit immer gegeben. Im Gegensatz dazu steht der $P2X_7$ Antagonist AZ11645373, der den humanen $P2X_7$ Rezeptor mit einer IC_{50} von 7 nM antagonisiert und selbst bei 10-20 µM keine Wirkung auf andere P2X Rezeptoren hat (Stokes et al. 2006). Andere Antagonisten wie, Suramin, PPADS und oxidiertes ATP sind nicht selektiv und hemmen viele andere P2X und P2Y Rezeptoren, genauso wie andere liganden-gesteuerte Ionen Kanäle, Ektonukleotidasen und eine Vielzahl intrazellulärer Enzyme (Baraldi et al. 2004). Ähnlich ist es bei Calmidazolium und KN-62 sowie deren Analoga, die besser bekannt sind für die Hemmung von Calmodulin und die Kalzium-Calmodulin-Kinase 2 (Braun et al. 1995). Cyclothiazid hemmt neben dem $P2X_7$ Rezeptor zusätzlich den humanen $P2X_4$ und $P2X_5$. Bei 300 µM Cyclothiazid liegt die Restrezeptoraktivität des $P2X_4$ noch bei 44,9 ± 9 %. Eine gleichzeitige Hemmung von $P2X_4$ und $P2X_7$ wäre daher nur in sehr hohen Cyclothiazid Konzentrationen zu erwarten. Da die IC_{50} von Cyclothiazid beim $P2X_7$ Rezeptor 16,1 ± 1,7 µM beträgt, wäre bei therapeutischer Konzentration eine zusätzliche Hemmung des $P2X_4$ Rezeptors minimal. Im Gegensatz dazu wird der $P2X_5$ nahezu komplett durch 300 µM Cyclothiazid gehemmt. Die Restrezeptoraktivität beträgt hier nur noch 0,4 ± 0,1 %. Zwei weitere Rezeptoren werden durch Cyclothiazid beeinflusst. An AMPA Rezeptoren wird die Desensitivierung verhindert, und GABA Rezeptoren werden durch Cyclothiazid blockiert (Partin et al. 1994, Deng et al. 2003). Um eine

ausreichende Desensitivierung der AMPA-Rezeptoren gewährleisten zu können, werden 100µM Cyclothiazid benötigt (Fucile et al. 2006). Mit einer IC_{50} von 57,6 µM werden GABA Rezeptoren gehemmt (Deng et al. 2003). Da die IC_{50} für $P2X_7$ bei ca. 16 µM liegt, haben diese die größte Affinität zu Cyclothiazid.

4.5 Hemmungsmechanismus von Cyclothiazid

4.5.1 Kompetitive und nicht-kompetitive Hemmung

Die meisten Antagonisten des $P2X_7$ Rezeptors wie, Suramin, PPADS, oxidiertes ATP, KN-62, Calmidizolium und Brilliant Blue G hemmen unabhängig von der Agonisten Konzentration und damit über einen nicht-kompetitiven Mechanismus (North 2002). In An- und Abwesenheit von Cyclothiazid war die EC_{50} für ATP bei den humanen $P2X_7$ Rezeptoren nahezu gleich. Auch bei sehr hohen ATP-Konzentrationen (10 mM) konnte die maximale Signalamplitude nicht erreicht werden, so dass die Hemmung durch CTZ ebenfalls auf nicht-kompetitive Art und Weise erfolgte. Für den $P2X_7$ Rezeptor der Ratte wurde ein gleicher Hemmungsmechanismus vermutet und damit eine Hemmung unabhängig von der ATP Konzentration vorausgesetzt. Daher wurde bei der Messung der IC_{50} nicht die EC_{50} von ATP verwendet, sondern eine höhere, die größere Signalamplituden generierte. Überraschenderweise zeigte der $P2X_7$ Rezeptor der Ratten jedoch ein genau gegenläufiges Verhalten. Die EC_{50} stieg unter Co-Applikation von CTZ an. Bei supramaximalen ATP-Konzentrationen war keine Hemmungwirkung mehr vorhanden. Daher war die Hemmung durch CTZ bei den $P2X_7$ Rezeptoren der Ratten abhängig von der ATP Konzentration und somit kompetitiv. Nach dieser Erkenntnis wurde die IC_{50} Messung mit der EC_{50} von ATP wiederholt. Die IC_{50} ist von 123 µM auf 18,79 µM CTZ gesunken. Für den humanen $P2X_7$ Rezeptor ergab sich eine IC_{50} von 16.7 ± 1.7µM CTZ. N-(Adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-aminopyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chlor-benzamid (AACBA) hemmt mit einer IC_{50} von 85 und 980 nM den humanen und $rP2X_7$ Rezeptor (Broom et al. 2008). Mit einer IC_{50} von 7 nM blockiert AZ11645373 den $hP2X_7$ Rezeptor, hat aber keine Wirkung am $P2X_7$ Rezeptor der Ratten. Auch diverse andere $P2X_7$ Antagonisten wie Calmidazolium, KN-62 (Chessell et al. 1998) und [3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidin (Donnelly-Roberts et al. 2009b), hemmen im

nanomolaren Bereich. Cyclothiazid scheint etwas weniger potent zu hemmen, hat dafür aber den Vorteil, den $P2X_7$ Rezeptor von Mensch und Ratte mit nahezu gleicher IC_{50} zu hemmen.

