



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

DISSERTATION



# Die autokrine Wachstumsregulation sensorischer Neuronen von *Gallus gallus*

Dissertation  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Anja Diana Werner**

München im Juni 2016



Diese Dissertation wurde angefertigt  
unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Uhl  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstgutachter: Prof. Dr. Rainer Uhl

Zweitgutachter: PD Dr. Martin Heß

Tag der Abgabe: 2. Juni 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Dezember 2016

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist. Hiermit erkläre ich weiter, dass diese Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist. Ich habe mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen.

München, den 11. Januar 2017

Anja Diana Werner

*"When you have excluded the  
impossible, whatever remains,  
however improbable, must be the  
truth."*

Sherlock Holmes

## Abstract

The tip of a growing axon is known as growth cone. This dynamic structure controls the elongation and steering of neuronal processes. Guidance molecules, which include extracellular purines like adenosine, affect a wide range of neuronal signaling pathways, which often take place in the growth cone.

This study is aimed to investigate the effects of stimulation and inhibition of adenosine receptors on the growth of neuronal processes of neurites from sensory neurons. To this end dorsal root ganglia were explanted from chicken embryos and neuronal elongation was further investigated.

Here I demonstrate a connection between stimulation and inhibition of the adenosine  $A_{2a}$  receptor and the regulation of neurite elongation. Different experiments, with specific agonists and antagonists for all known adenosine receptors ( $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$ ,  $A_3$ ), show that overall elongation is significantly affected only by  $A_{2a}$  selective compounds. Further immune-histochemical data show that  $A_{2a}$  receptors are present on the investigated growth cones. Apparently the activation of  $A_{2a}$  receptors stimulates neurite elongation whereas the inhibition of this receptor type impedes neurite growth. This finding is supported by experiments with adenosine deaminase, an enzyme which irreversibly deaminates adenosine and acts on neurite elongation like a pharmacological block of  $A_{2a}$  receptors.

Data of this thesis strongly indicate that adenosine provided by the cells themselves affect neurite elongation. This leads to the question if adenosine or adenine nucleotides are released by sensory neurons from chicken dorsal root ganglia. The release of adenine nucleotides like ATP is more likely than the release of adenosine itself. This hypothesis is firstly based on the presence of quinacrine positive vesicular structures of sensory neurons. Quinacrine is a marker for releasable ATP vesicles. Secondly, the inhibition of ectonucleotidases with ARL 67156 slowed the neurite elongation of sensory neurons. Ectonucleotidases are a family of nucleotide metabolizing enzymes, which break down nucleotides to nucleosides.



A recent publication of another group showed that the activation state of the  $A_{2a}$  receptor affects neurite growth in primary cortical neurons. This independent study together with the findings of this thesis shows that the  $A_{2a}$  receptor activation takes part in the regulation of neuronal elongation.

The growth of neuronal processes is the basis of all neuronal connections. There is still a long way to go to fully understand this process. This thesis contributes a small piece of information to a better understanding of the development and regeneration of neuronal systems.

# Inhalt

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	18
2.1 Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Stammlösungen und Medien	18
2.1.1 Lösungsmittel	18
2.1.2 Stammlösungen und Puffer	19
2.1.3 Beschichtungslösung	23
2.1.4 Zellkulturmedium	24
2.1.5 Agonisten und Antagonisten	25
2.1.6 Färbelösung	27
2.1.7 Antikörperfärbung	28
2.1.8 Verwendeter Vektor	29
2.2 Neuronale Zellkultur	30
2.2.1 Herstellung und Beschichtung der Zellkulturschalen	30
2.2.2 Herstellung von silikonisierten Pasteur-Pipetten	31
2.2.3 Bebrütung und Lagerung der Eier	32
2.2.4 Präparation der Spinalnervenneurone	32
2.2.5 Dissoziation präparierter Hühner-Neurone	34
2.2.6 Selektion neuronaler Zellen	34
2.2.7 Aussähen der Zellen	35
2.2.8 Anwachsen und Fixation dissoziierter Neurone	36
2.2.9 Ganglion-Explantate	37
2.3 HEK 293 Zellkultur	38
2.3.1 Auftauen von Zellen	38
2.3.2 Kultivieren von HEK293	39
2.3.3 Aussähen und transfizieren von HEK293	40
2.4 Färbungen	41
2.4.1 Neurofilamentfärbung	41
2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung	42
2.4.3 Doppelfärbung mit Quinacrin und Fura2-AM	44
2.4.4 Doppelfärbung MitoTracker® und Quinacrin	45
2.4.5 Dreifachfärbung mit LysoTracker®, MitoTracker® und HOECHST	46

2.5	Verwendete Messsysteme	47
2.5.1	Neuritenwachstum	47
2.5.2	Live-Cell-Imaging	48
2.5.3	Epifluoreszenzmessungen	50
2.6	Versuchsablauf	51
2.7	Auswertung der Bilder	52
2.8	Auswertmethode	53
2.9	Verwendete Software	53
3.	Ergebnisse	54
3.1	Meß- und Modellsystem	54
3.1.1	Auswahl und Etablierung des Meßsystems	54
3.1.2	Modellsystem Hühnerembryo	57
3.2	Untersuchung der beteiligten Rezeptoren am Wachstum sensorischer Neurone	60
3.2.1	Einfluss des A <sub>2a</sub> -Rezeptors auf das Wachstum sensorischer Neurone	60
3.2.2	Einfluss des A <sub>2b</sub> -Rezeptors auf das Wachstum sensorischer Neurone	67
3.2.3	Einfluss des A <sub>1</sub> -Rezeptors auf das Wachstum sensorischer Neurone	72
3.2.4	Einfluss des A <sub>3</sub> -Rezeptors auf das Wachstum sensorischer Neurone	75
3.2.5	Zusammenfassung der Adenosinrezeptoren	80
3.3	Immunhistologischer Nachweis des A <sub>2a</sub> -Rezeptors	83
3.4	Einfluss eines Adenosin bzw ATP abbauenden Enzyms und eines Ektonukleotidase-Inhibitors auf das Wachstum sensorischer Neurone	85
3.4.1	Aktiver Adenosinabbau durch die Zugabe des Enzyms Adenosin Desaminase	86
3.4.2	Aktiver ATP Abbau durch die Zugabe des Enzyms Apyrase	89
3.4.3	Einfluss des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL67156 auf das Wachstum sensorischer Neurone	91
3.4.4	Zusammenfassung von Adenosin Desaminase, Apyrase und ARL67156	93
3.5	ATP-Vesikelfärbung	96

4. Diskussion	99
4.1 Verwendete Agonisten und Antagonisten	102
4.2 Einfluss des Adenosinrezeptors A <sub>2a</sub> auf das Wachstum neuronaler Fortsätze dorsaler Hinterwurzelganglien	108
4.3 Immunohistochemischer Nachweis des A <sub>2a</sub> -Adenosinrezeptors	111
4.4 Der Einfluss des A <sub>2b</sub> -Adenosinrezeptors auf das Wachstum neuronaler Zellen dorsaler Hinterwurzelganglien	111
4.5 Der Einfluss des A <sub>1</sub> - und A <sub>3</sub> -Adenosinrezeptors auf das Wachstum neuronaler Zellen dorsaler Hinterwurzelganglien	115
4.6 Ist ein autokriner Mechanismus für die Aktivierung des A <sub>2a</sub> -Adenosinrezeptors verantwortlich?	116
4.7 Woher stammt das Adenosin, das die Adenosinrezeptoren aktiviert?	119
4.8 Inhibieren des ATP-Abbaus durch den unspezifischen Ektonukleotidaseninhibitor ARL67156	122
4.9 Am Wachstum von neuronalen Zellen beteiligte Rezeptoren und mögliche weiterführende Signalketten	124
4.10 Ausblick auf weitere Arbeiten	127
4.11 Physiologische Bedeutung	132
5. Zusammenfassung	133
6. Modell des autokrinen Adenosin-Loop	136
7. Literatur	138
8. Anhang	147

# Abkürzungsverzeichnis

## Allgemeine Abkürzungen

ADA	Adenosin Desaminase
ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APs/ALPs	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriophosphat
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
CAM	Zelladhäsionsmoleküle
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD39	Nukleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
CD73	ecto-5'-nukleotidase
CFP	cyan fluorescent protein
CMP	Cytidin-5'-phosphat
CNT	konzentrativ(e) Nucleosidtransporter (eng.: concentrative nucleoside transporter)
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	dorsal root ganglion
E5NT	ecto-5'-nukleotidase
ECM	extrazellulären Matrix
ENT	equilibrativen Nucleosid-Transporter
E-NTPDase	Ekto-nukleoside triphosphate diphosphohydrolases
ERK	extracellular signal-regulated protein kinases

F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATPase	Enzym ATP-Synthase / Transmembranprotein
FDA	Food and Drug Administration
FCS	fetal calf serum
FPR	Formylpeptidrezeptors
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G protein-coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
HANKS	Hanks balanced salt solution ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
IMP	Inosin-5'-monophosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LGICS	Ionenkanal-Rezeptoren (engl. Ligand-gated ion channels)
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
MAG	Myelin-assoziiertes-Glykoprotein
MAPK	mitogen-aktivierten Proteinkinasen
MPI	myocardial perfusion imaging
NADP	Nicotinamadenindinucleotidphosphat
NADPH	reduzierte Form von Nicotinamadenindinucleotidphosphat
NCAM	neural cell adhesion molecule
NGF	7s Nerve Growth Factor
NPPDase	Nukleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
NTPDase	Nukleoside triphosphate diphosphohydrolases
PBS	Phosphat-gepufferte Saline

PBST	Phosphat-gepufferte Saline Tween-20
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Antibiotikastammlösung
PNS / ZNS	peripheres / zentrales Nervensystem
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
rcf	Relative centrifugal force
rpm	Revolutions per minute
SCG	superior cervical ganglion
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
UMP	Uridinmonophosphat
YFP	yellow fluorescent protein

## Abkürzungen Agonisten und Antagonisten

2-Cl-IB-MECA	1-{2-Chloro-6-{{(3-iodophenyl)methyl}amino}-9 <i>H</i> -purin-9-yl}-1-deoxy- <i>N</i> -methyl-β- <sub>D</sub> -ribofuranuronamide
AOPCP	α,β-Methylene-ADP
ARL 67156	<i>N</i> <sup>6</sup> -dethyl-1-β,γ-dibromomethylene-ATP
BAY60-6583	2-((6-Amino-3,5-dicyano-4-(4-(cyclopropylmethoxy)phenyl)-2-pyridinylthio)-acetamide
CGS 15943	9-chloro-2-(2-furanyl)-{1,2,4}-triazolo{1,5- <i>c</i> }quinazolin-5-amine
CGS 21680	2-( <i>p</i> -(2-carboxyethyl)phenylethylamino)-5'- <i>N</i> -ethylcarboxamido-Adenosin
MRS 1334	3-ethyl-5-(4-nitrobenzyl)-2-methyl-4-phenylethynyl-6-phenyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate
PSB 603	8-(4-(4-(4-Chlorphenyl)piperazine-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin
SLV 320	4-(4-hydroxycyclohexylamino)-6-phenylpyrrolo(2,3- <i>d</i> )pyrimidine

## 1. Einleitung

Die medizinische Forschung ist so alt wie die Menschheit selbst. Durch die heutige Technik und das in den letzten Jahrhunderten erlangte Wissen ist es der Menschheit gelungen, vielen Umwelteinflüssen zum Trotz, die Lebenserwartung deutlich zu steigern. Es gibt eine Vielzahl von Krankheiten und Leiden, die dank der heutigen Medizin geheilt oder behandelt werden können. Doch auch im 21. Jahrhundert stößt die Medizin noch an Grenzen. Bei Krankheiten, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington, weiteren neurodegenerativen Erkrankungen und auch Depressionen oder Schizophrenie ist es heute, trotz neuester Techniken, noch nicht möglich, diese zu heilen. Das Gehirn, eines der kompliziertesten Systeme im menschlichen Organismus, und die damit verbundenen neurodegenerativen Erkrankungen, können in vielerlei Hinsicht noch als terra incognita bezeichnet werden.

### **Historischer Rückblick**

Die Entdeckung, dass auch das Gehirn aus einzelnen Zellen aufgebaut ist, wurde erst im späten 19. Jahrhundert erzielt. Die heute als Golgi-Methode bekannte Färbung von Gewebsschnitten mit einer Silberlösung legte den Grundstein für das heutige Wissen über die neuronale Architektur. Camillo Golgi entdeckte durch das Anfärben von Gehirnschnitten mit einer Silberlösung 1873, dass einzelne Neurone im Gehirn angefärbt werden können [1]. Golgi selbst bezeichnete dieses Färberesultat als Artefakt und glaubte nicht an die Theorie, die besagt, dass das Gehirn aus einzelnen Nervenzellen aufgebaut ist. Ein weiterer Wissenschaftler, Santiago Ramón y Cajal, modifizierte die Technik von Camillo Golgi und konnte so die noch heute gültige Morphologie des neuronalen Systems aufzeigen [1]. Für diese Entdeckung erhielten die beiden Wissenschaftler Camillo Golgi und Santiago Ramón y Cajal im Jahr 1906 den Nobelpreis für Medizin.

### **Entstehung und Aufteilung des Nervensystems**

Trotz des heutigen Wissens über die Entwicklung und Entstehung des neuronalen Systems sind viele Fragen noch nicht beantwortet. Eine zentrale Fragestellung der Neurobiologie ist, welche Komponenten und Mechanismen für das gerichtete Wachstum von neuronalen Zellen verantwortlich sind.



Das Wort Wachstum beschreibt in der Biologie die Zunahme oder Vermehrung von individuellen Strukturen, wie z.B. von Zellorganellen, Zellen, Gewebe, Organe und des gesamten Organismus. Jedes Wachstum ist ein hochkomplexer Vorgang ohne den kein Leben möglich ist.

Das menschliche Gehirn, das Nervensystem, das damit verbundene Bewusstsein und die Intelligenz sind die Hauptkomponenten in denen wir uns von allen anderen Lebewesen unterscheiden. Die Literatur geht davon aus, dass unser Gehirn aus 100 Billionen Neuronen und zehnmal so vielen Gliazellen besteht [2, 3]. Caspar Friedrich Wolff war Mitbegründer der modernen Embryologie. Seine Dissertationsarbeit „*Theoria generationis*“, welche er 1759 in Halle verteidigte, handelte von Entwicklungsvorgängen in Pflanzen und Tieren, was er mit mikroskopischen Untersuchungen belegen konnte [4]. Heute ist bekannt, dass das Nervensystem bereits sehr früh, 18 Tage nach Zygotenbildung, angelegt wird [5]. Die Entwicklung des Nervensystems von Vertebraten beginnt mit der Ausdifferenzierung des Neuralrohres und der Neuralleiste aus dem Ektoderm. Dabei stellt das Neuralrohr die Anlage für das zentrale Nervensystem und die Neuralleiste für das periphere Nervensystem dar [5].

Das zentrale Nervensystem wird in Gehirn und Rückenmark, welche auf Grund ihrer Struktur, wie auch ihrer Funktion, miteinander verbunden sind, unterteilt. Das Gehirn wird durch den Knochen des Hirnschädels, das Rückenmark durch die Knochen (Wirbel) und ihren charakteristischen Aufbau geschützt. Auch die Ummantelung der Hirn- und Rückenmarkshäute, die sogenannten Meningen, dienen dem Schutz [6]. Dem peripheren Nervensystem (PNS) werden die Spinal- und Hirnnervenganglien, die vegetativen Ganglien und peripheren Nerven zugeschrieben. Trotz der anatomischen Abgrenzung in Rückenmark und Hirn ist das zentrale Nervensystem untrennbar mit dem peripheren verbunden. So liegen z.B. Zellkörper (Soma) der motorischen Neurone im zentralen Nervensystem und senden Ihre Fortsätze (Neuriten) ins periphere Nervensystem aus [7]. Das periphere Nervensystem wird weiter in somatisches und vegetatives Nervensystem unterteilt. Die Axone des peripheren Nervensystems, stellen die längsten Zellen im Körper dar [8].

Das somatische Nervensystem, auch bekannt als animalisches Nervensystem, dient zum einen zur Wahrnehmung der Körperperipherie und zum anderen zur willkürlichen Ansteuerung der Skelettmuskulatur.

Das vegetative Nervensystem, welches aus dem Sympathikus und dem Parasympathikus besteht, ist für die unbewusste und unwillkürliche Steuerung der inneren Organe zuständig. Zu den Aufgaben des vegetativen Nervensystems gehören unter anderem die Steuerung der Atmung, Verdauung, Blutdruckregulation sowie die Weiterleitung von Informationen aus den einzelnen Organen in das zentrale Nervensystem [6].

Das während der Embryogenese gebildete Nervensystem ist kein starres Gebilde. Die lebenslange Variabilität in seiner Konnektivität macht es zu einem plastischen System. Nervenzellen ist es möglich, auch im adulten Zustand neue Synapsen und Schaltkreise zu bilden oder sich auch nach Traumata, wie beispielsweise nach einem Schlaganfall, wieder neu zu modulieren [9]. Neurone sind die Bauelemente des Nervensystems. Der Ausbau, die Wegfindung und das Wachstum dieses Systems endet nicht mit dem fertig entwickelten Embryo. Auch im adulten Alter spielt die Veränderung und besonders die Regeneration des Nervensystems eine tragende Rolle.

### **Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems**

Erkrankungen des Nervensystems, können wie auch das Nervensystem an sich, in Erkrankungen des zentralen und des peripheren Nervensystems aufgeteilt werden. Aufgrund der älter werdenden Weltbevölkerung ist eine Zunahme an neurodegenerativen Erkrankungen zu erkennen. Dadurch nehmen diese Erkrankungen sowohl im Bewusstsein der Bevölkerung als auch in der Forschung einen sehr hohen Stellenwert ein. Neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder auch Chorea Huntington, haben alle die pathologische Gemeinsamkeit des nicht regenerativen Absterbens von Nervenzellen und zählen zu den Erkrankungen des zentralen Nervensystems [10]. Bis heute sind diese neurodegenerativen Erkrankungen nicht heilbar. Die Forschungsimpulse zur Verbesserung der Krankheitssymptome oder auch zur Heilung, zum Beispiel von Morbus Alzheimer, gehen in viele Richtungen [11].

Periphere Neuropathie ist ein Überbegriff für Erkrankungen des peripheren Nervensystems. Diese können durch Verletzungen oder Durchtrennung der Nerven von außen geschehen. Als Ursachen können Schnittwunden, Tumore oder auch immunvermittelte Erkrankungen, wie das Guillain-Barré-Syndrom, genannt werden.

Die Pathophysiologie, welche dem Guillain-Barré Syndrom zugrunde liegt, ist meist eine Infektionskrankheit. Die darauffolgende Autoimmunreaktion führt zu Nervenschäden oder zum Blockieren der Nervenleitungen [12]. Dank der heutigen Behandlungsmöglichkeiten können Nervenschäden, besonders im peripheren System, meist weitest gehend behoben werden. Jedoch sind auch hier der Medizin Grenzen gesetzt und stark beschädigte Nervenbahnen können nicht wieder vollfunktionsfähig hergestellt werden, sodass spürbare Funktionsausfälle zurückbleiben.

### **Regeneration und Ansätze der Forschung**

Beim Begriff der Regeneration des neuronalen Systems gibt es ebenfalls wesentliche Unterschiede zwischen dem peripheren und dem zentralen Nervensystem. Das Gehirn und das Rückenmark ist durch die Knochen des Schädels und durch die Wirbelsäule bestmöglich vor Verletzungen geschützt. Da das peripher gelegene Nervensystem diese Schutzmechanismen nicht hat, ist es nötig, dass dieses System sich eigenständig regenerieren kann. Die Haut, das größte Sinnesorgan des Menschen, welches direkt allen Umwelteinflüssen ausgesetzt ist, braucht eine Maschinerie, der es möglich ist, Verletzungen, wie Abschürfungen oder Risse selbständig und schnellstmöglich zu reparieren. Dieser Prozess kann auch bei einem Schnitt in den Finger, einer Verletzung im peripheren System, beobachtet werden. Muskelfasern, Hautzellen und Nervenfortsätze werden durch den Körper in wenigen Tagen wieder regeneriert und die verletzte Stelle kann meistens ihre vollständige Funktion zurückerlangen. Durch Fortschritte in den letzten Jahrzehnten im Bereich der Molekular- und Zellbiologie ist auf dem Forschungsgebiet der neuronalen Regeneration in der Peripherie einiges über den Heilungsprozess bekannt. Heute wissen wir, dass der Regenerationsprozess nicht nur auf die verletzte Stelle lokalisiert ist, sondern dass auch die Zellkörper, welche in den Ganglien oder auch im Rückenmark gelegen sind, eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielen. Des Weiteren nehmen auch neurotrophe Faktoren eine zentrale Rolle im Heilungsprozess ein. Wird ein Nerv im peripheren Bereich verletzt, beginnt ein komplexer Prozess zur Wiederinstandsetzung der verletzten Region. Bei einer leichten Verletzung findet der Regenerationsprozess zeitnah statt, bei schwereren Verletzungen, wie zum Beispiel bei einer kompletten Durchtrennung von Nerven, beginnt dieser Prozess erst, nachdem der sogenannte „Waller-Degenerationsprozess“ abgelaufen ist [13, 14].

Die Heilung von verletzten Nervenzellen im zentralen Nervensystem, ist im Gegensatz zum peripheren System, nicht ohne weiteres möglich. Die spontane Regeneration der Axone im zentralen Nervensystem bei erwachsenen Säugetieren nach einer Verletzung ist gering. Im Gegensatz dazu regenerieren Axone im peripheren System leicht. Doch schon in den frühen 1980ern konnten Aquayo und Kollegen zeigen, dass auch Neurone aus dem zentralen Nervensystem noch Kapazitäten zum erneuten Wachstum besitzen. Heute ist eine Vielzahl an wachstumsinhibierenden Faktoren, welche beispielsweise im Myelin des ZNS angereichert sind und das erneute Auswachsen von zerstörten oder geschädigten Neuronen im ZNS verhindern, bekannt. Zu diesen Molekülen zählen unter anderem das Membranprotein Nogo-A, Myelin-assoziiertes-Glykoprotein (MAG), Ephrin B3 und Ephrin A3. Der Einfluss dieser wachstumsinhibierenden Faktoren kann in zwei Bereiche unterteilt werden. Zum einem können diese zu einem schnellen und lokalen Kollaps in den Lamellipodien und Filopodien des Wachstumskegels führen und zum anderen kann es, beispielsweise durch Nogo-A, zu einer lang anhaltenden im Zellkörper vermittelten Wachstumshemmung führen [15-17].

Trotz der Fortschritte in diesem Bereich, ist die Regeneration und das Wachstum von Neuronen ein sehr wichtiges Thema in der neurobiologischen Forschung. Dabei stellen die Stammzellenforschung und die Identifizierung der für das gerichtete Wachstum verantwortlichen Signalmoleküle, wichtige Aspekte für die weitere Forschung und spätere therapeutische Maßnahmen dar.

Durch Therapie mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark wird versucht, den Verlust an Neuronen, welcher bei Morbus Parkinson auftritt oder den komplexen Komplettausfällen, welche ein Leitbild der Krankheit Morbus Alzheimer sind, entgegenzuwirken. Eine Einsatzmöglichkeit für die aus adultem oder embryonalem Gehirn gewonnenen Stammzellen ist die Transplantation bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen. Die transplantierten Stammzellen sollen zerstörte Nervenzellenareale ersetzen oder auch die zelluläre Selbstreparatur anregen [18, 19]. Der heutige Forschungsstand der Stammzellentherapie ermöglicht es, aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Stammzellen in Patienten mit Morbus Parkinson zu transplantieren [20].

Trotz der Möglichkeiten der heutigen Forschung in diesem Bereich sind gerade Risiken, wie die Bildung von Tumoren auf Grund von Stammzellentransplantation, Abstoßungsreaktionen nach Transplantation von Stammzellen und die Letalität der transplantierten Zellen in Langzeitstudien, noch nicht restlos erforscht [21, 22]. Auch eine ethische Debatte über solche Therapiemöglichkeiten wird noch geführt [23, 24].

Inspiziert durch die Wissenschaftler Cajal und Sperry wurde in den letzten zwei Jahrzehnten versucht, die Signalmoleküle zu identifizieren, durch welche das neuronale Wachstum gelenkt und gesteuert wird. Bislang sind einige Substanzen, welche Einfluss auf das Wachstum haben können, identifiziert worden. Zu den ersten „axon guidance“ Molekülen, welche Anfang der 90er Jahre entdeckt worden sind und mit zu den herausragenden Signalmolekülen zählen, gehören die Netrine, Slit-Proteine, Semaphorine und die Ephrine [25]. Weiterhin stellen dabei Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) und Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) eine Klasse dieser Signalmoleküle dar. Zu den ECM-Proteinen zählen Laminin, Fibronectin und Collagen. Eine Hauptgruppe der CAM, ist die Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie). Zu dieser Familie von Proteinen zählen unter anderem NCAM (neural cell adhesion molecule), Fasciclin und Neurofascin [26, 27]. Eine weitere wichtige Rolle spielen die Neurotrophine. Zur Familie der Neurotrophine zählen, nerve growth factor (NGF), brain-derived growth factor (BDNF), Neurotrophin3 (NT3) und Neurotrophin4 (NT4). Diese Nervenwachstumsfaktoren bewerkstelligen das Überleben von Neuronen, das Wachstum von Axonen und die Bildung von neuronalen Netzwerken [28]. Trotz des umfassenden Wissens über Signalmoleküle gibt es noch keine Pharmazeutika, welche für die klinische Behandlung von Nervenverletzungen und Nervenregeneration eingesetzt werden können [14].

## **Wachstum**

Trotz immenser Fortschritte im Bereich der Forschung über neuronale Regeneration sind noch viele Fragen offen. Aus diesem Grund soll im Fokus dieser Arbeit die Detektion der Mechanismen, welche für das gerichtete Wachstum verantwortlich sind, stehen. Als Modellsystem dienten hierfür dissoziierte sensorische Neurone aus Hühnerembryonen (E11). Wenn von Wachstum bei neuronalen Zellen gesprochen wird, liegt ein besonderes Augenmerk auf den Enden der wachsenden neuronalen Fortsätze, den Wachstumskegeln. Diese sind für die Orientierung und die Wegfindung der Dendriten und Axone verantwortlich [29].

Die Frage, wie Neurone und auswachsende Axone navigieren um ihren Weg zu finden, beschäftigt die Wissenschaft noch heute. Die ersten Erkenntnisse bei dieser Fragestellung konnte Santiago Ramón y Cajal im Jahre 1890 mit seiner Entdeckung machen. Cajal analysierte die Entwicklung der Neurone des Rückenmarks von Hühnerembryonen, um die These der Ontogenese zu beweisen. Dabei fand er eine neuartige Struktur, welche sich an den wachsenden Enden der Neurone befand und einen freibeweglichen Aufbau der Nervenenden darstellte. Diesen bezeichnete er als „*cones d'accroissement*“ oder Wachstumskegel (Abbildung 1) [30, 31].

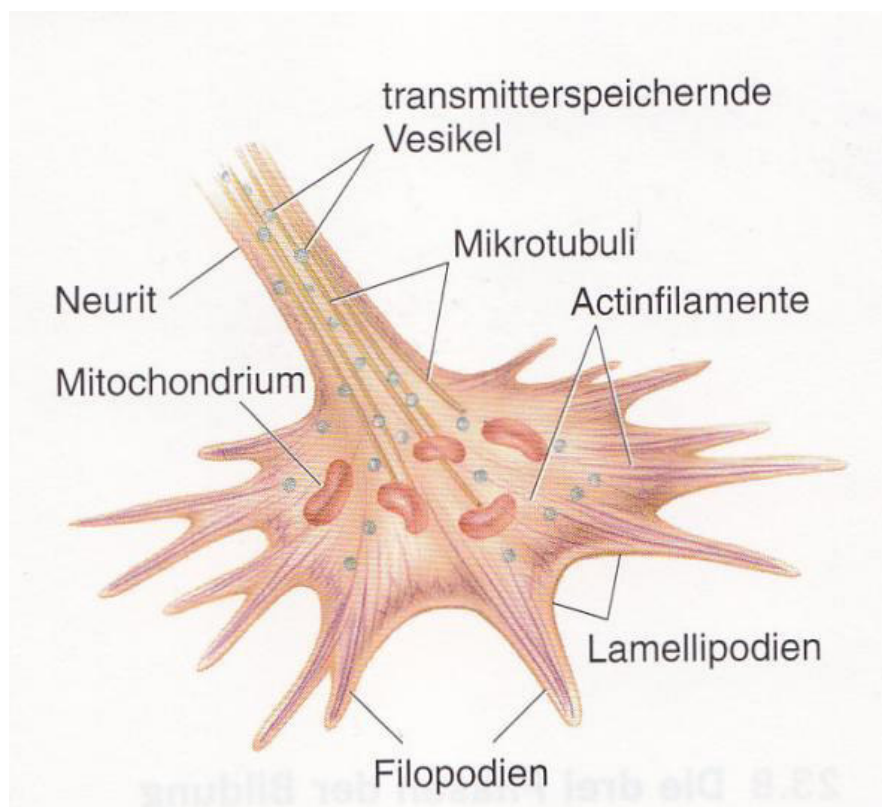


Abb. 1: Zeigt einen Wachstumskegel, mit seiner handartigen Struktur. Dieses distale Ende der Neuriten ist für die vorwärts gerichtete Bewegung zuständig [32]. Abbildung entspricht dem Original [32].

Der Wachstumskegel kann als handartige Struktur bezeichnet werden, welche am distalen Ende eines wachsenden Neuriten lokalisiert ist. Diese spezialisierte Struktur des Neuriten kann als ein Instrument der Signaltransduktion verstanden werden. Ihm ist es möglich, auf Reize in Form von extrazellulären Signalen mit neuronalem Wachstum zu reagieren.

Eine gerichtete Vorwärtsbewegung oder auch die Orientierung und die damit verbundene Bewegung und Richtungsänderung des Wachstumskegels resultiert aus einem fortlaufenden Umbau von zellulären Komponenten. Diese Orientierungsbewegung, das hin- oder wegkrümmen, ausgelöst durch Reize aus der Umgebung, ist meist aus der Pflanzenwelt bekannt und wird als Tropismus bezeichnet [33]. Neben dem Aktin-Zytoskelett, welches hauptsächlich in der Peripherie des Wachstumskegels anzutreffen ist, sind hier auch die Mikrotubuli zu nennen. Dem Wachstum liegen die äußerst beweglichen Filo- und Lamellipodien zugrunde, welche durch ihren hohen Grad an Beweglichkeit die Umgebung sondieren und auf gesonderte Reize reagieren können [34, 35].

Der Wachstumskegel kann in zwei verschiedene Kompartimente aufgeteilt werden, den peripheren und den zentralen Bereich. Der periphere Bereich ist ein breites aber flaches Geflecht mit den für diesen Bereich charakteristischen Membranausstülpungen, den Filo- und Lamellipodien. Diese zwei Arten von Membranausstülpungen sind in ein Geflecht aus verzweigten Aktinfilamenten und langen parallelen Aktin-Bündeln eingebunden. Die zentrale Region ist hinter der peripheren Region lokalisiert und mit dem Neuriten verbunden. Die Hauptkomponente dieser zentralen Domäne ist ein Gerüst aus dicht gepackten Mikrotubuli, von denen einzelne auch bis in den peripheren Bereich reichen [36]. Die zentrale Domäne bewerkstelligt durch die Mikrotubuli die Stabilisation des Wachstumskegels.

Das Protein Aktin tritt in zwei unterschiedlichen Formen auf. Zum einen das nicht gebundene Aktin oder auch globuläres Aktin (G-Aktin), welches als Monomer vorliegt und zum anderen die polymere Form, welche als F-Aktin bezeichnet wird. Beim Vorgang der Polymerisation, bindet an jedes Aktinmolekül ein Adenosintriphosphat (ATP), welches beim Einbau in das Polymer zu Adenosindiphosphat (ADP) hydrolysiert wird [37]. Aktin-Filamente haben zwei Pole, an einem wird G-Aktin angefügt und am anderen wird depolymerisiert. Das distale oder auch + Ende, an welchem Aktin angelagert wird, ist dabei Richtung Zellmembran gerichtet. Der Abbau der Aktinfilamente, die Depolymerisierung, findet am – Ende statt. Eine andauernde Polymerisation am Randbereich des Wachstumskegels, würde zu einer stetigen Vergrößerung führen.

Um diesem Prozess entgegen zu wirken, werden die gesamten Filamente nach innen verschoben. Dieses Zurückziehen der gesamten Aktinfilamente in die zentrale Domäne bewerkstelligt das Motorprotein Myosin [38].

Die in der Peripherie gelegenen Mikrofilamente hingegen sind mit Hilfe des Myosins für die Vorwärtsbewegung oder auch Motilität zuständig [38]. Der Prozess der Vorwärtsbewegung ist ein Zusammenspiel aus der Polymerisation von Aktin nahe der Plasmamembran, einem durch Myosin bewirkten Zurückziehen der Aktinfilamente und dem selektiven Anheften an ein Substrat [36]. Die Motilität des Wachstumskegels von Neuronen liegt dem Prinzip der Anhaftung der sogenannten „molekularen Kopplung“ (englisch. molekular clutch) zugrunde. Durch das Anhaften an das Substrat, entsteht eine mechanische Festigkeit. Diese Stabilität führt zu einer Reduktion der retrograden Flussgeschwindigkeit von Aktin-Filamenten, wodurch wiederum der Plasmamembran die Vorwärtsbewegung ermöglicht wird [36].

### **Guidance Moleküle**

Der Mechanismus des Wachsens und Orientierens der Neuriten wird durch den Umbau des Zytoskeletts bewerkstelligt. Dennoch stellt sich die Frage, welche Signale dafür verantwortlich sind und wie der Wachstumskegel dieses Signal wahrnimmt und weiterverarbeiten kann, so dass ein gerichtetes Wachstum erfolgt. Santiago Ramón y Cajal, der Entdecker der wachsenden Enden der Axone, schlussfolgerte aus seinen Beobachtungen zum Einen, dass Axone zielgerichtet und effizient wachsen und zum Anderen, dass Axone chemotaktisch ihren Weg finden. Heute ist bekannt, dass das Richtungswachstum und die Wegfindung der Axone aktiv durch Informationen, in Form von unterschiedlichen Signalen aus ihrer Umgebung, gesteuert werden [26]. Wie schon beschrieben, ist eine große Anzahl an Signalmolekülen, die Wachstum steuern oder inhibieren können, heute bekannt. Diese Signal- oder guidance Moleküle können in zwei Gruppen eingeteilt werden, in die gebundenen und die diffusiven Substanzen.

Zu den gebundenen Signalmolekülen werden die Ephrine gezählt. Ephrin-As sind durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit der Membran verbunden. Ephrin-Bs haben eine Transmembrandomäne, durchspannen die Lipid-Doppelschicht und sind so mit der Membran verankert [25].



Das Binden dieser Signalmoleküle an die dazugehörigen Rezeptoren steuert Zellmechanismen, zu denen sowohl der positive als auch negative Tropismus, die Migration sowie die Modulation der Dynamik des Aktin-Zytoskelettes zählen [39]. Zur Klasse der membranständigen Proteinsignalmoleküle gehören ebenfalls die Semaphorine, welche sowohl gebunden als auch diffusiv vorliegen. Dieser Familie von Signalmolekülen wurde anfänglich nur die axonale Wegfindung zugeschrieben. Heute, ist bekannt das, sie in vielen biologischen Prozessen, wie der Immunabwehr, der Angiogenese oder auch bei Tumoren, eine wichtige Rolle spielen [25, 40].

Eine Wichtige Gruppe der diffusiven Moleküle bildet die Familie der Netrine, diese können sowohl attraktiv als auch repulsiv auf die Wachstumsrichtung von Zellen wirken [41]. Weiterhin zählen zu dieser Gruppe auch Slit-Proteine, diese haben die Aufgabe, Nervenfaserbündel im zentralen Nervensystem zu leiten und sind für ein breites Spektrum der Zell-Zell Interaktion außerhalb des zentralen Nervensystems zuständig. Bei den diffusiven Molekülen sind darüber hinaus noch die Neutropine, wie NGF, BDNF, Neutrophine3 und Neutrophine4, zu nennen [28].

## **Purine**

Die Familie der Purine zählt ebenfalls zu den diffusiven Signalmolekülen. Purine sind an einer Vielzahl biologischer Mechanismen beteiligt. Sie sind beispielsweise Bausteine der DNA und RNA in Form von Adenin und Guanin (Purinbasen), Grundlage des Energiestoffwechsels und der Energiespeicherung in Form von ATP und GTP [42].

Sowohl ATP, cAMP als auch Adenosin sind als Signalmoleküle in der Literatur beschrieben. Im Nervensystem spielen ATP als Neurotransmitter und Adenosin als Neuromodulator eine Rolle [43, 44]. Im Fokus dieser Arbeit steht die Gruppe der Purine, die Purinrezeptoren und Nukleotid-Phosphatasen sowie deren Einfluss auf das Wachstum neuronaler Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass ein generierter Konzentrationsgradient von Adenosin, Wachstumskegel von Neurone aus dorsalen Hinterwurzelganglien zu einem positiven Tropismus stimuliert [45]. Neben der Frage, ob Adenosin zu den wachstumsmodulierenden Molekülen zählt, muss darüber nachgedacht werden, woher das Adenosin stammt. Es sollte geklärt werden, ob ein autokriner Mechanismus im Wachstum von neuronalen Zellen eine Rolle spielt.

## Purin- und Pyrimidinrezeptoren

Der Grundstein für unser heutiges Wissen über Adenosinrezeptoren und seine Liganden legten die beiden Wissenschaftler Alan Drury und Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolt im Jahre 1929. Drury und Szent-Györgyi zeigten als erste in ihrer 1929 veröffentlichten Arbeit „*The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart*“ die Wirkung von Adenosin auf das kardiovesikuläre System [46]. Ende der 1970er Jahre fanden Forscher heraus, dass es sich bei den durch Adenosin aktivierten Rezeptoren um mehrere Isoformen handeln muss [47, 48]. Die Nomenklatur der Adenosinrezeptoren, beruht zum einem auf ihrer molekularen Struktur zum anderen auf ihren pharmakologischen Eigenschaften und auf die von von Jeffery Burnstock 1978 beschriebenen Rezeptor-Familien welche er mit P1 und P2 bezeichnete [49]. Die Purin- und Pyrimidinrezeptoren können in weitere Unterklassen eingeteilt werden (Abb. 2). Die P1- oder auch Adenosinrezeptoren, werden weiter in vier Subtypen, die A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> und den A<sub>3</sub> Rezeptoren unterteilt. Eine Aktivierung erfolgt durch den natürlichen Liganden Adenosin. Bei diesen Rezeptortypen handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) [50]. Diese Rezeptorfamilie durchspannt mit einer Proteinkette in Form von 7 transmembrane  $\alpha$ -helices die Plasmamembran. Diese ist durch drei extrazelluläre (ECL 1-3) und drei intrazelluläre (ICL 1-3) Schleifen miteinander verbunden. Dabei liegt die N-terminale Domäne extrazellulär und die C-terminale Domäne intrazellulär [51]. Zusätzlich zur molekularen Gemeinsamkeit, der 7 transmembrane  $\alpha$ -helices, hat diese Rezeptorfamilie einen Signalmechanismus gemeinsam. Die Besetzung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch den jeweiligen Liganden induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch anschließend eine inaktive GDP-gebundene Form in die aktive GTP-gebundene Form überführt wird. Auf diese Weise fungieren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für ein nachgeschaltetes heterotrimeres G-Protein [52].

