

Aus dem Lehrstuhl für physiologische Genomik des
Physiologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Professor Dr. M. Götz

*Bestimmung der ATP-Freisetzung und des ATP-Abbaus an peripheren
Nerven mittels Lumineszenzmessung*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Veronika Maria Schaffer
aus
Garmisch- Partenkirchen
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Grafe

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Walter Zieglgänsberger

Priv. Doz. Dr. Johanna Anneser

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

.....

.....

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung:

04.12.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Extrazelluläres ATP - Ein Mediator der Nozizeption?</i>	1
1.1.1	<i>Ein Überblick</i>	1
1.2	<i>Rezeptoren für extrazelluläres ATP</i>	3
1.2.1	<i>P2Y-Rezeptoren auf Gliazellen und Neuronen</i>	4
1.2.2	<i>P2X-Rezeptoren auf nozizeptiven afferenten Neuronen</i>	6
1.3	<i>Extrazelluläres ATP wird durch Ectonucleotidasen abgebaut</i>	8
1.3.1	<i>Ectonucleotidasen auf Gliazellen und Neuronen</i>	8
1.4	<i>Metaboliten des ATP-Abbaus aktivieren weitere Rezeptoren</i> ..	11
1.4.1	<i>Adenosinrezeptoren am peripheren Nerv</i>	11
1.5	<i>Nervenkompression und Schmerz - ATP als Signalstoff</i>	12
2	FRAGESTELLUNG	14
3	MATERIALIEN UND METHODEN	15
3.1	<i>Präparate und Methoden</i>	15
3.1.1	<i>Spinalwurzelpräparate</i>	15
3.1.2	<i>Astrozytenkultur</i>	15
3.1.3	<i>Bestimmung der ATP-Konzentration durch Lumineszenzmessung</i> ..	16
3.1.4	<i>Elektrophysiologische Messungen</i>	17
3.2	<i>Messplatz und Geräte</i>	18
3.2.1	<i>Geräte</i>	18
3.2.2	<i>Organbäder</i>	18
3.3	<i>Substanzen</i>	22
3.4	<i>Durchführung</i>	23
3.4.1	<i>ATP-Freisetzung durch mechanische Stimulation</i>	25
3.4.2	<i>Messung des ATP-Abbaus in der Mikrotiterplatte</i>	27
3.4.3	<i>Allgemeines Vorgehen bei der Lumineszenzmessung</i>	28
3.5	<i>Statistische Methoden</i>	30
4	ERGEBNISSE	31
4.1	<i>Optimierung der Lumineszenzmessung für Echt-Zeit-Messungen</i>	31
4.2	<i>ATP-Freisetzung durch Kompression einer Spinalwurzel</i>	31
4.3	<i>ATP-Abbau</i>	36
4.3.1	<i>Geschwindigkeit des ATP-Abbaus an verschiedenen Präparaten</i>	36
4.3.2	<i>ATP-Abbau nach Zugabe von Hemmstoffen der Ectonucleotidasen</i> ..	41

4.4	<i>ATP-Freisetzung durch Kompression während Hemmung von Ectonucleotidasen</i>	46
5	DISKUSSION	48
5.1	<i>Kompression verändert die Signalfortleitung im Nerv</i>	48
5.2	<i>ATP-Freisetzung durch Kompression</i>	49
5.3	<i>Abnahme der Lumineszenz nach Kompression</i>	51
5.3.1	<i>Durch die Methode bedingte Abnahme der Lumineszenz</i>	51
5.3.2	<i>Durch das Präparat bedingte schnelle Abnahme der Lumineszenz</i> ...	52
5.4	<i>Messung des ATP-Abbaus am Präparat</i>	53
5.5	<i>Inhibierung von Ectonucleotidasen durch Hemmstoffe</i>	54
5.5.1	<i>Hemmung des ATP-Abbaus durch $\beta\gamma$-me-ATP</i>	54
5.5.2	<i>Hemmung des ATP-Abbaus durch ARL 67156</i>	56
5.6	<i>Einfluss von ATP und seinen Metaboliten auf die Nozizeption</i>	57
6	ZUSAMMENFASSUNG	58
7	LITERATURVERZEICHNIS	59
8	DANKSAGUNG	65
9	LEBENS LAUF	66

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.1-1 Reaktionsschema	16
Abbildung 3.2-1 Mikrotiterplatten mit vier Schalen.....	20
Abbildung 3.2-2 Gitternetze	21
Abbildung 3.4-1 Eichkurve für 15 bis 165nM ATP.....	24
Abbildung 3.4-2 Kompression einer Spinalwurzel mit dem Mikro-Manipulator	26
Abbildung 4.2-1 Kompression einer Spinalwurzel.....	33
Abbildung 4.2-2 Standardprotokoll: ATP-Freisetzung durch Kompression mit Eichung	34
Abbildung 4.2-3 Korrelation der Summenaktionspotentiale und ATP-Freisetzung.	35
Abbildung 4.3-1 ATP-Abbau durch Astrozytenkulturen im Vergleich zur Kontrolle	38
Abbildung 4.3-2 Vergleich des ATP-Abbaus an Spinalwurzeln und Kontrolle	39
Abbildung 4.3-3 Vergleich des ATP-Abbaus an Vorder- und Hinterwurzeln	40
Abbildung 4.3-4 ATP-Abbau in zellfreien Kulturschalen mit und ohne $\beta\gamma$ -me-ATP	42
Abbildung 4.3-5 ATP-Abbau an Astrozyten mit und ohne $\beta\gamma$ -me-ATP	43
Abbildung 4.3-6 Verschiebung der ATP-Abbaukurve durch $\beta\gamma$ -me-ATP	44
Abbildung 4.3-7 ATP-Abbau an Spinalwurzeln mit und ohne ARL 67156.....	45
Abbildung 4.4-1 $\beta\gamma$ -me-ATP verändert die Kinetik des ATP Abbaus nach Kompression	47

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 4.3.1 Zeitliches Verhalten des ATP-Abbaus an verschiedenen Präparaten..	40
Tabelle 4.3.2 Zeitliches Verhalten der ATP-Konzentration in zellfreien Kulturschalen.....	42
Tabelle 4.3.3 Wirkung von $\beta\gamma$ -me-ATP auf den zeitlichen Verlauf des ATP-Abbaus durch Astrozyten.....	43
Tabelle 4.3.4 Wirkung von $\beta\gamma$ -me-ATP auf das zeitliche Verhalten des ATP-Abbaus durch Spinalwurzeln	45
Tabelle 4.3.5 Zeitlicher Verlauf des ATP-Abbaus an Spinalwurzeln mit und ohne ARL 67156	46

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>AMP</i>	Adenosin 5'-monophosphat
<i>ADP</i>	Adenosin 5'-diphosphat
<i>ARL 67156</i>	6-N,N-Diethyl- β - γ -Dibromomethylen-D-Adenosin-5-triphosphat
<i>ATP</i>	Adenosin 5'-triphosphat
<i>ATP-Assay-Mix</i>	FL-AA-M, Adenosin-5'-Triphosphat- Biolumineszenz-Assay-Mix mit Luciferin und Luciferase
<i>CAP</i>	Compound Action Potential - Summenaktionspotential
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>DR</i>	Dorsal Root - Hinterwurzel
<i>eNPP</i>	Ecto-Nucleotid-Phosphodiesterase/Pyrophosphatase
<i>eNTPDase</i>	Ecto-Nucleosid-5'-TriPhosphat-Diphosphohydrolase
<i>HEPES</i>	N-2-HydroxyEthylPiperazin-N'-2-EthanSulfonsäure
<i>Triton-X-100</i>	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-Phenyl-Polyethylen Glycol
<i>VR</i>	Ventral Root - Vorderwurzel
<i>$\alpha\beta$-me-ATP</i>	$\alpha\beta$ -methylene-ATP
<i>$\beta\gamma$-me-ATP</i>	$\beta\gamma$ -methylene-ATP

1 EINLEITUNG

1.1 Extrazelluläres ATP - Ein Mediator der Nozizeption?

1.1.1 Ein Überblick

Extrazelluläres ATP scheint bei der Vermittlung von Schmerz eine wesentliche Rolle zu spielen. Seit in den letzten Jahren Purin-Rezeptoren auf nozizeptiven afferenten Neuronen nachgewiesen wurden (Lewis *et al.*, 1995), wird seine Beteiligung an verschiedenen akuten und chronischen Schmerzgeschehen, sowie neuropathischem Schmerz und Kompressionsschmerz (Karpaltunnelsyndrom), diskutiert (Wirkner *et al.*, 2007) und untersucht.

Obwohl die Mechanismen der Freisetzung von ATP noch nicht geklärt sind, sind doch einige Umstände bekannt, die zur Freisetzung führen können. ATP kann durch Vesikel, zusammen mit anderen neuronalen Botenstoffen, wie Acetylcholin oder Noradrenalin (Zimmermann, 1994), über Transportproteine und Kanäle (Connexine (Cotrina *et al.*, 1998), ATP-Binding Cassette, P2X7-Rezeptor), oder bei Schädigung der Zellmembran freigesetzt werden. Die Auswirkungen der folgenden Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration können sehr unterschiedlich sein, je nachdem, welcher Rezeptortyp auf benachbarten Zellen durch das ATP aktiviert wird.

Während Endothelzellen der Gefäße bei Hypoxie ATP freisetzen und dadurch eine Vasodilatation hervorrufen, setzen Epithelzellen der Blase unter Dehnung ATP frei, wodurch es nach Erregung von sensorischen Afferenzen zur Miktions kommt. Auch in den Zellen des peripheren Nervensystems kann es, je nachdem, ob durch mikromolare ATP-Konzentrationen P2X oder P2Y-Rezeptoren aktiviert werden, zu unterschiedlichen Reaktionen kommen. Eine akute oder chronische ATP-Freisetzung könnte im Nerv durch mechanische Reize (wie Kompression, Überdehnung, oder Stöße) verursacht werden.

Mögliche komplexe Vorgänge die durch eine ATP-Freisetzung durch Kompression eines Nervensegments ausgelöst werden können sollen anhand der folgenden Überlegung dargestellt werden.

Bei der Kompression eines Nervenstrangs werden alle Zellen im betroffenen Bereich einem hohen Druck ausgesetzt durch den die Zellmembranen geschädigt werden und reißen (Maxwell *et al.*, 1991). Dadurch wird einerseits die Signalleitung in den Nervenfasern in beide Richtungen unterbrochen, erkennbar an einem Absinken der Amplitude der Summenaktionspotentiale (Jou & Lai, 1998). Da die ATP-Konzentration im Zellinneren im unteren millimolaren Bereich (2mM (Arcuino *et al.*, 2002), 5mM (Joseph *et al.*, 2003)) liegt, kommt es durch Kompression neben dem Austritt verschiedener zytosolischer Bestandteile auch zur Freisetzung von Ionen und ATP. Das ATP aktiviert nun andererseits bei ausreichender Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration Rezeptoren (vom Typ P2X oder P2Y) auf der Zelloberfläche benachbarter Zellen. Je nach Art des Rezeptors und der Zelle die aktiviert wird können unterschiedlichste Wirkungen auf das umliegende Gewebe vermittelt werden.

Durch die Aktivierung von P2X-Rezeptoren auf nozizeptiven Neuronen kann es über einen Ioneneinstrom zu einer lokalen Depolarisation kommen. Diese kann zur ektopen Excitation des Neurons führen und über eine gesteigerte Aktionspotentialfrequenz die Wahrnehmung von Schmerz auslösen. Dieser Schmerz würde vom Gehirn dorthin projiziert werden, wo sich die freien Nervenendigungen des Neurons befinden, obwohl die Zellerregung von einer proximaleren Stelle der Nervenfaser ausgeht.

Es könnten auch P2Y-Rezeptoren auf Gliazellen oder Neuronen aktiviert werden, die über verschiedene Mechanismen eine Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verursachen. Dadurch werden weitere Prozesse in den Zellen in Gang gesetzt, wie Enzymphosphorylierung, Ausschüttung weiterer neuronaler

Botenstoffe (Jeftinija & Jeftinija, 1998) und möglicherweise sogar eine Änderung der Genaktivierung. Die Beteiligung der P2Y-Rezeptoren an der Schmerzwahrnehmung und -entstehung ist noch nicht vollständig geklärt.

Gleichzeitig mit der Rezeptoraktivierung müsste das ATP jedoch beseitigt werden, um die Signalwirkung einzuschränken oder aufzuheben. Dazu besitzen alle Zellen Ectonucleotidasen auf der Zellmembran, die ATP hydrolysieren können. Beim Abbau des ATP entsteht über ADP und AMP letztlich Adenosin, welches seinerseits Adenosin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren) aktivieren, oder wieder in die Zelle aufgenommen und dort zu ATP rephosphoryliert werden kann.

1.2 Rezeptoren für extrazelluläres ATP

In den letzten Jahren wurde viel daran gearbeitet, die Wirkmechanismen von ATP als neuronalem Transmitter aufzudecken. Es wurden Rezeptoren entdeckt, die sowohl Purin- als auch Pyrimidinderivate als Liganden binden können (vor allem ATP, ADP, UTP, UDP). Nach dem Vorschlag des Nomenclature Committee of International Pharmacological Society wurden sie P2-Rezeptoren genannt und in metabotrope P2Y-Rezeptoren und ionotrope P2X-Rezeptoren unterteilt. Beide Rezeptorarten haben mehrere Subtypen, die in verschiedenen Geweben des Körpers unterschiedlich stark ausgeprägt sind und beide sind unter anderem in folgenden Geweben und Zellen zu finden: in Thrombozyten, Epithelzellen und Endothelzellen, sowie in Zellen des Immunsystems, des zentralen und des peripheren Nervensystem. Es können sogar gleichzeitig mehrere Subtypen von P2X- und P2Y-Rezeptoren auf derselben Zelle exprimiert sein. Im Folgenden sollen vor allem die Subtypen und ihre Funktionen dargestellt werden, die besonders mit der Schmerzwahrnehmung und der Signalfortleitung im peripheren Nervensystem zusammenhängen.

1.2.1 P2Y-Rezeptoren auf Gliazellen und Neuronen

P2Y-Rezeptoren sind metabotrope, G-Protein gekoppelte Proteine mit 7 transmembranären Domänen. Bis jetzt sind 8 verschiedene Subtypen mit der Nummerierung P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14} bekannt. Die Nummerierung erfolgte nach der zeitlichen Reihenfolge des genetischen Nachweises (Ziganshin *et al.*, 2002). Sie ist nicht zusammenhängend, da sich einige als P2Y-Rezeptoren deklarierte Proteine als funktionslos oder schon unter anderem Namen bekannt herausstellten und dann aus der Nummerierung ausgeschlossen wurden. P2Y-Rezeptoren werden je nach Subtyp durch mikromolare Konzentrationen verschiedener Substrate, wie ATP, ADP, UTP und UDP aktiviert. Sie können homo- oder heteromultimere Komplexe bilden und es können von derselben Zelle mehrere Subtypen gleichzeitig exprimiert werden. Nach Aktivierung eines P2Y-Rezeptors wird entweder Phospholipase C aktiviert, die über die Produktion von IP₃ (Inositol-Triphosphat) als intrazellulärem Second-Messenger einen Anstieg der intrazellulären freien Ca²⁺-Konzentration zur Folge haben kann (Ziganshin *et al.*, 2002), oder es kann die Aktivität von Phospholipase A₂ oder Adenylatcyclase beeinflusst werden, wodurch sich die Konzentrationen von Arachidonsäuremetaboliten oder cAMP ändern können (King & Townsend-Nicholson, 2004).

Der Nachweis der P2Y-Rezeptorsubtypen im Gewebe erfolgt meist durch Zugabe verschiedener Agonisten, die eine unterschiedlich starke Aktivierung der Rezeptorsubtypen zur Folge haben. Sie werden nach der Effektivität angeordnet. Aus dem spezifischen Wirkungsprofil kann auf die Expressierung eines bestimmten Rezeptorsubtyps geschlossen werden. Aktivität von P2Y-Rezeptoren wurde auf fast allen Körperzellen festgestellt (Burnstock, 2004). Auf Gliazellen und Neuronen im peripheren Nervensystem wurde folgenden Rezeptorsubtypen eine wichtige Rolle nachgewiesen:

P2Y₁ -Rezeptor: Er wurde auf nicht-myelinisierenden Schwannzellen adulter Ratten (Mayer *et al.*, 1998), und auf Neuronen (mit schmalem Durchmesser und

häufiger Coexpression mit dem P2X₃-Rezeptor) sensorischer Ganglien (Hinterwurzel-, nodöses, Trigeminal-Ganglion) (Ruan & Burnstock, 2003) nachgewiesen.

Bei seiner Aktivierung, die im Menschen durch ADP, in der Ratte sowohl durch ADP als auch ATP geschehen kann, wird die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht, die cAMP-Konzentration kann durch Hemmung der Adenylat-Cyklase erniedrigt werden.

P2Y₂ -Rezeptor: Er wurde auf myelinisierenden Schwannzellen adulter Ratten (Mayer *et al.*, 1998), und in sensorischen Ganglien (zusammen mit P2Y_{1,4,6}) (Ruan & Burnstock, 2003) nachgewiesen.

Dieser Rezeptor kann sowohl durch UTP als auch ATP aktiviert werden und vermittelt, wahrscheinlich über Phospholipase C (Dubyak, 2003), eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Diese Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ kann in Gliazellen zu einer weiteren ATP-Freisetzung durch Ca²⁺-aktivierte Connexin-Hemikanäle an der Membran führen (Cotrina *et al.*, 1998), (Arcuino *et al.*, 2002), (Stout *et al.*, 2002), (Braet *et al.*, 2003). Dieses ATP kann dann weitere Purin-Rezeptoren an benachbarten Zellen aktivieren, sodass eine interzelluläre Ca²⁺-Welle (Radius 200 bis 300µm = einige 100 Zellen in Kultur (Arcuino *et al.*, 2002)) entsteht. Die Ca²⁺-Erhöhung könnte dann auch weitere Prozesse auslösen, wie Enzymphosphorylierungen oder Freisetzung von Glutamat und Aspartat (Jeftinija & Jeftinija, 1998).