4.5.2 Einfluss divalenter Kationen auf die Hemmung durch CTZ

Da Studien mit dem $P2X_7$ Rezeptor eine veränderte Wirkung sowohl von Agonisten als auch von Antagonisten bei Verwendung normaler Kationen-konzentration zeigten (Chessell et al. 1997), wurde in dieser Arbeit die Wirkung von ATP und Cyclothiazid auch in normalen Kationenkonzentrationen untersucht. Eine veränderte Wirkung wäre von großer klinischer Relevanz, da es die Gegebenheiten in vivo widerspiegelt. Alle anderen Experimente wurden in reduzierter Kationenkonzentration durchgeführt, da divalente Kationen inhibitorisch auf den $P2X_7$ Rezeptor wirken (Surprenant et al. 1996). Die Experimente mit Cyclothiazid in unterschiedlichen Kationenkonzentrationen zeigten keine Veränderung der Hemmung bei den humanen $P2X_7$ Rezeptoren, da sich nahezu gleiche IC_{50} Werte bei niedriger (16,7 ± 1,7 µM CTZ) und normaler (21,2 ± 1,2 µM CTZ) Kationenkonzentration ergaben. Die $P2X_7$ Rezeptoren der Ratten hingegen wurden in niedriger (18,8 ± 3,2 µM CTZ) Kationenkonzentration stärker gehemmt als in normaler (54,6 ± 5,2 µM CTZ). Daher nimmt die Hemmung von $rP2X_7$ Rezeptoren durch CTZ in normalen Kationenkonzentrationen maximal um den Faktor 3 ab. Somit reagieren die beiden $P2X_7$ Rezeptoren unterschiedlich auf veränderte Kationenverhältnisse. Die Wirkung anderer $P2X_7$ Antagonisten wie PPADS und Suramin variiert stark in Abhängigkeit von der extrazellulären Kationenkonzentration (Michel et al. 1999). Wiederum andere Antagonisten wie Brilliant Blue G und AZ11645373 wirken wie Cyclothiazid unabhängig von der extrazellulären Kationenkonzentration (Jiang et al. 2000, Stokes et al. 2006).

4.5.3 Wirkungseintritt und Reversibilität von CTZ

Im Vergleich zu den anderen $P2X_7$ Antagonisten, - wie oxidiertem ATP - bei dem eine Vorinkubation von mindestens 2 Stunden nötig ist (Surprenant et al. 1996), oder PPADS, bei dem erst nach 30 Minuten Auswaschzeit die Hemmung reversibel ist (Chessell et al. 1998), werden für die Verwendung von CTZ keine Vorinkubation oder verlängerte Auswaschzeiten benötigt. Die Wirkung tritt direkt nach Applikation ein, ist vollständig reversibel und daher besser für Versuche

geeignet als $P2X_7$ Antagonisten, wie KN-62, deren Hemmung irreversibel ist (Chessell et al. 1998). Klinisch gesehen, sind Laborparameter wie Vorinkubation und Auswaschzeiten jedoch von untergeordneter Bedeutung.

4.5.4 Hemmung des $P2X_7R$ bei unterschiedlichem Membranpotential

Eine weitere Information, wie ein Rezeptor durch einen Antagonisten gehemmt wird, erhält man aus Messungen bei verschiedenen Membranpotentialen. Es wurde die Hemmwirkung von Cyclothiazid bei unterschiedlichen Membranpotentialen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung des humanen $P2X_7$ Rezeptors durch CTZ genau wie bei den $P2X_7$ Antagonisten AZ11645373 (Stokes et al. 2006) und Brilliant Blue G (Jiang et al. 2000) unabhängig vom eingestellten Membranpotential verläuft. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass Cyclothiazid sehr wahrscheinlich kein Offen-Kanal-Blocker ist. Die Beurteilung der $P2X_7$ Rezeptoren der Ratten gestaltet sich etwas schwieriger, da die Hemmung ohnehin schon mit wiederholten Applikationen abnimmt. Um diesen Trend besser abschätzen zu können, wurden zu Beginn und am Ende jeder Messreihe mit -80 mV gemessen. Wie zu erwarten, hatte die Hemmung zwischen erster und letzter Messung trotz gleichem Membranpotential abgenommen. Bei Verwendung von positiven Membranpotentialen ergaben sich jedoch Werte, die niedriger waren als bei den zuletzt gemessenen -80 mV. Insgesamt jedoch folgt diese Abnahme dem allgemeinen Trend und ist nur gering ausgeprägt. Daher kann man trotz der leichten Abweichung bei den $P2X_7$ Rezeptoren der Ratte nicht von einer spannungsabhängigen Hemmung durch CTZ ausgehen.