Die zweite Hauptgruppe der Purin- und Pyrimidinrezeptoren, sind die P2-Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden durch Purine und Pyrimidine aktiviert und können weiter in zwei Unterklassen unterteilt werden. Die P2Y-Rezeptoren, welche ebenfalls zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählen und die P2X-Rezeptoren, welche zur Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanalrezeptoren (LGICs) gehören [50].

Diese Ionenkanäle sind mit einer Rezeptordomäne ausgestattet, welche einen der bestimmten Liganden bindet. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Kanalproteins, was anschließend zu einem regulierten Ionenstrom durch die Plasmamembran führt [53]. Der Unterfamilie der P2X Rezeptoren werden sieben Subtypen zugeordnet (P2X<sub>1-7</sub>), die P2Y-Rezeptoren bestehen aus acht Mitgliedern (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>) [50]. Vor wenigen Jahren ist ein weiteres Mitglied der Purin-Rezeptoren entdeckt worden, welche als P0- oder auch Adeninrezeptoren bezeichnet werden. Diese zählen ebenfalls zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden durch den natürlich vorkommenden Liganden Adenin aktiviert [54].

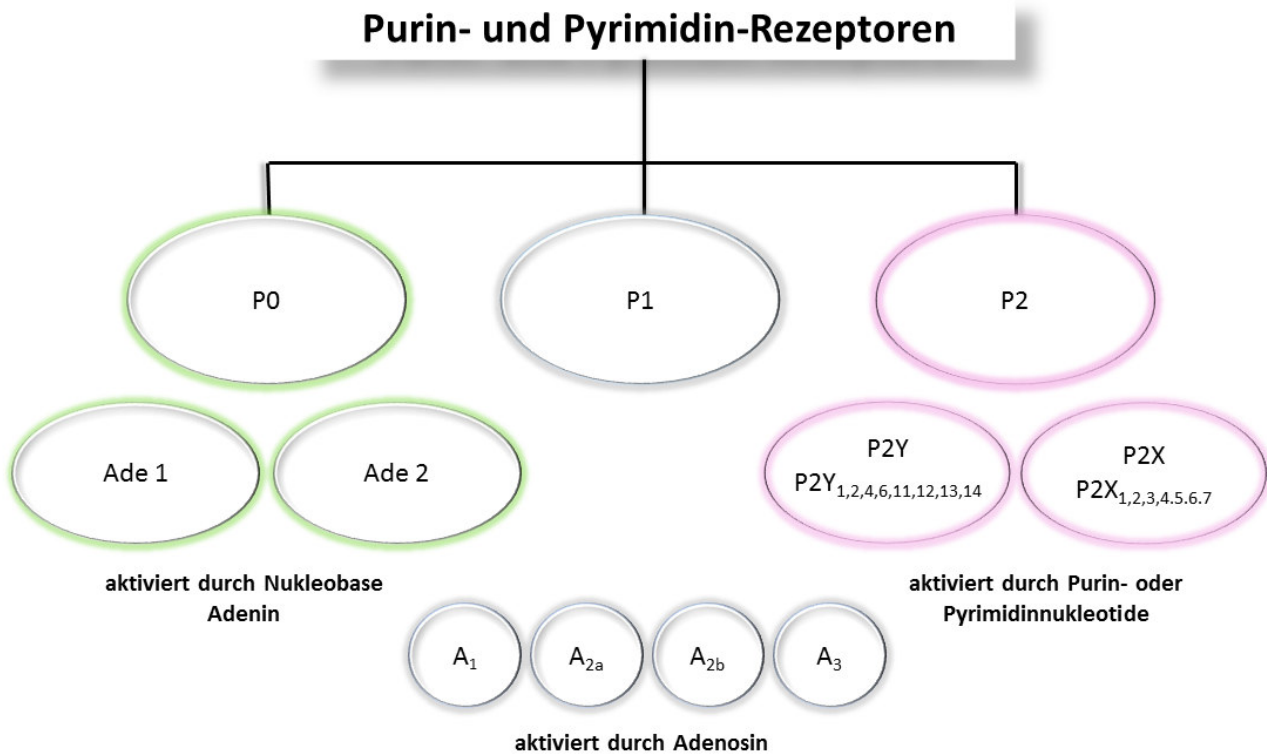


Abb. 2: Heute sind 21 verschiedene Purin- und Pyrimidinrezeptoren bekannt. Die erst kürzlich beschriebenen P0 Rezeptoren, welche durch die Nucleobase Adenin aktiviert werden [54]. Die zu diesem Zeitpunkt wohl am besten erforschten P1 oder Adenosinrezeptoren, welche weiter in A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> und A<sub>3</sub> unterteilt werden. Der natürliche Ligand dieser Rezeptorsubtypen ist Adenosin. Zuletzt gibt es noch die P2 Rezeptoren, welche weiter in den P2Y und den P2X Rezeptor unterteilt werden. Bis heute sind acht Rezeptorsubtypen des P2Y und sieben des P2X Rezeptors bekannt. Die Aktivierung erfolgt über Purin- oder Pyrimidinnucleotide [50].

Wie bereits ausführlich beschrieben, ist der natürliche Ligand der P1-Rezeptoren Adenosin. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den P1-Rezeptoren, A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> und A<sub>3</sub>, ist die Affinität für Adenosin und somit auch die Adenosinkonzentration, bei der die vier Rezeptorsubtypen aktiviert werden. Jeder Aktivierung der P1-Rezeptoren durch den natürlichen Liganden, soweit er nicht von außerhalb zugefügt worden ist, muss eine Ausschüttung oder Generierung von Adenosin zu Grunde liegen.

Demnach muss es einen Mechanismus oder eine Signalkette geben, welche extrazelluläres Adenosin für die P1-Rezeptoren bereitstellt, damit diese aktiviert werden oder Adenosin aktiv abzubauen, um die Rezeptoraktivierung zu beenden. Aus diesem Grund muss die Frage gestellt werden, woher das Adenosin stammt, welches die Adenosinrezeptoren aktiviert. Weiter muss die Frage geklärt werden, ob Adenosin direkt freigesetzt wird oder durch den Abbau von extrazellulären ATP generiert wird.

### **Freisetzung von Adenosin und ATP**

Die wichtige Rolle von extrazellulären Nukleotiden und Adenosin im gesamten Organismus ist weit bekannt und wissenschaftlich akzeptiert. Die Freisetzung dieser extrazellulären Nukleotide durch unterschiedlichste Zellen, beispielsweise in Stresssituationen oder durch Verletzungen, ist wissenschaftlich bewiesen [55-57]. Die Bereitstellung von Adenosin für die Modulation neuronalen Wachstums ist über zwei unterschiedliche Prozesse möglich. Einerseits kann ein direkter Transport von Adenosin stattfinden, andererseits kann Adenosin durch Hydrolyse von Nucleotiden generiert werden.

Equilibrative Nucleosid-Transporter (ENT) transportieren Substanzen, beispielsweise auch Adenosin, unabhängig von Na<sup>+</sup>-Ionen nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion [58, 59]. Des Weiteren ist der Transport von Adenosin entlang eines Na<sup>+</sup>-Konzentrationsgradienten bekannt. Dies geschieht durch konzentrierte Nucleosid-Transporter, welche zur CNT-Familie zählen [58]. Kürzlich konnten, neben der schon bekannten Freisetzung von Adenosin über Transporter, mit Adenosin angereicherte vesikuläre Strukturen in bestimmten Hirnarealen von Ratten nachgewiesen werden [60].

Die Freisetzung von ATP ist sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem ein weitverbreiteter Mechanismus. ATP kann sowohl vesikulär [61, 62] als auch nicht-vesikulär abgegeben werden. Zu den nicht-vesikulären Mechanismen zählen die ATP Freisetzung über Ionenkanäle, Connexin, Pannexin oder P2X<sub>7</sub> Rezeptoren [63]. Durch Phosphatgruppen-hydrolysierende Enzyme können sowohl aus ATP oder dessen Abbauprodukte wie ADP oder AMP Adenosin generiert werden.

## Phosphatgruppen-hydrolysierende Enzyme

Als ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der physiologischen Zellfunktion und somit zur Steuerung und Verfügbarkeit dieser essentiellen Signalmoleküle im extrazellulären Bereich, spielen unterschiedliche, Phosphatgruppen-hydrolysierende, Enzyme eine tragende Rolle. Diese Enzyme werden als Ekto-Nukleotidasen bezeichnet und besitzen ein katalytisches Zentrum, welches dem extrazellulären Raum zugewandt ist. Zu diesem Zeitpunkt sind vier Hauptklassen, welche sich hinsichtlich ihrer Reaktionsmechanismen unterscheiden, identifiziert und benannt worden. Zu diesen zählen die Nukleoside-triphosphate-diphosphohydrolasen (NTPDases), Nukleotide-pyrophosphatasen/phosphodiesterasen (NPPs), Alkalische Phosphatasen (APs/ALPs) und die ecto-5`-nukleotidase (e5NT) (Abbildung 3).

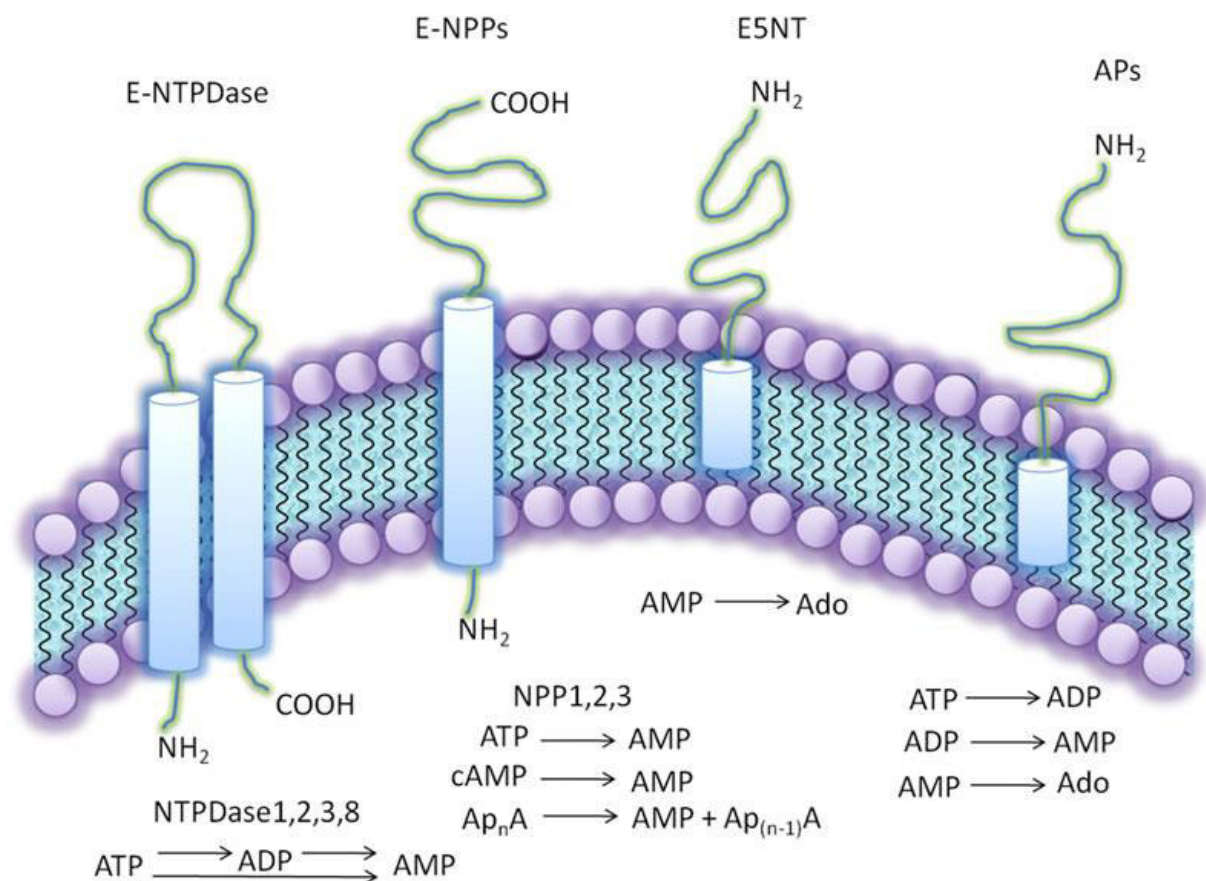


Abb. 3: Zeigt die vier Hauptklassen der Ekto-Nukleotidasen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Reaktionsmechanismen. Zu diesen zählen die Nukleoside-triphosphate-diphosphohydrolasen (NTPDases), Nukleotide-pyrophosphatasen/phosphodiesterasen (NPPs), Alkaline Phosphatasen (APs/ALPs) und die ecto-5`-nukleotidase (e5NT) [64]. Abbildung entspricht dem Original [64].

Das gemeinsame Merkmal dieser NTPDasen-Familie, welche auch Ekto-Apyrasen oder E-ATPasen genannt werden, ist die große extrazelluläre katalytische Domäne, welche fünf Apyrase-konservierte Regionen (apyrase conserved regions, ACRs) enthält. Zu diesem Zeitpunkt sind acht Isoformen dieses Enzyms bekannt, welche mit NTPDase1-NTPDase8 bezeichnet werden. Nukleotide, welche von NTPDasen hydrolysiert werden, sind Nukleosid di- und triphosphate (ADP und ATP). Nukleosidmonophosphat (AMP) wird dagegen von dieser Enzymgruppe nicht hydrolysiert. Ein maßgeblicher Unterschied zwischen den jeweiligen NTPDasen ist die Substratpräferenz. Die NTPDase1 hydrolysiert ATP und ADP mit ähnlicher Geschwindigkeit, die NTPDase2 hingegen hydrolysiert ATP etwa 30mal schneller als ADP. Die NTPDase3 bildet das Mittelstück zwischen diesen beiden NTPDasen und bevorzugt ATP aber hydrolysiert diese nur etwa dreimal schneller als ADP [64, 65].

Heute zählen sieben Enzyme zu den Nukleotid-pyrophosphatasen/phosphodiesterasen (NPPs), welche mit NPP1-NPP7 benannt sind. Nur die drei Isoformen NPP1-NPP3 sind für den purinergen Stoffwechsel zu diesem Zeitpunkt interessant, da über die physiologische Rolle und die Substrate, welche von NPP4 und NPP5 hydrolysiert werden, bisher noch nichts bekannt ist. Durch NPP 6 und NPP 7 findet eine Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen hin zu Phospholipiden statt, auch über diese Subtypen der Nukleotidpyrophosphatasen ist nicht bekannt, dass sie Nukleotide hydrolysieren [64].

Im Gegensatz zu NPP1 und NPP3, welche in der Membran verankert sind, liegt NPP2 nicht als membrangebundene Form vor, sondern ist eine lösliche Form dieser Ekto-Nukleotidfamilie. Diese Enzyme hydrolysieren ein breites Substratspektrum von ATP, ADP, AMP bis hin zu 3',5'-cAMP [64].

Eine weitere Gruppe sind die alkalischen Phosphatasen. Diese ubiquitär vorkommende Proteinfamilie dephosphoryliert ein breites Spektrum an Molekülen. Diese Gruppe kann weiter in die gewebeunspezifische alkalische Phosphatase (tissue nonspecific alkaline phosphatase, TNAP) und in die gewebsspezifische alkalische Phosphatase (APs) unterteilt werden. Dieses Enzym ist nicht nur für die Dephosphorylierung von einer großen Anzahl an organischen Komponenten zuständig, sondern baut auch Nukleoside 5'-tri-, -di- und monophosphate (NTP, NDP, NMP) ab.

Über die alkalische Phosphatase und ihre Rolle im purinergen Stoffwechsel ist bislang noch nicht viel bekannt, da die Wissenschaft dieser Thematik noch keine große Aufmerksamkeit geschenkt hat [64].

Die letzte Gruppe, die im Zusammenhang mit den Ekto-Nukleotidasen erwähnt werden soll, ist die ecto-5'-nukleotidase (e5NT). Heute sind drei Formen der e5NT bekannt. Eine mit der Zellmembran verankerte Form, eine lösliche Form, bei der davon ausgegangen wird, dass dies eine Loslösung der verankerten Form ist, und eine im Cytosol vorkommende e5NT. Dabei weicht die Struktur der im Cytosol gefundenen e5NT von der löslichen und verankerten Form ab. Der größte Teil des Adenosins im extrazellulären Bereich, welches durch Hydrolyse von AMP entsteht, wird von der Ecto-5'-nukleotidase generiert [64, 66].

### **Zielsetzung dieser Arbeit**

Der Grundgedanke, der dieser Arbeit voranging, ist die Frage, welchen Einfluss Adenosinrezeptoren auf den Wachstumsprozess von sensorischen Neuronen von *Gallus gallus* haben. Eine aus dem eigenen Labor stammende Arbeit zeigt, dass Konzentrationsgradienten von Adenosin die Wachstumsrichtung von sensorischen Neuronen beeinflussen. Adenosin wirkt in diesem Zellsystem als Chemoattractant [67]. Ausgehend von diesem Befund sollten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von pharmakologischen Methoden untersucht werden ob neben dem Richtungswachstum auch das Längenwachstum der sensorischen Neurone durch P1-Rezeptoren beeinflusst wird. Erstaunlicherweise deuteten erste experimentelle Ergebnisse darauf hin, dass Adenosin nicht nur einen Einfluss auf die neuronale Wachstumssteuerung hat, sondern dass auch autokrine Mechanismen involviert sein kann. Diese Interpretation der Daten wurde durch eine Veröffentlichung unterstützt, die einen autokrinen purinergen Mechanismus bei dem Chemotropismus neutrophiler Zellen nachweist [68]. Aus diesen Gründen sollte in der vorliegenden Arbeit nicht nur der Einfluss der P1-Rezeptoren auf das neuronale Wachstum untersucht werden, sondern auch die Hypothese überprüft werden, ob autokrine purinerge Mechanismen bei der Wachstumssteuerung sensorischer Neurone eine Rolle spielen.



## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Stammlösungen und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma Aldrich im höchsten Reinheitsgrad gebrauchsfertig bezogen. Die Sterilisation von Verbrauchsmaterialien oder auch Lösungen, wie z.B. Phosphat-gepufferte Saline, erfolgte mit einem Autoklaven (Systec 2540 EL; Tuttnauer). Glucose und Antibiotikastammlösungen wurden auf Grund ihrer hitzesensitiven Eigenschaften mittels eines Membranfilters (Zellulosemischester, Roth) mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  sterilfiltriert. Die Herstellung der Zellkulturmedien fand zeitnah zu den jeweiligen Versuchen statt. Für die Sterilisation von Verbrauchsmaterialien wie Glas- und Plastikwaren wurde ein Autoklav (Systec 2540 EL; Tuttnauer) verwendet. Für die Glaspipetten wurde die Hitzesterilisation in einem Trockenschrank (FD 115, Binder, Tuttlingen) bei 160°C für drei Stunden gewählt.

#### 2.1.1 Lösungsmittel

##### **Demineralisiertes Wasser**

Wurde dem Reinstwassersystem (SG Ultra Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel) entnommen.

##### **Dimethylsulfoxid (DMSO, wasserfrei, 98%)**

Gelagert bei Raumtemperatur (RT) im Exsikkator

##### **Ethanol (pa)**

Fertig bezogen

Bei Raumtemperatur im Lösungsmittelschrank gelagert

## 2.1.2. Stammlösungen und Puffer

### **Antibiotikastammlösung (PenStrep)**

6,86 [mM] Streptomycinsulfat

17,42 [mM] Penicilin G

Gelöst in physiologischer Kochsalzlösung

Sterilfiltriert

Aliquotiert in 0,5ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 120 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **Glucoselösung**

1 [M] Glucose

Gelöst in demineralisiertem Wasser

Sterilfiltriert

Gelagert im Gefrierschrank bei -24°C

### **Formaldehydlösung**

14,8% Formaldehyd

Gelöst in demineralisiertem Wasser

Kurz vor Verwendung frisch angesetzt

### **Fötale Kälberserum (FCS)**

Gelagert im Gefrierschrank oder Gefrierfach bei -18°C

### **Hanks balanced salt solution ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (HANKS)**

Fertig bezogen

Gelagert im Kühlschrank bei +4°C

### **N1 Medium Supplement (100x)**

Als gebrauchsfertige Lösung bezogen

Aliquotiert in 0,5ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 100µl

Gelagert im Kühlschrank bei +4°C

### **Trypsin EDTA**

Als gebrauchsfertige Lösung bezogen

Gelagert im Kühlschrank bei +4°C

### **Ziegenserum (Goat Serum)**

Aliquotiert in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 1 ml

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **7s Nerve Growth Factor (NGF)**

100 ng/µl

Gelöst in BSA-Lösung

Aliquotiert in 0,5ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 12 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **Permeabilisierungslösung Triton X-100**

Gebrauchslösung mit PBS zur benötigten Konzentration verdünnt

### **Phosphat-gepufferte Saline (PBS)**

136,89 [mM] NaCl

2,68 [mM] KCl

10,14 [mM] Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,76 [mM] KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH-Wert 7,4

Gelöst in demineralisiertem Wasser

### **Phosphat-gepufferte Saline Tween-20 (PBST)**

136,89 [mM] NaCl

2,68 [mM] KCl

10,14 [mM] Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,76 [mM] KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.02% Tween 20

pH-Wert 7,4

Gelöst in demineralisiertem Wasser

### **Physiologische Kochsalzlösung**

154 [mM] NaCl

Gelöst in demineralisiertem Wasser

Sterilfiltriert

Gelagert im Gefrierschrank bei -24°C

### **Blocking Lösung**

136,89 [mM] NaCl

2,68 [mM] KCl

10,14 [mM] Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,76 [mM] KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.02% Tween 20

2% BSA (Bovine Serum Albumin)

0.5% FSG (Fish Skin Gelatin)

pH-Wert 7,4

Gelöst in demineralisiertem Wasser

Sterilfiltriert

Gelagert im Gefrierschrank bei -24°C

### **Polyethylenimin (PEI)**

Leihgabe der AG Leonhardt

Gelagert im Kühlschrank bei +4°C

### **Glycerol**

Fertig bezogen

Im Chemikalienschrank bei Raumtemperatur gelagert

### **Kaliumphosphat Puffer**

1 [M] Kaliumphosphate

pH-Wert 6,0

### 2.1.3 Beschichtungslösung

#### **Poly-D-Lysin**

0,383 [mM] Poly-D-Lysin Hydrobromid

Gelöst in demineralisiertem Wasser

Gelagert im Gefrierschrank bei -24°C

#### **Laminin**

0,5 mg/ml (2 ml, Hoffmann La Roche) aufgetaut

Aliquotiert in 1 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 20 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

Kurz vor Verwendung aufgetaut und 980µl HANKS pro Aliquot zugegeben  
(Endkonzentration 10 µg/ml)

#### **Silikonlösung**

Fertig bezogen

Bei Raumtemperatur gelagert

## 2.1.4 Zellkulturmedium

### **Dulbeccos Modified Eagle Medium mit F12-Zusatz (DMEM-F12)**

Fertig bezogen

Gelagert im Kühlschrank bei +4°C

### **DRG-10**

DMEM-F12 90% (v/v)

FCS 10% (v/v)

PenStrep 100µl/10 ml

NGF 1 µl/10 ml

### **DRG-10 serumfrei**

DMEM-F12 90% (v/v)

N1-Supplement 100 µl/10 ml

PenStrep 100µl/10 ml

NGF 1 µl/10 ml

### **HEK 293 Zellkulturmedium**

DMEM 4,5 (v/v)

FCS 10% (v/v)

## 2.1.5 Agonisten und Antagonisten

### **CGS 15943**

30 [mM] CGS-15943

Gelöst in DMSO

Kurz vor Verwendung frisch angesetzt

### **CGS 21680**

25 [mM] CGS-21680

Gelöst in DMSO

Aliquotiert in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 50 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **MRS1334**

10 [mM] MRS1334

Gelöst in DMSO

Aliquotiert in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 50 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **2-CI-IB-MECA**

25 [mM] 2-CI-IB-MECA

Gelöst in DMSO

Aliquotiert in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 50 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C



### **SLV320**

25 [mM] SLV320

Gelöst in DMSO

Aliquotiert in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 50 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **PSB603**

25 [mM] PSB603

Gelöst in DMSO

Aliquotiert in 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) zu je 50 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **BAY 60-6583**

25 [mM] BAY 60-6583

Gelöst in DMSO

Aliquotiert in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 50 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **Adenosine Desaminase (ADA) from bovine spleen**

Gebrauchsfertig bezogen zu  $\geq 130$  units/mg

Aliquotiert in 0,5ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 50µl

Gelagert im Kühlschrank bei +4 °C

### **Apyrase from potato**

Gebrauchsfertig bezogen zu  $\geq 200$  units/mg

Aliquotiert in 0,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) zu je 50µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

## **ARL67156**

20 [mM] ARL67156

Gelöst in Wasser

Aliquotiert in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 24 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

## 2.1.6 Färbelösung

### **Hoechst (bisBenzimide) 33258**

1 [mM] Hoechst 33258

Gelöst in Wasser

Aliquotiert in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 1,0 ml

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **Quinacrine dihydrochloride**

50 [µM] Quinacrine dihydrochloride

Gelöst in PBS

Für jeden Versuchstag frisch angesetzt

### **MitoTracker®Orange CMTMRos**

1 [mM] MitoTracker

Gelöst in DMSO

Aliquotiert zu je 50 µg

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **LysoTracker®Blue-White DPX**

1 [mM] LysoTracker

Gelöst in DMSO

Aliquotiert zu je 50 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **Fura-2AM cell permeant**

1 [mM] Fura-2AM

Gelöst in DMSO

Aliquotiert zu je 50 µg

Gelagert im Gefrierschrank bei -18°C

### **2.1.7 Antikörperfärbung**

#### **Mouse Anti-Neurofilament 200 kDa monoclonal antibody,**

**Clone rt97** (Chemicon/Upstate/Linco, Milipore Corporation)

0,1mg/ml

Gelöst in demineralisiertem Wasser mit 0,005 [M] NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0,125 [M] NaCl, 50%  
Glycerol

Aliquotiert in 0,5ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 25µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -24°C

#### **Cy3 conjugated Affini Pure Goat Anti Mouse**

(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)

1,5 mg/ml

Gelöst in demineralisiertem Wasser mit 0,005 [M] NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,125 [M] NaCl, 50%  
Glycerol

Aliquotiert in 0,5ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zu je 25 µl

Gelagert im Gefrierschrank bei -80°C

#### **Adenosine A2A-R (H-82): sc-13937**

(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.)

Gebrauchsfertig bezogen

Gelagert im Kühlschrank bei +4°C

**F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) secondary Antibody, Alexa Fluor®488 conjugate**

(ThermoFisher SCIENTIFIC)

Gebrauchsfertig bezogen

Dunkel gelagert im Kühlschrank bei +4°C

### 2.1.8 Verwendeter Vektor

Plasmidvektor PCMV-SPORT6 Invitrogen, Adenosin A<sub>2a</sub> Rezeptor human ATCC-MGC-21342 von LGC Promochem GmbH, Wesel Germany

## 2.2 Neuronale Zellkultur

### 2.2.1 Herstellung und Beschichtung der Zellkulturschalen

In diesem Versuch wurden von Hand angefertigte Zellkulturschälchen verwendet. Der Vorteil dieser aufwendigen Herstellung der Schälchen liegt in dem sehr geringen Fassungsvermögen von etwa 150 µl. Vorversuche mit handelsüblichen Zellkulturschalen, mit einem Fassungsvermögen von etwa 400 µl, haben gezeigt, dass sich der Boden der Schälchen auf Grund der Flüssigkeitsmenge etwas absenkt. Dies erschwerte eine gleichmäßige Verteilung der dissoziierten Neurone. Als Grundmaterial für die Zellkulturschalen dienen 35 mm Petrischalen mit Nocken (Bakterienschälchen,  $\gamma$ -bestrahlt; Greiner, Frickenhausen). Die Petrischalen wurden in eine für diesen Zweck speziell angefertigte Halterung mit Boden nach oben eingespannt und mit einer zentrischen Bohrung von 15 mm versehen. Um die Schälchen zu reinigen und zu desinfizieren, wurden diese für ca. 60 Minuten in technischem Ethanol eingelegt. Die Anzahl der später benötigten Mikroskopier-Deckgläschen (rund, Stärke 1, Ø 24 mm; Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim) wurden zeitgleich in Ethanol eingelegt. Zur Reinigung von Bohrrückständen und Staub wurden die Schälchen mit fusselfreien Labortüchern (KimTech, Kimberly-Clark, WI, USA) sorgfältig trockengerieben. Um mögliche Verschmutzungen wie etwa Fettrückstände auf den Deckgläschen zu entfernen, wurden diese ebenfalls mit fusselfreien Labortüchern sehr vorsichtig trocken poliert. Zum Anbringen der Deckgläschen wurde die Unterseite der Schälchen, rund um die Bohrung, mittels eines angewärmten Metallstempels mit flüssigem Paraffin beschichtet. Nach dem Anwärmen der Deckgläschen auf einer Heizplatte wurden diese mittig an die Unterseite der Schälchen gedrückt. Die fertigen Schälchen wurden mit je 150 µl 0,1 M Poly-D-Lysin beschichtet und über Nacht in einem Weinklimaschrank (WKw1806, Liebherr, Biberach) bei 16°C beschichtet. Als letzter Schritt mussten die Schälchen zweimal mit 1 ml PBS und mit 1 ml demineralisiertem Wasser gewaschen werden. Nachdem die Schälchen an der Luft vollständig getrocknet waren, wurden diese zur Sterilisation für 45 Minuten unter der Reinluftbank (BDK, Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen) UV bestrahlt (HNS 30 OFR, Osram, München). Die gebrauchsfertigen Schälchen wurden in 100 mm Petrischalen (Greiner, Frickenhausen) überführt und im Kühlschrank bei 4°C für bis zu 4 Wochen gelagert.

Am jeweiligen Versuchstag wurde zeitnah die benötigte Anzahl an sterilen Schälchen mit Laminin beschichtet. Dies erfolgte mit je 150 µl einer 10 µg/ml Lamininlösung und anschließender Inkubation im CO<sub>2</sub>-Zellkulturschrank (Model 3111, Forma Series III Water Jacket, Thermo Fisher Scientific, USA) bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 7,5% CO<sub>2</sub> für zwei Stunden. Im darauf folgenden Arbeitsschritt wurden die Schälchen zweimal mit 1 ml HANKS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Hankslösung durch 150 µl serumhaltiges Nährmedium ersetzt. Wichtig bei diesen Waschschriften war es, darauf zu achten, dass die Schälchen nicht trockenfallen und immer ein leichter Flüssigkeitsfilm über der Lamininschicht bestehen bleibt. Bis zum schlussendlichen Gebrauch der Schälchen wurden diese im CO<sub>2</sub>- Zellkulturschrank bei 37°C gelagert.

### 2.2.2 Herstellung von silikonisierten Pasteur-Pipetten

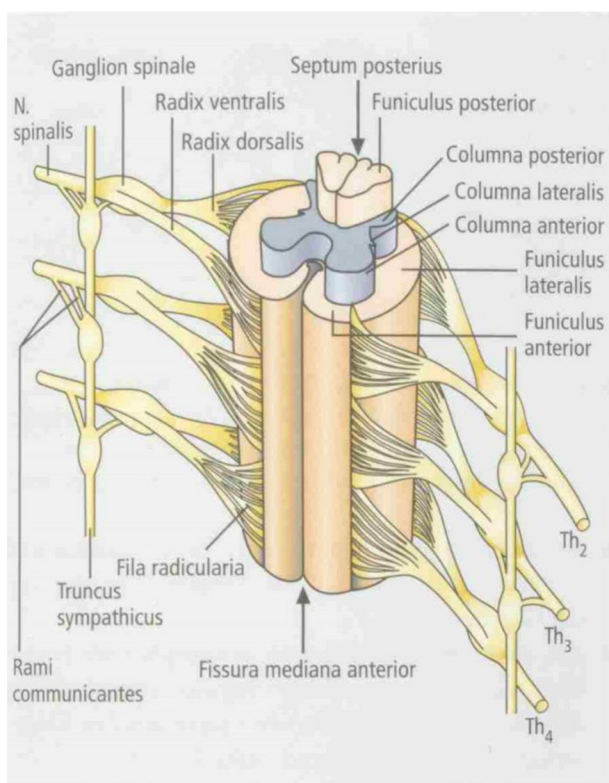
Die Mündung einer langen Pasteur-Pipette wird in einem Bunsenbrenner (Flammy, Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) durch gleichmäßiges und zügiges drehen so abgeschmolzen, dass sich die Öffnung verkleinert und, falls vorhanden, scharfe Kanten beseitigt werden. Um zu vermeiden dass beim Vorgang des Dissoziierens Neurone an der Innenwand der Pipette haften bleiben, muss diese vorab mit Silikon beschichtet werden. Hierzu wird mit einem Peleusball 35%ige Silikonlösung in Isopropanol (Serva) in die Pipette aufgezogen und wieder ausgelassen. Im Anschluss wird der gleiche Vorgang mit demineralisiertem Wasser wiederholt. Die mit Silikon beschichteten und gespülten Pipetten werden anschließend für 30 Minuten auf dem hinteren Ende an der Luft getrocknet. Als letzten Waschschrift werden sie weitere zweimal mit demineralisiertem Wasser gespült und anschließend in einer Aluminium-Pipettenbox für 1h bei 80°C in einem Wärmeschrank hitzesterilisiert. Das Autoklavieren dieser Pipetten ist nicht möglich, da dieser Vorgang die Silikonschicht beschädigen würde.

### 2.2.3 Bebrütung und Lagerung der Eier

Befruchtete Hühnereier des Haushuhnes *Gallus gallus* wurden von der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven bezogen. Die für die Versuchstage benötigten Eier wurden in einem Eierbrüter (Hova, Turbofan-70) bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von etwa 70% für 11 Tage bebrütet und mittels eines motorisierten Eierwenders umgelagert. E11 Embryonen wurden entnommen und präpariert. Vor Brutbeginn wurden die Eier einem Weinklimaschrank (WKw1806, Liebherr, Biberach) bei 16°C gelagert.

### 2.2.4 Präparation der Spinalnervenneurone

Als Ganglion oder auch Nervenknotten wird die Ansammlung von Nervenzellkörpern des peripheren Nervensystems bezeichnet [69]. Diese liegen beidseitig im Bereich der Zwischenwirbellöcher. Hinterwurzelganglien oder auch dorsal root ganglia (DRG)



sind sensorische Neurone, welche Informationen der Peripherie in das zentrale Nervensystem weiterleiten (Abbildung 4) [70].

Abb. 4: Zeigt im Thorakalbereich ein Teilstück des Rückenmarks und die dazugehörigen Spinalnervenpaare. Die Wurzelfäden (Radix ventralis und dorsalis) sind die gruppierten Nervenbahnen, welche das Rückenmark verlassen. Die Verdickungen / Spinalganglion (Ganglion spinale), befinden sich in der hinteren Wurzel und enthalten die Zellkörper von Nervenzellen [69]. Abbildung entspricht dem Original. [69].

Sämtliche Versuche wurden *in vitro* an dissoziierten Neuronen der Hinterwurzelganglien (DRG, dorsal root ganglia) des Haushuhns (*Gallus gallus*) durchgeführt.

Alle Schritte der Präparation erfolgten unter einer Reinluftbank (BDK, Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen), um sterile Bedingungen zu gewährleisten. Mittels einer Pinzette wurde das Ei am stumpfen Pol vorsichtig eröffnet. Dabei wurde die Eierschale nur bis zur begrenzenden inneren Eimembran entfernt. Nachdem die innere Eimembran vollständig entfernt wurde, konnte der Embryo entnommen werden. Nach zügigem Abklemmen des Halses wurde der Kopf vom Rumpf des Embryos entfernt und in eine neue Petrischale überführt. Die darauf folgenden Schritte wurden unter einem Binokular (Olympus SZX 90, Olympus, Tokio, Japan) mit einer Kaltlichtquelle (Schott, KL 1500 electronic) mit Schwanenhalslichtleitern durchgeführt. Durch mehrmaliges Spülen mit einer Hankslösung konnten Blut und Gewebereste während der Präparation entfernt werden. Der Rumpf des Embryos wurde durch vorsichtiges Auseinanderziehen mit zwei Pinzetten (Dumont Nr. 5 mit Biologiespitze) median geöffnet. Um ein Einbluten in den Thorax zu vermeiden, war es nötig als ersten Schritt die zu- und abgehenden Herzgefäße an der cranialen Seite mit einer Pinzette zu durchtrennen und das Herz sofort zu entnehmen. Anschließend wurden sämtliche Organe des Bauchraumes vollständig entfernt und immer wieder mit Hankslösung gespült. Die sympathischen Nervenstränge, Blut-, Binde- und Fettgewebe mussten so weit entfernt werden bis die lateral an der Wirbelsäule liegenden Spinalganglien für den Präparator gut sichtbar waren. Vor dem Abtrennen der Ganglien von den lateralen Nervensträngen, mussten zuerst die medialen Nervenstränge mit einer Pinzette durchtrennt werden. Die separierten Ganglien konnten in eine Zellkulturschale (35 mm x 10 mm, BD Falcon, BD Biosciences, CA, USA), in welcher sich 1,5 ml CO<sub>2</sub>-angereichertes und 37 °C warmes, serumhaltiges Medium befand, überführt werden. Der letzte Präparationsschritt bestand in der vorsichtigen aber sorgfältigen Reinigung der Ganglien von Blutgefäßen, Bindegewebe und Nervenstrangresten.



### 2.2.5 Dissoziation präparierter Hühner-Neurone

Sämtliche Arbeitsschritte fanden, wenn nicht anders angegeben, unter sterilen Bedingungen unter einer Reinluftbank (Heraeus HS12, Kendro Laboratory Products, Hanau, Germany) statt.

Für den Vorgang des Dissoziierens wurden die geputzten Ganglien im ersten Teilschritt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf), in welches 1 ml HANKS vorgelegt war, überführt und für 5 Minuten bei 0,2 rcf zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurde das durch das Zentrifugieren entstandene Pellet in 250 µl Trypsin EDTA resuspendiert. Trypsin, welches zu den Endopeptidasen zählt und ein Wirkoptimum bei ca. 37°C hat, dient in diesem Versuch dazu, die membranständigen Zelladhäsionsproteine zu spalten. Aus diesem Grund wird die zehnminütige Inkubation im Zellkulturschrank bei 37°C durchgeführt. Durch Zugabe von 750 µl serumhaltigen Zellkulturmediums wurde die Wirkung des Trypsins gestoppt. Es folgten zwei Waschschriffe mit 1 ml DRG-10 serumhaltigem Medium. Zwischen den Waschschriffen wurde jeweils wieder für 5 Minuten bei 0,2 rcf zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Überstand durch 500 µl DRG-10 serumhaltiges Medium ersetzt. Hierbei war darauf zu achten, dass das Pellet intakt blieb. Für den Vorgang des Dissoziierens wurden eigens vorab angefertigte silikonisierte Pasteur-Pipetten benötigt. Durch leichtes Andrücken der abgerundeten Spitze, der silikonisierten Pasteur-Pipette an den Boden des Reaktionsgefäßes und dem gleichzeitigen langsamen „auf und ab pipettieren“ wurden die Ganglien durch die entstehenden Scherkräfte vereinzelt. Das vorherige Silikonisieren der Pipetten verhinderte das Anhaften der Zellen an der Innenseite der Pipetten, wodurch eine höhere Zellzahl generiert werden konnte. Dieser Vorgang wurde nur etwa zehnmal wiederholt, um die neuronalen Zellen diesen Scherkräften nicht unnötig auszusetzen.

### 2.2.6 Selektion neuronaler Zellen

Ein wichtiger Arbeitsschriff vor dem Aussähen der Neurone ist die Selektion. Nicht neuronale Zellen, wie z.B. Fibroblasten oder auch Satellitenzellen, haben einen geringeren Anspruch hinsichtlich des Bodenuntergrundes.