P2Y₄ -Rezeptor: Er wurde auf Neuronen sensorischer Ganglien mit mittlerem und großem Durchmesser nachgewiesen (Ruan & Burnstock, 2003).

Die Rolle der P2Y-Rezeptoren bei der Schmerzvermittlung ist noch nicht abschließend geklärt und wird kontrovers diskutiert (Gerevich *et al.*, 2004), da aktuelle Studien widersprüchliche Ergebnisse zeigen. So können P2Y-Rezeptoren

sowohl an der Entstehung als auch an der Unterdrückung von Schmerz beteiligt sein.

1.2.2 P2X-Rezeptoren auf nozizeptiven afferenten Neuronen

P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte, ionotrope Rezeptoren, die bei Aktivierung (durch mikromolare ATP-Konzentrationen) einen Ionenkanal öffnen, der vor allem für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺-Ionen durchlässig ist. P2X-Rezeptoren vermitteln eine schnelle, exzitatorische Wirkung auf die Zelle, die auch mit einer lokalen Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration einhergehen kann.

Es sind derzeit sieben Untereinheiten von P2X₁ bis P2X₇ bekannt, benannt in der Reihenfolge ihrer Beschreibung. Die Untereinheiten bilden funktionelle homooligomere (außer der P2X₆-Untereinheit), und auch heterooligomere (außer P2X₇) Komplexe, die die eigentlichen P2X-Rezeptoren darstellen ((Burnstock, 2004). Die Untereinheiten P2X₁ und P2X₃ desensibilisieren nach Aktivierung schnell, während die anderen Subtypen langsam desensibilisieren. Die heterooligomeren Rezeptoren liegen in ihren Eigenschaften zwischen denen der beteiligten Untereinheiten.

P2X-Rezeptoren wurden in glatten Muskelzellen, Endothel- und Epithelzellen, Gliazellen und Neuronen von Säugetieren beobachtet (King & Townsend-Nicholson, 2004).

Man weiß durch Studien mit Knock-Out Mäusen, dass P2X-Rezeptoren an verschiedenen Prozessen beteiligt sind, wie Thrombenbildung, Cytokinproduktion und -sekretion, Ausschüttung von Glutamat und Aspartat (Jeftinija & Jeftinija, 1998), Fortpflanzung, Miktion, synaptischer Signalübertragung im zentralen und Nozizeption im peripheren Nervensystem (North, 2004).

Nach dem Austritt von ATP aus lysierten Zellen, zum Beispiel nach einer Verletzung, wirkt es als Defektmarker und kann an der Entstehung eines traumatischen Schocks (Bodin & Burnstock, 2001) und an der Vermittlung von Schmerz und Entzündung beteiligt sein (Li *et al.*, 1996).

Im peripheren neuronalen Gewebe wurde die mRNA der Subtypen von P2X₁ bis P2X₇ nachgewiesen (Chizh & Illes, 2001). Für uns sind P2X-Rezeptoren, die an der Schmerzwahrnehmung und Entzündungsprozessen direkt beteiligt zu sein scheinen, von besonderem Interesse. Es folgt nun ein Überblick über die wichtigsten im peripheren Nervensystem bekannten P2X-Rezeptoren und ihre Funktionen.

P2X₃-Rezeptor: Die wichtigste Rolle bei der Schmerzwahrnehmung scheint der homooligomere P2X₃-Rezeptor zu spielen (Wirkner *et al.*, 2007). Sein genetischer Nachweis erfolgte 1995 (Chen *et al.*, 1995). Es wurde bei Mäusen beobachtet, dass bei einem Fehlen des P2X₃-Rezeptors die Schmerzwahrnehmung reduziert sein kann (Cockayne *et al.*, 2000). Der P2X₃-Rezeptor wird besonders stark exprimiert (oft zusammen mit dem P2Y₁-Rezeptor (Ruan & Burnstock, 2003)) auf sensorischen Nerven, vor allem auf afferenten Neuronen des Hinterwurzelganglions (Vulchanova *et al.*, 1998) mit kleinem bis mittelgroßem Durchmesser, in Neuronen des Trigemini- und des nodösen Ganglions, und in sensorischen Hinterhornneuronen des Rückenmarks (Xiang *et al.*, 1998). Da die sensorischen Neurone freie periphere Nervenendigungen besitzen, können sie direkt von extrazellulärem ATP im Gewebe aktiviert werden. Aktivierung des P2X₃-Rezeptors verursacht einen schnellen Ioneneinstrom und führt so über eine lokale Depolarisation zu einer erhöhten Erregbarkeit des Neurons. Der Rezeptor desensibilisiert sehr schnell (innerhalb von 100ms (North, 2004)), wodurch seine Wirkungsdauer limitiert wird.

P2X_{2/3}-Rezeptor: Dieser heterooligomere Rezeptor ist aus zwei P2X₃ und einer P2X₂ Untereinheit aufgebaut (Jiang *et al.*, 2003). Er wurde vor allem auf sensorischen Neuronen nachgewiesen (Lewis *et al.*, 1995) und verursacht

einen langsam ansteigenden Ioneneinstrom, der langsam desensitisiert (North, 2004).

P2X₇ -Rezeptor: Dieser Rezeptor wird insbesondere für inflammatorische und zytotoxische Wirkungen verantwortlich gemacht (Chessell *et al.*, 2005). Der Subtyp P2X₇ ist unter anderem auf Zellen des Immunsystems zu finden, es wurden aber auch Hinweise auf seine Expression in myelinisierenden Schwannzellen von Ratten gefunden (Grafe *et al.*, 1999). Der Rezeptor desensitisiert nicht und kann neben einem Kationenkanal auch eine 4nm große Pore ausbilden, die für Moleküle bis zu einer Größe von 900Da permeabel ist und die Apoptose der Zelle herbeiführen kann (Ziganshin *et al.*, 2002), (Burnstock, 2004). Meist ist der Rezeptor im Inneren der Zelle gespeichert und wird nur unter pathologischen Bedingungen, wie bei Ischämie oder bei Tumoren, in die Zellmembran externalisiert (Ziganshin *et al.*, 2002).

1.3 Extrazelluläres ATP wird durch Ectonucleotidasen abgebaut

1.3.1 Ectonucleotidasen auf Gliazellen und Neuronen

Um die extrazelluläre ATP-Konzentration und damit auch den Aktivierungszustand der Zelle durch P2-Rezeptoren zu regulieren, besitzen alle Körperzellen, somit auch Gliazellen und Neurone, auf ihren Zellmembranen Ectonucleotidasen unterschiedlicher Familien, die ATP schnell hydrolysieren können (K_m-Werte 10-100μM). Die Ectonucleotidasen können auch im Plasma gelöst vorkommen und werden dann als Exonucleotidasen bezeichnet. Ectonucleotidasen konkurrieren mit den ATP-Rezeptoren um eine limitierte Menge an extrazellulärem ATP. Bei der Hydrolyse entstehen, je nach Präferenz der Ectonucleotidase-Familie, Metabolite wie ADP, AMP und Adenosin, die ihrerseits spezielle Rezeptoren aktivieren können.

Es gibt verschiedene Familien von Ectonucleotidasen, die wesentlich am Abbau von ATP und anderen Nucleotiden beteiligt zu sein scheinen.

eNTPDasen - ecto-Nucleosid-5'-Triphosphat-Diphosphohydrolase

Enzyme dieser Familie werden im Nervensystem aller Säugetiere exprimiert. Sie hydrolysieren Purin- und Pyrimidinnukleotide mit unterschiedlicher Präferenz. Im Folgenden soll besonders die charakteristische Hydrolyse von Adeninnucleotiden durch die einzelnen Subtypen der Enzymfamilie dargestellt werden.

eNTPDase1: hydrolysiert etwa gleich gut ATP direkt zu AMP, und ADP zu AMP.

Sie wird im Gehirn und im peripheren Nervensystem exprimiert, besonders stark auf Mikrogliazellen, die bei Ischämie die Expression verstärken können (Zimmermann, 2004).

eNTPDase2: hydrolysiert bevorzugt ATP zu ADP; ADP wird nur sehr langsam zu AMP gespalten (Hydrolyserate für ATP:ADP entspricht 30:1), sodass es zur Akkumulation von ADP kommen kann. Die eNTPDase2 wird von Typ-B-Zellen in der Subventrikulären Zone exprimiert, von denen man annimmt, dass sie neuronale Stammzellen darstellen (Zimmermann, 2004). Besonders spezifisch wurde eNTPDase2 in peripheren Nerven von embryonalen Ratten nachgewiesen. Im Laufe der Entwicklung der Ratte beschränkte sich die Expression von eNTPDase2 explizit auf nicht-myelinbildende Schwannzellen (Braun *et al.*, 2004).

eNTPDase3: hydrolysiert ATP zu ADP zu AMP (ATP:ADP entspricht 5:1)

eNPP - ecto-Nucleotid-Phosphodiesterase/Pyrophosphatase

Diese Ectonucleotidasefamilie hat 5 bekannte Subtypen, von denen bisher 1-3 kloniert und genauer untersucht worden sind. Sie werden in fast allen Geweben exprimiert. Strukturell sind sie nicht mit den eNTPDasen verwandt, sie sind ihnen jedoch in folgenden Eigenschaften sehr ähnlich: sie besitzen beide eine breite Substratspezifität, haben ihr Umsatzoptimum bei alkalischem pH, ihre K_m -Werte liegen zwischen 10 und 100 μ M ATP, und sie arbeiten nur unter Anwesenheit zweifach positiv geladener Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , in millimolaren Konzentrationen). Substrate für die Subtypen eNPP1-3 können Purin- oder Pyrimidinphosphate sein. Sie können zum Beispiel

cAMP zu AMP und Pi,

ATP zu AMP und PPi,

ADP zu AMP und Pi,

NAD zu AMP und Nicotinamid hydrolysieren.

Der Subtyp eNPP2, auch als Autotaxin bezeichnet, wurde auch in neuronalem Gewebe gefunden. Er kann zusätzlich zu den oben genannten Reaktionen die Hydrolyse von

ATP zu ADP und Pi,

AMP zu Adenosin + Pi,

PPi zu 2Pi,

Ap_4A zu ATP und AMP katalysieren (Zimmermann, 2000), (Goding *et al.*, 2003), scheint aber als Ectonucleotidase eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Seine Hauptwirkung entfaltet eNPP2 als ecto-Phospholipase D bei der Bereitstellung von Lysophospholipiden (Joseph *et al.*, 2004).

Alkalische Phosphatase

Diese Enzymfamilie spaltet (unspezifisch) von Tri-, Di- und Mono-Phosphaten jeweils ein inorganisches Phosphat (Pi) ab. Es kann somit ein Nucleotid-triphosphat

zu einem Nucleotid und drei Pi hydrolysiert werden, dazu werden jedoch millimolare Substratkonzentrationen benötigt (Zimmermann, 2000).

Ecto-5'-Nucleotidase

Dieses Enzym ist auch unter Lymphozyten-Oberflächenprotein CD73 bekannt. Es katalysiert die Hydrolyse von Nucleosid-5'-Monophosphaten zu ihrem entsprechenden Nucleosid und Pi. Ecto-5'-Nucleotidase ist das wichtigste Enzym bei der Bereitstellung von extrazellulärem Adenosin aus AMP (Km-Wert für AMP liegt im unteren mikromolaren Bereich).

Sie wird im Gehirn vor allem von Astrozyten exprimiert (Zimmermann, 2000).

1.4 Metaboliten des ATP-Abbaus aktivieren weitere Rezeptoren

1.4.1 Adenosinrezeptoren am peripheren Nerv

Adenosin kann in nanomolarer Konzentration G-proteingekoppelte P1-Rezeptoren (A_1 , A_{2a} , A_{2b} , A_3) an nozizeptiven Hinterwurzelneuronen aktivieren. Der A_1 -Adenosinrezeptor befindet sich unter anderem auf Neuronen des Hinterwurzelganglions und auf den zentralen Endigungen afferenter Neurone. Er hat im peripheren Nervensystem eine antinozizeptive Wirkung während die A_{2a} und A_3 -Rezeptoren pronozizeptiv und antiinflammatorisch wirken (Sawynok, 1998). Der A_2 -Rezeptor benötigt zur Aktivierung eine etwas höhere Adenosin-Konzentration als der A_1 -Rezeptor (King & Townsend-Nicholson, 2004). Es ist nicht genau bekannt, welche Rezeptoren in verschiedenen Situationen und Geweben stärker aktiviert werden.

1.5 Nervenkompression und Schmerz - ATP als Signalstoff

Verletzung eines Nervs, zum Beispiel durch Kompression oder Einstechen, führt subjektiv zu einem Funktionsverlust des Nervs (im Sinne von Gefühlsstörungen und Taubheitsgefühl) und zur Wahrnehmung von Schmerz (ausgelöst durch eine erhöhte Aktionspotential-Frequenz in nozizeptiven afferenten Neuronen). Bei Kompression wird im Nerv die Fortleitung der Aktionspotentiale und die Morphologie der Axone und Schwannzellen verändert.

Bei genauerer funktioneller Betrachtung des Geschehens sind die ausgelösten Empfindungen zunächst widersprüchlich. Wie kann es an manchen Fasern zu einem Funktionsverlust und gleichzeitig an benachbarten zu einem Funktionsgewinn kommen?

Der Funktionsverlust des Nervs ist besonders gut erkennbar (durch elektrophysiologische Messungen) an einem Absinken der Amplitude und einer Verlängerung der Latenz der Aktionspotentiale der A-Fasern (Shi & Blight, 1996) (Maxwell *et al.*, 1991). Bei der Kompression wird aus dem Nerv ATP freigesetzt, welches über die Aktivierung von Purin-Rezeptoren unterschiedliche Reaktionen in Schwannzellen und Neuronen hervorruft, und zu einer Erregungssteigerung in den dünnen nicht-myelinisierten Neuronen führen kann.

Das ATP kann Purin-Rezeptoren vermutlich nur in unmittelbarer Nähe der Kompressionsstelle aktivieren, da es von Ectonucleotidasen schnell abgebaut wird. Durch die Aktivierung von P2X-Rezeptoren könnte es zu einer ektopten Stimulation von Nervenfasern kommen. Die Aktionspotentiale dieser über P2X-Rezeptoren ektopt stimulierten afferenten Nervenfasern signalisieren im Gehirn Schmerz, der in die Körperregion projiziert werden könnte, in der die Nervenfasern normalerweise Reize empfangen.

Die Reizleitung anderer Neurone (efferent und afferent), die nicht ektopt über P2X-Rezeptoren aktivierbar sind, kann an der Kompressionsstelle unterbrochen sein.

Signale aus der Peripherie oder dem Gehirn würden dann ihren Zielort nicht erreichen, und es könnte zu Missempfindungen oder Taubheitsgefühl kommen.

Die Vorgänge in einem intakten peripheren Nerv nach Kompression sind jedoch noch nicht vollständig bekannt. Deshalb sollten Details zur folgenden Überlegung in dieser Arbeit untersucht werden.

2 FRAGESTELLUNG

Rezeptoren für extrazelluläres ATP sind an nozizeptiven Nervenfasern in peripheren Nerven von verschiedenen Säugetierspezies nachgewiesen worden. Sehr viel geringeres Wissen ist über die Bedingungen und Mechanismen der Freisetzung und des sofortigen Abbaus von ATP am intakten peripheren Nerv bekannt. Ziel der Untersuchungen war es deshalb, die mögliche Freisetzung von ATP aus isolierten Nervensegmenten mit Hilfe von ATP-induzierter Lumineszenz zu messen und den ATP-Abbau zu quantifizieren. Insbesondere sollten folgende Bedingungen getestet werden:

1. Es sollte eine quantitative Analyse einer möglichen Freisetzung von ATP an peripheren Nervenpräparaten durch standardisierte Kompression stattfinden.
2. Besonderes Augenmerk sollte darauf gelegt werden, ob die freigesetzte ATP-Konzentration ausreichend ist, um P2-Rezeptoren aktivieren zu können. Dabei sollte der elektrophysiologische Zustand des Nervs überwacht werden.
3. Die Kinetik des ATP-Abbaus an Astrozyten und Spinalwurzeln sollte nach Kompression und nach Zugabe von 150nM ATP beobachtet werden. Die präparatspezifischen Abbaugeschwindigkeiten sollten miteinander verglichen werden.
4. Die Wirkung von Ectonucleotidase-Hemmstoffen sollte an den Präparaten getestet werden. So sollten Ectonucleotidase-Familien identifiziert werden, die für den ATP-Abbau im intakten peripheren Nerv relevant sind.
5. Es sollte geklärt werden, welche ATP-Konzentrationen mit der verwendeten Methode registriert werden können und wo die Grenzen der Lumineszenzmessung mit Glühwürmchen-Luciferase liegen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Präparate und Methoden

3.1.1 Spinalwurzelpräparate

Für die Versuche wurden 1,5 bis 2cm lange Spinalwurzelsegmente aus dem Wirbelkanal adulter Wistar-Ratten (250g bis 450g; durch CO₂-Vergiftung getötet) entnommen, und nach Vorderwurzeln (30% nicht-myelinisierte Fasern) und Hinterwurzeln (75% nicht-myelinisierte Fasern) sortiert. Die Hinterwurzelganglien wurden gleichzeitig entnommen, von Epineurium getrennt und auf eine Länge von 3mm zugeschnitten. Versuche an den Präparaten wurden gleich nach Präparation oder spätestens am folgenden Tag durchgeführt. Gelagert wurden die Präparate in HEPES-Lösung bei 4 - 7°C im Kühlschrank.

Nach Abschluss der Messungen wurden die Spinalwurzeln und Ganglien aus der Lösung genommen und mit der Analysewaage KERN 770 gewogen.