4.6 Speziesspezifische Hemmung durch Cyclothiazid

Menschliche $P2X_7$ Rezeptoren unterscheiden sich in ihrem Wirkungsverhalten teilweise erheblich von denen der Ratte. Zum einen bei den Aktivierungskonzentrationen, bei denen man 10-30 mal höhere ATP-Konzentrationen für den humanen $P2X_7$ Rezeptor als für den der Ratte verwenden muss. Zum anderen unterscheiden sie sich beim Einfluss divalenter Kationen, die den humanen $P2X_7$ Rezeptor 5-20 mal stärker hemmen als den der Ratte (Surprenant et al. 1996). Die Unterschiede zwischen dem humanen $P2X_7$ Rezeptor und dem der Ratte sind vor allem auf die deutlich unterschiedliche Aminosäuresequenz zurückzuführen. Bei

allen P2X Rezeptoren außer dem $P2X_7$ sind Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz zwischen Ratte und Mensch von 90-99 % festzustellen (North 2002), bei dem $P2X_7$ Rezeptor sind es nur 80% (North et al. 1997). Viele der $P2X_7$ Antagonisten hemmen je nach Spezies mit teilweise deutlich unterschiedlicher Potenz. Für die klinische Testung an Tiermodellen sind große Diskrepanzen in der speziesspezifischen Hemmung problematisch, da man so nur sehr schwer die Ergebnisse auf den Menschen übertragen kann. Zum Beispiel ist eine Untersuchung an Tiermodellen bei dem hochspezifischen $P2X_7$ Antagonisten AZ11645373 kaum möglich, da der $P2X_7$ Rezeptor des Menschen 1000-fach stärker gehemmt wird als der der Ratte (Stokes et al. 2006). Ein gleiches Problem ergibt sich bei KN-62, bei dem keine Hemmung des $P2X_7$ Rezeptors der Ratten ermittelt wurde (Gargett et al. 1997). Und auch bei den Antagonisten Suramin und PPADS wäre eine Übertragung auf den Menschen schwierig, da der humane $P2X_7$ Rezeptor 10-50-fach stärker gehemmt wird als der $rP2X_7$ Rezeptor (Chessell et al. 1998). Derzeit können nur sehr wenige $P2X_7$ Antagonisten, wie [3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidin (Donnelly-Roberts et al. 2009b) speziesübergreifend mit nahezu gleicher Intensität hemmen. Für die Testung am Tiermodell ist diese Eigenschaft jedoch essentiell. Daher sind $P2X_7$ Antagonisten mit günstigen speziesübergreifenden Hemmungsverhältnissen von generellem Interesse. Cyclothiazid erfüllt genau diese Eigenschaften mit IC_{50} Werten von 18,8 ± 3,2 µM CTZ für den $P2X_7$ Rezeptor der Ratten und 16,7 ± 1,7 µM CTZ für den humanen $P2X_7$ Rezeptor.

4.7 Mögliche klinische Einsatzgebiete für $P2X_7$ Antagonisten

Der $P2X_7$ Rezeptor ist an diversen pathophysiologischen Prozessen beteiligt und stellt daher ein gutes Ziel für pharmakologische Interventionen dar. Studien zeigten, dass $P2X_7$ defiziente Mäuse vor Symptomen und Schädigungen von Knorpel durch Antikollagen Antikörpern geschützt waren (Labasi et al. 2002). Neurodegenerative Erkrankungen und zerebrale Ischämien entstehen vorrangig durch IL1ß Freisetzung von Mikroglia und könnten erfolgreich durch Blockierung des $P2X_7$ Rezeptors verhindert werden (Bernardino et al. 2008, Franke et al. 2004). Chronisch neuropathische Schmerzen führen zu einer Hoch-Regulation von $P2X_7$ Rezeptoren in den betroffenen Nerven und Stammganglia (Chessell et al. 2005). In der gleichen Studie mit $P2X_7$ defizienten Mäusen konnte gezeigt

werden, dass weder durch mechanische noch durch thermische Stimulationen eine neuropathische Überempfindlichkeit erzeugt werden konnte (Chessell et al. 2005). Patienten mit chronischen neuropathischen Schmerzen könnten daher von einem $P2X_7$ Antagonisten profitieren. Weitere Studien deuten darauf hin, dass $P2X_7$ Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Depressionen spielen. Es stellte sich heraus, dass hohe Konzentrationen von IL-1β Symptomatiken hervorrufen, die der einer Depression entsprechen. Da $P2X_7$ Antagonisten die Freisetzung von IL-1β unterbinden, wären Depressionen mit proinflammatorischer Komponente ein vielversprechendes therapeutisches Ziel (Smith 1991). Ein weiteres Gebiet für einen möglichen $P2X_7$ Rezeptor Antagonisten ist die Behandlung von neoplastischen Lymphozyten. Auf diesen wird der $P2X_7$ Rezeptor in großer Anzahl exprimiert. Bei Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass Metastasierungen in Lymphknoten drastisch reduziert werden könnten, wenn der $P2X_7$ Rezeptor gehemmt wird (Ren et al. 2010).