Diesen Zellen ist es möglich, sich schnell am Boden von unbeschichteten Zellkulturschalen anzuheften und anzuwachsen.

Neuronale Zellen dagegen benötigen einen besonderen Untergrund zum Anhaften und Ausbilden ihrer Neuriten, wie z.B. Laminin [71].

Aus diesem Grund wurde das Zellkulturmedium mit den nun vereinzelt Zellen zur Selektion in eine nicht beschichtete Zellkulturschale (35mm x 10mm, BD Falcon, BD Biosciences, CA, USA) überführt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit 1 ml Medium nachgespült und dies auch in das Zellkulturschälchen gegeben. Zur Inkubation kam das Zellkulturschälchen für etwa 2 Stunden in einen Zellkulturschrank bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 7,5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.7 Aussähen der Zellen

Vor dem Abnehmen des Überstandes, welcher die neuronalen Zellen beinhaltet, wurde die Zellkulturschale vorsichtig zweimal geschwenkt. Dies war nötig, um lose am Boden liegende Neurone mit dem Überstand abnehmen zu können.

Das mit DRG-Neuronen versetzte Medium konnte anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 0,2 rcf zentrifugiert werden. Nach Abnehmen des Überstandes konnte das Pellet in 450 µl serumhaltigem Zellkulturmedium resuspendiert werden.

Vorversuche haben gezeigt, dass Neurone bezüglich des Anwachsens oder auch im Stadium des Wachstums an sich auf kleinste Veränderungen reagieren können.

Aus diesem Grund wurden sämtliche weitere Arbeitsschritte im Inkubator durchgeführt. In die mit 150 µl serumhaltigem DRG-10 Medium vorbereiteten Schälchen wurden nun 50 µl Zellsuspension zugegeben und diese vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erhalten.

Hauptaugenmerk wurde beim Aussähen der Zellen auf eine gleichmäßige Verteilung und eine geringe Zelldichte gelegt. Um zu vermeiden, dass das Wachstum durch parakrine Signale ungewollt beeinflusst wird, entsprach das Volumen 200 µl 3-4 Zellen / mm<sup>2</sup>. Dieser Wert stimmt mit der in der Literatur beschriebenen klonalen Dichte von < 5 Zellen / mm<sup>2</sup> überein [72].

### 2.2.8 Anwachsen und Fixation dissoziierter Neurone

Die bestückten Zellkulturschalen wurden anschließend für 2 Stunden in einem Zellkulturschrank bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 7,5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei dem Prozess des Absinkens und Anhaftens der neuronalen Zellen war es sehr wichtig, den CO<sub>2</sub>-Zellkulturschrank nach Möglichkeit nicht zu öffnen. Nach 2 Stunden konnten die 200 µl serumhaltiges Medium komplett abgenommen und durch 1 ml serumfreies Medium, welches mit dem jeweiligen Inhibitoren oder Kontrollsubstanzen versetzt wurde, ersetzt werden. Bei diesem Schritt war es nötig, zügig zu arbeiten, um ein Trockenfallen der Zellen zu vermeiden. Wichtig bei der Zugabe des neuen Mediums war es, dies langsam und aus einem schrägen Winkel auf die Zellen tropfen zu lassen, um ein Ablösen der schon angehafteten Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen für weitere 5,5 Stunden im Zellkulturschrank auswachsen gelassen.

Damit es möglich war, das Wachstum der neuronalen Fortsätze nach insgesamt 7,5 Stunden zu bestimmen, mussten die Zellen in dem jeweiligen Zustand festgehalten werden. Für die Fixierung wurde eine 14,8% Formaldehydlösung benötigt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Paraformaldehyd eingewogen und in 50°C heißes, demineralisiertes Wasser gegeben. Zum Lösen des Paraformaldehyds wurde auf einem Magnetrührgerät 1 M NaOH zugetropft bis sich die Festsubstanz vollständig gelöst hat. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese mit einer 1 M HCl Lösung auf den pH-Wert von 7,4 eingestellt. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass für jeden Versuchstag frisch hergestelltes Formaldehyd einen bestmöglichen Formerhalt des Wachstumskegels bietet. Für die Fixierlösung wurde 600 mM Glucose mit 14,8% Formaldehyd zu gleichen Teilen vermischt und in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Sämtliche Fixierschritte wurden im CO<sub>2</sub>-Zellkulturschrank durchgeführt. Für eine optimale Fixation musste 1 ml der Lösung vorsichtig in das Zellkulturschälchen getropft werden. Die Inkubationszeit für die Fixation betrug 6 Minuten, alle weiteren Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Reinluftbank. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS konnten die Zellen bis zur weiteren Verwendung in einem Weinklimaschrank bei 16°C gelagert werden.

### 2.2.9 Ganglion-Explantate

Zu Beginn der Ganglion-Explantate musste als erster Schritt die benötigte Anzahl Schälchen mit Laminin beschichtet werden. Nach 2 Stunden Inkubation der beschichteten Schälchen im CO<sub>2</sub>-Zellkulturschrank, konnte das Laminin in 2 Waschsritten mit jeweils 1ml HANKS abgewaschen werden. Nun musste 200 µl Zellkulturmedium vorgelegt werden. Wie unter 2.2.5 genauestens beschrieben, wurden die Ganglien frei präpariert, geputzt und anschließend jeweils ein Ganglion in ein mit 200µl Zellkulturmedium befülltes Schälchen gegeben. Nach Zurückstellen der Schälchen in den Zellkulturschrank musste darauf geachtet werden, dass die Ganglien zentriert ausgerichtet sind und gegebenenfalls noch einmal vorsichtig mit einer Pinzette das Ganglion verschoben werden. Nach ca. 3 Stunden konnte das Volumen des Zellkulturmediums auf 1 ml aufgestockt werden und die Ganglion-Explantate für mindestens 24 Stunden ohne weitere Beeinträchtigungen von außen anwachsen. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, wuchsen die Explantate während dieser Zeit sonnenförmig aus und es war gut möglich, einzelne Wachstumskegel in der Peripherie relativ vereinzelt zu detektieren.



*Abb. 5:* Ganglion-Explantat nach ca. vierundzwanzig Stunden Auswachsen. Neuriten sind sonnenförmig um das Explantat ausgewachsen.

## 2.3 HEK 293 Zellkultur

Bei der in dieser Arbeit verwendeten adhärennten Zellkultur handelt es sich um HEK 293. Diese Zelllinie stammt ursprünglich aus dem Jahre 1973. Die Abkürzung HEK bezeichnet embryonalen Nierenzellen (HEK = Human Embryonic Kidney) eines verstorbenen menschlichen Embryonen mit unbekannter Herkunft. Durch Transformation wurden Teile des menschlichen Adenovirus 5 in das Genom eingebaut [73]. Diese Zelllinie zeichnet sich durch die einfache Handhabung in der Kultivierung und beim Transfizieren aus. Auf Grund dieser Eigenschaften wurden HEK293 als Zelllinie für die Transfektionsversuche gewählt.

### 2.3.1 Auftauen von Zellen

Die in Kyroröhrchen aufbewahrten Zellen werden bis zum Auftauen in einem Tank mit Flüssigstickstoff bei etwa  $-200^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zum Auftauen werden die Kyroröhrchen zuerst für etwa 1 Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen. In dieser Zeit wird unter einer Reinluftbank ein 50 ml Falconröhrchen 10 ml Zellkulturmedium vorgelegt. Um den Auftauvorgang etwas zu beschleunigen, können die Zellen anschließend in der Handfläche gewärmt werden. Mittels einer Pasteurpipette werden etwa 50% der Zellen entnommen und in das vorbereitete Medium gegeben. Mit etwas frischem Medium werden nun auch die im Kyroröhrchen verbliebenen Zellen resuspendiert und in das Falconröhrchen überführt. Anschließend werden die Zellen bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Heraeus Holding GmbH, Biofuge Primo R, Hanau Deutschland). Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand vorsichtig abgesaugt, ohne das Pellet zu zerstören, und mit 1 ml frischem Medium wieder aufgenommen. Die nun in frischem Medium überführten Zellen können dann in eine T25 Zellkulturflasche, in welche vorab 5 ml Medium gefüllt wurde, gegeben werden. Nach ca. 5 Stunden sind die Zellen am Boden der Zellkulturflasche adhärennt und es kann ein Mediaustausch vorgenommen werden. In diesem Schritt werden Zellen, die schon tot oder dabei sind sich abzulösen, aus der Zellkultur entfernt, um eine schnelle Regeneration zu gewährleisten.

### 2.3.2 Kultivieren von HEK293

Die Lagerung der HEK293 Zellkulturen erfolgte in einem CO<sub>2</sub> Inkubator (Model 3111, Forma Series III Water Jacket, Thermo Fisher Scientific, USA) bei 37,5°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 90%. Zum Schutz vor Kontamination der Zellkultur war es nötig, die Reinluftbank mit 80% Ethanol zu reinigen und einen Kittel sowie Handschuhe zu tragen. Als erster Schritt wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt. Dabei war darauf zu achten, dass die Spitze der Absaugpipette nicht direkt auf den Zellboden mit den adhärenen Zellen gehalten wird, sondern das Medium aus einer gegenüberliegenden Ecke abgenommen wurde. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 1x PBS. Zum Ablösen der HEK293 vom Boden der Zellkulturflasche, wurden diese mit Trypsin/EDTA überschichtet und für ca. 30 Sekunden zurück in den CO<sub>2</sub> Inkubator gestellt. Nach vorsichtigem Abnehmen der Flüssigkeit konnten die Zellen in 10 ml Medium, welches vorab in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde, in ein 15 ml Falconröhrchen resuspendiert werden, um sie anschließend für 5 Minuten bei 100 rpm zu zentrifugieren. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abgesaugt und das zurückgebliebene Pellet mit 5 ml frischem Medium resuspendiert. Zum weiteren Kultivieren wurde in eine T25 Zellkulturflasche 5 ml Medium vorgelegt und 0,5 ml Zellsuspension dazu pipettiert.

### 2.3.3 Aussähen und transfizieren von HEK293

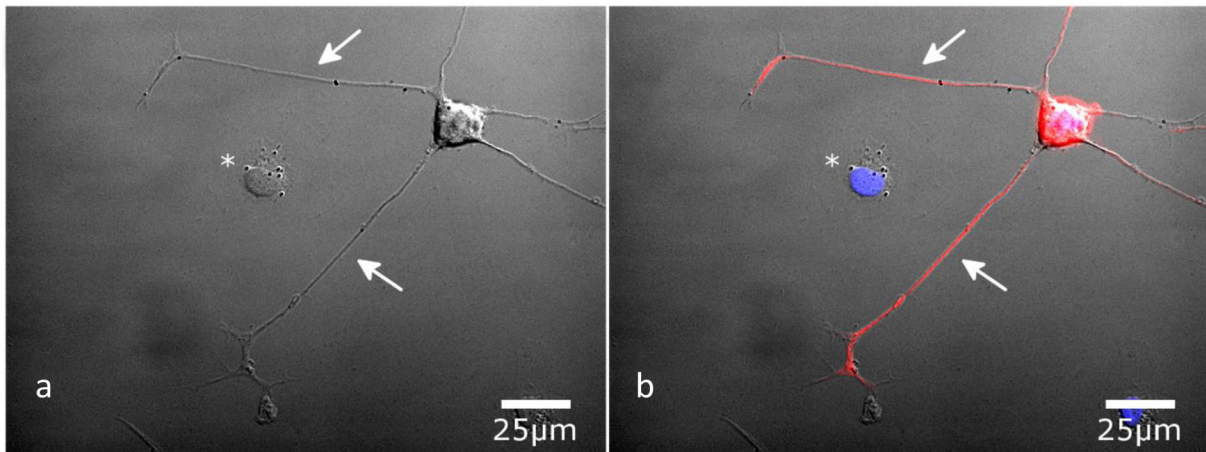
Bei der Transfektion von adhärenten Zellen wird die Zellsuspension zunächst verdünnt und mit einer Dichte von 30-50% in 200 µl Nährmedium (DMEM 4,5 mit 10% fötalem Kälberserum) ausgesät. Zum Aussähen der Zellkultur wurden, wie unter 2.2.2 Herstellung und Beschichtung der Zellkulturschalen beschrieben, selbst hergestellte 35mm Zellkulturschalen mit einer 15 mm Bohrung und einer anschließenden Poly-D-Lysin Beschichtung verwendet. Nach ca. 3 Stunden Anwachsen der adhärenen Zellkultur wurde der Transfektionsansatz, bestehend aus DMEM 4,5 (ohne FCS und ohne Antibiotika), Plasmid-DNA und PEI, hergestellt. Das Verhältnis betrug DNA:PEI 1:3 (µg/µg) und wurde mit der 8,3 fachen Menge des verwendeten PEI mit DMEM 4,5 aufgefüllt. Wichtig war, dass PEI vor der Verwendung für 10 Minuten stark vorzutexten. Anschließend wurden die drei Komponenten, Plasmid-DNA, PEI und DMEM 4,5 in ein 0,5 µl Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. 3 Stunden später wurde das Volumen des Mediums noch auf 1 ml aufgestockt und über Nacht im CO<sub>2</sub> Zellkulturschrank bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> wachsen gelassen.

Der in diesem Versuchsabschnitt verwendete Plasmidvektor mit dem Insert (A2A-Rezeptor Human) trägt die Bezeichnung PCMV-SPORT6-MGC-21342.

## 2.4 Färbungen

### 2.4.1 Neurofilamentfärbung

Bei dem in diesem Assay angewandten Selektionsverfahren war es nicht möglich, 100% der nicht neuronalen Zellen zu beseitigen. Aus diesem Grund musste sichergestellt werden, dass es möglich ist, nicht neuronale Zellen von neuronalen zu unterscheiden. Auf eine Selektion und Auswertung anhand einer Neurofilamentfärbung an jedem Versuchstag wurde verzichtet, da sich der Zellverlust, bedingt durch die häufigen Waschschriffe, auf mehr als 25% belief. Anhand einer Doppelfärbung konnte festgestellt werden, dass neuronale und nicht neuronale Zellen anhand von morphologischen Merkmalen, wie z.B. dem Ausbilden von Fortsätzen, unterschieden werden konnten (vgl. Abbildung 6).



*Abb. 6:* Identifikation von neuronalen Zellen: a: Zeigt ein Differentialinterferenzkontrastbild von neuronalen und nicht neuronalen Zellen. b: Immunocytochemische Färbung der Neurofilamente (rot) und eine Zellkernfärbung mit HOECHST (blau) zur Detektion von nicht neuronalen Zellen (markiert mit \*). Für diese Abbildung wurden die Zellen nicht selektiert und auch nicht in klonaler Dichte ausgesät um neuronale und nicht neuronale Zellen in einer Abbildung zeigen zu können.

Vor der Antikörperfärbung mussten die vorab fixierten Zellen permeabilisiert werden. Dies geschah mit 0,1% Triton X-100, mit einer Inkubationszeit von 4 Minuten und jeweils 200 µl pro Schälchen. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS, wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine Blockingsolution, bestehend aus PBS und 3% Ziegen Serum, für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Als Haupt-Markerprotein des Neuritenwachstums gelten die Neurofilamente. Aus diesem Grund wurde eine immunocytochemische Färbung der Neurofilamente verwendet.



Hierfür wurde der primäre Antikörper gegen die 200 kDa Neurofilament-Untereinheit mit einer Verdünnung von 1:200 mit PBS (100%) auf die Zellen gegeben. Um ein besseres Färbeergebnis zu erzielen, erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht im Kühlschrank.

Anschließend folgten drei Waschschrte mit PBS, wobei zwischen jedem Waschschrte 5 Minuten inkubiert wurde. Um die spezifischen Bindungsstellen des primären Antikörpers sichtbar zu machen folgte eine zweistündige Inkubation der Zellen mit dem sekundären Antikörper Cy3-konjugierten Goat Anti Mouse-Antikörper. Die Verdünnung des sekundären Antikörpers betrug 1:200.

Im Anschluss an die Antikörperfärbung folgten wieder drei Waschschrte. Der zweite Waschschrte diente gleichzeitig zum Anfärben der Kerne mit HOECHST 33258. Für die Zellkernfärbung betrug die Endkonzentration von HOECHST 33258 1  $\mu$ M bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten. Die Messungen erfolgten zeitnah, um ein bestmögliches Ergebnis zu erhalten.

#### 2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung sollte der A<sub>2a</sub>-Rezeptor im Wachstumskegel neuronaler Zellen von Hühnerembryonen und in der Zellmembran von HEK 293 nachgewiesen werden. Neurone wurden wie unter 2.2.9 in Ganglion-Explantaten vorbereitet. HEK 293 wurden nach vorangegangener Transfektion, wie unter 2.3.3 beschrieben, ebenfalls am Vortag ausgesät und beide Zellsysteme für 24 Stunden auswachsen gelassen. Alle weiteren Schritte wurden für neuronale Zellen wie für HEK293 durchgeführt.

Zunächst mussten die Zellen vorab mit einem Gemisch aus Formaldehyd (Endkonzentration 2%) und Glucose (Endkonzentration 150mM) fixiert werden. Die Fixierung fand im Zellkulturschrte statt, um ein Zurückziehen der Neuriten oder ein Abkugeln der Zellen zu vermeiden. Hierfür wurde 1 ml Fixationslösung zum Zellmedium zugegeben und anschließend 10 Minuten gewartet. Die Fixation wurde durch Zugabe von 2 ml PBST beendet und die Schälchen mussten zwei weitere Male mit PBST gewaschen werden. Anschließend fand ein Mediumwechsel statt und nach dem Absaugen des PBST folgte die Permeabilisierung wofür 0,5% Triton X100/PBS für 10 Minuten auf die Zellen getropft wurde.

Ohne anschließenden Waschschrift wurde die Permeabilisierungslösung durch die Blockinglösung ersetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Blockinglösung vorsichtig abgesaugt, wobei darauf zu achten war, dass die einzelnen Schälchen nicht komplett trocken fallen, und sofort mit 200 µl des primären Antikörpers Adenosine A2A-R Antikörper mit einer Verdünnung von 1:50 überschichtet. Die weitere Inkubation der Schälchen erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen. Um ein Austrocknen zu vermeiden, musste eine Feuchtkammer geschaffen werden, indem ein nasses, fusselfreies Tuch in die Petrischale gelegt wurde.

Anschließend folgte das viermalige Waschen mit PBST, wobei hier auch sehr wichtig war, dass die Schälchen nicht trocken fallen. Der sekundäre Antikörper goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor®488 mit einer Verdünnung von 1:400, wurde ebenfalls mit der Blockinglösung verdünnt und die Zellen damit für eine Stunde im Dunklen bei Raumtemperatur überschichtet. Danach folgte ein viermaliger Waschschrift mit Blockinglösung und weitere zweimal mit PBS. Daraufhin wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4%igem Formaldehyd/PBS nachfixiert. Als letzter Schritt wurde die Fixierung wieder durch die Zugabe von PBS aufgehoben und anschließend Schälchen vorsichtig weitere zwei Mal mit PBS gewaschen.

Die Schälchen wurden bis zur Messung im Dunklen aufbewahrt.

Bei HEK293 Zellen wurde zusätzlich, im Anschluss an die Fixierung, noch eine Kernfärbung mit HOECHST 33258 durchgeführt, um transfizierte Zellen von nicht-transfizierten Zellen unterscheiden zu können. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit 1 µM HOECHST 33258 (Stocklösung 1 mM) Lösung durchgeführt. Die vorab mit PBS gewaschenen Zellkulturschälchen wurden vorsichtig abgesaugt und mit 200 µl der Färbelösung überschichtet. Nach fünfminütiger Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur konnte die Färbelösung durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt werden.

### 2.4.3 Doppelfärbung mit Quinacrin und Fura2-AM

Aus der Literatur ist bekannt, dass mit Hilfe von Quinacrine dihydrochloride ATP-reiche Vesikel angefärbt werden können [74-76]. Um ATP-reiche Vesikel lokalisieren zu können, wurde eine Gegenfärbung mit Fura2-AM durchgeführt. Mit diesem Farbstoff war es möglich Neuriten und Wachstumskegel bei Lebendzellen sichtbar zu machen.

Für diese Färbeversuche war es nötig, Ganglion-Explantate, wie unter 2.2.9 beschrieben, für 24 Stunden auswachsen zu lassen. Bei den weiterführenden Färbeschritten war es sehr wichtig, das Absaugen und Austauschen des Mediums so behutsam wie möglich durchzuführen, um einen Kollaps, also das Zurückziehen der Wachstumskegel, zu verhindern. Aus diesem Grund mussten alle Färbelösungen im Medium auf 37°C vortemperiert und verdünnt werden. Des Weiteren war darauf zu achten, dass die Zugabe der Medien und Färbelösung nur von der Seite und nicht direkt auf das Ganglion erfolgte. Vorab wurde eine Stocklösung von 50µM Quinacrin in PBS und eine Stocklösung von Fura2-AM in DMSO hergestellt und für 15 Minuten mittels hochfrequenter Schwingungen in einem Ultraschalbad gelöst. Um die Irritationen der Ganglien durch Medienwechsel so gering wie möglich zu halten, wurde eine Doppelfärbelösung aus 25µM Quinacrin und 2µM Fura2-AM, welche in Medium verdünnt wurde, vorbereitet. Nach vorsichtigem Absaugen konnten 200 µl der Färbelösung in das Zellkulturschälchen getropft werden. Nach achtsamen Zurückstellen in den Zellkulturschrank konnten diese für 30 Minuten inkubiert werden. Um die Färbelösung von den Zellen abzuwaschen, mussten die Zellkulturschälchen zuerst zweimal vorsichtig ausgesaugt werden, um anschließend sofort mit 1 ml angewärmtem Zellkulturmedium ersetzt zu werden.

#### 2.4.4 Doppelfärbung MitoTracker® und Quinacrin

Mit einer MitoTracker® / Quinacrin Doppelfärbung sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den angefärbten Vesikeln, um ATP-Vesikel und nicht um Mitochondrien handelt. Auch in diesem Versuchsteil kamen Ganglion-Explantate zum Einsatz. Wie auch schon unter 2.4.3 beschrieben, war es auch bei diesen Färbungen von Lebendzellen wichtig, darauf zu achten, dass die Zellen so wenig wie möglich aus ihrem idealen Wachstumsklima, dem CO<sub>2</sub> Klimaschrank, entfernt wurden. Auch hier wurde die Färbelösung mit vorgewärmtem Zellkulturmedium verdünnt und Färbeschritte zusammengefasst.

Zuerst wurde eine MitoTracker® Stocklösung 1 mM in DMSO gelöst und anschließend eine 50 µM Stocklösung von Quinacrin in PBS hergestellt. Damit die Färbepartikel besser in Lösung gehen, kam auch hier das Ultraschallbad für 15 Minuten zum Einsatz. Die Färbelösung mit der Endkonzentration von MitoTracker® 250 nM und Quinacrin 25 µM wurde weiter mit angewärmtem Zellkulturmedium verdünnt und nach Abnehmen des Zellkulturmediums direkt für 30 Minuten auf die Zellen getropft. Die Inkubation mit der Färbelösung fand, wie schon unter 2.2.3, im Zellkulturschrank statt. Die darauf folgenden zwei Waschschriffe mit angewärmtem Medium (1 ml) wurden unter einer Reinluftbank durchgeführt. Zur besseren Klimatisierung wurde das Zellkulturschälchen zunächst für 10 Minuten auf dem Live-Cell- Imaging Setup bei 37°C und unter CO<sub>2</sub> Begasung inkubiert. Erst nach Ablauf dieser Zeit konnte mit dem Messprotokoll begonnen werden.

### 2.4.5 Dreifachfärbung mit LysoTracker®, MitoTracker® und HOECHST

Bei Lysosomen handelt es sich um Vesikel mit einem sauren pH-Wert, welche von einer einfachen Biomembran umschlossen sind. Diese Doppelfärbung sollte Aufschluss darüber geben, ob mit Hilfe von quinacrine dihydrochloride nur ATP-Vesikel oder auch Lysosome angefärbt werden können.

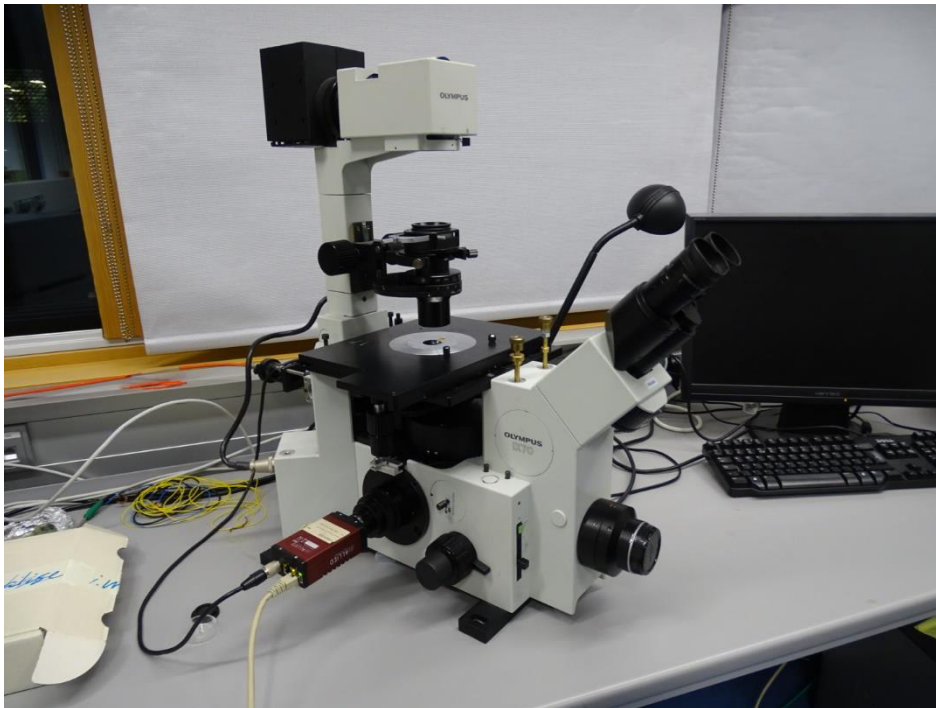
Als Gegenfärbung zum Farbstoff LysoTracker® wurde zum einen wieder der Farbstoff MitoTracker® gewählt und zum anderen auch eine Zellkernfärbung mit HOECHST 33258 durchgeführt. Um Vergleiche in der Lokalisation der angefärbten Kompartimente erstellen zu können, wurden in dem hier verwendeten Zellkultursystem auch Ganglion-Explantate verwendet.

Als erster Schritt mussten auch hier die Stocklösungen der einzelnen Farbstoffe hergestellt werden. Zur Herstellung der MitoTracker® 1mM Stocklösung wurde der Farbstoff zuerst in der Hand vorgewärmt und dann mit DMSO gelöst. Der Farbstoff LysoTracker® wurde bereits fertig gelöst in DMSO mit einer Konzentration von 1mM bezogen. Es wurde eine Dreifachlösung mit den Endkonzentrationen von 250 nM (MitoTracker®), 50nM (LysoTracker®) und 1,6 µM HOECHST 33258 durch Verdünnung mit warmem Zellkulturmedium hergestellt. Nach fünfzehnminütiger Inkubation im Ultraschallbad konnte die Färbelösung auf die Zellen gegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die Färbelösung durch zweimaliges Waschen mit 1 ml warmem Medium abgewaschen. Eine zehnminütige Inkubation auf dem Live-Cell-Imaging Setup bei 37°C und unter CO<sub>2</sub>-Begasung, sollte die Färberesultate verbessern.

## 2.5 Verwendete Messsysteme

### 2.5.1 Neuritenwachstum

Alle mikroskopischen Messungen zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit von dissoziierten neuronalen Zellen wurden mit einem Olympus IX70 (Olympus, Tokio, Japan) mittels einer Phasenkontrast-Beleuchtung durchgeführt. Für die Messungen wurde ein 20x, NA 0,40, Ph 1, Plan Objektiv (Olympus, Tokio, Japan) verwendet (vgl. Abbildung 7). Für sämtliche Bildaufnahmen wurde eine Proscilica GX (Allied Vision Technologies GmbH, Stadtroda) genutzt, als Software diente GigE Vision®.



*Abb. 7:* Setup zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit von dissoziierten neuronalen Zellen. Dies wurde mit einem Olympus IX70 (Olympus, Tokio, Japan) mittels einer Phasenkontrast-Beleuchtung durchgeführt.

## 2.5.2 Live-Cell-Imaging

Bei dem Setup für Live-Cell-Imaging war es wichtig, zu gewährleisten, dass während der kompletten Messdauer optimale Bedingungen (Temperatur und CO<sub>2</sub> Begasung) für die Zellen herrschten, da jede Änderung der Umweltbedingungen die Zellen stressen kann und somit Messwerte verfälschen würde. Dieses Messsystem wurde für die jeweiligen Doppelfärbungen verwendet.

Um ein Messklima von 37°C aufrechterhalten zu können, stand das komplette Messsystem unter einer selbstgebauten Styroporkiste, die dafür gesorgt hat, dass störendes Raumlicht abgeschirmt wird. Zudem war es durch die Kiste auch möglich, eine konstante Temperatur von 37°C aufrecht zu halten. Mit Hilfe einer Messdatenerfasskarte (PCI 6024E, National Instruments) und Break Out Box (BNC 2110 National Instruments) und dem Programm Lab View wurde die Heizung am Mikroskop gesteuert. Um die Luft innerhalb der Kiste auf 37° C anzuwärmen, wurde ein Heißluftföhn (Steinel. 3451, Herzebrock-Clarholz) verwendet. Um das System vor einer Überhitzung zu schützen wurde dies über ein Thermostat (ELV, UT100, LEER) geregelt.

CO<sub>2</sub> wurde mit Hilfe eines Schlauches aus dem Zellkulturschrank ausgeleitet. Der Schlauch wurde durch ein kleines Loch im Deckel des Zellkulturschälchens mit dem System verbunden und der CO<sub>2</sub>-Transport aus dem Inkubator mit Hilfe einer Pumpe (Gilson Miniplus2, Gilson) aufrechterhalten. Um Verdunstung und somit eine Reduzierung des Mediums innerhalb der Schälchen zu vermeiden, wurde das CO<sub>2</sub> über eine, im beheizten Innenraum stehende, wassergefüllte Glasflasche geleitet. Somit wurde die Luft angewärmt und angefeuchtet, wodurch die Zellen in der gleichen Atmosphäre wie im Zellkulturschrank wachsen konnten.

Bei dem eigentlichen Messsystem handelte es sich um ein Imic (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) mit einem Polychrome 5000 (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) als Lichtquelle. Das Mikroskop wurde mit der Software Live Acquisition (Version 2.4, Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland), einem motorisierten Mikroskoptisch H101ATP (Prior, Cambridge, UK) mit einem beheizbaren Probenhalter betrieben. Bei der verwendeten Kamera handelte es sich um eine Sensicam QE (PCO, Kelheim) (Abbildung 8).

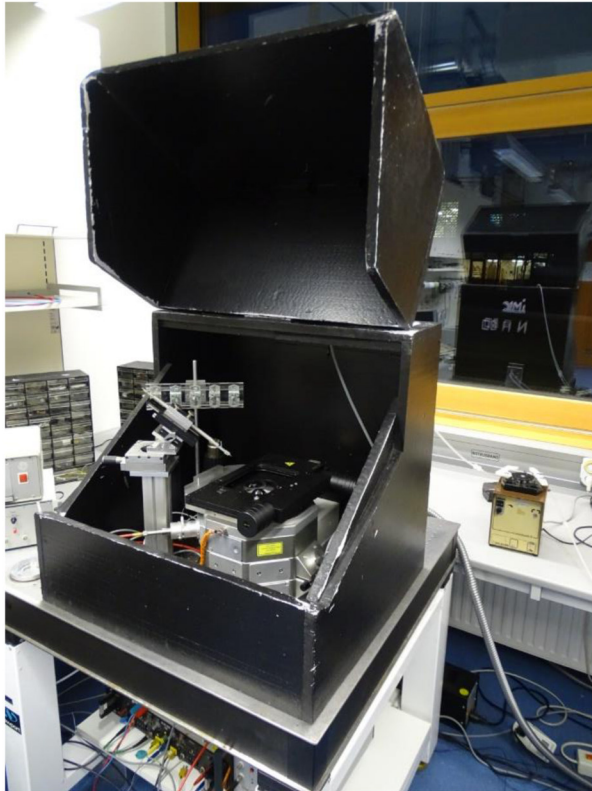


Abb. 8: Gezeigt ist in dieser Abbildung, das für diese Arbeit verwendete Setup für die jeweiligen Live-Cell-Imaging-Aufnahmen. Mit Hilfe der selbstgebauten Styroporkiste war es zum einen möglich, das Raumlicht abzuschirmen und zum anderen konnte so eine konstante Temperatur, für die Zellexplantate, von 37°C generiert werden.

Die Steuerung des Messsystems erfolgte mittels eines digitalen Signalprozessors (ICU, Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland).

Sämtliche Bildaufnahmen wurden mit einem 40x Objektiv (NA 1,35, Öl, OLYMPUS) und den Filtersätzen Fura2 (Ex. SP 410, DC. LP 410 Em. Bright Line 510/84) und dem Filtersatz CFP/YFP gemacht. Die Anregung für den Farbstoff Fura2-AM lag bei 380 nm, Quinacrin wurde bei 420 nm angeregt.

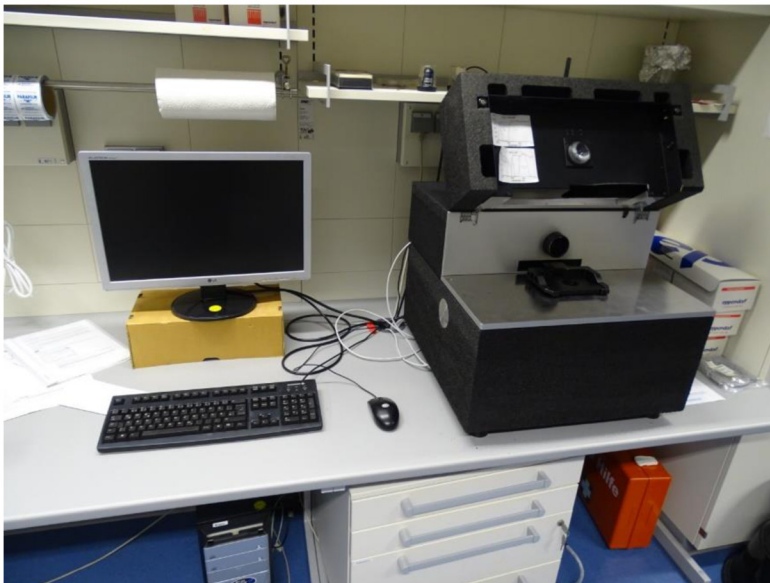


### 2.5.3 Epifluoreszenzmessungen

Dieses Messsystem wurde aufgrund seiner extrem leichten Bedienbarkeit und wegen des guten Durchlichts, welches einem ermöglichte, schon vorab Zellen auszusuchen ohne sie zu bleichen, für die Immunfluoreszenzaufnahmen gewählt.

Die Bildaufnahme wurde mit dem automatischen Epifluoreszenzmikroskop, more (TILL I.D. GmbH, Gräfelfing, Deutschland) und einem Polychrome V Monochromator (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) als Lichtquelle aufgenommen. Das Setup wurde über einen digitalen Signalprozessor (ICU, Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) und der Software (Live Aquisition, Version 2.4, Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) gesteuert (vgl. Abbildung 9).

Für diese Bildreihe kam ein 60 x Objektiv (NA 1,35, Öl, OLYMPUS) zum Einsatz. Zellen wurden mit einer LED bei 470 nm angeregt und mit einem DAPI-Filtersatz bei einer Belichtungszeit von 750 ms gemessen.



*Abb. 9:* Zeigt ein Epifluoreszenzmikroskop, more der Firma TILL I.D. GmbH (Gräfelfing, Deutschland). Als Lichtquelle kam ein Polychrome V Monochromator (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) zum Einsatz.

## 2.6 Versuchsablauf

Das Vermessen der ausgewachsenen Neurite erfolgte im Anschluss an das Präparieren, Dissoziieren und schlussendliche Fixieren der Zellen, welches unter 2.2.9 ausführlich beschrieben ist. Die mit Formaldehyd fixierten und PBS überschichteten Schälchen konnten bis zur Messung am darauf folgenden Tag in einem Weinklimaschrank (WKw 1806, Liebherr, Biberach) bei +16°C gelagert werden.

Das Aussähen von 3-4 Neuronen / mm<sup>2</sup> (klonale Dichte) [72] war nötig, um die Neurone im bestmöglichen Abstand zueinander auswachsen lassen zu können. Das vorherige Verblinden der Schälchen von einer außenstehenden Person ermöglichte es dem Experimentator, objektiv jedes Neuron auf die vorab aufgestellten Kriterien hin zu überprüfen ohne, dass Erwartungshaltungen die Auswahl beeinträchtigen. Kriterien für Neurone waren, dass der Neurit mit seinem Wachstumskegel gut erkennbar war. Durch die vorangegangene Fixierung war es möglich, dass trotz der richtig temperierten und frisch hergestellten Fixierlösung Zellen, auf diesen Vorgang, mit einem Kollaps oder mit einem Zurückziehen des Neuriten reagierten. Auch mechanische Einwirkungen, wie das Zugeben der Fixationslösung, konnten zu einer Beschädigung der Neuriten führen. Auf diese Weise beeinträchtigte Zellen wurden von der Messung ausgeschlossen. Weiter war es wichtig, darauf zu achten, dass die Zellen weitestgehend separiert von anderen Zellen gewachsen sind. Damit ist gemeint, dass sich die Neuriten nicht treffen oder übereinander wachsen, da dieser Assay auf Grund der Annahme von autokrinen Mechanismen im Wachstumskegel entstanden ist und somit parakrine Wirkungen weitestgehend vermieden werden sollten. Von den ausgewählten Neuriten wurde mit dem unter 2.5.1 beschriebenen Setup ein Phasenkontrastbild gemacht. Alle weiteren Schritte wurden unter Zuhilfenahme des Programmes ImageJ durchgeführt.

## 2.7 Auswertung der Bilder

ImageJ ist ein in Java geschriebenes Open Source Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm, entwickelt von Wayne Rasband. Das Programm kann durch eine Vielzahl an Plugins erweitert werden, wodurch es ein großes Anwendungsgebiet gerade in der medizinischen und wissenschaftlichen Bildbearbeitung findet.

Die manuelle Auswertung der Bilder wurde in dieser Arbeit mit dem ImageJ Plugin, NeuronJ durchgeführt. Da das Plugin NeuronJ auf fluoreszenzgefärbte Bilder ausgelegt ist [77], somit also helle Neurone auf dunklen Hintergrund erkennen kann, mussten die mit Phasenkontrast aufgenommenen Bilder mit dem Standardtool von ImageJ invertiert werden. Die Neuritenlänge konnte mit Hilfe eines Tracingwerkzeuges bestimmt werden, wobei der erste Markierungspunkt am Stoma lag und der Endmarkierungspunkt in der Mitte des Wachstumskegels. Zur Messung wurde immer nur der längste Neurit des Neurons ausgewählt. Die so erhaltenen Längen der einzelnen Neuriten konnten dann weiter in eine Excel-Tabelle übertragen werden. Die von NeuronJ ausgegebenen Daten stellten Pixel-Werte dar und mussten anschließend noch in  $\mu\text{m}$  umgerechnet werden. Anhand dieser Daten konnte dann die neuronale Gesamtlänge bestimmt werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism.