3.1.2 Astrozytenkultur

Um den Abbau von ATP durch Gliazellen beobachten zu können, stellte uns Frau S. Meier aus der Arbeitsgruppe von Frau Dr. C. R. Rose Astrozytenkulturen zur Verfügung, die aus dem Hippocampus neugeborener Bulb C Mäuse gewonnen worden waren. Dazu wurden Hippocampi aus den Mäusen präpariert und die Hirnhäute entfernt. Die Hippocampi wurden dann 20 bis 40 Minuten in Papain gelagert, um die Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Nach Absaugen des Papains wurde Trypsininhibitor-BSA-Mischung zugegeben, 15 Minuten inkubiert, dann wieder abgesaugt. Nach dreimaligem Waschen mit Glia-Medium und vorsichtigem Lösen der Zellen hatte die Endverdünnung 40000 Zellen pro Milliliter. Davon wurden je 100µl auf ein Coverslip-Glasplättchen (mit Poly-D-Lysin beschichtet) in einer Schale einer Mikrotiterplatte pipettiert und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Dann wurden 500µl Glia-Medium addiert und zweimal pro Woche durch

frisches ersetzt, bis die Zellen nach etwa vier Wochen die Coverslips einschichtig bewachsen hatten. So konnten sie für die Messungen verwendet werden, es mussten nur das Glia-Medium durch 400µl HEPES-Lösung ersetzt, eventuell Hemmstoffe addiert, und 50µl ATP-Assay-Mix zugefügt werden, bevor die erste Schale in den Fokus unseres Mikroskops platziert werden konnte.

3.1.3 Bestimmung der ATP-Konzentration durch Lumineszenzmessung

Um den Abbau und die Freisetzung von ATP quantitativ einschätzen zu können, wurde eine Methode verwendet, deren Einzelergebnisse sich a) proportional zur ATP-Konzentration in einer Badlösung quantifizieren, und b) nach der Zeit (pro Sekunde) aufzeigen lassen.

Besonders effektiv und sensitiv lässt sich ATP indirekt bei der Lumineszenzreaktion mit Luciferin und Glühwürmchen-Luciferase in Echt-Zeit messen. Glühwürmchen-Luciferase produziert bei der Reaktion mit Luciferin, ATP, Sauerstoff und Magnesiumionen ein gelb-grünes Licht mit einem Emissionsmaximum bei 562nm.

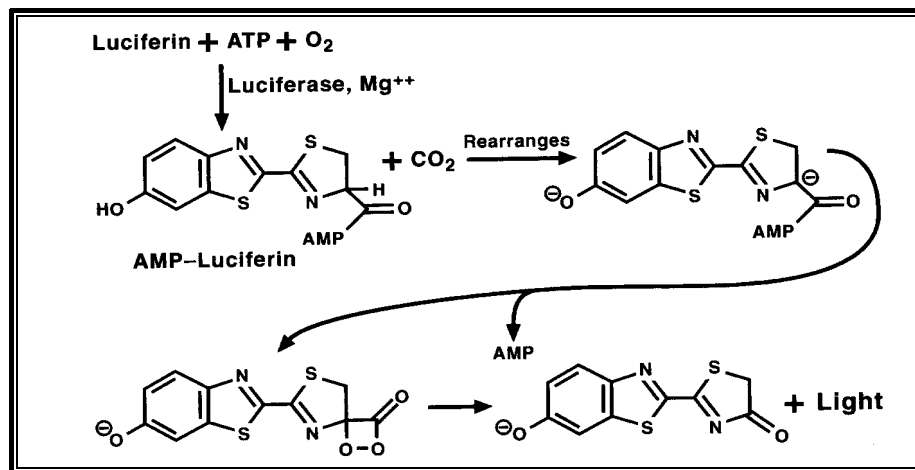


Abbildung 3.1-1 Reaktionsschema

In der Gegenwart von ATP wird das Kohlenstoffatom im Thiazolring des Luciferins von Sauerstoff angegriffen. Dadurch entsteht ein Dianion, welches oxidiert wird und sich als Dioxetan reorganisiert. Durch Sauerstoffabgabe bildet sich reaktives Oxyluciferin. Man vermutet, dass bei der Oxyluciferinbildung ein Elektronentransfer vom Dianion stattfindet, bei dem Photonen freigesetzt werden. Der Wirkungsgrad dieser Reaktion beträgt etwa 33%, sie ist somit eine der effektivsten bekannten Licht emittierenden Reaktionen.

3.1.4 Elektrophysiologische Messungen

Um zu beobachten wie sich verschiedene Eingriffe (ATP, ATP-Assay-Mix, Entzündungssubstanzen, Kompression) auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Spinalwurzelpräparate auswirken, wurden ihre Summenaktionspotentiale kontinuierlich gemessen. Die Enden der Nervensegmente wurden dafür in Saugelektroden eingezogen. An einem Ende der Saugelektrode wurde über Silberdrähte (Elektroden) jede Sekunde mit konstanter Reizstärke (Reizdauer 0.1 ms) stimuliert. Die Saugelektrode am anderen Ende diente zur Aufzeichnung der Summenaktionspotentiale der Nervenfasern. Daraus konnten Aussagen über den elektrophysiologischen Zustand des Nervs gemacht werden. Besonderen Wert legten wir auf Veränderungen der Amplitude (peak) und der Latenz der Summenaktionspotentiale. Als Zeichen für eine Schädigung des Präparates konnte ein Absinken der Amplitude und eine Verlängerung der Latenz gemessen werden. Gleichzeitig wurde durch Lumineszenzmessung die ATP-Konzentration am Präparat beobachtet.

3.2 Messplatz und Geräte

3.2.1 Geräte

Mikroskop: AXIOVERT 200 von Zeiss, eingestellt war eine 10 fache Vergrößerung, das Gesichtsfeld hatte einen Durchmesser von 2mm

Photon Counting Unit von Hamamatsu mit hochempfindlichem Photomultiplier (H7421), der maximale nicht schädliche Lichteinfall liegt bei 10^6 Photonen pro Sekunde, das entspricht einer Intensität die mit dem an Dunkelheit adaptierten Auge gerade noch wahrgenommen werden kann

Schutz: Der speziell angefertigte Verbindungstubus zwischen Mikroskop und Photon Counting Unit enthält den **Uniblitzzhutter** von der Firma Vinzent zum Schutz der Photon Counting Unit vor Lichteinfall

Magnetschüttler für Mikrotiterplatten: VARIOMAG TELESHAKE von H+P Labortechnik AG, mit speziell angefertigter Mikrotiterplatten-Halterung

Analysewaage KERN 770, Messgenauigkeit von 0,1mg

Motorisierter Micro-Manipulator LN-Mini 25 mit einem Steuergerät der Firma Luigs & Neumann (Ratingen, Deutschland), dazu eigens angefertigte Metallstifte (unterer Teil gegen den oberen 1cm frei verschiebbar) für Metallstempel von 0,1 bis 1mm Durchmesser

3.2.2 Organbäder

Es wurden zwei Schalen für die verschiedenen Bedingungen verwendet: die ATP-Freisetzung wurde in der Saugelektrodenschale, der ATP-Abbau in der Mikrotiterplatte mit vier Schalen beobachtet.

a) Saugelektrodenschale

Das zu messende Nervensegment wurde mit 400µl HEPES-Lösung und 50µl ATP-Assay-Mix in eine runde, transparente Schale aus Kunststoff mit Glasboden eingelegt und mit beiden Enden in zwei gegenüberliegende Saugelektroden (Abstand ca. 3mm) aus Glas geschoben. Anschließend wurden die Nervensegmente mit Vaseline in den Saugelektroden befestigt und so elektrisch gegen die Lösung isoliert. In die Saugelektroden wurde je ein Silberdraht geschoben. An einem wurde die Spannung gegen im Bad befindliche Drähte gemessen. Über den anderen Draht wurde computergesteuert elektrisch stimuliert und beobachtet, wie sich Amplitude und Latenz der folgenden Summenaktionspotentiale im Nerv bei Zugabe verschiedener Substanzen und unter mechanischer Stimulation veränderten. Nach dem Messen wurden die Drähte und die Schale gründlich mit heißem Wasser gereinigt und mit destilliertem Wasser gespült, damit für den nächsten Versuch kein ATP in der Schale verblieb.

b) Mikrotiterplatten mit vier Schalen

Die transparenten Kunststoffträger mit vier nummerierten Schalen, wie sie auch in der Zellkultur verwendet werden, eigneten sich hervorragend für Lumineszenzmessungen.

Bei Rotationsmessungen boten sie für alle vier Schalen identische Bedingungen beim Schütteln. Um während der Messzeit Verdunstung zu vermeiden wurden die Kunststoffträger mit dem zugehörigen Deckel geschlossen. Die Mikrotiterplatten waren Einwegmaterial und konnten nach Verwendung entsorgt werden. So mussten sie nicht sorgfältig von ATP gereinigt werden. In die Mikrotiterplatte wurden 400µl HEPES-Lösung, Hemmstoffe wie $\beta\gamma$ -me-ATP oder ARL 67156 gegeben, anschließend Nervenpräparate in die Lösung gelegt. Dann wurden 50µl ATP-Assay-Mix addiert, gemischt und die Gitter eingepasst. Die Platte wurde so auf dem Mikroskop platziert, dass sich die erste Schale über dem 10 fach vergrößernden Objektiv befand und der Fokus direkt auf einen Nerv oder in die Flüssigkeit zielte.

Das Gesichtsfeld hatte einen Durchmesser von 2mm. Alle 100 bis 200 Sekunden wurde die Mikrotiterplatte nach manuellem Mischen um eine Schale weitergedreht und diese Schale in den Fokus platziert. Die Messzeit betrug mit der Messung der Ausgangswerte (1200 Sekunden) immer ein Minimum von 5400 Sekunden. Es wurde nach unmittelbarer ATP-Zugabe alle 100 Sekunden rotiert, um bessere Ergebnisse für die Auswertung zu erzielen, da die emittierte Anzahl an Photonen bei den Messungen mit Nervenpräparaten nach ATP-Zugabe nach einer kurzen Emissionsspitze sehr schnell abfiel. Erst bei gleichmäßiger Photonenemission wurde alle 200 Sekunden rotiert. Durch die Methode ließen sich vier jeweils um 100 Sekunden versetzt laufende Messungen im Rotationsverfahren beobachten. Das bot identische Bedingungen für die Versuche und reduzierte die Messdauer. Da alle Schalen mit gleich viel Flüssigkeit gefüllt waren, musste die Einstellung des Fokus während einer Messreihe nicht mehr nachjustiert werden.

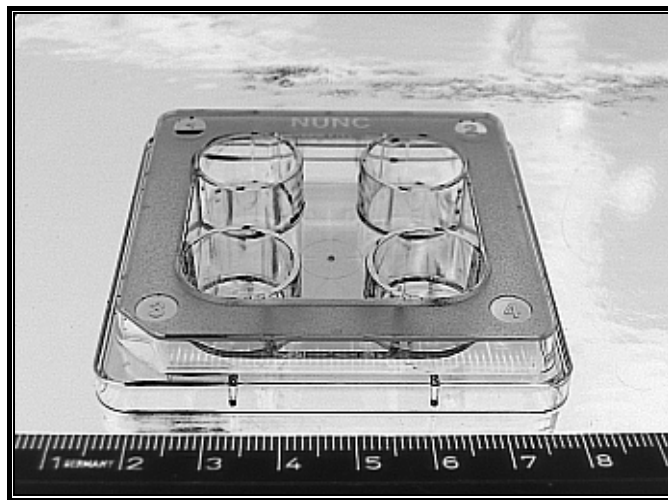


Abbildung 3.2-1 Mikrotiterplatten mit vier Schalen

Jede der Schalen wurde mit der Standardmischung aus 400 μ l HEPES-Lösung und 50 μ l ATP-Assay-Mix befüllt. Zuerst wurden die Nervenpräparate in 400 μ l HEPES-Lösung eingelegt, dann wurden 50 μ l ATP-Assay-Mix pro Schale zugefügt und ein Gitternetz eingepasst. Während den Messungen wurde der Kunststoffträger alle 100 bis 200 Sekunden geschüttelt.

Gitternetze

Um bei den Messungen an Spinalwurzelsegmenten und Spinalganglien jeweils identische Bedingungen zu schaffen, und um zu verhindern, dass die Präparate beim Mischen mit der Pipette aufgesaugt und beschädigt würden, setzten wir eigens angefertigte, exakt passende Gitternetze aus halbtransparentem Kunststoff in die Schalen der Mikrotiterplatten. Diese feinmaschigen Gitter mit einem Durchmesser von 14mm wurden vorsichtig mit einer Pinzette in die Flüssigkeit gedrückt und mit HEPES-Lösung benetzt, um die Nervenpräparate ohne Quetschen zu befestigen. Nach den Messungen wurden die Gitternetze zuerst mit heißem, dann mit destilliertem Wasser gründlich gereinigt.

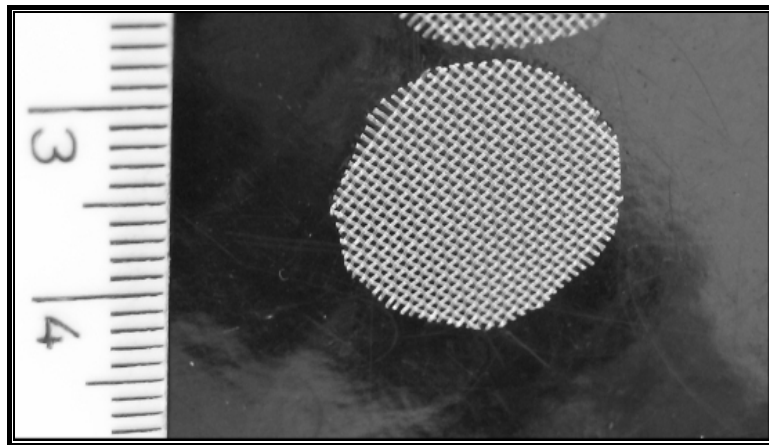


Abbildung 3.2-2 Gitternetze

Speziell gefertigte Gitternetze mit einem Durchmesser von 14 mm halten die Nervenpräparate in der Flüssigkeit und schützen sie vor Beschädigung beim Mischen und Pipettieren.

3.3 Substanzen

Adenosin 5' Triphosphat Biolumineszenz Assay Kit (FL-AA):

von Sigma-Aldrich bestehend aus:

FL-AAM (ATP-Assay-Mix):

enthält gefriergetrocknetes Pulver mit Glühwürmchen Luciferase, Luciferin, MgSO₄, DTT (Dithiothreitol), EDTA, BSA (bovines Serumalbumin) (verhindert die Deaktivierung von Luciferase durch Luciferin) und Tricin Puffersalze. Er wurde in 5ml sterilem, gefiltertem, destilliertem Wasser gelöst und auf 50 Eppendorffgefäße mit je 100µl verteilt. Bei Aufbewahrung im Eisfach bei -20°C bleibt der ATP-Assay-Mix stabil.

FL-AAS (ATP-STANDARD)

enthält 1mg ATP (entspricht 2.0×10^{-6} Mol) Es wurde in 5ml sterilem, gefiltertem, destilliertem Wasser gelöst, auf 50 Eppendorffgefäße mit je 100µl verteilt und bei -20°C aufbewahrt. Unmittelbar vor einem Versuch wurde der Inhalt eines Gefäßes mit 900µl HEPES-Lösung verdünnt.

HEPES-Lösung:

Enthielt 118mM NaCl, 3mM KCl, 1,5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20mM Na-Gluconat, 5mM D-Glucose und 6mM HEPES (N-2-HydroxyEthylPiperazine-N'-2-EthaneSulfonsäure). Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Die maximale Lagerungsdauer betrug 36 Stunden.

Zellkultur:

Poly-D-Lysin 0,04% (Sigma), Papain (Roche), Trypsin-Inhibitor Typ II-0, Hühnereiweiß (Sigma), BSA Fraktion V (Sigma)

Glia-Medium: 4ml 1 M Glucoselösung, 1ml G-5-Supplement 100x (Gibco), 20ml FCS (Gibco), 180ml DMEM/F12 (Gibco)

Hemmstoffe:

βγ-me-ATP (300µM), ARL 67156 (100µM), Apyrase (50µg)

(von Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

3.4 Durchführung

Um die Anzahl der detektierten Photonen/s in Relation zur aktuellen ATP-Konzentration im Versuch zu setzen, wurden Eichkurven für das Verhältnis der gemessenen Anzahl der Photonen/s zur ATP-Konzentration erstellt, die als Richtwert für alle weiteren Messungen dienten. Alle Messungen fanden bei konstanter Raumtemperatur (22- 24°C) in völliger Dunkelheit statt.

Da die Helligkeit des emittierten Lichtes bei den von uns verwendeten Konzentrationen für das menschliche Auge und somit auch für normale Kameras nicht ausreichend war, platzierten wir die Messschalen in den Fokus unseres Mikroskops (AXIOVERT 200 von Zeiss, Objektiv mit zehnfacher Vergrößerung), welches über einen eigens angefertigten Verbindungstubus, in den der Uniblitzzhutter der Firma Vinzent eingebaut war, Anschluss an die hochempfindliche Photon Counting Unit von Hamamatsu hatte. So konnten genau definierte Bereiche in den Messschalen, auf die der Fokus gerichtet war - in unserem Fall Segmente eines Nervenpräparates - beobachtet werden. Gemessen wurde mit zwei verschiedenen Schalen: mit der Saugelektrodenschale (ATP-Freisetzung) und mit der Mikrotiterplatte mit vier Schalen (ATP-Abbau).

Je nach Anzahl der umgesetzten ATP-Moleküle entstanden entsprechend viele Photonen/s, welche mit dem hochempfindlichen Photomultiplier und der Photon Counting Unit der Firma Hamamatsu registriert, gezählt und am Computer mit dem zugehörigen Programm C8855 graphisch dargestellt wurden.

Wie konnte man von der Anzahl der Photonen/s auf die ATP-Konzentration schließen?

Die von der ATP-Konzentration abhängige Änderung der Aktivität der Luciferase spiegelte sich in einer Änderung der pro Sekunde freigesetzten, gemessenen Photonen wider, und konnte so graphisch dargestellt werden. Wenn die bekannte zugegebene ATP-Konzentration niedrig war, wurde auch nur eine geringe Anzahl

an Photonen erzeugt und gemessen. Da die Abbaurate von ATP durch die Luciferase im nanomolaren Bereich linear war, ließen sich umgekehrt auch relative Rückschlüsse von der gemessenen Anzahl an Photonen/s auf die zugehörige ATP-Konzentration in der Lösung ziehen. Dieser Zusammenhang stellte die Grundlage für Eichkurven dar, die für verschiedene bekannte zugegebene ATP-Konzentrationen erstellt wurden.

