

Einfluss purinergere Substanzen auf das Wachstum sensorischer Neurone

Dissertation
zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Benjamin Grau
München, 13. Dezember 2004

Erstgutachter:
Zweitgutachter:

Prof. Dr. Rainer Uhl
Prof. Dr. Benedikt Grothe

Tag der mündlichen Prüfung:

21. Februar 2005

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

München, Dezember 2004

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	15
2.1	Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen und ihre Anwendung	15
2.1.1	Fluoreszenzfarbstoffe	15
2.1.2	Zusätze für das Zellkulturmedium	16
2.1.3	Verwendete Agonisten und Antagonisten	16
2.1.4	Beschichtungslösungen	17
2.1.5	Puffer und Medien	17
2.1.6	Zellkulturschälchen	19
2.1.6.1	Herstellung der Schälchen	19
2.1.6.2	Beschichtung der Deckgläschen	20
2.1.7	Die Mikropipetten für die Orientierungsexperimente	20
2.2	Das Zellsystem	23
2.2.1	Lagerung und Bebrüten der Eier	24
2.2.2	Präparation und Kultur der Ganglien	24
2.2.3	Aufrechterhaltung der Wachstumsbedingungen während der Messungen	25
2.3	Mikroskopie	26
2.4	Experimente	27
2.4.1	Zytoskelettmessungen	27
2.4.2	Orientierungsexperimente	28
2.4.3	Gradientencharakterisierung	29
2.5	Auswertung und Bildanalyse	30
2.5.1	Zytoskelettmessungen	30
2.5.2	Orientierungsmessungen	32
2.6	Verwendete Software	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Zielsetzung	37
3.2	Ergebnisse der Zytoskelettexperimente	37
3.2.1	Untersuchung von ATP und seinen Abbauprodukten	37

3.2.2	Charakterisierung beteiligter Rezeptoren	40
3.2.3	Untersuchungen an Signalketten	43
3.3	Ergebnisse der Orientierungsexperimente	45
3.3.1	Einfluss von ATP, ADP, AMP und Adenosin auf das Richtungswachstum	48
3.3.2	Untersuchung der beteiligten Rezeptoren an der Adenosin-induzierten Orientierung	53
3.3.3	Untersuchungen an der Signalkette	58
3.4	Ergebnisse der Gradientencharakterisierung	63
3.4.1	Zusammenhang zwischen Widerstand und Öffnung der Pipetten	63
3.4.2	Untersuchung der Gradientenform in Abhängigkeit der Größe der Pipettenöffnung	65
4	Diskussion	68
4.1	Extrazelluläres Adenosin beeinflusst das F-Aktin neuronaler Wachstumskegel	68
4.2	Neuronale Wachstumskegel orientieren sich in extrazellulären Adenosingradienten	69
4.3	Bedeutung von Konzentrationsgradienten für das Richtungswachstum	70
4.4	Generierung orientierender Konzentrationsgradienten	72
4.5	Charakterisierung der Konzentrationsgradienten	76
4.6	Beschreibung der beteiligten Rezeptoren und möglicher weiterführender Signalketten	81
4.7	Mögliche physiologische Bedeutung	87
4.8	Quellen für extrazelluläres Adenosin	88
4.9	Gibt es Adenosingradienten im Nervensystem?	91
4.10	Möglicher Beitrag zur Regeneration	92
4.11	Möglicher Beitrag zur Entwicklung	93
5	Zusammenfassung	94
6	Literatur	96
7	Curriculum Vitae	108

1 Einleitung

Die Orientierung in der Umwelt, das Finden von Wegen zu bestimmten Orten, stellt in gewisser Weise ein Charakteristikum und eine Voraussetzung für die Höherentwicklung des Lebens dar, und dies nahezu auf allen Stufen der Organisation. Grundlage hierfür ist zum einen die Fähigkeit zur Bewegung als solches, zum anderen die Möglichkeit, diese Bewegung im Raum zu orientieren. Die ortsgerichtete Bewegung findet also als Antwort auf und in direkter Abhängigkeit von der jeweiligen Umgebung statt. Relativ unerheblich ist dabei, ob die Bewegung einen Ortswechsel des Objektes zur Folge hat, oder ob diese fixiert sich ganz oder nur mit Teilen im Raum orientieren. Um eine Raumorientierung zu ermöglichen, haben sich im Laufe der Evolution und später unter dem, was gemeinhin als Zivilisation bezeichnet wird, verschiedenste Methoden entwickelt und etabliert. Der moderne Mensch entfernt sich hierbei immer weiter von den natürlichen Wegweisern wie dem Erdmagnetfeld oder dem Stand der Sonne, denen zum Beispiel die Vögel folgen. Er baut sich sein eigenes, synthetisches Navigationssystem, entsprechend seiner geistigen und technischen Fähigkeiten auf. Die wichtigste Erfindung, besonders für einen Ortswechsel über größere Strecken, stellen sicher seit langem Land- oder Seekarten dar, die den entsprechenden Bereich der Umwelt mit zunehmender Weiterentwicklung der Kartographie immer präziser und detaillierter beschreiben und abbilden. Eine solche Karte ist jedoch ohne die Kenntnis der eigenen momentanen Position für das Finden des richtigen Weges von geringem Nutzen. Gewisse, leicht erkennbare natürliche Anhaltspunkte und eine zunehmende Kennzeichnung der Umwelt waren lange Zeit die Hilfsmittel, mit denen eine Orientierung möglich war. Um diese grundlegende Voraussetzung eines gezielten Ortswechsels aber eindeutig und unabhängig von Änderungen der Topographie sicher zu stellen, wurde in den letzten Jahren eine technische Lösung entwickelt: Das global positioning system, oder kurz GPS. Dieses System ermöglicht es, die momentane Position basierend auf Positionsdaten verschiedener Satelliten zu berechnen. Dies, in Kombination mit immer detaillierteren und präziseren Karten, versetzt den Menschen in die Lage, sich völlig ohne Kenntnis seiner Umgebung, nahezu ferngesteuert von Punkt A nach Punkt B zu bewegen.

Das Problem der Orientierung und der Navigation ist jedoch nicht nur auf ganze Organismen mit in Abstimmung arbeitenden Zellen und Zellkomplexen, wie bei-

spielsweise den Menschen, beschränkt, sondern ist generell von zentraler Bedeutung bei dem Aufbau eines solchen Organismus aus seinen zellulären Komponenten. So unterschiedlich die Navigationssysteme unserer modernen Zivilisation und die Mechanismen lebender Organismen, ihre Organe oder einzelne Zellen gerichtet zu bewegen oder wachsen zu lassen, auch sein mögen, haben sie doch eine grundlegende Gemeinsamkeit: Es ist zu Beginn der Reise nicht der genaue Weg bekannt, sondern man begibt sich von einem Wegpunkt zum nächsten, von einer möglichen Abzweigung zur folgenden. Trotz dieser prinzipiellen Übereinstimmung gibt es, aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der vom Menschen konstruierten und der in der belebten Welt entstandenen Systeme einen gravierenden Unterschied, der direkt zur Fragestellung dieser Arbeit überleitet: Während bei den artifiziellen Systemen die Funktionsweise zumindest dem Entwickler bekannt ist, aber die Funktionalität bisweilen mit Schwächen behaftet ist, verhält es sich bei den biologischen, im Laufe der Evolution entwickelten Systemen genau umgekehrt. Die Funktionalität ist perfekt, wie täglich durch alles Lebende bewiesen wird, doch das Verständnis des Aufbaus und der Wirkungsweise solcher Systeme ist in vieler Beziehung (noch) mangelhaft und unvollständig.

Ich möchte mich im Folgenden auf die zelluläre Ebene beschränken. Eines der eindrucksvollsten, weil vielleicht am komplexesten und wohl auch kritischsten Beispiele für zelluläre Navigation findet sich bei der Entwicklung des Nervensystems. Zum einen müssen hier zum Teil sehr weite Strecken zurückgelegt werden, zum anderen ist der Aufbau neuronaler Schaltkreise (Tessier Lavigne und Goodman, 1996) von besonderer Bedeutung für den Organismus, basiert darauf doch seine gesamte Funktionalität, angefangen von sensomotorischen Antworten bis hin zu den kognitiven Leistungen des Gehirns. Doch die Notwendigkeit des zielgerichteten Wachstums neuronaler Zellen beschränkt sich nicht nur auf die Phase der embryonalen Entwicklung des Nervensystems; auch im adulten Organismus ist sie von eminenter Bedeutung. Dies gilt zum Beispiel für die Regeneration zerstörter Bereiche nach Verletzung (Tessier-Lavigne und Goodman, 2000) oder aber auch für die auf synaptischer Plastizität basierenden Lernvorgänge (Bonhoeffer, 1996; McAllister et al., 1999; Skaper et al., 2001; McEwen und Chattarji, 2004). Die Komplexität dieser Aufgabe erscheint in Anbetracht der großen Zahl an Nervenzellen mit ihrer Unmenge an Verschaltungen nahezu unüberwindlich.

Daraus leiten sich die vielleicht größten Fragestellungen der Neurobiologie ab, nämlich wie sich dieses komplexe Muster der neuronalen Verschaltung mit dieser Präzision aufbauen und entwickeln kann, wie die Nervenzelle wächst und wie sie zu ihrem Ziel hin geleitet wird.

Schon 1880 beobachtete Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1906) die handförmigen, freibeweglichen Strukturen an den wachsenden Enden der Neuriten und nannte sie „cono de crecimiento“ – Wachstumskegel. Sie zeichnen sich durch ein hohes Maß an Autonomie (Kater und Rehder, 1995) und dynamischer Beweglichkeit aus, so dass sie in ihren Bewegungen häufig mit den sich amöboid bewegenden Schleimpilzen verglichen werden (Weiner, 2002). Viele der Erkenntnisse, die aus Untersuchungen an *Dictyostelium* stammen, lassen sich auch tatsächlich recht gut auf das Wachstum und die Bewegung von neuronalen Wachstumskegeln übertragen, insbesondere die Umstände, die den Umbau des Zytoskeletts und die Gradiententheorie betreffen (Song und Poo, 2001). Man sollte allerdings nicht vergessen, dass es sich bei den Wachstumskegeln um ein Zellorgan, also einen Teil einer Zelle handelt. Die Wachstumskegel stellen in gewisser Weise die Navigationseinheit der sich entwickelnden Nervenzellen dar (Tessier Lavigne und Goodman, 1996), indem sie ihre Umgebung aktiv erforschen, auf extrazelluläre Signale reagieren, um so den richtigen Weg zu finden. Dies führt schließlich zur Verbindung zwischen der Nervenzelle und ihrer Zielzelle.

Wachstumskegel sind die handförmige Verlängerung des Neuriten mit äußerst beweglichen peripheren Regionen, den so genannten Filopodien und den Lamellipodien. Diese sondieren so durch ihre ständige Bewegung ihre Umgebung. Das Wachstum des Neuriten und die Bewegung des Wachstumskegels resultiert aus einem ständigen Umbau zellulärer Komponenten durch entsprechende Enzyme und Proteinkomplexe. Verantwortlich für die Vorwärtsbewegung des Wachstumskegels, sowie für die Bewegung von Filopodien und Lamellipodien ist das Zytoskelett; von seinen Bestandteilen sind es besonders die Mikrotubuli und die Mikrofilamente. Diese beiden Komponenten liegen im Wachstumskegel in einer charakteristischen Anordnung vor: Während die Mikrotubuli den zentralen Bereich des Wachstumskegels einnehmen, sind die Mikrofilamente in der Peripherie lokalisiert. Dabei übernehmen die Mikrotubuli die Stabilisierung der sich verlängernden Neuriten; die eigentliche Motilität des Wachstumskegels beruht jedoch

auf einem Zusammenspiel von Mikrofilamenten und Myosin. Diese Komponenten bilden zusammen mit entsprechenden Gegenlagern in der Membran einen molekularen Motor. Mikrofilamente sind Aktinpolymere, die zusammen mit verschiedenen Aktin-bindenden und -assoziierten Proteinen das Aktinzytoskelett bilden und die dynamische Komponente in den peripheren Regionen des Wachstumskegels darstellen (Lin et al., 1994; Welch et al., 1997); dort unterliegen sie stetem Umbau und Umverteilung.

Aktin kommt in einer monomeren (G-Aktin) und in einer polymeren Form (F-Aktin) vor. Jedes Aktinmolekül kann ein Adenosintriphosphat (ATP) binden, das beim Einbau in das Polymer zu ADP Adenosindiphosphat (ADP) hydrolysiert wird. An den Aktin-Filamenten lassen sich im Wachstumskegel zwei verschiedene Pole in charakteristischer Anordnung unterscheiden. Solche, an denen G-Aktin angefügt wird (im Wachstumskegel nach außen gerichtet) und solche, an denen depolymerisiert wird (im Inneren des Kegels) (siehe Abbildung 1). Zwar gibt es auch energieunabhängige, langsam ablaufende Assemblierung über nichtkovalente Interaktion zwischen den monomeren Untereinheiten; der äußerst bewegliche Charakter dieser Strukturen begründet sich aber auf Polymerisation des G-Aktins unter Hydrolyse von gebundenem ATP (Engel et al., 1977; Schmidt und Hall, 1998). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Aktin-Formen, bei dem die Filamente am einen Ende durch Polymerisationsprozesse verlängert werden und gleichzeitig am entgegen gesetzten Ende wieder abgebaut werden. Die permanente Polymerisation in den Randbereichen des Kegels würde zu einer steten Vergrößerung des Wachstumskegels führen. Um dem entgegen zu wirken, also um die zentrifugale Verlängerung der Filamente zu kompensieren, werden die gesamten Filamente nach innen verschoben. Diese retrograde Bewegung der Filamente wird durch die oben erwähnten Motoren, also durch Myosin und die entsprechende Verankerung an der Membran, verwirklicht (Suter und Forscher, 1998). Die Vorwärtsbewegung erfolgt durch eine Fixierung der Filamente am extrazellulären Substrat über entsprechende Ankerproteine (Turner, 2000).

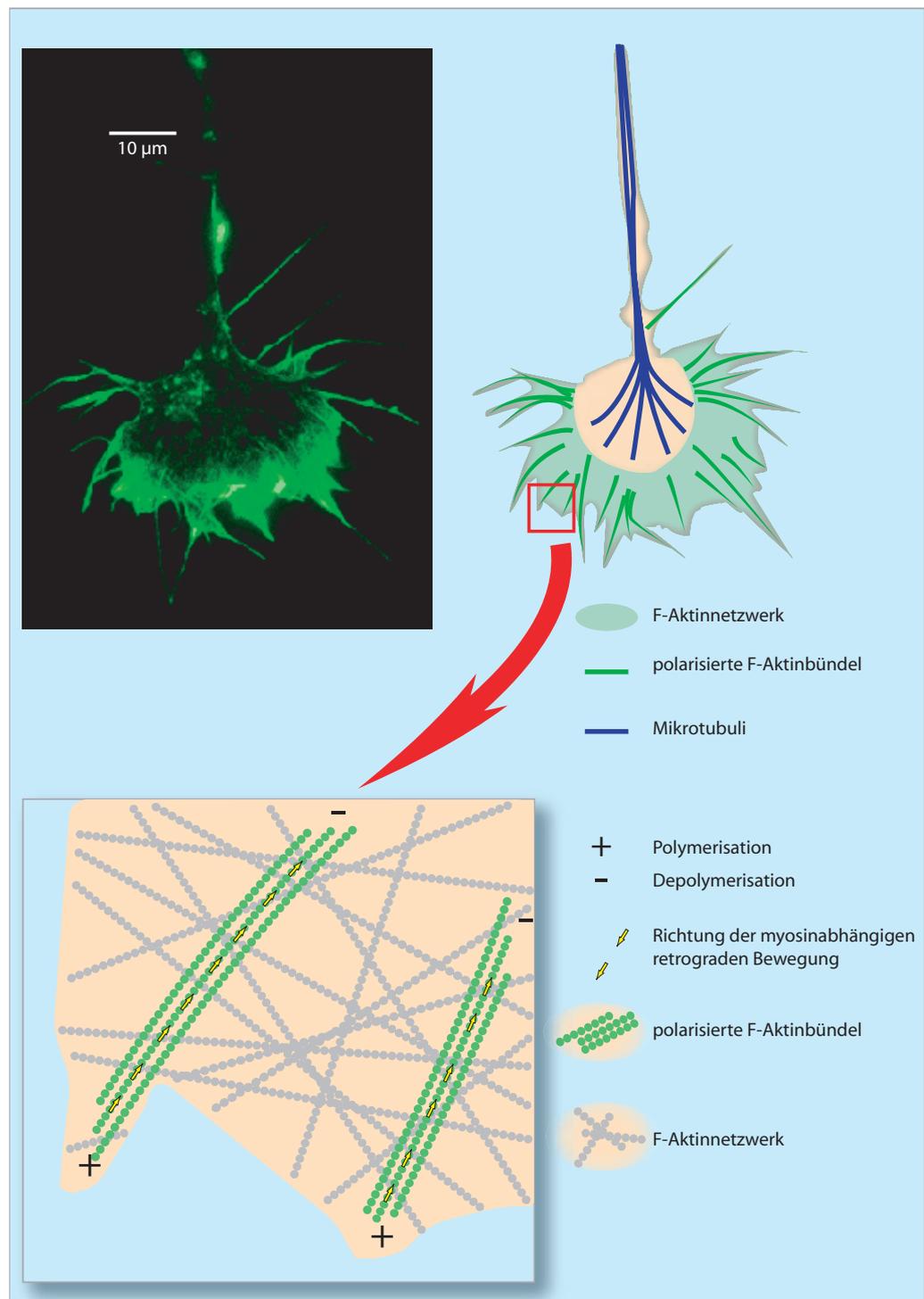


Abb. 1: Schematische Darstellung der Anordnung von Mikrotubuli und Mikrofilamenten im Wachstumskegel (verändert nach Lin et al., 1994; Lin und Forscher, 1995).

Wenn nun die Bewegung des Wachstumskegels auf dem Umbau des Zytoskeletts basiert, stellt sich die Frage, durch welche Signale dieser Umbau gesteuert wird, um ein gerichtetes Wachstum zu induzieren und wie der Wachstumskegel diese Signale

erkennt. Ramón y Cajal postulierte, dass die Wachstumskegel durch Chemotropismus geleitet werden, aber es dauerte noch fast 100 Jahre, bis die Existenz solcher Lenkungsmoleküle im Nervensystem tatsächlich nachgewiesen werden konnte (Gundersen und Barrett, 1979; Bagnard et al., 2000).

Die grundlegenden Mechanismen, die der Wirkung verschiedener Lenkungsmoleküle zugrunde liegt, werden häufig in Chemorepulsion, Chemoattraktion, kontaktabhängige Repulsion und kontaktabhängige Attraktion unterteilt (Goodman, 1996; Mueller, 1999). Dass diese recht starre Einteilung die Realität zum Teil nicht richtig widerspiegelt, zeigt sich zum Beispiel daran, dass diffusible Lenkungsfaktoren durch Bindung an Moleküle der extrazellulären Matrix in lokal wirkende kontaktabhängige Signalstoffe umgewandelt werden können (MacLennan et al., 1997). Auch reagiert ein Wachstumskegel in Abhängigkeit seines inneren Zustandes, zum Beispiel in Abhängigkeit von der interzellulären cAMP Konzentration (Song et al., 1997), unterschiedlich auf ein und denselben Signalstoff. Doch um eine grobe Vorstellung davon zu bekommen, wie Wachstumskegel gelenkt werden können, ist diese Einteilung sicher hilfreich.

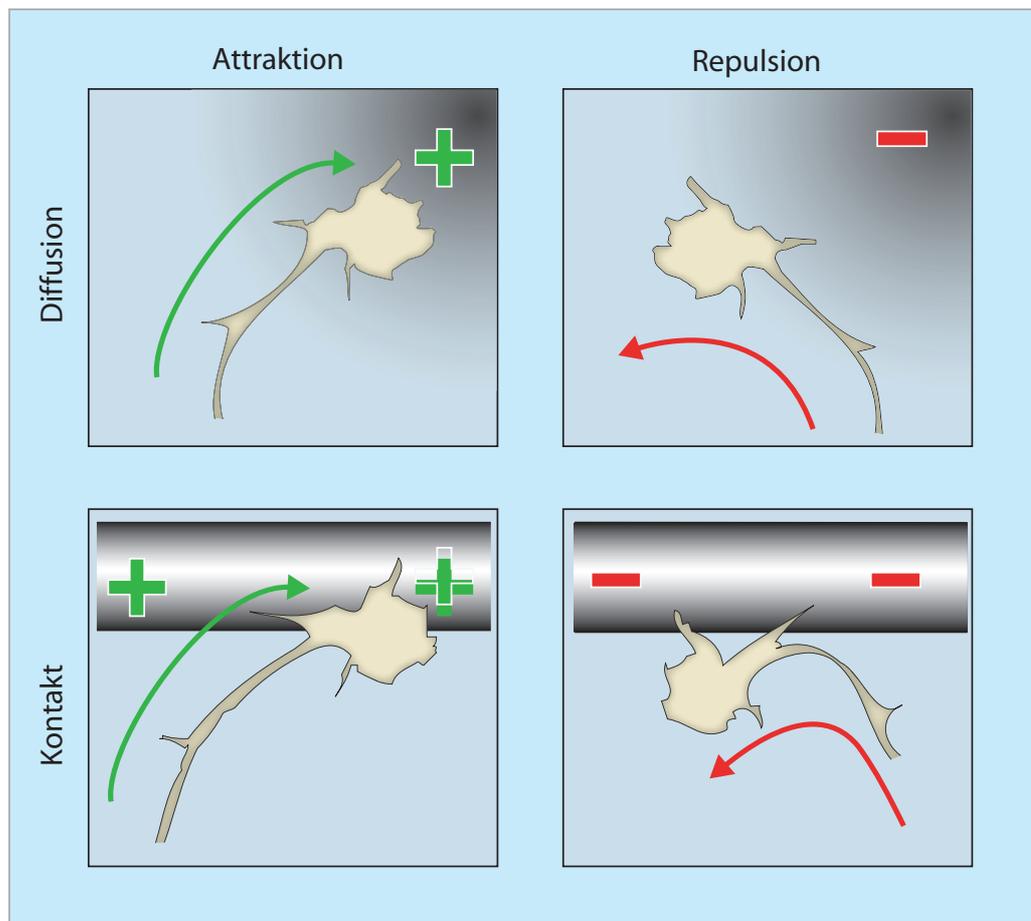


Abb. 2: Lenkungsmechanismen werden danach unterteilt, ob sie anziehend (attraktiv) oder abstoßend (repulsiv) wirken und ob sie als diffusible Stoffe über weite Strecken oder substratgebunden, also kontaktvermittelt über kurze Entfernung wirken (verändert nach Mueller, 1999).

Heute sind verschiedene Lenkungsmoleküle – diffusible und gebundene Stoffe – aus unterschiedlichen Stoffgruppen bekannt; darunter sind Proteine, wie Netrine, Slits und einige Semaphorine, Wachstumsfaktoren wie NGF (nerve growth factor) und BDNF (brain derived neurotrophic factor) und Neurotransmitter wie Acetylcholin, Glutamat und ATP, um nur die Bekanntesten zu nennen (Zheng et al., 1994; Culotti und Kolodkin, 1996; Paves und Saarma, 1997; Tuttle und O'Leary, 1998; Dontchev und Letourneau, 2003). Damit ein solches Lenkungsmolekül auch lenken kann, muss es dem Wachstumskegel in irgendeiner Weise eine vektorielle Information übermitteln. Bei kontaktvermittelten Stoffen erscheint dies relativ einfach, ähnlich dem Schienennetz der Eisenbahn. Eine interessante Parallele ist, dass dieser Mechanismus auch von der Autoindustrie aufgegriffen wurde, detektieren moderne Autos doch mittlerweile die Fahrbahnmarkierungen. Weitaus kom-

plexer erscheint die Kodierung der nötigen Richtungsinformation bei diffusiblen Stoffen. Hierfür muß die entsprechende Substanz in einer Form dargereicht werden, dass ein ausreichend großes physiologisch relevantes Konzentrationsgefälle, ein sogenannter Konzentrationsgradient, über dem Wachstumskegel anliegt. Wie dieser Gradient beschaffen sein muss, also seine relative Steilheit und seine absolute Konzentration, hängt von der Bindungskonstante der entsprechenden Rezeptoren und deren Verteilungsdichte auf dem Wachstumskegel ab (Goodhill, 1998). Der Konzentrationsgradient führt zu einer asymmetrischen Aktivierung der Rezeptoren des Wachstumskegels (siehe Abbildung 3) und wird auf diese Weise in ein intrazelluläres Signal übersetzt, wobei die vektorielle Information erhalten bleibt – unter Umständen sogar verstärkt wird (Postma und Van Haastert, 2001) – und so in einer Änderung der Wachstumsrichtung resultiert.

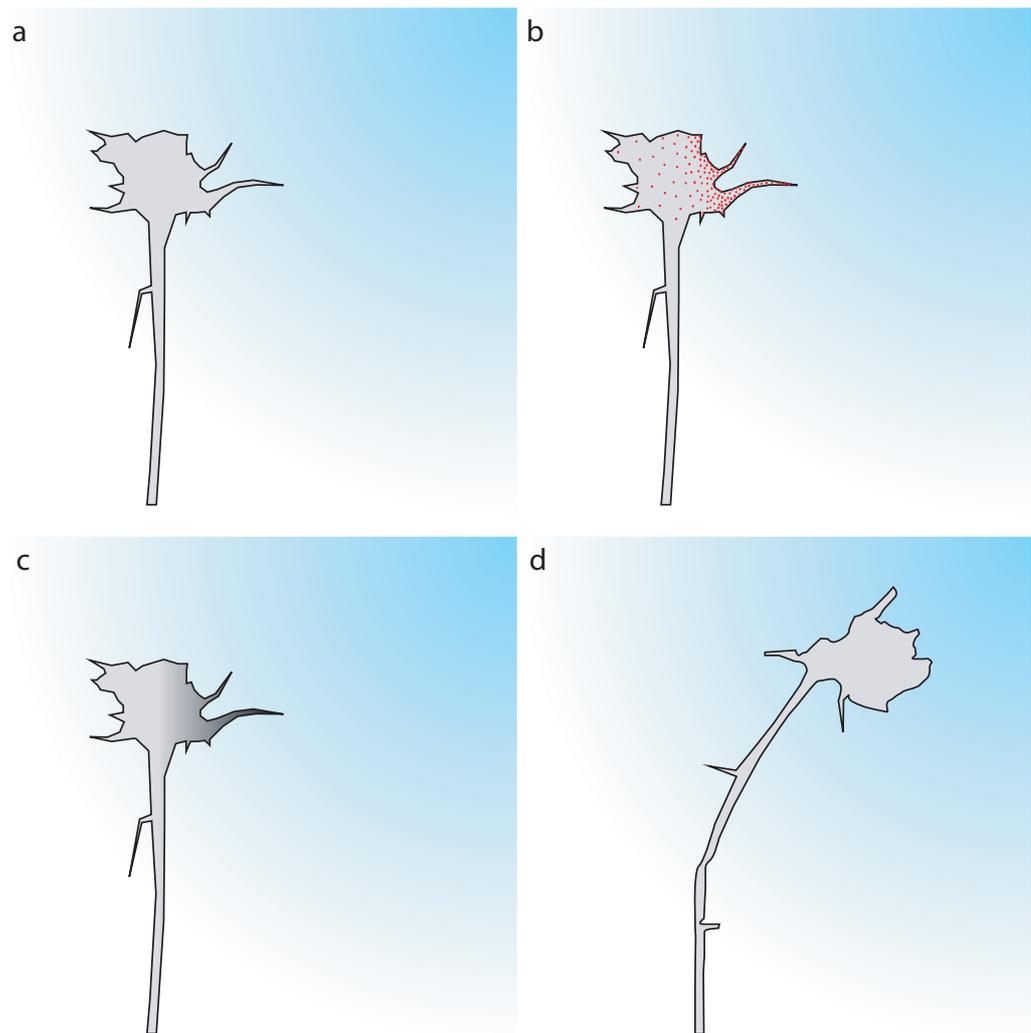


Abb. 3: Schematische Darstellung der Richtungsänderung eines Wachstumskegels in einem extrazellulären Konzentrationsgradienten. a extrazellulärer Konzentrationsgradient, b asymmetrische Rezeptoraktivierung, c intrazellulärer Gradient, d Wachstumsantwort des Wachstumskegels.

Neben den Grundlagen der Orientierung von Wachstumskegeln außerhalb der Zelle, stellt sich die Frage, auf welche Weise diese extrazelluläre Information in die verschiedenen Signalwege der Zellen eingespeist wird, wie die vektorielle Information des Konzentrationsgradienten auf das Zytoskelett übertragen wird. Ausgehend von den zuvor beschriebenen Vorgängen im Aktinhaushalt, müssen hierfür mindestens vier Prozesse, die das Zytoskelett und damit die Dynamik und die Bewegung der Wachstumskegel beeinflussen, kontrolliert werden: Aktinpolymerisation, Verzweigung der Aktinfilamente, Aktindepolymerisation und die retrograde Bewegung. Da die Zytoskelettmaschinerie ständig läuft, müssen die „zusätzlichen“ Signale der Rezeptorantworten in diese integriert werden. Zusätzlich ist es natürlich

auch denkbar, dass gleichzeitig verschiedene Signale auf den Wachstumskegel wirken. Diese Rezeptorantworten müssen in Abhängigkeit voneinander weitergeleitet werden; eine funktionierende Abstimmung und Modulation der Grundbewegung des Zytoskeletts und unter Umständen verschiedener Rezeptorantworten stellt eine Grundvoraussetzung für eine gerichtete Bewegung dar (Weiner, 2002). Dass dies bei der Vielzahl möglicher an der Orientierung von Wachstumskegeln beteiligten Rezeptoren und ihren nachfolgenden Signalketten zu einem äußerst vielschichtigen Netzwerk führt, liegt nahe; Abbildung 4 soll lediglich diese Komplexität am Beispiel einiger bekannter Lenkungsmoleküle verdeutlichen, wobei auf eine detaillierte Beschreibung an dieser Stelle verzichtet wird.

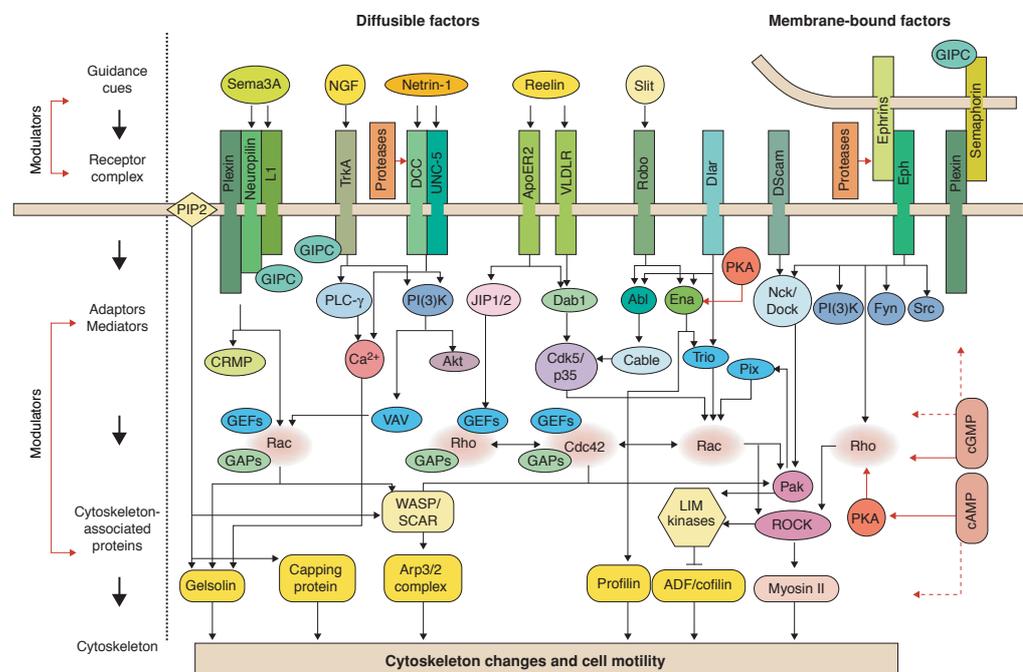


Abb.4: Mögliche Signalwege der Verbindung verschiedener Rezeptoren bekannter Lenkungsmoleküle und dem Zytoskelett und deren Vernetzung untereinander (aus Song und Poo, 2001).

Von zentraler Bedeutung für das Zusammenspiel und Abstimmung der verschiedenen Signalketten scheinen Proteine aus der Rho-Familie kleiner GTPasen zu sein. Von diesen konnten Cdc42, Rac und RhoA auch mit der Dynamik von Lamellipodien und Filopodien von Wachstumskegeln in Verbindung gebracht werden (Dickson, 2001), wobei die ersten beiden das Wachstums fördern und letzterer das Wachstum hemmt. Wie alle kleinen GTP bindenden Proteine wechseln die Rho GTPasen über die Bindung von GTP oder GDP zwischen ihrer aktiven und inak-

tiven Form. Dies wird auf der einen Seite durch so genannte GEFs (guanine nucleotide exchange factors), die den Austausch von GDP mit GTP ermöglichen und auf der anderen Seite durch GAPs (GTPase activating proteins), welche die endogene GTPase-Aktivität und somit die Hydrolyse von GTP zu GDP induzieren, kontrolliert. Ob die Änderung der Wachstumsrichtung allerdings direkt von diesen GTPasen induziert wird, oder ob sie nur die nötigen Aktin-Strukturen für eine entsprechende Reaktion liefern, ist unklar (Hall, 1998; Mueller, 1999; Dickson, 2001) und wahrscheinlich auch abhängig von der Art des extrazellulären Signals.

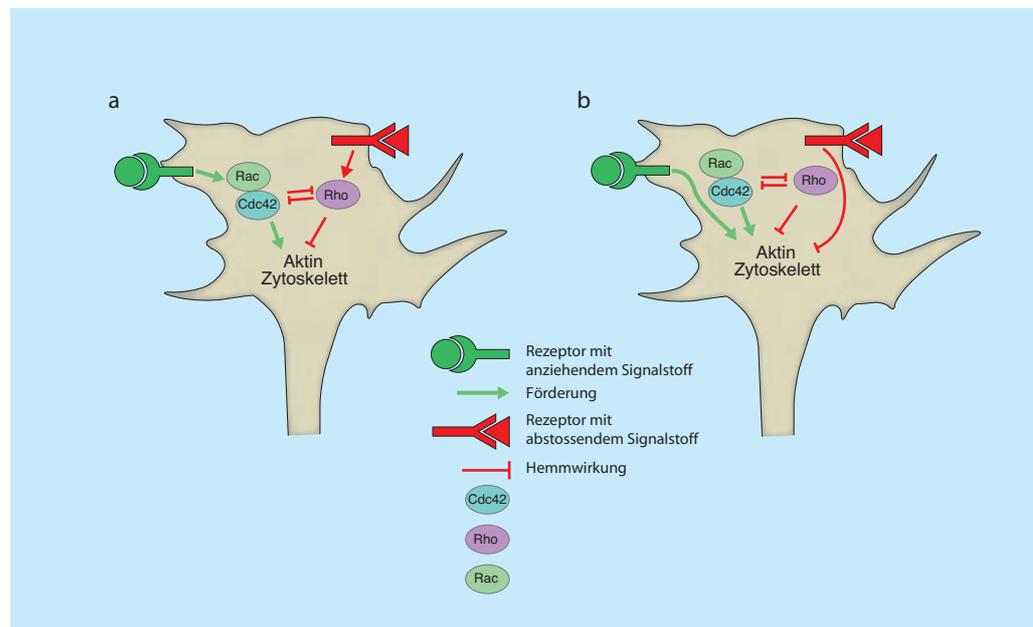


Abb. 5: Mögliche Funktionsweise der Signalübermittlung von den Signalstoffen zum Zytoskelett. Anziehende Signalstoffe aktivieren Rac und Cdc42, während abstoßende Stoffe Rho aktivieren a direkte Beeinflussung der Wachstumsreaktion; b indirekte Beeinflussung der Wachstumsreaktion (verändert nach (Dickson, 2001)).