## 2.8 Auswertmethode

Während ein Live-Cell-Assay aus technischen Gründen nur geringe Stichprobenumfänge ermöglicht, ist es mit dissoziierten und fixierten Zellen möglich, eine weit größere Zahl an Zellen im gleichen Zeitraum zu untersuchen. Im Live-Cell-Assay wurde jede einzelne Zelle als statistisch unabhängiges Ereignis behandelt. Gleiches ist auch im Fall der dissoziierten und fixierten Zellen sinnvoll, da das Zellsystem gezielt darauf optimiert wurde, dass die Zellen so weit von anderen entfernt wachsen, dass eine gegenseitige Beeinflussung weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Zwar sind Schwankungen, die vom jeweiligen Schälchen abhängen, denkbar (Beschichtung, mechanische Einflüsse), jedoch wurde bei der Durchführung der Experimente auf möglichst große Reproduzierbarkeit Wert gelegt. Der Auswertung auf Schälchenbasis steht entgegen, dass hierbei Schälchen, in denen weniger Zellen ausgewertet werden, eine höhere Gewichtung erhalten würden. In der Literatur findet man in vergleichbaren Fällen sowohl Auswertung auf Einzelzellbasis (wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden) als auch auf Schälchenbasis [78, 79].

## 2.9 Verwendete Software

Word 2013, Excel 2013, (Microsoft Corporation Version 1.3.1.8), Adobe® Illustrator® CS2 (Adobe Systems Inc., San José, USA), Live Acquisition (Version 2.4, Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland), ImageJ Version 1.37I (National Institutes of Health), GraphPad Prism 5 (Version 5.02, GraphPad Software, Inc.)

## 3.0 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es zu einem, zu analysieren, welcher Adenosinrezeptor oder welcher Zusammenschluss von Rezeptoren das Wachstum neuronaler Zellen beeinflussen kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der Aktivierung der Adenosinrezeptoren ein autokriner Adenosin-Loop zu Grunde liegt. Diese Arbeit kann funktionell in folgende zwei Abschnitte gegliedert werden, wobei die einzelnen Unterkapitel meist voneinander abhängen oder aufeinander aufbauen.

- Untersuchung des Einflusses der vier verschiedenen Adenosinrezeptoren auf das Wachstum von sensorischen Neuronen
- Auswirkungen auf den neuronalen Wachstumsprozess durch den aktiven Abbau von purinergen Substanzen sowie das Blocken von nukleotidabbauenden Enzymen (NTPDasen)

## 3.1 Meß- und Modellsystem

### 3.1.1 Auswahl und Etablierung des Meßsystems

Benjamin Grau konnte 2004 in seiner Dissertation zeigen, dass der  $A_{2a}$ -Rezeptor, ein Familienmitglied der P1-Adenosinrezeptoren, Einfluss auf das Richtungswachstum neuronaler Zellen hat [80]. In weiteren Arbeiten konnte sowohl mit einem Live-Cell Assay als auch mit einem Wachstumsassay gezeigt werden, dass durch Hemmung der Adenosinrezeptoren nicht nur Einfluss auf das Richtungswachstum sondern auch auf die Geschwindigkeit bzw. auf die Gesamtlänge der neuronalen Fortsätze genommen werden kann [81, 82].

Im Rahmen der vorangegangenen Bachelor- und Masterarbeiten zeigte sich, dass für Experimente bezüglich des neuronalen Wachstums und die mögliche Beteiligung der Adenosinrezeptoren der hier verwendete Wachstumsassay am geeignetsten ist. Dies liegt zum einen daran, dass der Stichprobenumfang an den Messtagen deutlich höher ist als es zum Beispiel mit einem Live-Cell Assay möglich wäre. Der gewichtigste Grund ist jedoch, dass in diesem Assay die Zellkultur aus dissoziierten, selektierten und in einer geringen Dichte von 3-4 Zellen pro  $\text{mm}^2$  ausgesäten Neuronen bestand. Durch das Dissoziieren und Selektieren, war es möglich, eine Zellkultur zu generieren die zu mindestens 85% aus neuronalen Zellen besteht.

Sowohl durch das Selektieren als auch durch das Aussäen in dieser geringen Dichte konnten parakrine Wirkungsmechanismen zwischen den Zellen weitestgehend unterbunden werden. Im Gegensatz dazu finden sich in einem Live-Cell-Assay, in welchem Ganglienexplantate für die Messungen verwendet werden, in umliegender Nähe sowohl neuronale als auch nicht neuronale Zellen in der Zellkultur. Dadurch ist es möglich, dass in diesem System Zellen, zum Beispiel durch parakrine Einflüsse von neuronalen oder auch nicht neuronalen Zellen, massiv beeinflusst werden können. Werden die Ganglien jedoch dissoziiert, selektiert und in einer klonalen Dichte von 3-4 Zellen pro  $\text{mm}^2$  [72] ausgesät, kann vermieden werden, dass Zellen in unmittelbarer Nähe einen positiven oder negativen Einfluss auf das Wachstum der Neurone haben. Ein Nachteil dieser Messmethode ist der hohe Zeitaufwand, der bei ca. 11 Stunden pro Versuchstag liegt. Als Modellsystem dieser Arbeit wurden Hühnerembryonen (E11) verwendet.

Der genaue experimentelle Ablauf ist in Kapitel zwei detailliert beschrieben. Im ersten Arbeitsschritt mussten die Hinterwurzelganglien entnommen und geputzt werden. Der zweite Arbeitsschritt bestand im Dissoziieren und Selektieren. Anschließend konnten die Zellen in der richtigen Dichte, 3-4 Zellen pro  $\text{mm}^2$ , ausgesät und inkubiert werden. In vorangegangenen Arbeiten zeigte sich, dass die Zellen 2 Stunden benötigen, um abzusinken und anzuhafte. Nach exakt dieser Zeit fand ein Mediumwechsel statt, im Zuge dessen den Zellen der jeweilige Agonist bzw. Antagonist zugesetzt wurde. Das Abstoppen der jeweiligen Substanzen fand nach weiteren 5,5 Stunden mittels einer Glucose/Formaldehyd-Fixationslösung statt. Auf Grund fehlender Erfahrung zur Haltbarkeit von formaldehydfixierten Präparaten sah das Protokoll vor, die Zellen innerhalb der nächsten 12 Stunden nach Fixierung zu vermessen. Bis zur eigentlichen Messung fand die Aufbewahrung der Schälchen in einem Weinklimaschrank bei  $16^\circ\text{C}$  statt.

Das oben beschriebene Verfahren, in welchen die Neurone erst nach zwei Stunden des Absinkens und Anhaftens durch Zugabe der Substanzen stimuliert bzw. inhibiert werden, hat zur Folge dass nur Aussagen über die Gesamtlänge getroffen werden können. Eine Aussage über die Wachstumsgeschwindigkeit kann durch diese Untersuchungsmethode nicht gemacht werden.

Geschwindigkeit wird definiert als:

$$\frac{s \text{ (Strecke)}}{t \text{ (Zeit)}} = v \text{ (Geschwindigkeit)}$$

Der Zeitpunkt des Aussäens der Neurone kann zwar als Beginn des Wachstums der Neurone festgelegt werden, da zuvor durch das Präparieren, putzen und dissoziieren der Neurone, nur Zellkörper ohne jeglichen Neuriten auf die Schälchen ausgesät werden. Jedoch konnte über die ersten zwei Stunden in denen die Neurone ans Substrat anhaften und sich akklimatisieren, mit diesem Assay keine Länge gemessen werden, welche als Basiswert für alle Versuche herangezogen werden konnte. Um Aussagen über die Geschwindigkeit treffen zu können müsste klar definiert sein, wann der Zeitpunkt Null des Auswachsens ist. In Vorversuchen wurde getestet, ob es möglich ist, einen Mittelwert für diese Anfangszeit zu generieren, der dann auf die Versuchstage umgelegt werden kann. Das Problem hierbei ist aber, dass es drei verschiedene Möglichkeiten der Zellwachstumsstadien zum Zeitpunkt nach zwei Stunden gibt. Erstens, Neurone können schon Neuriten ausgebildet haben. Zweitens, Neurone haben noch keine Neuriten ausgebildet, sind aber nicht abgestorben, sondern brauchten nur länger zum anhaften und akklimatisieren und beginnen zu einem späteren Zeitpunkt mit der Ausbildung von Neuriten. Drittens, Neurone sind abgestorben und bilden keine Neuriten aus. Wenn nach zwei Stunden fixiert wird, kann deshalb nicht zwischen Zellen die noch keine Neuriten gebildet haben und Zellen die keinen Neurit bilden werden unterschieden werden. Für Versuche dieser Art scheint ein Live-Cell-Imaging-Assay geeigneter. Hierbei muss jedoch darauf geachtet werden, dass diese Versuche ein Setup benötigen, in welchem sich die Zellen in einem annähernd optimalen Klima entwickeln können. Dazu zählen die Begasung mit CO<sub>2</sub> und eine weitestgehend konstante Temperatur von 37°C.

### 3.1.2 Modellsystem Hühnerembryo

Auf Grund seiner extrauterinen Embryonalentwicklung, der einfachen Bestimmung der Embryonalstadien und der raschen (dreiwöchigen) Ontogenese ist das Hühnerei ein geeignetes Modellsystem für viele Forschungsstudien. Schon in der Antike diente das Hühnerei als erstes Modellsystem zur Untersuchung des embryologischen Systems. Vor mehr als 2000 Jahren, im 4. Jahrhundert vor Christus, führte schon der Philosoph und Naturforscher Aristoteles (384-322 v.Chr.) Forschungen zur Embryonalentwicklung an Hühnereiern durch. Seine favorisierte Theorie, dass die Struktur und Entwicklungsform der Embryonen stufenweise vorangeht und nicht in kleinster Form, vollständig ausgebildet schon im Ei vorliegt, stellte sich als richtig heraus [83]. Jedoch teilten die meisten Forscher bis ins späte 17. Jahrhundert die Ansicht, dass es durch physikalische und chemische Kräfte nicht möglich ist, einen Embryo zu formen und somit der Embryo in seiner Form schon von Anbeginn vorgefertigt sein muss. Nur ein englischer Arzt, Harvey Williams (1578-1657), welcher auch intensive Forschungen an Hühnereiern durchführte, wandte sich gegen diese Vorstellung [83]. Er prägte den Satz „*ex ovo omnia*“, was so viel bedeutet wie „alles stammt aus dem Ei“ aber war auch der Meinung, dass sich der Embryo aus einer ungeformten Grundsubstanz formt [83, 84]. Die Präformationstheorie, der Organismus ist schon vollständig entwickelt und muss nur noch wachsen, und die Theorie über die Epigenese, das Leben bildet sich aus einer Grundsubstanz, waren bis in das 19. Jahrhundert ein Streitthema in der Wissenschaft [83]. Erst die Erkenntnis der beiden Naturforscher Theodor Schwann und Jakob Matthias Schleiden 1858, dass die Zelle als elementarer Baustein lebender Gewebe und Organismen [85] der Anfang allen Lebens ist, konnte diese wissenschaftliche Frage klären.

Laut der Firma Bayer AG Leverkusen betrug der prozentuale Anteil von Nagern als Versuchstiere in der medizinischen Forschung in Bayern, zu welchen unter anderem Mäuse und Ratten zählen, 95,8%. Vögel hingegen kamen in Bayern laut dieser Statistik nur auf 0,1% (siehe Abbildung 10) im Jahre 2014.



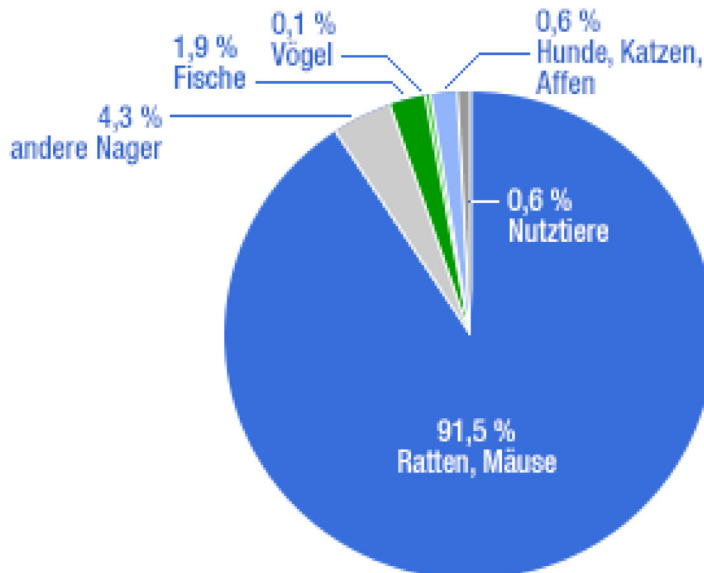


Abb. 10: Prozentuale Aufteilung von Versuchstieren in der medizinischen Forschung in Bayern. Diese Abbildung wurde von der Firma Bayer AG Leverkusen für das Jahr 2014 und den Freistaat Bayern erstellt und entspricht der Originalabbildung.

Trotz dieser niedrigen Zahlen und den Fortschritten in der Forschung, in welchen Modellorganismen, wie zum Beispiel Tumorzellen für ein breites Spektrum an Versuchen genutzt werden können, hat das Modellsystem Hühnerembryo noch nicht an Attraktivität verloren. Gründe hierfür liegen zum einen am extrem kostengünstigen Arbeiten mit diesem Versuchsmodell. Für das Heranwachsen der Embryonen im Ei wird nur ein Brutschrank benötigt. Kosten für einen Tierstall und Personal, das die Tiere versorgt und die Ställe reinigt, fallen weg. Ein weiterer, wenn auch geringer Kostenanteil, der jedoch nicht vergessen werden darf, sind die Ausgaben für Futtermittel, welche bei Versuchen mit Hühnerembryonen ebenfalls wegfallen. Ein weiterer Vorteil ist die extrauterine Entwicklung des Embryos. Es ist also nicht wie bei Nagern nötig, das Muttertier zu töten um an die noch ungeborenen Jungen dieses Tieres heranzukommen. Mit ein Grund für dieses Modell ist auch die einfache Bestimmung der Phasen der Embryonalentwicklung. Des Weiteren können Bruteier kostengünstig bezogen werden. Das Präparieren, beispielsweise von Hinterwurzelganglien, ist im Huhn sehr einfach, da im Embryonalstadium diese Strukturen noch gut sichtbar außerhalb der Wirbelsäule liegen. Das bedeutet für den Präparator eine erhebliche Zeitersparnis. Einer der wichtigsten Punkte ist jedoch die Handhabung der zur Verfügung stehenden Embryonen. Durch das gezielte und zeitlich abgestimmte Einlegen der Bruteier in einen Brutschrank ist es für den Experimentator zu jedem Zeitpunkt möglich, Hühnerembryonen im benötigten Embryonalstadium für Versuche bereitstehen zu haben.

Hühnerembryonen als Versuchstiere haben aber nicht nur Vorteile. Dass Nager und im speziellen Mäuse für die biologische Forschung enorm wichtig sind, ist bekannt und wird auch klar in der von der Firma Bayer AG Leverkusen veröffentlichten Statistik, bei welcher der prozentuale Anteil von Nagern über 90% ausmacht. Das Mausmodell ist ein sehr gut verstandenes und etabliertes System, bei welchem schon 2002, als zweites Säugetier überhaupt, die komplette Genomsequenz veröffentlicht wurde. Des Weiteren ist die Anzahl der Gene von ca. 21000 dem Genom des Menschen in der Anzahl als auch in 99% der Sequenz, mit artspezifischen Abwandlungen und umgekehrt, extrem ähnlich [86]. Auf Grund des viel verwendeten Modellsystems Maus ergeben sich Probleme für Experimente mit Hühnerembryonen. Dadurch, dass besonders Nagetiere sehr viel in der medizinischen und biologischen Forschung verwendet werden, sind meist Antikörper und Inhibitoren auf diese Gattung ausgelegt und an diesen erprobt. Die von den Firmen empfohlenen Konzentrationen und Wirkungssysteme zielen auf Versuche mit Labortieren wie Ratten oder Mäusen ab. Aus diesem Grund sind manche pharmazeutischen Produkte, wie beispielsweise Inhibitoren nur in eingeschränktem Maße oder auch gar nicht für andere Modellsysteme empfehlenswert. Ein weiterer Vorteil von Mäusen und zugleich ein Nachteil beim Einsatz von Hühnerembryonen ist, dass es durch die Kreuzung unterschiedlicher Mäuse und besonders durch den Einsatz transgener Mäuse möglich ist, zum Beispiel Mäuse zu generieren, welchen gewisse Eigenschaften fehlen. Für diese Arbeit konkret gäbe es eine transgene  $A2a^{-/-}$  Adenosin Rezeptor Maus ( $A_{2a}$  knockout Maus), welche gerade bei der Antikörperfärbung als Negativkontrolle einen erheblichen Mehrwert dargestellt hätte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es für und gegen das Modellsystem der Hühnerembryonen einige Argumente gibt. In dieser Arbeit ist jedoch bewusst das Modellsystem Huhn gewählt worden. Aufgrund des sehr zeitaufwendigen Wachstumsassays kam die leichte und weniger zeitintensive Präparation der Hinterwurzelganglien diesem Assay sehr entgegen. Weiter war es auf Grund des schnellen Heranreifens und der hundertprozentigen Kontrolle, wann welches Embryonenstadium zu Versuchszwecken vorliegt, gut möglich einen hohen Stichprobenumfang zeitnah zu reproduzieren und zu messen.

## 3.2 Untersuchung der beteiligten Rezeptoren am Wachstum sensorischer Neurone

### 3.2.1 Einfluss des A<sub>2a</sub>-Rezeptors auf das Wachstum sensorischer Neurone

In diesem Versuchsteil sollte die Frage geklärt werden, ob Adenosinrezeptoren Einfluss auf das Wachstum sensorischer Neurone des Modellsystems *Gallus gallus* haben. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden durch Zugabe von Agonisten und Antagonisten die einzelnen Adenosinrezeptoren stimuliert oder geblockt und das neuronale Wachstum mittels eines Wachstumsassays gemessen.

Das heutige Wissen über den biologischen Einfluss von Adenin und seinen Nucleotiden geht auf das Jahr 1929 zurück. Die beiden Wissenschaftler Drury und Szent-Györgi beschrieben den Einfluss von Adeninnucleosiden und seinen Nucleotiden auf das kardiovaskuläre System [46]. Es sollte jedoch fast 50 Jahre dauern bis Geoffrey Burnstock 1978 purinerge Rezeptoren klassifizierte. Bis heute gilt diese Klassifizierung, bei welcher die Familie der P1-Rezeptoren (Adenosinrezeptoren) durch den physiologischen Agonisten Adenosin aktiviert wird. Die purinergen P2-Rezeptoren hingegen können durch ATP, ADP oder andere Nucleotide aktiviert werden [87].

Als Agonist wird eine Substanz oder ein Ligand verstanden, welcher durch die Besetzung eines Rezeptors eine bestimmte Aktivierung des Rezeptorproteins den natürlichen Liganden nachahmt [88]. Die in diesen Versuchsabschnitten verwendeten Liganden sind zumeist chemische Verbindungen, welche den eigentlichen Botenstoff in seiner Wirkung imitieren.

2-(p-(2-carboxyethyl)phenylethylamino)-5'-N-ethylcarboxamido-Adenosin (CGS 21680) ist als erster hoch selektiver A<sub>2a</sub>-Rezeptoragonist in der Literatur beschrieben. Seine hohe Affinität für den A<sub>2a</sub>-Rezeptor wurde experimentell an Ratten nachgewiesen [89]. CGS 21680 ist ein synthetisch hergestellter Agonist, dessen Grundgerüst die gleichartige Struktur wie der natürliche Agonist Adenosin darstellt, mit dem Substituent (2-carboxyethyl)phenylethylamino-Gruppe an der C2 Position vom Adenin und dem Substituent Nethylcarboxamido-Gruppe am C5' der Ribose [90]. In Abbildung 11 ist die Struktur von CGS 21680 gezeigt.

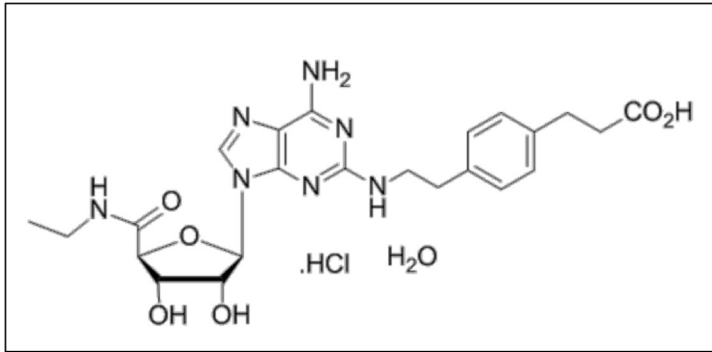


Abb. 11: Strukturformel des hochselektiven  $A_{2a}$ -Adenosin-Rezeptoragonisten CGS 21680. Abbildung entspricht dem Original, entnommen von Merck Millipore.

Hintergrund der durchgeführten Experimente sind sowohl die gemessenen Richtungsänderungen von Neuronen durch die Stimulation mit CGS 21680 [45] als auch die in Ganglienexplantaten gemessene Zunahme des Längenwachstums bedingt durch diesen Agonisten [91]. Des Weiteren ist der Literatur zu entnehmen dass dieser Agonist mit einem  $K_i$ -Wert von 27nM eine hohe Affinität für den menschlichen  $A_{2A}$ -Rezeptor hat [92]. Aufgrund der Datenlage innerhalb dieser Arbeitsgruppe und der in der Literatur beschriebenen Spezifität dieses Agonisten für den Adenosinrezeptor  $A_{2a}$ , nicht nur für den menschlichen  $A_{2a}$ -Rezeptor sondern auch in Ratten [89], wurde CGS21680 für die spezifische Stimulation in diesem Versuchsteil gewählt.

Dieses Experiment sollte Aufschluss im Hinblick auf den möglichen Einfluss purinerner Rezeptoren auf die Gesamtlänge des Wachstums von dissoziierten sensorischen Neuronen geben. Die vorangegangene Diplomarbeit von Silvio Bürge zeigte, dass durch Zugabe von CGS21680, in einem Live-Cell-Assay an Ganglien-Explantaten, eine Zunahme im Längenwachstum gemessen werden kann. Es sollte getestet werden, ob dieser Effekt auch in einem Wachstumsassay an dissoziierten einzelnen Neuronen vorliegt. Die verwendete Konzentration von CGS 21680 betrug 100nM und orientierte sich an den schon vorangegangenen Arbeiten, um trotz der verschiedenartigen Assays anhand der gleichen Konzentrationen Vergleiche ziehen zu können.

Ein entscheidender Unterschied zu einem Live-Cell-Assay liegt in der Auswahl der zu vermessenden Neuriten. Bei Live-Cell Imaging können die zu vermessenden Neuriten aktiv beobachtet und vermessen werden, wodurch jeder Neurit, der sich nicht innerhalb einer Messung zurückzieht oder kollabiert, in die Auswertung miteinbezogen werden kann. In einem fixierten Zellkultursystem, wie es in diesem Assay genutzt wurde, ist dies nicht möglich. Aus diesem Grund wurde vorab festgelegt, dass der längste Neurit eines jeden Neurons als Maß für die Gesamtlänge vermessen wird. Um eine Aussage über den Einfluss des spezifischen A<sub>2a</sub>-Rezeptoragonisten CGS 21680 auf das Längenwachstum neuronaler Zellen treffen zu können, war es nötig gegen die dazugehörigen Kontrollen zu testen. Kontrollschälchen wurden mit der gleichen Menge an DMSO stimuliert, die auch zum Lösen von CGS 21680 verwendet wurde. An keinem der Versuchstage konnte auf Kontrollmessungen verzichtet werden, da deutliche Schwankungen im Gesamtlängenwachstum der durchgeführten Messtage zu verzeichnen waren. Daher wurde an den jeweiligen Messtagen etwa die gleiche Anzahl von Neuronen in den stimulierten Schälchen und der Kontrolle ausgewählt. Die statistische Auswertung der Gesamtlängen fand auf Basis der einzelnen Neurone statt. Hierfür wurden Neurone aller Messtage in die Auswertung einbezogen und nicht die Mittelwerte auf Schälchenbasis verglichen. Der Grund hierfür war, dass durch Einbeziehen jedes einzelnen Neurons keine Gewichtung der verschiedenen Versuchstage stattfand. Die statistische Überprüfung der Wachstumsmessungen mit dem Programm GraphPad ergab, dass diese nicht normalverteilt sind und somit mittels des Mann-Whitney-Test auf Signifikanz hin überprüft werden konnten. Dieser Versuchsteil ergab, dass durch Stimulation mit 100nM CGS 21680 (n=141) die Gesamtlänge der Neuriten signifikant (p=0,0431) um 9,2% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (n=158) gesteigert werden konnte (vgl. Abb. 12 und Tab. 1).

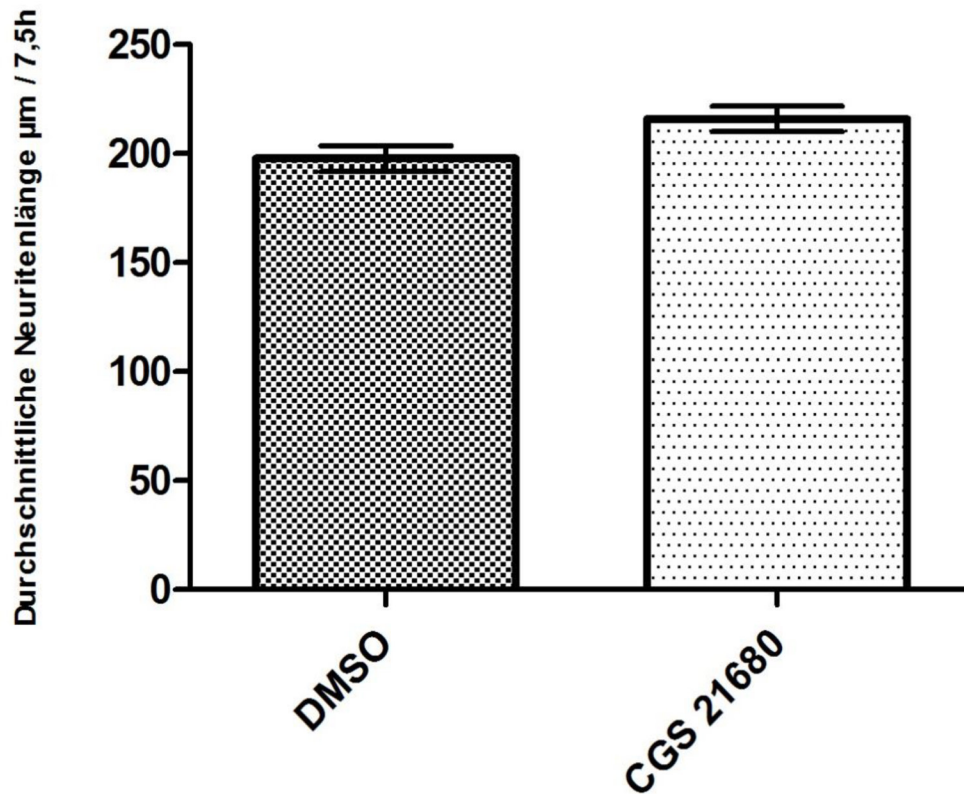


Abb. 12: Einfluss von CGS 21680 auf das Wachstum der Neuriten dissoziierter Neurone des Haushuhnes (*Gallus gallus*). Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge der mit dem spezifischen  $A_{2a}$ -Agonisten CGS 21680 (100nM) stimulierten Neurone im Vergleich zur Kontrolle nach einer Wachstumszeit von 7,5h. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Wachstum der Neuriten dissoziierter Neurone der Hinterwurzelganglien durch Zugabe von CGS 21680 (n=141) im Vergleich zu der DMSO Kontrolle (n=158) von 197,7  $\mu\text{m}$  auf 215,9  $\mu\text{m}$  signifikant ( $p=0,431$ ) steigern lässt. Das ergibt eine Wachstumssteigerung von 9,2 %. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-Test bestimmt, da es sich bei den gemessenen Werten um keine Normalverteilung handelt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

Im Rahmen von neuen Experimenten innerhalb der Arbeitsgruppe, in welchen untersucht wurde, ob und in welchen Mengen Nukleotide im Zellkulturmedium vorliegen, konnte in Übereinstimmung mit [93] festgestellt werden, dass nicht nur keine Nukleotide in den einzelnen Substanzen des Zellkulturmediums vorliegen, sondern auch, dass im FCS nukleotidabbauende Enzyme vorkommen [94]. Aufgrund von fehlenden Kenntnissen über die Menge und Aktivität an nukleotidabbauenden Enzymen, die durch das FCS im Zellkulturmedium vorliegen könnten, und dem nicht bekannten Einfluss auf das *in vitro* Zellsystem, war es auf Basis dieser neuen Erkenntnisse unumgänglich, die Zusammensetzung des Zellkulturmediums zu verändern. Fötale Kälberserum ist ein Tierprodukt und beinhaltet eine Vielzahl an unterschiedlichen Komponenten, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Hormone Adhäsionsmoleküle, Cytokine, Aminosäuren und auch Vitamine. Diese immense Fülle an wachstumsfördernden Substanzen macht das Serum zu einer idealen Nahrungsquelle für *in vitro* Zellkulturen [95]. Da das Serum eine Hauptnahrungsquelle im Zellkulturmedium darstellt, ist es nicht möglich dieses ersatzlos aus dem Medium zu entfernen. Eine Vielzahl an Herstellern bietet unterschiedlichste chemisch definierte Fertigmedien an, um serumfreie Nährlösungen herstellen zu können. Als Serum-Ersatz kam in allen weiteren Versuchen das chemisch definierte Fertigmedium N1-supplement zum Einsatz. N1-supplement, bestehend aus Insulin, Transferrin, Putrescin, Progesteron und Selenit, ist ein aus der Literatur bekannter Zusatz, welcher für *in vitro* Versuche mit Hinterwurzelganglien von Hühnern geeignet ist, wobei für das Wachstum der Neurone von E11-Hühnerembryonen nur Insulin und Transferrin wichtig ist [96]. Des Weiteren war dieses Fertigmedium in dieser Arbeitsgruppe schon etabliert und wurde aus diesen Gründen als Ersatz für FCS in den weiteren Versuchen verwendet.

Auf Grund der Umstellung des Zellkulturmediums von serumhaltigem auf serumfreies Medium sollte im nächsten Experimentabschnitt überprüft werden, ob es auch im serumfreien Medium möglich ist, das Wachstum durch Blocken der Adenosinrezeptoren mit CGS 15943 zu hemmen. Dieses Experiment wurde zur Überprüfung des geänderten Assays gewählt, da in vorangegangenen Arbeiten das Blocken der Adenosinrezeptoren mit CGS 15943 zu einer signifikanten Verlangsamung der Gesamtlängen der Neuriten geführt hat [97] und diese Daten zum Vergleich herangezogen werden konnten.

Antagonisten bezeichnen Substanzen, welche sich reversibel mit dem jeweiligen Rezeptor verbinden, aber im Gegensatz zum Agonisten keine Aktivierung auslösen [88]. Gleichzeitig blockieren sie die Rezeptoren konzentrationsabhängig und der natürliche Agonist, in diesem System Adenosin, verliert seine Wirksamkeit. Als erster nicht-Xanthiner Adenosinantagonist wurde 9-chloro-2-(2-furanyl)-{1,2,4}-triazolo{1,5-c}quinazolin-5-amine (CGS 15943) beschrieben [98]. Die chemische Struktur dieses Antagonisten ist in Abbildung 13 gezeigt.

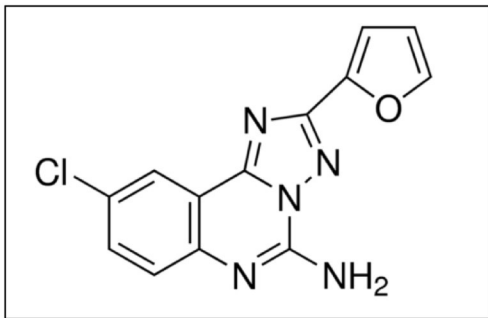


Abb. 13: Strukturformel des nicht spezifischen Adenosinrezeptor-Antagonisten CGS 15943. Abbildung entspricht dem Original, entnommen von Sigma-Aldrich GmbH.

CGS 15943 ist in der Literatur als potenter, unspezifischer Adenosinrezeptor-Antagonist beschrieben [99]. Die für diesen Versuch gewählte Antagonistenkonzentration lag bei  $9\mu\text{M}$ . Mit einem  $K_i$ -Wert von  $3,5\text{ nM}$  für den  $A_1$ ,  $4,2\text{ nM}$  für den  $A_{2a}$ ,  $910\text{ nM}$  für den  $A_{2b}$ -Rezeptor und  $51\text{ nM}$  für den  $A_3$ -Rezeptor [99] war es nötig, diese hohe Konzentration zu wählen, um nicht nur einzelne Rezeptoren zu blocken. Wie auch schon in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt wurde [97], ist es auch im serumfreien Medium möglich, durch Zugabe von CGS 15943 das Wachstum, gegen die Kontrolle gemessen, zu verlangsamen. Die Kontrollgruppe erreichte im Durchschnitt eine Neuritenlänge von  $217,3\mu\text{M}$  in 7,5 Stunden. Das Inhibieren der Adenosinrezeptoren führte dagegen nur noch zu einer durchschnittlichen Länge der Neuriten von  $180,7\mu\text{M}$  in 7,5 Stunden. Bei einem Stichprobenumfang von  $n=120$  für CGS 15943 und  $n=110$  für die Kontrolle mit DMSO ergab sich eine signifikante ( $p<0,0001$ ) Verringerung der Gesamtlänge der Neuriten von  $16,84\%$  (vgl. Abb. 14 und Tab. 1).



Eine vorangegangene Bachelorarbeit zeigte, dass in serumhaltigem Medium durch das Blockieren der Adenosinrezeptoren mit CGS 15943 die Länge der Neuriten vermindert werden kann [82]. Auf Grundlage dieser Daten konnte nachgewiesen werden, dass der Austausch des Serums gegen ein chemisch definiertes Fertigmedium (N1-supplement) im Zellkulturmedium keine Auswirkungen auf die Messergebnisse hat. Gestützt auf diese Daten konnten alle weiteren Versuche in serumfreiem Medium durchgeführt werden.

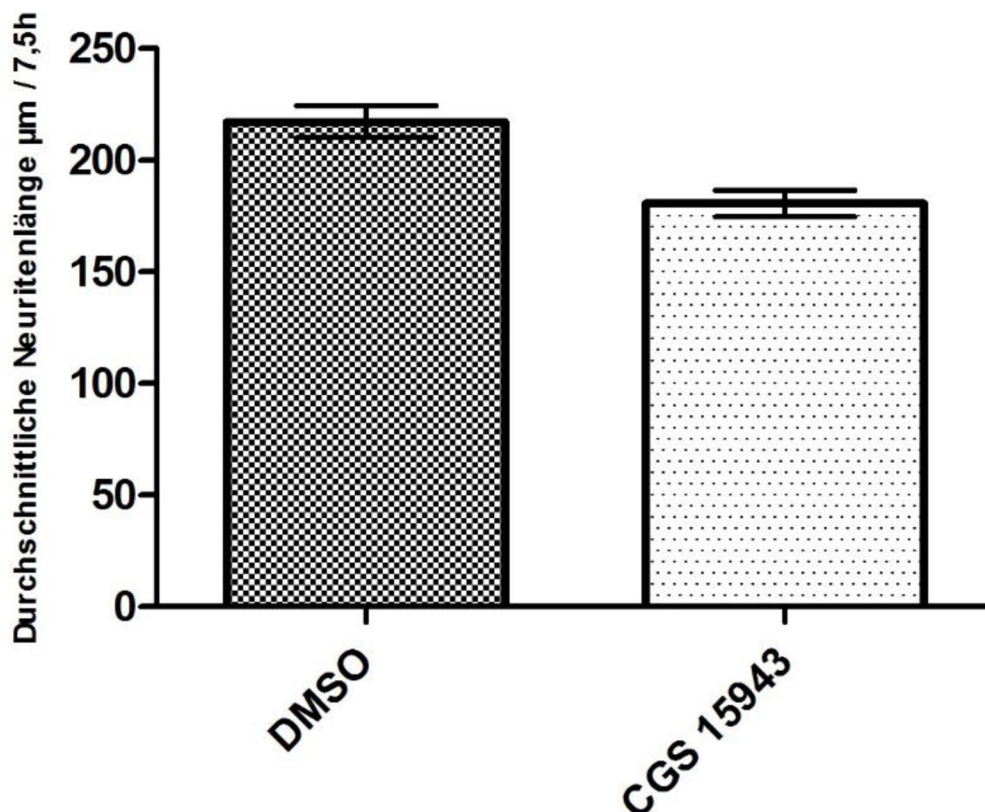


Abb. 14: Einfluss von CGS 15943 auf das Wachstum der Neuriten dissoziierter Neurone des Haushuhnes (*Gallus gallus*) in serumfreiem Medium. Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge, nach Zugabe des Adenosinrezeptor-Antagonisten CGS 15943 (9 µM), im Vergleich zur Kontrolle nach einer Wachstumszeit von 7,5h. Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Neuriten dissoziierter Neurone der Hinterwurzelganglien, durch das Blockieren mit CGS 15943 (n=120) im Vergleich zu der DMSO Kontrolle (n=110) von 217,3 µm auf 180,7 µm signifikant ( $p < 0,0001$ ) verringert werden konnte. Das ergibt eine Wachstumsminde rung von 16,84 %. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-Test bestimmt, da es sich bei den gemessenen Werten um keine Normalverteilung handelt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

### 3.2.2 Einfluss des A<sub>2b</sub>-Rezeptors auf das Wachstum sensorischer Neurone

Ziel dieses Experimentes war es, mit Hilfe eines spezifischen Agonisten und Antagonisten zu klären, ob auch dieser Rezeptor Einfluss auf das Längenwachstum sensorischer Neurone hat.

Der A<sub>2b</sub>-Rezeptor ist zu diesem Zeitpunkt der noch am wenigsten erforschte und verstandene Rezeptor der Adenosin-Rezeptorfamilie. Insbesondere seine niedrige Affinität für Adenosin, die laut Literatur bei 5,1  $\mu\text{M}$  liegt [100], stützt die Annahme, dass dieser Rezeptor in Situationen, in denen vermehrt Adenosin ausgeschüttet wird, eine Rolle spielt. Die genaue Aufklärung der verschiedenen Funktionen dieses Rezeptors bildet die Grundlage für die Erforschung neuer therapeutischer Mittel [101]. Besonders in Hinblick auf Therapien von entzündlichen kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes und auch Asthma wird diesem Rezeptor eine wichtige Funktion zugeschrieben [101, 102]. Im Zuge dieses erheblichen Interesses an diesem Rezeptor als neues Zielobjekt für Medikamente sind in der Literatur eine Vielzahl an potenten und selektiven Antagonisten für den A<sub>2b</sub>-Rezeptor in den letzten Jahren beschrieben worden [103-105]. Die Arbeitsgruppe um Borrmann et al. publizierte 2009 eine neuentwickelte Serie an hochaffinen und selektiven A<sub>2b</sub>-Rezeptorantagonisten, die 1-alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines [106]. Auf Grund seiner spezifischen Affinität mit dem K<sub>i</sub>-Wert von 0,553 nM für den humanen A<sub>2b</sub>-Rezeptor und keiner Affinität für die weiteren Adenosinrezeptoren, bei einer Konzentration bis hin zu 10  $\mu\text{M}$ , wurde dieser spezifischer A<sub>2b</sub>-Antagonist 8-(4-(4-(4-Chlorphenyl)piperazine-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (PSB603) ausgewählt [106]. PSB 603 zählt zu den von der Xanthin-Struktur (Abb. 15) abgeleiteten Antagonisten, wie in Abbildung 16 zu sehen ist.