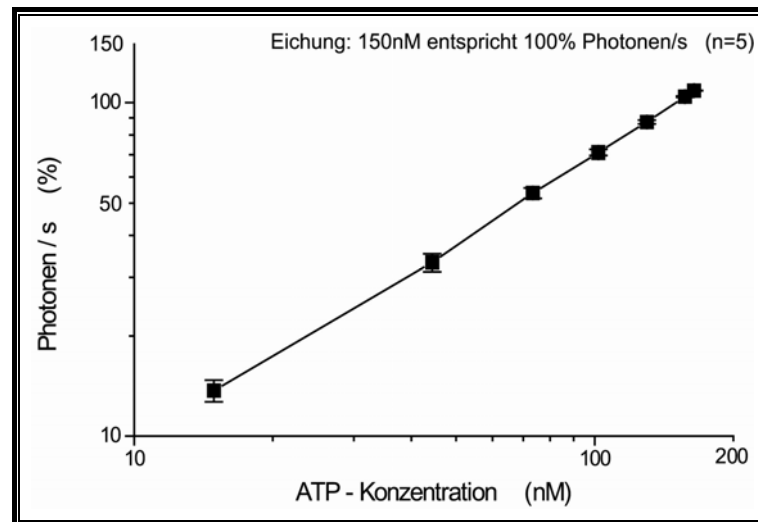


Abbildung 3.4-1 Eichkurve für 15 bis 165nM ATP

Das Verhältnis der gemessenen Photonen/s in Prozent (150nM entspricht 100%) ist zur zugegebenen nanomolaren ATP-Konzentration in doppellogarithmischer Darstellung linear. Bei den Versuchen wurden 150nM ATP zugegeben. Die anfangs jeweils maximale gemessene Zahl der Photonen/s wurde als 100% beschrieben. Bei Erstellung der Eichung wurden zusätzlich höhere Konzentrationen gegeben, um einen linearen Verlauf des Verhältnisses sicher zu stellen. Alle Messungen der ATP-Freisetzung wurden mit 15 und 150nM ATP abgeglichen, daraus wurde die erreichte freigesetzte ATP-Konzentration ermittelt.

Elektrophysiologisch wurde kontrolliert, dass die Nervenpräparate keine Schädigung durch das ATP oder den ATP-Assay-Mix erfuhr. Die Messung des Ausgangswertes erfolgte immer ohne ATP: Bei Messungen ohne Präparat einstufig: HEPES-Lösung mit ATP-Assay-Mix, bei Versuchen mit Nervenpräparaten zweistufig: erste Messung mit Präparat in HEPES-Lösung, zweite Messung nach Zugabe von ATP-Assay-Mix.

3.4.1 ATP-Freisetzung durch mechanische Stimulation

Um ATP-Freisetzung zu messen, wurde ein Nervenpräparat (entweder eine Vorder- oder eine Hinterwurzel) in die Saugelektrodenschale eingelegt und elektrophysiologisch überwacht. Gleichzeitig wurde mit der Lumineszenzmessung die ATP-Konzentration im Gesichtsfeld beobachtet, dann mechanisch stimuliert (Abbildung 3.4-2), in unserem Fall durch Verletzung des Nervs durch Kompression. Der elektrophysiologische Zustand des Präparats verschlechterte sich, deutlich erkennbar an einer Verlängerung der Latenz und einer Senkung der Amplitude der Aktionspotentiale.

Durch die Verletzung wurde ATP aus dem Nerv freigesetzt, welches mit der Lumineszenzmethode detektiert werden konnte. Da bei dieser Methode ein Mischen der Lösung unmöglich war (das freigesetzte ATP wurde innerhalb weniger Sekunden abgebaut) konnte die gemessene Anzahl an Photonen/s nur Rückschlüsse auf die punktuelle ATP-Konzentration an der Verletzungsstelle direkt im Gesichtsfeld, nicht jedoch in der übrigen Lösung zulassen.

Bei allen Messungen, die eine ATP-Freisetzung zeigten, wurde vor Ende der Messung ATP zugegeben. Die ATP-Konzentrationen wurden so gewählt (15nM und 150nM), dass sie in der Größenordnung der freigesetzten ATP-Konzentration lag. So konnte abgeschätzt werden, wie viel ATP freigesetzt worden war.

Zum Schluss der Messungen wurden 50µg Apyrase zugegeben. Sie spaltete das vorhandene ATP innerhalb von Sekunden und die Messung erreichte wieder den Ausgangswert. So konnte sichergestellt werden, dass die beobachtete Lumineszenz durch ATP verursacht war.

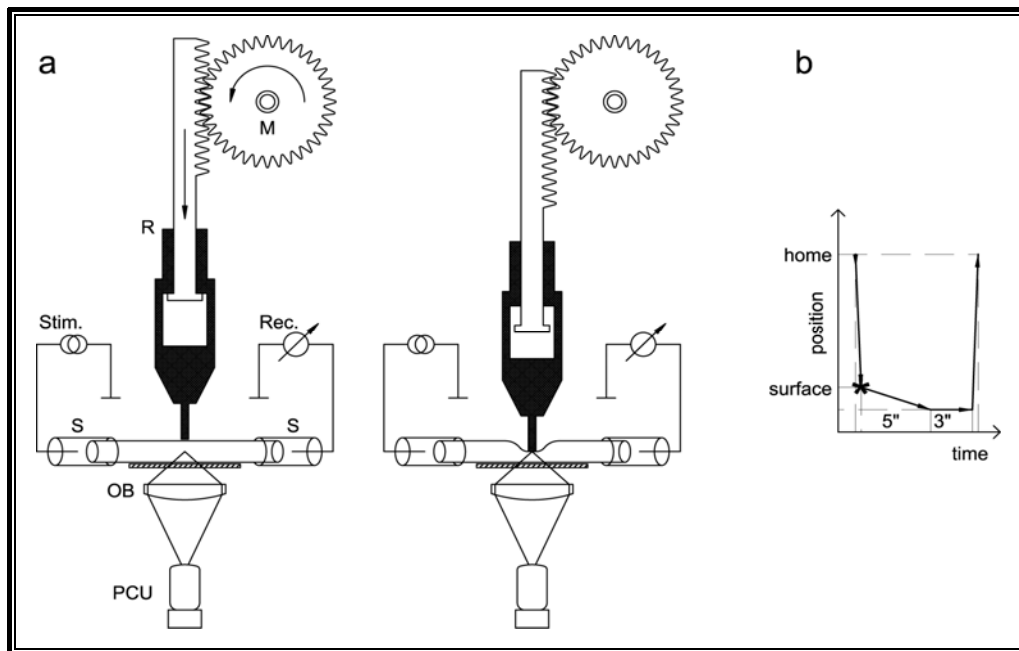


Abbildung 3.4-2 Kompression einer Spinalwurzel mit dem Mikro-Manipulator

Um ATP aus den Nervenpräparaten in der Saugelektrodenschale (S) freizusetzen, wurde ein motorisierter Micro-Manipulator (M), der vom Nebenraum über ein Steuergerät angesteuert werden konnte, so installiert, dass verschiedene Aufsätze (R) angebracht werden konnten (a). Diese Aufsätze bestanden aus einem zweiteiligen Metallstift, dessen unterer hängender Teil (7g schwer) einen Zentimeter frei nach oben geschoben werden konnte, um ein Zerstechen des Glasbodens der Saugelektrodenschale zu vermeiden. Am unteren Teil wurden Metallstempel mit einem Durchmesser von 0,1 bis 1mm befestigt. Sie wurden so eingestellt, dass ihre Spitze die Oberfläche des Präparates gerade berührte (b). Diese Position wurde als „surface“-Position im Steuergerät gespeichert. Anschließend wurde der Manipulator bis zum Anschlag nach oben („home“) gefahren und über eine Mikrometerschraube die gewünschte Einstichtiefe festgelegt (0,5 bis 1,0mm).

Nach dem Start der Messung wurde einige Minuten der Ausgangswert gemessen, dann ferngesteuert eingestochen (5 Sekunden bis zum Erreichen der eingestellten Einstichtiefe, 3 Sekunden Arretierung am tiefsten Punkt, Stärke der Kompression 66 mN) und nach 8 Sekunden wieder bis zur „home-Position“ zurückgezogen. Während der Prozedur wurde der Zustand des Nervs elektrophysiologisch (Stim., Rec.) beobachtet und die ATP-Freisetzung durch Lumineszenzmessung mit der Photon Counting Unit (PCU) protokolliert.

3.4.2 Messung des ATP-Abbaus in der Mikrotiterplatte

Biolumineszenz wird seit Jahren in vielen Bereichen verwendet und liefert genaue Aussagen über die vorhandene ATP-Konzentration. Allerdings wird bei der Messung des ATP-Abbaus vorausgesetzt, dass die ATP-, Luciferin- und Luciferasekonzentration in der Badlösung überall gleich ist. Beim Einfrieren des ATP-Assay-Mix machten wir allerdings die Beobachtung, dass sich manche Bestandteile nach einiger Zeit an der Flüssigkeitsoberfläche sammelten. Um Unregelmäßigkeiten bei der Durchmischung und somit Schwankungen bei den Aufzeichnungen zu verhindern und um eine gleichmäßige ATP- und ATP-Assay-Mix-Konzentration in den Schalen der Mikrotiterplatten zu gewährleisten, entwickelten wir zwei Varianten der Durchmischung:

a) manuelles Mischen

Die Schalen der Mikrotiterplatten wurden wie beschrieben präpariert und eingelegt. Die Mikrotiterplatte wurde alle 100 bis 200 Sekunden hochgehoben, von Hand geschüttelt (je 4 mal ellipsenförmig im und entgegen dem Uhrzeigersinn dann 4 mal diagonal) und um eine Schale weitergedreht wieder in den Fokus gestellt. Nachdem 1200 Sekunden lang die Ausgangswerte im Rotationsverfahren gemessen wurden, wurde mit der Zugabe von 2µl ATP-Lösung (150nM) in die erste Schale begonnen und die Lösung durch siebenmaliges Aufziehen mit einer 80µl Pipette gemischt. Anschließend wurde der Kunststoffträger wie beschrieben von Hand geschüttelt, um auch die Lösungen in den anderen Schalen zu mischen. Dann wurde die Schale mit dem ATP in den Fokus gestellt, das Licht gelöscht, und der Raum verlassen. Vom Nebenraum aus wurde der Shutter geöffnet und die Photon Counting Unit wieder eingeschaltet.

100 Sekunden später wurde der Shutter wieder geschlossen, die Photon Counting Unit ausgeschaltet. Im Messraum gaben wir ATP in die nächste Schale und führen wie beschrieben mit allen vier Schalen fort. Während der gesamten Messung lief die

graphische Darstellung am PC pro Sekunde (X-Achse) weiter, wodurch für die Zeit während des Betretens des Raumes (PCU ausgeschaltet) keine Photonen/s gemessen wurden, und dort der Wert 0 automatisch eingetragen wurde.

b) maschinelles Mischen

Angenehmer für den Untersucher gestaltete sich das Messen mit dem Magnetschüttler VARIOMAG TELESHAKE von H+P Labortechnik AG mit einer eigens angefertigten Spezialhalterung für Mikrotiterplatten. Hier musste lediglich nach Einlegen der Platte und Fokussieren auf die zu messende Schale am Magnetschüttler die gewünschte Intensität eingestellt werden. Nach Zugabe von ATP auch ohne Mischen mit einer Pipette verteilte sich dieses innerhalb weniger Sekunden gleichmäßig in der Badlösung. Aufgrund der Spezialhalterung war es bei dieser Variante nur schlecht möglich im Rotationsverfahren zu messen. Deshalb wurden meist Einzelversuche kontinuierlich über mindestens 4000 Sekunden gemessen.

Bis zu vier Hinterwurzeln (DR), Vorderwurzeln (VR) oder Ganglien (DRG) wurden bei den Versuchen in eine Schale der Mikrotiterplatten gegeben, damit man den ATP-Abbau deutlich erkennen konnte. Es wurde beobachtet, mit welcher Geschwindigkeit eine definierte, zugegebene ATP-Menge von den verschiedenen Präparaten und von der Luciferase abgebaut wurde. Anschließend wurden die Messungen in der Anwesenheit von Hemmstoffen wiederholt und die Abbauraten verglichen.

3.4.3 Allgemeines Vorgehen bei der Lumineszenzmessung

Es war unerlässlich vor jedem Betreten des Messraumes die Photon Counting Unit auszuschalten und den Shutter zu schließen, um sie vor starkem Lichteinfall und dadurch vor Beschädigung zu schützen. Das Gerät war so empfindlich, dass es

bereits bei einer Lichtstärke, die mit dem Auge gerade noch wahrgenommen werden konnte, geschädigt worden wäre.

Beim Betreten des Messraumes wurden die Schalen geschüttelt, gemischt, rotiert, Substanzen addiert oder Einstellungen für die mechanische Stimulation justiert. Dabei diente eine 40 Watt Glühbirne als Lichtquelle. Danach löschten wir alle Lichter, kontrollierten die Verdunkelung und verließen den Raum. Vom Nebenraum aus steuerten wir die Photon Counting Unit und das Shutterssystem, um einen ungewollten Lichteinfall zu vermeiden, der auch die Messungen gestört hätte. Es sollten nur Photonen gemessen werden, die durch die Lumineszenzreaktion entstanden waren. Besonders zu beachten war hier, dass die an der Decke befindlichen Neonröhren „nachleuchteten“ und somit mindestens 10 Minuten vor Versuchsbeginn gelöscht werden mussten, um falsche Werte bei den Aufzeichnungen zu vermeiden.

Dank dieses Vorgehens wurden von der hochempfindlichen Apparatur nur noch sehr wenige Photonen im Raum registriert, die nicht durch Lumineszenz entstanden waren. Dieses Phänomen wurde als Dunkelrauschen bezeichnet und entstand durch den Eintritt von einzelnen Photonen durch winzige, nicht wahrnehmbare Defekte in der Verdunkelung (zum Beispiel an Schlüssellochern oder Türrahmen). Seine Intensität war gering, musste aber bei der Auswertung der ATP-Konzentrationen berücksichtigt werden. Deshalb wurde bei den Messungen in den Kulturschalen 15 Minuten vor ATP-Zugabe mit den Aufzeichnungen begonnen. Dies ermöglichte es dem ATP-Assay-Mix auch ATP abzubauen, das ungewollt, zum Beispiel durch Verunreinigung der Pipettenspitzen oder durch versehentliche leichte Quetschung der Nervenpräparate beim Einlegen, in die Flüssigkeit gelangt war.

Alle von der Photon Counting Unit übermittelten Daten wurden in einen PC eingespeist, von dem Programm C8855 zeitlich aufgetragen (Photonen pro Sekunde), und graphisch dargestellt. Die Daten wurden auf Festplatte gespeichert, mit dem Programm ORIGIN 7.0 ausgewertet und graphisch aufgearbeitet.

Einzelwerte wurden mit dem Programm PRISM auf ihre Signifikanz hin überprüft. Die Grafiken wurden mit Adobe Illustrator erstellt.

3.5 Statistische Methoden

Die gemessenen ATP-Abbau-Kurven wurden einheitlich angepasst, sodass der jeweils höchste erreichte Wert (Photonen/s) nach Zugabe von 150nM ATP als 100% auf der Kurve dargestellt wurde. So konnten alle Messungen miteinander verglichen und für die jeweiligen Gruppen Mittelwerte gebildet werden. Die Mittelwerte wurden mit dem Standardfehler (mean \pm s.e.m) angegeben. Ihre Signifikanz wurde mit dem t-Test überprüft.

4 ERGEBNISSE

4.1 Optimierung der Lumineszenzmessung für Echt-Zeit-Messungen

Bei den Untersuchungen wurde angestrebt, die Freisetzung von sehr geringen ATP-Konzentrationen in der Umgebung von isolierten Nervensegmenten in Echt-Zeit zu messen. Dazu musste sichergestellt werden, dass die Zugabe des ATP-Assay-Mix in die Badlösung keine Schädigung der Nervenfasern verursachte. Deshalb wurde unter elektrophysiologischer Messung der Summenaktionspotentiale zunächst untersucht, welche Mischung von HEPES-Lösung und ATP-Assay-Mix von den Nervensegmenten ohne Verlust der axonalen Erregbarkeit vertragen wird. Es wurden verschiedene Konzentrationsverhältnisse getestet. Als optimal stellte sich die Mischung von 50µl ATP-Assay-Mix mit 400µl der HEPES-gepufferten Badlösung heraus. Dabei wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der Nervensegmente nur geringfügig verändert, während die Empfindlichkeit des ATP-Assay-Mix noch ausreichend war, um ATP-Konzentrationen größer als ca. 3-5nM zu detektieren. Dieses Mischungsverhältnis wurde in allen im Folgenden beschriebenen Experimenten verwendet.

4.2 ATP-Freisetzung durch Kompression einer Spinalwurzel

Um zu beobachten, wie viel ATP bei mechanischer Verletzung eines Nervs freigesetzt wird, und welche elektrophysiologischen Auswirkungen dabei entstehen, wurden folgende Versuche durchgeführt: Durch Kompression eines Nervenpräparats mit einem Metallstempel wurde eine Schädigung des Nervs verursacht. Dabei freigesetztes ATP konnte durch Lumineszenzmessung detektiert werden. Gleichzeitig wurde die korrelierende Schädigung (erkennbar an einer Absenkung der Amplitude der Summenaktionspotentiale und einer Verlängerung ihrer Latenz) des Nervs elektrophysiologisch protokolliert. Durch die Zugabe von 15 und 150nM ATP (repräsentative Einzelmessung (Abbildung 4.2-2) am Ende jeder

Messung und den Vergleich mit einer Eichkurve (Abbildung 3.4-1) konnte eine indirekte Aussage über die durchschnittliche im Gesichtsfeld ($d=2\text{mm}$) herrschende ATP-Konzentration um die Einstichstelle gemacht werden. Die elektrophysiologische Messung lieferte zur Einstichstärke korrelierende Schädigungszeichen des Präparats (Abbildung 4.2-1, Abbildung 4.2-3). Die Beobachtung der ATP-Freisetzung musste in Echt-Zeit gemacht werden, da das initial freigesetzte ATP innerhalb weniger Sekunden abgebaut wurde und in die Badlösung diffundierte.