Insgesamt wäre somit die Bandbreite klinischer Einsatzgebiete für $P2X_7$ Antagonisten enorm. Ein wesentlicher Vorteil von Cyclothiazid gegenüber anderen $P2X_7$-Antagonisten besteht darin, dass es mit gleicher Sensitivität bei Mensch und Ratte wirkt, wodurch optimale Bedingungen für die Testung am Tiermodell gegeben wären. Zudem wurde Cyclothiazid als Diuretikum und Hypertensivum klinisch erforscht und als Medikament zugelassen. Daher sind auch klinischen Parameter bekannt (Jounela et al. 1985). Diese Eigenschaften zeichnen Cyclothiazid als geeigneten Kandidaten für die Entwicklung eines klinisch einsetzbaren $P2X_7$ Rezeptor Antagonisten aus.

5. Zusammenfassung

$P2X_7$ Rezeptoren (7.purinerger Rezeptor der P2X Familie) findet man hauptsächlich bei Zellen des Immunsystems. Hier spielen sie häufig eine entscheidende Rolle bei pathophysiologischen Vorgängen. Antagonisten des $P2X_7$ Rezeptors sind daher von allgemeinem Interesse. Aktuell können nur wenige $P2X_7$ Antagonisten überzeugen, so dass die Suche nach Antagonisten mit günstigen Eigenschaften noch nicht abgeschlossen ist. Diese Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung von Cyclothiazid, einem neuen $P2X_7$ Rezeptor Antagonisten. Zusätzlich ist Cyclothiazid in der Klinik als Hypertensivum und Diuretikum bekannt. In dieser Arbeit wurde Cyclothiazid sowohl an humanen dendritischen Zellen als auch an clonierten $P2X_7$ Rezeptoren von Ratte und Mensch getestet.

Native und clonierte humane $P2X_7$ Rezeptoren wurden gleichermaßen durch Cyclothiazid gehemmt, so dass nach Bestimmung der halbmaximalen inhibierenden Konzentration (IC_{50}) nur noch die clonierten $P2X_7$ Rezeptoren verwendet wurden. In folgenden Experimenten wurde Cyclothiazid auf speziesspezifische Hemmung untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl der $P2X_7$ Rezeptor der Ratte (18,7 ± 3,24 µM) als auch der des Menschen (16,7 ± 1,7 µM) mit gleicher Intensität gehemmt wurde. Die Hemmung beider Rezeptoren war vollständig reversibel. Unterschiede zeigten sich jedoch beim Hemmungs-mechanismus. Humane $P2X_7$ Rezeptoren wurden nicht-kompetitiv, die der Ratten kompetitiv gehemmt. Zudem war die Hemmung unabhängig von der divalenten Kationenkonzentration und des eingestellten Membranpotentials.

Aufgrund der seltenen Eigenschaft der nahezu gleichen IC_{50} von $P2X_7$ Rezeptoren der Ratte und Mensch stellt Cyclothiazid einen geeigneten Antagonisten für Testungen am Tiermodell dar. Zudem sind klinische Parameter bekannt, da Cyclothiazid als Diuretikum und Hypertensivium eingesetzt wurde. Insgesamt wäre Cyclothiazid unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften eine geeignete Substanz für weitere Untersuchungen zur Entwicklung eines klinisch einsetzbaren $P2X_7$ Rezeptor Antagonisten.

6. Literaturverzeichnis

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

2. Allan S M, Rothwell N J: Cytokines and acute neurodegeneration. Nat.Rev.Neurosci., 2: 734-744 (2001)

3. Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti L V, Torrisi M R, Rubartelli A: Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 101: 9745-9750 (2004)

4. Baraldi P G, Di Virgilio F, Romagnoli R: Agonists and antagonists acting at P2X7 receptor. Curr.Top.Med.Chem., 4: 1707-1717 (2004)

5. Beigi R, Kobatake E, Aizawa M, Dubyak G R: Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. Am.J.Physiol., 276: C267-781 Pt 1 (1999)

6. Bernardino L, Balosso S, Ravizza T, Marchi N, Ku G, Randle J C, Malva J O, Vezzani A: Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X7 receptor-mediated IL-1beta release. J.Neurochem., 106: 271-280 (2008)