Jeder Veränderung der Form eines Wachstumskegels, und damit jeder Bewegung muss eine Veränderung in dem Zusammenspiel von Polymerisation, Depolymerisation und der retrograden Bewegung zugrunde liegen und damit sollte auch das Verhältnis von G- und F-Aktin beeinflusst werden. Demnach sollte sich auch jede Bewegung des Wachstumskegels und damit auch seine Antwort auf extrazelluläre Signale mehr oder weniger direkt im Zytoskelett widerspiegeln. Es stellt sich also die Frage, ob der Gehalt an Mikrofilamenten als Maß für die Bewegung und zur Charakterisierung entsprechender, die Bewegung beeinflussender, Signale dienen kann. Fluoreszenzmarkierung von F-Aktin mittels Phalloidinkonjugaten ist seit

längerem bekannt (Barak et al., 1980) und in vorhergehenden Arbeiten (Grau, 2000; Grau et al., 2001; Bartl, 2002) konnte eine Methode zu halbquantitativen Bestimmung des F-Aktin Gehalts und der F-Aktindichte etabliert werden. Basierend darauf konnte gezeigt werden, dass Stoffe, die das Richtungswachstum von Wachstumskegeln beeinflussen, auch einen Effekt auf das F-Aktin haben. So induziert der Nervenwachstumsfaktor NGF, dem attraktive Wirkung auf Wachstumskegel zugesprochen wird, eine Zunahme, wohingegen Cytochalasin B, das eine repulsive Wirkung hat (Dent und Gertler, 2003; Henley und Poo, 2004; Strasser et al., 2004), erwartungsgemäß eine Abnahme in F-Aktin Gehalt und -dichte (Grau, 2000). Ob allerdings auch der Umkehrschluss zulässig ist, also ob Substanzen, die einen förderlichen Einfluss auf das F-Aktin haben, auch das Richtungswachstum beeinflussen, blieb bislang ungeklärt.

Neben NGF, dem ersten identifizierten attraktiven Lenkungsmolekül (Gundersen und Barrett, 1979) für das auch ein positiver Effekt auf das Zytoskelett beschrieben wurde (Paves und Saarma, 1997; Grau et al., 2001), wurde der Einfluss von ATP und seinen Abbauprodukten auf das Zytoskelett untersucht. ATP kann von Neuronen sowohl als Neurotransmitter als auch zusammen mit anderen Neurotransmittern wie Acetylcholin (Richardson und Brown, 1987; Zimmermann und Braun, 1996) als Cotransmitter über Exozytose abgegeben werden; diese Abgabe erfolgt demnach – zumindest in manchen Fällen – aktivitätsabhängig. Der Bedeutung elektrischer Aktivität für die Entwicklung neuronaler Schaltkreise (Zhang und Poo, 2001) ist bislang noch nicht abschließend geklärt, scheint aber von genereller Bedeutung zu sein. Der Einfluss elektrischer Aktivität auf das Richtungswachstum von Wachstumskegeln soll über Modulation entsprechender diffusibler Lenkungsmoleküle laufen (Ming et al., 2001). ATP könnte aufgrund seiner aktivitätsabhängigen Ausschüttung und seiner Fähigkeit neuronale Wachstumskegel zu orientieren ein solches Lenkungsmolekül sein. In diesem Zusammenhang müssen aber auch weitere Charakteristika von ATP betrachtet werden. Aufgrund seiner sehr hohen Ladungsdichte kann es nicht durch die Membran diffundieren und eine aktive ATP-Aufnahme der Zellen konnte bislang nicht gezeigt werden (Zimmermann, 1996; Zimmermann und Braun, 1996). Um nun sowohl eine zeitliche als auch eine räumliche Begrenzung des ATP-Signals zu gewährleisten, wird ATP außerhalb der Zelle sehr schnell abgebaut. Dieser Abbau erfolgt durch Hydrolyse der Nucleotide mit Hilfe von an der Zelloberfläche lokalisierten Enzymen, so genannten Ecto-

Nucleotidasen, bis hin zum zugehörigen Nucleosid und den einzelnen Phosphatmolekülen. Doch auch bei den verschiedenen Abbauprodukten handelt es sich um biologisch aktive Substanzen, sind doch zumindest für ADP und Adenosin entsprechende Rezeptoren beschrieben. Deshalb ist die Einbeziehung dieser purinergen Substanzen in die Untersuchung einer potentiellen Wirkung von ATP von Bedeutung. In wie weit sich die Wirkung dieser Substanzen auf das Zytoskelett – wie auch immer sie geartet sein mag – auch im Richtungswachstum der Wachstumskegel manifestieren, war der zentrale Aspekt der Arbeit. Da bei der Lenkung von Wachstumskegeln die Übertragung der Richtungsinformation vom extrazellulären Signal bis hin zum Zytoskelett und somit zur eigentlichen Wachstumsreaktion entscheidend ist, lag ein zusätzliches Augenmerk der Arbeit auf der eingehenden Untersuchung der für diffusible Stoffe charakteristischen Kodierungsform, dem Konzentrationsgradienten.

Danksagung:

Diese Arbeit wäre ohne die Mithilfe Vieler nicht zu Stande gekommen.

Mein besonderer Dank gilt – in alphabetischer Reihenfolge, die Entsprechenden wissen wofür – folgenden Personen:

Eva Bartl
Gerhard Brändle
Anna Carle
Peter Dittrich
Eva Facher
Michael Fleuchaus
Julia von Frowein
Gudula Grau
Juliana Grau
Jürke Grau
Lorenz Grau
Hartmann Harz
Frank Imkamp
Jörn-Carsten Kamp
Sebastian Munck
Frank Neudel
Ralph Oeser
Katharina Pflüger
Hugo Scheer
Elizabeth Schroeder-Reiter
Susanne Steinhaus
Rainer Uhl
Gerhard Wanner

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen und ihre Anwendung

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen. Ein pH-Meter (Calimatik pH-Meter 766; Knick) mit einer pH-Elektrode (Blue Line 18 PH; Schott) wurde zur pH-Wert-Bestimmung verwendet und die Lösungen gegebenenfalls mit HCl oder NaOH auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt. Die Sterilisation der Lösungen erfolgte mit einem Autoklaven (Systec 2540 EL; Tuttnauer). Hitzesensitive, wie zum Beispiel glukosehaltige, Lösungen wurden durch einen Membranfilter (Schleicher und Schuell) mit 0,2 µm Porengröße und 50 mm Durchmesser sterilfiltriert. Die Medien für die Zellkultur wurden direkt vor dem Gebrauch aus den entsprechenden Lösungen hergestellt. Die Sterilisation der Glas- und Plastikwaren wurde in einem Autoklaven (Systec 2540 EL; Tuttnauer) durchgeführt, mit Ausnahme der Glaspipetten, die für drei Stunden in einem Trockenschrank (FD 115, Binder, Tuttlingen) bei 160 °C hitzesterilisiert wurden, um ein Durchfeuchten der Watte zu umgehen.

2.1.1 Fluoreszenzfarbstoffe

- Carboxyfluorescein [5-(und-6)-carboxyfluorescein (gemischte Isomere)] wurde in einer Konzentration von 100 mM in Ethanol p.A. gelöst und lichtgeschützt bei 8 °C im Kühlschrank gelagert.
- Oregon Green 488 Phalloidin (Molecular Probes) wurde gemäß den Herstellerangaben 6,6 µM in Methanol p.A. gelöst und in Aliquots á 25 µl aufgeteilt. Diese wurden mittels Vakuumkonzentration getrocknet und bei -18 °C gelagert. Vor den Experimenten wurde der Farbstoff wieder in 25 µl Methanol p.A. gelöst, dann 500 µl PBS⁻ und danach 500 µl PBS⁻ mit 2 % Rinderserumalbumin (Fraktion V, proteasefrei) zugegeben. Hierbei wurde durch gravimetrische Bestimmung genauestens auf das Einhalten der angegebenen Volumina geachtet, um Abweichungen in der Farbstoffkonzentration an verschiedenen Messtagen zu verhindern. Alle Zytoskelettfärbungen wurden mit der so erhaltenen 165 nM Farbstofflösung durchgeführt.

2.1.2 Zusätze für das Zellkulturmedium

- **Nerve Growth Factor (NGF)** (7S NGF (Becton Dickinson)) wurde in PBS⁻, dem 1 mg/ml Cytochrom c (Roche Diagnostics GmbH) beigemischt wurde, in einer Konzentration von 100 ng/μl gelöst und bei -18 °C gelagert.
- **Antibiotika Stammlösung:** 10000 Einheiten/ml Penicillin G und 10 mg/ml Streptomycinsulfat wurden in physiologischer Kochsalzlösung (154 mM NaCl-Lösung) gelöst, anschließend durch einem Spritzenvorsatzfilter (0,22 μm; Neolab) sterilfiltriert und in entsprechenden Aliquots bei -18 °C gelagert.

2.1.3 Verwendete Agonisten und Antagonisten

- **Adenosin** (Böhringer-Mannheim) wurde direkt vor den Experimenten in Dimethyl Sulfoxid (DMSO) im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 31, Bandelin) in einer Konzentration von 10 mM gelöst.
- **ADP** (Adenosindiphosphat) wurde direkt vor den Experimenten in PBS⁻ in einer Konzentration von 10 mM gelöst.
- **Alloxazin** (Benzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione) (Brackett und Daly, 1994; Liang und Haltiwanger, 1995) wurde direkt vor den Experimenten in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst.
- **AMP** (Adenosinmonophosphat) wurde direkt vor den Experimenten in PBS⁻ in einer Konzentration von 10 mM gelöst.
- **ATP** (Adenosintriphosphat) wurde direkt vor den Experimenten in PBS⁻ in einer Konzentration von 10 mM gelöst.
- **CGS 15943** (9-Chloro-2-(2-furanyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5-amine) (Ongini et al., 1999) wurde direkt vor den Experimenten in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst.
- **CGS 21680** (2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine hydrochloride) (Landis, 1983; Jarvis et al., 1989) wurde in einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei -18 °C gelagert.

- **Forskolin** (Calbiochem) (Lankford et al., 1988; Bhat, 1993) wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und aliquotiert. Diesen Aliquots wurde das Lösungsmittel mittels Vakuumkonzentration wieder entzogen und die Substanz bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Direkt vor den Experimenten wurde das Forskolin in DMSO in einer Konzentration von 10 mM resuspendiert.
- **KT 5720** (Calbiochem) (Kase et al., 1987) wurde in DMSO in einer Konzentration von 500 μM gelöst und in Aliquots bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.
- **NECA** (Adenosine-5'-N-ethylcarboxamide) (Fredholm et al., 2001) wurde direkt vor den Experimenten in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst.
- **Rp-cAMPS** (Biomol) (Botelho et al., 1988) wurde in destilliertem Wasser gelöst. Vorratslösungen mit einer Konzentration von 50 mM wurden bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.1.4 Beschichtungslösungen

- **Poly-D-Lysin hydrobromid** (MW 261,000) wurde in destilliertem Wasser (1 mg/ml) gelöst und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.
- **Laminin** (Roche) wurde steril in 20 μl (500 $\mu\text{g/ml}$) Aliquots aufgeteilt und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor dem Gebrauch wurde es mit Hanks zu einer 2 % Lösung verdünnt.

2.1.5 Puffer und Medien

- **PBS⁻** (Phosphat buffered saline) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

NaCl	136,89 mM
KCl	2,68 mM
Na ₂ HPO ₄	10,14 mM
KH ₂ PO ₄	1,76 mM
pH 7,4 (NaOH/HCl)	

Diese wurden in destilliertem Wasser gelöst, anschließend autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

- **Hanks** (Hanks balanced salt solution) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

KCl	5,36 mM
KH_2PO_4	0,44 mM
NaCl	136,89 mM
NaHCO_3	4,17 mM
Na_2HPO_4	0,34 mM
Glucose	5,55 mM
Phenolrot	26,57 μM
pH 7,1 (NaOH/HCl)	

Diese wurden in destilliertem Wasser gelöst, anschließend sterilfiltriert und bei 8 °C im Kühlschrank gelagert.

- **Physiologische Kochsalzlösung:** NaCl in einer Konzentration von 154 mM wurde in destilliertem Wasser gelöst und bei –18 °C gelagert.
- **DMEM-F12** (Dulbecos modified eagle medium mit F12-Zusatz und Heps) (Invitrogen, Karlsruhe) wurden als Trockensubstanz bezogen und entsprechend den Herstellerangaben rekonstituiert und der pH-Wert mit NaOH/HCl auf 7,1 eingestellt. Sterilfiltriert wurden die Lösungen bei 8 °C im Kühlschrank gelagert.
- **Fixativ:** In 37 % igem Formaldehyd wurde Glucose mit einer Konzentration von 300 mM gelöst um die Osmolarität der Fixierungslösung auf dem Niveau der Zellkulturmedien zu halten und so Veränderungen der Zellform bei der Fixierung zu vermeiden. Das eigentliche Fixativ enthielt 20 % (v/v) in DMEM-F12, was einer Formaldehydkonzentration von 7,4 % entspricht.
- **Waschpuffer:** 1 % Hühnereiweiß-Albumin wurde direkt vor der Verwendung unter Rühren in PBS^- gelöst und durch Faltenfilter (MN 617 we 1/4, Machery-Nagel) filtriert, um ungelöste Eiweißbestandteile zu entfernen.
- **Permeabilisierungslösung:** 0,1 % Triton X-100 wurde direkt vor den Experimenten in DMEM-F12 gelöst.

- **DRG-Medium** (Zellkulturmedium)

DMEM-F12	90 % (v/v)
Fötale Kälberserum	10 % (v/v)
Antibiotikastammlösung	10 µl/ml
NGF-Stammlösung	0,25 µl/ml

Das sogenannte DRG-Medium (aus dem Englischen: dorsal root ganglion) wurde direkt vor der Verwendung, frisch und unter Zugabe der entsprechenden Stammlösungen angesetzt. Das fötale Kälberserum (FCS; Invitrogen, Karlsruhe) wurde in entsprechenden Aliquots bei -18° gelagert.

2.1.6 Zellkulturschälchen

2.1.6.1 Herstellung der Schälchen

Um die Nervenzellen nach der Präparation zu kultivieren und anschließend damit Messungen durchführen zu können, wurden spezielle Zellkulturschälchen hergestellt. Als Basis dienten hierzu 35 mm Petrischalen mit Nocken (Greiner), die im Boden mit einer zentrischen Bohrung von 15 mm Durchmesser versehen wurden.

Zum Bohren der Schälchen wurde eine Ständerbohrmaschine mit einem Schälbohrer von Hoffmann, 8 bis 20 mm, verwendet. Nach dem Einspannen einer eigens angefertigten Bohrlehre im Schraubstock wurden 15 mm durchmessende Löcher zentrisch bei 970 Umdrehungen pro Minuten die Schälchen gebohrt. Der Durchmesser der Bohrung wurde durch Einstellung des Tiefenanschlags der Bohrmaschine angepasst.

Anschließend wurden die Schälchen für eine halbe Stunde in technisches Ethanol gelegt und in Folge mit Kimwipes (Kimberly-Clark) trockengerieben. Deckgläser für die Mikroskopie mit 24 mm Durchmesser der Stärke 1 (Kindler) wurden für eine halbe Stunde in p.a. Ethanol (Roth) gelegt und ebenfalls vorsichtig mit Kimwipes trockengerieben, um eine rückstandsfreie Oberfläche für die Beschichtung zu gewährleisten.

Auf einer Heizplatte (Monotherm; H+P Labortechnik) wurde Paraffin (rotiplast; Roth) bei 100°C verflüssigt und mit Hilfe eines auf der Heizplatte erwärmten Aluminiumstempels zentrisch auf die Unterseite der Schälchen gestempelt.

Die gereinigten Deckgläschen wurden im nächsten Arbeitsschritt mittels eines Metallrings auf der Heizplatte erwärmt und so von unten an die Parafinschicht auf den Schälchen angeschmolzen.

2.1.6.2 Beschichtung der Deckgläschen

Da Nervenzellen auf dem blanken Glas nicht wachsen können, sondern extrazelluläre Matrixmoleküle als Substrat benötigen, wurden die Deckgläschen im Boden der angefertigten Zellkulturschälchen in zwei Schritten mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtet. Substratadhäsionsmoleküle ermöglichen das Anheften und das Auswachsen der Nervenzellen.

Zunächst wurden die Schälchen über Nacht mit 200 µl der Poly-D-Lysin-Lösung bei 14 °C in einen Weinklimaschrank (Liebherr) beschichtet und anschließend je zweimal mit PBS⁻ und H₂O dest. gewaschen. Die trockenen Schälchen wurden zum Sterilisieren nachfolgend für 40 min in 13 cm Abstand unter eine UV-Lampe (HNS 30W OFR; Osram) gelegt. Die Schälchen wurden bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Unmittelbar vor der Präparation wurden die Schälchen mit 150 µl Lamininlösung beschichtet. Das Laminin wurde dazu mit Hanks auf 2 % verdünnt. Nach zwei Stunden Beschichtungszeit im Zellkulturbrutschrank (Forma Scientific) wurde zweimal mit jeweils 5 ml Hanks gewaschen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Beschichtung nicht trocken fiel um eine daraus resultierende Beschädigung der Beschichtungsmatrix zu vermeiden. Anschließend wurden die Schälchen mit 1 ml DRG-Medium aufgefüllt und für weitere 20 Minuten bis zur Präparation im Inkubationsschrank aufbewahrt, damit sich das Medium erwärmt und mit CO₂ anreichert.

2.1.7 Die Mikropipetten für die Orientierungsexperimente

Für die Orientierungsexperimente wurden Mikropipetten aus Borosilicatglaskapillaren (Länge 100 mm; Außendurchmesser 1,6 mm; Wanddicke 0,336 mm; Artikelnummer 1409066 Hilgenberg) verwendet. Als erstes wurden die Glaskapillaren zweimal in Ethanol p.A. im Ultraschallbad gereinigt, um ein späteres Verstopfen der fertigen Pipetten durch etwaige Verschmutzung zu verhindern und anschließend im Trockenschrank getrocknet. Nun wurden die Bruchkanten an den Enden der Kapillaren in der Flamme eines Bunsenbrenners rund geschmolzen, um eine

Beschädigung der Silberchloridschicht der Elektrode durch die Pipetten zu vermeiden. Direkt vor den Experimenten wurden die Pipetten mit Hilfe eines Elektrodenziehgeräts (DMZ-Universal Puller Zeitz-Instruments, München), entwickelt für die Herstellung von Patch-Clamp-Pipetten, aus den Glaskapillaren gezogen.

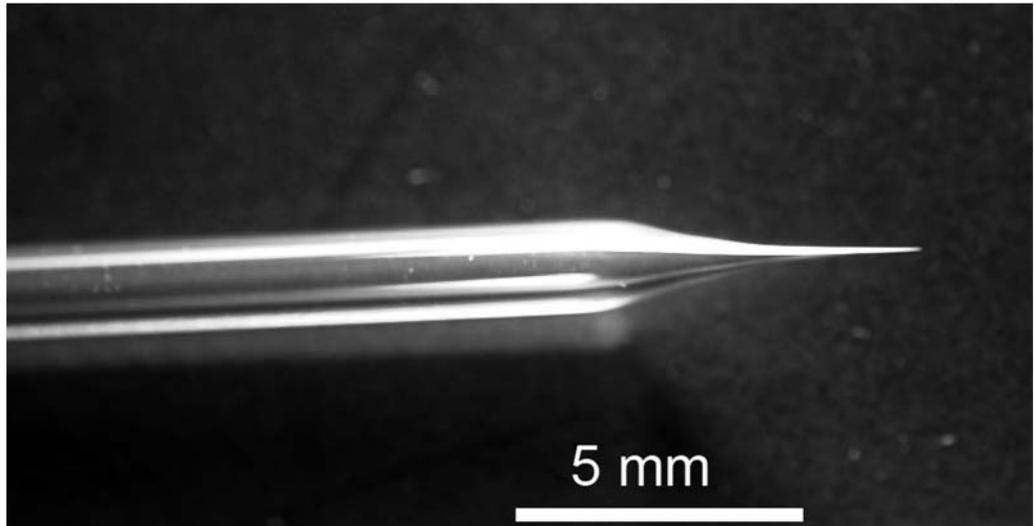


Abb.6: Aufnahme einer typischen verwendeten Mikropipette

Die Zugprogramme des Elektrodenziehgeräts wurden darauf optimiert, Pipetten mit einem Widerstand von entweder 80-100 M Ω oder 40-60 M Ω zu produzieren (siehe Tabelle 1). Da die Herstellung der Pipetten extrem von äußeren Faktoren wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur sowie dem Alter des Filaments abhängig ist, mussten die Programme entsprechend häufig nachjustiert werden. Wichtigste Parameter für diese Korrektur der Programme waren die H und t(F1) der zweiten Phase (P(B)), also die Temperatur und die Verzögerung zwischen dem einleitenden Zug und dem Hauptzug.

	hochohmige Pipette	niederohmige Pipette
P(A)		
H: Temperatur	650	650
F(TH): Stärke des Zugs (Glasverlängerung)	030	030
s(TH): Zugstrecke	022	022
AD: Justage der Kapillare	120	120
P(B)		
H: Temperatur	820	740
F(TH): Stärke des Zugs (Glasverlängerung)	050	050
s(TH): Zugstrecke	012	012
t(H): Verzögerung zwischen dem Ende des ersten Zuges und dem Ausschalten des Filaments	030	030
s(H): Entfernung für das Ausschalten des Filaments	000	000
t(F1): Verzögerung zwischen den Zügen	040	035
F1: Kraft für den ersten Teil des Hauptzuges	450	450
s(F2): Entfernung	006	006
F2: Kraft für den zweiten Teil des Hauptzuges	400	400

Tab. 1: Parameter der entwickelten Zugprogramme des Elektrodeziehgerätes für die zwei verwendeten Pipettentypen, wobei sich das Zugprogramm in zwei aufeinanderfolgende Phasen (A und B) aufteilt. Für eine detailliertere Erklärung sei auf die Gebrauchsanleitung des Herstellers verwiesen.

Alle Pipettenlösungen wurden vor der Verwendung durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,22 μm , Neolab) filtriert, um ein Verstopfen der Pipette zu vermeiden. Die Pipetten wurden zuerst von der Spitze an gefüllt, indem die Pipette mit der Spitze in die entsprechende Lösung getaucht wurde und am Hinterende ein Unterdruck angelegt wurde. Dies war nötig, um eine blasenfreie Befüllung der Spitze zu gewährleisten. Anschließend wurden die Pipetten von hinten mit einer Kanüle bis zu der definierten Höhe von 35 mm befüllt.

Die Größe der Pipettenöffnung kann mit dem Pipettenwiderstand korreliert werden, weshalb dieser Parameter als Kriterium für die Qualität der gezogenen Pipetten und die Größe der Öffnung derselben verwendet wurde. Das Messen des Pipettenwiderstandes erfolgte an einem separaten Aufbau; anschließend wurden

die Pipetten mit dem Pipettenhalter und Pipettenelektrode für die Orientierungsmessungen verwendet.

Die Bestimmung des Pipettenwiderstandes erfolgte mit Hilfe eines Patch-clamp-Verstärkers (EPC 7, HEKA) mit entsprechendem Vorverstärker, eines Funktionsgenerators (HM 8030.4 Hameg) und eines Oszilloskops (TDS 420A, Tektronix). Der Silberdraht, der als Messelektrode im inneren der Pipette verwendet wurde, wurde zunächst mechanisch gereinigt, mit einem Ether-Ethanol-Gemisch (30 % / 70 %) entfettet und anschließend in etwa 2 cm Abstand zu einer Platinelektrode in eine 0,5 M KCl Lösung getaucht. Um auch letzte Reste oxidierten Silbers zu entfernen, wurde der Silberdraht an den Minuspol, der Platindraht an den Pluspol einer 1,5 V Batterie angeschlossen. Nach etwa 5 Minuten wurde in den Stromkreis ein Vorwiderstand von 1 Ω geschaltet, umgepolt und die Silberelektrode für 20 Minuten chloriert. Anschließend wurde der Vorwiderstand entfernt und der Chlorierungsprozess für weitere 2 Minuten fortgesetzt. Da schon kleine Kratzer in der Silberchloridschicht die Stabilität des Elektrodenpotentials stören und außerdem die Gefahr besteht, dass Silberionen die Zelle beeinflussen, wurde die Elektrode regelmäßig auf Beschädigungen in der Silberchloridschicht hin untersucht und gegebenenfalls neu chloriert.

Von dem Funktionsgenerator wurden rechteckförmige Kommandospannungspulse von 5 V (30 Hz) erzeugt; diese wurden von dem Patch-Verstärker mit dem Faktor 0,01 skaliert, sodass das Pipettenpotential zwischen 0 und +50 mV alterierte. Aus dem gemessenen Stromsignalen zwischen Pipette und der auf dem Erdpotential liegenden Badelektrode (Silberchlorid-Pellet, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, England) wurde gemäß des Ohmschen Gesetzes der Pipettenwiderstand errechnet.

2.2 Das Zellsystem

Alle Experimente wurden an Spinalganglienzellen (DRG) aus dem Lumbosakralbereich von Haushuhnembryonen (*Gallus gallus*) durchgeführt. Bei diesen Zellen handelt es sich um sensorische Zellen des peripheren Nervensystems (Rüsse, 1991). Die explantierten Ganglien wachsen über Nacht sonnenförmig (siehe Abbildung 7) aus, sodass in den äußeren Bereichen des Präparats relativ isolierte Wachstumskegel für die Experimente zu finden sind. Alle Zellkulturarbeiten

wurden in einer Reinluftbank (BDK, Luft und Reinraumtechnik GmbH) durchgeführt. Die Inkubation der explantierten Ganglien erfolgte in einem Zellkulturschrank (Forma Scientific), der mit 37 °C und 7,5 % CO₂ betrieben wurde.

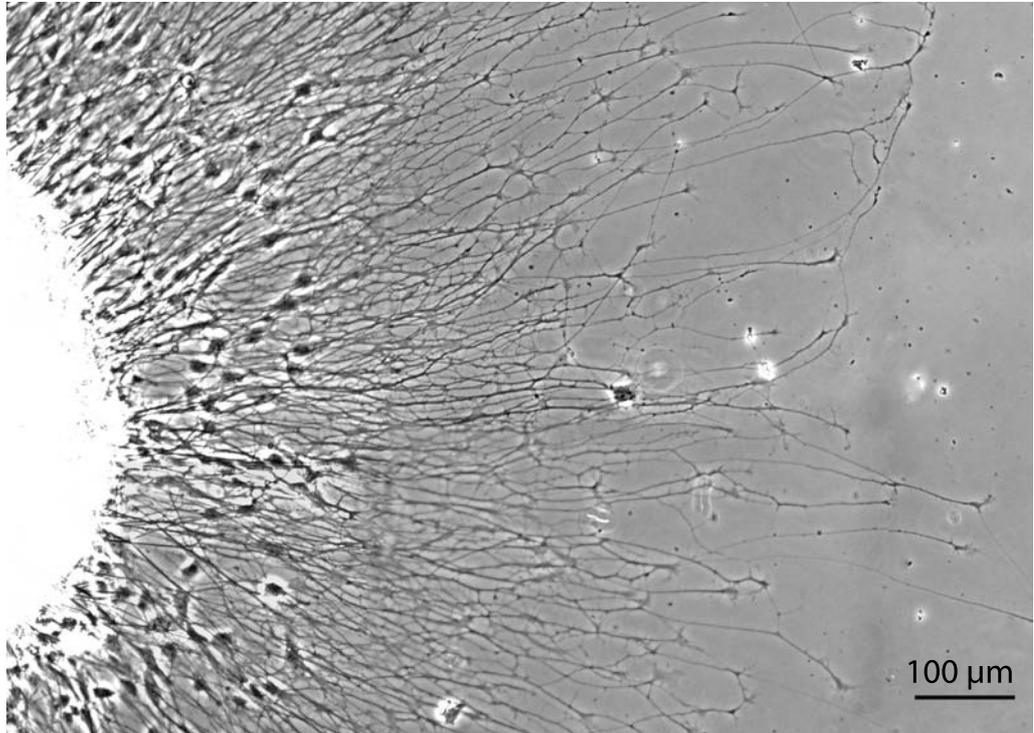


Abb.7: Mikroskopische Aufnahme (differenzieller Interferenz Kontrast) eines Bereiches eines ausgewachsenen Hinterwurzelganglions.

2.2.1 Lagerung und Bebrüten der Eier

Befruchtete Hühnereier wurden von einer Geflügelzucht (Geflügelzucht Hölzl, Moosburg an der Isar) bezogen. Die Eier wurden zwischen Lieferung und Bebrüten bei 14 °C in einem Weintemperierschrank (Liebherr) gelagert. Sie wurden in einem Brüter (Turbo-Fan 70; Hova) mit motorisierter Eierwendung bei 36 °C und bei circa 80 % Luftfeuchtigkeit elf Tage lang bebrütet.

2.2.2 Präparation und Kultur der Ganglien

Die Ganglien wurden aus elf Tage alten Haushuhnembryonen präpariert. Gelegentliche Überprüfungen ergaben, dass dies einem Entwicklungsstadium nach Hamburger von 36 bis 38 entspricht (Bellairs und Osmond, 1988). Die Präparation wurde in einer Reinluftbank durchgeführt. Das verwendete DRG-Medium wurde vor Gebrauch im Inkubator vorgewärmt und dabei mit CO₂ angereichert. Das Ei wurde an der stumpfen Seite, an der sich das Luftreservoir befindet, vorsich-

tig geöffnet. Der Hühnerembryo wurde nach Entfernen der Schalenmembran aus dem Ei entnommen und rasch dekapitiert. Anschließend wurde unter einem Bino-kular (Olympus, SZX90), ausgestattet mit einer Kaltlichtquelle (Schott, KL 1500 electronic) aufgeteilt auf zwei Schwanenhalslichtleiter mit zwei Pinzetten (Dumont Nr. 5 mit Biologiespitze) der Bauchraum ventral geöffnet. Um die Wirbelsäule frei-zulegen wurden die inneren Organe entfernt. Blut und Gewebereste wurden wäh-rend der Präparation wiederholt mit Hanks, der Raumtemperatur hatte, herausgespült. Um die im Lumbosakralbereich gelegenen Ganglien links und rechts der Wirbelsäule entnehmen zu können, mussten die auf der Wirbelsäule lie-genden Sympathikusstränge entfernt werden, indem sie mit einer sehr feinen Prä-paratornadel (Fine Science Tools, geätzte Wolfram-Mikronadel, 1 µm Spitze) abgehoben wurden. Die Ganglien wurden mit der Präparatornadel vorsichtig von der Wirbelsäule abgetrennt und mit Hilfe einer Pinzette herausgenommen.

Anschließend wurden die Ganglien in ein Schälchen mit vorgewärmten und CO₂-äquilibrierten DRG-Medium überführt und dort von Bindegewebsresten und den Nervenfortsätzen befreit.

Die Ganglien wurden nun mit einer 1 ml Gilson-Pipette zentral in Zellkulturschäl-chen, die mit 1 ml DRG-Medium befüllt waren, überführt und über Nacht im Brutschrank inkubiert (Skaper et al., 1990). Nach 21–24 Stunden konnten an den Wachstumskegeln der regenerierten Fortsätze die entsprechenden Experimente durchgeführt werden. Da bei der Präparation der Neurone Kontaminationen nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde das DRG-Medium mit einer Antibiotika-mischung versetzt.

2.2.3 Aufrechterhaltung der Wachstumsbedingungen während der Messungen

Um während der Messung die Wachstumsbedingungen, die für die Nervenzellen nötig sind, aufrechtzuhalten, wurde ein Heizsystem (npi electronic GmbH, Tamm) verwendet. Dieses wurde mit einer selbst gebauten, beheizten Aufnahme für die Kulturschälchen und einer Objektivheizung kombiniert, die bei (Munck, 1999) beschrieben ist. Objektiv und Kammer wurden des Weiteren, um Konvektionsströ-mungen zu reduzieren, über einem Schaumstoffring verbunden. Um zusätzlich zu verhindern, dass CO₂ verloren geht, dass sich die Osmolarität infolge von Verduns-

tung ändert und um die Gefahr von Konvektionsströmungen weiter zu reduzieren, wurde das Medium in den Zellkulturschälchen mit 2 ml Mineralöl (embryonengetestet) überschichtet. Alle Experimente mit Neuronen wurden bei 37 °C durchgeführt.

2.3 Mikroskopie

Alle Wachstumsmessungen und Weitfeld-Fluoreszenzmessungen wurden an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (IX70-S1F; Olympus) durchgeführt. Das Mikroskop war mit einem UV-Licht korrigierten 40fach Ölimmersionsobjektiv (UAPO 40x OL/340/1.35; Olympus) bestückt. Für die Fluoreszenzmessungen wurde ein Filtersatz mit einem Strahlteiler (FITC; DCLP500) und einem Emitter (BP 535/30) verwendet. Der Messaufbau war mit einer charge coupled device (CCD) Kamera (Imago-VGA, TILL Photonics, Gräfelfing), mit einem dynamischen Bereich von 12 Bit versehen, um Zeitrasteraufnahmen und Fluoreszenzaufnahmen zu ermöglichen. Das Anregungslicht für die Fluoreszenzmessungen wurde von einem Monochromator (Polychrome II, TILL PHOTONICS, Gräfelfing) erzeugt (Messler et al., 1996), der über einen Auflichtkondensator (dual port imaging, TILL Photonics, Gräfelfing) eingekoppelt wurde.

Sämtliche TIRF-Messungen (total internal reflection fluorescence) wurden an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) bestückt mit einem 100fach Ölimmersionsobjektiv (Fluar 100x /1.45 oil/ •/0.17, Zeiss), einer CCD-Kamera (IMAGO-SVGA, TILL Photonics, Gräfelfing) und dem TILL-TIRF-Module (TILL Photonics, Gräfelfing) bestehend aus Kondensator, Faser-Kopplung, Mono-mode faser und Shutter durchgeführt. Als Lichtquelle wurde ein 488 nm Laser (Sapphire 488-20, Coherent, Santa Clara, USA) verwendet. Der verwendete Filtersatz bestand aus einem Strahlteiler (DCLP 500 mit AR coating, TILL Photonics, Gräfelfing) und einem Emitter (BP 525/50 mit AR coating, TILL Photonics, Gräfelfing). Zum Einstellen des Einkopplungswinkels des Lasers wurden fluoreszierende Kügelchen, so genannte beads (TransFluoSpheres carboxylate-modified microspheres 0,04 µm (488/605), Molecular Probes, Eugene, USA) in das Präparat eingestreut.