Zur Kompression von Spinalwurzeln wurde ein Metallstempel mit einem Durchmesser von 1mm auf den Mikro-Manipulator aufgeschraubt (Abbildung 3.4-2). Der Stempel hatte kein spitz zulaufendes Ende, sondern eine stumpfe Fläche. Er wurde mit einer vorher eingestellten Einstichtiefe ($0,5$ bis 1mm) mit einer Kraft von 66mN in das Präparat gepresst und nach 8 Sekunden nach oben wieder aus dem Bad gefahren. Die vorübergehend messbare Anzahl an Photonen/s (ATP-Konzentration) korrelierte mit der elektrophysiologischen Schädigung des Präparats (gemessen als Absenkung der Amplitude des Summenaktionspotentials der A-Fasern, (Abbildung 4.2-3) und mit der Einstichtiefe (Abbildung 4.2-1).

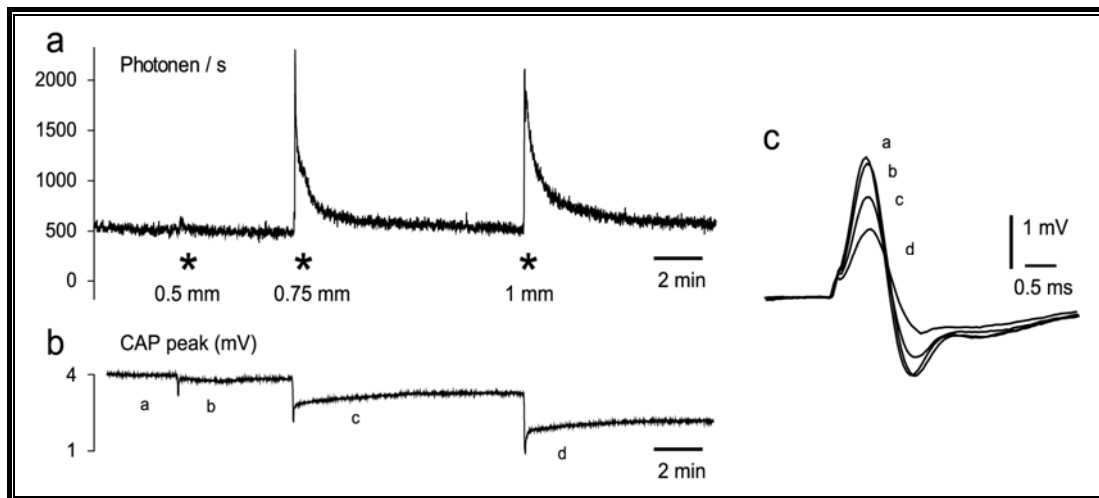


Abbildung 4.2-1 Kompression einer Spinalwurzel

Zum Zeitpunkt der Kompression einer Spinalwurzel (gekennzeichnet in (a) durch Sternchen *; Stempeldurchmesser=1mm, Einstichtiefe 0.5, 0.75, 1.0mm) mit einem Metallstempel (wie in Abbildung 3.4-2 dargestellt und beschrieben) wurde initial eine Erhöhung der ATP-Konzentration in der umgebenden Badlösung durch Lumineszenzmessung (a) detektiert. Die Konzentration des extrazellulären ATP begann sofort nach der Kompression abzunehmen. Dies ist erkennbar an einem Absinken der Lumineszenz (gemessen in Photonen/s) auf den Anfangswert wenige Minuten nach Kompression. Während der Messung wurde kontinuierlich elektrophysiologisch protokolliert, wie sich die Amplitude des Summenaktionspotentials der A-Fasern (b: CAP peak) im Nervenpräparat während der Zeit vor und nach Kompression veränderte (b_{a-d}). Dabei ist zu beachten, dass unmittelbar nach Kompression die Amplitude vorübergehend sehr stark vermindert war. Sie erholte sich dann teilweise während der folgenden Minuten. In (c) wurden repräsentative Beispiele der Amplituden der Summenaktionspotentiale aus (b) zu den Zeitpunkten (b_{a-d}) graphisch übereinander gelagert dargestellt.

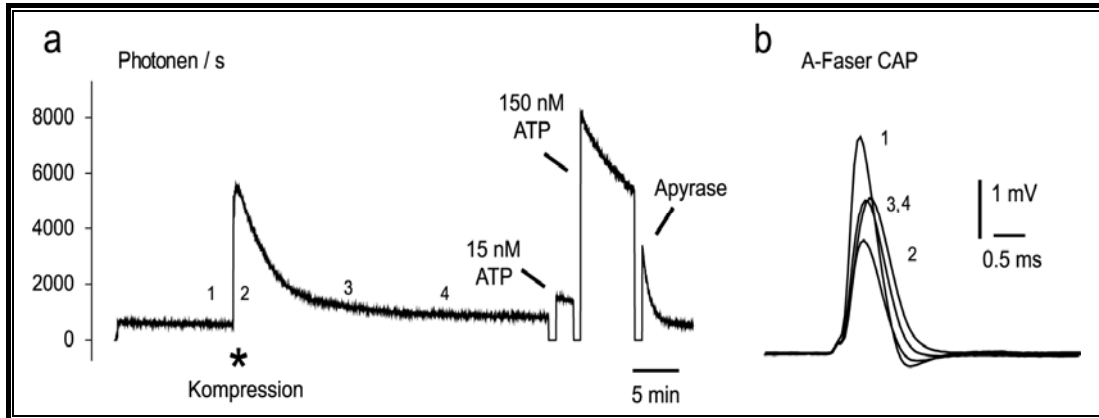


Abbildung 4.2-2 Standardprotokoll: ATP-Freisetzung durch Kompression mit Eichung

*In der Lumineszenzaufzeichnung (a) wird dargestellt, wie zum Zeitpunkt * eine Spinalwurzel mit einem Metallstempel (Durchmesser 1mm, Einstichtiefe 0,5mm, Dauer der Kompression 8 Sekunden) komprimiert wurde. Ein vorübergehender Anstieg der ATP-Konzentration in der Badlösung um das Nervenpräparat ist in (a) an einem Anstieg der Lumineszenz (gemessen in Photonen/s) zu sehen. Am Ende des Experiments wurden 15 und 150nM ATP zugegeben, um aus den resultierenden Lumineszenzwerten zu errechnen, wie viel ATP zuvor freigesetzt worden war. Es war ausreichend zwei bekannte ATP-Konzentrationen zuzugeben, da die Beziehung zwischen der ATP-Konzentration und der Lichtemission (Photonen/s) für nanomolare ATP-Konzentrationen linear ist (Abbildung 3.4-1). Zum Schluss wurde Apyrase in die Badlösung gegeben, um zu zeigen, dass die Lumineszenz ausschließlich durch ATP verursacht war.*

Parallel zur Lumineszenzmessung wurde elektrophysiologisch die Amplitude der Summenaktionspotentiale (CAP) der A-Fasern in den Spinalwurzeln zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Kompression protokolliert (b). Die zu verschiedenen Zeitpunkten a,b1-4 gemessene und schematisch dargestellte Amplitude der Summenaktionspotentiale (CAP) der A-Fasern fiel während der Kompression vom Anfangswert (1) (etwa 4mV) auf einen Minimalwert (2) (etwa 2mV) und erholte sich teilweise (3,4) auf etwa 3mV während der folgenden Minuten.

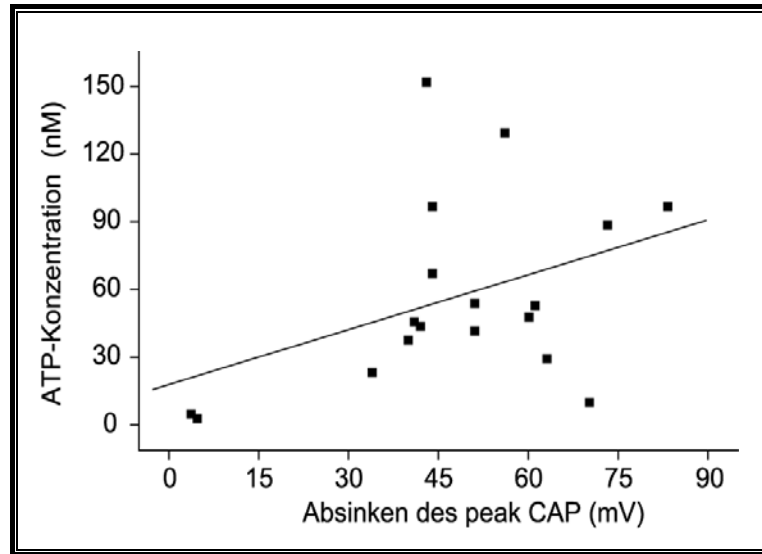


Abbildung 4.2-3 Korrelation der Summenaktionspotentiale und ATP-Freisetzung

Im Mittel wurde durch Kompression (die ausreichend stark war, um die Signalfortleitung in etwa 50% der A-Fasern zu blockieren) einer Spinalwurzel (Stempeldurchmesser=1mm, Einstichtiefe=0,5mm) so viel ATP freigesetzt, dass im Gesichtsfeld eine durchschnittliche ATP-Konzentration von etwa 60nM ATP gemessen wurde (n=18). Die elektrophysiologische Schädigung des Nervs, dargestellt als prozentualer Abfall der Amplitude der A-Faser-Summenaktionspotentiale (CAP peak, eine Minute nach Kompression gemessen), wurde gegen die in der Badlösung gemessene ATP-Konzentration (etwa 15 Sekunden nach Kompression) aufgetragen. Die Gerade soll eine Korrelation zwischen dem Grad der elektrophysiologischen Schädigung und der freigesetzten ATP-Konzentration andeuten.

Wir beobachteten bei der ATP-Freisetzung eine schnelle und eine langsame Komponente des ATP-Abbaus. Die schnelle Komponente hatte initial eine hohe Lumineszenz-Spitze mit schnellem, exponentiellem Abfall der Photonen/s. Sie ging dann in die langsame Komponente mit niedrigerer Anzahl der Photonen/s über, in welcher sich die Anzahl der Photonen/s über einen längeren Zeitraum hin wieder dem Ausgangswert vor der Kompression näherte.

4.3 ATP-Abbau

Um zu untersuchen welche Rolle Diffusion und enzymatischer Abbau bei der Abnahme der ATP Konzentration haben, wurde getestet wie schnell ATP von Ectonucleotidasen der Nervenpräparate abgebaut werden kann. Dazu wurde mithilfe der Lumineszenzmessung beobachtet, um wie viel Prozent eine bestimmte ATP-Konzentration (150nM ATP in 452µl Badlösung) durch Anwesenheit von kultivierten Astrozyten oder Spinalwurzeln in einer bestimmten Zeit reduziert werden konnte. Die ATP-Konzentrationen wurden für jede Messgruppe (Kontrolle, Astrozyten, Spinalwurzeln) separat für verschiedene Zeitpunkte gemittelt und gegen die Zeit aufgetragen, anschließend wurden die Kurven verglichen. Es ergaben sich für alle Messgruppen unterschiedliche, aber spezifische Geschwindigkeiten für die Absenkung der ATP-Konzentration in der Badlösung.

Für jede Messgruppe wurden die Mittelwerte der ATP-Konzentrationen aus $n \geq 5$ Versuchen mit ihrem Standardfehler (mean \pm s.e.m.) in Zeitintervallen von 5 Minuten dargestellt, es wurde eine Normalverteilung der Messwerte angenommen.

4.3.1 Geschwindigkeit des ATP-Abbaus an verschiedenen Präparaten

„Kontrolle“ - Abbau von ATP durch Luciferase

Um den ATP-Verbrauch durch die Luciferase zu messen gaben wir 15 Minuten nach Beginn der Messung 150nM ATP in eine Versuchsschale mit HEPES-Lösung und ATP-Assay-Mix. Die entstehende Lumineszenz (in Photonen/s) wurde über weitere 70 Minuten detektiert und mit dem Ausgangswert (100%) verglichen. Die Anzahl der Photonen/s reduzierte sich über die Zeit langsam, was den ATP-Verbrauch durch die Luciferase widerspiegelte. Die ATP-Konzentration in der Lösung war durch ständiges Mischen überall gleich, diffusionsbedingte Schwankungen der Lumineszenzstärke konnten somit ausgeschlossen werden.

Für nanomolare ATP-Konzentrationen ergab sich eine sehr geringe Reduktion der ATP-Konzentration pro Zeiteinheit durch die Luciferase: 10 Minuten nach Zugabe

von 150nM ATP (entspricht 100% der Photonen/s) wurden $8,6 \pm 0,6\%$ (n=6), nach 70 Minuten $22,1 \pm 1,1\%$ weniger Photonen pro Sekunde gemessen (Überblick in Tabelle 4.3.1). Das bedeutet, dass durch die Luciferase die ATP-Menge in der Badlösung von 67,8pMol (ATP-Konzentration entspricht 150nM) innerhalb der ersten 10 Minuten um etwa 6,4pMol ATP (entspricht 14,1nM) und nach 70 Minuten um etwa 16,6pMol (entspricht 36,7nM) ATP reduziert worden ist.

Bei allen Abbildungen muss berücksichtigt werden, dass die prozentuale Anzahl der gemessenen Photonen die ATP-Konzentration widerspiegelt, die sich durch den gemeinsamen und gleichzeitigen ATP-Abbau durch das Präparat und die Luciferase einstellte.

ATP-Abbau durch kultivierte Astrozyten

Die Analyse der Abnahme der ATP-Konzentration (kontinuierlich gemessen über 70 Minuten) durch den ATP-Abbau durch Ectonucleotidasen an kultivierten Astrozyten zeigte eine breite Streuung der Einzelbeobachtungen. Durch den gemeinsamen ATP-Abbau von Astrozyten und Luciferase senkte sich die pro Sekunde gemessene Anzahl an Photonen/s innerhalb von 10 Minuten nach ATP-Zugabe um $14,6 \pm 2,8\%$. Das bedeutete, dass von den Astrozyten und der Luciferase innerhalb der ersten 10 Minuten von zugegebenen 67,8pMol ATP etwa 10,6pMol ATP abgebaut wurden, was die ATP-Konzentration (150nM) um etwa 23,4nM senkte.

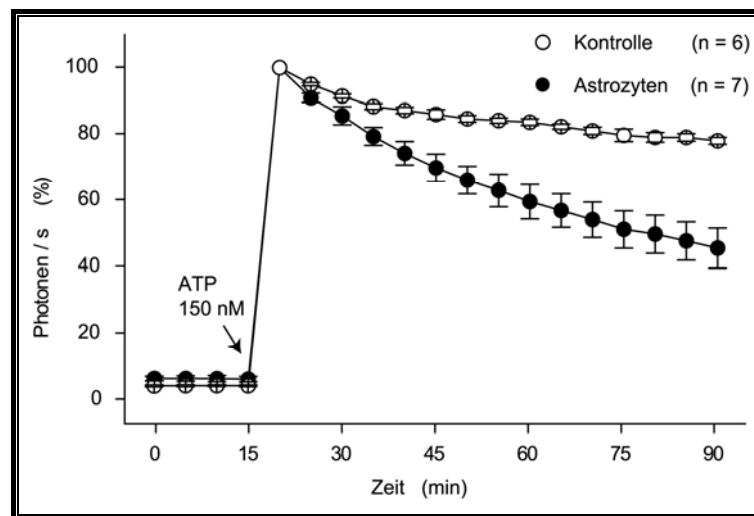


Abbildung 4.3-1 ATP-Abbau durch Astrozytenkulturen im Vergleich zur Kontrolle

An 7 Messschalen mit kultivierten Astrozyten wurde der ATP-Abbau mittels Lumineszenzmessung beobachtet. Dazu wurde 15 Minuten lang der Ausgangswert einer Schale gemessen, dann wurden 150nM ATP (100% der Photonen/s) zugefügt und in Abständen von 100 bis 200 Sekunden geschüttelt. Es wurde beobachtet, wie sich die ATP-Konzentration in der Badlösung über 70 Minuten stetig absenkte. Aus den 7 Einzelmessungen wurden die Mittelwerte und ihre Standardfehler errechnet und in Abständen von 5 Minuten in der Grafik dargestellt. Es ergab sich eine Streuung bei den Abbauraten der Astrozyten-Einzelmessungen, wie man an den um den Mittelwert dargestellten s.e.m.-Werten erkennen kann. Der ATP-Abbau durch die Astrozyten ist signifikant ($p < 0,0005$) schneller als der durch die Luciferase.

ATP-Abbau durch Spinalwurzeln

Einen schnellen ATP-Abbau konnte man unter Anwesenheit von 4 Spinalwurzeln (2DR und 2VR) beobachten. Durch sie wurde die ATP-Konzentration in der Badlösung innerhalb von 15 Minuten um etwa 138,4nM ($85,4 \pm 3,1\%$ der Photonen/s) reduziert.

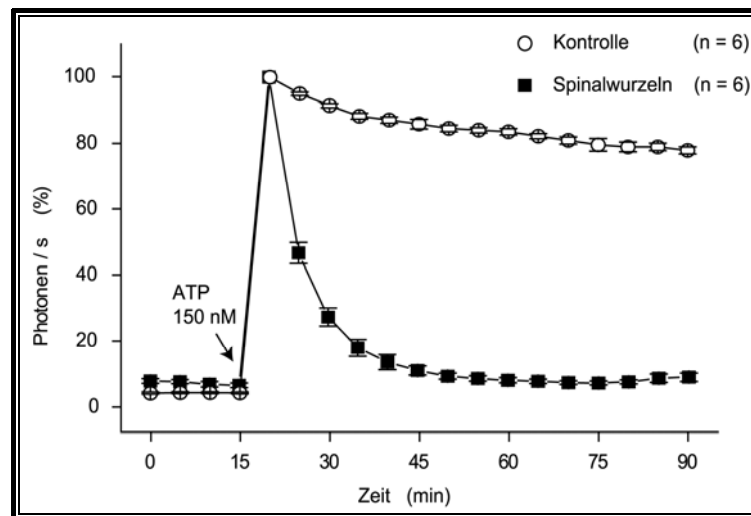


Abbildung 4.3-2 Vergleich des ATP-Abbaus an Spinalwurzeln und Kontrolle

An Spinalwurzeln wurde das zugegebene ATP (150nM) schnell abgebaut (Die prozentuale Anzahl der gemessenen Photonen/s wurde in der Grafik zur besseren Übersicht nur alle fünf Minuten dargestellt). Durch die Luciferase wurde nur sehr wenig ATP verbraucht.