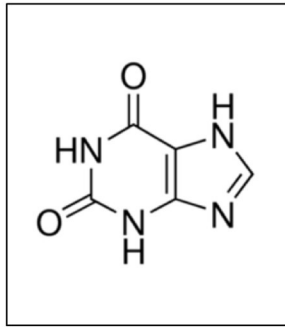


Abb. 15: Strukturformel von Xanthin. Abbildung entspricht dem Original, entnommen von Sigma-Aldrich GmbH.

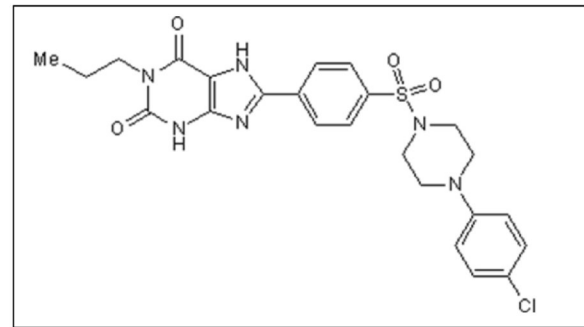


Abb. 16: Strukturformel des spezifischen A<sub>2b</sub>-Rezeptorantagonisten PSB 603. Abbildung entspricht dem Original, entnommen von Tocris Bioscience.

Der Literatur ist zu entnehmen, dass durch Modifikation der xanthinen Kernstruktur an der 8-Position durch Arylgruppen eine Selektivität für den A<sub>2b</sub>-Rezeptor erreicht werden kann [107]. Auf Grund von fehlenden Erfahrungswerten in dieser Arbeitsgruppe bezüglich der zu verwendenden Konzentration des spezifischen A<sub>2b</sub>-Rezeptorantagonisten PSB603, wurde sich an in der Literatur etablierten Konzentrationen orientiert [108, 109].

Aufbauend auf die vorangegangenen Ergebnisse, den Einfluss des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors auf das Wachstum neuronaler Hinterwurzelganglien, sollte in diesem Versuchsabschnitt untersucht werden, ob auch der A<sub>2b</sub>-Rezeptor positiv oder negativ auf das Wachstum einwirken kann. Durch spezifisches Inhibieren des A<sub>2b</sub>-Rezeptors mit 100 nM PSB603, konnte nach 7,5 Stunden eine nicht signifikante ( $p < 0,0538$ ) Wachstumsverminderung von 7,12 % gegenüber der Kontrolle induziert werden. Die durchschnittliche Länge eines Neuriten der Kontrollgruppe ( $n=184$ ) betrug 207,8  $\mu\text{M}$  nach 7,5 Stunden. Neuriten, bei welchen durch PSB603 ( $n=176$ ) die A<sub>2b</sub>-Rezeptoren blockiert worden sind, hatten hingegen nur eine durchschnittliche Neuritenlänge von 193,0  $\mu\text{M}$  nach 7,5 Stunden (vgl. Abb. 17 und Tab. 1).

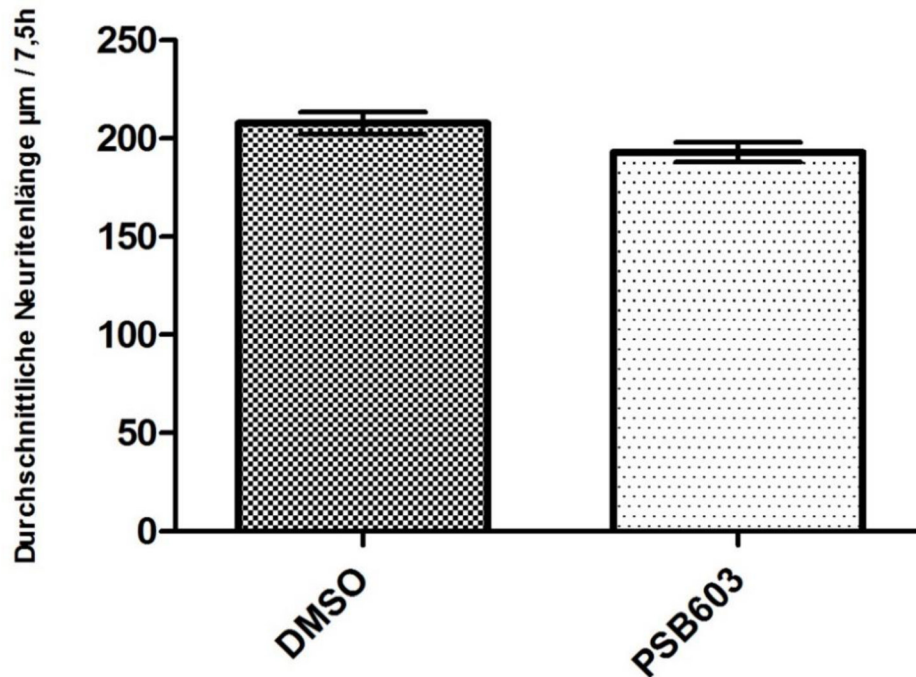


Abb. 17: Einfluss von PSB603 auf das Wachstum von Neuriten dissoziierter Neuronen des Haushuhnes (*Gallus gallus*). Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge, nach Zugabe des spezifischen  $A_{2b}$ -Rezeptorantagonisten PSB603 (100nM), im Vergleich zur Kontrolle, nach einer Wachstumszeit von 7,5h. Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Neuriten dissoziierter Neuronen der Hinterwurzelganglien durch das Blockieren mit PSB603 (n=176), im Vergleich zu der DMSO Kontrolle (n=184) von 207,8  $\mu\text{M}$  auf 193,0  $\mu\text{M}$  nicht signifikant ( $p=0,0548$ ) verringert werden konnte. Die Wachstumsminderung lag bei 7,12 %. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-Test bestimmt, da es sich bei den gemessenen Werten um keine Normalverteilung handelt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

Durch die Zugabe von PSB603, einem  $A_{2b}$ -spezifischen Antagonisten, war es möglich die Gesamtlänge der Neuriten von sensorischen Neuronen zu verringern. Dieser Versuch sollte zeigen, ob auch das Stimulieren dieses Rezeptors Einfluss auf das Wachstum haben kann.

Aufgrund neuester Erkenntnisse im Bereich der Medizin rückt der Adenosin  $A_{2b}$ -Rezeptor in den Fokus der Wissenschaft. Jedoch sind auf Grund von Mangel an potenten und selektiven Agonisten für diesen Rezeptor pharmakologische Untersuchungen sowie Beurteilungen zum therapeutischen Potential nur eingeschränkt möglich [110]. In den letzten Jahren wurden diverse, an den Adenosin  $A_{2b}$ -Rezeptor bindende Liganden, publiziert [111, 112].

Adenosin  $A_{2b}$ -Agonisten lassen sich in zwei verschiedene Klassen einteilen. Die von Adenosin abgeleitete und in die nicht von Adenosin abgeleitete Struktur. Bei den Agonisten, welche vom endogenen Agonisten Adenosin abgeleitet sind, handelt es sich hauptsächlich um eine Substitution an den N<sup>6</sup>- oder C2 Positionen des Purinheterozyklus und/oder an der 5'-Position der Ribose des Adenosins. Durch Kombination der beiden Substitutionen konnten Verbindungen mit größter Potenz und Rezeptorselektivität erzielt werden [110]. 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) war der erste Adenosinderivat- $A_{2b}$ -Agonist [113]. NECA ist ein potenter, aber nicht selektiver Adenosinrezeptor- $A_{2b}$ -Agonist [109].

Zu den selektiven Agonisten zählen Pyridin-3,5-dicarbonitril-Derivate. Eine weitaus kleinere Gruppe, die strukturell nicht von Adenosin abgeleitet ist [110]. BAY60-6583 (Abbildung 18) ein 2-aminopyridine-3,5-diacarbonitrile Derivat, ist ein Agonist aus dieser Gruppe. Dieser Agonist wurde von Bayer Healthcare (Wuppertal, Germany) entwickelt [114].

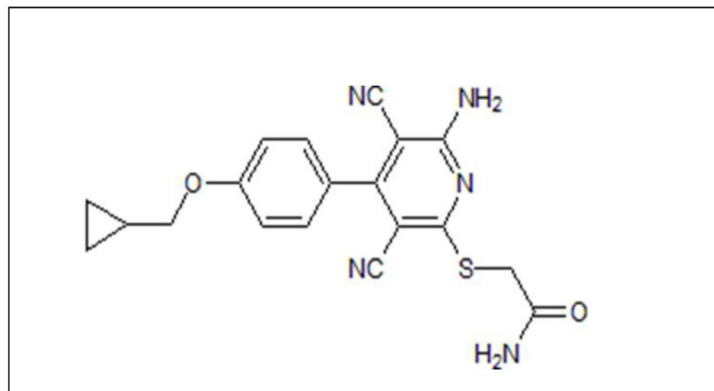


Abb. 18: Struktur des selektiven  $A_{2b}$ -Adenosin-Rezeptoragonisten BAY60-6583. Abbildung entspricht dem Original, entnommen von Tocris Bioscience.

Dieser  $A_{2b}$ -Adenosin-Rezeptoragonist ist der einzige potente und selektive Agonist, welcher im Moment im Handel erhältlich ist [113]. In diesem Versuch wurde sich für den hoch selektiven Agonisten BAY60-6583 und gegen den potenten Agonisten NECA entschieden. NECA ist ein häufig in der Literatur verwendeter Agonist, jedoch mit seiner hohen Affinität für den  $A_1$ ,  $A_3$  und  $A_{2a}$ -Rezeptor [99] wurde dieser als ungeeignet für dieses Experiment befunden.



Auf Grund der Steigerung des Wachstums durch das Stimulieren des  $A_{2a}$ -Rezeptors sollte in diesem Versuchsabschnitt der Frage nachgegangen werden, ob auch durch Stimulation des  $A_{2b}$ -Rezeptors mit 100 nM BAY60-6583 ein Effekt im Wachstum der Neuriten neuronaler Zellen gemessen werden kann. Im Unterschied zu den vorangegangenen Versuchen konnte hier keine Änderung der Wachstumslängen detektiert werden. Die mit BAY60-6583 behandelten Zellen ( $n=179$ ) erreichten eine durchschnittliche Gesamtlänge von 228,3  $\mu\text{M}$  in 7,5 Stunden, die dazugehörigen Kontrollen mit DMSO ( $n=177$ ) wuchsen im Mittel 229,3  $\mu\text{M}$  in 7,5 Stunden (vgl. Abb. 19 und Tab. 1).

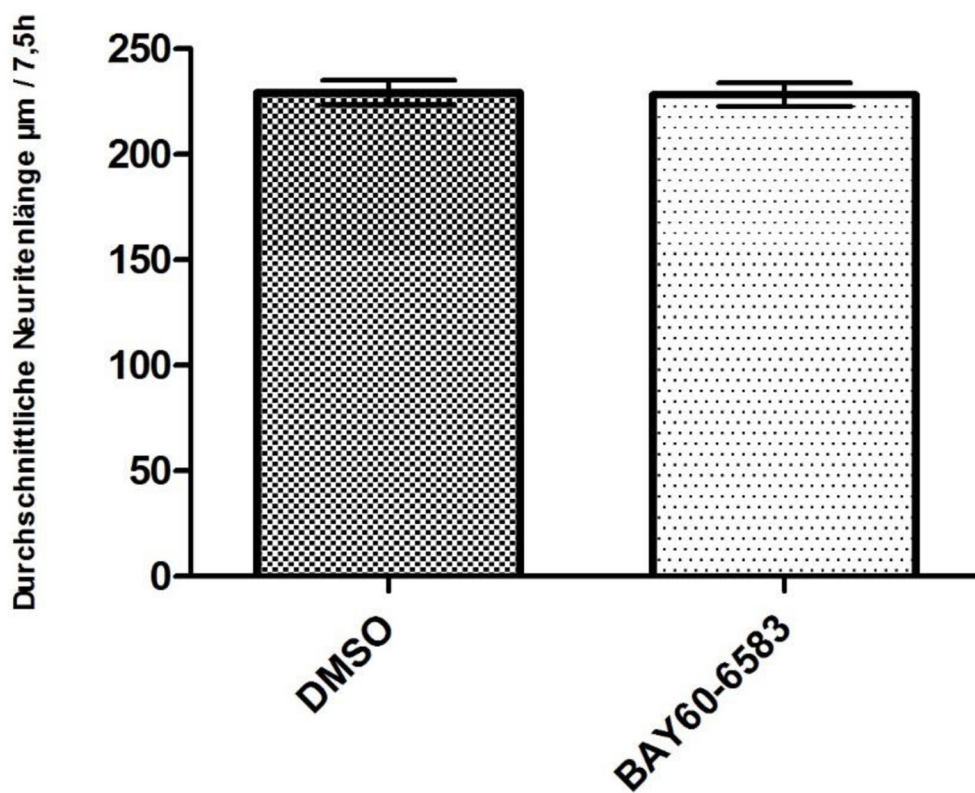


Abb. 19: Einfluss von BAY60-6583 auf das Wachstum von Neuriten dissoziierter Neuronen des Haushuhnes (*Gallus gallus*). Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge nach Stimulation mit dem spezifischen  $A_{2b}$ -Rezeptoragonisten BAY60-6583 (100nM), im Vergleich zur Kontrolle, nach einer Wachstumszeit von 7,5h. Durch das spezifische Stimulieren des  $A_{2b}$ -Rezeptors konnte keine Veränderung in der Gesamtlänge der Neuriten gemessen werden. Die durchschnittliche Neuritenlänge der mit BAY60-6583 ( $n=179$ ) behandelten Neurone lag bei 228,3  $\mu\text{M}$ , im Vergleich zu der DMSO Kontrolle ( $n=177$ ), welche eine durchschnittliche Neuritenlänge von 229,3 $\mu\text{M}$  aufwies. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

### 3.2.3 Einfluss des A<sub>1</sub>-Rezeptors auf das Wachstum sensorischer Neurone

Bislang konnte in den letzten Versuchen gezeigt werden, dass durch Blocken, sowohl des A<sub>2a</sub>-Rezeptors, als auch des A<sub>2b</sub>-Rezeptors, das Wachstum sensorischer Neurone verlangsamt werden kann. Nur das spezifische Stimulieren des A<sub>2a</sub>-Rezeptors zeigte einen signifikanten Anstieg in der durchschnittlichen Länge der Neurite. Ziel dieses Versuchsabschnittes war es, den Einfluss des A<sub>1</sub>-Rezeptors auf das Längenwachstum sensorischer Neurone zu ermitteln.

Adenosin, ein endogenes Nukleosid, welches in allen Zellen einschließlich Gliazellen und Neuronen vorkommt, ist der physiologische Agonist der Adenosinrezeptoren. Eine Vielzahl physiologischer als auch pathophysiologischer Funktionen von Adenosin z.B. im zentralen Nervensystem, den peripheren Organen sowie im Gewebe sind bislang bekannt [115]. In der Pharmakologie spielen bislang die beiden Adenosin-Rezeptoren A<sub>1</sub> und A<sub>2a</sub> mit ihren Agonisten und Antagonisten eine vorherrschende Rolle [116]. Zu diesem Zeitpunkt, gilt A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptor als der am besten untersuchte Rezeptor der Familie von P<sub>1</sub> Rezeptoren. Ein hohes Expressionsniveau des A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptors ist im Cortex, im Cerebellum, im Hippocampus, im Cornu posterius medulla spinalis und im Auge zu finden. Weiter konnte dieser Rezeptor auch in der Skelettmuskulatur, verschiedenen Regionen des Gehirns, in der Leber sowie in der Niere detektiert werden. Dieses detaillierte Wissen über das Vorkommen dieses Rezeptors ist im Besonderen dem Vorhandensein eines Radioliganden für den A<sub>1</sub>-Rezeptor zu verdanken [117]. Die pharmazeutische Forschung hat in den letzten Jahren viele Anhaltspunkte gefunden, dass die Adenosinrezeptoren, unter anderem auch der A<sub>1</sub>-Rezeptor in unterschiedliche Krankheitsbilder involviert sind. Zukünftig könnten spezifische A<sub>1</sub>-Agonisten eine wichtige therapeutische Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen wie z.B. der Schmerztherapie, der Behandlung von Angina Pectoris oder bei Erkrankungen des Herzens (Herzrhythmusstörungen, Tachykardie) spielen [107, 115]. Des Weiteren wird auch den spezifischen Antagonisten im Bereich der Alzheimerforschung ein therapeutisches Potential zugeschrieben [116].

Zu diesem Zeitpunkt sind in der Literatur zahlreiche A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptor-Agonisten sowie Antagonisten beschrieben. Nahezu alle bis heute bekannten Adenosinrezeptor-Agonisten sind Derivate von Adenosin oder Xanthosin. In der Pharmakologie kommen als selektive Agonisten für den A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptor N<sup>6</sup>-substituierte Adenosinderivate wie CPA (N<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosine) oder CCPA (2-Chlor- N<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosine) zum Einsatz. Die Struktur der Antagonisten hingegen orientiert sich meist nur an Xanthinderivaten. Natürlich vorkommende Xanthine sind Coffein und Theophyllin, welche beide als unspezifische Adenosin-Rezeptorantagonisten agieren. Bei den Antagonisten werden Modifikationen an der 8-position von Xanthinderivaten mit Acryl- oder Cycloalkylgruppen als hoch affin und selektiv eingestuft [107]. In klinischen Studien, kamen sowohl Xanthine als auch nichtxanthine A<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten, zu welchen Rolofylline, Toponafylline, FK-453 (R-{(E)-3-(2-phenylpyrazolo(1,5- $\alpha$ )pyridin-3-yl) und auch SLV320 (4-(4-hydroxycyclohexylamino)-6-phenylpyrrolo(2,3-*d*)pyrimidine) zählen, zum Einsatz. Jedoch konnte zu diesem Zeitpunkt noch keines der oben genannten Substrate als Medikament etabliert werden [107, 118]. Auf Grund des ubiquitären Vorkommens dieses Rezeptors als auch der Kolo-kalisation von A<sub>1</sub> und A<sub>2a</sub>, welche in Patienten mit dem neurodegenerativen Krankheitsbild Alzheimer beschrieben wurden [116], muss sich die Frage gestellt werden, ob nicht nur der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor, sondern vielleicht auch der A<sub>1</sub>-Rezeptor Einfluss auf das Wachstum neuronaler Zellen hat. Für diesen Versuchsabschnitt wurde der A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptor mit dem schon beschriebenen Antagonisten SLV320 (Abbildung 20), Endkonzentration 10 nM, geblockt. Diese Konzentration wurde auf Grund von Erfahrungswerten in dieser Arbeitsgruppe hin gewählt.

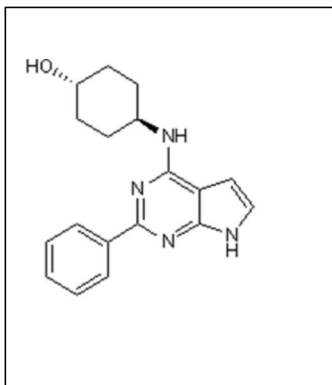


Abb.20: Struktur des selektiven A<sub>1</sub>-Adenosin-Rezeptorantagonisten SLV320. Abbildung entspricht dem Original, entnommen von Tocris Bioscience.



Trotz einer hohen Stichprobenzahl von  $n=163$  für DMSO und  $n=161$  für SLV320 konnte keine wachstumsveränderte Wirkung durch das Blocken des  $A_1$ -Rezeptors gemessen werden. Die durchschnittliche Länge der Neuriten nach 7,5 Stunden betrug für die Neurone, welche mit SLV320 behandelt wurden  $183,9 \mu\text{m}$ . Die dazugehörigen DMSO Kontrollen wuchsen im Durchschnitt  $181,2 \mu\text{m}$  in 7,5 Stunden (vgl. Abb. 21 und Tab.1).

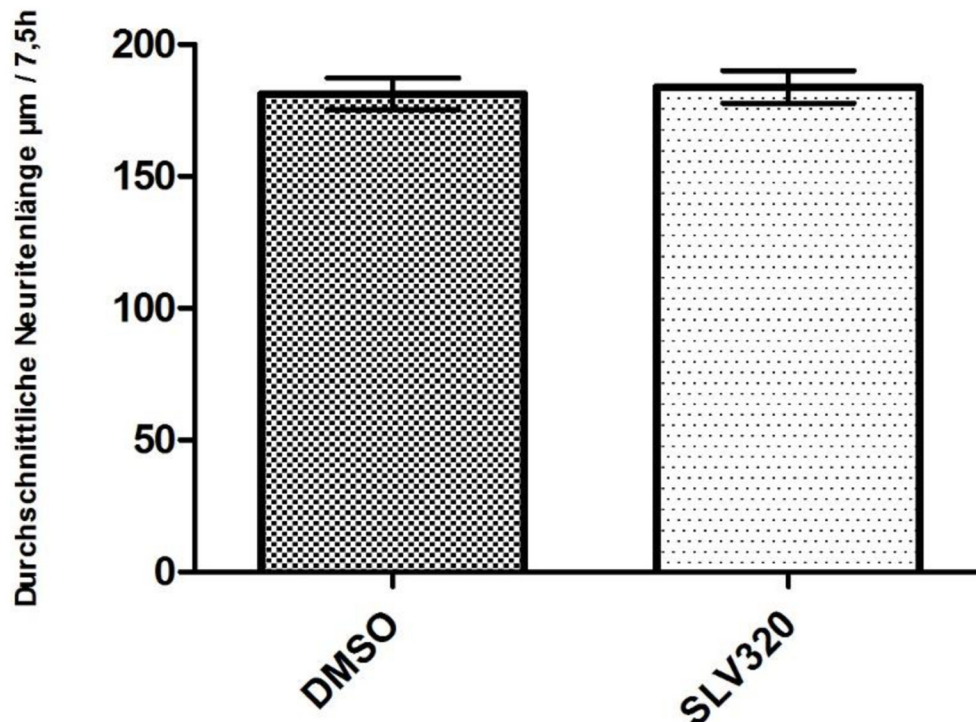


Abb.21: Einfluss von SLV320 auf das Wachstum der Neuriten dissoziierter Neurone des Haushuhnes (*Gallus gallus*). Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge, nach Zugabe des spezifischen  $A_1$ -Rezeptorantagonisten SLV320 (10 nM) von Neuronen, im Vergleich zur Kontrolle nach einer Wachstumszeit von 7,5 h. Durch das spezifische Blockieren des  $A_1$ -Rezeptors dissoziierter Neurone der Hinterwurzelganglien konnte keine Veränderung in der Gesamtlänge der Neuriten gemessen werden. Die durchschnittliche Neuritenlänge der mit SLV320 ( $n=161$ ) behandelten Neurone lag bei  $183,9 \mu\text{m}$ . Im Vergleich dazu wies die durchschnittliche Neuritenlänge bei der DMSO Kontrolle ( $n=163$ ) einen Wert von  $181,2 \mu\text{m}$  auf. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

### 3.2.4 Einfluss des A<sub>3</sub>-Rezeptors auf das Wachstum sensorischer Neurone

In diesem Experiment lag der Fokus auf dem letzten in dieser Arbeit noch nicht behandelten Rezeptor der P1-Adenosinrezeptorfamilie, genauer gesagt dem A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptor. Exprimiert wird dieser Rezeptor sowohl im Herzen, der Lunge und in Bereichen des ZNS (Hippocampus, Cerebral cortex). Das Expressionsniveau des A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptors ist jedoch im Vergleich zum A<sub>1</sub>-, A<sub>2a</sub>- und A<sub>2b</sub>-Rezeptor in den Gehirnregionen wesentlich niedriger [119-122]. In der Literatur ist der A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptor im Zusammenhang mit entzündlichen Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis oder dem Wachstum von Tumoren beschrieben. Weiter sind Parallelen in Bezug auf Apoptoseprozesse und die Rezeptordichte beschrieben [123-126]. Selektive Agonisten für diesen Rezeptor sind handelsüblich zu erwerben. Die am häufigsten beschriebenen A<sub>3</sub>-Agonisten, sind modifizierte Adenosinderivate. Durch Substitution von 5'-uranamide und N<sup>6</sup>-benzyl modifiziert wird hier eine Rezeptoraffinität im nanomolaren Bereichen erreicht. Beispiel für selektive A<sub>3</sub>-Agonisten sind IB-MECA (1-Deoxy-1-{{(3-iodophenyl)methyl}amino}-9H-purin-9-yl)-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide), dessen 2-Clor Analog 2-Cl-IB-MECA (1-{{2-Chloro-6-{{(3-iodophenyl)methyl}amino}-9H-purin-9-yl}-1-deoxy-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide) sowie LJ-529 (2-chloro-N<sup>6</sup>-(3-iodobenzyl)-5'-N-methylcarbamoyl-4'-thioadenosine) [127, 128]. In diesem Versuch wurde der selektive A<sub>3</sub>-Rezeptoragonist 2-Cl-IB-MECA (Abb. 22) verwendet.

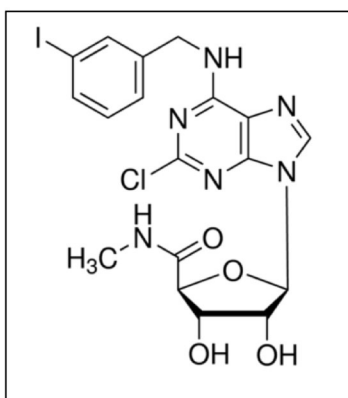


Abb.22: Struktur des selektiven A<sub>3</sub>-Adenosin-Rezeptoragonisten 2-Cl-IB-MECA. Abbildung entspricht dem Original, entnommen von Sigma-Aldrich GmbH.

Im Bereich der medizinischen Forschung konnte mit Hilfe dieses selektiven A<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten eine Wachstumsinhibierung von promyeloischen Leukämiezellen (HL-60) gezeigt werden [129]. Weitere Studien belegen, dass nicht nur der A<sub>3</sub>-Rezeptor Einfluss auf die Proliferation in Tumoren haben kann, sondern auch die Adenosinrezeptoren A<sub>1</sub>, A<sub>2b</sub> und unter anderem auch der A<sub>2a</sub>-Rezeptor [130]. Auf Grund dieser Erkenntnisse aus der Literatur stellt sich die Frage, ob der A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptor auch einen Einfluss auf das Wachstum neuronaler Zellen hat. Um dies zu testen, wurden die dissoziierten Neurone mit dem spezifischen Agonisten 2-CI-IB-MECA, mit einer Endkonzentration von 10 nM, stimuliert. 2-CI-IB-MECA ist in der Arbeitsgruppe ein bereits etablierter Agonist und auf Grund der Datenlage vorangegangener Arbeiten wurde die Konzentration in Höhe von 10 nM übernommen. Die mit 2-CI-IB-MECA behandelten Zellen zeigten eine durchschnittliche Neuritenlänge von 150,6 µM nach 7,5 Stunden. Die durchschnittliche Neuritenlänge nach 7,5 Stunden bei den mit DMSO behandelten Kontrollen lag bei 151,0 µM. Auf Grund des hohen Stichprobenumfangs von n=192 für die mit 2-CI-IB-MECA stimulierten Zellen und für n=184 der Kontrollzellen, kann trotz der wesentlich geringeren Durchschnittslänge in Bezug auf die bereits getesteten Komponenten trotzdem davon ausgegangen werden, dass das Stimulieren des A<sub>3</sub>-Rezeptors keinen Einfluss auf das Wachstum der Neuriten, neuronaler Zellen hat (vgl. Abb.23 und Tab.1).

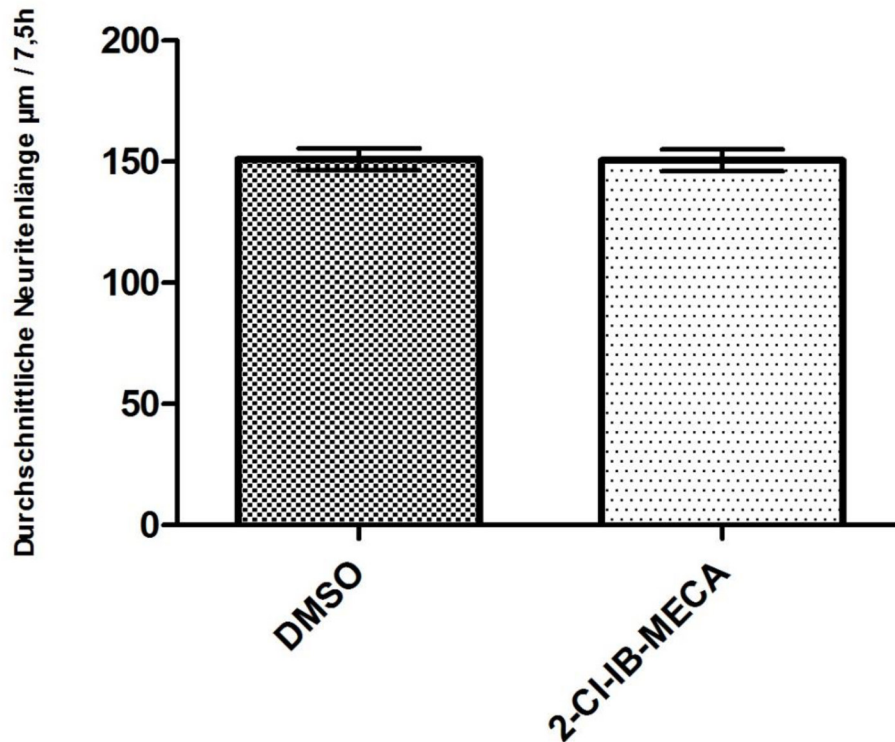


Abb.23: Einfluss von 2-CI-IB-MECA auf das Wachstum der Neuriten, dissoziierter Neurone des Haushuhnes (*Gallus gallus*). Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge, nach Stimulierung der Neurone mit dem spezifischen  $A_3$ -Rezeptoragonisten 2-CI-IB-MECA (10 nM), im Vergleich zur Kontrolle nach einer Wachstumszeit von 7,5h. Durch das spezifische Stimulieren dissoziierter Neurone der Hinterwurzelganglien konnte keine Veränderung in der Gesamtlänge der Neurite gemessen werden. Die durchschnittliche Neuritenlänge der mit 2-CI-IB-MECA (n=192) behandelten Neurone lag bei 150,6 µM. Im Vergleich dazu lag die durchschnittliche Neuritenlänge der DMSO Kontrolle (n=184) bei 151,0 µM. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

Trotz des Resultats, dass durch Stimulieren des A<sub>3</sub>-Rezeptors keine Änderung in der Gesamtlänge der Neuriten gemessen werden konnte, sollte im letzten Versuchsabschnitt ein spezifischer Antagonist für den A<sub>3</sub>-Rezeptor getestet werden.

4-(Phenylethynyl)-6-phenyl-1,4-dihydropyridin-Derivate, zu welchen auch der hier verwendete Adenosin-Rezeptorantagonisten (3-ethyl-5-(4-nitrobenzyl)-2-methyl-4-phenylethynyl-6-phenyl-1,4dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) MRS1334 (Abb.24) [99] zählt, gelten als selektive Antagonisten für den humanen A<sub>3</sub>-Rezeptor [131].

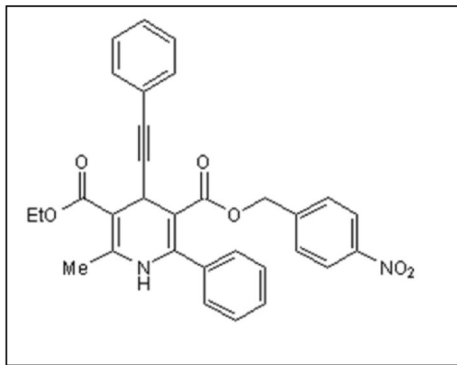


Abb.24: Struktur von MRS 1334  
einem selektiven A<sub>3</sub>-Rezeptor-  
Antagonisten. Abbildung entspricht  
dem Original, entnommen von  
Tocris Bioscience.

Durch das Blocken des A<sub>3</sub>-Rezeptors mit dem selektiven Antagonisten MRS1334 sollte untersucht werden, ob dieser Rezeptor auf das Wachstum neuronaler Zellen einwirken kann. Die hier eingesetzte Endkonzentration des Antagonisten MRS1334 betrug 25 nM. Jedoch konnte auch in diesem Versuchsabschnitt durch das spezifische Blocken des A<sub>3</sub>-Rezeptors keine Veränderung im Neuritenwachstum gegen die Kontrolle gemessen werden. Der Mittelwert der mit MRS1334 behandelten Zellen lag bei 146,9 µM in 7,5 Stunden. Die Kontrollen wiesen einen Mittelwert von 147,4 µM nach 7,5 Stunden auf. Wie auch schon in dem Versuchsteil mit dem spezifischen Agonisten 2-CI-IB-MECA fiel die durchschnittliche Wachstumslänge der einzelnen Neuriten geringer aus. Auf Grund des hohen Stichprobenumfangs von n=159 für MRS1334 und n=163 für die DMSO Kontrollen kann davon ausgegangen werden, dass auch das Blocken des A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptors keinen Einfluss auf das Wachstum neuronaler Zellen hat (vgl. Abb.25 und Tab.1).

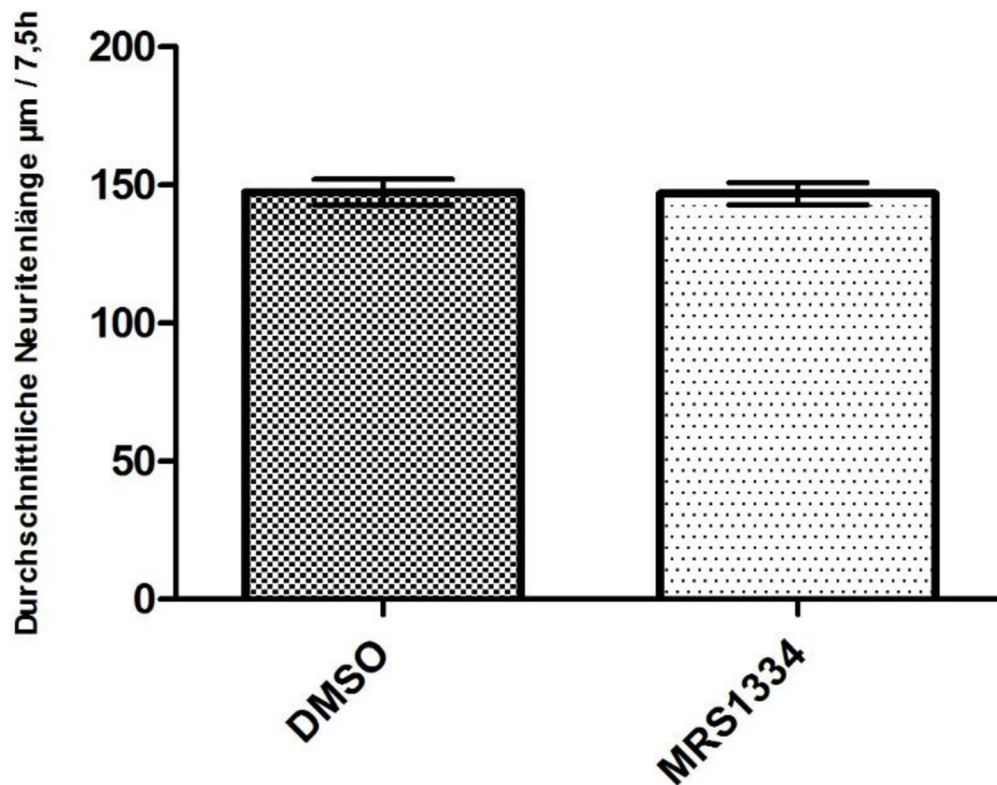


Abb.25: Einfluss von MRS1334 auf das Wachstum von Neuriten dissoziierter Neurone des Haushuhnes (*Gallus gallus*). Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge der mit dem spezifischen  $A_3$ -Rezeptorantagonisten MRS 1334 (25nM) blockierten Neurone im Vergleich zur Kontrolle nach einer Wachstumszeit von 7,5h. Durch das spezifische Blocken dissoziierter Neurone der Hinterwurzelganglien konnte keine Veränderung in der Gesamtlänge der Neuriten gemessen werden. Die durchschnittliche Neuritenlänge der mit MRS1334 (n=159) behandelten Neurone lag bei 146,9 µM, im Vergleich zu der DMSO Kontrolle (n=163) welche eine durchschnittliche Neuritenlänge von 147,4 µM aufwies. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

### 3.2.5 Zusammenfassung der Adenosinrezeptoren

Über das Vorkommen der einzelnen Adenosinrezeptoren und über ihren physiologischen und pathologischen Einfluss ist bislang schon viel veröffentlicht worden, jedoch muss noch viel Arbeit in der Forschung geleistet werden, um weitere Agonisten und Antagonisten in diesem Bereich in der Pharmakologie zu etablieren. In den Experimenten dieser Arbeit wurde aus diesem Grund der Fokus auf den Einfluss der Adenosinrezeptoren auf das Wachstum neuronaler Zellen gelegt. Gezeigt werden konnte, dass mit dem nicht spezifischen Adenosin-Rezeptorantagonisten CGS 15943 das Wachstum der Neuriten innerhalb von 7,5 Stunden um 16,85 % verlangsamt werden konnte. Um eingrenzen zu können, welcher Adenosinrezeptor im Einzelnen an diesem Effekt beteiligt ist, wurden unterschiedliche spezifische Agonisten sowie Antagonisten in den jeweiligen Experimenten verwendet. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass es durch die Zugabe von CGS 21680, einem spezifischen  $A_{2a}$ -Rezeptoragonisten, möglich war, das Wachstum signifikant um 9,2 % zu steigern. Weiter konnte durch den spezifischen  $A_{2b}$ -Rezeptorantagonisten PSB603 auch eine Wachstumsminde- rung von 7,2% gemessen werden. Das Blocken und Stimulieren der Adenosinrezeptoren  $A_1$  und  $A_3$  zeigte keine Veränderung in der durchschnittlichen Neuritenlänge. In der unten aufgeführten Tabelle 1 können die jeweiligen Agonisten und Antagonisten und die zur Kontrolle hin gemessenen durchschnittlichen Gesamtlängen entnommen werden. Abbildung 26 zeigt die prozentuale Änderung des Wachstums, gemessen gegen die Kontrolle.