7. Beswick P J, Billinton A, Chambers L J, Dean D K, Fonfria E, Gleave R J, Medhurst S J, Michel A D, Moses A P, Patel S, Roman S A, Roomans S, Senger S, Stevens A J, Walter D S: Structure-activity relationships and in vivo activity of (1H-pyrazol-4-yl)acetamide antagonists of the P2X(7) receptor. Bioorg.Med.Chem.Lett., 20: 4653-4656 (2010)

8. Brake A J, Wagenbach M J, Julius D: New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. Nature, 371: 519-523 (1994)

9. Braun A P, Schulman H: The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. Annu.Rev.Physiol., 57: 417-445 (1995)

10. Broom D C, Matson D J, Bradshaw E, Buck M E, Meade R, Coombs S, Matchett M, Ford K K, Yu W, Yuan J, Sun S H, Ochoa R, Krause J E, Wustrow D J, Cortright D N: Characterization of N-(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-amino-pyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chloro-ben zamide, a P2X7 antagonist in animal models of pain and inflammation. J.Pharmacol.Exp.Ther., 327: 620-633 (2008)

11. Buell G, Chessell I P, Michel A D, Collo G, Salazzo M, Herren S, Gretener D, Grahames C, Kaur R, Kosco-Vilbois M H, Humphrey P P: Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody. Blood, 92: 3521-3528 (1998)

12. Buell G, Collo G, Rassendren F: P2X receptors: an emerging channel family. Eur.J.Neurosci., 8: 2221-2228 (1996)

13. Burnstock G: Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol.Life Sci., 64: 1471-1483 (2007)

14. Burnstock G: Introduction: P2 receptors. Curr.Top.Med.Chem., 4: 793-803 (2004)

15. Burnstock G, Kennedy C: Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? Gen.Pharmacol., 16: 433-440 (1985)

16. Burnstock G, Wood J N: Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. Curr.Opin.Neurobiol., 6: 526-532 (1996)

17. Carroll W A, Kalvin D M, Perez Medrano A, Florjancic A S, Wang Y, Donnelly-Roberts D L, Namovic M T, Grayson G, Honore P, Jarvis M F: Novel and potent 3-(2,3-dichlorophenyl)-4-(benzyl)-4H-1,2,4-triazole P2X7 antagonists. Bioorg.Med.Chem.Lett., 17: 4044-4048 (2007)

18. Cheneval D, Ramage P, Kastelic T, Szelestenyi T, Niggli H, Hemmig R, Bachmann M, MacKenzie A: Increased mature interleukin-1beta (IL-1beta) secretion from THP-1 cells induced by nigericin is a result of activation of p45 IL-1beta-converting enzyme processing. J.Biol.Chem., 273: 17846-17851 (1998)

19. Chessell I P, Hatcher J P, Bountra C, Michel A D, Hughes J P, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck W L, Grahames C B, Casula M A, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell G N: Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. Pain, 114: 386-396 (2005)

20. Chessell I P, Michel A D, Humphrey P P: Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor. Br.J.Pharmacol., 124: 1314-1320 (1998)

21. Chessell I P, Michel A D, Humphrey P P: Properties of the pore-forming P2X7 purinoceptor in mouse NTW8 microglial cells. Br.J.Pharmacol., 121: 1429-1437 (1997)

22. Chu X P, Wemmie J A, Wang W Z, Zhu X M, Saugstad J A, Price M P, Simon R P, Xiong Z G: Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. J.Neurosci., 24: 8678-8689 (2004)

23. Clyne J D, LaPointe L D, Hume R I: The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. J.Physiol., 539: 347-359Pt 2 (2002)

24. Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North R A, Buell G: Tissue distribution of the P2X7 receptor. Neuropharmacology, 36: 1277-1283 (1997)

25. Deng L, Chen G: Cyclothiazide potently inhibits gamma-aminobutyric acid type A receptors in addition to enhancing glutamate responses. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 100: 13025-13029 (2003)

26. Di Virgilio F: The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. Immunol.Today, 16: 524-528 (1995)

27. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz J M, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi O R: Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. Blood, 97: 587-600 (2001)

28. Di Virgilio F, Ferrari D, Falzoni S, Chiozzi P, Munerati M, Steinberg T H, Baricordi O R: P2 purinoceptors in the immune system. Ciba Found.Symp., 198: 290-302; discussion 302-5(1996)

29. Ding S, Sachs F: Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: single channel recordings. J.Membr.Biol., 172: 215-223 (1999)

30. Donnelly-Roberts D L, Namovic M T, Han P, Jarvis M F: Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. Br.J.Pharmacol., 157: 1203-1214 (2009a)

31. Donnelly-Roberts D L, Namovic M T, Surber B, Vaidyanathan S X, Perez-Medrano A, Wang Y, Carroll W A, Jarvis M F: 3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. Neuropharmacology, 56: 223-229 (2009b)