2.4 Experimente

2.4.1 Zytoskelettmessungen

Auf über Nacht in 1 ml Medium kultivierte Ganglien wurden die zu untersuchenden Chemikalien, respektive das entsprechende Lösungsmittel für die Kontrollen, in 1 ml vorgewärmtem Medium gelöst, vorsichtig zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Bei diesen Vorgängen wurde peinlich genau darauf geachtet, Erschütterungen zu vermeiden, um dadurch induzierte Veränderungen des Zytoskeletts zu vermeiden. Anschließend wurden die Präparate mit 2 ml des raumtemperierten Fixativs 10 Minuten fixiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden die Ganglien zweimal mit je 2 ml DMEM-12 vorsichtig gewaschen. Um die F-Aktin Bestandteile des Zytoskeletts für den nicht membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff zugänglich zu machen, wurden die Zellen mit 200 µl der Triton-Lösung permeabilisiert, das heißt die Zellmembran extrahiert. Darauf folgten drei Waschschriffe mit je 2 ml Waschpuffer. Der Waschpuffer des dritten Waschschriffs wurde bis zum Färben (mindestens jedoch 30 Minuten) im Schälchen belassen, um ein vollständiges Absättigen des Hintergrundes mit Protein zu gewährleisten und damit unspezifische Bindungen des Farbstoffs zu verhindern.

Für die Färbung wurde der Waschpuffer gegen 200 µl der Oregon Green 488 Phalloidin-Lösung ausgetauscht und 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde innerhalb von 5 Minuten viermal mit je 2 ml Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe der letzten beiden Milliliter wurde das Präparat mikroskopiert. Da es sich bei der Bindung des Phalloidin-Farbstoff-Konjugates an das F-Aktin um keine feste Bindung handelt, der Farbstoff also langsam abdiffundiert, wurden die Untersuchungen auf 15 Minuten beschränkt um Messartefakte zu vermeiden. In diesem Zeitraum konnten im Schnitt 100 Bilder aufgenommen werden. Um einen möglichst hohen Durchsatz zu erreichen, wurden die Färbungen der einzelnen Schälchen ineinander geschachtelt.

Zeit in Minuten	
0	Schälchen 1 färben
15	Schälchen 2 färben
20	Schälchen 1 waschen
30	Schälchen 3 färben
35	Schälchen 2 waschen
45	Schälchen 4 färben
50	Schälchen 3 waschen
60	Schälchen 5 färben
65	Schälchen 4 waschen
75	Schälchen 6 färben
80	Schälchen 5 waschen
90	
95	Schälchen 6 waschen

Tab.2: Zeitschema für die phasenverschobene Färbung von 6 Schälchen um jeweils 15 Minuten für das Vermessen eines Schälchens zu gewährleisten.

2.4.2 Orientierungsexperimente

Alle Orientierungsexperimente wurden an Ganglien aus 11 Tage bebrüteten Hühneriern (siehe 2.2.2) durchgeführt, bei denen am Tag nach der Präparation das Volumen an DRG-Medium auf zwei Milliliter erhöht wurde. Direkt vor den Experimenten wurden die Schälchen mit 2 ml Öl überschichtet (siehe 2.2.3) und anschließend für 15 Minuten zum Äquilibrieren der Temperatur auf den beheizten Kreutzisch mit entsprechender Aufnahme für das Kulturschälchen des Mikroskops gestellt. Sofern in den Experimenten Inhibitoren verwendet wurden, wurden diese in doppelter Endkonzentration in einem Milliliter DRG-Medium gelöst und zu den explantierten Hinterwurzelganglien vorsichtig hinzugefügt. Diese Zugabe fand jeweils 30 Minuten vor dem Experiment statt. Die ersten 15 Minuten der Inkubation fanden im Brutschrank statt, die restlichen 15 Minuten wie oben erwähnt auf dem Mikroskop. Um die Wachstumskegel für die Experimente ideal auszurichten wurden die Schälchen zum einen vorsichtig mittels des Kreuztisches verfahren, zum anderen wurden die Schälchen innerhalb ihrer Aufnahme im Kreuztisch gedreht.

Die Mikropipetten mit entweder 80–100 M Ω oder 40–60 M Ω Widerstand wurden mit der zu testenden Substanz und 100 μ M Fluorescein in DRG-Medium

gelöst und 35 mm hoch blasenfrei befüllt. Durch die Zugabe von Fluorescein konnte während der Messungen überprüft werden, ob die Pipette verstopft war. Die Pipetten wurden mithilfe von Mikromanipulatoren (JEMI-France, Frankreich) in 50 μm Abstand vom Wachstumskegel in einem Winkel von 90° zur Wachstumsrichtung des Kegels mit der Spitze auf dem Deckglas aufgesetzt (siehe Abbildung 8). Die zu testende Substanz lief aufgrund des hydrostatischen Drucks aus der Pipette und erzeugte so für den jeweiligen Pipettentyp charakteristische Gradienten.

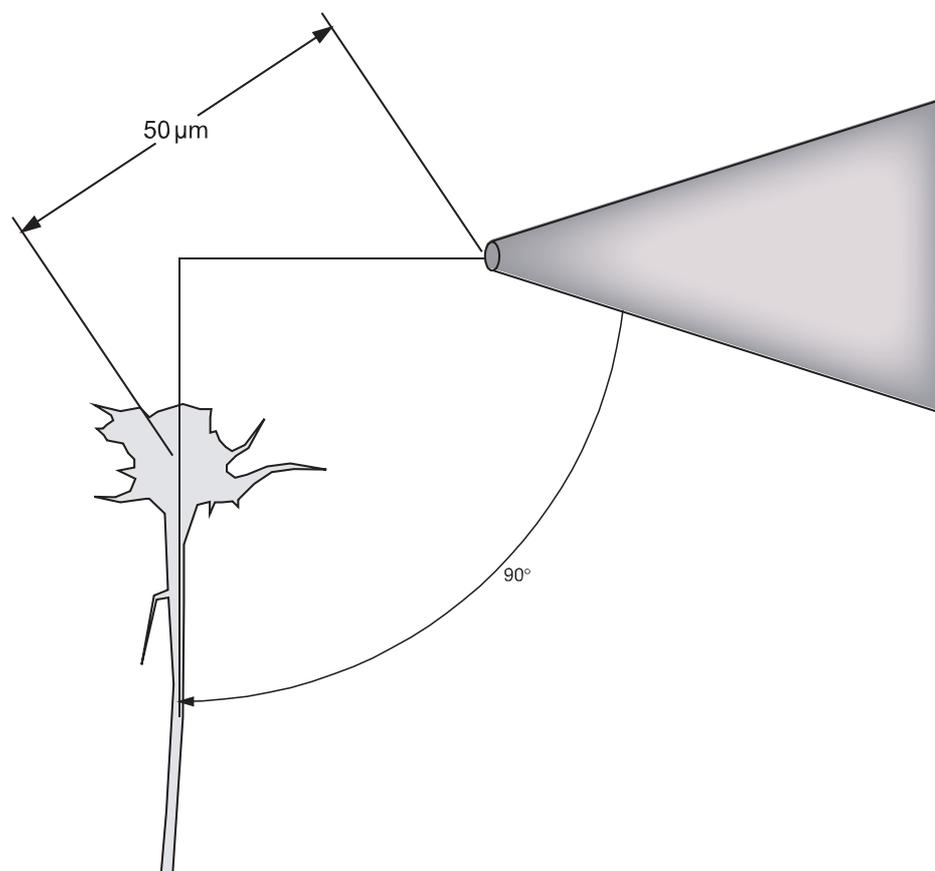


Abb.8: Schematische Darstellung der Ausrichtung der Mikropipetten zum Wachstumskegel in den Orientierungsexperimenten.

2.4.3 Gradientencharakterisierung

Für die Untersuchung der bei den Orientierungsexperimenten erzeugten Gradienten, wurden entsprechende Mikropipetten gefüllt mit 1 mM Carboxyfluorescein in Zellkulturmedium wie in den Orientierungsexperimenten in den Zellkulturschälchen, die 2 ml Zellkulturmedium enthielten, positioniert. Diese Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Hauptaugenmerk lag bei diesen

Messungen auf der zeitlichen Entwicklung und der Form der Gradienten. Zur Charakterisierung der mit den Mikropipetten erzeugten Diffusionsgradienten wurde die Methode der TIRF-Mikroskopie angewandt, um eine hohe Auflösung in z-Richtung zu erreichen und somit die Information über den Gradienten auf den – für den Wachstumskegel detektierbaren – Bereich direkt über dem Deckglas zu beschränken.

2.5 Auswertung und Bildanalyse

2.5.1 Zytoskelettmessungen

Für die Auswertung der digitalen Bilder des fluoreszenzmarkierten F-Aktins der Wachstumskegel, wurde eine von Gerhard Brändle in IDL (Interactive Data Language 5.6, Research Systems) programmierte, speziell an die Erfordernisse angepasste Auswerteroutine verwendet. Die hierbei zugrunde liegenden Vorgänge und Überlegungen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

Um eine automatische Hintergrundkorrektur zu ermöglichen, wurde dieser anhand der Dichtefunktion der Häufigkeitsverteilung der Pixelintensitäten eines jeden Bildes bestimmt. Grundlage hierbei war die Überlegung, dass der Hintergrund am meisten Raum in einem Bild einnimmt, der Wert für den Hintergrund also dem Maximum der Histogrammkurve entspricht. Der so ermittelte Wert wurde dann von dem entsprechenden Bild subtrahiert. Anschließend wurde ein Schwellwert von 30 counts gesetzt, um Streulichtartefakte und Hintergrundrauschen zu minimieren, das heißt nur Pixel mit einer Intensität oberhalb ($>$) von 30 counts gingen in die weiteren Berechnungen ein. Nun wurden manuell um alle Wachstumskegel so genannte ROIs (regions of interest) eingezeichnet, welche die Bereiche für die Bestimmung von Mittelwert und Integral der Fluoreszenzintensität markierten. Die Einschränkung der Auswertung von Pixeln mit einer Intensität oberhalb von 30 macht zudem ein genaues Umranden der Wachstumskegel unnötig, da zusätzlich ausgewählter Hintergrund nicht mit einberechnet wurde. Lediglich die Trennung von Wachstumskegel und Neuriten musste genau und einheitlich durchgeführt werden. Des Weiteren wurde darauf geachtet, alle Kegel in die Auswertung mit einzubeziehen, um die Gefahr des menschlichen Einflusses bei der Auswertung zu minimieren. Das Integral der Fluoreszenz des Wachstumskegels spiegelt den Gesamtgehalt an F-Aktin wieder, der Mittelwert die F-Aktindichte.

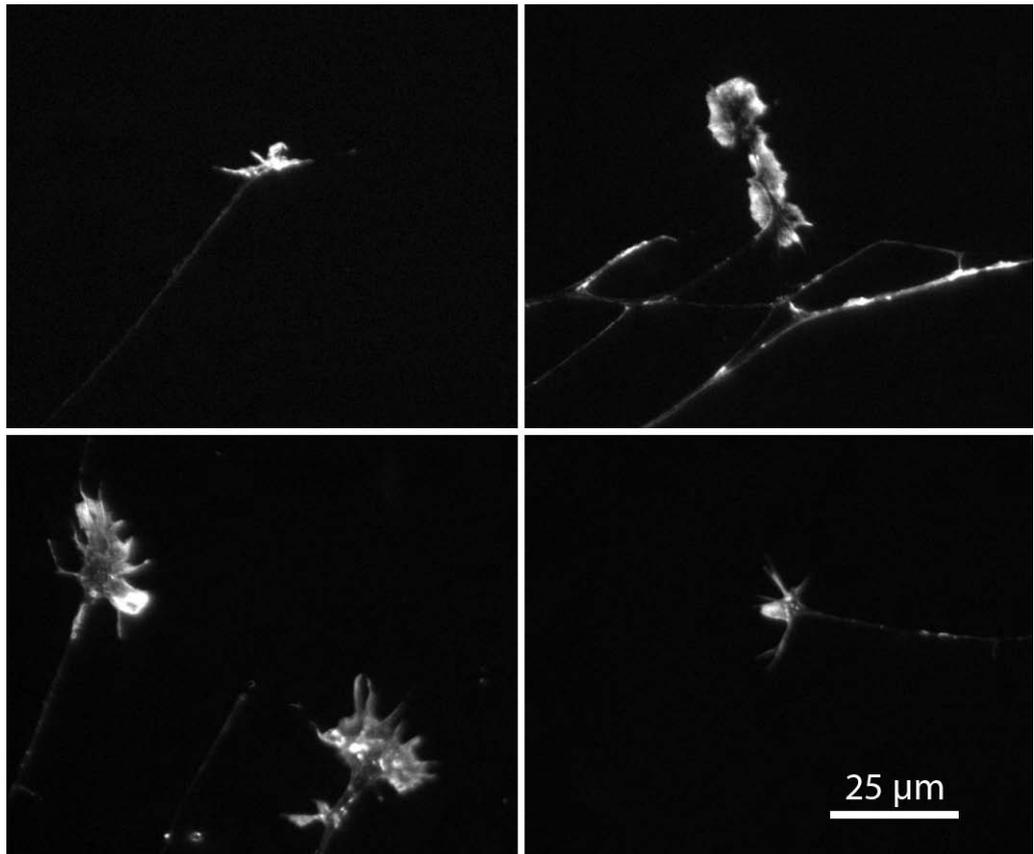


Abb. 9: Beispielbilder für Wachstumskegel mit fluoreszenzmarkiertem F-Aktin.

Die Dichtefunktionen der Häufigkeitsverteilungen der erlangten Messwerte konnten durch entsprechende Transformationen in Normalverteilungen überführt werden. Bei den Mittelwerten der Fluoreszenz war dies durch logarithmische Transformation möglich, bei den Integralen der Fluoreszenz durch Reziproken-Transformation. Die Signifikanz von Unterschieden oder Korrelationen, die für transformierte Daten gefunden wird, gilt auch für die Originaldaten. Die Überführung der Daten in normalverteilte Daten erlaubt die Durchführung parametrischer Tests in den nachfolgenden statistischen Untersuchungen. Diese Tests bieten eine höhere Trennschärfe als ihre nichtparametrischen Pendanten, wodurch auch kleine Unterschiede erkannt werden können.

Verifiziert wurde die Qualität der Transformation, also die Überführung der Messdaten in normalverteilte Daten, durch den Vergleich mit einer theoretischen Normalverteilung mittels des Anpassungstests nach Kolmogorov-Smirnov, was in allen Fällen zu signifikanten Ergebnissen führte.

2.5.2 Orientierungsmessungen

Es wurden differentielle Interferenz Kontrast (DIC) Bilder nach Normarski aufgenommen, um die Orientierungsbewegungen der Wachstumskegel zu beobachten. Die Wachstumsrichtung vor Beginn der Messung wurde durch zwei 5–10 mm voneinander entfernt liegende Punkte, die am Wachstumskegel gelegenen Ende des Neuriten eingezeichnet wurden, bestimmt. Die Wachstumsspuren der untersuchten Neuriten wurden so ausgerichtet, dass sie vom Ursprung des Koordinatensystems starteten und in Richtung der Ordinate wuchsen. Hierfür wurde der vom Wachstumskegel weiter entfernte Punkt des Neuriten auf den Ursprung eines kartesischen Koordinatensystems verschoben und anhand des zweiten Punktes die Abweichung der Wachstumsrichtung als Winkel bestimmt. Um den Wachstumspfad der untersuchten Neuriten auszurichten, wurden die Messwerte um den Koordinatenursprung um den ermittelten Winkel gedreht. Die Berechnung der winkelnormierten Koordinaten erfolgte nach folgenden Transformationsgleichungen (Bronstein und Semendjajew, 1987) basierend auf den trigonometrischen Beziehungen im rechtwinkligen Dreieck (siehe Abbildung 10):

$$\begin{aligned}x' &= x \cos \alpha + y \sin \alpha \\y' &= -x \sin \alpha + y \cos \alpha\end{aligned}$$

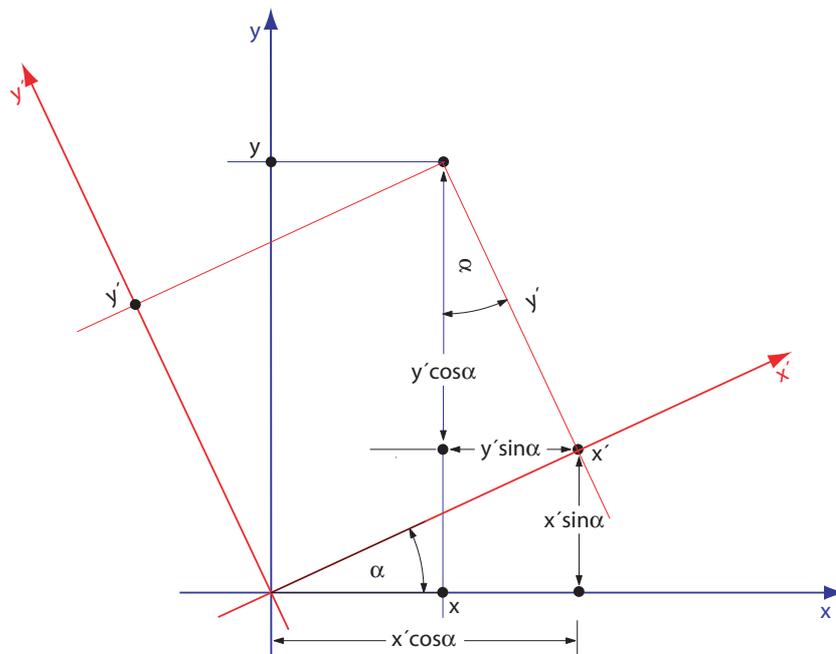


Abb.10: Drehung eines kartesischen Koordinatensystems um den Ursprung um den Winkel α ; blau dargestellt das ursprüngliche x-y-Koordinatensystem mit dem Punkt $(x; y)$, rot das gedrehte $x'-y'$ -Koordinatensystem mit dem Punkt $(x'; y')$.

Der Winkel α gibt hierbei die Abweichung der Wachstumsrichtung des Wachstumskegels von der Ordinate an. Um diesen Winkel zu bestimmen, werden zunächst die Koordinaten zweier Punkte auf dem Neuriten bestimmt (siehe Abbildung 11 a, b). Der Wachstumskegel wird nun im Koordinatensystem so verschoben, dass der untere Punkt auf dem Ursprung des Koordinatensystems liegt. Mittels einer Geraden durch die beiden Punkte, kann der Winkel beziehungsweise dessen Winkelfunktionen direkt abgelesen werden. Anschließend werden alle aus dieser Messserie erhaltenen Koordinaten entsprechend verschoben und nach den Werten der Winkelfunktionen gemäß obiger Formel gedreht (siehe Abbildung 11 c). Als Messwert für die Position des Wachstumskegels wurde sein Schwerpunkt verwendet. Dieser wurde bestimmt, indem der Umriss eines jeden Wachstumskegels im digitalen Bild mit Hilfe eines digitalen Grafiktablets (Wacom Graphire) manuell nachgezeichnet und der Schwerpunkt des sich ergebenden Polygons durch die verwendete Software (TILL visION) errechnet wurde (siehe Abbildung 11 d). Der erste Schwerpunkt einer Messung wurde per Definition auf den Ursprung des Koordinatensystems gelegt (siehe Abbildung 11 e) und alle nachfolgenden Schwerpunkte entsprechend im Koordinatensystem verschoben. Um den Wachstumspfad des Wachstumskegels zu erfassen, wurde im Abstand von 2 Minuten die Position des Wachstumskegels auf diese Weise bestimmt (siehe Abbildung 11 f, g, h für die Position am Ende des Experiments). Auf diese Weise konnte der Wachstumspfad der einzelnen Wachstumskegel vom Ursprung des Koordinatensystems startend in Form von x-y-Koordinaten erfasst und dargestellt werden (siehe Abbildung 11 i). Es wurden nur die Kegel ausgewertet, die während der Messung ein positives Wachstum zeigten.

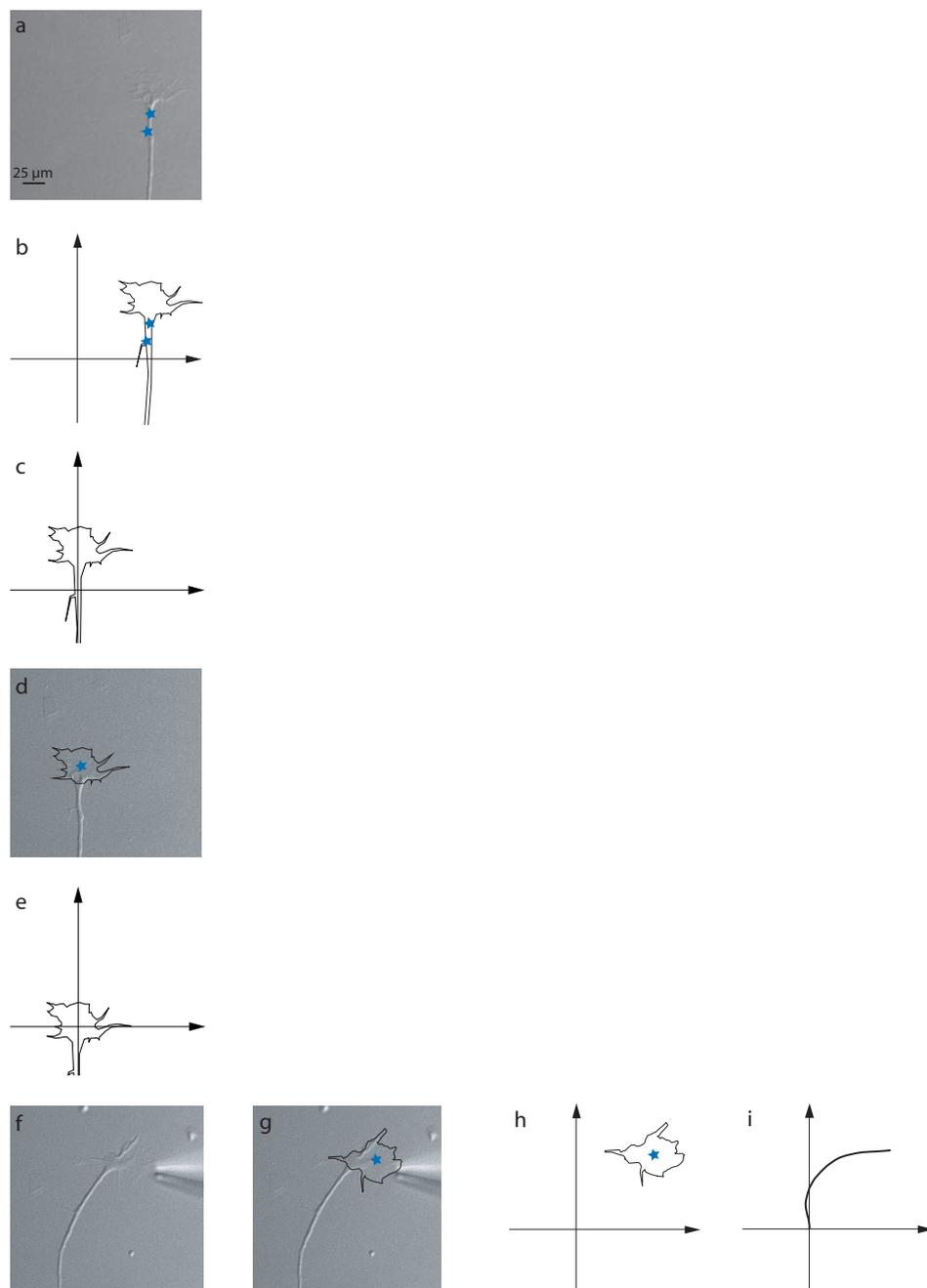


Abb. 11: Veranschaulichung der Auswertung der Orientierungsmessungen in den einzelnen Schritten. In den Bildern wurden die benötigten Koordinaten erfasst, anschließend wurden die Messdaten exportiert und mit Hilfe von Excel™ weiterverarbeitet. a-c Als erstes wurden die Neuriten wie auf die Ordinate ausgerichtet. d, e Anschließend wurde der Schwerpunkt des Wachstumskegels zu Beginn der Experimente bestimmt und die Koordinaten auf den Ursprung des Koordinatensystems gelegt. Auf diese Weise wurde die Position des Wachstumskegels zu den verschiedenen Zeiten des Experiments bestimmt, wie in f-h dargestellt, für die Position am Ende des Experiments. i Aus diesen Messwerten ergibt sich der gesamte Wachstumspfad des Wachstumskegels über die Dauer des Experiments in entsprechender Zeitauflösung.

Die so genannten Knickwinkel ergaben sich aus dem Winkel zwischen der Ordinate und einer Linie, die durch den Ursprung des Koordinatensystems und dem Endpunkt des Wachstums gelegt wurde. Es wurde festgelegt, dass positive Winkel rechts von der Ordinate liegen und negative auf der linken Seite der Ordinate. Dies bedeutet, dass Wachstumskegel, die in Richtung des Stimulus gewachsen sind, positive Knickwinkel hatten.

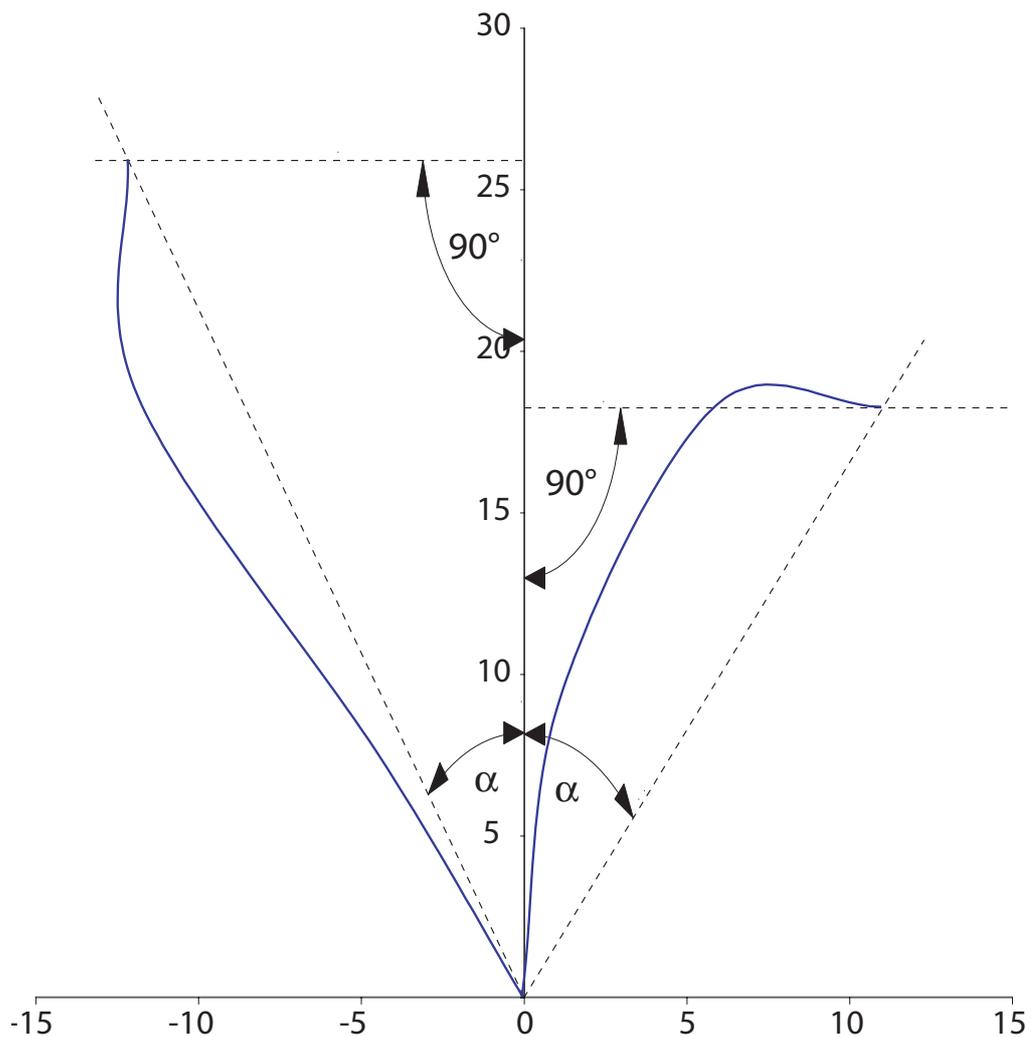


Abb. 12: Bestimmung der Knickwinkel im kartesischen Koordinatensystem; blau dargestellt die Wachstumspfade von zwei Wachstumskegeln mit unterschiedlichen Wachstumsrichtungen.

Die nachfolgende statistische Analyse basierte auf diesen Knickwinkeln, da sie einen relativ leicht zugänglichen Parameter zur Quantifizierung der Änderung der Wachstumsrichtung darstellen. Für diese Analysen wurde der *U*-Test von Mann

und Whitney verwendet. Dieser Rangtest dient der Prüfung, ob zwei unabhängige Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen; der P-Wert gibt Aufschluss darüber, ob die Populationen wirklich den gleichen Median haben und mit welcher Wahrscheinlichkeit zufällige Probennahme aus einer Population zu einem solchen Ergebnis führt. Es handelt sich hierbei um einen nichtparametrischen Test, das bedeutet dass keine normalverteilten Messdaten vorausgesetzt werden (Weber, 1986). Dies ist insofern sinnvoll, als bei kleineren Stichprobenumfängen die Gefahr fälschlicherweise eine Normalverteilung der Messwerte zu erkennen deutlich höher ist. Als extremes Beispiel hierfür sei angeführt, dass sich an einen einzigen Messwert eine Gaußkurve immer hochsignifikant anpassen lässt.

2.6 Verwendete Software

Microsoft Office 2004 für Macintosh; Microsoft Office 2003 für Windows; Adobe Creative Suite Premium 1.1; InStat version 3.0 für Macintosh, GraphPad Software; StatView 5.01 von SAS Institut Inc.; visION 4 von TILL Photonics, IDL 5.6 von Research Systems Inc.; Origin 7.0 von OriginLab Corporation

3 Ergebnisse

3.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach Substanzen, die in Form extrazellulärer Gradienten das Richtungswachstum neuronaler Wachstumskegel beeinflussen. Die Arbeit, und damit auch der Ergebnissteil, gliedert sich in drei funktionelle Abschnitte, die zum Teil stärker, zum Teil weniger stark voneinander abhängen, sich zum Teil ergänzen, aufeinander aufbauen, sich bestätigen:

- Untersuchungen am Zytoskelett
- Orientierungsmessungen
- Charakterisierung der orientierenden Gradienten

3.2 Ergebnisse der Zytoskelettexperimente

Basierend auf einer zuvor etablierten Methode zur halbquantitativen Bestimmung des F-Aktin Gehalts in neuronalen Wachstumskegeln (Grau, 2000; Bartl, 2002), wurde der Einfluss purinerge Substanzen auf eine das Aktinzytoskelett beeinflussende Wirkung hin untersucht. Die eigentliche Fragestellung dieser Experimente war, ob aufgrund von Veränderungen auf Zytoskelettebene, induziert durch externe Stimuli, Rückschlüsse auf eine das Wachstumsverhalten beeinflussende Wirkung dieser Substanzen getroffen werden können. Als Positiv-Kontrolle wurden entsprechende Experimente mit NGF durchgeführt. Für diese Substanz ist eine das Wachstum von Neuronen beeinflussende Wirkung beschrieben (Gundersen und Barrett, 1979); NGF spielt eine entscheidende Rolle beim Auswachsen von Neuronen (Levi-Montalcini, 1986) und kann in Form extrazellulärer Konzentrationsgradienten das Richtungswachstum von Neuronen beeinflussen (Gundersen und Barrett, 1979). Des Weiteren ist aber auch eine Zunahme im Gehalt und der Dichte von F-Aktin durch Zugabe von NGF beschrieben (Paves und Saarma, 1997). Dieser Befund konnte in den Experimenten bestätigt werden.

3.2.1 Untersuchung von ATP und seinen Abbauprodukten

Es ist bekannt, dass ATP ebenfalls attraktive Wirkung auf neuronale Wachstumskegel hat (Fu et al., 1997). Jedweder Bewegung des Wachstumskegels muss ein Umbau der entsprechenden Zytoskelettbestandteile zugrunde liegen. Bei schnellen

Bewegungen, wie der Formänderung des Wachstumskegels, ist in erster Linie das Aktin betroffen, langsamere Bewegungen wie die Verlängerung des Neuriten, haben hingegen einen Umbau der Mikrotubuli zur Ursache.

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss des Neurotrophins NGF, extrazellulärer Adenin-Nucleotide (ATP, ADP und AMP) und des zugehörigen Nucleosids Adenosin auf Gehalt und Dichte dieses Zytoskelettbestandteils untersucht und verglichen. Grundlage dieser Untersuchungen war eine bekannte Fluoreszenzmarkierung des F-Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin-Konjugaten. Diese Fluoreszenzfärbung war in vorhergehenden Arbeiten (Grau, 2000; Steinhaus, 2000; Grau et al., 2001) auf eine semiquantitative Bestimmung des F-Aktins hin optimiert und an das verwendete Zellsystem angepasst worden. Das mittlere Fluoreszenzsignal eines Wachstumskegels entspricht hierbei der F-Aktindichte, das über einen Wachstumskegel integrierte Signal entspricht der Menge an F-Aktin im Kegel. Für die NGF-Experimente wurden die Ganglien über Nacht in einem Medium mit einem NGF-Gehalt von 1 ng/ml angezogen und anschließend für 30 Minuten mit Medium, das 25 ng/ml NGF enthielt, stimuliert. Dies führte zu einer Zunahme des F-Aktingehalts von 45,9 % im Vergleich zu den Kontrollenzellen (siehe Abbildung 13 und Tabelle 3), denen Medium mit dem niedrigen NGF-Gehalt zugegeben wurde, und zu einer Zunahme der F-Aktindichte um 11 % (siehe Abbildung 14 und Tabelle 4).

Durch Stimulation für 30 Minuten mit einer ATP-Konzentration von 25 μ M konnte eine Zunahme der F-Aktindichte um 8 % im Vergleich zur Kontrolle, und eine Zunahme des F-Aktingehalts um 25 % im Vergleich zur Kontrolle induziert werden. Durch Zugabe von 25 μ M ADP für den gleichen Zeitraum konnte keine signifikante Änderung des F-Aktingehalts, jedoch eine signifikante Abnahme der F-Aktindichte um 8 % induziert werden. Die Zugabe von 25 μ M AMP führte zu keiner signifikanten Änderung in F-Aktindichte und -gehalt. Eine Stimulation mit 25 μ M Adenosin führte jedoch zu einer Zunahme der F-Aktindichte um 12 % im Vergleich zur Kontrolle, und eine Zunahme des F-Aktingehalts um 26 % im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 13, Abbildung 14, Tabelle 3 und Tabelle 4).