Tabelle 1: Verwendete Agonisten und Antagonisten für die Adenosinrezeptoren A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub>, A<sub>1</sub> und A<sub>3</sub>

Rezeptor	Agonisten/Antagonisten	n	Mittelwert ( $\mu\text{m}/7,5\text{h}$ )	Standardfehler des Mittelwerts	Mann-Whitney- Test (p-Wert)	% Änderung des Wachstums
A <sub>2a</sub>	CGS 21680	141	215,9	5,86	0,0431 (*)	9,2
	Kontrolle	158	197,7	5,96		
A <sub>1</sub> , A <sub>2a</sub> , A <sub>2b</sub> , A <sub>3</sub>	CGS 15943	120	180,7	5,92	< 0,0001 (****)	-16,84
	Kontrolle	110	217,3	7,18		
A <sub>2b</sub>	PSB603	176	193,0	5,0	0,0548	-7,12
	Kontrolle	184	207,8	5,71		
A <sub>2b</sub>	BAY60-6583	179	228,3	5,52	0,9462	-0,43
	Kontrolle	177	229,3	5,90		
A <sub>1</sub>	SLV320	161	183,9	6,10	0,7832	1,49
	Kontrolle	163	181,2	5,96		
A <sub>3</sub>	2-CI-IB-MECA	192	150,6	4,48	0,9920	-0,264
	Kontrolle	184	151,0	4,54		
A <sub>3</sub>	MRS1334	159	146,9	4,04	0,6809	-0,33
	Kontrolle	163	147,4	4,67		



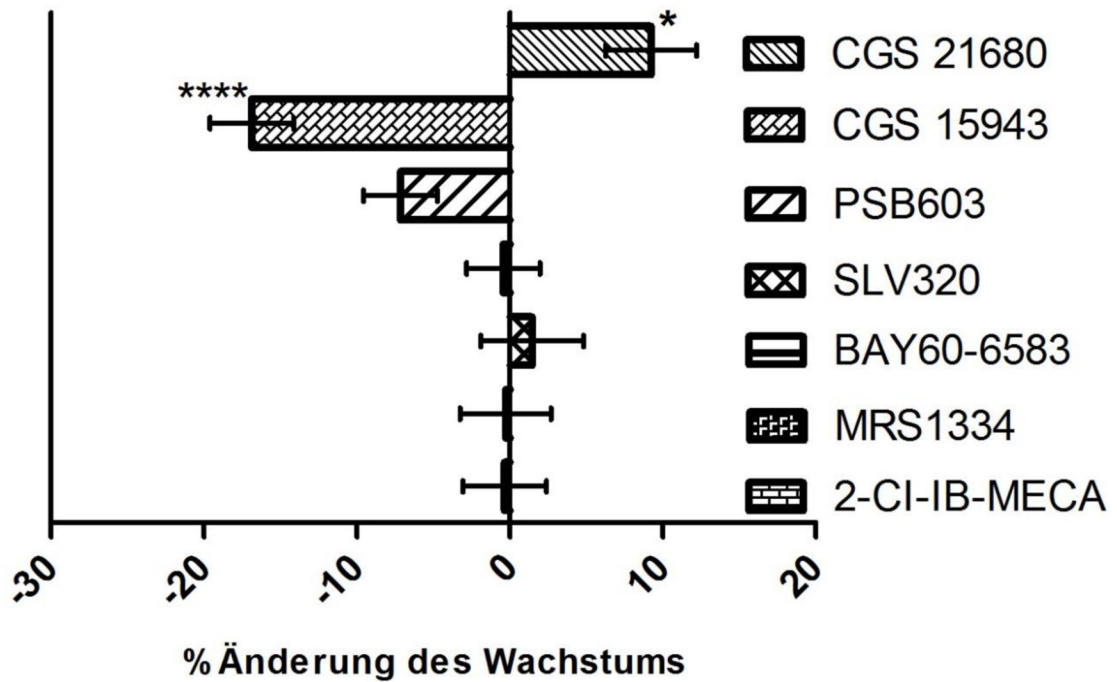


Abb. 26: Zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Agonisten und Antagonisten zum Stimulieren und Blockieren der P1-Rezeptoren. Durch die spezifische Stimulation des  $A_{2a}$ -Rezeptors konnte eine signifikante Steigerung von 9,2% in der durchschnittlichen Neuritenlänge gemessen werden. Durch Inhibieren der P1-Rezeptoren mit CGS 15943 konnte das Wachstum um ca. 17% signifikant verlangsamt werden. Durch das spezifische Blocken des  $A_{2b}$  Rezeptors konnte ebenfalls eine Verlangsamung im Gesamtwachstum von 7% gemessen werden. Sowohl durch das Blocken als auch durch das Stimulieren der übrigen P1-Rezeptoren konnte keine Veränderung im Wachstum gemessen werden.

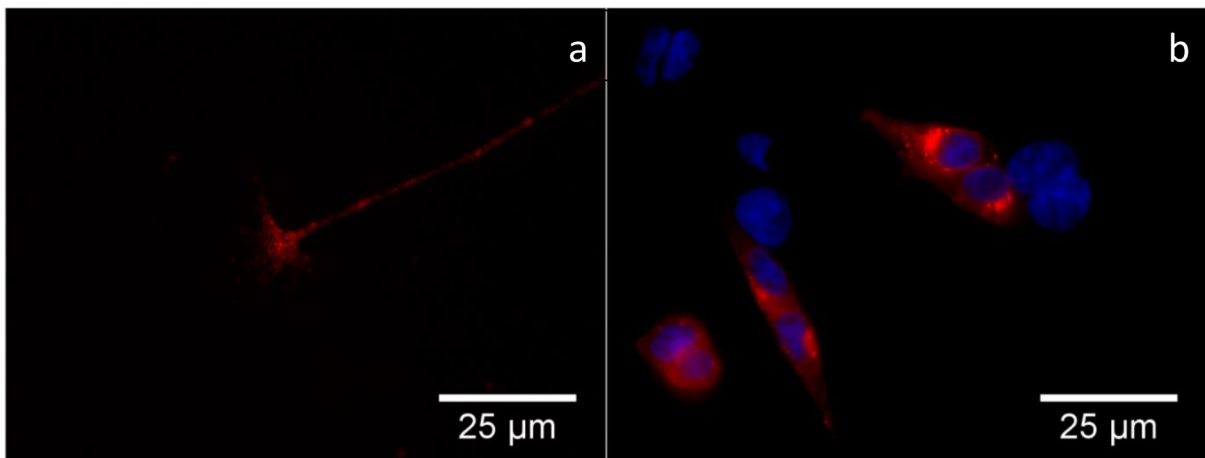
### 3.3 Immunhistologischer Nachweis des A<sub>2a</sub>-Rezeptors

Der immunhistologischen Technik liegt die Idee zu Grunde, mittels einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion Gewebseigenschaften eindeutig identifizieren zu können. Die hier verwendete Technik wird als die Indirekte oder Zwei-Schritt-Methode bezeichnet. Diese Technik beruht auf der Affinität des Antikörpers für ein bestimmtes Epitop (auf der Oberfläche eines Antigens der Bereich an den der Antikörper binden kann). Diese Methode wurde ausgewählt, da sie sensitiver als die direkte Methode ist und es zu einer Signalverstärkung kommt.

Des Weiteren ist diese Methode kostengünstiger, da für alle Primärantikörper derselbe Sekundärantikörper verwendet werden kann, vorausgesetzt die Primärantikörper stammen aus der gleichen Tierart. Ein weiterer Vorteil ist, dass eine große Auswahl an unkonjugierten Primärantikörpern handelsüblich zu Verfügung steht [132].

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor positiv wie auch negativ auf das Wachstum der Neuriten von dissoziierten Neuronen des Haushuhns (*Gallus gallus*) wirken kann. In diesem Versuchsabschnitt sollte durch eine indirekte Antikörperfärbung die Expression des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors lokalisiert werden. Hierfür kam der „rabbit polyklonale“ Primärantikörper Adenosine A2A-R (H-82): sc-13937 der Firma SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. zum Einsatz. Polyklonale Antikörper stammen von verschiedenen Plasmazellen und sind gegen das gleiche Antigen, jedoch gegen verschiedene Epitope, gerichtet. Zur Visualisierung der Antigen-Antikörperbindung kam ein „Goat anti-Rabbit“ mit Alexa Fluor®488 konjugierter Sekundärantikörper zum Einsatz.

Wie in Abbildung 27a zu sehen ist, konnte an der Zellmembran des Wachstumskegels sowie in der Zellmembran der Neuriten dissoziierter Hinterwurzelganglien der  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor mit Hilfe einer indirekten Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Die dazugehörige Positivkontrolle, welche in Abbildung 27b zu sehen ist, wurde auf Grund von fehlenden  $A_{2a}^{-/-}$  Hühnerembryonen an mit dem  $A_{2a}$ -Rezeptor transfizierten HEK 293 Zellen durchgeführt.



*Abb.27:* Visualisierung des  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptors mit Hilfe einer immunhistochemischen Anti- $A_{2a}$ -Antikörperfärbung an der Zellmembran von Wachstumskegeln und Neuriten der Hinterwurzelganglien aus Hühnerembryonen (a). Positivkontrolle der  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor-Antikörperfärbung an, mit diesem Rezeptor transfizierten, HEK293 Zellen. Färbung der Zellkerne (blau) mit HOECHST33258 (b).

### 3.4 Einfluss eines Adenosin bzw. ATP abbauenden Enzyms und eines Ektonukleotidase-Inhibitors auf das Wachstum sensorischer Neurone

In den letzten Versuchsabschnitten wurde nicht nur gezeigt, dass der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor eine wachstumsregulierende Wirkung haben kann, sondern auch dass dieser Rezeptor an der Membran von Wachstumskegeln neuronaler Zellen, mit Hilfe einer indirekten Antikörperfärbung, detektierbar ist. Aufbauend auf die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen sollte getestet werden, ob diesen Versuchsergebnissen ein autokriner Mechanismus zu Grunde liegt. Als mögliche These wäre denkbar, dass ATP oder Adenosin von der Zelle freigesetzt wird, welches autokrin die in der Zellmembran des gesamten Neurons gelegenen Adenosinrezeptoren aktivieren kann. Zur Untersuchung eines möglichen autokrinen Effekts wurden alle Versuche im serumfreien Medium durchgeführt. Als weiterführende Versuche sollten durch Zugabe von Adenosin Desaminase und Apyrase die natürlichen Liganden Adenosin bzw. ATP abgebaut werden, um mit Hilfe des Wachstumsassays die Auswirkungen auf das neuronale Wachstum zu messen. Weiter sollte untersucht werden, ob durch die unspezifische Inhibierung der Ektonukleotidasen das Wachstum dieses Zellsystems beeinflusst werden kann. Im letzten Versuchsteil sollte mit einer ATP-Vesikelfärbung das lokale ATP-Vorkommen im Neuron überprüft werden.

### 3.4.1 Aktiver Adenosinabbau durch die Zugabe des Enzyms Adenosin Desaminase

Durch das Blocken und Stimulieren der einzelnen P1-Rezeptoren konnte der A<sub>2a</sub>-Rezeptor als wachstumsregulierende Struktur im neuronalen System detektiert werden. Die Frage, die sich in diesem Versuchsabschnitt stellt, ist, woher das Adenosin, das die Adenosinrezeptoren aktiviert, kommt. Darüber hinaus ist zu klären, ob bei aktiven Adenosinabbau, beispielsweise durch Zugabe von Adenosin Desaminase oder Apyrase, Auswirkungen auf das Wachstum eintreten. Die P1-Rezeptoren (Adenosinrezeptoren), welche weiter in A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> und A<sub>3</sub> unterteilt sind, werden durch den physiologisch vorkommenden Liganden Adenosin aktiviert [133] (Abb.28).

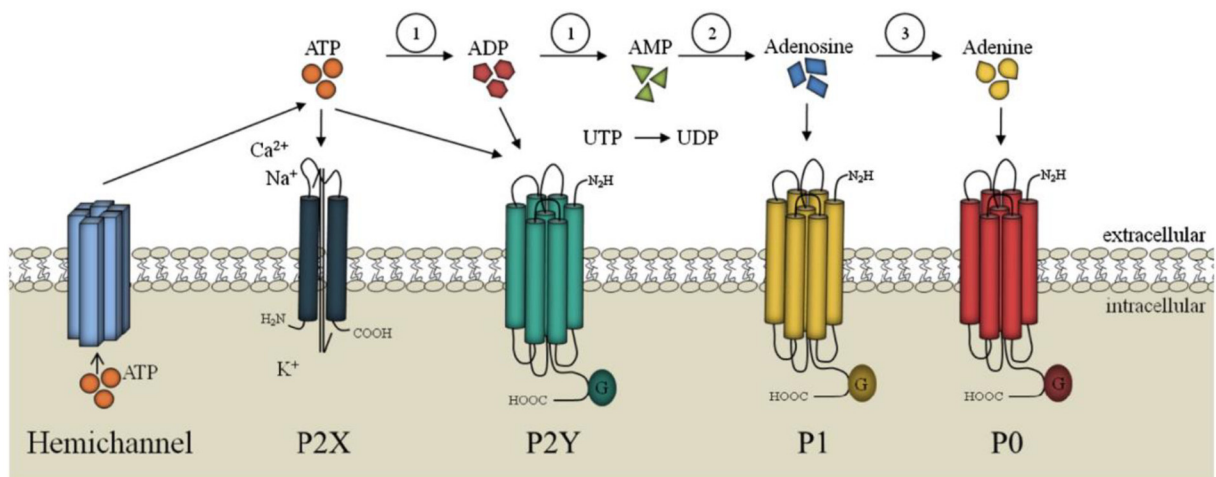


Abb. 28: Purinerge Rezeptoren und ihre natürlichen Liganden. Purinerge Rezeptoren können in die P2 Rezeptoren, welche durch unterschiedlichste Nucleotide aktiviert werden und in die P1 Rezeptoren, bei welchen der natürliche Aktivator Adenosin ist, unterteilt werden. Kürzlich erst wurden auch adeninaktivierte Rezeptoren, die P0 Rezeptoren, entdeckt [133]. Abbildung entspricht dem Original [133].

Das Enzym Adenosin Desaminase (ADA) katalysiert die irreversible Desaminierung von Adenosin und Deoxyadenosin zu Inosin und Deoxyinosin (Abb.29). Dieses Enzym konnte sowohl in Pflanzen, Bakterien, Wirbeltieren als auch in wirbellosen Tieren nachgewiesen werden. Die Adenosin Desaminase, welche in nahezu jedem Gewebe von Säugetieren vorkommt, wird auch als Schlüsselenzym im purinergen Metabolismus bezeichnet [134].

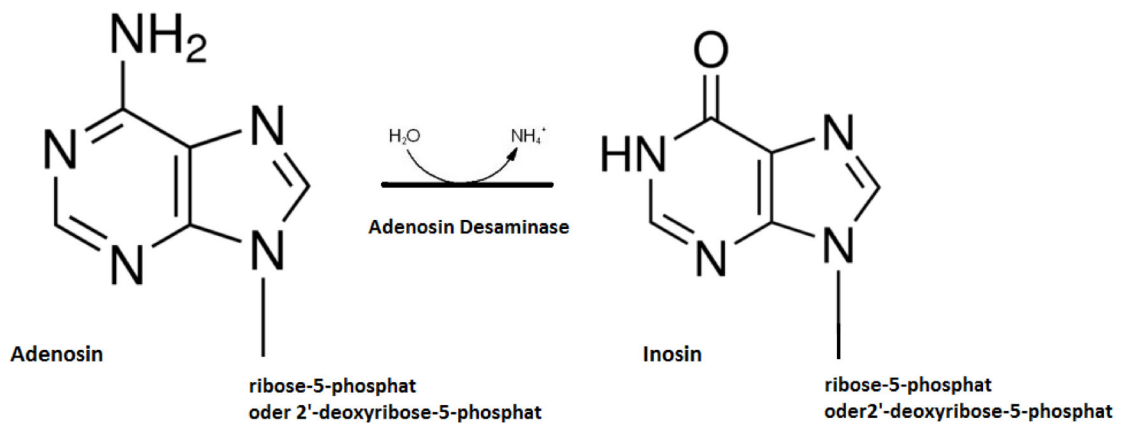


Abb. 29: Die Desaminierung von Adenosin bzw. Deoxyadenosin zu Inosin bzw. Deoxyinosin durch das Enzym Adenosin Desaminase.

Mit Hilfe der Adenosin Desaminase sollte der natürliche Ligand Adenosin abgebaut werden, um so die Aktivierung der Adenosinrezeptoren herunterzusetzen. Wie auch in den anderen Versuchen, wurde nach zwei stündiger Anhaftung der dissoziierten und selektierten Neurone das Enzym oder die Kontrollsubstanz zu den Schälchen pipettiert und nach weiteren 5,5 Stunden durch die Fixierung mit einer Formaldehyd/Glucoselösung abgestoppt. Die hier eingesetzte ADA desaminiert laut Hersteller, bei idealen Bedingungen (pH 7,5 und 25°C) und Einsatz von 1U ADA, in einer Minute 1,0  $\mu\text{mol}$  Adenosin zu Inosin. In diesem Telexperiment wurden 5U/ml pro Schälchen eingesetzt. Durch den Einsatz der Adenosin Desaminase konnte eine signifikante ( $p=0,0096$ ) Wachstumsinderung von 8,7% gemessen werden. Bei den mit Adenosin Desaminase behandelten neuronalen Zellen konnte, nach 7,5 Stunden und einem Stichprobenumfang von  $n=320$ , ein durchschnittliches Wachstum von 174,4  $\mu\text{m}$  gemessen werden. Die dazugehörige Kontrollgruppe ( $n=278$ ) wies im Vergleich dazu eine durchschnittliche Neuritenlänge von 191,1  $\mu\text{m}$  nach 7,5 Stunden auf. Da es auch hier keine Normalverteilung beim Längenwachstum der Neurite gab, wurde die Signifikanz mit dem Mann-Whitney-Test ermittelt (vgl. Abb.30 und Tab.2).



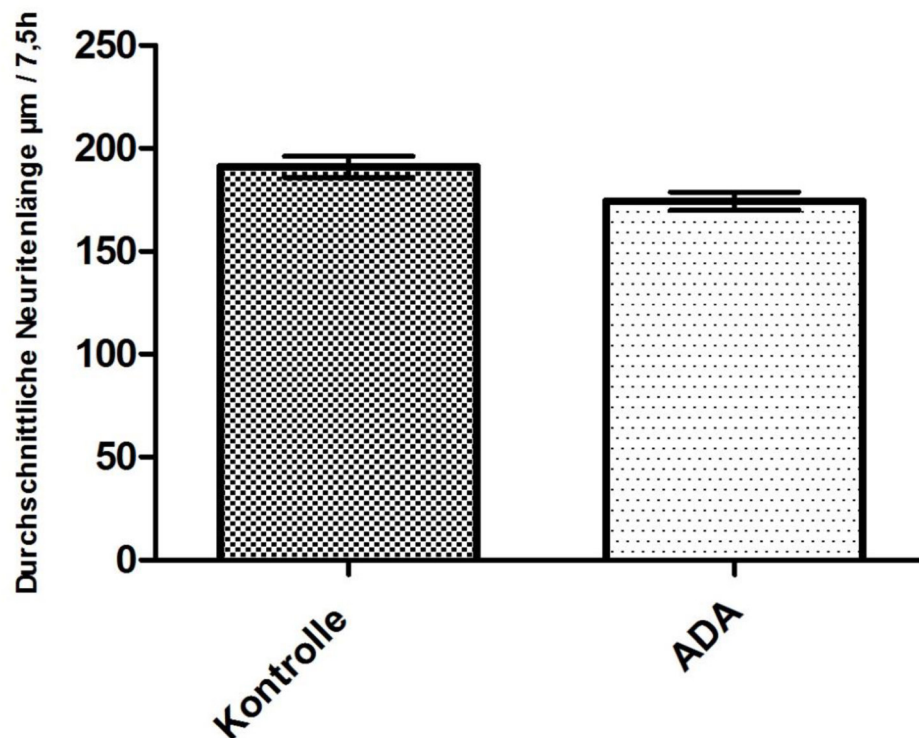


Abb.30: Einfluss von Adenosin Desaminase auf das Wachstum der Neuriten dissoziierter Neurone des Haushuhnes (*Gallus gallus*). Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge im Vergleich zur Kontrolle mit einer Wachstumszeit von 7,5h nach Zugabe von Adenosin Desaminase. Dieses Enzym desaminiert Adenosin zu Inosin. Durch diesen beschleunigten Abbau von Adenosin konnte bei dissoziierten Neuronen der Hinterwurzelganglien eine signifikante ( $p=0,0096$ ) Verminderung in der Gesamtlänge der Neuriten von 8,7% gemessen werden. Die durchschnittliche Neuritenlänge der Neurone, welchen ADA zugefügt wurde ( $n=278$ ), lag bei 174,4  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu der Kontrolle ( $n=320$ ), welche eine durchschnittliche Neuritenlänge von 191,1  $\mu\text{m}$  aufwies. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-Test bestimmt, da es sich bei den gemessenen Werten um keine Normalverteilung handelt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

### 3.4.2 Aktiver ATP Abbau durch die Zugabe des Enzyms Apyrase

Wie auch schon im vorangegangenen Experiment sollte untersucht werden, welche Auswirkungen der aktive ATP-Abbau, und somit die mögliche Verminderung der Adenosinquelle, auf das Wachstum neuronaler Zellen hat. Kürzlich veröffentlichte wissenschaftliche Publikationen lassen darauf schließen, dass Neurone retinaler Ganglien von Hühnern sowie Hinterwurzelganglien von Ratten ATP freisetzen [135, 136]. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Mitglieder der Enzymfamilie ENTPDasen (Ecto-nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase) nucleotid-spezifische Enzyme sind und Nucleosidtri- und diphosphate in die jeweiligen Monophosphate abbauen. Zu diesem Zeitpunkt sind im menschlichen Körper acht Isoformen (NTPDase1-8) bekannt, wobei die von den einzelnen Isoformen bevorzugten Nucleotide variieren können. Die E-NTPDasen (1-3 und 8) besitzen eine große extrazelluläre katalytische Domäne, welche fünf Apyrase-konservierte Regionen (apyrase conserved regions, ACRs) enthält und einen Marker für diese Enzymfamilie darstellt [66, 137]. Das Enzym Apyrase, eine aus der Kartoffel isolierte wasserlösliche Form der NTPDase, katalysiert die Hydrolyse der Phosphatdihydrid-Bindungen und somit das Abspalten der Phosphate der Nucleosidtri- und diphosphate zu monophosphaten und anorganischem Phosphor (Pi), in der Gegenwart von divalenten Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  [138, 139]. Die Arbeitsgruppe um Handa konnte im Rahmen einer molekularen Klonierung von Apyrase aus der Kartoffel aufzeigen, dass die Proteinsequenz dieses Enzyms der im humanen CD39 entspricht [138]. In diesem Versuchsteil kam die oben beschriebene wasserlösliche ATP-Diphosphorhydrolase (Apyrase) aus der Kartoffel zum Einsatz. Laut dem Hersteller hydrolysiert 1U Apyrase 1  $\mu\text{M}$  anorganisches Phosphor (Pi) in der Minute bei optimalen Bedingungen von pH 6,5 und 30°C. Die hier eingesetzte Menge an Apyrase betrug in jedem gemessenen Schälchen 10U/ml. Der beschleunigte Abbau von ATP und ADP durch die zugegebene Apyrase führte zu einer Verminderung im Wachstum von 5,7%. Das entspricht einem mittleren Wachstum von 188,9  $\mu\text{m}$  für die mit der Apyrase behandelten Zellen (n=187) in 7,5 Stunden und einem durchschnittlichen Wachstum der Kontrollen (n=186) von 200,3  $\mu\text{m}$  in 7,5 Stunden (vgl. Abb. 31, Tab.2).



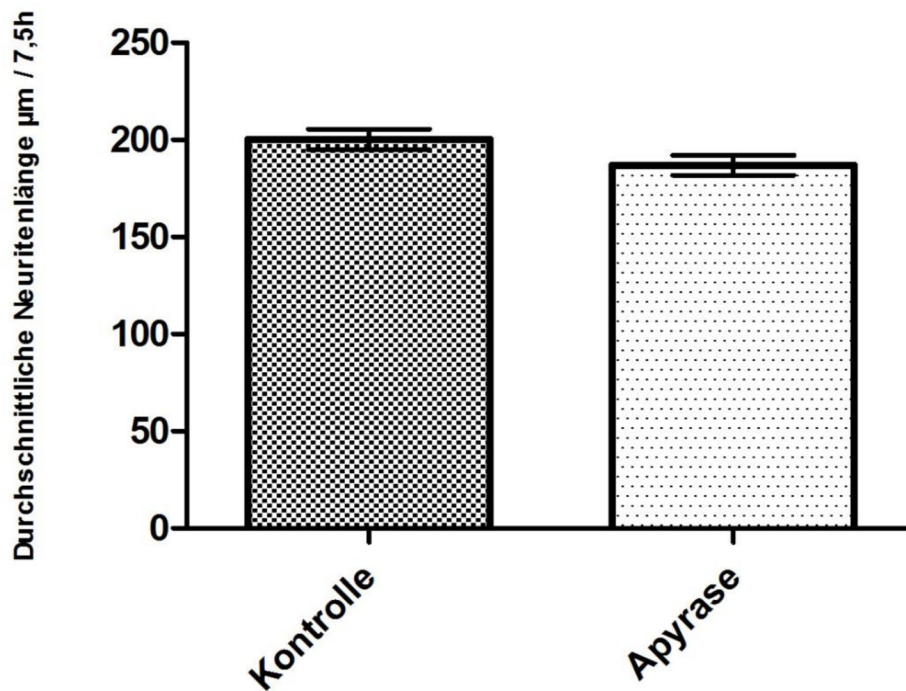


Abb.31: Einfluss von Apyrase auf das Wachstum der Neuriten dissoziierter Neurone des Haushuhnes (*Gallus gallus*). Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge im Vergleich zur Kontrolle nach Zugabe von Apyrase mit einer Wachstumszeit von 7,5h. Das Enzym Apyrase hydrolysiert ATP und ADP zu AMP. Durch diesen beschleunigten Abbau von einzelnen Nucleotiden konnte bei dissoziierten Neuronen der Hinterwurzelganglien eine Verminderung in der Gesamtlänge der Neuriten von 5,7% gemessen werden. Die durchschnittliche Neuritenlänge der Neurone, welchen Apyrase zugefügt wurde (n=187), lag bei 188,9 µM, im Vergleich zu der Kontrolle (n=186), welche eine durchschnittliche Neuritenlänge von 200,3 µM aufwies. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

### 3.4.3 Einfluss des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL67156 auf das Wachstum sensorischer Neurone

Die vier Hauptgruppen der Ektonukleotidasen repräsentieren eine Gruppe von membrangebunden Enzymen, zu welchen die ectonucleoside triphosphate diphosphoydolases (ENTPDs), ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (ENPPs), ecto5'-nucleotidase/CD73 (ENT5) und die alkaline phosphatases (AP) zählen. Über die Ektonukleotidasen ist bekannt, dass sie Regulatoren des Nucleotidmetabolismus sind [137, 140]. Bislang ist in der Literatur kein potenter und selektiver Inhibitor für die Ektonukleotidasen beschrieben. Die bislang bekannten NTPDase-Inhibitoren sind ATP-analoga, welche jedoch meist eine fehlende chemische und physiologische Stabilität aufweisen [141]. In diesem Versuch wurde der unspezifische Ektonukleotidase-Inhibitor ARL 67156 (FPL 67156 *N*<sup>6</sup>-deethyl-1- $\beta$ , $\gamma$ -dibromomethylene-ATP, Abb. 32) verwendet.

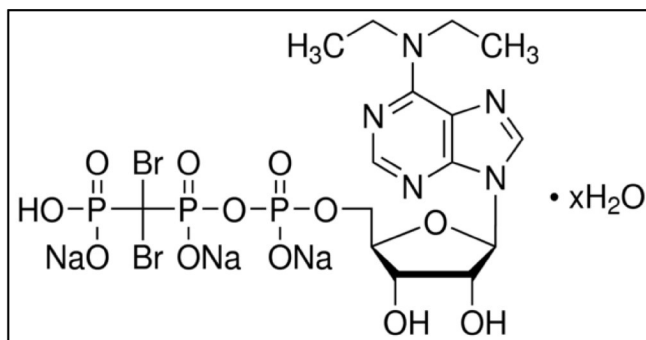


Abb. 32: Struktur von ARL 67156 einem unspezifischen Ektonukleotidase-Inhibitor. Abbildung entspricht dem Original, entnommen von Sigma-Aldrich GmbH.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass es mit diesem Inhibitor möglich ist, die NTPDase1 und die NTPDase3 zu inhibieren, er jedoch nur eine geringe Wirkung auf die NTPDasen 2 und 8 hat [142, 143]. Die hier eingesetzte Konzentration orientierte sich, wegen fehlender Erfahrungen zu diesem Inhibitor innerhalb dieser Arbeitsgruppe, an der Literatur und betrug 100  $\mu$ M [144]. Das unspezifische Blocken der Ektonukleotidasen mit ARL 67156 (100  $\mu$ M) führte zu einer Wachstumshemmung von 8,4%. Neurone der Kontrolle (n=184) wuchsen im Durchschnitt, während der gemessenen 7,5 Stunden, 210,1  $\mu$ m.

Die mit ARL 67156 (n=182) geblockten Neurone hingegen wuchsen im Durchschnitt nur 192,5  $\mu\text{m}$ . Die dazugehörigen Werte sind Abbildung 33 und der Tabelle 2 zu entnehmen.

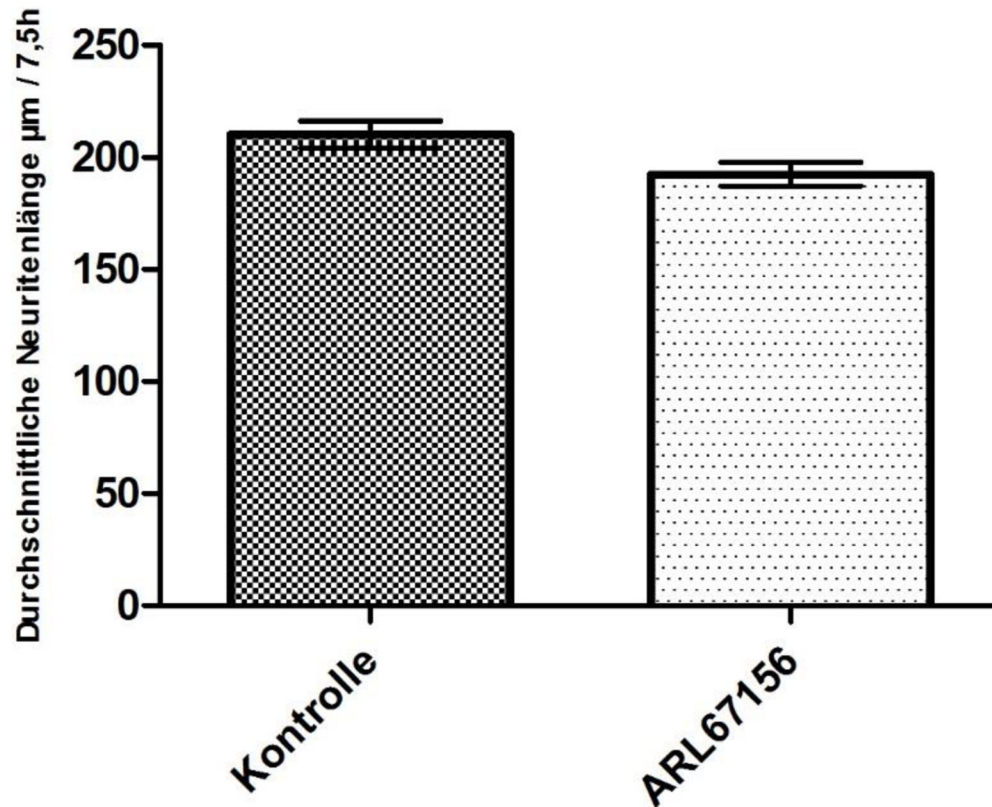


Abb.33: Einfluss des unspezifischen Ektonukleotidase-Inhibitors ARL 67156 auf das Wachstum der Neuriten dissoziierter Neurone des Haushuhnes (*Gallus gallus*). Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge im Vergleich zur Kontrolle nach Zugabe von ARL 67156 mit einer Wachstumszeit von 7,5h. Dieser Inhibitor blockt die NTPDase 1 und 3. Durch das Blocken der vorkommenden Ektonukleotidasen konnte, bei dissoziierten Neuronen der Hinterwurzelganglien, eine Verminderung in der Gesamtlänge der Neuriten von 8,4% gemessen werden. Die durchschnittliche Neuritenlänge der Neurone, welche mit ARL 67156 geblockt wurde (n=182), lag bei 192,5  $\mu\text{m}$ , im Vergleich zu der Kontrolle (n=184), welche eine durchschnittliche Neuritenlänge von 210,1  $\mu\text{m}$  aufwies. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.

### 3.4.4 Zusammenfassung der Messungen mit Adenosin Desaminase, Apyrase und ARL67156

Nukleoside zählen zu den organischen Molekülen und bestehen aus einer heterocyclischen Nucleobase mit Stickstoff und aus einer Pentose (Monosacharid). Phosphorylierung von Nucleosiden an der primären Hydroxylgruppe der Pentose führt zur Bildung eines Nucleotides wie beispielsweise ATP, ADP und AMP (Abb. 34). Sowohl Nucleoside als auch Nucleotide sind wesentliche Bestandteile aller lebenden Zellen und in einer Vielzahl an biologischen Systemen [145].

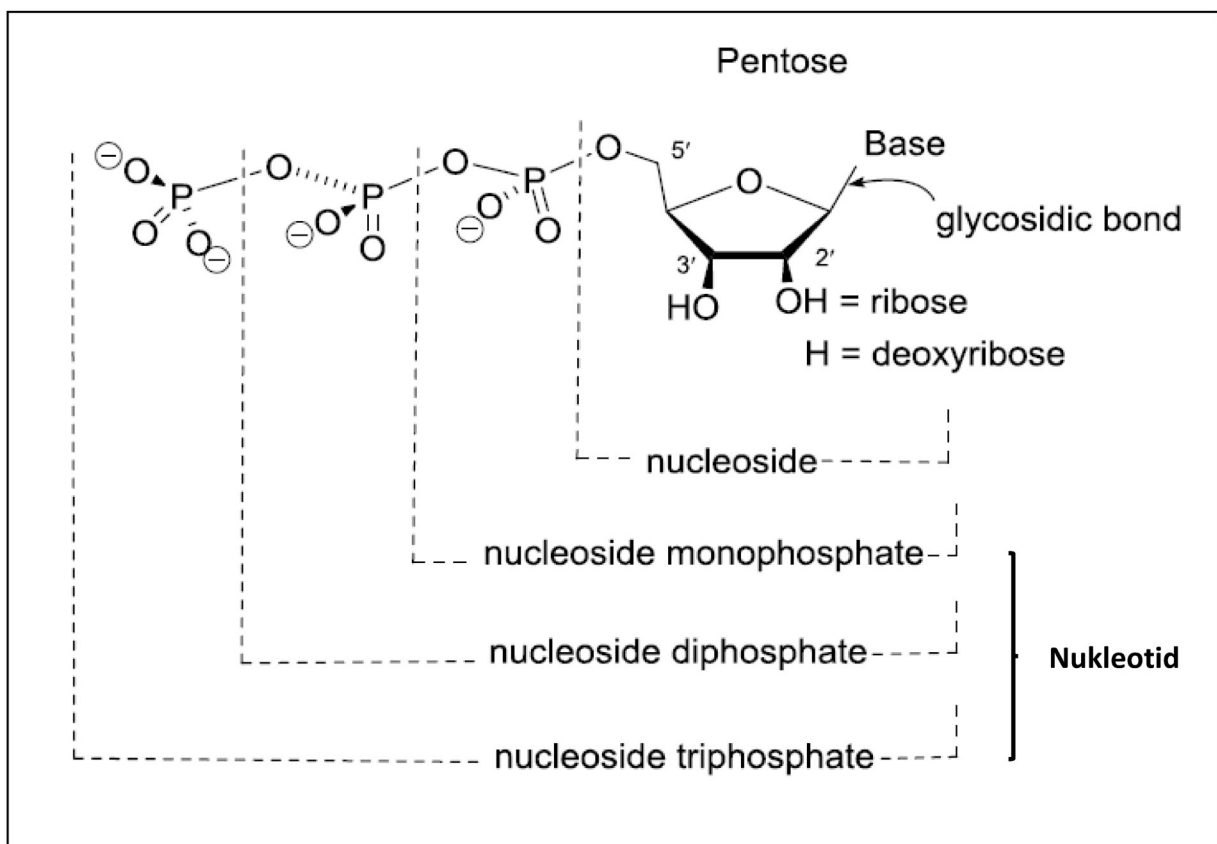


Abb. 34: Strukturelle Zusammensetzung von Nucleotiden und Nucleosiden. Abbildung entspricht dem Original [145].

Ektonucleotidasen spielen eine wichtige Rolle bei der purinergen Signaltransduktion. Sie hydrolysieren extrazelluläre Nucleotide, wie beispielsweise ATP zu ADP, welche dann durch purinerge Rezeptoren oder durch die Zelle selbst wiederaufgenommen werden können [137]. In diesem Versuchsabschnitt wurde unter anderem das Enzym Adenosin Desaminase, welche Adenosin zu Inosin desaminiert [134], verwendet. Des Weiteren wurde eine Apyrase aus der Kartoffel, eine lösliche Form aus der Familie der Ektonucleotidasen [146], eingesetzt.

In beiden Versuchsabschnitten konnte sowohl durch den beschleunigten Abbau von Adenosin zu Inosin durch die Adenosin Desaminase, als auch durch den beschleunigten Abbau von ATP zu ADP durch die eingesetzte Apyrase, eine Verminderung im Wachstum der Neuriten von dissoziierten Hinterwurzelganglien gemessen werden. Des Weiteren konnte durch das unspezifische Blocken der Ektonukleotidasen mit dem Inhibitor ARL 67156 eine ähnliche Reaktion der Neurone, in Bezug auf das Wachstum, gemessen werden. Mittels der Adenosin Desaminase sowie mit dem Inhibitor ARL 67156 konnte ein Rückgang in der Neuritenlänge von über 8%, gegenüber der Kontrolle, detektiert werden. Die dazugegebene Apyrase hingegen führte auch zu einem verkürzten Wachstum der Fortsätze der dissoziierten Neurone, jedoch betrug dies nur knapp 6%, gemessen gegen die Kontrollen. Die Werte zu den einzelnen Versuchsabschnitten können der Tabelle 2 entnommen werden, weiter ist in Abbildung 35 die prozentuale Veränderung des Wachstums, zur Kontrolle hin gemessen, zu sehen.

*Tabelle 2: Verwendete Enzyme und Inhibitoren zur Hydrolyse von Nucleotiden und Blocken der E-NTPDasen.*

Zielstruktur	Enzym/Inhibitor	n	Mittelwert ( $\mu\text{m}/7,5\text{h}$ )	Standardfehler des Mittelwerts	Mann-Whitney-Test (p-Wert)	% Änderung des Wachstums
Adenosin	Adenosin Desaminase	278	174,4	4,53	0,0096 (**)	-8,7%
	Kontrolle	320	191,1	5,13		
ATP	Apyrase	187	188,9	5,18	0,0709	-5,7%
	Kontrolle	186	200,3	5,29		
Ektonukleotidasen	ARL 67156	182	192,5	5,31	0,0570	-8,4%
	Kontrolle	184	210,1	6,10		

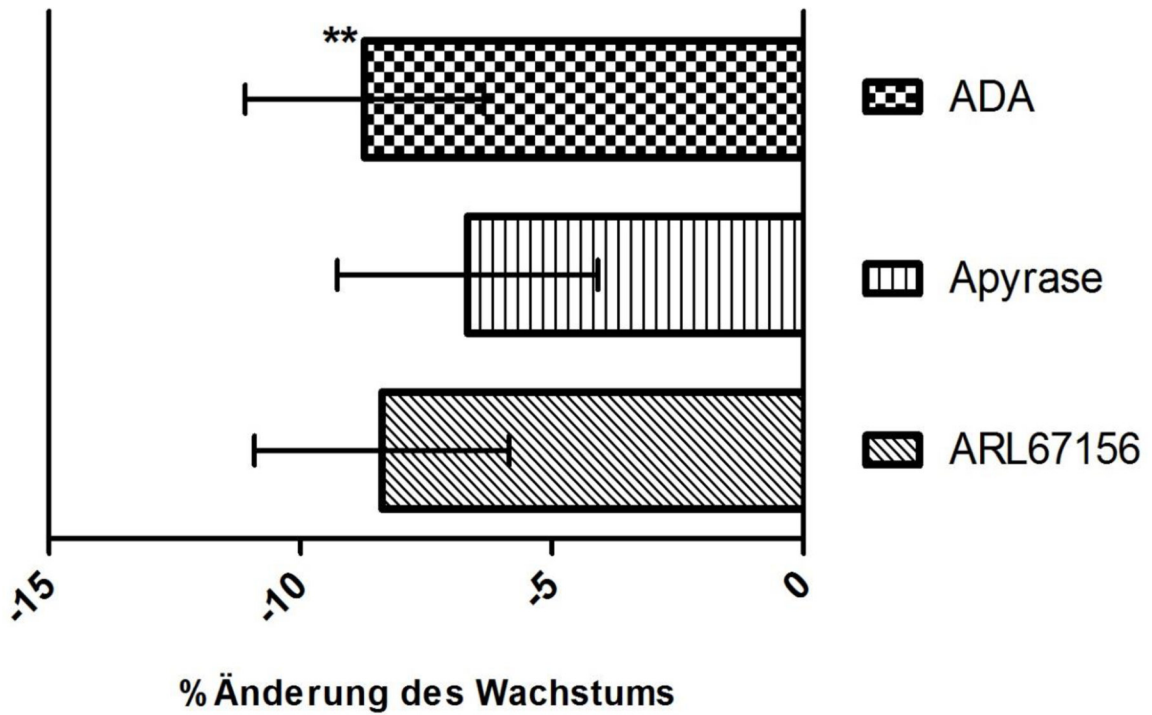


Abb. 35: Gezeigt ist der Einfluss von Adenosin Desaminase, Apyrase und dem unspezifischen Ektonukleotidaseinhibitor ARL 67156 auf das Wachstum sensorischer Neuronen. Durch den aktiven Abbau von Adenosin durch die Zugabe von Adenosin Desaminase, konnte eine signifikante Verringerung des Wachstums um 8,7% gemessen werden.