32. Dubyak G R: Go it alone no more--P2X7 joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels. Mol.Pharmacol., 72: 1402-1405 (2007)

33. Dubyak G R, el-Moatassim C: Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. Am.J.Physiol., 265: C577-606 Pt 1 (1993)

34. Dutot M, Liang H, Pauloin T, Brignole-Baudouin F, Baudouin C, Warnet J M, Rat P: Effects of toxic cellular stresses and divalent cations on the human P2X7 cell death receptor. Mol.Vis., 14: 889-897(2008)

35. Evans R J, Lewis C, Buell G, Valera S, North R A, Surprenant A: Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). Mol.Pharmacol., 48: 178-183 (1995)

36. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Collo G, Buell G, Di Virgilio F: ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. Neuropharmacology, 36: 1295-1301 (1997)

37. Ferrari D, Villalba M, Chiozzi P, Falzoni S, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F: Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. J.Immunol., 156: 1531-1539 (1996)

38. Filippini A, Taffs R E, Agui T, Sitkovsky M V: Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. J.Biol.Chem., 265: 334-340 (1990)

39. Franke H, Gunther A, Grosche J, Schmidt R, Rossner S, Reinhardt R, Faber-Zuschratter H, Schneider D, Illes P: P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. J.Neuropathol.Exp.Neurol., 63: 686-699 (2004)

40. Fucile S, Miledi R, Eusebi F: Effects of cyclothiazide on GluR1/AMPA receptors. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 103: 2943-2947 (2006)

41. Furber M, Alcaraz L, Bent J E, Beyerbach A, Bowers K, Braddock M, Caffrey M V, Cladingboel D, Collington J, Donald D K, Fagura M, Ince F, Kinchin E C, Laurent C, Lawson M, Luker T J, Mortimore M M, Pimm A D, Riley R J, Roberts N, Robertson M, Theaker J, Thorne P V, Weaver R, Webborn P, Willis P: Discovery of potent and selective adamantane-based small-molecule P2X(7) receptor antagonists/interleukin-1beta inhibitors. J.Med.Chem., 50: 5882-5885 (2007)

42. Gargett C E, Wiley J S: The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. Br.J.Pharmacol., 120: 1483-1490 (1997)

43. Gleave R J, Walter D S, Beswick P J, Fonfria E, Michel A D, Roman S A, Tang S P: Synthesis and biological activity of a series of tetrasubstituted-imidazoles as P2X(7) antagonists. Bioorg.Med.Chem.Lett., 20: 4951-4954 (2010)

44. Griffiths R J, Stam E J, Downs J T, Otterness I G: ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo. J.Immunol., 154: 2821-2828 (1995)

45. Gudipaty L, Munetz J, Verhoef P A, Dubyak G R: Essential role for Ca2+ in regulation of IL-1beta secretion by P2X7 nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells. Am.J.Physiol.Cell.Physiol., 285: C286-992 (2003)

46. Guile S D, Alcaraz L, Birkinshaw T N, Bowers K C, Ebden M R, Furber M, Stocks M J: Antagonists of the P2X(7) receptor. From lead identification to drug development. J.Med.Chem., 52: 3123-3141 (2009)

47. Guo C, Masin M, Qureshi O S, Murrell-Lagnado R D: Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. Mol.Pharmacol., 72: 1447-1456 (2007)

48. Hejjas K, Szekely A, Domotor E, Halmai Z, Balogh G, Schilling B, Sarosi A, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z: Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: a dimensional approach. Am.J.Med.Genet.B.Neuropsychiatr.Genet., 150B: 295-299 (2009)

49. Hibell A D, Kidd E J, Chessell I P, Humphrey P P, Michel A D: Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors. Br.J.Pharmacol., 130: 167-173 (2000)

50. Hibell A D, Thompson K M, Xing M, Humphrey P P, Michel A D: Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs. J.Pharmacol.Exp.Ther., 296: 947-957 (2001)

51. Hogquist K A, Unanue E R, Chaplin D D: Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. J.Immunol., 147: 2181-2186 (1991)

52. Humphreys B D, Dubyak G R: Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. J.Leukoc.Biol., 64: 265-273 (1998a)

53. Humphreys B D, Virginio C, Surprenant A, Rice J, Dubyak G R: Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. Mol.Pharmacol., 54: 22-32 (1998b)

54. Jahr C E, Jessell T M: ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. Nature, 304: 730-733 (1983)

55. Jiang L H: Inhibition of P2X(7) receptors by divalent cations: old action and new insight. Eur.Biophys.J., 38: 339-346 (2009)

56. Jiang L H, Mackenzie A B, North R A, Surprenant A: Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. Mol.Pharmacol., 58: 82-88 (2000)