Aufgrund der unterschiedlichen Häufigkeit von myelinisierten und nicht-myelinisierten Nervenfasern in Vorder- und Hinterwurzeln und der daraus zu erwartenden unterschiedlichen Enzymausstattung wurden ihre ATP-Abbaueigenschaften verglichen. Die Hinterwurzeln (DR, 70% nicht-myelinisierte Fasern) schienen sich in ihrer Kinetik von den Vorderwurzeln (VR, 30% nicht-myelinisierte Fasern) kaum zu unterscheiden (Abbildung 4.3-3). An den Hinterwurzeln schien der Abbau minimal schneller zu sein als an den Vorderwurzeln, jedoch zeigten die Abbau-Kurven der Vorderwurzeln eine größere Streubreite. Der tendenzielle Unterschied ist bei der Darstellung der Mittelwerte mit ihrem Standardfehler zu erkennen, signifikant ist er jedoch nicht.

Es ergab sich bei der Analyse der Präparate ein durchschnittliches Gewicht der Schalen mit Hinterwurzeln von 9,42mg (je 2DR) und mit Vorderwurzeln von 8,01mg (je 3VR).

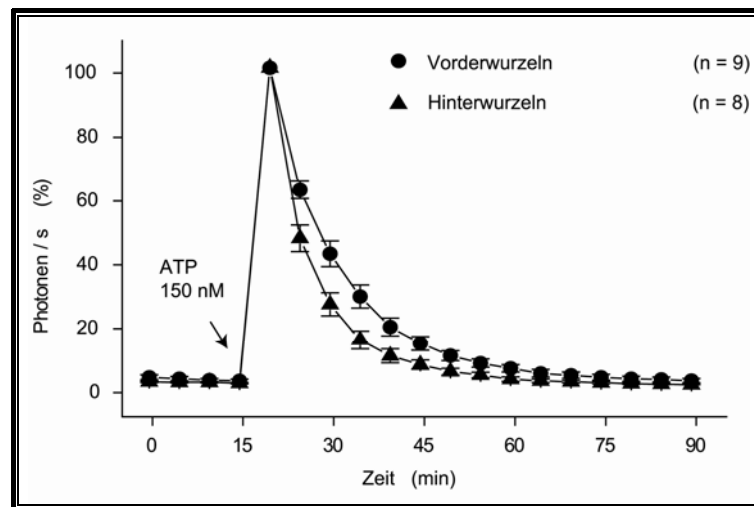


Abbildung 4.3-3 Vergleich des ATP-Abbaus an Vorder- und Hinterwurzeln

Die Kinetik des ATP-Abbaus von 2 bis 3 Vorderwurzeln wurde mit der von 2 Hinterwurzeln verglichen. Dabei fiel auf, dass die einzelnen Abbau-Kurven der Hinterwurzeln sehr ähnliche Werte, die der Vorderwurzeln eine leichte Streuung zeigten. Der Unterschied im Abbau ist nicht signifikant, es lässt sich jedoch eine Tendenz zu einem schnelleren Abbau durch Hinterwurzeln vermuten.

Für bestimmte Zeitpunkte (10, 15, 45 und 70 Minuten) nach Zugabe von 150nM ATP (=100% der Photonen/s) wurde die prozentuale Absenkung der Photonen/s in der Badlösung bis zu diesem Zeitpunkt berechnet. Mit der bekannten Anzahl der Photonen/s kann man in der Eichkurve die zugehörige ATP-Konzentration ablesen. Die Werte wurden in folgender Tabelle für die einzelnen Messgruppen aufgelistet.

ATP-Abbau		Reduktion der Photonen/s um (mean ± s.e.m, in %)			
Zeit: nach Zugabe		10 Min	15 Min	45 Min	70 Min
Kontrolle	n=6	8,6 ± 0,6	11,8 ± 0,9	17,9 ± 0,8	22,1 ± 1,1
Astrozyten	n=7	14,6 ± 2,8	20,8 ± 2,7	43,5 ± 5,1	54,9 ± 6,0
Spinalwurzeln	n=6	75,5 ± 4,5	85,4 ± 3,1	95,3 ± 0,6	95,2 ± 0,8

Tabelle 4.3.1 Zeitliches Verhalten des ATP-Abbaus an verschiedenen Präparaten

4.3.2 ATP-Abbau nach Zugabe von Hemmstoffen der Ectonucleotidasen

Anschließend wurde getestet, inwiefern der ATP-Abbau an den Präparaten durch verschiedene bekannte Inhibitoren von Ectonucleotidasen gehemmt werden konnte.

Alle Hemmstoffe und ATP-Analoga wurden zuerst auf so genannte Eigeneffekte getestet. Dazu wurden sie während der Messung zu den Kontrollschalen mit HEPES-Lösung und ATP-Assay-Mix gegeben. Wurde nun eine gegenüber dem Ausgangswert deutlich erhöhte oder erniedrigte Anzahl der Photonen pro Sekunde gemessen, war das ein Zeichen dafür, dass die Luciferasereaktion in ihrer Kinetik verändert worden war. Deswegen wurden solche Substanzen (DMSO, $\alpha\beta$ -me-ATP, me-S-ATP, UTP, ITP, AP₅A) nicht weiter angewendet, sondern aussortiert. Diese Eigeneffekte konnten verschiedene Ursachen haben, denen nicht genauer nachgegangen wurde. Sie hätten aber in jedem Fall die Messergebnisse verfälscht und eine sinnvolle Interpretation verhindert. Besonders $\alpha\beta$ -me-ATP zeigte einen starken Eigeneffekt.

$\beta\gamma$ -me-ATP und ARL 67156 hatten kaum nachweisbare Eigeneffekte und beeinflussten die Kinetik der Luciferase nicht, wie in Abbildung 4.3-4 erkennbar. $\beta\gamma$ -me-ATP wurde in der Konzentration von 300 μ M getestet, ARL 67156 mit 100 μ M.

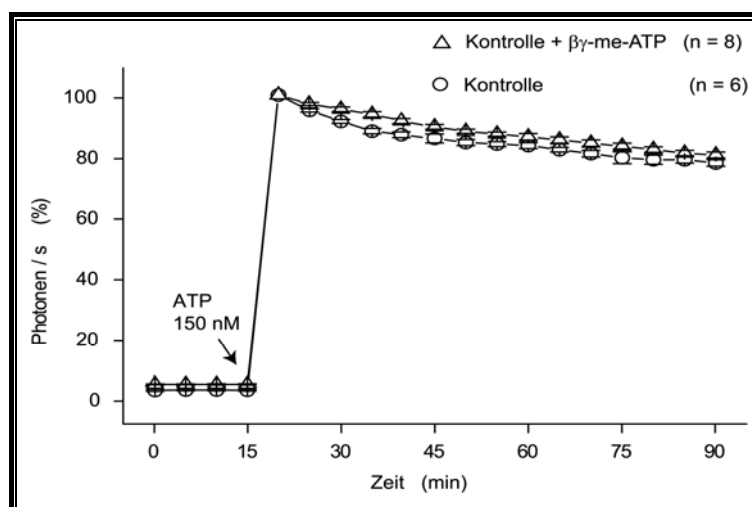


Abbildung 4.3-4 ATP-Abbau in zellfreien Kulturschalen mit und ohne $\beta\gamma$ -me-ATP

Wie auch in der folgenden Tabelle sichtbar, gab es keine Hemmung oder Steigerung der Aktivität der Luciferase (Kontrolle, $n=6$) durch $300\mu\text{M}$ $\beta\gamma$ -me-ATP (Kontrolle + $\beta\gamma$ -me-ATP, $n=8$). Erkennbar war das durch die Überlagerung der Kontrollkurven mit oder ohne $\beta\gamma$ -me-ATP. Eine Hemmung wäre an einem starken Absinken der Anzahl der Photonen pro Sekunde bei der Kontrollkurve mit $\beta\gamma$ -me-ATP erkennbar gewesen.

ATP-Abbau		Reduktion der Photonen/s um (mean \pm s.e.m, in %)			
Zeit: nach Zugabe		10 Min	15 Min	45 Min	70 Min
Kontrolle	$n=6$	$8,6 \pm 0,6$	$11,8 \pm 0,9$	$17,9 \pm 0,8$	$22,1 \pm 1,1$
Kontrolle + $\beta\gamma$ -me-ATP	$n=8$	$4,6 \pm 0,7$	$6,3 \pm 0,9$	$14,7 \pm 1,0$	$19,6 \pm 1,0$

Tabelle 4.3.2 Zeitliches Verhalten der ATP-Konzentration in zellfreien Kulturschalen

Die statistische Auswertung der Abbaukurven der Kontrollen mit und ohne $\beta\gamma$ -me-ATP zeigte keinen Unterschied der Abbaugeschwindigkeiten. $\beta\gamma$ -me-ATP zeigt keinen signifikanten Eigeneffekt auf die Luciferase.

Hemmung des ATP-Abbaus an Astrozyten

Die Wirkung von $\beta\gamma$ -me-ATP konnte nun an kultivierten Gliazellen, in unserem Fall Astrozyten von Mäusen, getestet werden (Abbildung 4.3-5). Bei einer vollständigen Hemmung aller ATP abbauenden Enzyme an den Zellen hätte sich die spezifische Abbaukurve mit der Kontrollkurve, die nur den Verbrauch durch die Luciferase zeigt, überlagern müssen.

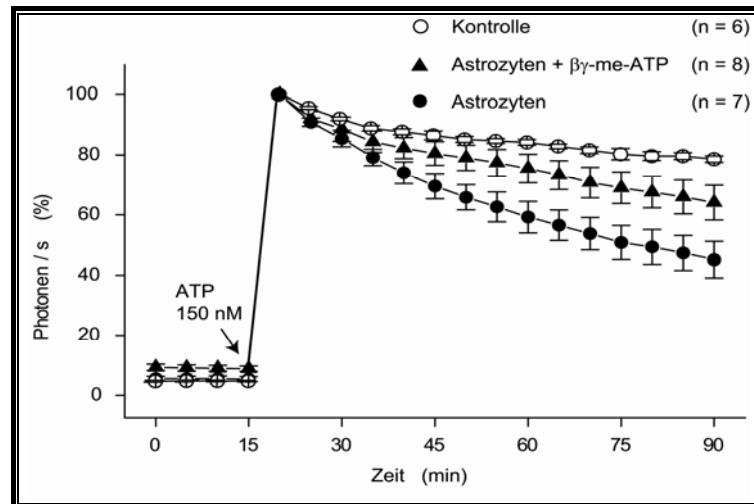


Abbildung 4.3-5 ATP-Abbau an Astrozyten mit und ohne $\beta\gamma$ -me-ATP

Vergleich der spezifischen Geschwindigkeiten beim Abbau von 150nM zugegebenem ATP in Kulturschalen mit kultivierten Astrozyten, mit und ohne vorheriger Zugabe von 300 μ M $\beta\gamma$ -me-ATP (ca. 15 Minuten vor dem Experiment). Es ist eine teilweise Hemmung des ATP-Abbaus durch die Astrozyten nach Zugabe von 300 μ M $\beta\gamma$ -me-ATP erkennbar. Die Einzelmessungen beider getesteten Bedingungen haben eine große Streubreite, die hemmende Wirkung von $\beta\gamma$ -me-ATP ist besonders nach 45 beziehungsweise 70 Minuten klar erkennbar. Der ATP-Verbrauch durch die Luciferase wird von $\beta\gamma$ -me-ATP nicht beeinflusst.

ATP-Abbau		Reduktion der Photonen/s um (in %)			
Zeit: nach Zugabe		10 Min	15 Min	45 Min	70 Min
Astrozyten	n=7	14,6 \pm 2,8	20,8 \pm 2,7	43,5 \pm 5,1	54,9 \pm 6,0
Astrozyten + $\beta\gamma$ -me-ATP	n=8	11,4 \pm 4,0	15,6 \pm 3,6	26,8 \pm 4,8	35,9 \pm 5,8

Tabelle 4.3.3 Wirkung von $\beta\gamma$ -me-ATP auf den zeitlichen Verlauf des ATP-Abbaus durch Astrozyten

Hemmung des ATP-Abbaus an Spinalwurzeln

Da sich ergeben hatte, dass die Substanz $\beta\gamma$ -me-ATP auf kultivierte Astrozyten einen deutlichen Effekt hatte, sollte nun die Wirkung auf isolierte, intakte Nervenpräparate von Ratten getestet werden. Dazu wurden Spinalwurzeln (je 2 Vorderwurzeln und 2 Hinterwurzeln) mit HEPES-Lösung, ATP-Assay-Mix und $\beta\gamma$ -me-ATP in eine Kulturschale gelegt. Nach Zugabe von 150nM ATP wurde beobachtet, wie schnell sich die Zahl der pro Sekunde gemessenen Photonen reduzierte, und ob sich die Werte deutlich von denen unterschieden, die wir ohne $\beta\gamma$ -me-ATP gemessen hatten. Eine deutliche Hemmung des ATP-Abbaus ist in Abbildung 4.3-6 an einer Verschiebung der Abbau-Kurve zu höheren prozentualen Werten der Photonen pro Sekunde erkennbar. Durch die vorherige Zugabe von $\beta\gamma$ -me-ATP war die Anzahl der nach 10 Minuten gemessenen Photonen/s nur um $48,8 \pm 4,1\%$, (81nM ATP), ohne $\beta\gamma$ -me-ATP dagegen um $75,5 \pm 4,5\%$ (119,3nM ATP) reduziert.

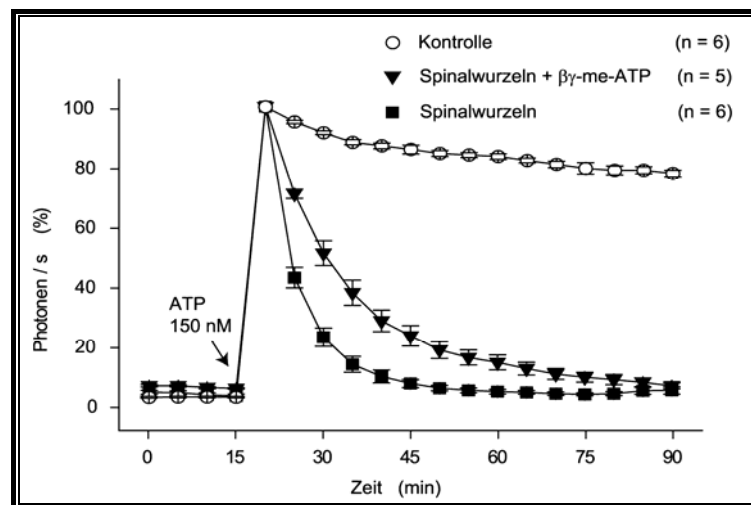


Abbildung 4.3-6 Verschiebung der ATP-Abbaukurve durch $\beta\gamma$ -me-ATP

Durch Zugabe von $300\mu\text{M}$ $\beta\gamma$ -me-ATP verlangsamte sich der ATP-Abbau durch die Spinalwurzeln, deutlich zu erkennen an einem langsameren Abfall der Photonen/s während der Messung. Dies drückt eine geringere ATP-Konzentration in der Badlösung aus. Prozentuale Werte der Reduktion der ATP-Konzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt sind der Tabelle 4.3.4 zu entnehmen.

ATP-Abbau		Reduktion der Photonen/s um (mean \pm s.e.m, in %)			
Zeit: nach Zugabe		10 Min	15 Min	45 Min	70 Min
Spinalwurzeln	n=6	75,5 \pm 4,5	85,4 \pm 3,1	95,3 \pm 0,6	95,2 \pm 0,8
Spinalwurzeln + $\beta\gamma$ -me-ATP	n=5	48,8 \pm 4,1	61,9 \pm 4,2	87,2 \pm 2,2	92,9 \pm 1,0

Tabelle 4.3.4 Wirkung von $\beta\gamma$ -me-ATP auf das zeitliche Verhalten des ATP-Abbaus durch Spinalwurzeln

Weniger deutliche Effekte zeigten sich nach der Zugabe von ARL 67156 in eine Messchale mit Spinalwurzeln. Auch ARL 67156 (100 μ M) reduzierte die ATP-Abbaurrate von Spinalwurzeln, im Vergleich zur $\beta\gamma$ -me-ATP jedoch wesentlich schwächer. Zum Vergleich senkten die Spinalwurzeln ohne Hemmstoffe die ATP-Konzentration in den ersten 10 Minuten um etwa 119,3nM ATP (Reduktion der Photonen/s um 75,5 \pm 4,5%), während sie nach Zugabe von ARL 67156 in den ersten 10 Minuten nur um etwa 99,8nM ATP (Reduktion der Photonen/s um 62,9 \pm 1,2%) reduzierten (Abbildung 4.3-7, Tabelle 4.3.5).

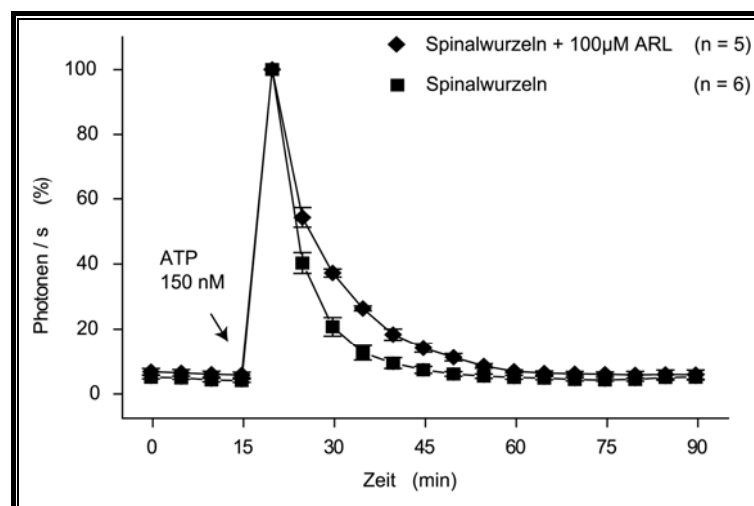


Abbildung 4.3-7 ATP-Abbau an Spinalwurzeln mit und ohne ARL 67156

Nach Zugabe von 100 μ M ARL 67156 gab es eine schwache Hemmung des ATP-Abbaus an den Spinalwurzeln, erkennbar an einer schwächeren Reduktion der ATP-Konzentration. Dies zeigte sich an einer Verlagerung der ATP-Abbaukurve mit ARL 67156 zu höheren prozentualen Werten der Photonen/s.