### 3.5 ATP-Vesikelfärbung

Mittels einer Fluoreszenzfärbung sollten mögliche ATP-Speicher in Neuronen von Hinterwurzelganglien, wie beispielsweise ATP enthaltenden Vesikeln, visualisiert werden. Zur Lokalisation von Purinen in den intrazellulären Strukturen von unterschiedlichsten Zellsystemen findet Quinacrin (Abb. 36), aufgrund seiner hohen Affinität für ATP, eine häufige Anwendung [74-76]. Wissenschaftlichen Veröffentlichungen zufolge konnte in unterschiedlichen Zelltypen die Freisetzung von ATP gezeigt werden [62, 135]. Die Arbeitsgruppe um Jung et al. zeigte, dass die Freisetzung von vesikulärem ATP in Hinterwurzelganglien von Ratten durch lysosomale Exocytose stattfindet, was unter anderem mittels einer Quinacrin-Fluoreszenzfärbung gezeigt werden konnte. Mit Hilfe dieser Färbung konnten im Soma und im Wachstumskegel von sensorischen Neuronen ATP-Vesikel detektiert werden [62, 136]. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte überprüft werden, ob auch in sensorischen Neuronen von Hühnerembryonen, welches das Zellsystem ist mit dem diese Arbeit durchgeführt wurde, durch eine Quinacrinfärbung vesikuläres ATP lokalisiert werden kann.

Für diese Experimente wurden die Ganglien aus E11-Hühnerembryonen präpariert, geputzt und anschließend für 24 Stunden auswachsen gelassen. Für die *in vitro* Quinacrin Färbung wurden die über Nacht sonnenförmig ausgewachsenen Ganglien bei 37°C und bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 7,5% mit 25µM Quinacrin, gelöst in PBS und weiterverdünnt im warmen Zellkulturmedium, für 30 Minuten inkubiert. Für die Visualisierung der Neuriten und der dazugehörigen Wachstumskegel wurde Fura2-AM (Abb. 36) verwendet.

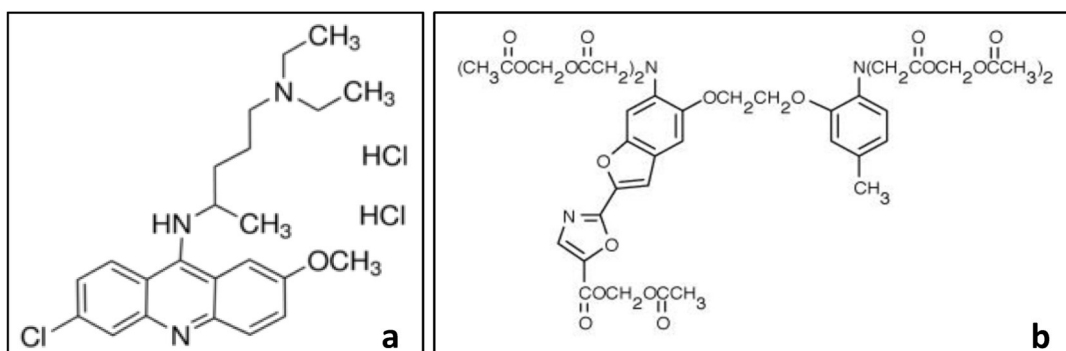
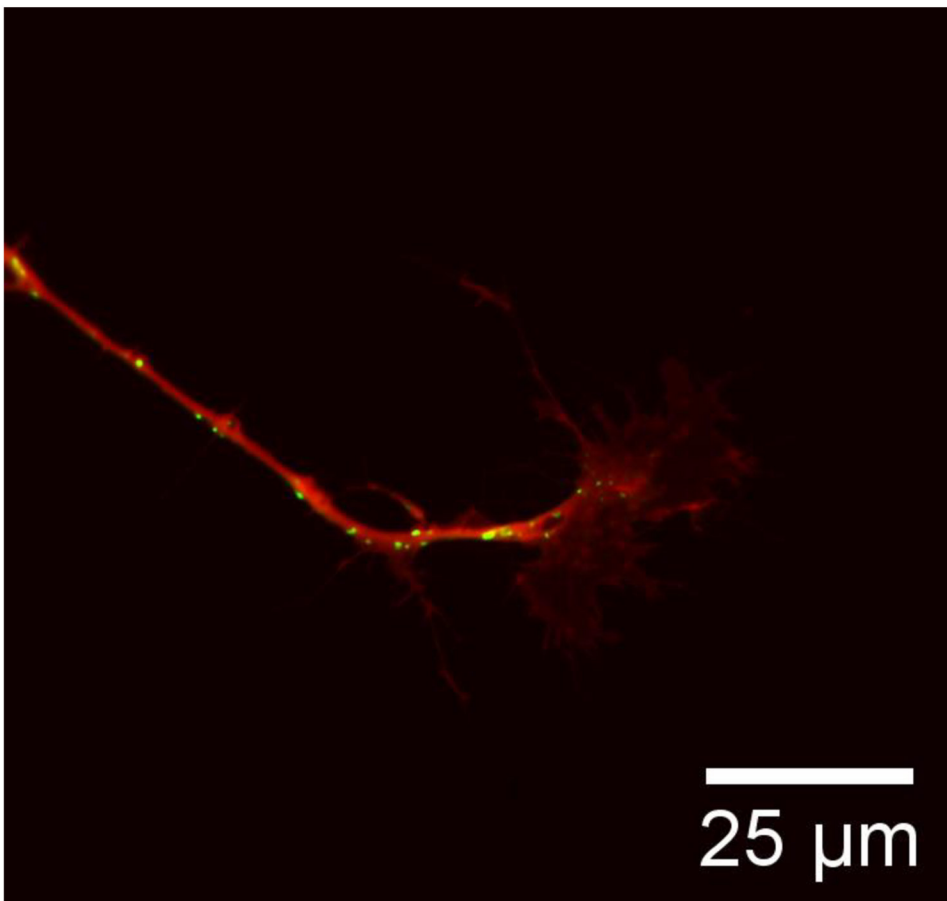


Abb. 36: Strukturformel von Quinacrin (a). Strukturformel von Fura2-AM, einem membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff (b). Beide Abbildungen entsprechen dem Original, (a) entnommen von Sigma-Aldrich GmbH, (b) entnommen von Thermo Fisher Scientific.

Um gleichzeitig die Struktur der Neuriten und Wachstumskegel sichtbar zu machen, wurde eine Doppelfärbung mit Quinacrin und Fura2-AM (Endkonzentration  $2\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Fura2-AM hat sowohl den Vorteil, dass er sich in der Anregungswellenlänge, welche für diesen Farbstoff bei  $340\text{ nm}$  liegt, mit Quinacrin nicht überschneidet, als auch, dass dieser Farbstoff durch seine Acetoxymethylestergruppe leicht über die Zellmembran in den Interzellularraum diffundiert. Im Zellinneren wird dann die Acetoxymethylestergruppe von zelleigenen Esterasen abgespalten und ist somit nicht mehr membrangängig [147].

Nach Inkubation mit der Doppelfärbelösung und dreimaligem Waschen mit  $1\text{ ml}$  vorgewärmtem Medium, konnten die Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie und einem Setup mit einer konstanten Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  und  $7,5\%$   $\text{CO}_2$ -Begasung gemessen werden. In Abbildung 37 ist die mit Fura2-AM angefärbte Struktur eines handförmig ausgebreiteten Wachstumskegels zu sehen (rot). Des Weiteren sind innerhalb des Wachstumskegels sowie auch entlang der Neuriten mit Quinacrin angefärbte ATP-Vesikel (grün) zu erkennen. Diese Fluoreszenzfärbung zeigt, dass auch in sensorischen Neuronen von Hühnern vesikuläres ATP in den Neuriten sowie dem Wachstumskegel zu finden ist.



*Abb.37:* Handförmig ausgebreiteter Wachstumskegel und Neurit von einem Hinterwurzelganglion eines E11 Hühnerembryos. Mit Fura2-AM wurde der Neurit und der dazugehörige Wachstumskegel sichtbar gemacht. Mittels einer Quinacrinfärbung konnten ATP-Vesikel im Wachstumskegel und dem Neuriten (grün) gezeigt werden.



Die Durchführung von Kontrollfärbungen fand mit MitoTracker® und LysoTracker® statt. Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker® der Firma Invitrogen, wurde zur Färbung von Mitochondrien in Ganglienexplantaten benutzt.

LysoTracker®, welcher ebenfalls von der Firma Invitrogen bezogen wurde, ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Färbung von lysosomalen Strukturen. Färbungen mit Quinacrin und MitoTracker® zeigten deutliche Unterschiede in der Lokalisation und Morphologie der angefärbten Strukturen. Deutlich konnte das mitochondriale Netzwerk, welches durch die bohnenförmigen Mitochondrien gebildet wird, von den vesikulären Strukturen der Quinacrinfärbung unterschieden werden. Eine Doppelfärbung mit LysoTracker® und Quinacrin war auf Grund der zu ähnlichen Anregungswellenlänge der beiden hier gewählten Fluoreszenzfarbstoffe nicht möglich. Aus diesem Grund wurden Dreifachfärbungen mit MitoTracker®, LysoTracker® und HOECHST 33258 gemacht. Mit dem Farbstoff Quinacrin konnten gleichartige Kompartimente wie mit LysoTracker® angefärbt werden, jedoch bezog sich dies nur auf Strukturen um den Zellkern, die sowohl mit Quinacrin als auch mit LysoTracker® angefärbt werden konnten. Wie in Abbildung 37 gezeigt, konnten nur durch den Farbstoff Quinacrine vesikuläre Strukturen in den Neuriten und im Wachstumskegel detektiert werden.

## 4.0 Diskussion

Der Begriff Regeneration stammt aus dem Lateinischen (regeneratio) und bezeichnet allgemein die Neuentstehung bzw. die Wiederherstellung. Die Regeneration neuronaler Fortsätze ist ein komplexer Vorgang, welcher im zentralen wie auch im peripheren System unterschiedlichen Mechanismen unterliegt. Heute ist bekannt das Axone sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem die Kapazität zur Regeneration haben.

Herbert Seddon klassifizierte im Jahre 1943 traumatische Schädigungen von peripheren Nerven in drei Klassen, welche er mit Neurapraxie, Axonotmesis und Neurotmesis bezeichnete.

Neurapraxie stellt den ersten Verletzungsgrad in der Klassifizierung nach Herbert Seddon dar. Von einer Neuapraxie spricht man, wenn, beispielsweise durch ein stumpfes Trauma, die Myelinschicht der Nervenfasern verletzt ist. Diese Verletzung hat eine Störung der Nervenleitgeschwindigkeit zur Folge. Eine vollständige Regeneration ist jedoch innerhalb weniger Tage zu erwarten [148].

Beim zweiten Verletzungsgrad, der Axonotmesis, ist das Axon geschädigt, die bindegewebigen Strukturen sind jedoch noch intakt. Bei einer Axonotmesis liegt klinisch gesehen ein vollständiger Funktionsverlust des Nervs vor. Die erhaltene mesenchymale Struktur dient dem regenerierenden Axon als Leitschiene, wodurch eine funktionelle Erholung sehr wahrscheinlich ist. Bei diesem peripheren Verletzungsgrad erfolgt distal ein Waller-Degenerations-Prozess [148].

Neurotmesis ist der dritte Verletzungsgrad und beschreibt eine komplette Durchtrennung des Nervs [148]. Sydney Sutherland präziserte die Klassifizierung von Seddon und unterteilte den dritten Verletzungsgrad weiter wodurch der Verletzungsgrad und die klinische Prognose besser beurteilt werden kann [148].

Zum heutigen Zeitpunkt ist im Bereich der neuronalen Regeneration in der Peripherie vieles über den Heilungsprozess bekannt. Ein zentraler Aspekt ist, dass der Prozess der Wiederherstellung des physiologischen Zustandes nicht allein auf die beschädigte Stelle lokalisiert ist. Auch die Zellkörper sind an dem Regenerationsprozess beteiligt. Wie bereits beschrieben, findet ein Heilungsprozess abhängig vom Verletzungsgrad zeitnah oder erst nach durchlaufen des Waller-Degenerations-Prozesses statt (Abb. 38) [13, 14]. Der Prozess der Regeneration von Axonen ist zu einem durch die intrinsische Wachstumskapazität und zum anderen durch die unmittelbare Umgebung geregelt.

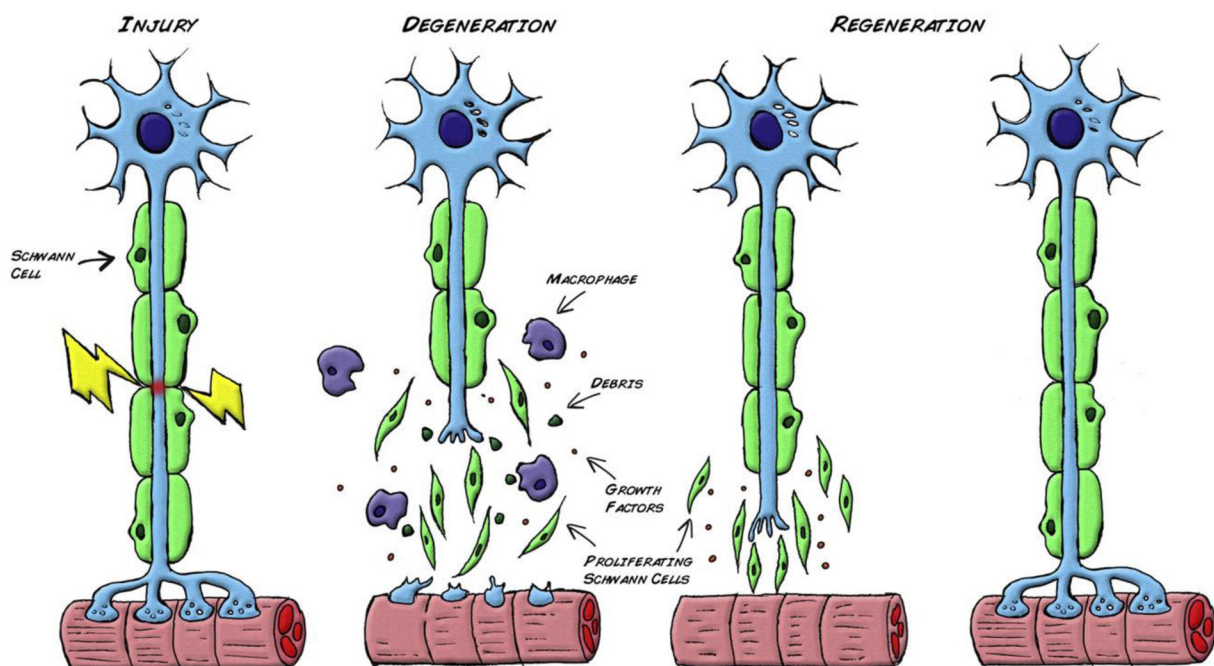


Abb. 38: Waller-Degeneration nach einem Trauma im distalen Bereich eines Neuriten. Innerhalb weniger Stunden degeneriert sowohl das Axon als auch das Myelin im distalen Bereich. Makrophagen wandern zu der verletzte Stelle und beseitigen die Zellreste. In den ersten 24h vermehren sich Schwann-Zellen und verändern ihren Phänotyp von myelinisierend zu regenerativ. Gleichzeitig erfolgt eine hoch-Regulierung unterschiedlicher Moleküle, wie beispielsweise von Adhäsionsmolekülen, Nervenwachstumsfaktoren und auch des Signalstoffs Neutrophin 3. Schwann-Zellen bilden entlang des zerstörten Axons ein Zellband aus. Diese werden Bünger-Bänder genannt, stellen eine Leitschiene für das nachwachsende Axon dar und sind somit die Voraussetzung zum Erreichen des distalen Faserabschnittes [14]. Abbildung entspricht dem Original [14].

Dass Nervenfortsätze im zentralen System, wie auch im peripheren Nervensystem, die Kapazität zu einem erneuten Wachstum haben, konnten in den 1980ern Aquayo und Kollegen zeigen. Eine Vielzahl an wachstumshemmenden Faktoren, welche beispielsweise im Myelin des ZNS angereichert sind und das erneute Auswachsen von zerstörten oder geschädigten Axonen im zentralen Nervensystem verhindern, sind heute bekannt. Zu diesen Molekülen zählen unter anderem das Membranprotein Nogo-A, Myelin-assoziiertes-Glykoprotein (MAG) oder Ephrin A3 und B3. Der Einfluss dieser wachstumshemmenden Faktoren kann in zwei Bereiche unterteilt werden. Zum einen können diese zu einem schnellen und lokalen Kollaps in den Lamellipodien und Filopodien des Wachstumskegels führen, zum anderen kann es, beispielsweise durch Nogo-A, zu einer lang anhaltenden im Zellkörper vermittelten Wachstumshemmung kommen [15-17].

In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde gezeigt, dass RtcA (RNA 3'-terminal phosphatase cyclase) zu den Faktoren zählt, die Einfluss auf die Regeneration von Neuronen haben. RtcA, ein RNA-Prozessierungsenzym, spielt sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem eine Rolle im Regenerationsprozess von Neuronen [149].

Aufgrund der in dieser Arbeit angewandten Technik des Dissoziierens der Neuronen, bei dem alle neuronalen Fortsätze verloren gehen, kann nicht im klassischen Sinne von einer Neuritenregeneration gesprochen werden. In dem hier verwendeten Wachstumsassay sollte nicht die Regeneration von Neuronen sondern das Wachstum von neuronalen Fortsätzen in einem Zellkultursystem von einzelnen Neuronen untersucht werden.

## 4.1 Verwendete Agonisten und Antagonisten

Diese Arbeit ist aufgebaut auf früheren Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, die zeigen, dass Adenosin ein chemoattractant für Neurone aus den Hinterwurzelganglien von *Gallus gallus* ist [45]. Des Weiteren konnten Ergebnisse eigener Arbeiten zeigen, dass das Inhibieren des A<sub>2a</sub>-Rezeptors zu einer Verkürzung der Gesamtlänge der Neuriten führt [97].

Daher ist ein Abschnitt dieser Arbeit der Fragestellung gewidmet, welcher Adenosinrezeptor das Wachstum von sensorischen Neuronen beeinflussen kann. Die Basis dieser Arbeit sind ausschließlich pharmakologische Experimente. Ein Grund hierfür ist die Wahl des Modellsystems Hühnerembryo. Die Arbeit mit transgenen Versuchstieren, wie beispielsweise einer transgenen A<sub>2a</sub><sup>-/-</sup> Adenosin Rezeptor Maus (A<sub>2a</sub> knockout Maus), hätte einen erheblichen Mehrwert für die Versuche dargestellt, war aber auf Grund der Entscheidung für Hühnerembryonen nicht möglich. Weiter waren, durch die Rahmenbedingungen innerhalb der Arbeitsgruppe molekularbiologische Versuche nicht durchführbar.

Bei der Arbeit mit pharmakologischen Substanzen ergeben sich grundlegende Probleme, die in die Wahl der verwendeten Agonisten und Antagonisten mit einbezogen werden mussten. Denkbare Probleme waren sowohl „off-target“ Effekte, Lösungsmittelleffekte, die Beeinflussung des Wachstums auf Grund mechanischer Perturbation durch Zugabe der jeweiligen Substanzen und speziebedingte Variationen in der Wirksamkeit der verwendeten Agonisten und Antagonisten.

Die oben genannten Probleme mit einbezogen, fiel die Wahl zunächst auf einen unspezifischen Adenosinrezeptor-Antagonisten. 9-chloro-2-(2-furanyl)-{1,2,4}-triazolo{1,5-c}quinazolin-5-amine (CGS 15943) ist ein nicht-Xanthiner Adenosinantagonist [98]. Die Entscheidung für CGS 15943 beruhte zum einem darauf, dass er in der Literatur als potenter, unspezifischer Adenosinrezeptor-Antagonist beschrieben ist [99]. Zum Anderen lagen langjährige Erfahrung aus der eigenen Arbeitsgruppe in Bezug auf die Löslichkeit für diesen Antagonisten vor. Die der Literatur entnommenen K<sub>i</sub>-Werte für diesen Antagonisten liegen für den A<sub>1</sub>-Rezeptor bei 3,5 nM, für den A<sub>2a</sub>-Rezeptor bei 4,2 nM, für den A<sub>2b</sub>-Rezeptor bei 910 nM und für den A<sub>3</sub>-Rezeptor bei 51 nM [99].

Um alle Rezeptor-Subtypen zu blocken, entsprach die verwendete Endkonzentration  $9\mu\text{M}$ . Da die Konzentration von CGS 15943 etwa 10 Mal höher war als der größte  $K_i$ -Wert, konnte davon ausgegangen werden, dass nahezu alle Rezeptoren, einschließlich des  $A_{2b}$ -Rezeptors, geblockt waren. Dass die signifikante Verlangsamung des Wachstums neuronaler Fortsätze von 17%, durch Zugabe von CGS 15943, auf einen „off target“ Effekt zurückzuführen ist, ist unwahrscheinlich. Diese Annahme ist gestützt durch die vorangegangenen Versuche, bei welchen ein spezifischer  $A_{2a}$ -Rezeptorantagonist, SCH 442416, einen vergleichbaren Effekt auf das Wachstum von sensorischen Neurone hatte [97]. Weiter konnte durch die Zugabe von Adenosin Desaminase, durch den Abbau von Adenosin, ebenfalls ein wachstumshemmender Effekt gemessen werden.

Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob ein oder mehrere Subtypen von Adenosinrezeptoren das Wachstum von neuronalen Fortsätzen beeinflussen, kamen in der anschließenden Versuchsreihe spezifische Agonisten und Antagonisten für die jeweiligen Subtypen der Adenosinrezeptoren zum Einsatz.

In der Literatur ist 2-(p-(2-carboxyethyl)phenylethylamino)-5'-N-ethylcarboxamido-Adenosin (CGS 21680) als hoch selektiver  $A_{2a}$ -Rezeptoragonist beschrieben, dessen hohe Affinität für den  $A_{2a}$ -Rezeptor experimentell an Ratten nachgewiesen wurde [89]. CGS 21680 ist ein synthetisch hergestellter Agonist, welcher einen strukturell gleichartigen Liganden wie der natürliche Agonist Adenosin mit dem Substituent (2-carboxyethyl)phenylethylamino-Gruppe an der C2 Position vom Adenin und dem Substituent Nethylcarboxamido-Gruppe am C5' der Ribose [90] darstellt. In der Literatur ist die Spezifität von CGS 21680 lediglich für den menschlichen  $A_{2a}$ -Rezeptor sowie den entsprechenden Rezeptor in Ratten [89] beschrieben. Nicht veröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe von John-Christian Eilert aus einem Cytoskelett-Assay zeigten jedoch auch eine Wirksamkeit im Modellsystem Hühnerembryo. In der Literatur wird diesem Agonisten, mit einem  $K_i$ -Wert = 27nM, eine hohe Affinität für den menschlichen  $A_{2a}$ -Rezeptor zugeschrieben [150]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Endkonzentration lag bei 100nM. Diese Konzentration orientierte sich an vorangegangenen Arbeiten und ermöglicht es Ergebnisse verschiedener Assays zu vergleichen. Durch die Zugabe von CGS21680 konnte das Wachstum, dissoziierter Neurone der Hinterwurzelganglien, signifikant gesteigert (9%) werden.

Das weitere Vorgehen bestand darin, den A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptor sowohl zu blocken als auch zu stimulieren. Aufgrund fehlender Erfahrungen in der eigenen Arbeitsgruppe in Bezug auf Agonisten und Antagonisten, den A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptor betreffend, konnte ausschließlich auf Informationen aus der Literatur zurückgegriffen werden. Wie anfänglich schon beschrieben, ist der A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptor aufgrund seiner niedrigen Affinität für Adenosin im Bereich der pathophysiologischen Prozesse angesiedelt. Dies macht den Rezeptor zu einem Zielobjekt für Medikamente, weshalb in den letzten Jahren eine Vielzahl an potenten und selektiven Antagonisten für den A<sub>2b</sub>-Rezeptor beschrieben worden sind [103-105]. 2009 entwickelten und publizierten Borrmann et al. 1-alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthine, eine Gruppe von hochaffinen und selektiven A<sub>2b</sub>-Rezeptorantagonisten [106]. Laut Literatur weist dieser Antagonist eine Spezifität mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 0,553 nM für den humanen A<sub>2b</sub>-Rezeptor auf. Weiter ist der Literatur zu entnehmen, dass dieser Agonist bis hin zu einer Konzentration von 10 µM keine Affinität für den A<sub>1</sub>, den A<sub>2a</sub> und den A<sub>3</sub> Rezeptor zeigt. Aus diesen Gründen wurde für die weiteren Versuche dieser spezifische A<sub>2b</sub>-Antagonist 8-(4-(4-(4-Chlorphenyl)piperazine-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (PSB603) ausgewählt [106].

PSB603 zählt zu den von der Xanthin-Struktur abgeleiteten Antagonisten. Die verwendete Endkonzentration von PSB603 orientierte sich auf Grund von fehlenden Erfahrungswerten an in der Literatur etablierten Konzentrationen und betrug in der vorliegenden Arbeit durchweg 100nM [108, 109]. Das spezifische Inhibieren des A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptors mit PSB603 zeigte eine nicht signifikante Verlangsamung des Wachstums von sensorischen Neuronen von 7%.

Zusätzlich zu diversen Adenosin A<sub>2b</sub>-Rezeptorantagonisten wurden in den letzten Jahren an den A<sub>2b</sub>-Rezeptor bindende Liganden publiziert [111, 112]. 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) war der erste Adenosinderivat-A<sub>2b</sub>-Agonist [113], welcher zu den potenten aber nicht selektiven Adenosinrezeptor-A<sub>2b</sub>-Agonisten zählt [109]. Eine weitaus kleinere Gruppe von selektiven Agonisten, welche sich strukturell nicht von Adenosin ableiten lassen, stellen die Pyridin-3,5-dicarbonitril-Derivate dar [110]. Zu dieser Klasse zählt BAY60-6583, ein 2-aminopyridine-3,5-dicarbonitrile Derivat, welches von Bayer Healthcare (Wuppertal, Germany) entwickelt worden ist [114].

In der Literatur ist BAY60-6583 als der einzige derzeit im Handel erhältliche potente und selektive  $A_{2b}$ -Adenosin-Rezeptoragonist beschrieben [113]. In diesem Versuch wurde der hoch selektive Agonist BAY60-6583 und nicht der potente Agonist NECA gewählt. NECA ist ein häufig in der Literatur verwendeter Agonist, jedoch wurde dieser mit seiner hohen Affinität für den  $A_1$ ,  $A_3$  und  $A_{2a}$ -Rezeptor [99] als ungeeignet für die im Rahmen der hier geplanten und durchgeführten Experimente befunden. Die verwendete Endkonzentration von BAY60-6583 orientierte sich ebenfalls an den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen von 100nM [113, 151]. Durch die Zugabe von BAY60-6583 konnte keine Veränderung im Längenwachstum sensorischer Neuronen gemessen werden.

Wie anfänglich schon beschrieben, kann es in der Wirksamkeit, abhängig von der Spezies, Variationen geben. Auf Grund der Bedeutung von Nagetieren in der medizinischen und biologischen Forschung sind die von den Firmen empfohlenen Konzentrationen und Wirkungssysteme auf Versuche mit Labortieren, wie Ratten oder Mäusen, ausgelegt. Aus diesem Grund sind manche pharmazeutischen Produkte, wie beispielsweise Inhibitoren, nur in eingeschränktem Maße oder auch gar nicht für andere Modellsysteme nutzbar. Da im Bereich dieser Inhibitoren nicht auf persönliche Mitteilungen oder Literatur in Bezug auf das hier gewählte Modellsystem zurückgegriffen werden konnte, wären weitere Versuche in unterschiedlichen Konzentrationen nötig gewesen, um eine abschließende Aussage treffen zu können.

Der  $A_1$ -Adenosinrezeptor ist der bislang am besten erforschte Rezeptor der P1-Rezeptorfamilie. In der Literatur sind zahlreiche  $A_1$ -Adenosinrezeptor-Agonisten sowie Antagonisten beschrieben. Diverse xanthine und nichtxanthine  $A_1$ -Rezeptorantagonisten, unter anderem Rolofylline, Toponafylline, FK-453 (R- $\{(E)\}$ -3-(2-phenylpyrazolo(1,5- $\alpha$ )pyridin-3-yl) und auch SLV320 (4-(4-hydroxycyclohexylamino)-6-phenylpyrrolo(2,3- $d$ )pyrimidine), wurden in klinischen Studien getestet. Bislang wurde jedoch keiner dieser Antagonisten als Medikament zugelassen [107, 118]. Zum Inhibieren des  $A_1$ -Adenosinrezeptors kam ein selektiver Antagonist (SLV320) zum Einsatz.



Die gewählte Arbeitskonzentration von 10nM stützte sich zum einen auf die in der Literatur beschriebenen  $K_i$ -Werte, welche für den menschlichen  $A_1$ -Rezeptor bei 1 nM, den  $A_{2a}$ -Rezeptor bei 398 nM, den  $A_{2b}$ -Rezeptor bei 3,9 mM und den  $A_3$ -Rezeptor bei 200 nM liegen [107, 152], und zum anderen auf Erfahrungen aus dem eigenem Labor.

Die Inhibierung mit SLV320 zeigte keine Veränderung im Längenwachstum von sensorischen Neuronen. Aufgrund der verwendeten Konzentration von 10nM, der zehnfachen Konzentration des für den  $A_1$ -Rezeptor angegebenen  $K_i$ -Wertes, sowie durch die in der Literatur beschriebene Selektivität für den  $A_1$ -Adenosinrezeptor, kann davon ausgegangen werden, dass der  $A_1$ -Adenosinrezeptor keinen Einfluss auf das Wachstum von sensorischen Neuronen hat.

Im letzten Teilabschnitt sollte noch der  $A_3$ -Adenosinrezeptor, durch Zugabe von Agonisten und Antagonisten, auf seinen Einfluss auf das Längenwachstum von Neuronen aus den Hinterwurzelganglien von *Gallus gallus* untersucht werden. Wie auch für die Adenosinrezeptoren  $A_1$ ,  $A_{2a}$ , und  $A_{2b}$ , sind selektive Agonisten ebenfalls für diesen Rezeptor handelsüblich verfügbar. Die am häufigsten verwendeten  $A_3$ -Agonisten leiten sich von Adenosinderivaten ab, welche durch eine Substitution von 5`-uranamide und *N*6-benzyl modifiziert werden und somit eine Rezeptoraffinität im nanomolaren Bereich aufweisen. Zu den selektiven  $A_3$ -Agonisten zählt unter anderem 2-Cl-IB-MECA (1-{2-Chloro-6-{{(3-iodophenyl)methyl}amino}-9*H*-purin-9-yl}-1-deoxy-*N*-methyl- $\beta$ -D-ribofuranuronamide) [127, 128], welches in diesem Versuch zum Einsatz gekommen ist. Der  $A_3$ -Adenosinrezeptor wurde mit dem spezifischen  $A_3$ -Agonist 2-Cl-IB-MECA und einer Endkonzentration von 10 nM stimuliert. 2-Cl-IB-MECA ist in der eigenen Arbeitsgruppe ein bereits etablierter Agonist und auf Grund der Datenlage vorangegangener Arbeiten wurde die Konzentration in Höhe von 10 nM übernommen. Die verwendete Konzentration von 10 nM entspricht in etwa der zehnfachen Konzentration des in der Literatur angegebenen  $K_D$ -Wertes von 1,4 nM für den menschlichen  $A_3$ -Adenosinrezeptor [127]. Durch das Stimulieren des  $A_3$ -Adenosinrezeptors konnte keine Veränderung im Wachstum von sensorischen Neuronen gemessen werden.

Für die Inhibierung des  $A_3$ -Adenosinrezeptors wurde der selektive  $A_3$ -Antagonist MRS1334 gewählt. Die Arbeitsgruppe um Kenneth A. Jacobson publizierte im Jahre 1997 die 4-(Phenylethynyl)-6-phenyl-1,4-dihydropyridin-Derivate, welche selektive Antagonisten für den menschlichen  $A_3$ -Rezeptor darstellen [131]. Zu dieser Klasse chemischer Adenosin-Rezeptorantagonisten zählt auch (3-ethyl-5-(4-nitrobenzyl)-2-methyl-4-phenylethynyl-6-phenyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) MRS1334 (Abb.24) [99].

Auch die Wahl dieses Inhibitors und die verwendete Konzentration von 25nM stützt sich auf die Erfahrung der eigenen Arbeitsgruppe und die in der Literatur beschriebene Selektivität für den  $A_3$ -Adenosinrezeptor [99]. So wie schon bei der Stimulation des  $A_3$ -Adenosinrezeptors, zeigte auch die Inhibierung keine Wachstumsveränderungen in sensorischen Neuronen.

Die pharmakologischen Studien mit den jeweiligen Agonisten und Antagonisten zeigen einen deutlichen Einfluss des  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptors auf das Wachstum. Die Rolle des  $A_{2b}$ -Adenosinrezeptors konnte nicht abschließend bestimmt werden. Das spezifische Stimulieren wie auch das Inhibieren des  $A_1$ - und des  $A_3$ -Adenosinrezeptors war unwirksam in Bezug auf das Wachstum. Dass abhängig von Agonist bzw. Antagonist eine Wachstumsbeschleunigung, eine Verlangsamung oder auch kein Effekt auftritt zeigt, dass Lösungsmittel und Zugabeartefakte ausgeschlossen werden können.

## 4.2 Einfluss des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors auf das Wachstum neuronaler Fortsätze von dorsalen Hinterwurzelganglien

Das Wachstum neuronaler Zellen ist nicht erst seit den letzten Jahren ein zentrales Thema der Forschung. Im Fokus der hier vorliegenden Arbeit war der Einfluss von Adenosinrezeptoren auf das Längenwachstum von Neuriten einzelner Neuronen. Der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor zählt zu den P1 oder Adenosinrezeptoren [50]. Diese sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), welche mit einer Proteinkette der 7 Transmembranhelix die Plasmamembran durchspannt [153]. Der natürliche Ligand der P1-Rezeptoren ist Adenosin [50].

Eine hohe Expressionsrate des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors weisen sowohl die Milz, der Thymus, die Leukozyten, das Stratum, der Bulbus olfactorius (Riechkolben) und auch die Blutplättchen auf. Weiter ist dieser Rezeptor in einer niedrigeren Expressionsrate in den Blutgefäßen, dem Herzen, der Lunge und in anderen Bereichen des Gehirns vertreten [154]. Die physiologische Rolle dieses Rezeptors kann nur sehr schwer eingegrenzt werden, da der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor mit verschiedenen Rezeptortypen kolokalisiert und mit unterschiedlichen Rezeptortypen oligoheteromere bildet, wie beispielsweise mit den Dopaminrezeptoren D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub> [155]. Eine wichtige Rolle spielt der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor bei der Vasodilatation und unterstützt die Bildung neuer Blutgefäße [155]. Weitere physiologische und pathophysiologische Prozesse an denen dieser Rezeptor beteiligt ist, sind die Immunsuppression, die Inhibierung von Thrombozytenaggregation, die Gefäßneubildung und neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson [156].

Über diesen Rezeptor ist im peripheren System bekannt, dass dieser in Hinterwurzelganglien von Ratten vorkommt. Die Arbeitsgruppe um Kaelin-Lang konnte bereits 1998 die Expression des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors in Hinterwurzelganglien von Ratten nachweisen [157]. Weiter wird dieser Rezeptor auch im Ganglion superius cervicale von Ratten [158] und in Hinterwurzelganglien von Mäusen exprimiert [159].

Zu den bislang schon bekannten Prozessen, bei denen der  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor involviert ist, konnte durch die vorliegende Arbeit eine weitere Funktion hinzugefügt werden. Die Daten zeigen auf, dass der  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor an der Wachstumsregulation von sensorischen Neuronen aus dem Hinterwurzelganglion von *Gallus gallus* beteiligt ist. Diese gemessenen Effekte stimmen mit einer kürzlich veröffentlichten Publikation einer Arbeitsgruppe überein, die ebenfalls durch Stimulation des  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptors im zentralen Nervensystem eine Wachstumszunahme zeigen konnte [160].

Der Vorgang des Präparierens von dorsalen Hinterwurzelganglien aus Hühnerembryonen und das anschließende Dissoziieren ist vergleichbar mit der anfänglich beschriebenen Neurotmesis, der kompletten Durchtrennung eines Nervs, welche mit dem Zeitpunkt Null (Aussaat der Zellen) gleichgesetzt werden kann. Durch diesen Vorgang sind sämtliche Neuriten abgetrennt und müssen durch das Neuron wieder neu gebildet werden. Der Versuchsaufbau, bei welchem nach dem Dissoziieren 2 Stunden gewartet wird, bis sich die ausgesäten Neuronen abgesetzt und neue Fortsätze initiiert wurden und dann erst die Zugabe der gewählten Substanz erfolgte, ermöglicht es, eine Aussage über den Einfluss der Adenosinrezeptoren auf das Wachstum der Fortsätze zu treffen. Zunächst zeigte das unspezifische Blocken aller Adenosinrezeptoren mit CGS15943, (vgl. Abb.14 und Tab. 1) dass das neuronale Wachstum, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant ( $p < 0,0001$ ) um knapp 17% verlangsamt ist. Dass dieser gemessene Effekt zum größten Teil dem  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor zuzuschreiben ist, zeigten Ergebnisse bei denen das spezifische Blocken dieses Rezeptors mit SCH442416, eine ähnliche inhibierende Wirkung auf das Wachstum der Neuriten hatte, wie CGS15943 [97]. Darüber hinaus führte das spezifische Stimulieren des  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptors zu einem signifikanten ( $p = 0,431$ ) Anstieg des Wachstums um 9,2% (vgl. Abb. 12 und Tab. 1). Aus diesen Versuchen kann demnach geschlossen werden, dass durch Stimulieren bzw. Inhibieren des  $A_{2a}$ -Rezeptors Einfluss auf das Wachstum von Neuriten genommen werden kann.