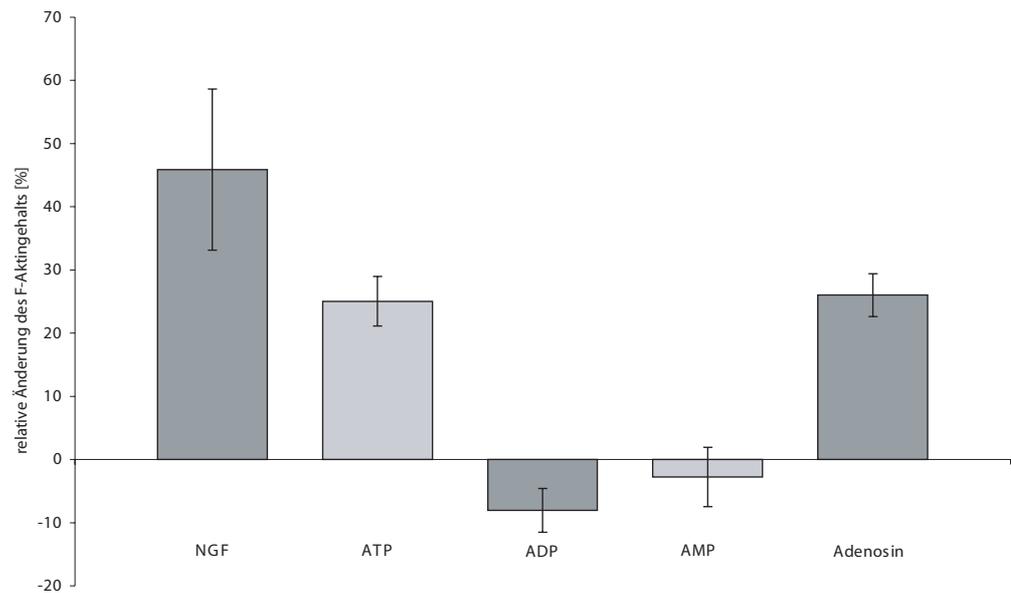


Abb. 13: Einfluss von NGF, ATP, ADP, AMP und Adenosin auf den Gehalt an F-Aktin im Wachstumskegel. Dargestellt ist die prozentuale Änderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts.

	n_{probe}	relative Änderung	SEM	$n_{\text{Kontrolle}}$	P-Wert vs. Kontrolle
NGF	160	45,9 %	± 12,8	257	<0,0001
ATP	431	25,1 %	± 3,9	362	<0,0001
ADP	363	- 8,1 %	± 3,5	304	0,3422
AMP	247	- 2,8 %	± 4,7	256	0,5265
Adenosin	772	26,0 %	± 3,4	790	0,0001

Tab. 3: Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Messungen des F-Aktin Gehalts; n = Stichprobenumfang; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach ungepaartem Student t-Test gegen die entsprechende Kontrolle.

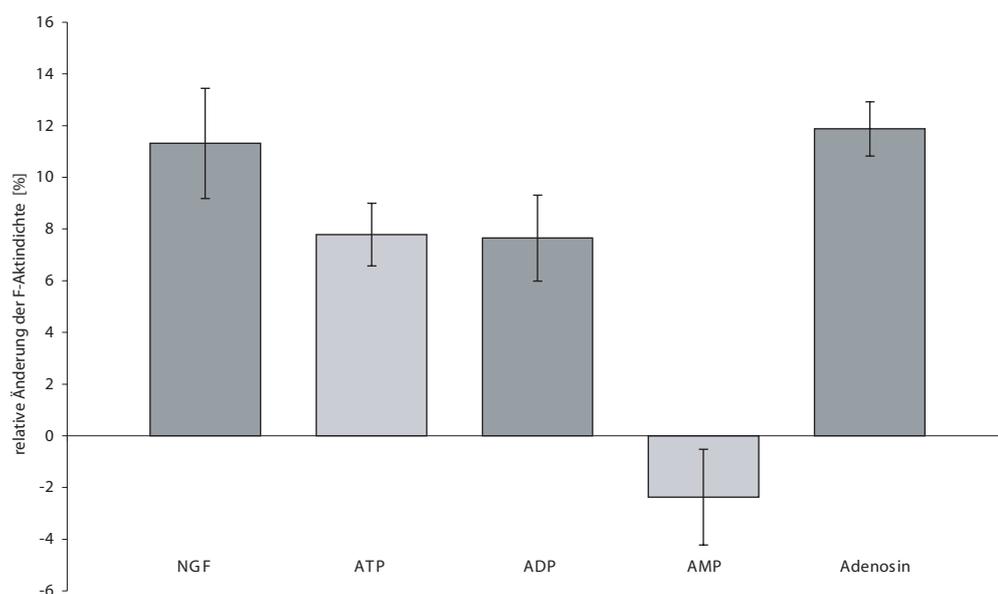


Abb. 14: Einfluss von NGF, ATP, ADP, AMP und Adenosin auf die Dichte des F-Aktin im Wachstumskegel. Dargestellt ist die prozentuale Änderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts.

	n_{probe}	relative Änderung	SEM	$n_{\text{Kontrolle}}$	P-Wert vs. Kontrolle
NGF	160	11,3 %	$\pm 5,9$	257	$<0,0001$
ATP	431	7,8 %	$\pm 3,9$	362	$<0,0001$
ADP	363	7,6 %	$\pm 3,5$	304	$<0,0001$
AMP	247	- 2,4 %	$\pm 4,7$	256	0,3466
Adenosin	772	11,9%	$\pm 3,4$	790	$<0,0001$

Tab.4: Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Messungen der F-Aktindichte; n = Stichprobenumfang; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach ungepaartem Student t-Test gegen die entsprechende Kontrolle.

3.2.2 Charakterisierung beteiligter Rezeptoren

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Veränderungen auf Ebene des F-Aktinzytoskeletts rezeptorvermittelt sind und nicht zum Beispiel auf metabolische Effekte über Adenosintransporter zurückzuführen sind, wurden entsprechende Experimente mit NECA, einem unspezifischen, sehr wirksamen Adenosinrezeptoragonist (Fredholm et al., 2001) durchgeführt. Eine etwaige Beteiligung von Adenosin- A_{2B} -Rezeptoren wurde durch eine gleichzeitige Gabe von Adenosin und Alloxazin untersucht. Alloxazin ist ein selektiver Adenosine- A_{2B} -Rezeptorantago-

nist (Brackett und Daly, 1994; Liang und Haltiwanger, 1995). Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Eva Bartl (Bartl, 2002) durchgeführt.

Durch Stimulation für 30 Minuten mit einer NECA-Konzentration von 5 μM konnte eine Zunahme der F-Aktindichte um 8 % im Vergleich zur Kontrolle, und eine Zunahme des F-Aktingehalts um 77 % im Vergleich zur Kontrolle induziert werden (siehe Abbildung 15, Abbildung 16, Tabelle 5 und Tabelle 6).

Die Zellen wurden 30 Minuten mit 10 μM Alloxazin und 25 μM Adenosin inkubiert. Es konnte bei den untersuchten Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zwischen den Schälchen, die neben Adenosin auch Alloxazin enthielten und solchen, die nur Adenosin enthielten, festgestellt werden. Die durch Adenosin induzierte Zunahme in F-Aktingehalt und -dichte konnte demnach durch die verwendete Alloxazinkonzentration nicht inhibiert werden, was gegen eine Beteiligung von Adenosin- A_{2B} -Rezeptoren spricht (siehe Abbildung 15, Abbildung 16, Tabelle 5 und Tabelle 6).

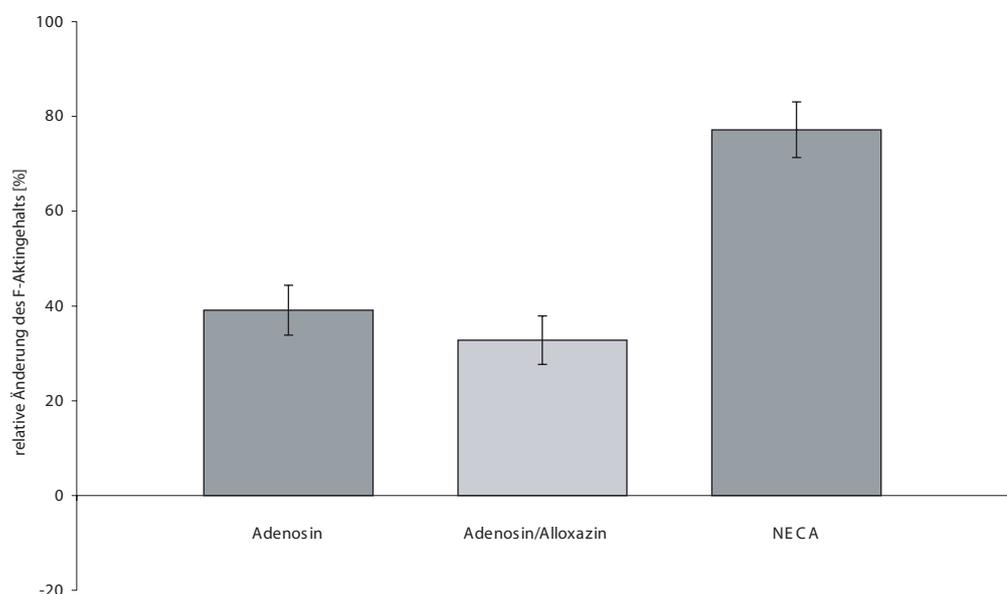


Abb. 15: Einfluss von Adenosin, Adenosin mit Alloxazin und NECA auf den Gehalt an F-Aktin im Wachstumskegel. Dargestellt ist die prozentuale Änderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts.

	n	relative Änderung	SEM	P-Wert vs Kontrolle	P-Wert vs Adenosin
Kontrolle	432	-	± 4,1	-	<0,0001
Adenosin	555	39 %	± 5,3	<0,0001	-
Adenosin / Alloxazin	550	32 %	± 5,1	<0,0001	0,2091
NECA	656	77,1 %	± 5,9	<0,0001	<0,0001

Tab. 5: Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Messungen des F-Aktin Gehalts; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach ungepaartem Student t-Test gegen die Kontrolle.

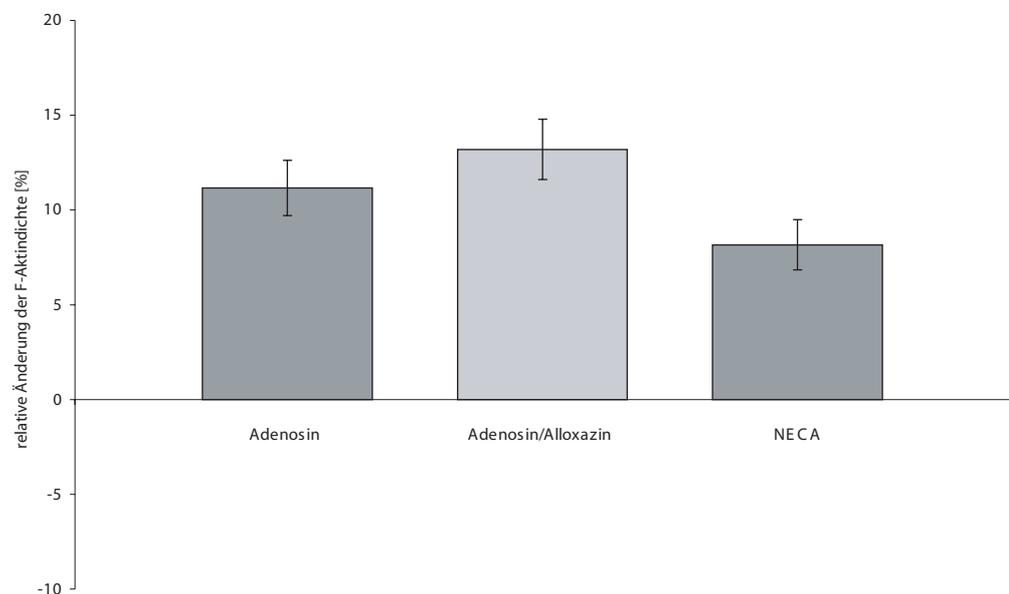


Abb. 16: Einfluss von Adenosin, Adenosin mit Alloxazin und NECA auf die Dichte des F-Aktin im Wachstumskegel. Dargestellt ist die prozentuale Zunahme im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts.

	n	relative Änderung	SEM	P-Wert vs Kontrolle	P-Wert vs Adenosin
Kontrolle	432	-	± 1,5	-	<0,0001
Adenosin	555	11 %	± 1,5	<0,0001	-
Adenosin / Alloxazin	550	13 %	± 1,6	<0,0001	0,1422
NECA	656	8,2 %	± 1,3	<0,0001	<0,0001

Tab. 6: Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Messungen der F-Aktindichte; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach ungepaartem Student t-Test gegen die Kontrolle.

3.2.3 Untersuchungen an Signalketten

Erste Untersuchungen der Signalketten, die auf das F-Aktin einwirken, wurden mit dem Alkaloid Forskolin und KT 5720 durchgeführt.

Forskolin ist ein sehr wirksamer Aktivator der Adenylat Cyclase über deren katalytische Untereinheit (Lankford et al., 1988; Bhat, 1993). Es wurde eingesetzt um das intrazelluläre cAMP-Niveau zu erhöhen und so den Einfluss von cAMP auf das F-Aktin Zytoskelett zu untersuchen. Von der Vielzahl bekannter Wirkung von cAMP ist eine die Aktivierung der Protein Kinase A (PKA). Daher wurde KT 5720, ein wirksamer und spezifischer Inhibitor der PKA, eingesetzt. Durch diese Experimente konnte der Einfluss der PKA auf den F-Aktin-Haushalt der Wachstumskegel untersucht werden. Somit stehen diese Experimente im direkten Zusammenhang mit der Erhöhung des cAMP-Gehalts durch Forskolin.

Durch Stimulation für 30 Minuten mit einer Forskolin-Konzentration von 5 μM konnte eine Zunahme des F-Aktin Gehalts um 51 % im Vergleich zur Kontrolle, und der F-Aktindichte um 11 % im Vergleich zur Kontrolle induziert werden (siehe Abbildung 17, Abbildung 18, Tabelle 7 und Tabelle 8).

Durch Inkubation mit KT 5720 für 30 Minuten mit Konzentration von 5 μM konnte eine Abnahme des F-Aktin Gehalts um 14 % im Vergleich zur Kontrolle, und der F-Aktindichte um 7 % im Vergleich zur Kontrolle induziert werden (siehe Abbildung 17, Abbildung 18, Tabelle 7 und Tabelle 8).

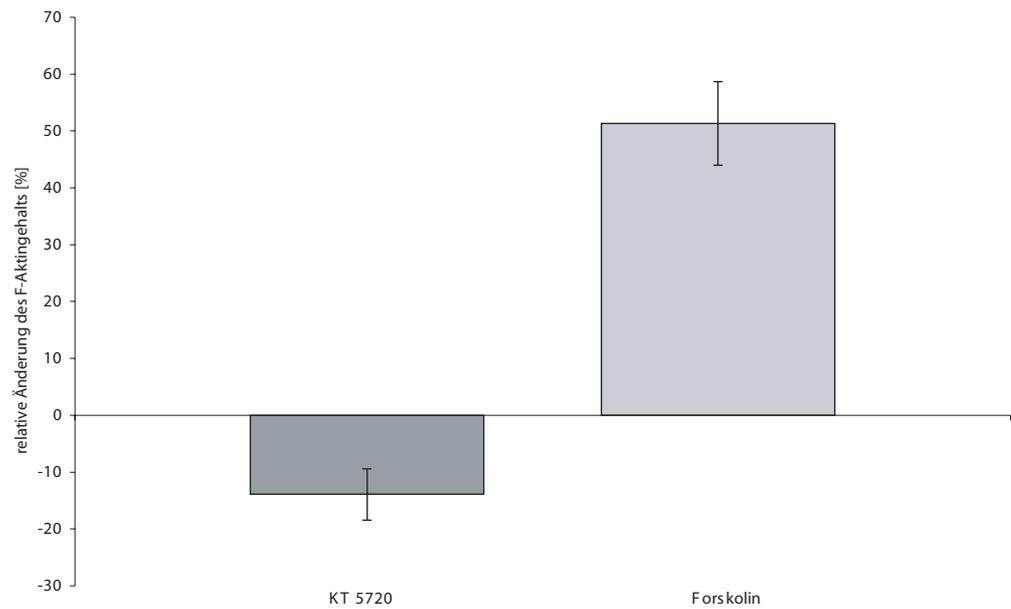


Abb. 17: Einfluss von Forskolin und KT 5720 auf den F-Aktin Gehalt im Wachstumskegel. Dargestellt ist die prozentuale Änderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts.

	n_{Probe}	relative Änderung	SEM	$n_{\text{Kontrolle}}$	P-Wert
Forskolin	392	-13,9 %	$\pm 4,5$	715	<0,0001
KT 5720	391	51,4 %	$\pm 7,4$	715	<0,0001

Tab. 7: Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Messungen des F-Aktin Gehalts; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach ungepaartem Student t-Test gegen die Kontrolle.

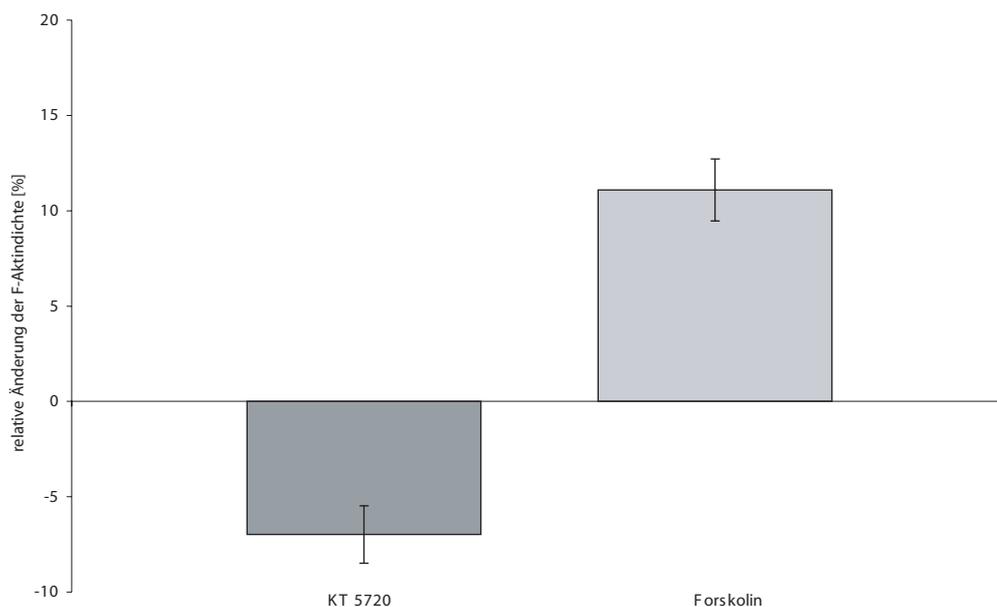


Abb. 18: Einfluss von Forskolin und KT 5720 auf die F-Aktindichte im Wachstumskegel. Dargestellt ist die prozentuale Änderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts.

	n_{Probe}	relative Änderung	SEM	$n_{\text{Kontrolle}}$	P-Wert
Forskolin	392	-7,0 %	$\pm 1,5$	715	<0,0001
KT 5720	391	11,1 %	$\pm 1,6$	715	<0,0001

Tab. 8: Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Messungen der F-Aktindichte; n = Stichprobenumfang; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach ungepaartem Student t-Test gegen die Kontrolle.

3.3 Ergebnisse der Orientierungsexperimente

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen über den Einfluss purinerger Substanzen auf den F-Aktingehalt und die F-Aktindichte in den Wachstumskegeln, (siehe Abschnitt „3.2 Ergebnisse der Zytoskelettexperimente“) wurde die Eignung dieser Substanzen zur Orientierung von Wachstumskegeln untersucht. Zu diesem Zweck wurde basierend auf den Erfahrungen und technischen Lösungen aus der Literatur (Gundersen und Barrett, 1979; Lohof et al., 1992; Paves und Saarma, 1997), eine Methode zur Generierung von Konzentrationsgradienten diffusibler Substanzen entwickelt. Diese Gradienten wurden, wie im Kapitel Material und Methoden erläutert, mit Mikropipetten, wie sie für Patch-Clamp-Messungen verwendet werden, hergestellt. Die zu testenden Substanzen wurden in einem entsprechenden Lösungsmittel gelöst, mit Zellkulturme-

dium verdünnt und in die Pipetten gefüllt; aufgrund des hydrostatischen Drucks strömte die Pipettenlösung aus und erzeugte so zusammen mit Diffusion die Konzentrationsgradienten. Die Kontrollexperimente wurden nur mit Lösungsmittel und Zellkulturmedium als Pipettenlösung durchgeführt.

Durch Adaptation der Programme des Pipettenziehgeräts, konnte die Geometrie der Pipetten nahezu stufenlos moduliert werden. Da die Form des Konzentrationsgradienten von der Freisetzungsrates der entsprechenden Substanz aus der Pipette und somit von der Pipettenform abhängig ist, wird auf diese Weise auch eine Modulation des Gradienten ermöglicht. Während diverser Vorversuche zu den eigentlichen Orientierungsexperimenten wurden zwei Pipettenformen entwickelt, die bei verschiedenen Substanzen die Wachstumskegel orientierende Gradienten erzeugten (siehe Abschnitt „3.4 Ergebnisse der Gradientencharakterisierung“); alle weiteren Experimente beschränken sich auf diese zwei Pipettentypen. Ausgehend von einer niederohmigen Pipette mit relativ großer Öffnung, wurde während dieser Pipettenentwicklung das Zugprogramm so verändert, dass Pipetten mit hohem Pipettenwiderstand und damit kleinerer Öffnung hergestellt wurden. Da der Vorgang des Pipettenziehens unter anderem von der Luftfeuchtigkeit und dem Alter des Heizfilaments abhängig ist, wurde die Pipettenform über den Pipettenwiderstand elektrisch kontrolliert. Des Weiteren wurde in diesen Vorversuchen zur Etablierung des Orientierungsassays das Zeitfenster ermittelt, innerhalb dessen die Wachstumskegel sich in extrazellulären Konzentrationsgradienten orientieren, beziehungsweise die Änderung der Wachstumsrichtung erkennbar ist. Somit wurde die Dauer der folgenden Experimente auf 15 Minuten festgelegt. Dies ist deutlich kürzer als die Dauer der vergleichbaren Experimente an *Xenopus*-Neuronen (Lohof et al., 1992; Fu et al., 1997), lässt sich aber durch die deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit der in dieser Arbeit verwendeten Hühner-Neurone erklären.



Abb. 19: Wachstumspfad eines Wachstumskegels in Adenosingradienten. Die Messung erstreckt sich über einen Zeitraum von 15 Minuten.

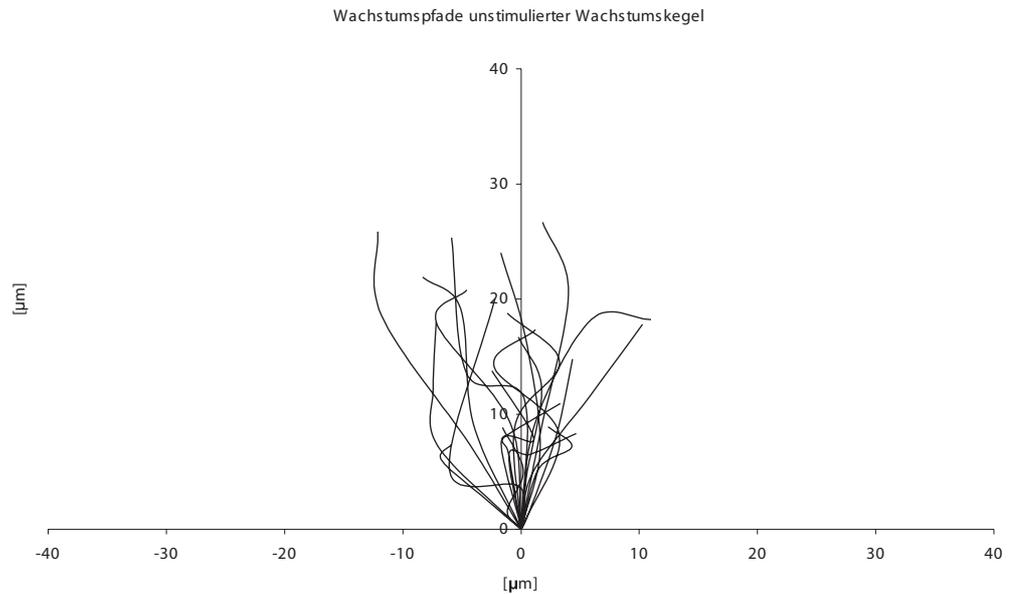


Abb. 20: Unstimulierte Wachstumskegel der Kontrollexperimente. Dargestellt sind die Wachstumspfade bestimmt über den Schwerpunkt der Wachstumskegel über einen Zeitraum von 15 Minuten. Die Spuren wurden so ausgerichtet, dass die ursprüngliche Wachstumsrichtung auf der Ordinate liegt und die Position der Wachstumskegel zu Beginn der Experimente im Ursprung des kartesischen Koordinatensystems liegt. Jede Spur entspricht dem Wachstumspfad eines individuellen Wachstumskegels. Es zeigt sich, dass die Pipetten mit Kontrollflüssigkeit gefüllt keinen Einfluss auf die Wachstumsrichtung der Wachstumskegel haben.

3.3.1 Einfluss von ATP, ADP, AMP und Adenosin auf das Richtungs- wachstum

Als Positivkontrolle für die Orientierungsexperimente wurde die Lenkung von Wachstumskegeln in ATP-Gradienten (Fu et al., 1997) verwendet. ATP wurde in einer Konzentration von 100 μM in Zellkulturmedium gelöst und in die Mikropipetten gefüllt. Es wurden zwei Formen von Mikropipetten verwendet; solche mit einem Pipettenwiderstand von 40–60 $\text{M}\Omega$ und solche mit einem Pipettenwiderstand von 80–100 $\text{M}\Omega$. Bei Wahl der niederohmigen Pipette konnte innerhalb eines Zeitraums von 15 Minuten eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipettenöffnung beobachtet werden, nicht jedoch unter Verwendung der höherohmigen Pipette (siehe Abbildung 21 und Tabelle 9).

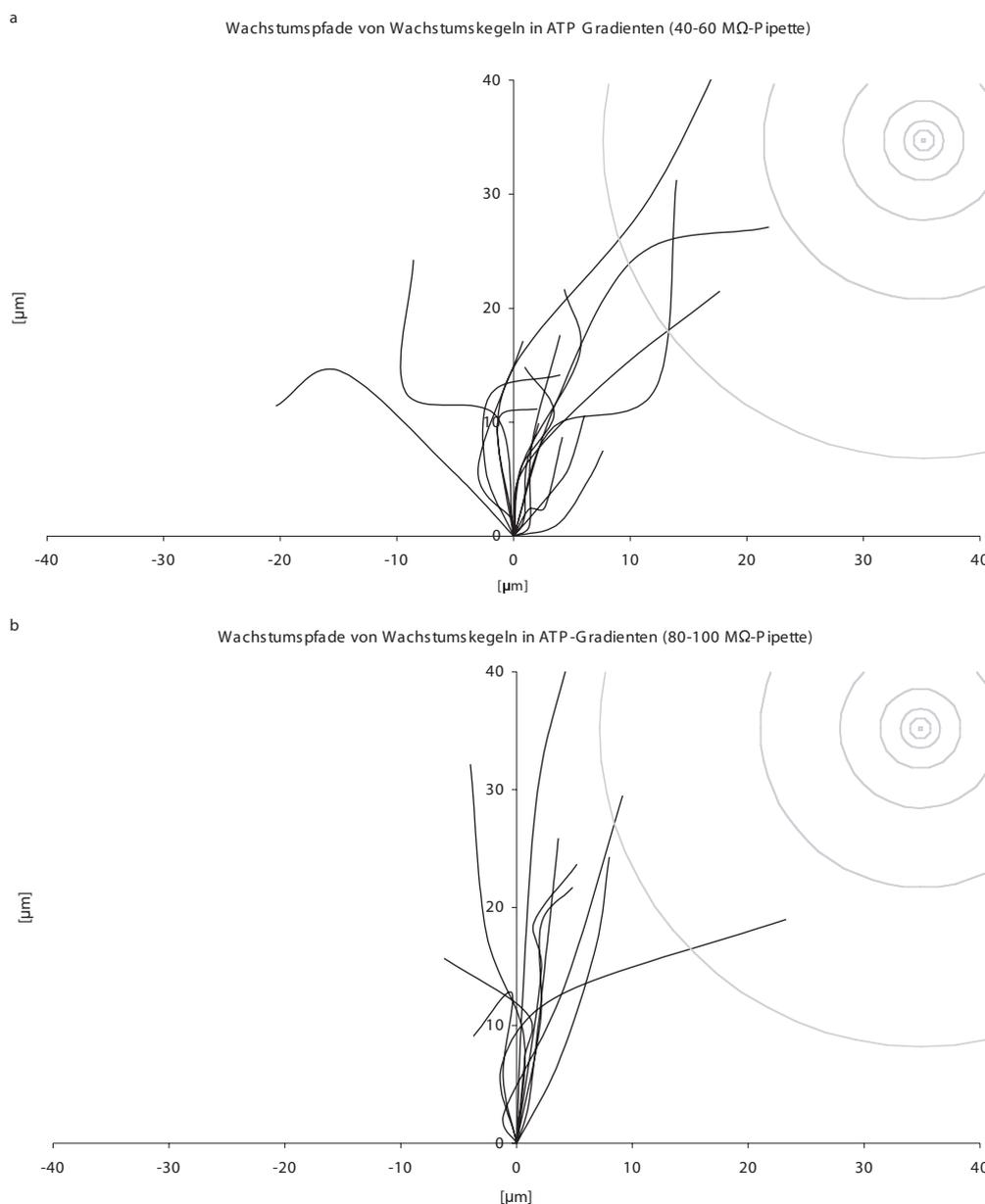


Abb. 21: Wachstumskegel in ATP-Gradienten. a Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 40–60 M Ω -Pipette. Hier zeigt sich eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipette (siehe Tabelle 9). b Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 80–100 M Ω -Pipette. Hier konnte keine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung beobachtet werden (siehe Tabelle 9). Die Art der Darstellung entspricht der in Abbildung 20.

Da in den Zytoskelettexperimenten sowohl durch ATP als auch durch Adenosin eine signifikante Zunahme in F-Aktingehalt und -dichte induziert werden konnte, wurde untersucht, ob Adenosin ebenfalls eine orientierende Wirkung auf Wachstumskegel hat.

Hierfür wurden wiederum Mikropipetten mit einem Pipettenwiderstand von 40–60 M Ω oder mit einem Pipettenwiderstand von 80–100 M Ω verwendet. Adenosin wurde in einer Konzentration von 100 μ M in Zellkulturmedium gelöst und in die Mikropipetten gefüllt. Bei Wahl der niederohmigen Pipette, konnte innerhalb eines Zeitraums von 15 Minuten keine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipettenöffnung beobachtet werden; unter Verwendung der höherohmigen Pipette konnte jedoch eine solche Änderung induziert werden (siehe Abbildung 22 und Tabelle 9). Interessant ist hierbei das gegensätzliche Verhalten der Adenosin- und ATP-Experimente, da die Wachstumskegel auf ATP-Gradienten erzeugt mit der niederohmigen Pipette reagieren, bei Adenosin jedoch Gradienten nötig sind, die mit der hochohmigen Pipette erzeugt wurden.

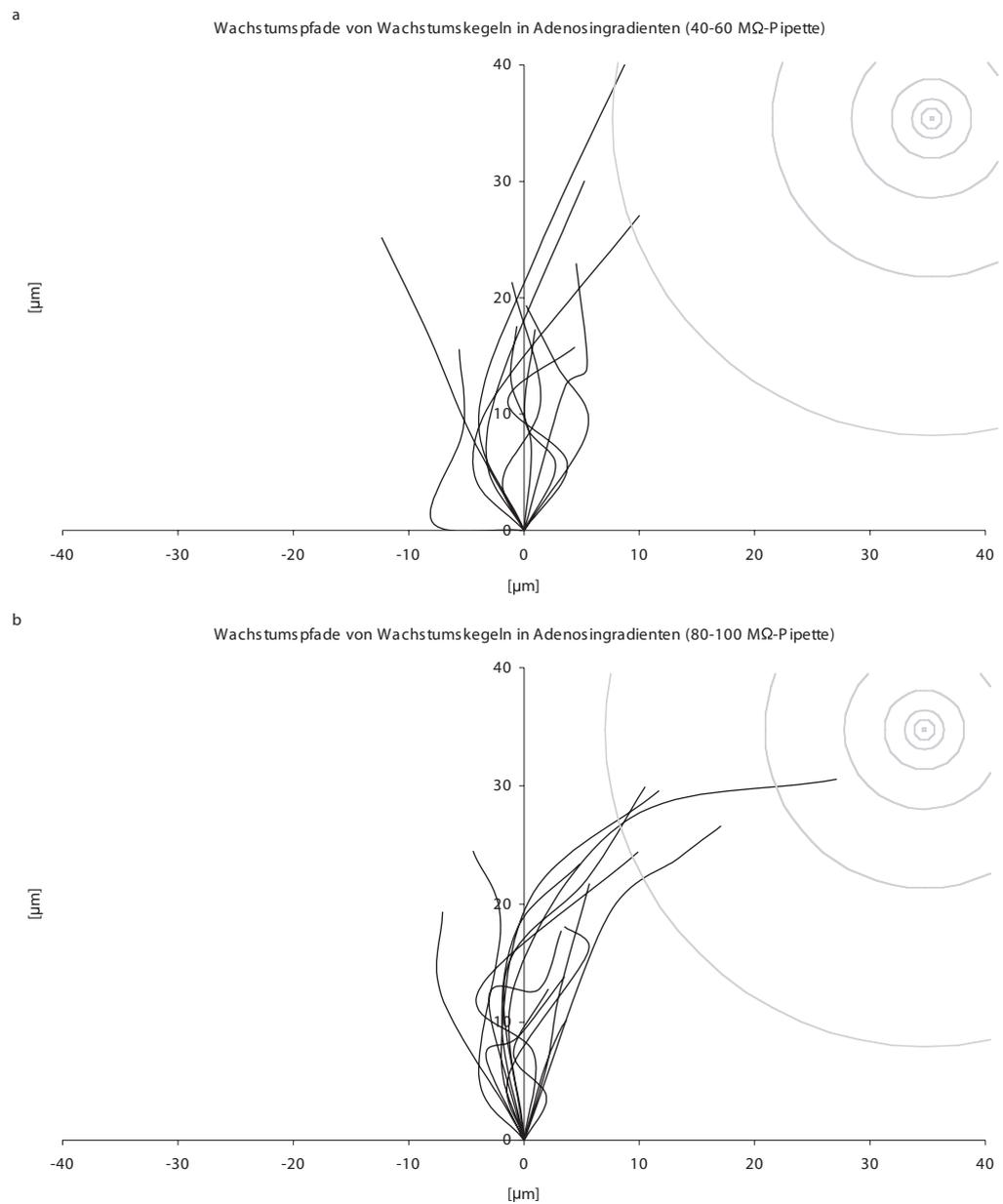


Abb. 22: Wachstumskegel in Adenosin-Gradienten. Die Art der Darstellung entspricht der in Abbildung 20. a Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 40–60 M Ω -Pipette. Hier konnte keine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung beobachtet werden (siehe Tabelle 9). b Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 80–100 M Ω -Pipette. Hier zeigt sich eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipette (siehe Tabelle 9).

Weder mit 100 μ M ADP noch mit 100 μ M AMP konnte unter Verwendung der 80–100 M Ω -Pipette eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung induziert werden. Da die Daten der Zytoskelettexperimente auch keinen eindeutigen Hinweis auf eine etwaige Beeinflussung des F-Aktinhaushalts, wie er zum Beispiel nach

Gabe von ATP und Adenosin beobachtet wurde, brachten, wurde bei diesen Nucleotiden auf weitere Experimente mit anderen Konzentrationen und Pipettentypen verzichtet. Die Daten der durchgeführten Experimente sind in Tabelle 9 aufgeführt.

	n	Knickwinkel	SEM	P-Wert
Kontrolle	25	1,8°	± 4,0	-
ATP (100µM; 40–60 MΩ Pipette)	16	13,5°	± 3,5	0,0384
ATP (100µM; 80–100 MΩ Pipette)	11	3,5°	± 6,34	0,7867
ADP (100µM; 80–100 MΩ Pipette)	20	-1,8°	± 4,1	0,3792
AMP (100µM; 80–100 MΩ Pipette)	12	0,9°	± 6,0	0,8584
Adenosin (100µM; 40–60 MΩ Pipette)	11	2,1°	± 4,4	0,9452
Adenosin (100µM; 80–100 MΩ Pipette)	14	14,2°	± 4,1	0,0482

Tab. 9: Zusammenfassung der Orientierungsexperimente mit ATP, ADP, AMP und Adenosin. n = Stichprobenumfang; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach Mann-Witney *U*-Test gegen die Kontrolle.