57. Jounela A J, Juustila H, Lilja M: Comparison of cyclothiazide and hydrochlorthiazide in hypertension. Effects of different doses of diuretics. Cor Vasa, 27: 412-416 (1985)

58. Khakh B S, North R A: P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. Nature, 442: 527-532 (2006)

59. Kim M, Jiang L H, Wilson H L, North R A, Surprenant A: Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. EMBO J., 20: 6347-6358 (2001)

60. Klapperstuck M, Buttner C, Schmalzing G, Markwardt F: Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor. J.Physiol., 534: 25-35Pt 1 (2001)

61. Labasi J M, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette M M, Brissette W, Wicks J R, Audoly L, Gabel C A: Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. J.Immunol., 168: 6436-6445 (2002)

62. Laube B, Kuhse J, Betz H: Kinetic and mutational analysis of Zn2+ modulation of recombinant human inhibitory glycine receptors. J.Physiol., 522 Pt 2: 215-230 (2000)

63. Lazarowski E R, Boucher R C, Harden T K: Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and

nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. J.Biol.Chem., 275: 31061-31068 (2000)

64. Liu X, Surprenant A, Mao H J, Roger S, Xia R, Bradley H, Jiang L H: Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper. Mol.Pharmacol., 73: 252-259 (2008)

65. Lorca R A, Coddou C, Gazitua M C, Bull P, Arredondo C, Huidobro-Toro J P: Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation. J.Neurochem., 95: 499-512 (2005)

66. Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagne B, Labbe M, Binder E B, Uhr M, Paez-Pereda M, Sillaber I, Ising M, Bruckl T, Lieb R, Holsboer F, Muller-Myhsok B: P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. Hum.Mol.Genet., 15: 2438-2445 (2006)

67. Lundy P M, Nelson P, Mi L, Frew R, Minaker S, Vair C, Sawyer T W: Pharmacological differentiation of the P2X7 receptor and the maitotoxin-activated cationic channel. Eur.J.Pharmacol., 487: 17-28 (2004)

68. Ma W, Hui H, Pelegrin P, Surprenant A: Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. J.Pharmacol.Exp.Ther., 328: 409-418 (2009)

69. MacKenzie A, Wilson H L, Kiss-Toth E, Dower S K, North R A, Surprenant A: Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. Immunity, 15: 825-835 (2001)

70. Mackenzie A B, Young M T, Adinolfi E, Surprenant A: Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. J.Biol.Chem., 280: 33968-33976 (2005)

71. Markwardt F: Activation kinetics of single P2X receptors. Purinergic Signal., 3: 249-253 (2007)

72. Mathie A, Sutton G L, Clarke C E, Veale E L: Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. Pharmacol.Ther., 111: 567-583 (2006)

73. McGaraughty S, Chu K L, Namovic M T, Donnelly-Roberts D L, Harris R R, Zhang X F, Shieh C C, Wismer C T, Zhu C Z, Gauvin D M, Fabiyi A C, Honore P, Gregg R J, Kort M E, Nelson D W, Carroll W A, Marsh K, Faltynek C R, Jarvis M F: P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. Neuroscience, 146: 1817-1828 (2007)

74. Michel A D, Chessell I P, Humphrey P P: Ionic effects on human recombinant P2X7 receptor function. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol., 359: 102-109 (1999)

75. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet J M: Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. Curr.Opin.Hematol., 11: 156-164 (2004)

76. Morelli A, Chiozzi P, Chiesa A, Ferrari D, Sanz J M, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Olson M F, Di Virgilio F: Extracellular ATP causes ROCK I-dependent bleb formation in P2X7-transfected HEK293 cells. Mol.Biol.Cell, 14: 2655-2664 (2003)

77. Narcisse L, Scemes E, Zhao Y, Lee S C, Brosnan C F: The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. Glia, 49: 245-258 (2005)

78. Nelson D W, Sarris K, Kalvin D M, Namovic M T, Grayson G, Donnelly-Roberts D L, Harris R, Honore P, Jarvis M F, Faltynek C R, Carroll W A: Structure-activity relationship studies on N'-aryl carbohydrazide P2X7 antagonists. J.Med.Chem., 51: 3030-3034 (2008)

79. Nieber K, Eschke D, Brand A: Brain hypoxia: effects of ATP and adenosine. Prog.Brain Res., 120: 287-297(1999)

80. North R A: Molecular physiology of P2X receptors. Physiol.Rev., 82: 1013-1067 (2002)

81. North R A, Barnard E A: Nucleotide receptors. Curr.Opin.Neurobiol., 7: 346-357 (1997)

82. North R A, Surprenant A: Pharmacology of cloned P2X receptors. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol., 40: 563-580 (2000)

83. Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, Neyton J: Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. Neuron, 28: 911-925 (2000)

84. Partin K M, Patneau D K, Mayer M L: Cyclothiazide differentially modulates desensitization of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor splice variants. Mol.Pharmacol., 46: 129-138 (1994)