ATP-Abbau		Reduktion der Photonen/s um (in %)			
Zeit: nach Zugabe		10 Min	15 Min	45 Min	70 Min
Spinalwurzeln	n=6	75,5 ± 4,5	85,4 ± 3,1	95,3 ± 0,6	95,2 ± 0,8
Spinalwurzeln ARL 67156	n=5	62,9 ± 1,2	73,8 ± 0,8	94,4 ± 0,7	94,4 ± 1,4

Tabelle 4.3.5 Zeitlicher Verlauf des ATP-Abbaus an Spinalwurzeln mit und ohne ARL 67156

Da $\beta\gamma$ -me-ATP eine stärkere Hemmung des ATP-Abbaus durch Ectonucleotidasen zeigte, sollte dieses nun bei Messungen der ATP-Freisetzung während Kompression der Nervensegmente eingesetzt werden.

4.4 ATP-Freisetzung durch Kompression während Hemmung von Ectonucleotidasen

Ob Ectonucleotidasen eine wichtige Rolle beim Abbau von ATP spielen, das bei Verletzung freigesetzt wird, wurde in weiteren Experimenten getestet. Dabei kam das in Abbildung 4.2-2 dargestellte standardisierte experimentelle Protokoll zum Einsatz. Verglichen wurden 7 Spinalwurzeln mit Kompression in der normalen Badlösung und weitere 7 Spinalwurzeln mit Kompression in der Gegenwart von $\beta\gamma$ -me-ATP, einem bekannten Hemmstoff von Ecto-Nucleotidasen. $\beta\gamma$ -me-ATP wurde gewählt, weil es eine stärkere Hemmwirkung auf den ATP-Abbau durch Spinalwurzeln zeigte als ARL 67156. Ausgewertet wurde die maximal erreichte extrazelluläre Konzentration von ATP und die Abnahme dieser Konzentration 4 Minuten nach der Kompression. Die Beobachtungen sind in der Abbildung 4.4-1 zusammengefasst: Durch Kompression einer Spinalwurzel nach Zugabe von $\beta\gamma$ -me-ATP erhöhte sich deutlich, jedoch nicht signifikant die initiale maximal freigesetzte ATP-Konzentration (Abbildung 4.4-1b). Nach 4 Minuten ($t=240$) hatte $\beta\gamma$ -me-ATP den ATP-Abbau jedoch signifikant verlangsamt (Abbildung 4.4-1 a und b).

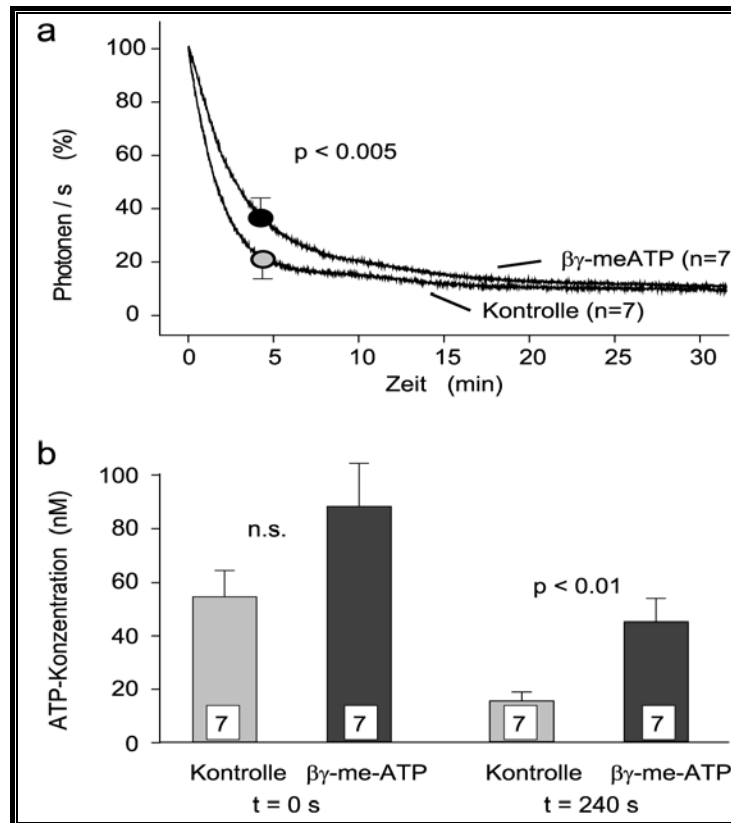


Abbildung 4.4-1 $\beta\gamma$ -me-ATP verändert die Kinetik des ATP Abbaus nach Kompression

Die Messungen mit der standardisierten Kompression von Spinalwurzeln wurden wie in Abbildung 4.2-2 beschrieben durchgeführt, die Einzelergebnisse der beiden Gruppen wurden jeweils gemittelt. Es folgten ein Vergleich der Mittelwerte der beiden Gruppen und eine Analyse der in den Badlösungen herrschenden ATP-Konzentrationen zu folgenden Zeitpunkten: $t=0$: unmittelbar bei Kompression, $t=240$: genau 4 Minuten nach Kompression.

(a) Durch die Zugabe von $300 \mu\text{M}$ $\beta\gamma$ -me-ATP konnte die Kinetik der initialen, schnellen Komponente des ATP-Abbaus bei der ATP-Freisetzung verändert werden. Die maximal freigesetzte Anzahl an Photonen/s der dargestellten repräsentativen Einzelmessungen wurde auf 100% gesetzt, um die Kinetik des Abbaus anschaulich vergleichen zu können. Die Hemmung des ATP-Abbaus durch die Zugabe von $\beta\gamma$ -me-ATP war deutlich an einer Verschiebung der Abbau-Kurve zu höheren Werten der Photonen/s erkennbar (Signifikanz $p < 0,005$).

(b) Der durchschnittliche initiale Anstieg ($t=0$) der ATP-Konzentration in der Badlösung war unmittelbar bei Kompression der Kontroll-Spinalwurzeln $54,5 \pm 9,7\text{nM}$. Bei unmittelbarer Kompression der Spinalwurzeln mit $\beta\gamma$ -me-ATP lag er mit $88,9 \pm 16,1\text{nM}$ etwas, jedoch nicht signifikant höher. Nach 4 Minuten ($t=240$) allerdings hatte $\beta\gamma$ -me-ATP die ATP-Abbaukinetik der Spinalwurzeln mit $\beta\gamma$ -me-ATP im Vergleich zu den Kontroll-Spinalwurzeln signifikant verlangsamt (sowohl prozentual (a, $p < 0,005$) als auch aus der absoluten ATP-Konzentration (b, $p < 0,01$) berechnet).

5 DISKUSSION

ATP spielt als Neurotransmitter eine besondere Rolle da es verschiedene purinerge P2-Rezeptoren aktivieren kann, die an der Schmerzwahrnehmung beteiligt zu sein scheinen. Extrazelluläres ATP wird von Ectonucleotidasen an der Membran von Gliazellen und Neuronen hydrolysiert, wodurch Adenosin entsteht, welches seinerseits durch Bindung an P1-Rezeptoren Schmerz verstärkende oder lindernde Wirkungen haben kann (Burnstock, 2001), (Sawynok, 1998)). Da Schmerz zum Beispiel durch Kompression eines Nervs verursacht wird, sollte mittels Lumineszenzmessung eine mögliche ATP-Freisetzung registriert werden, während der Zustand des Nervenpräparats elektrophysiologisch beobachtet wurde.

5.1 Kompression verändert die Signalfortleitung im Nerv

Es ist bekannt, dass es durch Kompression von Spinalwurzeln oder des Rückenmarks zu einer Abnahme der Amplitude evozierter Potentiale (Jou & Lai, 1998), (Shi & Blight, 1996) im Nerv kommt, die teilweise reversibel ist. Grund dafür scheint einerseits eine vorübergehende Verschiebung von Ionen in den Extrazellulärraum durch eine veränderte Membranpermeabilität, andererseits eine längerfristige mechanische Schädigung oder ein Einriss der Nervenfasern oder Gliazellen zu sein. Auch von uns wurde ein Absinken der Amplitude der A-Faser Summenaktionspotentiale beobachtet (Abbildung 4.2-2), was als Funktionsverlust von myelinisierten Fasern des Nervs gedeutet werden kann.

Die Empfindung von Schmerz wird jedoch hauptsächlich durch eine Erregbarkeitssteigerung von nicht-myelinisierten nozizeptiven Fasern (C-Fasern) ausgelöst (mit erhöhter Aktionspotential-Frequenz). Diese Erregbarkeitssteigerung durch Erhöhung der extrazellulären Konzentration von ATP könnte über ionotrope P2X₃ oder P2X_{2/3}-Rezeptoren, die besonders auf nozizeptiven Hinterwurzelneuronen mit kleinem Durchmesser vorhanden sind, vermittelt werden (Burnstock, 2001),

(Abbracchio & Burnstock, 1998). Sie benötigen zur Aktivierung mikromolare ATP-Konzentrationen. Experimentell konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass derartige ATP-Konzentrationen nach mechanischer Verletzung von Zellen erreicht werden. Cook et al (Cook & McCleskey, 2002) beschreiben, dass es bei Schädigung von kultivierten Hautzellen in benachbarten kultivierten nozizeptiven Neuronen zur Aktivierung von P2X Rezeptoren und dadurch zur Exzitation der Zellen kommt. Eine Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration führt auch zur Aktivierung von P2Y-Rezeptoren, die sich vor allem auf Gliazellen befinden und einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration vermitteln.

In unseren Versuchen wurde nur das Summenaktionspotential der A-Fasern im Nerv gemessen. Es ist durchaus denkbar, dass es zu einer Vergrößerung der Amplitude der C-Faser-Summenaktionspotentiale kam, dies wurde aber nicht untersucht.

5.2 ATP-Freisetzung durch Kompression

Diese Studie sollte untersuchen, ob es durch Kompression von Nervenpräparaten zur ATP-Freisetzung kommt. In diesem Fall sollte die freigesetzte ATP-Konzentration quantifiziert werden und eine Aussage darüber getroffen werden, ob ausreichend ATP freigesetzt wird, um P2X und P2Y Rezeptoren im peripheren Nerv zu aktivieren.

Zur ATP-Freisetzung kam es durch Kompression des Präparates, was vermutlich zu Rissen und Defekten in den Zellmembranen der Schwannzellen und Nervenfasern führte. Dies führte zum Austritt zytosolischer Bestandteile in den Extrazellulärraum, somit auch von ATP. Die ATP-Konzentration in einer Zelle beträgt etwa 2 bis 5 millimolar (Arcuino *et al.*, 2002), (Joseph *et al.*, 2003). Man kann davon ausgehen, dass so freigesetztes ATP lokal eine ausreichende Konzentration erreichen würde, um purinerge Rezeptoren auf der Membran umgebender Zellen zu aktivieren.

Eine Lumineszenz, die einer so hohen initialen ATP-Konzentration entspräche, konnte über dem Gesichtsfeld des Mikroskops jedoch nicht gemessen werden. Die der gemessenen Lumineszenz entsprechende ATP-Konzentration bewegte sich nur im nanomolaren Bereich, was zur Aktivierung von purinergen Rezeptoren nicht ausreicht.

Wenn man jedoch berücksichtigt, dass es bei Kompression des Nervenpräparates (Durchmesser sei 300 μ m) mit einem Stempel von 1mm Durchmesser zu einem Anstieg der Lumineszenz (in Photonen/s) im Gesichtsfeld (d=2mm, enthält etwa 9,4 μ l Flüssigkeit) kommt, der einer ATP-Konzentration von 60nM entspricht, muss die ATP-Konzentration in der aus dem Nerv freigesetzten Flüssigkeit (etwa 0,3 μ l) unmittelbar an der Kompressionsstelle des Nervenpräparats und im Inneren des Präparats mindestens im mikromolaren Bereich (berechnet: $\geq 2,0 \mu$ M) liegen. (Es herrscht zusätzlich ein Konzentrationsgefälle durch fehlendes Durchmischen, mit hoher ATP-Konzentration direkt am Nerv und sehr niedriger Konzentration in der umgebenden Badlösung.)

Diese ATP-Konzentration reicht aus, um P2X und P2Y-Rezeptoren zu aktivieren.

Wir vermuten zusätzlich, dass das Enzym Luciferase aufgrund seiner Molekülgröße von 62kDa (Conti *et al.*, 1996) nicht ins Innere des Nervenpräparats eindringen kann. Die gemessene Lumineszenz spiegelt somit nur die durchschnittliche extrazelluläre ATP-Konzentration der Badlösung um das Präparat im Gesichtsfeld wider, während die ATP-Konzentration bei Kompression im Inneren des Nervenpräparats wohl noch wesentlich höher war.

5.3 Abnahme der Lumineszenz nach Kompression

5.3.1 Durch die Methode bedingte Abnahme der Lumineszenz

Schon wenige Minuten nach Kompression der Nervenpräparate war die Lumineszenz fast zum Ausgangswert zurückgekehrt. Es gibt einige durch die verwendete Methode bedingte Ursachen, die zum schnellen Abfall der Lumineszenz beitragen könnten:

- Die Versuche wurden *in vitro* mit viel Flüssigkeit um das Nervenpräparat durchgeführt. Dadurch konnte das ATP ungehindert von der Außenseite des Präparates in die Badlösung diffundieren, was zur Absenkung der durchschnittlichen ATP-Konzentration im Gesichtsfeld durch Verdünnung führte.
- Weiterhin ist bekannt, dass Luciferase bei einer ATP-Konzentration von mehr als $8\mu\text{M}$ einen Licht-Flash (Ford *et al.*, 1996) emittiert, mit anschließendem schnellen Abfall der Lumineszenz. Deshalb können bei mikromolaren ATP-Konzentrationen keine exakten Aussagen über die ATP-Konzentration in der Lösung gemacht werden.

Da wir aber bei der Kompression einen kurzen Licht-Flash beobachten konnten, bestätigt das die vorher gemachte Aussage, dass punktuell (in unmittelbarer Umgebung des Nervenpräparates) mindestens mikromolare ATP-Konzentrationen herrschten.

Bei ATP-Konzentrationen $< 1\mu\text{M}$ hat die Lumineszenzreaktion eine lineare Kinetik (die Lumineszenz nimmt langsam und konstant ab), wie wir es beim im folgenden beschriebenen Abbau von 150nM ATP beobachten konnten.

- Schließlich können noch Metabolite der Luciferasereaktion die ATP-induzierte Lumineszenz beeinflussen. Das Enzym Luciferase kann u.a. durch eine

intrinsische Adenylatkinase-Aktivität aus ATP und AMP bei mikromolaren ATP-Konzentration (direkt am Präparat) ADP synthetisieren, was zu den komplexen Abläufen in der Kinetik des Lumineszenzabfalls beitragen könnte (Min & Steghens, 2001). Auch das bei der Lumineszenzreaktion anfallende Produkt Oxyluciferin kann die Kinetik der Luciferasereaktion beeinflussen.

5.3.2 Durch das Präparat bedingte schnelle Abnahme der Lumineszenz

Außer den oben genannten Faktoren können auch zelluläre Mechanismen am Abfall der Lumineszenz nach Nervenkompression beteiligt sein.

Es ist bekannt, dass auf Zellen in verschiedenen Geweben Ectonucleotidasen vorhanden sind, die Nukleotide wie ATP, ADP und AMP hydrolysieren können. In kultivierten Gliazellen und Neuronen wurden verschiedene Familien von Ectonucleotidasen genetisch und funktionell nachgewiesen, allerdings ist momentan noch wenig über die genaue Ausprägung der einzelnen Ectonucleotidasefamilien in den verschiedenen Geweben bekannt (Zimmermann, 2000). Da sie in der Lage sind ATP und seine Metabolite zu hydrolysieren, könnten sie das durch Kompression freigesetzte ATP sowohl im Inneren des Nerven als auch an seiner Außenseite schnell abbauen, was in einer Abnahme der Lumineszenz resultieren würde.

Es ist möglich, dass ein Teil des freigesetzten ATP schon während der Kompression hydrolysiert wurde, und somit für die Lumineszenzreaktion gar nicht erst zur Verfügung stand. Das könnte ein weiterer Grund dafür sein, dass bei der Kompression initial nur 60nM im Gesichtsfeld gemessen wurden.

5.4 Messung des ATP-Abbaus am Präparat

Um zu erfassen, welchen Anteil Ectonucleotidasen an dem zuvor beschriebenen schnellen Abfall der Lumineszenz nach der ATP-Freisetzung haben, und welche Kapazität sie bei der Hydrolyse von ATP erreichen können, wurde experimentell der ATP-Abbau durch Nervenpräparate untersucht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die K_m -Werte der Ectonucleotidasen im mikromolaren Bereich (10 bis 100 μ M) (Zimmermann, 2000) liegen. Da sich die Lumineszenzmessung mit Luciferase jedoch nicht für so hohe ATP-Konzentrationen eignet, wurde an den Präparaten (kultivierte Astrozyten oder isolierte Spinalwurzeln von Ratten) überprüft und quantitativ analysiert, mit welcher Kinetik 150nM ATP hydrolysiert werden konnten.

Der Abbau von 150nM ATP durch kultivierte Astrozyten war im Vergleich zum Abbau durch Spinalwurzeln sehr langsam. Das kann einerseits an einer geringeren Zellzahl, und damit einer geringeren Anzahl an Ectonucleotidasemolekülen, andererseits an unterschiedlicher Enzymausstattung durch Exprimierung verschiedener Familien von Ectonucleotidasen liegen.

Dieselben Ursachen könnten auch dafür verantwortlich sein, dass sich Vorder- und Hinterwurzeln (unterschiedliches Gewicht) in der Abbaugeschwindigkeit leicht zu unterscheiden schienen.