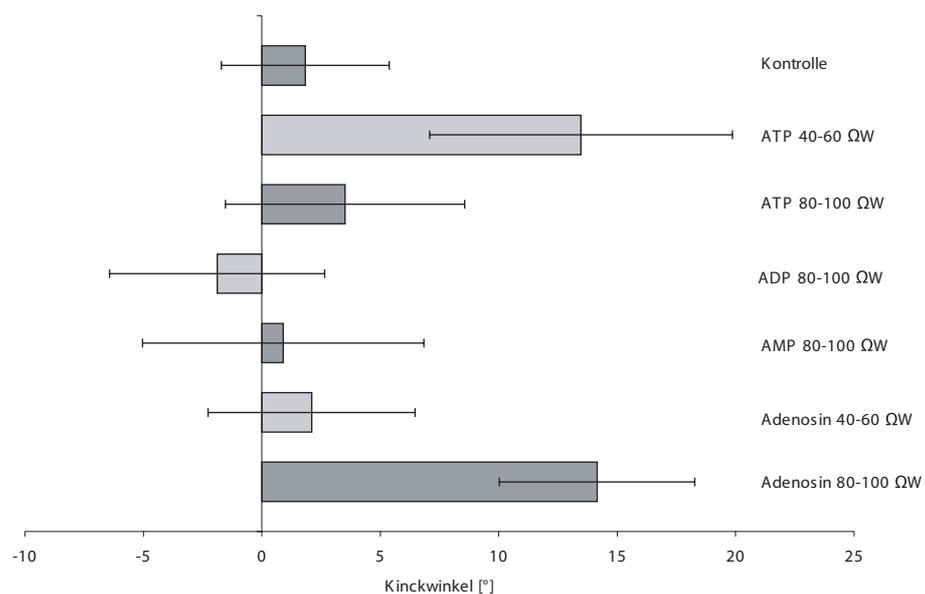


Abb. 23: Zusammenfassende Darstellung der Knickwinkel der Orientierungsexperimente mit ATP, ADP, AMP und Adenosin; die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (siehe Tabelle 9), der Asterisk kennzeichnet statistisch signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (P-Wert nach Mann-Witney *U*-Test <0,05).

Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Messungen, ist der Einfluss der extrazellulären Konzentrationsgradienten der verschiedenen Substanzen auf die Wachstums-

geschwindigkeit der Wachstumslegel. Eine genauere Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeiten zeigte, dass diese durch Adenosin, in Form der für die Orientierung wirksamen mit der höherohmigen Pipette erzeugten Konzentrationsgradienten, um 36 % im Vergleich zur Kontrolle zunimmt. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant (siehe Tabelle 12). Die anderen Konzentrationsgradienten, sowohl die Adenosingradienten erzeugt mit der niederohmigen Pipette, als auch die der verschiedenen Nucleotide, erzeugten keine signifikanten Änderungen der Wachstumsgeschwindigkeit (siehe Abbildung 24 und Tabelle 12).

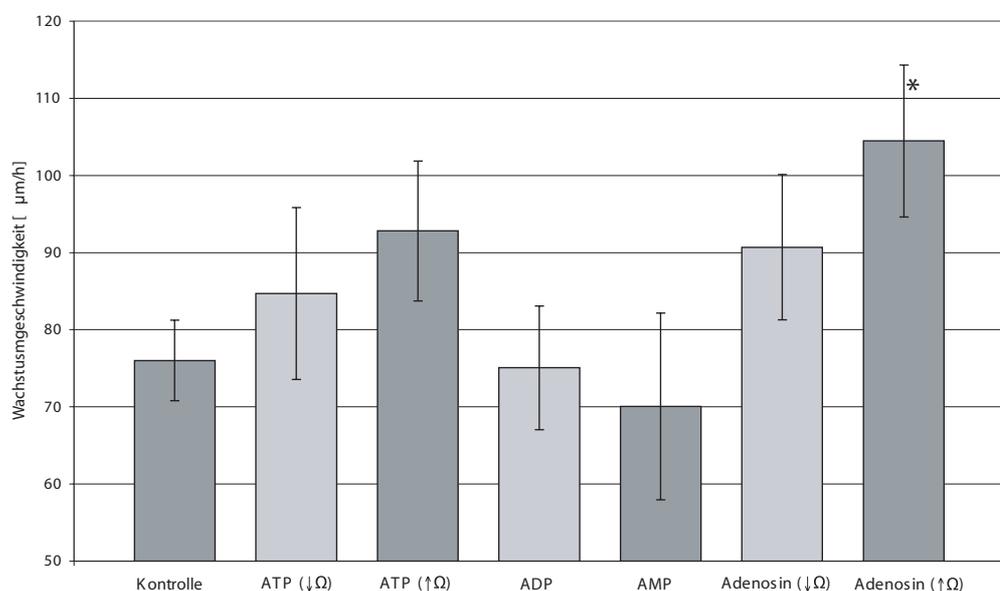


Abb. 24: Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeit in Konzentrationsgradienten verschiedener Substanzen und unterschiedlichen Konzentrationsgradienten. Der Asterisk kennzeichnet statistisch signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (P-Wert nach Mann-Witney *U*-Test <0,05), (↓Ω) kennzeichnet Experimente mit den niederohmigen Pipetten, (↑Ω) solche mit den höherohmigen Pipetten.

3.3.2 Untersuchung der beteiligten Rezeptoren an der Adenosin-induzierten Orientierung

Um zu überprüfen, ob es sich bei der beobachteten Adenosin-induzierten Änderung der Wachstumsrichtung, um eine rezeptorvermittelte Reaktion oder um einen metabolischen Effekt, z.B. durch Adenosin-Transporter handelt, wurden mehrere Agonisten und Antagonisten unterschiedlicher Rezeptorspezifität eingesetzt. Hierbei wurde die eingesetzte Konzentration je nach Rezeptoraffinität der entsprechenden Substanz im Vergleich zu Adenosin angepasst. Alle Experimente wurden mit

dem hochohmigen Pipettentyp durchgeführt, der sich für die Orientierung mit Adenosin als geeignet erwiesen hat.

- Mit NECA, einem unselektiven Adenosinrezeptoragonisten (Fredholm et al., 2001), konnten in einer Konzentration von 10 μM eine signifikante Orientierungsreaktionen gezeigt werden (siehe Abbildung 25 und Tabelle 10).
- CGS 15943 ist ein potenter, nicht selektiver Adenosinrezeptorantagonist (Ongini et al., 1999; Fredholm et al., 2001). Durch Zugabe von 10 μM konnte die Induktion der Änderung der Wachstumsrichtung durch Adenosin signifikant unterbunden werden (siehe Abbildung 26 und Tabelle 10). Die Inkubation mit dem Antagonisten erfolgte 30 Minuten vor den Orientierungsexperimenten; der Antagonist war während der Experimente sowohl im Medium als auch in der Pipettenlösung enthalten.
- Mit CGS 21680, einem selektiven A_{2A} -Rezeptoragonist (Klotz, 2000), konnte in einer Konzentration von 10 μM eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung induziert werden (siehe Abbildung 27 und Tabelle 10).

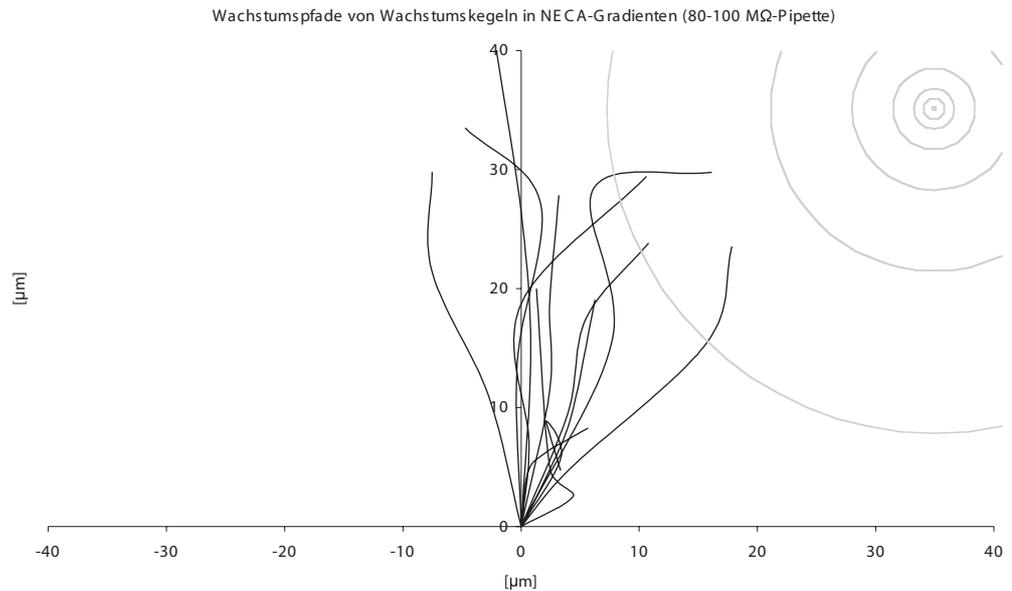


Abb. 25: Wachstumskegel in NECA-Gradienten. Die Art der Darstellung entspricht der in Abbildung 20. Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 80–100 M Ω -Pipette. Hier zeigt sich eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipette (siehe Tabelle 10).

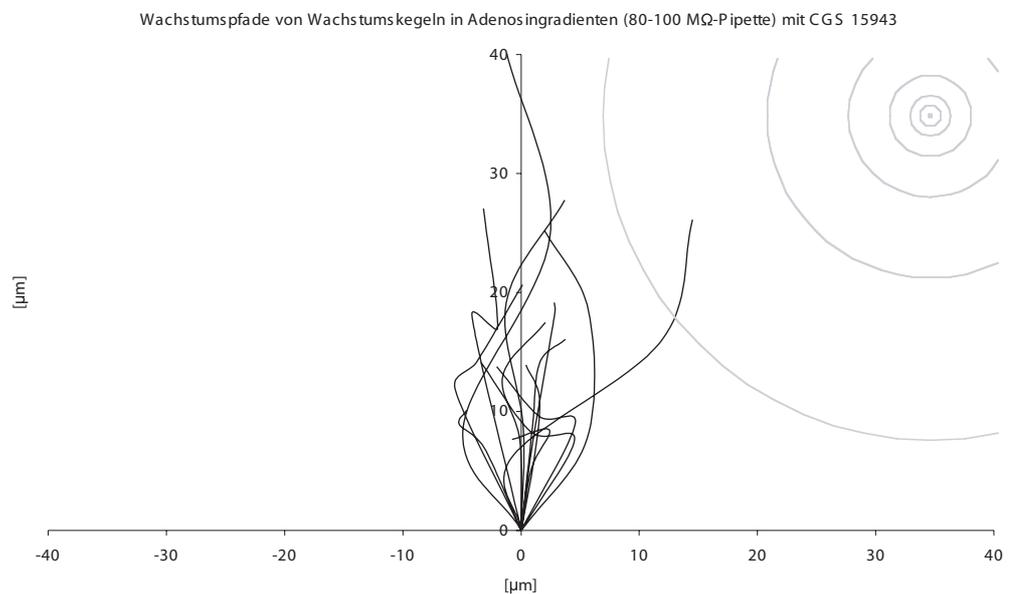


Abb. 26: Wachstumskegel in Adenosin-Gradienten in Anwesenheit von 10 μ M CGS 15943. Die Art der Darstellung entspricht der in Abbildung 20. Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 80–100 M Ω -Pipette. Hier zeigt sich eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipette (siehe Tabelle 10).

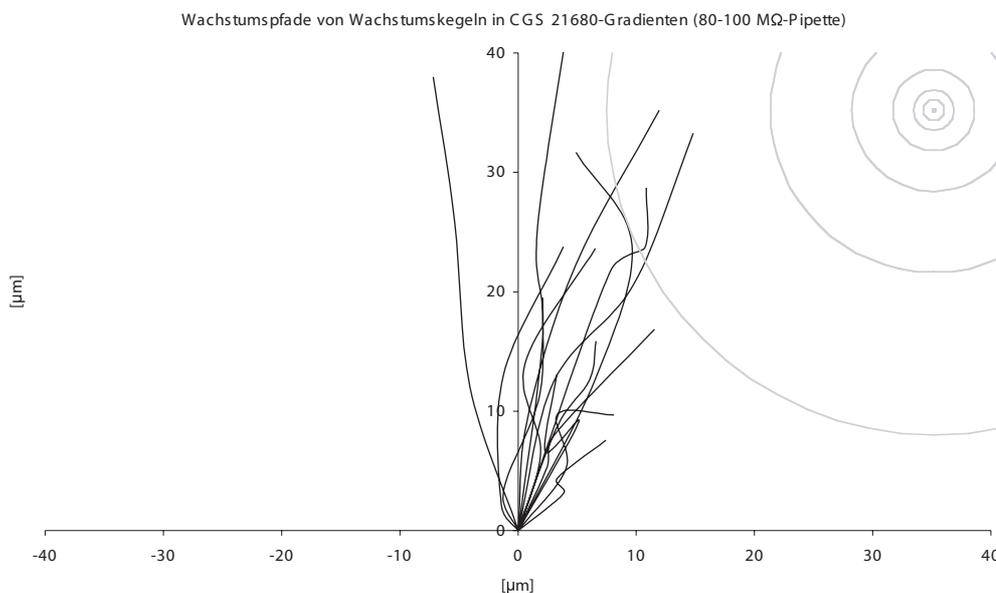


Abb. 27: Wachstumskegel in CGS 21680-Gradienten. Die Art der Darstellung entspricht der in Abbildung 20. Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 80–100 M Ω -Pipette. Hier zeigt sich eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipette (siehe Tabelle 10).

	n	Knickwinkel	SEM	P-Wert
Kontrolle	25	1,8 °	± 4,0	-
Adenosin	14	14,2 °	± 4,1	0,0482
NECA	12	15,2 °	± 5,1	0,0435
Adenosin / CGS 15943	14	0,8 °	± 3,4	0,7809
CGS 21680	14	18,1 °	± 3,9	0,0104

Tab. 10: Zusammenfassung der Orientierungsexperimente mit den Adenosinrezeptoragonisten und -antagonisten. Zur Verdeutlichung wurden auch die Daten der Kontroll- und Adenosinexperimente aufgeführt. Pipettenkonzentrationen: Adenosin 100 μ M; NECA 10 μ M; CGS 21680 10 μ M. Antagonistenkonzentration: CGS 15943 10 μ M. n = Stichprobenumfang; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach Mann-Witney *U*-Test gegen die Kontrolle.

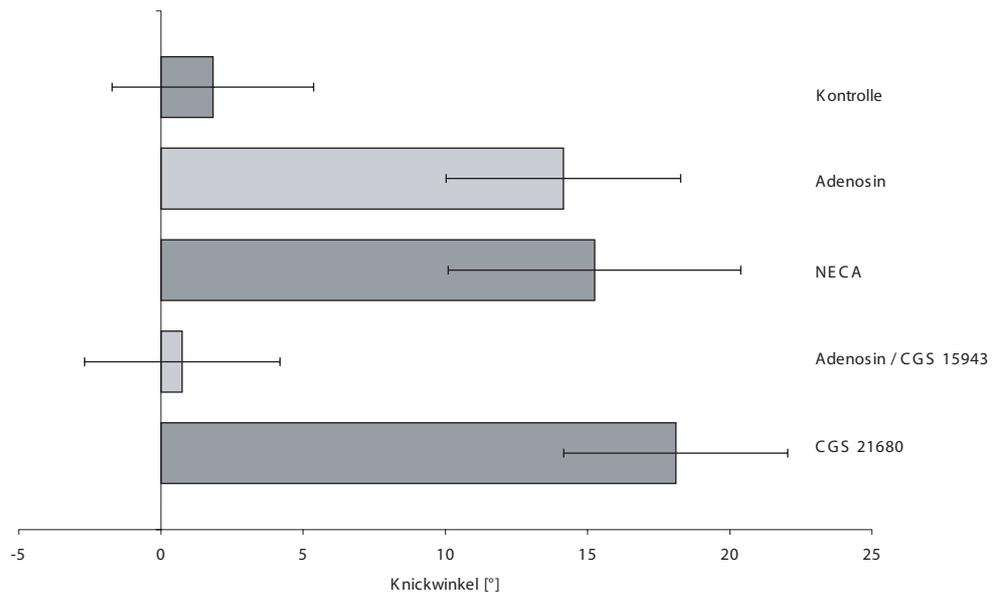


Abb. 28: Zusammenfassende Darstellung der Knickwinkel der Orientierungsexperimente mit den Adenosinrezeptoragonisten und -antagonisten. Zur Verdeutlichung wurden auch die Kontroll- und Adenosinexperimente dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (siehe Tabelle 10), der Asterisk kennzeichnet statistisch signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (P-Wert nach Mann-Witney U -Test $<0,05$)

Diese Experimente bestätigen, dass die beobachtete Orientierungsreaktion in Adenosingradienten über Adenosinrezeptoren vermittelt wird und hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit A_{2A} -Rezeptoren eine zentrale Rolle spielen.

Interessant ist in diesem Fall auch die eingehende Betrachtung der Wachstumsgeschwindigkeit der Wachstumskegel in den Konzentrationsgradienten der unterschiedlichen Substanzen. Während durch den unspezifischen Adenosinrezeptoragonisten NECA eine signifikante Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit um 35 % induziert werden konnte, wird durch den unspezifischen Adenosinrezeptor-Antagonisten CGS 15943 die wachstumsbeschleunigende Wirkung von Adenosin inhibiert. Durch den spezifischen A_{2A} -Rezeptoragonisten CGS 21680 konnte keine signifikante Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle bewirkt werden (siehe Abbildung 29 und Tabelle 12).

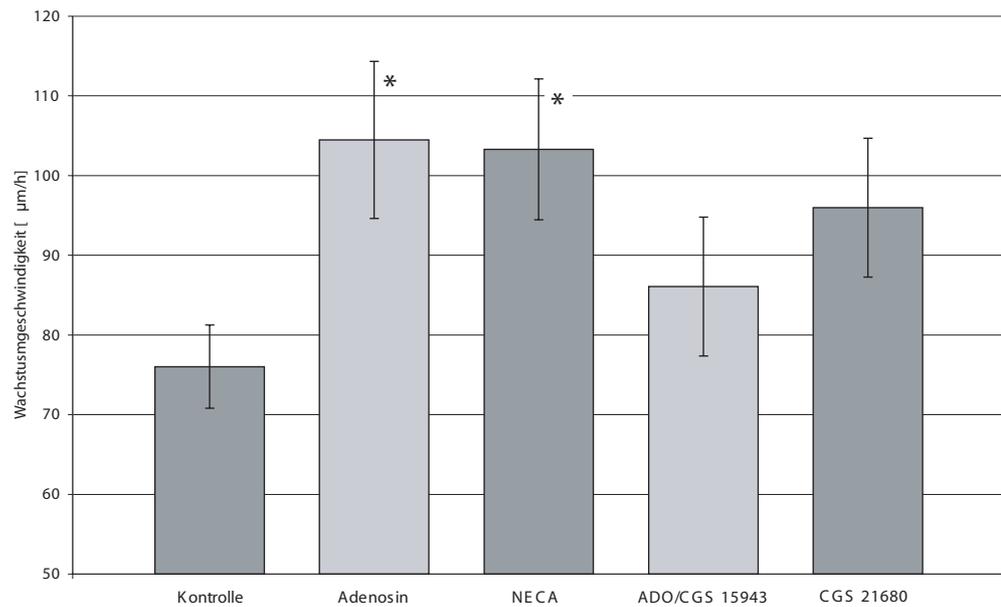


Abb. 29: Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeit in Konzentrationsgradienten verschiedener Substanzen und in Anwesenheit eines unspezifischen Adenosinrezeptorantagonisten. Zur Verdeutlichung wurden auch die Kontroll- und Adenosinexperimente dargestellt. Der Asterisk kennzeichnet statistisch signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (P-Wert nach Mann-Witney *U*-Test <0,05).

3.3.3 Untersuchungen an der Signalkette

Die folgenden Experimente dienen einer ersten Untersuchung der beteiligten Signalkette des Adenosinrezeptor-vermittelten Effekts. Hierbei wurde aufgrund von Literaturdaten (Ming et al., 1997; Munck et al., 2004) und den Ergebnissen der Zytoskelettexperimente, der Einfluss von cAMP als einem möglichen Botenstoff untersucht. Diese Experimente wurden mit der hochohmigen Pipette durchgeführt, die sich für die Orientierung der Wachstumskegel in Adenosingradienten als geeignet erweisen hat. Es wurden zwei Substanzen eingesetzt, die sowohl im Zellkulturmedium im Schälchen, als auch in der Pipettenlösung enthalten waren:

- Rp-cAMPs ist ein kompetitiver cAMP-Antagonist (Botelho et al., 1988). Sowohl unter Zugabe von 20 µM als auch unter Zugabe von 100 µM des Antagonisten, konnte keine signifikante Orientierungsreaktion in einem Adenosingradienten mehr nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30 und Tabelle 11). Dies zeigt, dass cAMP für die Orientierungsreaktion in Adenosingradienten notwendig ist.

- KT 5720 ist ein Inhibitor der Protein Kinase A (Kase et al., 1987). Dieser Inhibitor wurde ausgewählt, da die Protein Kinase A (PKA) ein wichtiges Zielprotein des cAMP ist und die PKA in anderen Studien, die sich mit der Orientierung von Wachstumskegeln beschäftigten, als ein möglicher Weg in der Umsetzung von extrazellulären Signalen in Änderungen der Wachstumsrichtung beschrieben wurde (Song et al., 1997). Des Weiteren wirkt dieser Inhibitor, im Gegensatz zu Rp-cAMPS, das an der regulatorischen Untereinheit der PKA wirkt, an der katalytischen Untereinheit und ist demnach ein wesentlich selektiveres Agens für den Nachweis der Beteiligung der PKA an der Adenosin-induzierten Richtungsantwort. Zur Überprüfung, ob die Richtungsantwort auf die Aktivierung der PKA durch cAMP zurückzuführen ist, wurden die Wachstumskegel in Anwesenheit des PKA-Inhibitors KT 5720 wie oben beschrieben mit Adenosin bzw. mit CGS 21680 stimuliert. Es wurden 200 nM KT 5720 in das Medium gegeben (siehe Abbildung 31, Abbildung 32 und Tabelle 11).

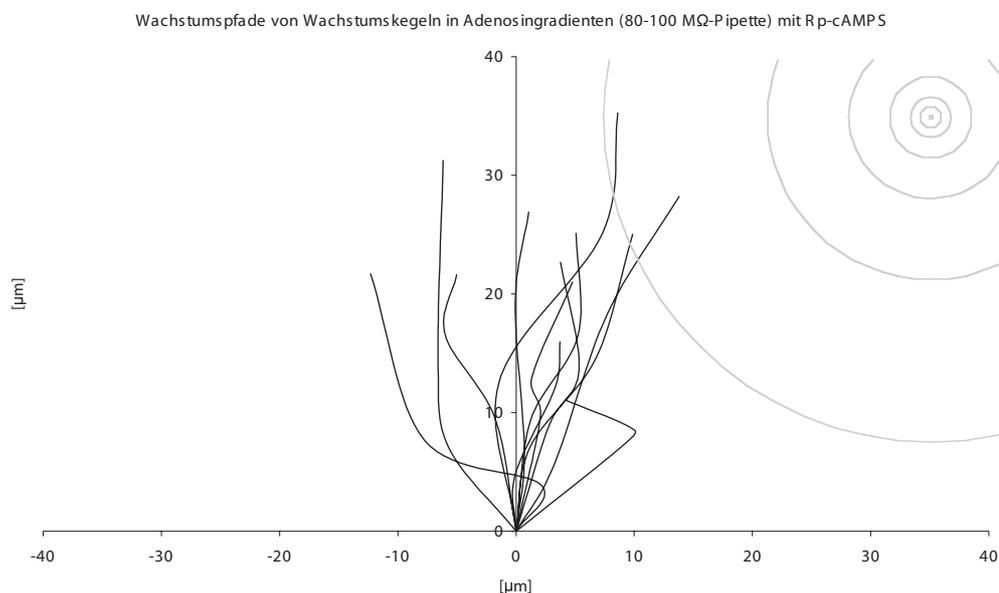


Abb. 30: Wachstumskegel in Adenosingradienten in Anwesenheit von 100 μ M Rp-cAMPS. Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 80–100 M Ω -Pipette. Hier zeigt sich eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipette (siehe Tabelle 11). Die Art der Darstellung entspricht der in Abbildung 20.

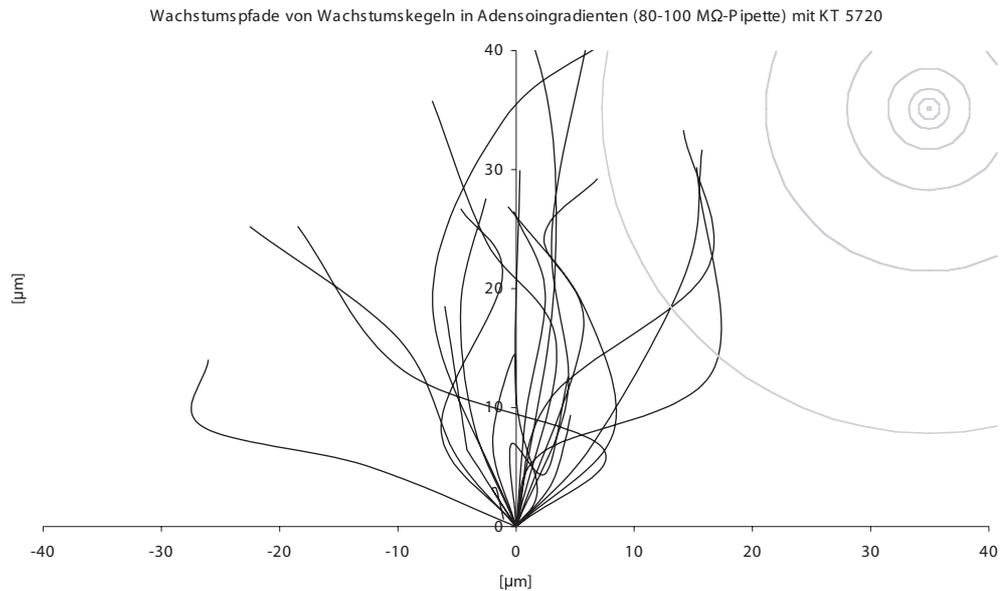


Abb.31: Wachstumskegel in Adenosingradienten in Anwesenheit von 200 nM KT 5720. Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 80–100 M Ω -Pipette. Hier zeigt sich keine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipette (siehe Tabelle 11). Die Art der Darstellung entspricht der in Abbildung 20.

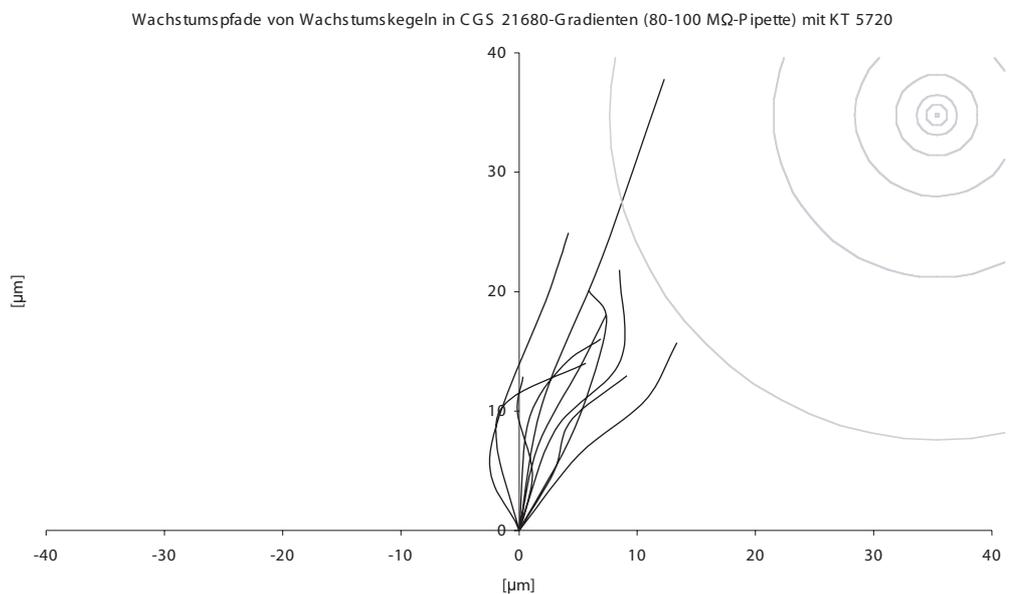


Abb.32: Wachstumskegel in CGS 21680-Gradienten in Anwesenheit von 200 nM KT 5720. Verlauf der Wachstumspfade unter Verwendung der 80–100 M Ω -Pipette. Hier zeigt sich eine signifikante Änderung der Wachstumsrichtung hin zur Pipette (siehe Tabelle 11). Die Art der Darstellung entspricht der in Abbildung 20.

	n	Knickwinkel	SEM	P-Wert
Kontrolle	25	1,8 °	± 3,5	-
ADO	14	14,2 °	± 4,1	0,0482
ADO / Rp-cAMPS	13	6,9 °	± 4,4	0,4061
ADO / KT 5720	22	-3,6 °	± 5,6	0,7572
CGS 21680 / KT 5720	10	21,0 °	± 3,5	0,0039

Tab. 11: Zusammenfassung der Orientierungsexperimente mit RpcAMPs und KT 5720. Zur Verdeutlichung wurden auch die Daten der Kontroll- und Adenosinexperimente aufgeführt. Pipettenkonzentrationen: Adenosin 100 μ M; CGS 21680 10 μ M; Antagonistenkonzentrationen im Medium: Rp-cAMPS 100 μ M; KT 5720 200nM. N = Stichprobenumfang; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach Mann-Witney *U*-Test gegen die Kontrolle.

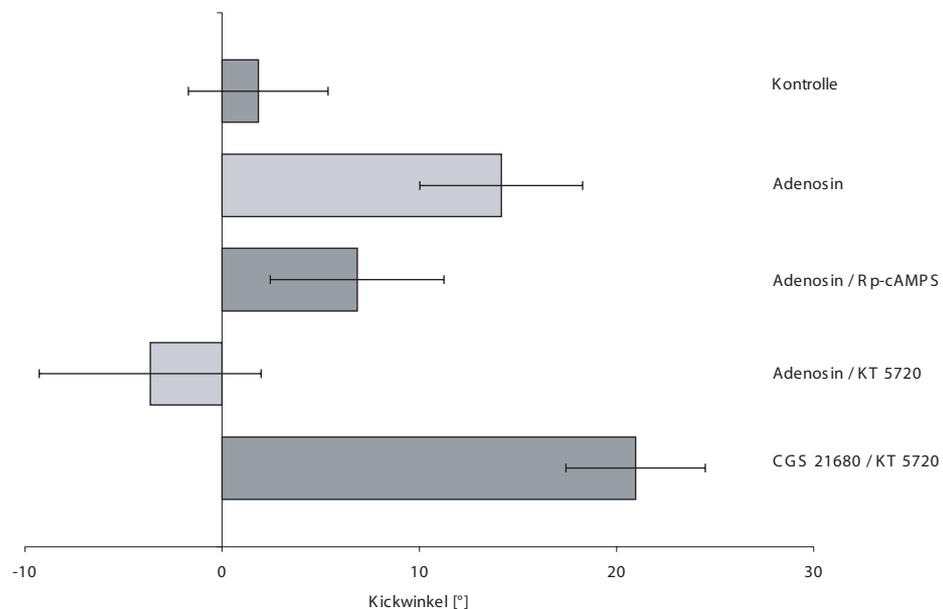


Abb. 33: Zusammenfassende Darstellung der Knickwinkel der Orientierungsexperimente mit RpcAMPs und KT 5720. Zur Verdeutlichung wurden auch die Kontroll- und Adenosinexperimente dargestellt. Der Asterisk kennzeichnet statistisch signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (P-Wert nach Mann-Witney *U*-Test <0,05), die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (siehe Tabelle 11).

Diese Experimente zeigen, dass cAMP für die Orientierung der Wachstumskegel in Adenosingradienten notwendig ist und dass diese Wachstumsreaktion in Adenosingradienten durch Inhibierung der PKA unterbunden werden kann. Erstaunlicherweise kann jedoch die Orientierung in CGS 21680 Gradienten nicht durch Inhibierung der PKA geblockt werden.

Die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit unter Einfluss der beiden intrazellulären Inhibitoren zeigt in extrazellulären Gradienten von Adenosin und dem A_{2A} -Rezeptoragonisten CGS 21680, dass weder Rp-cAMPS noch KT 5720 die durch Adenosin induzierte Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit unterbinden (siehe Abbildung 34 und Tabelle 12).

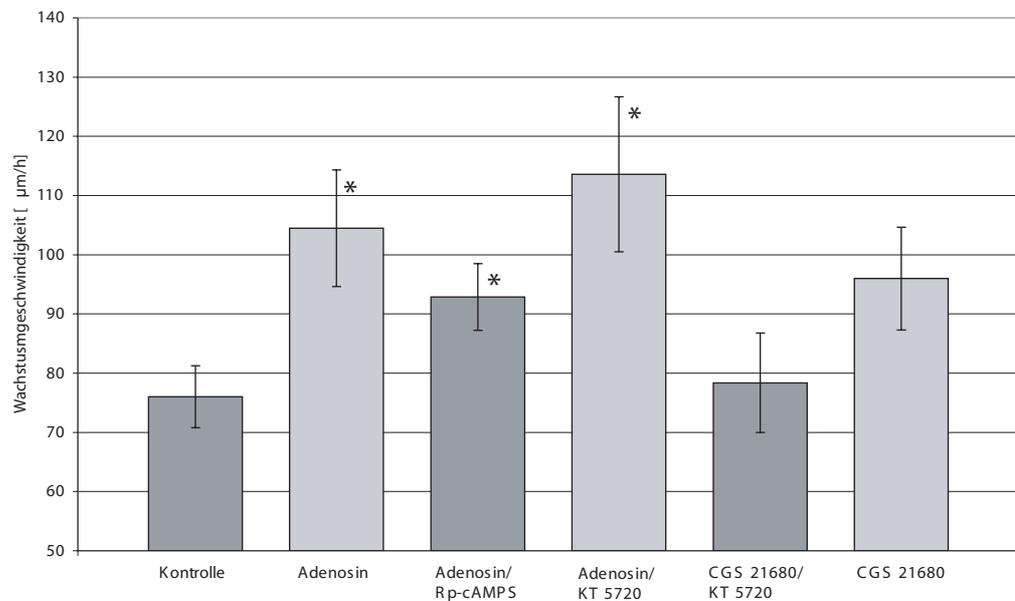


Abb. 34: Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeit in Konzentrationsgradienten von Adenosin oder CGS 21680 und in Anwesenheit von Rp-cAMPS oder KT 5720. Zur Verdeutlichung wurden die Ergebnisse der Kontroll-, Adenosin- und CGS 21680-Experimente mit dargestellt. Der Asterisk kennzeichnet statistisch signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (P-Wert nach Mann-Witney U -Test $<0,05$).

	n	$\mu\text{m/h}$	SEM	P-Wert
Kontrolle	25	76	$\pm 5,2$	-
ATP niederohmige Pipette	16	85	$\pm 11,1$	0,4817
ATP hochohmige Pipette	11	92	$\pm 9,0$	0,0648
ADP hochohmige Pipette	20	75	$\pm 8,0$	0,2874
AMP hochohmige Pipette	12	70	$\pm 12,1$	0,0839
Adenosin niederohmige Pipette	11	76	$\pm 9,4$	0,0050
Adenosin hochohmige Pipette	14	104	$\pm 9,9$	0,1421
NECA	12	103	$\pm 8,8$	0,0042
Adenosin / CGS 15943	14	86	$\pm 8,7$	0,2346
CGS 21680	14	96	$\pm 8,7$	0,0744
Adenosin / Rp-cAMPS	13	93	$\pm 5,6$	0,017
Adenosin / KT 5720	22	114	$\pm 13,1$	0,0050
CGS 21680 / KT 5720	10	78	$\pm 8,4$	0,4747

Tab. 12: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Berechnungen der Wachstumsgeschwindigkeit der Wachstumskegel in den Konzentrationsgradienten der verschiedenen Substanzen, gegebenenfalls in Anwesenheit von Antagonisten. N = Stichprobenumfang; SEM = Standardfehler des Mittelwerts; P-Wert nach Mann-Witney *U*-Test gegen die Kontrolle.