85. Pelegrin P, Surprenant A: Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO J., 25: 5071-5082 (2006)

86. Perez-Medrano A, Donnelly-Roberts D L, Honore P, Hsieh G C, Namovic M T, Peddi S, Shuai Q, Wang Y, Faltynek C R, Jarvis M F, Carroll W A: Discovery and biological evaluation of novel cyanoguanidine P2X(7) antagonists with analgesic activity in a rat model of neuropathic pain. J.Med.Chem., 52: 3366-3376 (2009)

87. Perregaux D, Gabel C A: Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated

by these agents is a necessary and common feature of their activity. J.Biol.Chem., 269: 15195-15203 (1994)

88. Pfeiffer Z A, Aga M, Prabhu U, Watters J J, Hall D J, Bertics P J: The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. J.Leukoc.Biol., 75: 1173-1182 (2004)

89. Pollak Y, Yirmiya R: Cytokine-induced changes in mood and behaviour: implications for 'depression due to a general medical condition', immunotherapy and antidepressive treatment. Int.J.Neuropsychopharmacol., 5: 389-399 (2002)

90. Rassendren F, Buell G N, Virginio C, Collo G, North R A, Surprenant A: The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. J.Biol.Chem., 272: 5482-5486 (1997)

91. Ren S, Zhang Y, Wang Y, Lui Y J, Wei W, Huang X, Mao W, Zuo Y: Targeting P2X7 receptor inhibits the metastasis of murine P388D1 lymphoid neoplasm cells to lymph nodes. Cell Biol.Int., (2010)

92. Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F: Kinetics of P2X7 receptor-operated single channels currents. Biophys.J., 92: 2377-2391 (2007)

93. Schilling W P, Wasylyna T, Dubyak G R, Humphreys B D, Sinkins W G: Maitotoxin and P2Z/P2X(7) purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. Am.J.Physiol., 277: C766-764 Pt 1 (1999)

94. Shemon A N, Sluyter R, Conigrave A D, Wiley J S: Chelerythrine and other benzophenanthridine alkaloids block the human P2X7 receptor. Br.J.Pharmacol., 142: 1015-1019 (2004)

95. Sikora A, Liu J, Brosnan C, Buell G, Chessel I, Bloom B R: Cutting edge: purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism. J.Immunol., 163: 558-561 (1999)

96. Sim J A, Young M T, Sung H Y, North R A, Surprenant A: Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. J.Neurosci., 24: 6307-6314 (2004)

97. Smith R S: The macrophage theory of depression. Med.Hypotheses, 35: 298-306 (1991)

98. Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez J M, Hollmann M, Karschin C, Stuhmer W: P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 93: 3684-3688 (1996)

99. Steinberg T H, Newman A S, Swanson J A, Silverstein S C: ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. J.Biol.Chem., 262: 8884-8888 (1987a)

100. Steinberg T H, Silverstein S C: Extracellular ATP4- promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. J.Biol.Chem., 262: 3118-3122 (1987b)

101. Stokes L, Jiang L H, Alcaraz L, Bent J, Bowers K, Fagura M, Furber M, Mortimore M, Lawson M, Theaker J, Laurent C, Braddock M, Surprenant A: Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373. Br.J.Pharmacol., 149: 880-887 (2006)

102. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North R A, Buell G: The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). Science, 272: 735-738 (1996)

103. Tenneti L, Gibbons S J, Talamo B R: Expression and trans-synaptic regulation of P2x4 and P2z receptors for extracellular ATP in parotid acinar cells. Effects of parasympathetic denervation. J.Biol.Chem., 273: 26799-26808 (1998)

104. Virginio C, Church D, North R A, Surprenant A: Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. Neuropharmacology, 36: 1285-1294 (1997)

105. Virginio C, MacKenzie A, Rassendren F A, North R A, Surprenant A: Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. Nat.Neurosci., 2: 315-321 (1999)

106. Virginio C, North R A, Surprenant A: Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. J.Physiol., 510 (Pt 1): 27-35Pt 1 (1998)

107. Wang T L, Hackam A, Guggino W B, Cutting G R: A single histidine residue is essential for zinc inhibition of GABA rho 1 receptors. J.Neurosci., 15: 7684-7691 (1995)

108. Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng W G, Wan P, Li P, Xu Q, Liu Q S, Goldman S A, Nedergaard M: P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. Nat.Med., 10: 821-827 (2004)

109. Werry E L, Liu G J, Bennett M R: Glutamate-stimulated ATP release from spinal cord astrocytes is potentiated by substance P. J.Neurochem., 99: 924-936 (2006)

110. Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell I P, Naylor A, Bountra C, Banati R R, Anand P: COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. BMC Neurol., 6: 12(2006)

111. Young M T, Pelegrin P, Surprenant A: Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. Mol.Pharmacol., 71: 92-100 (2007)