Um diffusionsbedingte Schwankungen bei der Lumineszenzmessung zu vermeiden wurden dabei die Versuchsschalen mit den verschiedenen Präparaten regelmäßig geschüttelt.

5.5 Inhibierung von Ectonucleotidasen durch Hemmstoffe

Es wurde in weiteren Experimenten versucht Ectonucleotidasen auf den Präparaten, die sich für den schnellen ATP-Abbau verantwortlich zeigten, zu inhibieren, um zu erfahren,

- a) ob ein Teil des freigesetzten ATP schon während der Kompression abgebaut wurde, und somit bei der Lumineszenzmessung eine niedrigere initiale ATP-Konzentration messbar war als tatsächlich freigesetzt wurde.
- b) welche Familien von Ectonucleotidasen auf den isolierten Spinalwurzeln für den ATP-Abbau funktionelle Bedeutung haben.

Dazu wurden die Ectonucleotidaseinhibitoren $\beta\gamma$ -me-ATP und ARL 67156 getestet.

Für beide Substanzen ist bekannt, dass sie eher unspezifisch wirken:

während $\beta\gamma$ -me-ATP die Familie der eNPP (EctoNukleotid-Phosphodiesterase/Pyrophosphatase 1 und/oder 3) hemmt (Joseph *et al.*, 2004), wirkt ARL 67156 unspezifisch auf verschiedene Familien von Ectonucleotidasen (eNPP, eNTPDase) (Ghildyal & Manchanda, 2004).

Einige andere Substanzen konnten nicht verwendet werden, da sie im Leerversuch selbst Lumineszenzanstiege verursachten.

5.5.1 Hemmung des ATP-Abbaus durch $\beta\gamma$ -me-ATP

Der ATP-Abbau an kultivierten Astrozyten konnte durch Zugabe des Ectonucleotidasehemmstoffes $\beta\gamma$ -me-ATP deutlich gehemmt werden. Das deutete darauf hin, dass vor allem die Ectonucleotidasefamilie der eNPPs (Ecto- Nukleotid-Phosphodiesterase/ Pyrophosphatase), welche durch $\beta\gamma$ -me-ATP hauptsächlich gehemmt wird, für den ATP-Abbau auf den kultivierten Astrozyten verantwortlich war.

Nun sollte der ATP-Abbau am intakten, isolierten Nervengewebe gehemmt werden. Beim Abbau von 150nM ATP durch isolierte Spinalwurzeln ließ sich nach Zugabe von $\beta\gamma$ -me-ATP eine deutliche, aber unvollständige Hemmung des ATP-Abbaus auslösen (Joseph *et al.*, 2003). Das gibt einen Hinweis darauf, dass sicher Ectonucleotidasen der eNPP-Familie auf den Zellen vorhanden waren, dass außer eNPPs aber auch andere Familien von Ectonucleotidasen auf den verschiedenen Zellen exprimiert wurden.

Wurde vor Kompression einer Spinalwurzel $\beta\gamma$ -me-ATP zugegeben, konnte eine durchschnittlich höhere initiale Lumineszenz (entspricht einer höheren initialen ATP-Konzentration in der Badlösung) gemessen werden als ohne $\beta\gamma$ -me-ATP. Das bestätigt die These, dass schon während der Kompression ein großer Teil des freigesetzten ATPs hydrolysiert wird und Ectonucleotidasen eine hohe Hydrolysekapazität für ATP besitzen. Diese Tatsache könnte besonders im Hinblick auf die Entstehung und Regulierung von P2-Rezeptor vermitteltem Schmerz bedeutend sein.

Der nach Kompression folgende ATP-Abbau wurde durch $\beta\gamma$ -me-ATP signifikant verlangsamt, wie schon beim Abbau von 150nM ATP beobachtet.

Das zeigt, dass nach Kompression eines peripheren Nervs Ectonucleotidasen (besonders der Familie der eNPPs, aber auch weiterer Familien) wesentlich am Abbau von ATP und somit an der Regulierung der extrazellulären ATP- und Adenosin- Konzentrationen beteiligt sind.

Dadurch können sie die Aktivierung von P1 und P2-Rezeptoren beeinflussen und maßgeblich an der Signalisierung von Schmerz mitwirken.

5.5.2 Hemmung des ATP-Abbaus durch ARL 67156

Um weitere Familien von Ectonucleotidasen zu zeigen, wurde zusätzlich getestet, welche Wirkung ARL 67156 auf den Abbau von 150nM ATP durch isolierte Spinalwurzeln hat.

Auf nicht-myelinisierenden Schwannzellen wurde eNTPDase2 aus der Familie der eNTPDasen immunhistologisch nachgewiesen (Braun *et al.*, 2004)). Sie scheint insbesondere im peripheren Nervensystem am ATP-Abbau beteiligt zu sein. Durch ARL 67156 zeigte sich jedoch nur eine schwache Hemmung (schwächer als durch β -me-ATP) des ATP-Abbaus von 150nM ATP durch die Spinalwurzelpräparate. Ursache dafür kann einerseits sein, dass ARL 67156 die Ectonucleotidasen der Familien der eNPPs und eNTPDasen nur schwach hemmt, andererseits, dass es weitere Ectonucleotidasen auf den Zellen der isolierten Spinalwurzeln gibt, die an verschiedenen Schritten des ATP-Abbaus beteiligt sind und den ATP-Abbau maßgeblich zu bestimmen scheinen, für die aber noch keine spezifischen Hemmstoffe zur Verfügung stehen.

Eine genauere Quantifizierung und Analyse des ATP-Abbaus ist momentan aufgrund fehlender spezifischer und wirksamer Ectonucleotidaseinhibitoren nicht möglich.

Die Ergebnisse zeigen, dass ATP durch Nervenkompression zwar in ausreichender Konzentration freigesetzt wird, um P2-Rezeptoren zu aktivieren, sie zeigen aber auch, dass ATP diese Rezeptoren nur kurzzeitig aktivieren kann, da es durch Ectonucleotidasen schnell hydrolysiert wird.

5.6 Einfluss von ATP und seinen Metaboliten auf die Nozizeption

Gleichzeitig mit den Rezeptoren konkurrieren auch Ectonucleotidasen nach Kompression um die limitierte freigesetzte Menge an ATP. Durch die schnelle Hydrolyse von ATP kommt es zur Anhäufung von Adenosin, welches einerseits die Wirkung von ATP an P2X_{2/3}-Rezeptoren verstärken (Wildman *et al.*, 1997) (Abbracchio & Burnstock, 1998), andererseits P1-Rezeptoren (A₁, A_{2a}, A_{2b}, A₃) an nozizeptiven Hinterwurzelneuronen aktivieren kann.

A₁, A_{2a}, A₃ -Rezeptoren können bei physiologischen Adenosin-Konzentrationen (nanomolar) aktiviert werden. A_{2b} Rezeptoren befinden sich vor allem in der Blase und im Dickdarm (Burnstock, 2001) und benötigen pathologische Adenosin-Konzentrationen von mindestens 24µM um aktiviert zu werden (King & Townsend-Nicholson, 2004). A₁-Adenosinrezeptoren (EC₅₀ bei 0,31µM) haben peripher eine antinozizeptive Wirkung und werden bei geringeren Adenosinkonzentrationen aktiviert, während A_{2a}-Rezeptoren (EC₅₀ bei 0,7µM) peripher pronozizeptiv (aber antiinflammatorisch) wirken und bei etwas höheren Konzentrationen aktiviert werden (King & Townsend-Nicholson, 2004), (Karlsten *et al.*, 1992), (Sawynok, 1998).

Bei chronischer Kompression mit entzündlichen Veränderungen und erhöhten extrazellulären ATP-Konzentrationen kann die Schmerzempfindung zusätzlich verstärkt werden, da zum einen durch Azidose bei Entzündung die Wirkung rekombinanter, pH-sensitiver P2X₂ Rezeptoren (auch P2X_{2/3}) über eine Steigerung der Affinität zu ATP verstärkt wird (King *et al.*, 1996) (Li *et al.*, 1996), andererseits vermehrte Anhäufung von Adenosin die Wirkung von ATP an P2X_{2/3}-Rezeptoren verstärken kann. Es wäre zusätzlich möglich, dass ATP vermindert abgebaut wird, da Ectonucleotidasen ihr Umsatzmaximum bei alkalischem pH erreichen (Zimmermann, 2000), bei Entzündung jedoch ein erniedrigter pH auftritt. Das könnte zu einer verstärkten Aktivierung von P2-Rezeptoren führen und eine Sensibilisierung gegen Schmerz verursachen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Rezeptoren für extrazelluläres ATP wurden in den letzten Jahren auf der Oberfläche von nozizeptiven Nervenzellen gefunden. Deshalb könnte ATP, nach Freisetzung durch Kompression eines peripheren Nervs, auch an der dabei auftretenden Schmerzempfindung beteiligt sein.

In dieser Studie sollte durch Kompression isolierter Spinalwurzelpräparate eine quantitative Analyse der ATP-Freisetzung mit Echt-Zeit-Lumineszenzmessung, und unter elektrophysiologischer Beobachtung der Summenaktionspotentiale der A-Fasern, gemacht werden. Kompression der Präparate für 8 Sekunden mit einem Metallstempel (d=1mm) hatte einen sofortigen Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration und einen Abfall der Amplitude der Summenaktionspotentiale der A-Fasern zufolge. Nach wenigen Minuten war die Lumineszenz weitgehend zum Ausgangsniveau zurückgekehrt, während die Amplitude des Summenaktionspotentials, nach einer initialen teilweisen Erholung, erniedrigt blieb. Es wurde nach Kompression (ausreichend, um 50% der Amplitude des Summenaktionspotentials zu blockieren) ein vorübergehender durchschnittlicher Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration im Gesichtsfeld (d=2mm) um 60nM gemessen. Welche Rolle Ectonucleotidasen auf den Spinalwurzelpräparaten beim folgenden Rückgang der ATP-Konzentration spielten, wurde zusätzlich am Abbau von zugegebenen 150nM ATP mit und ohne vorheriger Zugabe von Ectonucleotidase-Hemmstoffen beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass Ectonucleotidasen eine sehr hohe ATP-Abbauleistung haben, die durch Hemmstoffe (β -me-ATP, ARL 67156) nur teilweise blockiert werden konnte.

Aus den Beobachtungen schließen wir, dass sich bei Kompression eines peripheren Nervs die extrazellulären Konzentrationen von ATP und von Metaboliten des ATP-Abbaus (Adenosin) ausreichend erhöhen, um purinerge P1 und P2-Rezeptoren auf nozizeptiven afferenten Neuronen aktivieren zu können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abbracchio MP & Burnstock G (1998). Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* **78**, 113-145.

Arcuino G, Lin JH, Takano T, Liu C, Jiang L, Gao Q, Kang J, & Nedergaard M (2002). Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9840-9845.

Bodin P & Burnstock G (2001). Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* **26**, 959-969.

Braet K, Vandamme W, Martin PE, Evans WH, & Leybaert L (2003). Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers ATP release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26. *Cell Calcium* **33**, 37-48.

Braun N, Sevigny J, Robson SC, Hammer K, Hanani M, & Zimmermann H (2004). Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* **45**, 124-132.

Burnstock G (2001). Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 182-188.

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

Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, & Wood JN (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* **377**, 428-431.

Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, & Buell GN (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **114**, 386-396.

Chizh BA & Illes P (2001). P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev* **53**, 553-568.

Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, & Ford AP (2000). Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* **407**, 1011-1015.

Conti E, Lloyd LF, Akins J, Franks NP, & Brick P (1996). Crystallization and preliminary diffraction studies of firefly luciferase from *Photinus pyralis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**, 876-878.

Cook SP & McCleskey EW (2002). Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* **95**, 41-47.

Cotrina ML, Lin JH, ves-Rodrigues A, Liu S, Li J, zmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, & Nedergaard M (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15735-15740.

Dubyak GR (2003). Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol Pharmacol* **63**, 773-776.

Ford SR, Chenault KH, Bunton LS, Hampton GJ, McCarthy J, Hall MS, Pangburn SJ, Buck LM, & Leach FR (1996). Use of firefly luciferase for ATP measurement: other nucleotides enhance turnover. *J Biolumin Chemilumin* **11**, 149-167.

Gerevich Z, & Illes P (2004). P2Y receptors and pain transmission. *Purinergic Signalling* **1**, 3-10.

Ghildyal P & Manchanda R (2004). Effects of cooling and ARL 67156 on synaptic ecto-ATPase activity in guinea pig and mouse vas deferens. *Auton Neurosci* **115**, 28-34.

Goding JW, Grobбен B, & Slegers H (2003). Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* **1638**, 1-19.

Grafe P, Mayer C, Takigawa T, Kamleiter M, & Sanchez-Brandelik R (1999). Confocal calcium imaging reveals an ionotropic P2 nucleotide receptor in the paranodal membrane of rat Schwann cells. *J Physiol* **515** (Pt 2), 377-383.

Jeftinija SD & Jeftinija KV (1998). ATP stimulates release of excitatory amino acids from cultured Schwann cells. *Neuroscience* **82**, 927-934.

Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo X, Surprenant A, & North RA (2003). Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* **23**, 8903-8910.

Joseph SM, Buchakjian MR, & Dubyak GR (2003). Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* **278**, 23331-23342.

Joseph SM, Pifer MA, Przybylski RJ, & Dubyak GR (2004). Methylene ATP analogs as modulators of extracellular ATP metabolism and accumulation. *Br J Pharmacol* **142**, 1002-1014.

Jou IM & Lai KA (1998). Neuromonitoring of an experimental model of clip compression on the spinal nerve root to characterize acute nerve root injury. *Spine* **23**, 932-939.

Karlsten R, Gordh T, & Post C (1992). Local antinociceptive and hyperalgesic effects in the formalin test after peripheral administration of adenosine analogues in mice. *Pharmacol Toxicol* **70**, 434-438.

King BF & Townsend-Nicholson A. Nucleotide and Nucleoside Receptors. 2004. www.biotrend.com/pdf/nucleotiderev.pdf.

King BF, Ziganshina LE, Pintor J, & Burnstock G (1996). Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH. *Br J Pharmacol* **117**, 1371-1373.

Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, & Surprenant A (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* **377**, 432-435.

Li C, Peoples RW, & Weight FF (1996). Acid pH augments excitatory action of ATP on a dissociated mammalian sensory neuron. *Neuroreport* **7**, 2151-2154.

Maxwell WL, Irvine A, Graham, Adams JH, Gennarelli TA, Tipperman R, & Sturatis M (1991). Focal axonal injury: the early axonal response to stretch. *J Neurocytol* **20**, 157-164.

Mayer C, Quasthoff S, & Grafe P (1998). Differences in the sensitivity to purinergic stimulation of myelinating and non-myelinating Schwann cells in peripheral human and rat nerve. *Glia* **23**, 374-382.

Min K & Steghens J (2001). ADP is produced by firefly luciferase but its synthesis is independent of the light emitting properties. *Biochimie* **83**, 523-528.

North RA (2004). P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms. *J Physiol* **554**, 301-308.

Ruan HZ & Burnstock G (2003). Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol* **120**, 415-426.

Sawynok J (1998). Adenosine receptor activation and nociception. *Eur J Pharmacol* **347**, 1-11.

Shi R & Blight AR (1996). Compression injury of mammalian spinal cord in vitro and the dynamics of action potential conduction failure. *J Neurophysiol* **76**, 1572-1580.

Stout CE, Costantin JL, Naus CC, & Charles AC (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* **277**, 10482-10488.

Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Stone LS, Hargreaves KM, Buell G, Surprenant A, North RA, & Elde R (1998). P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci* **10**, 3470-3478.

Wildman SS, King BF, & Burnstock G (1997). Potentiation of ATP-responses at a recombinant P2x2 receptor by neurotransmitters and related substances. *Br J Pharmacol* **120**, 221-224.

Wirkner K, Sperlagh B, & Illes P (2007). P2X₃ receptor involvement in pain states *Mol Neurobiol* **36**, 165-183.

Xiang Z, Bo X, & Burnstock G (1998). Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett* **256**, 105-108.

Ziganshin AU, Ziganshina LE, & Burnstock G (2002). P2 receptors: theoretical background for the use in clinical practice. *Bull Exp Biol Med* **134**, 313-317.

Zimmermann H (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 299-309.

Zimmermann H (1994). Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci* **17**, 420-426.

Zimmermann H (2004). Der lange Weg zum ATP als extrazellulärem Signalstoff. *Neuroforum*. [1/04], 145-150.

8 DANKSAGUNG

Ich möchte allen Mitarbeitern am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität für ihre großzügige Unterstützung danken.

Besonderer Dank geht an Frau Dr. C. R. Rose und Frau Silke Meier für die großzügige Bereitstellung ihrer Zellkulturen.

Frau Christa Müller und Herrn Franz Rucker möchte ich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit danken. Vielen Dank für die Präparationen, die aufschlussreichen Erklärungen und die versierte technische Anleitung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. P. Grafe für sein außergewöhnliches Engagement, seine Geduld und seine unermüdliche Unterstützung bedanken.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit tatkräftig unterstützt haben und mir eine umfangreiche Ausbildung ermöglicht haben.

9 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Veronika Maria Schaffer

Wohnort 82418 Murnau

Geboren am * 25.06.1981 in Garmisch-Partenkirchen

Familienstand Ledig, keine Kinder

Eltern Dr. med. Franz Schaffer
Ingeborg Charlotte Schaffer

Geschwister Bernhard Schaffer
Christoph Schaffer

Ausbildung

1988 – 1992 Grundschule Murnau

1992 – 1998 Staffelsee-Gymnasium Murnau,

1998 – 1999 USA: Highschool-Year an der Bayport Highschool in Green Bay,
Wisconsin, Abschluss mit Highschool-Diploma

1999 – 2001 Staffelsee-Gymnasium Murnau, Abitur

30.04.2008 Abschluss des Medizinstudiums mit der Note 2,0

2004 – 2008 Dissertation am Physiologischen Institut der LMU über das Thema
„Bestimmung der ATP-Freisetzung und des ATP-Abbaus an peripheren
Nerven mittels Lumineszenzmessung“

München, den 5.08.2008