3.4 Ergebnisse der Gradientencharakterisierung

Die Bestimmung des Pipettenwiderstands wurde gemäß der Beschreibung in Material und Methoden durchgeführt. Während mit Pipetten, die einen Widerstand von 40–60 $\text{M}\Omega$ hatten, ATP-Gradienten erzeugt werden konnten, die eine positive Wachstumsantwort induzierten, erzeugten Pipetten mit einem Widerstand von 80–100 $\text{M}\Omega$ keine orientierend wirkenden ATP-Gradienten. Andererseits konnten nur mit den höherohmigen Pipetten Adenosingradienten erzeugt werden, in denen sich die Wachstumskegel orientierten. Daraus ergibt sich Bedeutung der eingehenden Untersuchung des Zusammenhangs von Pipettenwiderstand und den Diffusionsgradienten.

3.4.1 Zusammenhang zwischen Widerstand und Öffnung der Pipetten

Die geometrischen Eigenschaften von Mikropipetten werden bei Patch-Clamp-Experimenten der Elektrophysiologie häufig über den Pipettenwiderstand definiert, da dies ein relativ einfach zu bestimmender Parameter ist und dabei die Pipetten nicht verbraucht werden. Der Widerstand ist unter anderem abhängig

von der Flankenlänge der Spitze und ganz besonders von der Größe der Pipettenöffnung. Letztere ist der wohl entscheidende Faktor, wenn die Pipetten für die Erzeugung von Konzentrationsgradienten verwendet werden. In den Orientierungsexperimenten zeigte sich, dass Pipetten mit bestimmten Widerständen, in Kombination mit bestimmten Substanzen, wirksame oder unwirksame Gradienten erzeugen. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Pipettenwiderstand und der Öffnung der Pipette wurden, mit freundlicher Unterstützung der Zentralen Elektronenmikroskopie des Departments Biologie 1 der LMU München, rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Die Größe der Öffnung verschiedener Pipetten mit bekanntem Widerstand wurde anhand der Elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelt. Aus diesen Messungen ergab sich, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pipetten mit dem hohen Widerstand eine Öffnung von etwa $1\ \mu\text{m}$, die mit dem niedrigen eine Öffnung von etwa $3\ \mu\text{m}$ Durchmesser hatten.

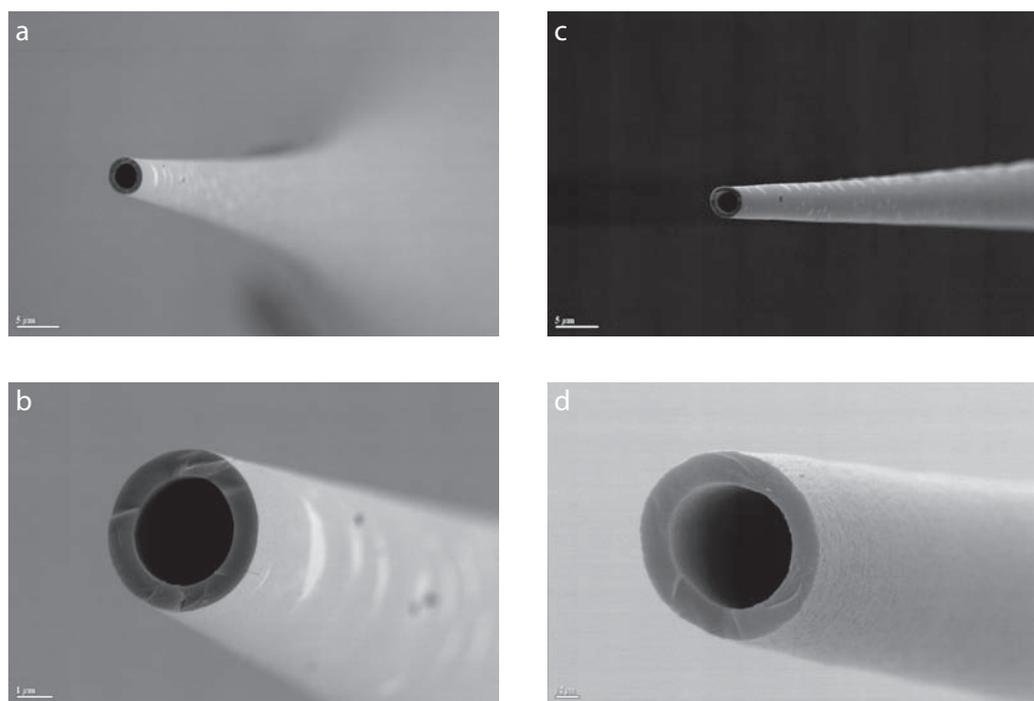


Abb. 35: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Pipetten mit einer Widerstand von $40\text{--}60\ \text{M}\Omega$ (a, b) und $80\text{--}100\ \text{M}\Omega$ (c, d)

3.4.2 Untersuchung der Gradientenform in Abhängigkeit der Größe der Pipettenöffnung

Für die Feststellung, welche Auswirkungen die Unterschiede in der Pipettenöffnung auf die generierten Konzentrationsgradienten haben, mussten die Gradienten vermessen werden. Zu diesem Zweck wurde eine 1 mM 5-(und-6)-carboxyfluorescein Lösung in die Pipetten gefüllt, um der Gradienten fluoreszenzoptisch abbilden zu können. Vermessen wurden die Gradienten mittels total internal reflection fluorescence (TIRF) Mikroskopie um eine hohe z-Auflösung zu erhalten (vergleiche auch Diskussion). Hauptaugenmerk der Experimente lag auf den Unterschieden der Form der zu den verschiedenen Pipetten gehörenden Gradienten. Allerdings wurde auch untersucht, wie lange die Gradienten benötigen, bis sie sich aufgebaut haben, und ob sie, über die Dauer der Orientierungsexperimente hinweg, stabil sind. Um absolute Werte für den Konzentrationsverlauf der Carboxyfluoresceinlösung im Gradienten zu bekommen, wurden die Messungen kalibriert. Hierfür wurden die hintergrundkorrigierten Bilder der Gradienten auf ein entsprechend korrigiertes Bild einer unverdünnten 1 mM Carboxyfluoresceinlösung normiert.

Die Experimente zeigten, dass sich die Gradienten beider Pipetten innerhalb von 5 Minuten stabilisieren und über 15 Minuten, also die Dauer der Experimente, stabil blieben. Die Form der Gradienten unterscheidet sich erwartungsgemäß in Abhängigkeit von dem inneren Durchmesser der Pipettenöffnung. Bei den Pipetten mit 1 μm Öffnung nahm die Carboxyfluoresceinkonzentration von 0,6 μM in 50 μm Entfernung von der Pipettenöffnung bis 1 μM in 5 μm Entfernung zu. Bei der Pipette mit einer 3 μm großen Öffnung war eine Zunahmen von 1,5 μM auf 17 μM in an entsprechend entfernten Messpunkten zu beobachten.

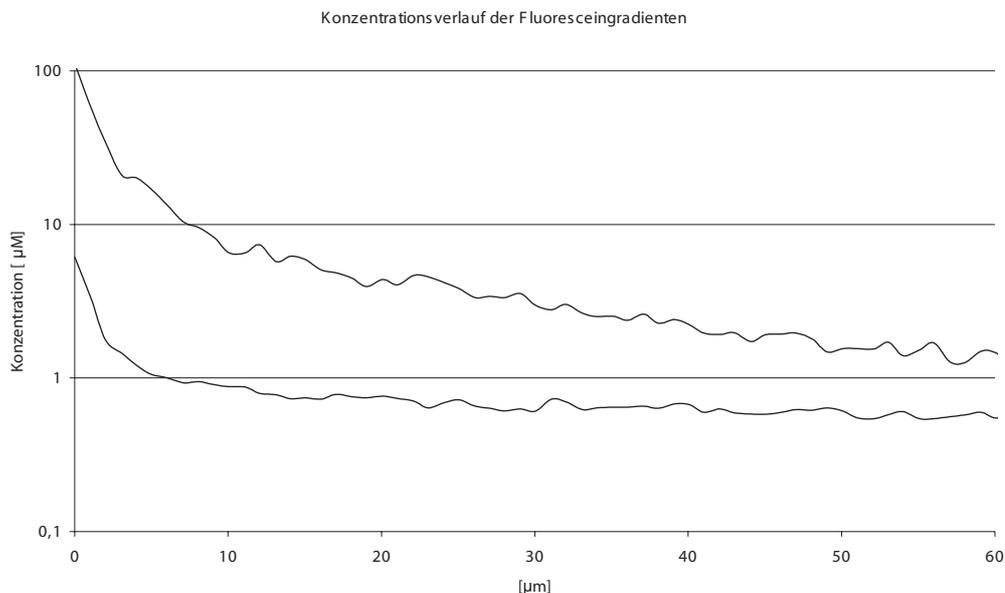


Abb. 36: Konzentrationsverlauf der Fluoresceingradienten. Die obere Kurve zeigt den Gradienten der mit der 3 µm Pipette erzeugt wurde, die untere Kurve den der 1 µm Pipette. Die hohe z-Auflösung der Messungen, kombiniert mit dem geringen Fluoreszenzsignal, führt zu einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis, was die Unregelmäßigkeit der Spuren erklärt. Um dies Rauschen etwas zu reduzieren, wurde das Signal jeweils von 5 Pixeln gemittelt.

Ob sich die auf Carboxyfluorescein basierenden Informationen über die Konzentrationsgradienten auch auf die anwenden lassen, die in den Orientierungsexperimenten zum tragen kamen, konnte nur theoretisch erörtert werden. Wenn man davon ausgeht, dass bei gleichem Füllstand der Pipetten, also bei gleichem hydrostatischen Druck, die Freisetzungsrates der Substanz aus der Pipette gleich ist, hängt die Ausbildung des Konzentrationsgradienten nur noch von den Diffusionseigenschaften der jeweiligen Substanz, also ihrem Diffusionskoeffizienten ab. In Ermangelung von experimentellen Meßwerten der Diffusionskoeffizienten, wurden diese nach der Einstein-Stokes-Gleichung (Einstein, 1956) bestimmt:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Wobei D der Diffusionskoeffizient ist, k die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur, η die dynamische Viskosität und R der aktive Radius des jeweiligen Moleküls. Die Werte für die aktiven Radien der Moleküle wurden basierend auf den Strukturdaten von Chemical Abstracts und dem European Bioinformatics

Institute abgeschätzt. Aus diesen Berechnungen ergibt sich, dass die Diffusionskoeffizienten der untersuchten Stoffe sich in einen ähnlichen Bereich bewegen wie der von Carboxyfluorescein, also etwa $5,5 \times 10^{-6}$. Demnach stellen die aus den Messungen mit Carboxyfluorescein erhaltenen Informationen ein durchaus realistisches Abbild der Gradientenform in den Orientierungsexperimenten dar.

4 Diskussion

Die Bewegungen der Wachstumskegel bestimmen bei der Entwicklung des Nervensystems die Verschaltung des neuronalen Netzes und sind so auch eine Grundlage seiner (späteren) Funktionalität.

Der gerichteten amöboiden Bewegung der Wachstumskegel liegt das Zusammenspiel der mechanischen Grundlage der Bewegung und die Wahrnehmung und Verarbeitung äußerer Reize zur Wegfindung zugrunde. Hierfür bilden die Wachstumskegel Rezeptoren für Lenkungsmoleküle aus, und die Verbindung von Lenkungsmolekül und Rezeptor stößt eine zytoplasmatische Signalkette an, die wiederum in die Regulation des Zytoskeletts eingreift und so das Wachstumsverhalten der Wachstumskegel steuert (Gallo und Letourneau, 2002; Gallo und Letourneau, 2004). Die äußerst dynamischen Mikrofilamente sind ein Ziel dieser Signalketten, ist doch das Zytoskelett in Kombination mit Myosin der Motor, der dieser gleitenden oder kriechenden Fortbewegung zugrunde liegt (Mitchison und Cramer, 1996). Die Dynamik der Mikrofilamente unterliegt einem ständigen Ablauf von Aktinpolymerisation, retrograder Bewegung und Aktindepolymerisation, und so ist auch die Bewegung von Filopodien und Lamellipodien abhängig von dieser Dynamik und dem gezielten Umbau der Filamente: Positive Signalstoffe fördern die Aktinpolymerisation, während negative Signalstoffe die Depolymerisation (Fan et al., 1993) und die Reorganisation der Filamente begünstigen (Gallo und Letourneau, 2002). Das Zusammenspiel der einzelnen Vorgänge im Aktinkreislauf bestimmt somit das Wachstumsverhalten des Wachstumskegels.

4.1 Extrazelluläres Adenosin beeinflusst das F-Aktin neuronaler Wachstumskegel

In der vorliegenden und in vorangegangenen Arbeiten (Grau, 2000; Grau et al., 2001; Bartl, 2002) konnte gezeigt werden, dass der das Richtungswachstum von neuronalen Wachstumskegeln beeinflussende Effekt von ATP auch mit einer Zunahme in Gehalt und Dichte an F-Aktin einhergeht. Eine solche Wirkung ist auch für die Zugabe von NGF beschrieben (Paves und Saarma, 1997), ein Ergebnis, das in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Da ATP (siehe unten) unter physiologischen Bedingungen im extrazellulären Raum sehr schnell abgebaut wird, wurden auch die verschiedenen Abbauprodukte, ADP, AMP und Adenosin,

auf eine entsprechende Wirkung hin untersucht. Während ADP zu etwas indifferenten, nur teilweise signifikanten Änderungen führte und AMP keinerlei signifikante Veränderung des F-Aktin gehalts und der F-Aktindichte zur Folge hatte, induzierte die Gabe von Adenosin signifikante Zunahmen in Gehalt und Dichte des F-Aktins, die den Veränderungen durch ATP und NGF durchaus ähnlich sind. Durch Zugabe des unspezifischen Adenosinrezeptoragonisten NECA konnten ebenfalls gleichgerichtete, signifikante Veränderungen am F-Aktin herbeigeführt werden. Dieses Experiment bestätigt, dass die beobachteten Veränderungen der Mikrofilamente über Adenosinrezeptoren vermittelt werden und nicht etwa ein metabolischer Effekt in Folge der Aufnahme extrazellulären Adenosins.

4.2 Neuronale Wachstumskegel orientieren sich in extrazellulären Adenosingradienten

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde versucht, das Richtungswachstum der Wachstumskegel durch extrazelluläre Gradienten von ATP und seinen Abbauprodukten zu steuern. Da dies für ATP und Spinalneurone aus *Xenopus*-Embryonen bereits beschrieben ist (Fu et al., 1997), wurde diese Substanz als Referenz verwendet; die lenkende Wirkung extrazellulärer ATP-Gradienten konnte auch an den verwendeten Wachstumskegeln der dorsalen Hinterwurzelganglien des Haushuhns gezeigt werden. Wie man aus den F-Aktinmessungen der durchgeführten Experimente annehmen konnte, war es nicht möglich in Konzentrationsgradienten von ADP und AMP signifikante Orientierungsreaktionen der Wachstumskegel zu beobachten. Nach langwierigen Arbeiten an der Modulation der Form der Konzentrationsgradienten konnte jedoch gezeigt werden, dass Adenosin in Form bestimmter Gradienten sowohl das Richtungswachstum der Neurone beeinflussen kann als auch die Wachstumsgeschwindigkeit der Wachstumskegel im Vergleich zur Kontrolle deutlich und signifikant erhöht. Letzteres ist wenig verwunderlich, ist doch eine förderliche Wirkung von Adenosin und anderen Nucleosiden auf das Auswachsen von Neuronen bekannt (Schäfer et al., 1995; Höpker et al., 1996; Zimmermann, 1996). Durch die Experimente mit dem unspezifischen Adenosinrezeptoragonisten NECA und dem unspezifischen Adenosinrezeptorantagonisten CGS 15943 konnte gezeigt werden, dass die gezielte Beeinflussung der Wachstumsrichtung durch Adenosinrezeptoren vermittelt wird, ebenso wie die Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit. Das Ergebnis, dass Adenosingradienten

ten neuronale Wachstumskegel orientieren können, steht jedoch im Widerspruch zu Resultaten vergleichbarer Experimente anderer Gruppen (Fu et al., 1997), insbesondere zu den Arbeiten von Stein und Kollegen (Stein et al., 2001). Ein möglicher Grund hierfür sind die Unterschiede im verwendeten Zellsystem, wurden doch die früheren Arbeiten zu diesem Thema an *Xenopus*-Neuronen durchgeführt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liefert der Vergleich der angewandten Methoden: Wurde in den Experimenten von Fu und Kollegen (Fu et al., 1997) eine Adenosinkonzentration in den Mikropipetten verwendet, die 30 mal höher war als die in den Experimenten dieser Arbeit, setzten Stein und Kollegen (Stein et al., 2001) in der Pipettenlösung eine NECA-Konzentration 100 mal höher als in die in der vorliegenden Arbeit verwendete ein. Hinzu kommen Unterschiede in der Art der Gradientenerzeugung. Dieser Punkt und die generelle Bedeutung der Konzentrationsgradienten soll im Folgenden genauer diskutiert werden.

4.3 Bedeutung von Konzentrationsgradienten für das Richtungswachstum

Nachdem die Orientierung neuronaler Wachstumskegel in Konzentrationsgradienten diffusibler Stoffe, so genannter Lenkungsmoleküle, schon Ende des 19. Jahrhunderts von Santiago Ramón y Cajal als Mechanismus der Wegfindung für wachsende Nervenzellen postuliert wurde (Ramón y Cajal, 1906), wurde der erste eindeutige Beweis für einen solchen Chemotropismus erst etwa einhundert Jahre später von Gundersen und Barrett (Gundersen und Barrett, 1979) erbracht. Sie konnten zeigen, dass sich regenerierende sensorische Axone in einem steilen NGF-Gradienten orientieren. Von entscheidender Bedeutung für die orientierende Wirkung ist, neben dem Lenkungsmolekül selbst, eine wirkungsvolle Übertragung der Richtungsinformation. Diese vektorielle Information wird in der Konzentrationsänderung des entsprechenden Lenkungsmoleküls in Abhängigkeit des Ortes codiert.

Welche Eigenschaften muss ein Konzentrationsgradient eines diffusiblen Stoffes haben, dass die in ihm codierte vektorielle Information vom Wachstumskegel wahrgenommen werden kann und er somit Einfluss auf das Richtungswachstum nehmen kann? Im Laufe der Evolution haben sich im Prinzip zwei verschiedene Mechanismen zur Detektion von Konzentrationsgradienten entwickelt. Prokaryoten erkennen die Änderung der Konzentration über die Zeit in Abhängigkeit ihrer

Bewegung und können auf diese Weise unterscheiden, ob sie sich zu der Diffusionsquelle hin oder von ihr weg bewegen (Stock et al., 1989; Stock und Mowbray, 1995). Im Gegensatz dazu detektieren Eukaryoten einen solchen Konzentrationsgradienten, indem sie entsprechende Unterschiede über die räumliche Ausdehnung der Zelloberfläche wahrnehmen können (Devreotes und Zigmond, 1988). Hierbei sind zum einen die absolute Konzentration und zum anderen die Konzentrationsänderung über den Wachstumskegel hinweg von zentraler Bedeutung. In welcher Konzentration der Chemoattraktant vorliegen muss und wie stark dabei die Konzentrationsänderung sein muss, hängt wiederum von der Verteilung und den biochemischen Eigenschaften der beteiligten Rezeptoren und der nachgeschalteten Signalketten ab.

Die absolute Konzentration muss dabei im Vergleich zur Dissoziationskonstanten des jeweiligen Rezeptors hoch genug sein, um eine ausreichende Zahl an Rezeptoren zu binden, darf aber nicht so hoch sein, dass die Großzahl der Rezeptoren gebunden ist und so kein Konzentrationsunterschied mehr erkannt werden kann (Goodhill, 1998). Diese theoretische Betrachtung findet ihre Bestätigung in Untersuchungen zur Orientierung von *Xenopus*-Spinalneuronen in Glutamatgradienten, die nur in einem bestimmten Konzentrationsfenster möglich ist (Zheng et al., 1996). Zusätzlich zur absoluten Konzentration des Chemoattraktants muß der Konzentrationsunterschied über den Wachstumskegel groß genug sein, um das Rauschen der Rezeptoraktivierung und der weiterführenden Signalkette übertönen zu können (Goodhill, 1998). So kann die codierte Richtungsinformation erkannt werden (Bagnard et al., 2000; Isbister et al., 2003). Die Tatsache, dass bei diesen Überlegungen die Dissoziationskonstanten der jeweiligen Rezeptoren und natürlich auch deren Anzahl und Verteilung auf dem Wachstumskegel eine Rolle spielt, zeigt, dass es keinen allgemein wirksamen Konzentrationsgradienten geben kann. Jeder Stoff muss, damit er eine Richtungsinformation übertragen kann, in Abhängigkeit der Rezeptoreigenschaften, inklusive deren Anzahl und Verteilung, einen „eigenen“ Konzentrationsgradienten haben. Dies zeigt sich auch an den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Während ATP in höheren Konzentrationen das Richtungswachstum der Neuronen beeinflussen kann, ist dies mit Adenosin bei vergleichbarer relativer Änderung der Konzentration über den Wachstumskegel nur in einem deutlich geringeren Konzentrationsbereich möglich; die Dissoziationskonstanten der verschiedenen Rezeptoren – der für ATP und der für Adenosin –

unterscheiden sich in etwa um den Faktor 50 (North und Barnard, 1997; Dunwidie und Masino, 2001). Neben der direkten Detektion des Chemoattraktants ist für die Umsetzung des Signals in eine Änderung der Wachstumsrichtung natürlich auch die intrazelluläre Weiterleitung von Bedeutung, wird doch der extrazelluläre Gradient in einen intrazellulären entsprechenden second-messenger übertragen. So ist zum Beispiel die Form intrazellulärer cAMP-Gradienten, einem verbreiteten second-messenger, von grundlegender Bedeutung für das Richtungswachstum neuronaler Wachstumskegel (Munck et al., 2004). Des Weiteren können diese Mechanismen der Weiterleitung über die Zellmembran durch verschiedene Rezeptoren und second-messenger auch zu einer Verstärkung des Gradienten führen; damit dienen sie auch der Übertragung der vektoriellen Information (Postma und Van Haastert, 2001; Postma et al., 2004).

4.4 Generierung orientierender Konzentrationsgradienten

Basierend auf diesen Überlegungen und experimentellen Befunden, die zeigen wie Konzentrationsgradienten beschaffen sein müssen, damit die in ihnen versteckte Richtungsinformation vom Wachstumskegel richtig erkannt wird, müssen entsprechende Methoden entwickelt werden, um solche Gradienten in Experimenten zu generieren. Gundersen und Barrett (1979) erzeugten die Gradienten mit Mikropipetten, aus denen die Lösung aufgrund des hydrostatischen Drucks auslief. Dies kombinierten sie mit einer schwachen Strömung des Kulturmediums entgegen der ursprünglichen Wachstumsrichtung des Wachstumskegels. Dadurch sollte die NGF-Konzentration am Wachstumskegel erhöht werden, ohne die Pipette näher an den Kegel heranzuführen zu müssen. Durch dieses Zusammenspiel zweier Strömungen – der aus der Pipette und der des Mediums – erscheint die Reproduzierbarkeit des Konzentrationsgradienten äußerst diffizil (Lohof et al., 1992). Dies könnte auch erklären, warum diese Art der Gradientenerzeugung in weiteren Veröffentlichungen keine Nachahmer fand. Ein weiterer Punkt ist die Frage einer eventuellen Beeinflussung des Wachstums durch die entgegenwirkende Strömung, ist doch der Einfluss mechanischer Reize auf das neuronale Wachstum bekannt (Buettner et al., 1994).

Um diese experimentellen Probleme zu umgehen, wurde Anfang der neunziger Jahre von Poo und Kollegen (Lohof et al., 1992) eine Applikation entwickelt, bei der die Pipettenlösung durch Überdruck aktiv ausgestoßen wird, wobei die ausge-

stoßene Menge, also die Freisetzungsrates aus der Pipette, über entsprechend gepulste Freisetzungsmuster reguliert werden kann. Durch diese erhöhten Freisetzungsrates konnten hohe Wirkstoffkonzentrationen am Wachstumskegel erreicht werden, ohne dass eine zusätzliche, eventuell den Gradienten oder den Wachstumskegel beeinflussende Strömung, angelegt werden musste. Problematisch bei dieser Art der Gradientenerzeugung sind zum einen die durch die gepulste Freisetzung entstehenden Konzentrationswellen, die sich erst in einem gewissen Abstand zu, Pipettenspitze durch Diffusionsprozesse ausgleichen (siehe Abbildung 37). Dadurch ist die mögliche auf den Wachstumskegel wirkende Steilheit, die ja zur Diffusionsquelle hin ansteigt, nach oben hin limitiert. Zum anderen ist die mögliche minimale Freisetzungsrates durch den aktiven Ausstoß der Pipettenlösung nach unten hin begrenzt.

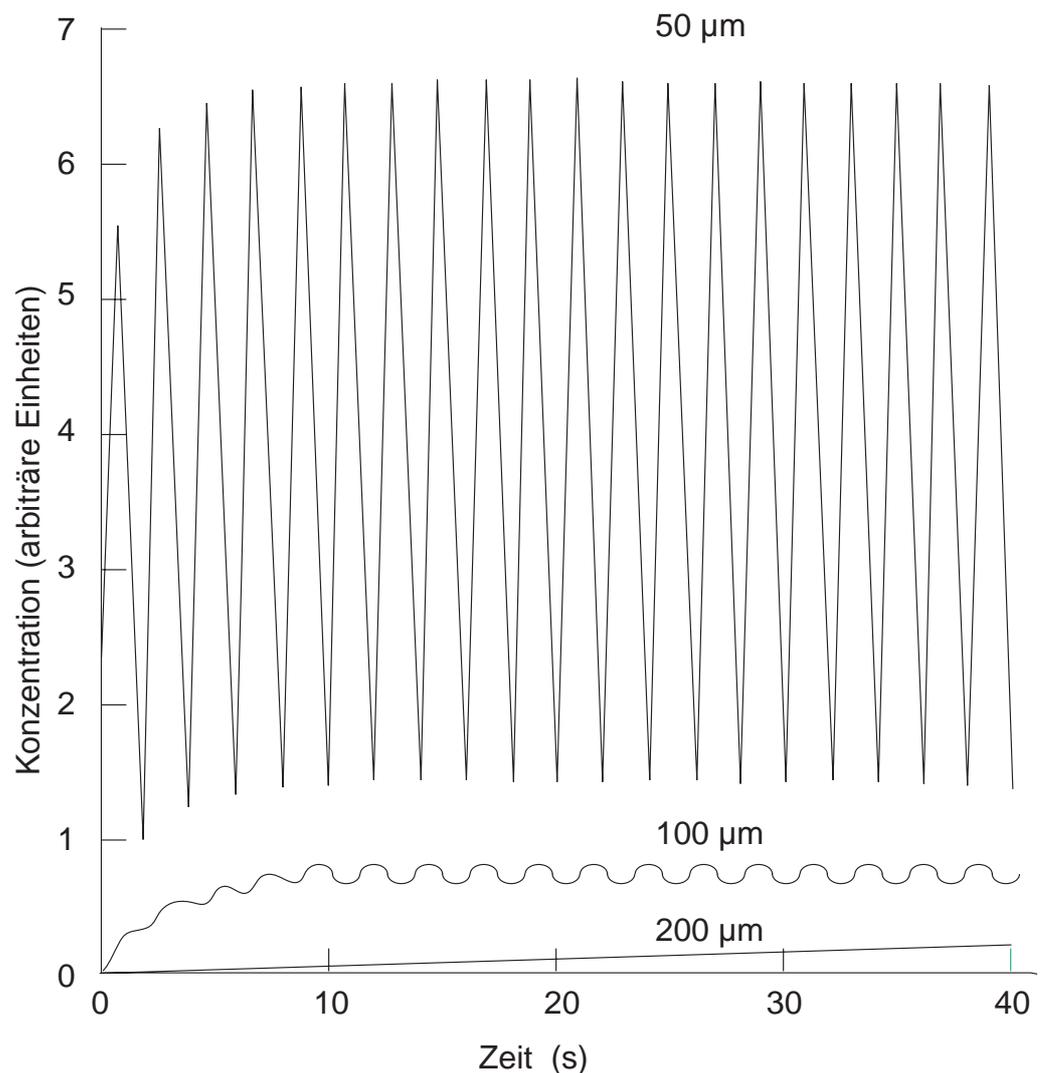


Abb.37: Darstellung des Konzentrationsverlaufs in Abhängigkeit zur Zeit und zum Abstand zu der Pipettenspitze (Lohof et al., 1992).

Ein völlig anderer Weg in der Generierung extrazellulärer Gradienten wird durch Freisetzung der Wirkstoffe aus so genannten Käfigverbindungen begangen. Käfigverbindungen sind biologisch inaktive, photolysierbare Substanzen, deren biologisch aktives Molekül mit einer chemischen Gruppe versehen ist, die bei Absorption eines geeigneten Lichtquants abgespalten werden kann und die aktive Substanz freisetzt. Die Menge der freigesetzten Substanz kann hier direkt durch die Anzahl der applizierten Photonen, also durch die Lichtintensität und die Belichtungsdauer kontrolliert werden. Ein nicht zu unterschätzendes Problem stellt hierbei jedoch die Phototoxizität dar (Denk et al., 1994), da durch die Bestrahlung mit UV-Licht photochemisch singulett Sauerstoff entsteht. Limitierend für die Nutzung dieser Methode zur Erzeugung von Mikrogradienten ist die Verfügbarkeit

geeigneter Käfigverbindungen, beziehungsweise die Möglichkeit die entsprechenden Substanzen mit entsprechenden chemischen Gruppen zu versehen. So ist zum Beispiel eine solche Modifikation bei Adenosin nicht möglich. Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit auf die klassische Methode der Gradientengenerierung mittels Mikropipetten zurückgegriffen. In Gegensatz zu den anderen Arbeiten, in denen Gradienten durch Mikropipetten erzeugt wurden, wurde auf Druckapplikation und zusätzliche Strömungen im Medium verzichtet. Besonderes Augenmerk lag dafür auf der Qualität der Pipetten. Durch Variation der Pipettengeometrie, insbesondere der Größe der Pipettenöffnung, durch Veränderung der Zugprogramme des Pipettenziehgerätes und der Füllhöhe der Pipetten konnte die Freisetzungsrates der Pipettenlösung gesteuert werden. Diese passive Technik in Kombination mit Pipetten mit sehr kleinen Öffnungen, ermöglichte die Generierung der speziellen, niedrigen Konzentrationsgradienten, die für die Adenosinorientierung nötig sind. Dies erklärt möglicherweise, warum frühere Arbeiten von Poo und Kollegen (Fu et al., 1997; Stein et al., 2001) über eine Beteiligung von Adenosin in der Orientierung neuronaler Wachstumskegel zu einem entgegengesetzten Ergebnis kamen: Zum einen wurde hier mit der erwähnten Überdruckapplikation gearbeitet, was in einer deutlich höheren Freisetzungsrates resultiert, zum anderen wurden, wie bereits erwähnt, wesentlich höhere Agonistenkonzentrationen eingesetzt. Die Kombination dieser beiden Parameter führt zu Gradienten höherer absoluter Konzentration. Allerdings beinhaltet dieser Erklärungsansatz, neben dem Vorhandensein der entsprechenden Rezeptoren, noch weitere Voraussetzungen: Die Rezeptoren müssen in einer vergleichbaren Dichte vorkommen und müssen auch vergleichbare Dissoziationskonstanten haben. Allerdings wird diese Erklärung auch dadurch gestützt, dass in der vorliegenden Arbeit, unter Verwendung der Pipetten mit der größeren Öffnung und den daraus resultierenden Gradienten höherer Konzentration, keine positive Beeinflussung des Richtungswachstums der Wachstumskegel erkennbar war. Eine weitere Bestätigung für die Bedeutung der Form der Konzentrationsgradienten findet sich in den Orientierungsexperimenten mit ATP: Hier führte der Einsatz der Druckapplikation von Poo und Kollegen (Fu et al., 1997) zum Erfolg. Dies steht auch im Einklang mit den entsprechenden Experimenten der vorliegenden Arbeit. In diesem Fall erwiesen sich die mit Pipetten mit großen Öffnungen erzeugten ATP-Gradienten als geeignet, um die Wachstumsrichtung der Wachstumskegel signifikant zu beeinflus-

sen, während das unter Verwendung der Pipetten mit der kleinen Öffnung nicht möglich war.

4.5 Charakterisierung der Konzentrationsgradienten

Neben der Erzeugung entsprechender Gradienten ist die Charakteristik (und damit die aufwendige Untersuchung) dieser Gradienten von großer Bedeutung, da der Konzentrationsverlauf ausschlaggebend für die Reaktion des Wachstumskegels ist. Während dieser Aspekt bei früheren Arbeiten (Gundersen und Barrett, 1979; Paves und Saarma, 1997) noch weitgehend vernachlässigt wurde, gewinnt er nun immer mehr an Bedeutung. Es gibt viele theoretische Überlegungen über die Diffusion und mehrere mathematische Modelle, die diese beschreiben (Crank, 1975).

Ein Ansatz ist es, eine „physiologische Anwendung“ dieser mathematischen Modelle für den Aufbau von Diffusionsgradienten aufzuzeigen (Goodhill, 1998; Goodhill und Urbach, 1999). Mindestens ebenso wichtig ist jedoch, die experimentelle Analyse realer, das Richtungswachstum der Wachstumskegel beeinflussender Konzentrationsgradienten, da diese nicht zwingend mit den mathematischen Modellen übereinstimmen. Bei den in der vorliegenden Arbeit mit Mikropipetten erzeugten Gradienten, handelt es sich um keine reinen Diffusionsgradienten, da die Pipettenlösung auch aus der Pipette ausströmt. Daher bringen die Versuche, sie durch die von Goodhill (1998) vorgeschlagenen Diffusionsgleichungen $C = q/(4\pi Dr)$ zu beschreiben, keine befriedigenden Ergebnisse (siehe Abbildung 38), auch wenn diese einen Parameter für die Freisetzungsrates der Pipettenlösung beinhalten. C ist hier die Konzentration, q die Freisetzungsrates, D die Diffusionskonstante und r die Entfernung von der Diffusionsquelle.

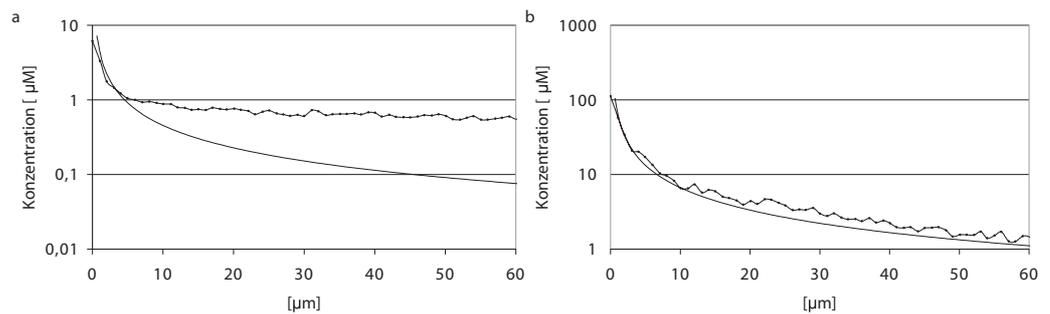


Abb.38: Versuche der Beschreibung der Konzentrationsgradienten durch ein mathematisches Modell nach Goodhill (1998). a Angleichung an den Fluoresceingradienten der hochohmigen Pipette, b Angleichung an den Fluoresceingradienten der niederohmigen Pipette. Die gepunktete Linie stellt jeweils den gemessenen Konzentrationsgradienten dar.

So kommt es bei dem Aufbau dieser Gradienten zu einem Zusammenspiel von zwei unterschiedlichen Kräften: Dem Ausströmen aus der Pipette und der Diffusion. Es ist jedenfalls anzunehmen, dass die Überdruckapplikationen, wie sie von Lohof und Kollegen eingeführt wurden (Lohof et al., 1992), Konzentrationsgradienten erzeugen, die wesentlich stärker von den mathematischen Modellen der Diffusionsgradienten abweichen.

Dennoch ist das Wissen über die Eigenschaften der wirksamen Gradienten von eminenter Bedeutung bei der Untersuchung der Wegfindung von Wachstumskegeln. Deshalb müssen Einflussgrößen für die Charakterisierung der Gradienten und Methoden, diese zu bestimmen, gefunden werden.

Bei der Beschreibung der Gradientenform kommen im Prinzip zwei Parameter zum Tragen, die vom Wachstumskegel detektiert werden können: Die absolute Konzentration und die Änderung der Konzentration in Abhängigkeit zur Entfernung von der Diffusionsquelle, im Falle der vorliegenden Arbeit von der Pipettenspitze. Zusätzlich dazu ist bei Orientierungsexperimenten die Stabilität der Gradienten für die Dauer des Experiments äußerst wichtig. Um solche Konzentrationsgradienten charakterisieren zu können, muss eine messbare Größe in das System eingebracht werden. Die Bandbreite an Möglichkeiten hierfür erscheint auf den ersten Blick sehr groß, doch wird sie durch die Durchführbarkeit adäquater Messungen schnell wieder eingeschränkt. Die vielleicht empfindlichste Methode zur Konzentrationsbestimmung ist wohl die radioaktive Markierung der entsprechenden Substanz. Zur Bestimmung von Konzentrationen in Gradienten müssten

diese jedoch fixiert – zum Beispiel durch Schockgefrieren – und in entsprechenden Schnitten ausgewertet werden. Da sich der für den Wachstumskegel relevante Teil des Gradienten jedoch fast auf zwei Dimensionen beschränkt, erscheint die Herstellung entsprechender Schnitte äußerst kompliziert. Ob hierbei der eigentliche Gradient auch noch realistisch dargestellt werden kann, muss in Frage gestellt werden.

Eine weitere messbare Größe ist das Übergangspotential zwischen zwei Elektrolyten (englisch: liquid junction potentials), also zum Beispiel zwischen der Pipettenlösung in der Lösung im Schälchen. Dieses elektrische Potential beruht auf den Diffusionsvorgängen der Ionen an der Grenzfläche zweier unterschiedlich zusammengesetzter Lösungen (Numberger und Graguhn, 1996). Es lässt sich mit einem Aufbau, wie er bei Patch-Clamp-Messungen verwendet wird, bestimmen. Hierfür werden das Schälchen und die Patchpipette mit der gleichen Lösung gefüllt (Übergangspotential Null) und dann eine Mikropipette mit einer anderen Lösung eingebracht. Der Konzentrationsgradient der aus der Mikropipette ausströmenden Ionen kann so über Messungen des elektrischen Potentials in verschiedenen Abständen von der Mikropipette bestimmt werden. Problematisch hierbei ist jedoch, dass die Patchpipette Einfluss auf die Strömungsverhältnisse im Schälchen nimmt: Zum einen stellt sie eine Barriere dar, zum anderen besteht auch die Gefahr, dass auch aus der Patchpipette etwas der Lösung ausströmt. Es kann also nicht sichergestellt werden, dass der Gradient völlig unbeeinflusst bleibt.

Als letztes soll die Markierung der Konzentrationsgradienten mit Farbstoffen aufgeführt werden, da sie wohl die am häufigsten verwendete Methode darstellt und auch in der vorliegenden Arbeit ihre Anwendung fand. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Fluoreszenzfarbstoffe, da die Detektion der Emission sehr empfindlich ist. Die Anwendung klassischer Fluoreszenzmikroskopie liefert hierbei jedoch kein wirkliches Abbild des Gradienten, wie er von den Wachstumskegeln in den Experimenten wahrgenommen wird. Von der Pipettenspitze als Ursprung des Diffusionsgradienten ausgehend, verteilen sich die Moleküle in alle Raumrichtungen. Liegt die Pipettenspitze, wie in den Experimenten dieser Arbeit, auf dem Deckglas auf, entsteht ein Konzentrationsgradient in Form einer Halbkugel, unten begrenzt durch das Deckglas, konzentrisch um die Pipettenspitze herum. Da die Wachstumskegel in dieser Form der Kultur flach auf dem mit Laminin beschichteten

Deckglas wachsen (müssen), können sie auch nur Moleküle in diesem Bereich erkennen. Somit beschränkt sich für sie die Wahrnehmungsmöglichkeit des Konzentrationsgradienten fast auf zwei Dimensionen.

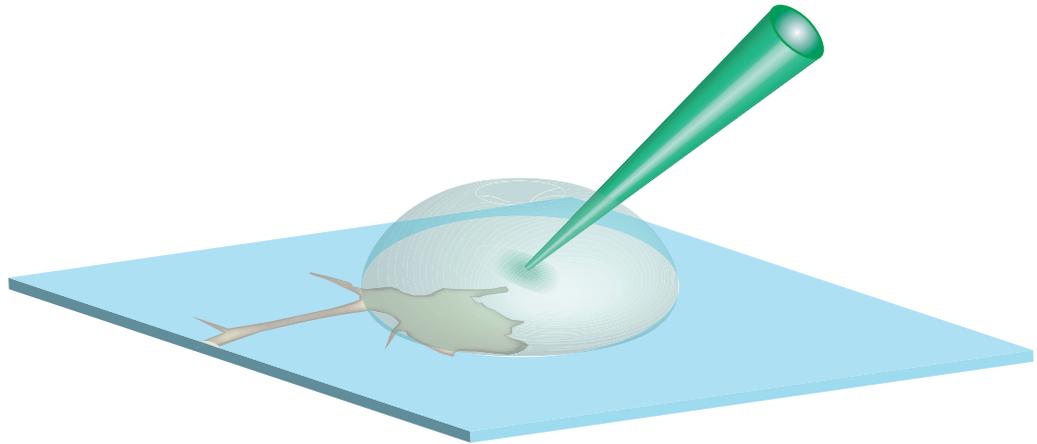


Abb. 39: Schematische Darstellung des näherungsweise zweidimensionalen Wachstumskegels und des durch Mikropipetten erzeugten dreidimensionalen Konzentrationsgradienten. Auf das umgebende Zellkulturmedium wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet, die Halbkugel stellt die Ausdehnung des Konzentrationsgradienten dar.

Die Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie liefert jedoch aufgrund ihrer mäßigen Auflösung in z-Richtung ein Bild des Gradienten mit viel Information von außerhalb der Fokalebene. Das Anregungslicht durchdringt die gesamte Probe, was entsprechend auch zu Emissionslicht aus der gesamten Probe führt. Daraus ergibt sich, dass der Konzentrationsgradient verzerrt dargestellt wird, d.h. in Bezug auf die absolute Konzentration und die Steilheit falsch eingeschätzt wird. Dazu kommt ein weiteres Problem: Die mit Fluoreszenzfarbstoff gefüllte Pipette wirkt zum einen wie ein Lichtleiter, in den das Anregungslicht eingekoppelt wird. Zum anderen werden dadurch aber auch die in ihr enthaltenen Fluorophore angeregt, wodurch sie zu einer kleinen Leuchtstoffröhre wird und so zusätzliches, störendes Emissionslicht abgibt.

Abhilfe schaffen hierbei moderne Mikroskopiemethoden mit hoher z-Auflösung wie konfokale Messungen, 2-Photonen-Mikroskopie oder die so genannte „total internal reflection fluorescence“ (TIRF) Mikroskopie, wie sie in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde.

Grundlage der TIRF Mikroskopie ist die Ausbildung einer evaneszenten Welle (lat. evanescere = dahinschwinden) an der Grenzfläche zweier unterschiedlich brechen-

der Medien unter den Bedingungen der Totalreflexion. Fluoreszenzfarbstoffe jenseits der Grenzschicht werden unter Energieverlust der reflektierten Welle angeregt. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes (δ) lässt sich durch folgende Formel beschreiben (Kramer, 2004):

$$\delta = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{[\sin(\alpha_1)/\sin(\alpha_g)]^2 - 1}}$$

Wobei λ die Wellenlänge, α_1 die Einfallswinkel und α_g der Grenzwinkel der Totalreflexion ist. Die dieser Formel zugrunde liegende Abhängigkeit zwischen dem Einfallswinkel und der Eindringtiefe der evaneszenten Welle (bei gleich bleibender Wellenlänge) soll durch Abbildung 40 verdeutlicht werden. Unter den bei den Experimenten vorherrschenden Bedingungen und den verwendeten Komponenten kann für diese Messungen von einer Eindringtiefe zwischen 100 und 200 nm ausgegangen werden.

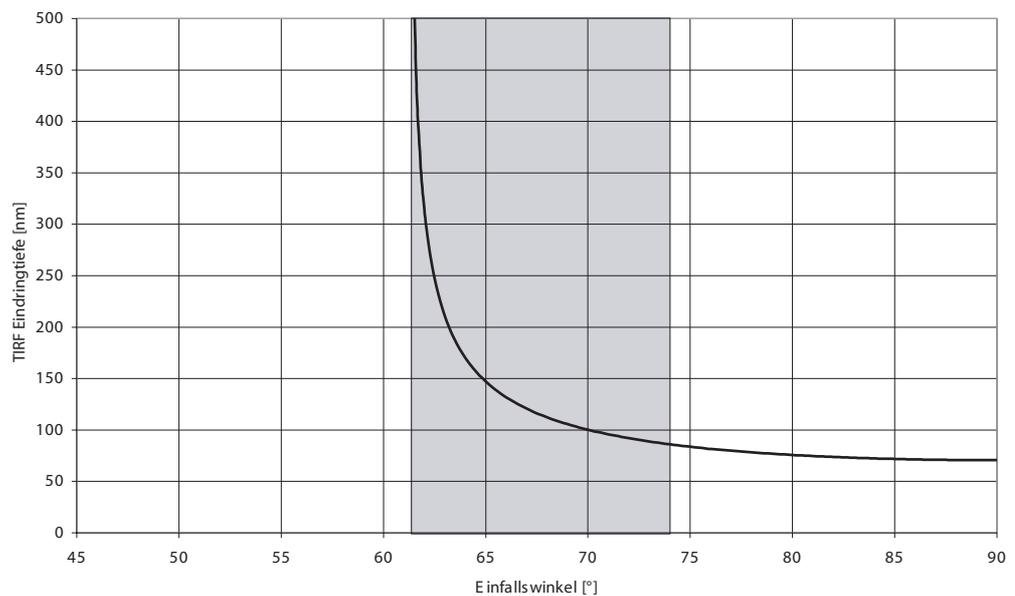


Abb.40: Eindringtiefe des evaneszenten Feldes als Funktion des Einfallswinkels für $\lambda=488$, Brechungsindex $n_1=1,518$, $n_2=1,33$ daraus resultierend $\alpha_g=61,2^\circ$. Der unterlegte Bereich stellt den Arbeitsbereich des verwendeten Objektivs dar (nach Kramer, 2004).

Aufgrund des exponentiellen Abfalls der Intensität der Welle mit dem Abstand zur Grenzfläche, werden weiter entfernte Fluorophore nicht angeregt, womit der Anteil von Hintergrundfluoreszenz am Bild entscheidend reduziert wird. Im Vergleich zur

konfokalen Detektionsmethode ist man bei TIRF an die Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe gebunden. Allerdings bietet TIRF im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie eine Weitfeldbeleuchtung, erlaubt also ein gleichzeitiges Vermessen des Blickfelds (Axelrod, 2001), was besonders bei dynamischen Prozessen von Bedeutung ist.

Der Vorteil von TIRF-Messungen im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie liegt darin, dass Hintergrundfluoreszenz aus nicht im Fokus befindlichen Ebenen, welche die Bildinformation aus der Fokalebene überlagert, ausgeschlossen wird. Die durch interne Totalreflexion ausgelöste Fluoreszenz beschränkt sich auf die Eindringtiefe der evaneszenten Welle, was etwa im Bereich von 200 nm liegt. Dieser Bereich deckt sich auch mit dem für den Wachstumskegel detektierbaren Bereich des Diffusionsgradienten.

4.6 Beschreibung der beteiligten Rezeptoren und möglicher weiterführender Signalketten

Wie im Vorangegangenen erläutert, spielt für die Detektion der Konzentrationsgradienten durch die Wachstumskegel und für die erfolgreiche Entschlüsselung der in ihnen enthaltenen vektoriellen Information, auch die Art und die Verteilung der zugehörigen Rezeptoren eine entscheidende Rolle. Ist hierbei nur ein Rezeptortyp beteiligt, lässt sich dies noch relativ einfach beschreiben. Bei der Orientierung der Wachstumskegel in Adenosingradienten ist jedoch davon auszugehen, dass sich der Sachverhalt wesentlich komplexer darstellt, kann es hier doch zu einem Zusammenspiel der verschiedenen Rezeptortypen für Adenosin kommen. Adenosin- oder P1-Rezeptoren – diese Begriffe werden synonym verwendet – können anhand ihrer molekularen Strukturen und ihrer pharmakologischen Eigenschaften in vier Subtypen unterteilt werden: A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 Rezeptoren (siehe Abbildung 41) (Fredholm et al., 1994). Die ursprüngliche Einteilung dieser Rezeptortypen erfolgt nach der an ihre Aktivierung anschließende intrazelluläre Signalkette; demnach führt die Aktivierung der A_1 - und A_3 -Rezeptoren zu einer Verminderung der cAMP-Konzentration über die Adenylatcyclase, die Aktivierung der A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren über einen entgegengesetzten Mechanismus zur Erhöhung der cAMP-Konzentration (Londos et al., 1980). Doch diese einfache Einteilung kann nach dem heutigen Kenntnisstand so nicht mehr aufrecht gehalten werden. (Schulte und Fredholm, 2003).

Die vier verschiedenen Rezeptorsubtypen haben eine bestimmte, häufig auch überlappende Verteilung auf verschiedene Gewebe. Die funktionelle Bedeutung der Koexistenz verschiedener Arten von Adenosinrezeptoren konnte am Beispiel der Neuromodulation zwischen A_1 - und A_2 -Rezeptoren in verschiedenen Systemen gezeigt werden (Cunha, 2001).

Da die verschiedenen Rezeptorsubtypen deutliche Unterschiede in der Affinität für Adenosin aufweisen, scheint die Adenosinkonzentration unter physiologischen Bedingungen von entscheidender Bedeutung dafür zu sein, welche Rezeptoren aktiviert werden und somit welche nachfolgende Signalkette angestoßen wird. Die Expression verschiedener Adenosinrezeptorsubtypen auf einer Zelle, ermöglicht die Aufspaltung des Signals, das durch den allgemeinen Agonisten Adenosin übertragen wird, in verschiedene weiterführende Signalketten.

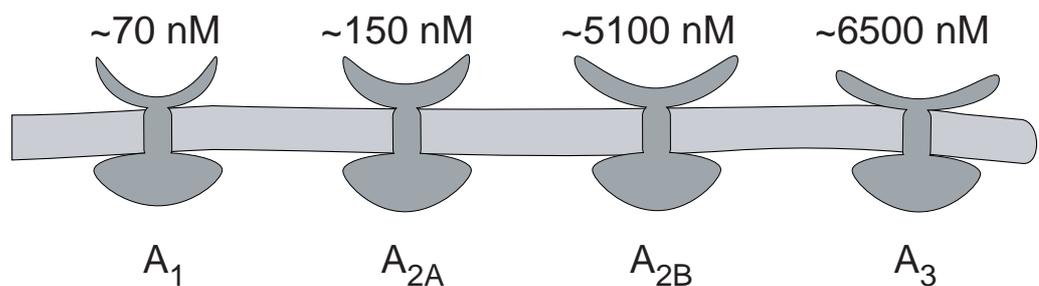


Abb.41: Adenosinaffinität der verschiedenen Rezeptorsubtypen (Dunwiddie und Masino, 2001)

Dennoch muss natürlich davon ausgegangen werden, dass in Adenosingradienten alle Typen von Adenosinrezeptoren, sofern sie von den Zellen exprimiert werden, auch aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt in Abhängigkeit von ihrer Dissoziationskonstanten und der vorherrschenden Adenosinkonzentration in unterschiedlichem Maße. Diese Unterschiede in der Affinität für Adenosin ermöglichen so, dass in bestimmten Konzentrationsbereichen die Rezeptorantwort eines bestimmten Typs überwiegt. Dies setzt allerdings auch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Signalwegen voraus, da sonst immer die Antwort des Rezeptors mit der niedrigsten Affinität zum Tragen käme.

Durch die Experimente mit dem selektiven A_{2A} -Rezeptoragonisten CGS 21680 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass für die primäre Reaktion der Wachstumskegel, also die gezielte Änderung der Wachstumsrichtung, die Aktivierung

dieses Rezeptorsubtyps ausreichend ist. Dieses Ergebnis stimmt auch mit den Adenosinkonzentrationen, die in den generierten Gradienten vorliegen, und mit den Bindungskonstanten des A_{2A} -Rezeptors überein. So beträgt die Adenosinkonzentration in 50 μm Entfernung von der Pipettenspitze 60 nM, in 5 μm Entfernung etwa 100 nM. Interessant ist, dass die alleinige Aktivierung der A_{2A} -Rezeptoren zwar ausreicht, um die Wachstumsrichtung zu beeinflussen, die Wachstumsgeschwindigkeit jedoch nicht signifikant verändert wird. Hierfür ist demnach eine zusätzliche Aktivierung eines weiteren Rezeptorsubtyps verantwortlich.

Der Nachweis der Existenz der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen in dem verwendeten Zellsystem durch entsprechende Antikörper konnte in Ermangelung ihrer kommerziellen Verfügbarkeit leider nicht durchgeführt werden. Innerhalb der Säugetiere gibt es eine relativ große Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz (Fredholm et al., 2001) der einzelnen Rezeptoren (siehe Abbildung 42); die Rezeptoren des Huhns unterscheiden sich jedoch, zumindest bei den bis jetzt sequenzierten, stärker von denen der Säugetiere. Die Verwendung von Antikörpern gegen die Rezeptoren der Säugetiere würde demnach zu sehr fragwürdigen Ergebnissen führen. Ebenso kritisch ist dieses mangelnde Wissen über die Adenosinrezeptoren im Huhn natürlich auch im Hinblick auf die Verwendung spezifischer Agonisten und Antagonisten; hier treten zum Teil schon innerhalb der Säugetiere beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der Spezifität auf (Klotz, 2000). Liang und Kollegen konnten jedoch im Huhn verschiedene Adenosinrezeptorantworten beobachten, die bekannten A_{2A} -Rezeptorantworten ähneln und durch den auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Agonisten CGS 21680 ausgelöst werden konnten (Liang und Haltiwanger, 1995; Liang und Morley, 1996).

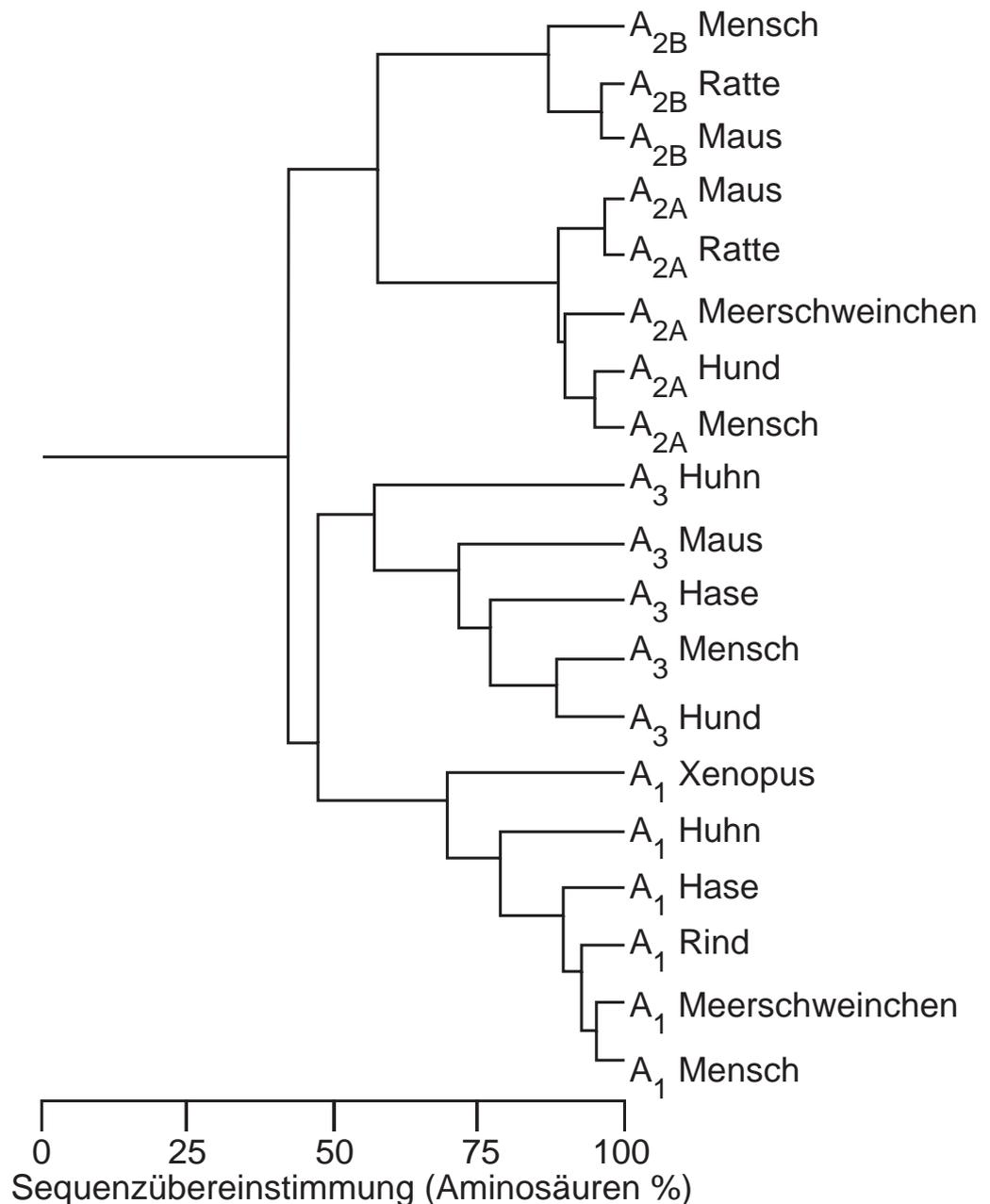


Abb.42: Das Dendrogramm zeigt die Sequenzübereinstimmung sequenzierter Adenosinrezeptoren verschiedener Organismen (nach http://www.gpcr.org/7tm/seq/001_007_001/001_007_001.TREE20.html; Dezember 2004)

Von besonderem Interesse ist die bei der Orientierung auf die Adenosinrezeptoraktivierung nachfolgende Signalkette. Allen Adenosinrezeptoren gemein ist, dass sie an G-Proteine gekoppelt sind. A₁- und A₃-Rezeptoren sind in der Regel an G_{i/o}, die A₂-Rezeptoren an G_s-Proteine gebunden (Ralevic und Burnstock, 1998). Dies geht auch konform mit der allgemeinen Vorstellung, dass A₁- und A₃-Rezeptoren über G_{i/o}-Proteine die Adenylatcyclase inhibieren und so die Konzentration an

cAMP senken. Die A_2 -Rezeptoren aktivieren hingegen über die G_s -Proteine die Adenylatcyclase und bewirken so eine Erhöhung der cAMP-Konzentration. Mittlerweile konnte eine Reihe verschiedener Kombinationen von Adenosinrezeptoren mit G-Proteinen nachgewiesen werden, die dieser grundlegenden Einordnung zum Teil widersprechen. A_1 -Rezeptoren binden an $G_{i1,2,3}$ und an G_o (Freissmuth et al., 1991; Akbar et al., 1994), für A_3 -Rezeptoren wurden Verbindungen mit $G_{i2,3}$, $G_{q/11}$ und sogar mit G_s -Proteinen gezeigt (Palmer et al., 1995; Reshkin et al., 2000). A_{2A} -Rezeptoren konnten zusammen mit G_s , G_{olf} und $G_{12/13}$ (Offermanns und Simon, 1995; Kull et al., 2000; Schulte und Fredholm, 2003) nachgewiesen werden und für A_{2B} -Rezeptoren konnte ein Auftreten in Kombination mit G_s , $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$ (Feoktistov et al., 1994; Feoktistov et al., 2002) gezeigt werden. Dieses breite Spektrum an unterschiedlichsten G-Proteinen, die an Adenosinrezeptoren gekoppelt sind, verdeutlicht, dass es nahezu unmöglich ist, von der Art des Rezeptortyps einer adenosinvermittelten Reaktion Rückschlüsse auf die weiterführende Signalkette zu treffen. Erschwert wird dies zusätzlich noch dadurch, dass auch an jeden G-Proteintyp mehrere verschiedene Signalketten anschließen. Daraus ergibt sich, durch Permutation der beteiligten Komponenten, eine Vielzahl möglicher weiterführender Signalwege.

Die Adenylatcyclase ist ein potentieller Mittler im Zusammenspiel der Adenosinrezeptorsubtypen. Sie wird nach der „klassischen“ Einteilung der Rezeptorsubtypen von A_1 - und A_3 -Rezeptoren negativ, von A_{2A} - und A -Rezeptoren positiv beeinflusst und bietet somit die Möglichkeit einer reziproken Kontrolle und Feinabstimmung der Signalketten (Ralevic und Burnstock, 1998).

Zusätzlich dazu konnte in verschiedenen Arbeiten die Rolle von cAMP für die Orientierung neuronaler Wachstumskegel aufgezeigt werden. So ist bekannt, dass das gleiche extrazelluläre Signal in Abhängigkeit von der intrazellulären cAMP-Konzentration zu entgegengerichteten Reaktionen bezüglich ihrer Wachstumsantwort auf den Reiz äußeren führen (Ming et al., 1997; Song et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für die Übertragung der vektoriellen Information des extrazellulären Gradienten auf einen intrazellulären Botenstoff cAMP von großer Bedeutung sein kann, da die Wachstumsrichtung auch allein durch entsprechende cAMP-Gradienten innerhalb des Wachstumskegels gesteuert werden kann (Lohof et al., 1992; Munck et al., 2004). Gestützt wird die Vermutung der Beteili-

gung von cAMP an der Änderung der Wachstumsrichtung auch durch die Zytoskelettexperimente mit Forskolin, ist dieses doch ein sehr potenter Aktivator der Adenylatcyclase. In diesen Experimenten konnte eine deutliche Zunahme in F-Aktingehalt und -dichte in den Wachstumskegeln beobachtet werden. Ein häufiges Ziel von cAMP ist wiederum die Protein Kinase A. Auch hier geben die Zytoskelettexperimente einen Anhaltspunkt für eine mögliche Involvierung dieses Enzyms an der Wachstumsreaktion; seine katalytische Untereinheit lässt sich durch KT 5720 effektiv blockieren. Durch Gabe von KT 5720 konnten deutliche Abnahmen in F-Aktingehalt und -dichte in den Wachstumskegeln herbeigeführt werden.

Dass cAMP und die Protein Kinase auch bei der Adenosinrezeptor-vermittelten Orientierung der Wachstumskegel beteiligt sind, konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nur teilweise bestätigt werden. Hier wurde zum einen die an der regulatorischen Untereinheit der Protein Kinase A wirkende cAMP-Antagonist Rp-cAMPS als auch KT 5720 eingesetzt. Während in Adenosingradienten die Orientierungsreaktion tatsächlich von cAMP und Protein Kinase A abhängig ist, ist letztere für die Orientierung in Gradienten des selektiven A_{2A} -Rezeptoragonisten CGS 21680 nicht nötig. Interessant ist jedoch, dass die durch Adenosin induzierte Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit sowohl durch die Anwesenheit von Rp-cAMPS als auch von KT 5720 unberührt bleibt.

Aus den Ergebnissen der Experimente mit dem A_{2A} -Rezeptoragonisten CGS 21680 muss man schließen, dass für die eigentliche Orientierungsreaktion, also die reine Änderung der Wachstumsrichtung, eine Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors ausreichend ist und diese Reaktion unabhängig von cAMP und der Protein Kinase A ist. Dass im Gegensatz dazu die Orientierung in Gradienten des natürlichen Agonisten Adenosin von der Protein Kinase A und ihrem Aktivator cAMP abhängig ist, könnte auf eine mögliche modulatorische Funktion der Protein Kinase A schließen lassen.

Eine vergleichbare Modulation durch dieses Enzym ist auch für das Richtungswachstum von Wachstumskegeln unter dem gleichzeitigen Einfluss attraktiver und repulsiver Lenkungsmoleküle beschrieben (Gallo und Letourneau, 2004). Dennoch muss man für den allein durch A_{2A} -Rezeptoraktivierung induzierten Signalweg eine cAMP- und Protein Kinase A-unabhängige Variante postulieren.

So wurden für Nervengewebe auch Signalwege beschrieben, die von der Protein Kinase C abhängig sind; dies gilt allerdings „nur“ für A_{2A} -Rezeptor vermittelte Abgabe von GABA und Acetylcholin (Fresco et al., 2004) und steht somit nicht in Zusammenhang mit neuronalem Wachstum. Eine Aktivierung der Phospholipase C durch A_{2A} -Rezeptoren wird ebenfalls postuliert (Fresco et al., 2004). Des Weiteren konnte in Herzmuskelzellen des Huhns ein cAMP unabhängiger, G_s -Protein vermittelter stimulatorischer Effekt in Folge einer A_{2A} -Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden (Liang und Morley, 1996). Interessant an dieser Arbeit ist, dass der stimulatorische Effekt nur zu beobachten ist, wenn der A_1 -Rezeptor geblockt wird. In diesem Fall ergibt sich, ähnlich wie bei dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekt, die Notwendigkeit der Modulation und der reziproken Verarbeitung verschiedener Signale durch die Aktivierung verschiedener Adenosinrezeptorsubtypen.

Im Zusammenhang mit dem Richtungswachstum von Wachstumskegeln konnte gezeigt werden, dass durch eine G_i -Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C durch die Aktivierung des $GABA_B$ -Rezeptors beeinflusst wird (Xiang et al., 2002). Ein weiterer denkbarer Weg der Signalweiterleitung ist eine Rezeptortransaktivierung. Der erste Beleg für die Orientierung neuronaler Wachstumskegel ist die positive Richtungsänderung in extrazellulären NGF-Gradienten (Gundersen und Barrett, 1979). Diese Reaktion wird über eine Rezeptortyrosinkinase vermittelt, und zwar über den TrkA-Rezeptor (Gallo et al., 1997). Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können Rezeptortyrosinkinasen aktivieren (Lee et al., 2002); eine Aktivierung des TrkA-Rezeptors in PC12-Zellen des TrkB-Rezeptors in Hippocampuszellen konnte durch Adenosin induziert werden und durch pharmakologische Experimente konnte gezeigt werden, dass dies über eine Aktivierung der A_{2A} -Rezeptoren erfolgt (Lee und Chao, 2001).

Ob dieser oder andere beschriebene Signalwege (oder die Kombination von ihnen) die in dieser Arbeit beobachtete Änderung der Wachstumsrichtung der Wachstumskegel bewirkt, kann erst durch weiterführende Arbeiten geklärt werden.

4.7 Mögliche physiologische Bedeutung

Bei der Komplexität, die dem in dieser Arbeit beobachteten Verhalten der Wachstumskegel zu Grunde liegt, bei dem Zusammenspiel verschiedener Rezeptoren für

ein und denselben Liganden, bei der Interaktion unterschiedlicher, sich zum Teil entgegengewirkender Signalketten, ist es schwer vorstellbar, dass es sich hierbei um einen Artefakt, also um eine zufällige, biologisch irrelevante Reaktion der Zellen handelt. Deshalb soll im Folgenden erörtert werden, wie solche Adenosingradienten im lebenden Organismus zustande kommen können.

4.8 Quellen für extrazelluläres Adenosin

Es gibt zwei generelle Mechanismen, anhand derer Adenosin in den extrazellulären Raum gelangen kann: Durch direkte Abgabe von Adenosin aus der Zelle oder indirekt durch Nucleotidabgabe und anschließenden Abbau zu Adenosin.

Adenosin wird durch Nucleosidtransporter über die Zellmembran transportiert (Cass et al., 1999; Cabrita et al., 2002) und diese spielen damit eine zentrale Rolle für die Regulation der extrazellulären Adenosinkonzentration (Noji et al., 2004). Diese Transporter werden aufgrund funktioneller und molekularer Unterschiede in zwei Kategorien unterteilt: Bidirektionale Transporter, die gemäß des Konzentrationsgradienten ein Gleichgewicht zwischen den beiden Kompartimenten einstellen, und Natriumantiporter, die einen Nucleosidtransport in Abhängigkeit eines Natriumgradienten bewirken und somit auch entgegen eines Adenosinkonzentrationsgefälles agieren können. Im Nervensystem scheint die erste Gruppe weiter verbreitet zu sein (Thorn Jarvis 96).

Die Neusynthese von Adenosin innerhalb der Zellen erfolgt in erster Linie aus S-Adenosylhomocystein durch eine entsprechende Hydrolase. Das gebildete Adenosin wird in der Regel anschließend weiter zu AMP phosphoryliert. Unter diesen Umständen steht die intrazelluläre Adenosinkonzentration in gewisser Weise unter enzymatischer Kontrolle und wird auf diese Weise niedrig gehalten (Noji et al., 2004). Die intrazelluläre Adenosinkonzentration liegt unter physiologischen Bedingungen mit etwa 50 nM deutlich unter der extrazellulären Konzentration, die in der Nähe von Synapsen bis zu 4 µM betragen kann (Cunha, 2001; Dunwiddie und Masino, 2001). Bei diesen Konzentrationsunterschieden ist ein Adenosintransport aus der Zelle heraus schwer vorstellbar. Vielmehr scheint es so, als dass anhand dieser Transporter die extrazellulären Nucleoside als Rohstoff für die intrazelluläre *de novo* Synthese der Nucleotide verfügbar gemacht werden können. Es kommt also zu einer Adenosinaufnahme und damit zu einer Verringerung der

extrazellulären Adenosinkonzentration. In Situationen, in denen die Zellen einen höheren Energiebedarf haben und somit auch größere Mengen ATP umsetzen, steigt die intrazelluläre Adenosinkonzentration deutlich an, was dann zu einem Adenosinausstrom über diese Nucleosidtransporter führt (Cunha, 2001).

Von größerer Bedeutung ist wohl der Nucleotidabbau als Quelle für extrazelluläres Adenosin. Mitte des letzten Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass die Enden sensorischer Nerven als Reaktion auf entsprechende Stimulation ATP abgeben (Holton, 1959). Wenige Jahre später wurde gezeigt, dass aus Fröschen isolierte Nervenzellen und Muskelgewebezellen in Folge elektrischer Stimulation ATP in den extrazellulären Raum freisetzen (Abood et al., 1962). Den eigentlichen Sinn und Zweck dieser ATP-Freisetzung konnten die Autoren allerdings nicht aufzeigen, wie Bodin und Burnstock in ihrem review belegen (Bodin und Burnstock, 2001). Erst etliche Jahre später wurde die Idee der Ko-transmission, also die gleichzeitige Abgabe verschiedener Neurotransmitter postuliert (Burnstock, 1976); dies kann heute als erwiesen angesehen werden (Zimmermann und Braun, 1996; Burnstock, 1999). Es konnten sogar schon definierte Mischungsverhältnisse von ATP und anderen Neurotransmittern in den Vesikeln bestimmt werden (Richardson und Brown, 1987). Auf diese Weise gelangen die Nucleotide aktivitätsabhängig in den extrazellulären Raum. Die exozytotische Abgabe von ATP stellt so auch die am weitesten verbreitete Art der ATP Freisetzung aus den Nervenzellen dar.

Sobald ATP in den extrazellulären Raum abgegeben wurde, wird es dort sehr schnell abgebaut (Sperlagh und Vizi, 1996). Aber auch andere Nucleotide werden von den Zellen abgegeben. So kann cAMP über entsprechende, energieabhängige Transporter nach außen abgegeben werden (Henderson und Strauss, 1991); dort wird es in AMP umgewandelt und dient so als zusätzliches Substrat für die entsprechenden abbauenden Enzyme (siehe unten).

Das extrazelluläre Kompartiment verfügt über eine erstaunliche Kapazität für die Hydrolyse von Nucleotiden, insbesondere von ATP. Verantwortlich hierfür sind so genannte Ecto-Nucleotidasen (Zimmermann, 2000). Hierbei handelt es sich um Membranproteine, deren katalytische Zentren dem extrazellulären Raum zugewandt sind. Die ersten Schritte des Nucleotidabbaus sind abhängig von Ecto-Nucleotidasen, Ecto-Phosphodiesterasen und Apyrasen, welche den Abbau der verschiedenen Adenin-Nucleotide zum 5'-AMP katalysieren, welches wiederum

von der 5'Ecto-Nucleotidase zur Adenosin dephosphoryliert wird. Die entsprechenden Enzyme sind hoch konserviert und kommen in nahezu allen Gewebetypen vor (Zimmermann und Braun, 1999).

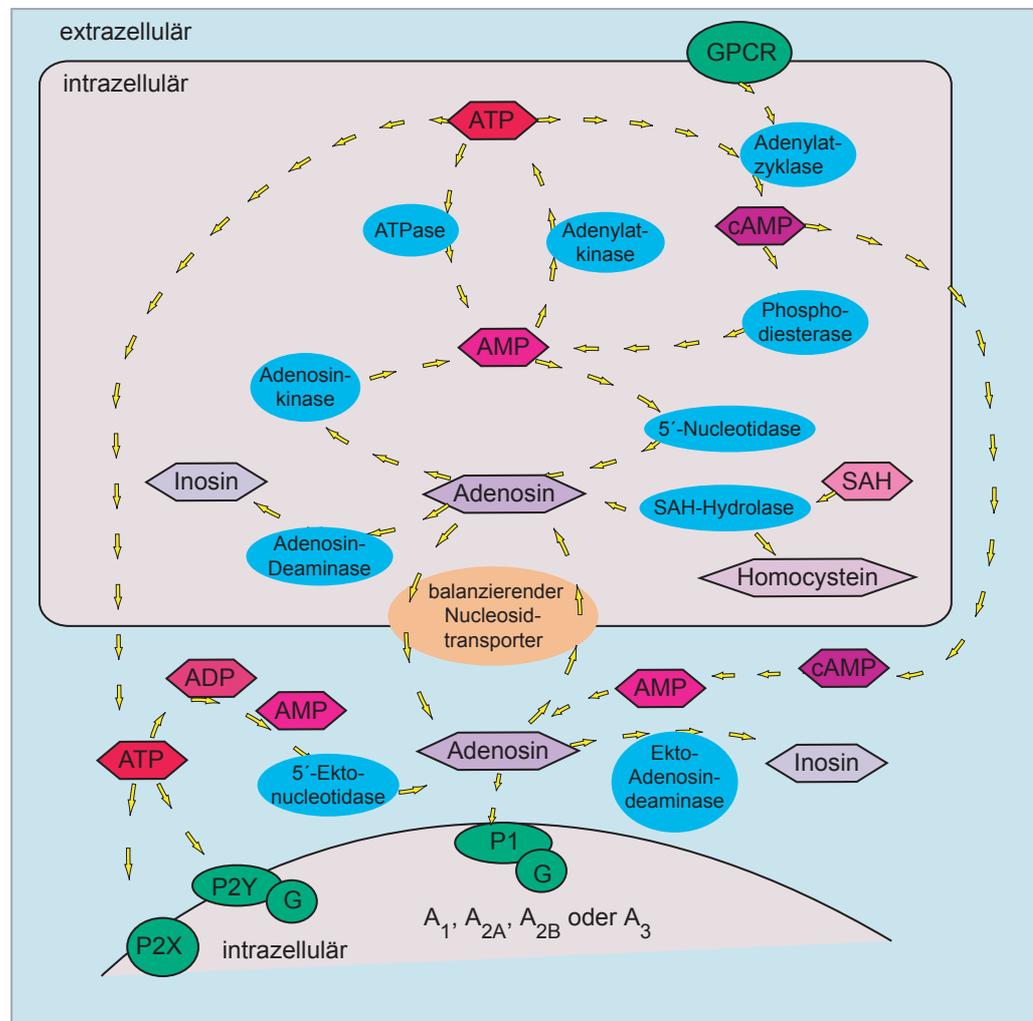


Abb. 43: Vereinfachte schematische Darstellung der intra- und extrazellulären Wege der Adenosinbildung und des Adenosinabbaus. Innerhalb der Zelle entsteht Adenosin unter anderem aus ATP und cAMP, außerhalb der Zelle über die gleichgewichtinstellenden Nucleosidtransporter und durch den Abbau der verschiedenen Nucleotide (SAH = S-Adenosylhomocystein; G = G-Protein; GPCR = G-Protein gekoppelter Rezeptor) (Sawynok und Liu, 2003).

Interessant ist, dass es bislang keinen Beleg für eine Nutzung der bei der Hydrolyse freigesetzten Energie gibt. Demnach muss man davon ausgehen, dass dieser rasante extrazelluläre Abbau einen Grund hat, der diese Energieverschwendung rechtfertigt.

Die abgegebenen Nucleotide haben in der Regel die Funktion extrazellulärer Signalstoffe, wie zum Beispiel ATP in seiner Funktion als Neurotransmitter und Neuromodulator. Den Ecto-Nucleotidasen kommen somit eigentlich zwei grundlegende Aufgaben zu: Zum einen wird durch sie die zeitlich-räumliche Aktivität dieser Substanzen begrenzt, das heißt durch den schnellen Abbau die Verfügbarkeit für den Rezeptor beschränkt und somit die Dauer und die Ausbreitung des Signals gesteuert. Dies ist auch insofern von großer Bedeutung, da die Nucleotide aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte nicht membrangängig sind, und somit extrazellulär abgebaut werden müssen, bevor sie wieder aufgenommen werden können. Gefördert wird dieser gezielte Abbau des Signals zusätzlich durch eine entsprechende Lokalisation der dephosphorylierenden Enzyme auf den Membranen. Zum anderen aber werden durch diesen Abbau natürlich die entsprechenden Nucleoside freigesetzt, die wie im Fall von Adenosin wiederum über entsprechende Rezeptoren neue Signalketten angestoßen.

4.9 Gibt es Adenosingradienten im Nervensystem?

Ausgehend von ATP als Quelle für extrazelluläres Adenosin ist die Entstehung entsprechender Konzentrationsgradienten durchaus denkbar und soll im Folgenden kurz skizziert werden. Von besonderer Bedeutung wäre hierbei der letzte Schritt der Abbaukaskade hin zum Adenosin, die Dephosphorylierung von AMP zu Adenosin. Dieser Schritt wird durch das Enzym 5'-Ectonucleotidase katalysiert und stellt die Reaktion dar, welche die Geschwindigkeit des ATP-Abbaus bestimmt. Die Rate, in der Adenosin durch Hydrolyse aus den Nucleotiden freigesetzt wird, ist strikt gekoppelt an die Konzentration von ATP und ADP, da diese Moleküle kompetitive Inhibitoren für das Enzym darstellen. Dies führt dazu, dass bei höherfrequenten Stimuli, die zu einer verstärkten ATP-Freisetzung führen, primär AMP angehäuft wird. Durch dessen Diffusion bildet sich zuerst ein entsprechender AMP-Gradient aus, der dann, nach Wegfall der ATP- und ADP-bedingten Inhibition der 5'-Ectonucleotidase zu Adenosin, abgebaut wird. Auf diese Weise entsteht ein Adenosingradient, wie er für die Orientierung von Wachstumskegeln genutzt werden könnte. Der „Vorgradient“ aus AMP gewinnt in Anbetracht der schnellen Aufnahme von Adenosin in die Zellen für die Ausbildung von einem Adenosingradienten an besonderer Bedeutung.

Tatsächlich konnten solche Gradienten im Hippocampus nachgewiesen werden (Cunha, 1997). Zum einen konnte hier durch den Vergleich der Adenosinkonzentrationen in aktiven glutamatergen Synapsen mit der umgebenen Flüssigkeit Konzentrationsgradienten infolge elektrischer Stimulation direkt nachgewiesen werden. Zum anderen wurde in dieser Arbeit die Entstehung von Adenosingradienten nach dem oben beschriebenen Muster an cholinergen Nervenenden im Hippocampus postuliert.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit handelt es sich um reine *in vitro* Untersuchungen. Sie sind demnach relativ weit entfernt von physiologischen Bedingungen und noch weiter entfernt von Reaktionen im lebenden Tier; somit kann über den möglichen Sinn und Zweck dieses Befundes nur spekuliert werden. Aus den möglichen Quellen für extrazelluläres Adenosin und der Existenz von Konzentrationsgradienten lassen sich jedoch einige potentielle Funktionen der beobachteten Reaktion ableiten.

4.10 Möglicher Beitrag zur Regeneration

Nach Verletzung von Zellen kommt es zu einer massiven Freisetzung von Adenosin, die direkt und indirekt sein kann (Rathbone et al., 1999). Unter widrigen Bedingungen, wie Ischämie, Hypoxie, Trauma, Apoplexia und Entzündungen, um nur einige zu nennen (Ralevic und Burnstock, 1998), steigt die extrazelluläre Adenosinkonzentration in verschiedenen Geweben deutlich an. Gemein haben diese Situationen einen erhöhten Energiebedarf der Zellen und damit einhergehend eine reduzierte Verfügbarkeit an Sauerstoff; sie stellen also einen metabolischen Stresszustand für die Zellen dar. Hauptquelle für Adenosin ist hier der Abbau von ATP (Kowaluk et al., 1998; Latini und Pedata, 2001), der sowohl in den Zellen als auch im extrazellulären Raum stattfindet. Unter diesen Bedingungen ist auch die Aktivität der 5'-Nucleotidase gesteigert (Johnson et al., 1999), was die Bildung von Adenosin zusätzlich unterstützt. In diesem Zusammenhang ist es also denkbar, dass Adenosin als Stresssignal gleichzeitig einen Wegweiser für die nachfolgende Regeneration darstellt. Dies setzt natürlich voraus, dass die dabei beteiligten Neurone auch über die nötige Rezeptorausstattung verfügen.

4.11 Möglicher Beitrag zur Entwicklung

Es gibt zunehmend Indizien für eine Beteiligung elektrischer Aktivität bei der Wegfindung neuronaler Fortsätze (Zhang und Poo, 2001). Die von Cunha (2001) beschriebene Ausbildung von Adenosingradienten im Hippocampus erfolgte ebenfalls durch elektrische Stimulation. ATP wird aufgrund seiner Funktion als Neurotransmitter und Neuromodulator infolge von erhöhter Aktivität verstärkt abgegeben. Zusätzlich dazu kann dies jedoch auch durch elektrische Stimulation induziert werden. Das abgegebene ATP wird dann, wie oben beschrieben, zu Adenosin abgebaut. Interessant ist in diesem Zusammenhang die verstärkte Expression der 5'-Ectonucleotidase während der Entwicklung des Nervensystems (Zimmermann, 1996). Zusätzlich dazu binden die 5'-Nucleotidase auch an Proteine der extrazellulären Matrix und könnten auf diese Weise eine Art Strasse bilden um so andere Lenkungsmechanismen zu unterstützen. Adenosin scheint auf jeden Fall der ideale Vermittler für solche aktivitätsabhängige Prozesse.

Abschließend muss jedoch gesagt werden, dass nicht sichergestellt werden kann, ob der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt auch in anderen Zellsystemen auftritt. Dass Adenosin als Lenkungsmolekül von großer Bedeutung sein könnte, steht außer Frage. Auf jeden Fall müssen weitere Arbeiten dieser wichtigen Frage nachgehen.

5 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass extrazelluläre ATP-Gradienten das Richtungswachstum neuronaler Wachstumskegel beeinflussen. Es ist aber auch bekannt, dass ATP im extrazellulären Raum sehr schnell abgebaut wird; der Abbau erfolgt dabei durch Ectonucleotidasen über ADP, AMP hin zum Adenosin. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass diesen Abbauprodukten, insbesondere dem Adenosin, eine größere physiologische Bedeutung zukommt, als es von ATP angenommen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss dieser purinergen Substanzen auf das Wachstum neuronaler Wachstumskegel untersucht. Als Objekt dienten die Wachstumskegel sensorischer Neurone des Haushuhns. Hierbei wurden verschiedene Aspekte behandelt:

- **Interne Mechanismen des Wachstums neuronaler Wachstumskegel.**

Grundlage der Bewegung der Wachstumskegel ist ein Umbau ihres Zytoskeletts. Durch semiquantitative Analyse des F-Aktins einzelner Wachstumskegel konnte die Wirkung der verschiedenen Substanzen auf Populationen von Wachstumskegeln analysiert werden. Diese Experimente zeigten, dass Adenosin einen positiven Einfluss auf den Gehalt und die Dichte des F-Aktins hat, der vergleichbar mit dem Effekt von ATP und NGF ist. Durch Versuche mit verschiedenen Adenosinrezeptoragonisten und -antagonisten konnte weiter gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen rezeptorvermittelten Effekt handelt. Experimente mit verschiedenen Pharmaka (wie cAMP-Antagonisten und Protein Kinase A Inhibitoren) belegen den Einfluss von cAMP und der Protein Kinase A auf den F-Aktinhaushalt der Wachstumskegel.

- **Selektive Beeinflussung von Wachstumsrichtung und Wachstumsgeschwindigkeit.**

In Orientierungsexperimenten erwies sich, dass sich das Richtungswachstum der Wachstumskegel durch geeignete extrazelluläre Konzentrationsgradienten von ATP oder Adenosin beeinflussen lässt, nicht aber durch solche von ADP oder AMP. Des Weiteren führten diese Experimente zu dem Schluss, dass durch Adenosin auch die Wachstumsgeschwindigkeit gesteigert wird. In Experimenten mit verschiedenen Adenosinrezeptoragonisten und -antagonisten konnte gezeigt werden,

dass diese Änderung der Wachstumsrichtung wahrscheinlich durch Aktivierung der Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren induziert wird. Interessanterweise führt jedoch die Aktivierung der Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren allein nicht zu einer Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit. Es konnte zudem gezeigt werden, dass bei der Orientierung in Adenosingradienten, bei der wahrscheinlich verschiedene Adenosinrezeptorsubtypen aktiviert werden, cAMP und die Protein Kinase A involviert sind; jedoch sind diese nicht an der Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit beteiligt. Bei der alleinigen Aktivierung der Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren nimmt die Protein Kinase A keinen Einfluß auf eine Änderung der Wachstumsrichtung.

- **Bedeutung der Form des Konzentrationsgradienten.**

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ergab sich, dass die Form des Konzentrationsgradienten von entscheidender Bedeutung für die Orientierungsreaktion ist. Deshalb war ein weiterer Bestandteil der Arbeit die eingehende Untersuchung der Konzentrationsgradienten. Es konnte gezeigt werden, dass für die Adenosinrezeptor-vermittelte Änderung der Wachstumsrichtung Gradienten sehr niedriger Konzentration notwendig sind; dies könnte mit ein Grund für die Abweichung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von denen anderer Arbeitsgruppen sein.

- **Nachweis und Bedeutung von Adenosin als Richtungswachstumsfaktor.**

Als Konsequenz der durchgeführten Experimente muss Adenosin der Liste der Substanzen, die das Richtungswachstum neuronaler Wachstumskegel beeinflussen, hinzugefügt werden. Dieser Stoff könnte, nicht zuletzt aufgrund der Ausschüttung von ATP, infolge neuronaler Aktivität, und dessen nachfolgendem Abbau zu Adenosin von weitreichender Bedeutung sein. Der Beitrag elektrischer Aktivität an der Wegfindung von Neuriten ist nicht endgültig belegt, Adenosin scheint jedoch ein idealer Vermittler für solche Effekte zu sein.

6 Literatur

- Abood LG, Koketsu K, Miyamoto S (1962) Outflux of various phosphates during membrane depolarization of excitable tissues. *Am J Physiol* 202:469-474.
- Akbar M, Okajima F, Tomura H, Shimegi S, Kondo Y (1994) A single species of A1 adenosine receptor expressed in Chinese hamster ovary cells not only inhibits cAMP accumulation but also stimulates phospholipase C and arachidonate release. *Mol Pharmacol* 45:1036-1042.
- Axelrod D (2001) Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives. *J Biomed Opt* 6:6-13.
- Bagnard D, Thomasset N, Lohrum M, Puschel AW, Bolz J (2000) Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *J Neurosci* 20:1030-1035.
- Barak LS, Yocum RR, Nothnagel EA, Webb WW (1980) Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phalloidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:980-984.
- Bartl E (2002) Untersuchungen zum Einfluss des Adenosins auf das Zytoskelett der Spinalganglienzellen des Haushuhns. In: *BioImaging Zentrum*. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Bellairs R, Osmond M (1988) *The Atlas of Chick Development*. London: Academic Press.
- Bhat SV (1993) Forskolin and congeners. *Fortschr Chem Org Naturst* 62:1-74.
- Bodin P, Burnstock G (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26:959-969.
- Bonhoeffer T (1996) Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* 6:119-126.
- Botelho LHP, Rothermel JD, Coombs RV, Jastorff B (1988) cAMP analog antagonists of cAMP action. *Methods in Enzymology* 159:159-172.

- Brackett LE, Daly JW (1994) Functional characterization of the A2b adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochemical Pharmacology* 47:801-814.
- Bronstein IN, Semendjajew KA (1987) Taschenbuch der Mathematik, 23. Edition. Thun und Frankfurt/Main: Verlag Harri Deutsch.
- Buettner HM, Pittman RN, Ivins JK (1994) A model of neurite extension across regions of nonpermissive substrate: simulations based on experimental measurement of growth cone motility and filopodial dynamics. *Dev Biol* 163:407-422.
- Burnstock G (1976) Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1:239-248.
- Burnstock G (1999) Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull* 50:355-357.
- Cabrita MA, Baldwin SA, Young JD, Cass CE (2002) Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem Cell Biol* 80:623-638.
- Cass CE, Young JD, Baldwin SA, Cabrita MA, Graham KA, Griffiths M, Jennings LL, Mackey JR, Ng AM, Ritzel MW, Vickers MF, Yao SY (1999) Nucleoside transporters of mammalian cells. *Pharm Biotechnol* 12:313-352.
- Crank J (1975) *The mathematics of diffusion*, 2d Edition. Oxford, [Eng]: Clarendon Press.
- Culotti JG, Kolodkin AL (1996) Functions of netrins and semaphorins in axon guidance. *Curr Opin Neurobiol* 6:81-88.
- Cunha RA (1997) Release of ATP and adenosine and formation of extracellular adenosine in the hippocampus. In: *The role of adenosine in the nervous system* (Okada Y, ed), pp 135-142. Amsterdam; New York: Elsevier.
- Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38:107-125.

- Denk W, Delaney KR, Gelperin A, Kleinfeld D, Strowbridge BW, Tank DW, Yuste R (1994) Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *J-Neurosci-Methods* 54:151-162.
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.
- Devreotes PN, Zigmond SH (1988) Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Annu Rev Cell Biol* 4:649-686.
- Dickson BJ (2001) Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 11:103-110.
- Dontchev VD, Letourneau PC (2003) Growth cones integrate signaling from multiple guidance cues. *J Histochem Cytochem* 51:435-444.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.
- Einstein A (1956) *Investigations on the theory of the Brownian movement*. New York: Dover Publications.
- Engel J, Fasold H, Hulla FW, Waechter F, Wegner A (1977) The polymerization reaction of muscle actin. *Mol Cell Biochem* 18:3-13.
- Fan J, Mansfield SG, Redmond T, Gordon Weeks PR, Raper JA (1993) The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J Cell Biol* 121:867-878.
- Feoktistov I, Murray JJ, Biaggioni I (1994) Positive modulation of intracellular Ca^{2+} levels by adenosine A_{2b} receptors, prostacyclin, and prostaglandin E1 via a cholera toxin-sensitive mechanism in human erythroleukemia cells. *Mol Pharmacol* 45:1160-1167.
- Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, Biaggioni I (2002) Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A_{2B} receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res* 90:531-538.

- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527-552.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Michael W (1994) VI. Nomenclature and Classification of Purinoceptors*. *Pharmacological Reviews* 46:143-156.
- Freissmuth M, Selzer E, Schutz W (1991) Interactions of purified bovine brain A₁-adenosine receptors with G-proteins. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding. *Biochem J* 275 (Pt 3):651-656.
- Fresco P, Diniz C, Goncalves J (2004) Facilitation of noradrenaline release by activation of adenosine A_{2A} receptors triggers both phospholipase C and adenylyl cyclase pathways in rat tail artery. *Cardiovasc Res* 63:739-746.
- Fu WM, Tang YB, Lee KF (1997) Turning of nerve growth cones induced by the activation of protein kinase C. *Neuroreport* 8:2005-2009.
- Gallo G, Letourneau P (2002) Axon guidance: proteins turnover in turning growth cones. *Current Biology: CB* 12:R560.
- Gallo G, Letourneau PC (2004) Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol* 58:92-102.
- Gallo G, Lefcort FB, Letourneau PC (1997) The trkA receptor mediates growth cone turning toward a localized source of nerve growth factor. *J Neurosci* 17:5445-5454.
- Goodhill GJ (1998) Mathematical guidance for axons. *Trends Neurosci* 21:226-231.
- Goodhill GJ, Urbach JS (1999) Theoretical analysis of gradient detection by growth cones. *J Neurobiol* 41:230-241.
- Goodman CS (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci* 19:341-377.

- Grau B (2000) Eine Methode der halbquantitativen Bestimmung des F-Aktins in subzellulären Kompartimenten. In: Fakultät für Biologie. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Grau B, Steinhaus S, Munck S, Lücker S, Uhl R, Harz H (2001) Purinergic compounds affect the F-actin content of sensory neurons. In: Proceedings of the 4th Meeting of the German Neuroscience Society 2001; 28th Göttingen Neurobiology Conference 2001 (Elsner N KW, ed), p 947. Göttingen: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Gundersen RW, Barrett JN (1979) Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science* 206:1079-1080.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Henderson GB, Strauss BP (1991) Evidence for cAMP and cholate extrusion in C6 rat glioma cells by a common anion efflux pump. *J Biol Chem* 266:1641-1645.
- Henley J, Poo M-m (2004) Guiding neuronal growth cones using Ca^{2+} signals. *Trends in Cell Biology* 14:320-330.
- Holton P (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145:494-504.
- Höpker VH, Saffrey MJ, Burnstock G (1996) Neurite outgrowth of striatal neurons in vitro: involvement of purines in the growth-promoting effect of myenteric plexus explants. *Int J Dev Neurosci* 14:439-451.
- Isbister CM, Mackenzie PJ, To KCW, O'Connor TP (2003) Gradient steepness influences the pathfinding decisions of neuronal growth cones in vivo. *Journal of Neuroscience* 23:193-202.
- Jarvis MF, Schulz R, Hutchison AJ, Do UH, Sills MA, Williams M (1989) [3H]CGS 21680, a selective A_2 adenosine receptor agonist directly labels A_2 receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 251:888-893.

- Johnson SM, Patel S, Bruckner FE, Collins DA (1999) 5'-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 38:391-396.
- Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, Takahashi M, Murakata C, Sato A, Kaneko M (1987) K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 142:436-440.
- Kater SB, Rehder V (1995) The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr Opin Neurobiol* 5:68-74.
- Klotz KN (2000) Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:382-391.
- Kowaluk EA, Bhagwat SS, Jarvis MF (1998) Adenosine kinase inhibitors. *Curr Pharm Des* 4:403-416.
- Kramer M (2004) Photonik.
- Kull B, Svenningsson P, Fredholm BB (2000) Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol Pharmacol* 58:771-777.
- Landis SC (1983) Neuronal Growth Cones. *Annual Review of Physiology* 45:567-580.
- Lankford KL, DeMello FG, Klein WL (1988) D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4567-4571.
- Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79:463-484.
- Lee FS, Chao MV (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3555-3560.
- Lee FS, Rajagopal R, Chao MV (2002) Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:11-17.

- Levi-Montalcini R (1986) The Nerve Growth Factor: Thirty-Five Years Later. In: Nobel Lecture.
- Liang BT, Haltiwanger B (1995) Adenosine A2a and A2b receptors in cultured fetal chick heart cells. High- and low-affinity coupling to stimulation of myocyte contractility and cAMP accumulation. *Circulation Research* 76:242-251.
- Liang BT, Morley JF (1996) A new cyclic AMP-independent, Gs-mediated stimulatory mechanism via the adenosine A2a receptor in the intact cardiac cell. *J Biol Chem* 271:18678-18685.
- Lin CH, Forscher P (1995) Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* 14:763-771.
- Lin CH, Thompson CA, Forscher P (1994) Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility [published erratum appears in *Curr Opin Neurobiol* 1995 Feb;5(1):112]. *Curr Opin Neurobiol* 4:640-647.
- Lohof AM, Quillan M, Dan Y, Poo MM (1992) Asymmetric modulation of cytosolic cAMP activity induces growth cone turning. *J Neurosci* 12:1253-1261.
- Londos C, Cooper DM, Wolff J (1980) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:2551-2554.
- MacLennan AJ, McLaurin DL, Marks L, Vinson EN, Pfeifer M, Szulc SV, Heaton MB, Lee N (1997) Immunohistochemical localization of netrin-1 in the embryonic chick nervous system. *J Neurosci* 17:5466-5479.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annual Review Of Neuroscience* 22:295-318.
- McEwen BS, Chattarji S (2004) Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. *European Neuropsychopharmacology: The Journal Of The European College Of Neuropsychopharmacology* 14:S497-S502.
- Messler P, Harz H, Uhl R (1996) Instrumentation for multiwavelengths excitation imaging. *J Neurosci Methods* 69:137-147.

- Ming G, Henley J, Tessier Lavigne M, Song H, Poo M (2001) Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* 29:441-452.
- Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM (1997) cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19:1225-1235.
- Mitchison TJ, Cramer LP (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84:371-379.
- Mueller BK (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* 22:351-388.
- Munck S (1999) Wachstum und calciumtransienten in Spinalnervneuronen von Gallus Gallus. In: Botanisches Institut. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Munck S, Bedner P, Bottaro T, Harz H (2004) Spatiotemporal properties of cytoplasmic cyclic AMP gradients can alter the turning behaviour of neuronal growth cones. *Eur J Neurosci* 19:791-797.
- Noji T, Karasawa A, Kusaka H (2004) Adenosine uptake inhibitors. *Eur J Pharmacol* 495:1-16.
- North RA, Barnard EA (1997) Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol* 7:346-357.
- Numberger M, Graguhn A (1996) Patch-Clamp-Technik. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Offermanns S, Simon MI (1995) G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem* 270:15175-15180.
- Ongini E, Dionisotti S, Gessi S, Irenius E, Fredholm BB (1999) Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359:7-10.
- Palmer TM, Gettys TW, Stiles GL (1995) Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J Biol Chem* 270:16895-16902.

- Paves H, Saarma M (1997) Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons. *Cell Tissue Res* 290:285-297.
- Postma M, Van Haastert PJ (2001) A diffusion-translocation model for gradient sensing by chemotactic cells. *Biophys J* 81:1314-1323.
- Postma M, Bosgraaf L, Looovers HM, Van Haastert PJ (2004) Chemotaxis: signaling modules join hands at front and tail. *EMBO Rep* 5:35-40.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 50:413-492.
- Ramón y Cajal S (1906) The structure and connexions of neurons. In: Nobel Lecture.
- Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 59:663-690.
- Reshkin SJ, Guerra L, Bagorda A, Debellis L, Cardone R, Li AH, Jacobson KA, Casavola V (2000) Activation of A(3) adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in A(6) cells. *J Membr Biol* 178:103-113.
- Richardson PJ, Brown SJ (1987) ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem* 48:622-630.
- Rüsse E (1991) *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Hamburg: Paul Parey Verlag.
- Sawynok J, Liu XJ (2003) Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol* 69:313-340.
- Schäfer KH, Saffrey MJ, Burnstock G (1995) Trophic actions of 2-chloroadenosine and bFGF on cultured myenteric neurones. *Neuroreport* 6:937-941.
- Schmidt A, Hall MN (1998) Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:305-338.
- Schulte G, Fredholm BB (2003) Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 15:813-827.

- Skaper SD, Moore SE, Walsh FS (2001) Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog Neurobiol* 65:593-608.
- Skaper SD, Facci L, Milani D, Leon A, Toffano G (1990) Culture and use of primary and clonal neural cells. In: *Cell Culture* (M.P. C, ed), pp 17-33. New York: Academic Press.
- Song H, Poo M (2001) The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* 3:E81-88.
- Song HJ, Ming GL, Poo MM (1997) cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388:275-279.
- Sperlagh B, Vizi SE (1996) Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Seminars in Neuroscience* 8:175-186.
- Stein E, Zou Y, Poo M, Tessier-Lavigne M (2001) Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science* 291:1976-1982.
- Steinhaus S (2000) Der Einfluss chemotropher Substanzen auf den F-Actingehalt und das Wachstum neuronaler Wachstumskegel. In: *Fakultät für Biologie. München: Ludwig-Maximilians-Universität.*
- Stock AM, Mowbray SL (1995) Bacterial chemotaxis: a field in motion. *Curr Opin Struct Biol* 5:744-751.
- Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53:450-490.
- Strasser GA, Rahim NA, VanderWaal KE, Gertler FB, Lanier LM (2004) Arp2/3 Is a Negative Regulator of Growth Cone Translocation. *Neuron* 43:81-94.
- Suter DM, Forscher P (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 8:106-116.
- Tessier Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.

- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (2000) Regeneration in the Nogo zone. *Science* 287:813-814.
- Turner CE (2000) Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature Cell Biology* 2:E231-E236.
- Tuttle R, O'Leary DD (1998) Neurotrophins rapidly modulate growth cone response to the axon guidance molecule, collapsin-1. *Molecular and Cellular Neurosciences* 11:1-8.
- Weber E (1986) *Grundriss der biologischen Statistik*, 9. Edition. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Weiner OD (2002) Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Current Opinion in Cell Biology* 14:196-202.
- Welch MD, Mallavarapu A, Rosenblatt J, Mitchison TJ (1997) Actin dynamics in vivo. *Curr Opin Cell Biol* 9:54-61.
- Xiang Y, Li Y, Zhang Z, Cui K, Wang S, Yuan XB, Wu CP, Poo MM, Duan S (2002) Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat Neurosci* 5:843-848.
- Zhang LI, Poo MM (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1207-1214.
- Zheng JQ, Poo MM, Connor JA (1996) Calcium and chemotropic turning of nerve growth cones. *Perspect Dev Neurobiol* 4:205-213.
- Zheng JQ, Felder M, Connor JA, Poo MM (1994) Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 368:140-144.
- Zimmermann H (1996) Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 49:589-618.
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:299-309.
- Zimmermann H, Braun N (1996) Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. *J Auton Pharmacol* 16:397-400.

Zimmermann H, Braun N (1999) Ecto-nucleotidases-molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res* 120:371-385.

7 Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Benjamin Filip Grau
 Adresse: Nadistraße 137/10
 80809 München
 Telefon: +49 173 8764846
 E-Mail: grau@biz.uni-muenchen.de
 Geburtsdatum: 01. Dezember 1974
 Geburtsort: München
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig



Schulbildung:

1981 – 1985 Grundschule, Nadischule München
 1985 – 1994 Gymnasium, Städtisches Luisengymnasium München
 Abschluss: Abitur

Akademische Bildung:

1995 – 2000 1995-2000 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Abschluss: Diplombiologe
 Prüfungsfächer: Pharmakologie / Toxikologie, Physiologische Botanik, Ökologie, Systematische Botanik
 Forschungsreisen nach Namibia und Chile
 seit 2000 Doktorarbeit in Neurobiologie in dem Thema „Identifikation neuer orientierender Substanzen im sensorischen Nervensystem“

Akademische Bildung:

1999 Mitarbeit im Institut für Pharmazeutische Biologie der LMU, Isolation und toxikologische Untersuchungen an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen
 seit 1999 Freie Mitarbeit in der Firma Parabits, München im Bereich Systemplanung, Netzwerkadministration und Installation
 seit 2000 Netzwerkadministration für den Bereich Apple Macintosh am Department Biologie 1 der LMU
 seit 2000 Tätigkeit als Resident Engineer für die Firma TILL Photonics, Gräfelfing

Akademische Bildung:

seit 2001	Systemadministrator am BioImaging Zentrum der LMU
seit 2001	Reorganisation und Gestaltung der Webseiten des Department Biologie 1 der LMU
seit 2004	Beauftragter für Biologische Sicherheit gemäß GenTG § 3 am BioImaging Zentrum der LMU

Sprachkenntnisse:

Deutsch	Muttersprache
Englisch	gut
Spanisch	gut

Computerkenntnisse:

Betriebssysteme	Mac OS, Windows, Unix (Grundlagen)
Programme	unter anderem Office, Photoshop, Illustrator, GoLive