Während der Endphase dieser Arbeit, konnte eine Arbeitsgruppe aus Portugal einen ähnlichen Effekt durch den A<sub>2a</sub>-Rezeptor in Neuronen aus der Großhirnrinde von Sprague-Dawley E18 Ratten zeigen. Wie auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte die Arbeitsgruppe um Ribeiro durch Zugabe von CGS 21680, einem A<sub>2a</sub>-spezifischen Agonisten, einen Anstieg im neuronalen Wachstum messen. Weiter verwendetet diese Arbeitsgruppe zum Blocken des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors den spezifischen A<sub>2a</sub>-Antagonisten ZM241385, bei welchem ein signifikanter inhibierender Effekt in Bezug auf das Wachstum der Neurone beschrieben worden ist [160]. Da in der vorliegenden Arbeit, wie auch in einer vorangegangenen Bachelorarbeit, ein unspezifischer Adenosin-Rezeptor-antagonist bzw. der spezifische A<sub>2a</sub>-Antagonist SCH442416 verwendet worden ist, können diese Ergebnisse nicht direkt verglichen werden. Wie schon ausführlich beschrieben, beruht die Wahl der verwendeten Agonisten und Antagonisten auf Erfahrungen dieser Arbeitsgruppe in Bezug auf die Wirksamkeit für das hier verwendete Modellsystem *Gallus gallus*. Jedoch wäre es als weiterer Arbeitsschritt sinnvoll, den A<sub>2a</sub>-Antagonisten ZM241385 in dem hier verwendeten Assay ebenfalls zu testen, um die publizierten Daten besser vergleichen zu können.

Trotz der unterschiedlichen Auswahl der Antagonisten stützen die von Ribeiro publizierten Daten die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Effekte. In beiden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass, sowohl durch das Blocken als auch durch das Stimulieren des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors, Einfluss auf das Wachstum von Neuronen genommen werden kann. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit und durch die kürzlich erfolgte Publikation der Arbeitsgruppe um Ribeiro kann davon ausgegangen werden, dass, sowohl im peripheren als auch im zentralen System, der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor in Bezug auf das Wachstum von Neuronen einen Rolle spielt. Aufgrund der komplexen Physiologie des neuronalen Wachstums muss davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung bzw. Deaktivierung des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors nur ein Faktor unter vielen ist. Jedoch ist dies ein weiteres Puzzleteil, welches helfen kann die Forschung im Bereich der Regeneration von Neuronen voranzubringen.

### 4.3 Immunohistochemischer Nachweis des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors

Die unterschiedlichen Expressionsniveaus des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors, sowohl in Hinterwurzelganglien von Ratten und Mäusen wie auch in Neuronen der superior cervical ganglion (SCG) von Ratten, wurde bereits anfänglich ausführlich beschrieben [157-159].

In der hier vorgelegten Arbeit konnte zum ersten Mal im Huhn mit Hilfe einer Antikörperfärbung der Nachweis erbracht werden, dass der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor auch in sensorischen Neuronen aus dem *Gallus gallus* exprimiert wird. Die immunohistochemische Färbung zeigte die Expression des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors, sowohl im Soma, als auch auf dem Wachstumskegel und auf den Neuriten.

### 4.4 Der Einfluss des A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptors auf das Wachstum neuronaler Fortsätzen von dorsalen Hinterwurzelganglien

Als weiterer Adenosinrezeptor ist der A<sub>2b</sub>-Rezeptor zu nennen, welcher als enger Verwandter des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors gilt. Dieser, bislang am wenigsten erforschte und verstandene Rezeptor der Adenosin-Rezeptorfamilie, unterscheidet sich hinsichtlich seiner Affinität für Adenosin von dem bereits genannten A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor [161]. Laut Literatur liegt die Affinität des A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptors für Adenosin bei 5,1 µM, im Vergleich hierzu liegt die Affinität des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors für Adenosin bei 0,15 µM [100]. Auf Grund der niedrigen Affinität für Adenosin wird dem A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptor eine wichtige Rolle in pathophysiologischen Prozessen zugeschrieben, in denen vermehrt Adenosin ausgeschüttet wird. Hierzu gehört das Absterben von Zellen, was beispielsweise bei einem Herzinfarkt oder Schlaganfall stattfindet. Ebenfalls gilt der A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptor als interessante Zielstruktur in Hinblick auf Therapien von entzündlichen kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes und auch Asthma [101, 102]. Die Expression des A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptors ist ubiquitär im gesamten Organismus. Dieser Rezeptor ist sowohl in Zellen der Lunge, des Gehirns, im kardiovaskulären System, in Zellen des Immunsystems oder auch im Gastrointestinaltrakt zu finden [161].

Um festzustellen, ob auch der A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptor eine Rolle in neuronalem Wachstum spielt, folgten weitere Experimente sowohl mit einem spezifischen A<sub>2b</sub>-Rezeptoragonisten als auch einem A<sub>2b</sub>-Rezeptorantagonisten. Diese Experimente zeigten, dass das spezifische Blocken des A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptors mit PSB603 eine, wenn auch deutlich geringere als durch Blocken des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors, inhibierende Wirkung auf das Wachstum der Neuriten hat (vgl. Abb. 17 und Tab. 1). Hingegen zeigte das spezifische Stimulieren dieses Rezeptors mit BAY60-6583 keinerlei Änderungen im neuronalen Wachstum.

Aufgrund der fehlenden Erfahrung könnte der geringe inhibierende Einfluss von 7% auf die Wahl der Agonisten bzw. Antagonisten zurückzuführen sein. Die verwendeten Konzentrationen für das hier genutzte Modellsystem *Gallus gallus* könnten zu niedrig gewählt worden sein oder die gemessenen Daten zeigen einen off Target Effekt.

Gründe die für eine Beteiligung des A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptors am Wachstum von neuronalen Zellen sprechen, sind zum einen, dass eine, wenn auch nicht signifikante Inhibierung durch den spezifischen Antagonisten PSB603 von 7% gemessen worden ist. Zum Anderen ist sowohl dem A<sub>2a</sub>-Rezeptor als auch dem A<sub>2b</sub>-Rezeptor ein G<sub>s</sub>-Protein (stimulatorisch) nachgeschaltet, welches zu einer Aktivierung der Adenylzyklase führt, wodurch es zu einem cAMP-Anstieg kommt. Durch Blocken beider Rezeptoren wird somit die gleiche Signalkaskade gehemmt.

Jedoch muss in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden, dass die Komplexbildung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, in Form von homo- oder heterodimeren, aus der Literatur bekannt sind. So bilden A<sub>1</sub>- und A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor homo- wie heteromere Komplexe [162-164]. Weiter sind zu den schon aufgeführten Komplexbildungen mit sich selbst und zwischen dem A<sub>1</sub>- und A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor, Verbindungen mit Dopamin oder auch P2Y Rezeptoren in der Literatur beschrieben [165, 166]. Bei den angewandten biophysikalischen Methoden für den Nachweis der Komplexbildungen, handelt es sich um Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) oder auch dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [167].

Für die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Effekte könnten die von der Arbeitsgruppe um Moriyama 2010 veröffentlichten Daten, welche erstmals Hinweise für die Existenz von  $A_{2a}$ - $A_{2b}$ -Rezeptor-Heteromeren fand [168], von Bedeutung sein. Die von Moriyama gezeigten Ergebnisse konnten auch im Rahmen einer Dissertationsarbeit, unter der Leitung von Prof. Dr. Christa E. Müller, bestätigt werden [169]. In  $A_{2a}$ - $A_{2b}$ -Rezeptor-Heteromeren könnte das spezifische Inhibieren des  $A_{2b}$ -Rezeptors, mit dem Antagonisten PSB603, zu einer verringerten Aktivierung des  $A_{2a}$ -Rezeptors führen. Dies könnte für den gemessenen Effekt, das verringerte Wachstum der Neuronen von 7%, nach Blocken des  $A_{2b}$ -Rezeptors, verantwortlich sein.

Weiterhin spricht eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit für eine Beteiligung des  $A_{2b}$ -Adenosinrezeptors an der Regulation neuronalen Wachstums. Dort wurde gezeigt, dass nach Amputation der hinteren Flosse von adulten Zebrafischen, Adenosin ein Bindeglied zwischen apoptotischen Zellen, epidermaler Zellproliferation, Auswachsen von Nerven und der Bildung von Blastomen ist. Unter einem Blastom wird hier die Ansammlung von Vorläuferzellen unterhalb der Amputation des verwundeten Epithels verstanden, welche durch wuchernde Zellen ein neues Körpergewebe bilden. Im Zebrafisch-System spielt der  $A_{2b}$ -Adenosinrezeptor sowohl bei der Bildung des Blastoms als auch beim Nervenwachstum eine Rolle [170]. Ein weiterer bekannter Mechanismus ist, dass absterbende Zellen über pannexin1-Kanäle ATP freisetzen, um ein „find-me“ Signal zur Rekrutierung von phagozytotischen Zellen aussenden damit eine Nekrosenbildung durch absterbende Zellen verhindert wird [56]. Das beim Absterben von Zellen durch Ektonukleotidase generierte Adenosin ist das Purin, welches bei der Bildung von Blastomen eine Rolle spielt [170]. Diese Veröffentlichung zeigt aber auch, wie anfänglich schon beschrieben, dass der  $A_{2b}$ -Adenosinrezeptor eine Rolle unter pathophysiologischen Bedingungen, bei welchen eine hohe Adenosinkonzentration vorliegt, spielt. In dem hier verwendeten Wachstumsassay lagen jedoch Idealbedingungen für die neuronalen Zellen vor.



Der gemessene Inhibierungseffekt von 7% weist auf einen geringen Einfluss hin. Dass der A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptor aber ein wichtiges Teilstück in der Wachstumssteuerung von Neuronen aus dorsalen Hinterwurzelganglien ist, kann auf Grund der Daten nicht gänzlich ausgeschlossen werden, erscheint aber eher unwahrscheinlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Beteiligung des A<sub>2b</sub>-Adenosinrezeptors am Wachstumsprozess der Fortsätze von sensorischen Neuronen aus *Gallus gallus* unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich ist.

#### 4.5 Der Einfluss des A<sub>1</sub>- und A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptors auf das Wachstum neuronaler Zellen von dorsalen Hinterwurzelganglien

Der A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptor gilt als der am besten untersuchte Adenosinrezeptor. Dies ist im Besonderen der Verfügbarkeit von Radioliganden für den A<sub>1</sub>-Rezeptor zu verdanken. In hoher Dichte wird dieser Rezeptor vor allem in der Cortex, im Cerebellum, im Hippocampus, im Cornu posterius medulla spinalis, in den Nebennierendrüsen, in den Vorhöfen des Herzens und im Auge exprimiert. In der Skelettmuskulatur, verschiedenen Regionen des Gehirns, in der Leber, den Hoden, dem Dickdarm, der Speicheldrüse sowie im Ösophagus ist dieser Rezeptor mit einer mittleren Expressionsdichte zu finden. Die geringste Expressionsrate, des A<sub>1</sub>-Rezeptors liegt in der Lunge und dem Pankreas vor [154]. Zu den physiologischen Wirkungen durch Aktivierung dieses Rezeptors zählen, unter anderem die Inhibierung der Lipolyse, die Verlangsamung der Herzfrequenz, die Verringerung des renalen Blutflusses und die Inhibierung der Freisetzung erregend wirkender Neurotransmitter [171].

Zuletzt ist noch der vierte Rezeptor der Adenosinrezeptorfamilie, der A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptor, zu nennen. Wie auch die schon genannten Vertreter dieser Rezeptorfamilie wird der A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptor im Herzen, der Lunge und in Bereichen des ZNS (Hippocampus, Cerebral cortex) exprimiert. Jedoch ist die Rezeptordichte im Vergleich zu den anderen Adenosinrezeptoren im Gehirn wesentlich geringer [119-122]. Bislang ist über den A<sub>3</sub>-Rezeptor bekannt, dass er eine wichtige Rolle bei entzündlichen Krankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis spielt und Auswirkungen auf das Wachstum von Tumoren haben kann. Des Weiteren ist ein enger Zusammenhang zwischen der Rezeptordichte und Apoptoseprozessen beschrieben [123-126].

Die experimentellen Untersuchungen mit spezifischen Substanzen sowohl für den A<sub>1</sub>- als auch für den A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptor waren nötig, um die gemessenen Effekte des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors richtig einordnen zu können. Es konnten keine Änderungen im Wachstum von sensorischen Neuronen durch die Zugaben von spezifischen Agonisten und Antagonisten, sowohl für den A<sub>1</sub>- und den A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptor, gemessen werden.

Die Wirksamkeit der verwendeten Agonisten und Antagonisten für das Modellsystem *Gallus gallus* stützt sich auf die nicht veröffentlichten Daten eines Cytoskelett-Assay von John Christian Eilert.

Neben der Tatsache, dass die Adenosinrezeptoren  $A_1$  und  $A_3$  nicht an der Wachstumsregulation sensorischer Neurone aus *Gallus gallus* beteiligt sind, kann aus den Ergebnissen auch geschlossen werden, dass die Ergebnisse den  $A_{2a}$ -Rezeptor betreffend nicht durch off-target Effekte anderer Adenosinrezeptoren hervorgerufen wurden.

#### 4.6 Ist ein autokriner Mechanismus für die Aktivierung des $A_{2a}$ -Adenosinrezeptors verantwortlich?

Der Gedanke, Adenosin oder seine Derivate als Arzneimittel für unterschiedlichste Erkrankungen zu nutzen, ist nicht erst in den letzten Jahren entstanden. Schon seit 1940 ist es ein Ziel in der medizinischen Forschung, diese Substanzen als Arzneimittel zu verwenden. Die größte Herausforderung für die Forschung liegt hierbei in der ubiquitären Verteilung der Adenosinrezeptoren in den unterschiedlichsten Organen und Gewebestrukturen. Des Weiteren liegt der physiologische Agonist der Adenosinrezeptoren in Form von Adenosin ubiquitär im gesamten Organismus vor. Trotzdem werden zurzeit selektive Agonisten und Antagonisten der Adenosinrezeptoren als potenzielle Arzneistoffe entwickelt [171]. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte bisher aber nur ein selektiver  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptoragonist, nämlich Regadenoson, medizinisch eingesetzt werden. Regadenoson wurde von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde Food and Drug Administration (FDA) am 10. April 2008 anerkannt. Regadenoson wird als Diagnostikum angewandt um die Durchblutung des Herzens während der bildgebenden Herzuntersuchung der Myokardperfusionsaufnahme (engl. myocardial perfusion imaging, MPI) zu beobachten [172].

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten lassen nicht nur den Schluss zu, dass der  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor eine Rolle im Wachstum sensorischer Neurone spielt, sondern auch, dass die Aktivierung des Rezeptors einem autokrinen Mechanismus unterliegt.

Zellen ist es möglich, untereinander, durch Freisetzung sogenannten Signalmoleküle, zu kommunizieren. Nach Bindung des freigesetzten Moleküls an den jeweiligen Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkette angestoßen. Dabei wird als parakrine Funktion verstanden, dass die freigesetzte Substanz, beispielsweise ATP, auf eine benachbarte Zelle wirkt. Autokrine Signalübertragung hingegen bezeichnet einen Wirkmechanismus, bei dem die freigesetzte Substanz der Zelle auf sie selbst wirkt [173, 174].

Die Annahme dass, sensorische Neurone ATP-Derivate freisetzen, welche autokrin den  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor aktivieren und so das Wachstum regulieren, ist durch mehrere Aspekte begründet. Das Aussäen der Neurone in klonaler Dichte ( $<5$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) [72] spielt hierbei eine wichtige Rolle. In den verwendeten Versuchsschälchen betrug die Zelldichte 3-4 Zellen /  $\text{mm}^2$ , wodurch Effekte durch parakrine Wirkmechanismen von benachbarten Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden können.

Anhand der im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigten Effekte, dass das Inhibieren der P1-Adenosinrezeptoren zu einer Verringerung der durchschnittlichen Neuritenlänge von sensorischen Neuronen führt, kann geschlossen werden, dass eine Basisaktivierung der Rezeptoren vorliegen muss. Es stellt sich daher die Frage woher das Adenosin stammt.

Im letzten Versuchsabschnitt konnte durch die Zugabe des Enzyms Adenosin Desaminase, welches Adenosin zu Inosin abbaut, das Wachstum signifikant verringert (9%) werden (vgl. Abb. 30 und Tab. 2).

Bei den anfänglichen Versuchen kam ein Zellkulturmedium, welches FCS beinhaltetete, zum Einsatz. Aufgrund der Komplexität der Inhaltsstoffe, welche FCS beinhaltet, folgte eine Umstellung und FCS wurde durch ein chemisch definiertes Fertigmedium ersetzt. Ein Derivatisierungs-Assay einer eigenen Arbeit zeigte in Übereinstimmung mit einer Publikation, dass sowohl im Zellkulturmedium mit FCS, wie im Zellkulturmedium mit der Ersatzsubstanz, kein Adenosin oder ATP-Komponenten gefunden werden konnten [93, 175]. Nachdem bei keinem der Versuche aktiv Adenosin zugesetzt wurde und auch das Zellkulturmedium keine Adenin-Derivate enthielt, liegt der Schluss nahe, dass das Adenosin, welches die Adenosinrezeptoren aktiviert, von der Zelle selbst stammen musste.

Als mögliche Adenosinquelle in diesem Zellsystem wäre noch denkbar, dass absterbende Zellen ATP freisetzen welches anschließend zu Adenosin metabolisiert wird [176]. Diese mögliche Adenosinquelle kann auf Grund von Verdünnungs- und Diffusionseffekten, die in diesem System vorliegen, aber ausgeschlossen werden.

Gestützt auf die Datenlage ist es sehr wahrscheinlich, dass ein autokriner Mechanismus zur Regulation des Wachstums neuronaler Fortsätze beiträgt. Auch wenn der Prozess noch nicht komplett verstanden ist, ist sicher dass extrazelluläres Adenosin autokrinen Ursprungs und der  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor Teil dieses Puzzles ist.

Eine autokrine Signalkaskade im Zusammenhang mit purinergen Rezeptoren ist bereits beschrieben worden. Die Arbeitsgruppe um Wolfgang G. Junger konnte an neutrophilen Granulozyten zeigen, dass der  $P2Y_2$ -Rezeptor an der Chemotaxis beteiligt ist. Mikrobielle Krankheitserreger oder beschädigte Zellen senden chemische Substanzen aus. Anhand dieses Konzentrationsgradienten vom schwachen zum starken Signal hin, finden Immunzellen, wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten ihren Bestimmungsort. Im Rahmen dieser Antwort, Vorwärtsbewegung und Orientierung, benötigen diese Zellen ATP. Zunächst wird von der Zelle selbst ATP freigesetzt, welches anschließend autokrin am membranständigen  $P2Y_2$ -Rezeptor bindet. Die Lokalisation dieser Rezeptoren an der Zellmembran befindet sich in der Bewegungsrichtung ganz vorne. Die ATP-Freisetzung und anschließende autokrine Rezeptoraktivierung, weist den Granulozyten die Richtung in welche sie wandern müssen. Damit eine Bewegung erfolgen kann, bindet Adenosin, ein Abbauprodukt aus dem, von den Granulozyten freigesetzten ATP, an den  $A_3$ -Rezeptor. Diese Adenosin-Rezeptorbindung ist für die Vorwärtsbewegung nötig [177]. Dieser komplexe Navigationsmechanismus von neutrophilen Granulozyten, ist dem Wachstumsprozess von sensorischen Neuronen aus dem *Gallus gallus* sehr ähnlich. Beiden Systemen liegt eine autokrine Rezeptoraktivierung, bei Granulozyten der  $P2Y_2$ -Rezeptor und bei sensorischen Neuronen der  $A_{2a}$ -Rezeptor, zugrunde.

#### 4.7 Woher stammt das Adenosin, das die Adenosinrezeptoren aktiviert?

Die Hypothese, dass sensorische Neurone den  $A_{2a}$ -Rezeptor autokrin aktivieren und somit das Wachstum der Neuriten beeinflussen, wirft die Frage auf, woher das Adenosin stammt. Dabei sind zwei Wege denkbar. Die Zelle setzt Adenosin frei, welches als Ligand für den Adenosinrezeptor dient. Denkbar ist aber auch, dass ATP freigesetzt wird und dieses durch Ektonukleotidasen bis hin zu Adenosin abgebaut wird welches dann die Rezeptoren stimuliert. Welcher Mechanismus für die Freisetzung von Adenosin aus sensorischen Neuronen verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Es ist durch viele Arbeiten gezeigt worden [59, 63, 178], dass eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellen in der Lage sind, purinerge Substanzen freizusetzen. Adenosin kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen in den extrazellulären Raum gelangen. Zum einen kann Adenosin direkt ausgeschüttet werden, zum anderen kann Adenosin durch die Hydrolyse von Adenin-Nucleotiden erzeugt werden. Die equilibrativen Nucleosid-Transporter (ENT) transportieren Substanzen, zu denen auch Adenosin zählt, unabhängig von  $Na^+$ -Ionen und somit nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion [58, 59]. Dieser Mechanismus wird jedoch meist im Zusammenhang mit pathophysiologischen Prozessen wie Hypoxie beschrieben [179]. Unter physiologischen Bedingungen entfernen diese Transporter Adenosin aus dem extrazellulären Bereich. Eine weitere Form sind die konzentrativen Nucleosid-Transporter, wie die CNT-Familie. Diese transportieren Adenosin entlang eines  $Na^+$ -Konzentrationsgradienten [58], wodurch es unter physiologischen Bedingungen zu einem Adenosineinstrom kommt. Da es sich, in der vorliegenden Arbeit, gezeigten Ergebnisse um einen auf dem Liganden Adenosin basierenden Effekt handelt, wäre es naheliegend, dass sensorische Neuronen dies direkt freisetzen. Da die in der Literatur beschriebenen Mechanismen der direkten Adenosinfreisetzung meist in pathophysiologischen Prozessen beschrieben sind, ist es aber wahrscheinlicher, dass ATP freigesetzt wird, welches membrannah zu Adenosin abgebaut wird.

Die Entstehung von Adenosin durch die Hydrolyse von Nucleotiden [66] setzt eine Adenin-Nukleotide Freisetzung voraus. Im zentralen sowie im peripheren Nervensystem ist die ATP-Freisetzung ein bekannter Mechanismus, bei dem zwischen zwei unterschiedlichen Freisetzungsformen unterschieden werden muss. Einem vesikulären Mechanismus [61, 62] und einem nicht vesikulären Mechanismus, zu welchem Connexin, Pannexin, spannungsabhängigen Anionenkanäle oder P2X<sub>7</sub> Rezeptoren zählen [63].

Ein Indiz für eine ATP-Ausschüttung, mit nachfolgender extrazellulärer Hydrolyse zu Adenosin ist die gemessene Verlangsamung neuronalen Wachstums nach Zugabe eines unspezifischen Ectonukleotidasinhibitors ARL 67156. Wie auch schon in den Versuchen mit der Adenosin Desaminase, führte die Zugabe von ARL 67156 zu einer Wachstumsverringerng von knapp 9% (vgl. Abb. 33 und Tab. 2). Diese Daten stützen die Theorie, dass ATP von der Zelle freigesetzt wird, es durch membranständige Ectonukleotidasen zu Adenosin abgebaut wird um autokrin auf die Adenosinrezeptoren zu wirken.

2009 konnte eine Arbeitsgruppe mit Hilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) die Bildung von A<sub>2a</sub> und NTPDase1 Heterooligomeren messen [180]. NTPDase1, welches auch als CD39 (Cluster of Differentiation 39) bezeichnet wird, zählt zur Familie der Ectonucleotidasen und hydrolysiert ATP sowie ADP zu AMP [137].

Im Striatum von Basalganglien konnten Wissenschaftler zeigen, dass eine Koexistenz zwischen dem A<sub>2a</sub>-Rezeptor und der ecto-5'-nucleotidase (CD73) besteht [181]. Die ecto-5'-nucleotidase hydrolysiert AMP, CMP, UMP, IMP und GMP, wobei der Abbau von AMP zu Adenosin als die Hauptfunktion dieses Enzyms erachtet wird [137]. Diese beiden Veröffentlichungen unterstützen die These, dass der autokrinen Aktivierung des A<sub>2a</sub>-Rezeptors eine Freisetzung von ATP durch das Neuron selbst vorangeht, welches anschließend durch die Ectonukleotidasen bis hin zu Adenosin abgebaut wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Färbung mit Quinacrin, einem Fluoreszenzfarbstoff mit einer hohen Affinität für ATP [74-76], durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, dass vesikuläres ATP in sensorischen Neuronen zu finden ist. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den mit Quinacrin angefärbten vesikulären Strukturen, wie in der Literatur beschrieben [136], um ATP-Vesikel handelt, fanden Gegenfärbungen sowohl mit einem Farbstoff zur Anfärbung von mitochondrialen als auch von lysosomalen Strukturen statt. Das mitochondriale Netzwerk, gebildet durch die bohnenförmigen Mitochondrien, konnte anhand der Morphologie deutlich von den mit Quinacrin gefärbten Strukturen unterschieden werden. Auch zeigten Versuche mit einer Doppelfärbung keine überlappende Färbung dieser Strukturen. Mit dem Farbstoff Quinacrin konnten jedoch gleichartige Kompartimente, wie mit einem Farbstoff für Lysosome, angefärbt werden. Die Strukturen welche sich sowohl mit LysoTracker®, einem Fluoreszenzfarbstoff zur Färbung von lysosomalen Strukturen, als auch mit Quinacrin anfärben ließen, lagen jedoch nur in der näheren Umgebung des Zellkerns. In Abbildung 39 ist zu sehen, dass mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker®, lysosomale Strukturen um den Zellkern gefärbt werden konnten. Vesikuläre ATP-Strukturen in Neuriten sowie im Wachstumskegel konnten nur mit einer Quinacrinfärbung detektiert werden (vgl. Abb. 37).

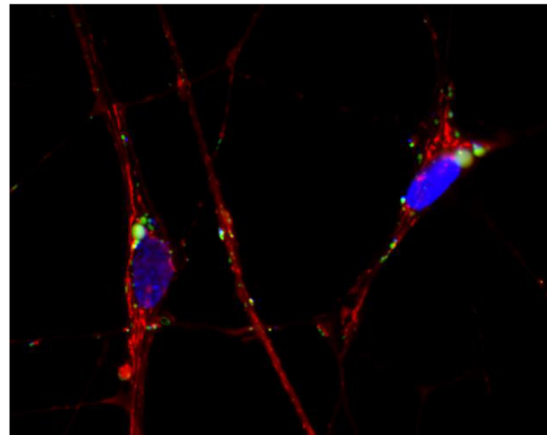


Abb. 39: Dreifachfärbung eines DRG mit MitoTracker®, LysoTracker® und HOECHST 33258. In rot sind die mit MitoTracker® angefärbten Mitochondrien zu sehen. In blau angefärbt ist der Zellkern zu erkennen. Lysosomale Strukturen konnten mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker® nur um den Zellkern und vereinzelt in Neuriten angefärbt werden.

Die unterschiedlichen Freisetzungsmechanismen von ATP, durch neuronale und nicht neuronale Zellen, ist in der Literatur vielfach beschrieben [62, 63, 178]. Zudem zeigte die Arbeitsgruppe um L. Moya eine ATP Freisetzung in retinalen Wachstumskegeln von Hühnerembryonen mit Hilfe eines NADP/NADPH Fluoreszenzassays [135].



Sowohl die oben genannte Literatur, als auch die eigenen Daten, welche durch Quinacrine anfärbare vesikuläre Strukturen in sensorischen Neuronen zeigen, stützen die Theorie, dass sensorische Neurone ATP freisetzen.

#### 4.8 Inhibieren des ATP-Abbaus durch den unspezifischen Ektonukleotidase-Inhibitor ARL67156

Ein weiterer unabhängiger Nachweis, der die Theorie des autokrinen Mechanismus in dieser Arbeit stützt, sind Wachstumseffekte durch das Blocken von Ektonukleotidasen. Mit Hilfe von ARL67156 wurde versucht, das Hydrolysieren von ATP zu Adenosin zu unterbinden und somit dem Adenosinrezeptor den natürlichen Liganden zu entziehen. Das Inhibieren der Ektonukleotidasen hatte, wie auch das Blocken der Adenosinrezeptoren, eine hemmende Wirkung auf das Wachstum dissoziierter sensorischer Neurone.

Bis heute sind im menschlichen Körper acht Isoformen der Ektonukleotidasen NTPDasen 1-8 (ectonukleoside triphosphate diphosphoydolases) bekannt, welche sich hinsichtlich ihrer Lokalisation und Affinität zur Hydrolyse der einzelnen Nukleotide unterscheiden [137]. Über den Inhibitor ARL 67156 ist bekannt, dass er in den von der Literatur verwendeten Konzentrationen (50-100  $\mu\text{M}$ ) die NTPDase1, NTPDase3 und NPP1 (ectonukleotide pyrohoshatase/phoshodiesterases 1) inhibiert. Nur noch eine geringe inhibierende Wirkung ist für die NTPDase2, NTPDase8, NPP3 und die ecto-5'-nucleotidase beschrieben [143]. Bislang konnten in Hinterwurzelganglien von Mäusen die NTPDase3 und ecto-5'-nucleotidase lokalisiert werden. Aufgrund einer Ko-lokalisierung von NTPDase 3 und ecto-5'-nucleotidase wird davon ausgegangen, dass diese für die Bildung von Adenosin durch die Hydrolyse von ATP verantwortlich sind [182, 183]. NTPDasen hydrolysieren Nukleosid di- und triphosphate (ADP und ATP), Nukleosidmonophosphate (AMP) werden von dieser Enzymgruppe nicht hydrolysiert. Dabei weisen die unterschiedlichen Isoformen bestimmte Substratpräferenzen auf, wie zum Beispiel die NTPDase3, die ATP dreimal schneller hydrolysiert als ADP. Der Abbau von AMP zu Adenosin wird durch die ecto-5'-nucleotidase katalysiert [64].

Das Vorkommen der NTPDase3 in Hinterwurzelganglien von Mäusen konnte durch eine weitere Veröffentlichung bestätigt werden, jedoch zeigt diese Veröffentlichung durch Zuhilfenahme von ENTPD<sup>-/-</sup> Mäusen, dass nicht alleine diese Ektonukleotidase, sondern scheinbar mehrere Isoformen für die Hydrolyse der Nucleotide verantwortlich sind [184]. Die Literatur und die gemessenen Daten legen nahe, dass ARL67156 nur einen Teil der Ektonukleotidasen blockt und somit die ATP-Hydrolyse nicht vollständig zum Erliegen kommt. Dies könnte erklären, warum das Blocken mit ARL67156 nur eine geringe wachstumsinhibierende Wirkung (9%) hat.

Aufgrund der noch nicht geklärten Frage, welches Enzym in Neuronen aus dorsalen Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen für die ATP-Hydrolyse verantwortlich ist, war es wichtig, einen unspezifischen NTPDase-Inhibitor zu wählen. Der Abbau von ATP hin zu Adenosin ist ein komplexer biochemischer Prozess, welcher durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Mitgliedern der Familie der Ektonukleotidasen katalysiert werden kann. Zu den Enzymen die ATP bis hin zum AMP abbauen, zählen sowohl die ENTPDasen, die ENPP-s als auch die alkalische Phosphatase. Der Abbau von AMP zu Adenosin wird sowohl der ecto-5'-nucleotidase sowie der alkalischen Phosphatase zugeschrieben [64]. ARL67156 wurde als Inhibitor gewählt, da dieser bislang als einziger kommerziell erhältlicher Inhibitor der Ektonukleotidasen gilt, welcher keinen signifikanten Effekt auf purinerge Rezeptoren aufweist [64].

Die Ergebnisse zeigen, dass Ektonukleotidasen eine Rolle im Wachstum von neuronalen Zellen spielen. Weitere Versuche zum Beispiel mit dem Inhibitor AOPCP ( $\alpha,\beta$ -Methylene-ADP) sollten folgen. AOPCP blockt die ecto-5'-nucleotidase [141], wodurch die Generierung von Adenosin aus AMP unterbrochen wäre.

## 4.9 Am Wachstum von neuronalen Zellen beteiligte Rezeptoren und mögliche weiterführende Signalketten

Die Nomenklatur der Adenosinrezeptoren beruht zum einem auf ihrer molekularen Struktur und zum anderen auf ihren pharmakologischen Eigenschaften. Die von Geoffrey Burnstock 1978 erfolgte Einteilung der purinen Rezeptor-Familien in zwei Unterklassen, die er mit P1 und P2 bezeichnete, ist heute noch gültig [49].

Ursprünglich wurde die Rezeptoreinteilung auf Grund ihrer gegensätzlichen Wirkung auf die intrazellulären cAMP- Konzentration (cyclisches Adenosinmonophosphat) eingeteilt. Die vier Rezeptorsubtypen A<sub>1</sub>-, A<sub>2a</sub>-, A<sub>2b</sub>- und A<sub>3</sub>-gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren [185] (Abb. 40).

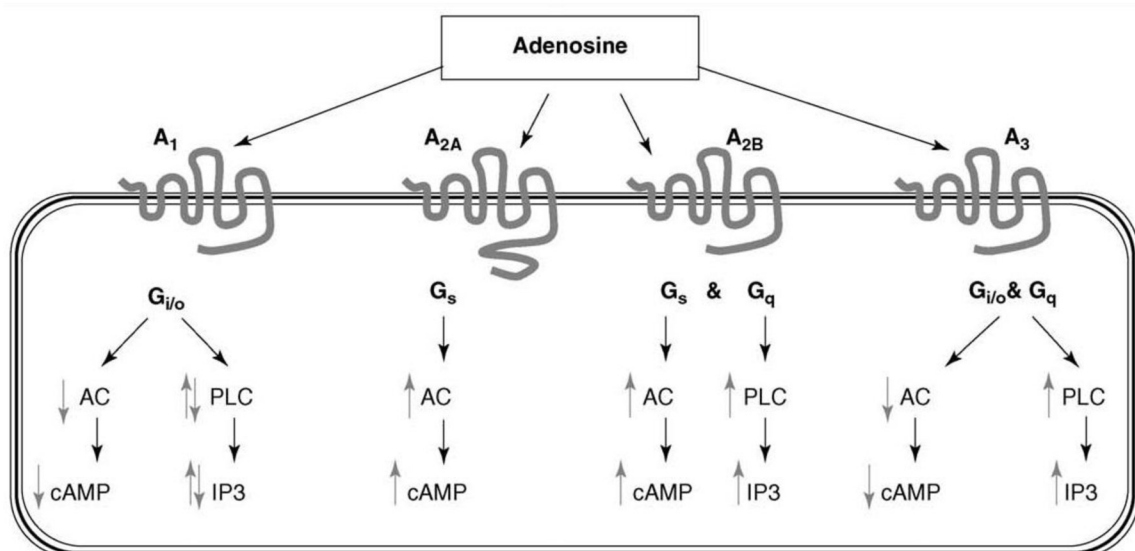


Abb. 40: Der natürliche Ligand Adenosin aktiviert die vier Adenosinrezeptoren A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> und A<sub>3</sub>. Der A<sub>2a</sub>- und A<sub>2b</sub>-Rezeptor sind an die G<sub>s</sub>-Familie gekoppelt. Diese stimulieren nach der Rezeptoraktivierung die Adenylzyklase, welche die Umwandlung von ATP zu cAMP bewirkt. An die Familie der G<sub>i/o</sub>-Proteinen sind sowohl der A<sub>1</sub>- als auch der A<sub>3</sub>-Rezeptor gekoppelt. Nach der Aktivierung hemmen diese beiden Rezeptoren die Adenylzyklase, wodurch es zu einer Verringerung der cAMP Konzentration kommt [185]. Abbildung entspricht dem Original [185].

Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, führt die Aktivierung der  $G_s$ -Proteine (s=stimulatorisch) zu einer erhöhten Adenylzyklaseaktivität, was zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt.

Sowohl der  $A_{2a}$ - als auch der  $A_{2b}$ -Adenosinrezeptor sind an  $G_s$ -Proteine gekoppelt. Die  $G_{i/o}$ -Proteine (i=inhibitorisch, o=olfaktorisch) lösen eine inhibierende Kaskade aus, bei welcher die Adenylzyklase gehemmt wird. Dies führt zu einer Senkung der intrazellulären cAMP Konzentration. Der  $A_1$ - und auch der  $A_3$ -Adenosinrezeptor interagieren mit der Familie der  $G_{i/o}$ -Proteine. Zuletzt ist noch die  $G_q$ -Familie (q=chemotaktisch) zu nennen. Diese aktiviert die Phospholipase C. Der  $A_{2b}$ - als auch der  $A_3$ -Rezeptor sind, neben den oben genannten G-Proteinen, auch an  $G_q$ -Proteine gekoppelt [186].

Bereits bekannt ist, dass cAMP im Wachstum von neuronalen Zellen eine Rolle spielt. Forscher zeigten, dass während der neuronalen Reifung ein deutlicher postnataler Rückgang des intrazellulären cAMP Levels zu messen ist [187]. Darüber hinaus ist cAMP an neuronalen Funktionen wie der Wegfindung und beim Auswachsen von Axonen involviert [188, 189].

Wie schon beschrieben, kann die Familie der  $G_q$ -Proteine das membranständige Enzym Phospholipase C aktivieren. Dieses Enzym wiederum spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ ) in Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Das so entstandene  $IP_3$  setzt durch die Bindung an  $IP_3$ -Rezeptoren, welche ligandenaktivierte Calciumkanäle in der Membran des glatte endoplasmatischen Retikulums (ER) sind, Calcium-Ionen aus dem ER frei und erhöht somit für einige Sekunden die intrazelluläre Calcium-Konzentration von  $\sim 100$  nM auf  $\sim 1\mu M$  [190]. Im neuronalen System haben Calcium-Signale unter Anderem regulatorische Funktion beim Auswachsen von Axonen. Weiter werden diese auch im Zusammenhang mit der axonalen Wegfindung bzw. Zielfindung als Signalmolekül beschrieben [191, 192].

Weitere Signalwege, welche durch die Adenosinrezeptoren  $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$  und  $A_3$  aktiviert werden können, sind die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Diese Familie vereint eine Reihe von Serin/Threoninkinasen, zu welchen ERK (extracellular signal-regulated proteins kinases), stressaktivierte Proteinkinasen p38 und c-jun N-terminale Proteinkinasen (JNK) gehören [193].

Eine portugiesische Arbeitsgruppe konnte im zentralen Nervensystem zeigen, dass sowohl der  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor im neuronalen Wachstum eine tragende Rolle einnimmt und auch, dass die Signalwege MAPK/ERK, PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und PLC dabei eine wichtige Rolle spielen [160].

Die oben beschriebene Kopplung der Adenosinrezeptoren an unterschiedliche, zum Teil sogar gegensätzlich wirkende Signalketten erklärt, warum es schwierig vorauszusagen ist, welche Reaktion ein zelluläres System nach einer Adenosinstimulation zeigen wird. Die Komplexität wird durch die Tatsache erhöht, dass Expressionsmuster und Expressionsstärke der jeweiligen Rezeptoren auch subzellulär variieren können. Hinzu kommt noch, dass die unterschiedlichen Adenosin-Bindungsaffinitäten der einzelnen Rezeptorsubtypen dazu führen, dass je nach Adenosinkonzentration, dasselbe Zellsystem unterschiedliche Signalketten auslöst.

Somit hängt der endgültige Effekt der Rezeptoren von den jeweils vorhandenen Subtypen, der Rezeptordichte und der Adenosinkonzentration ab.

Welcher der oben genannten Signalwege in sensorischen Neuronen eine Rolle spielt, war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Gleichwohl könnten solche Untersuchungen in Zukunft tiefere Einblicke in die Regulation neuronalen Wachstums geben.

## 4.10 Ausblicke auf weitere Arbeiten

Wie schon beschrieben, konnte während dieser Arbeit anhand der Versuche nicht abschließend geklärt werden, ob ATP oder Adenosin von der Zelle freigesetzt wird, um autokrin auf den A<sub>2a</sub>-Rezeptor zu wirken. Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Zelle ATP freisetzt und dies mit Hilfe der Ektonukleotidasen in Adenosin umbaut (vgl. 4.8). Daher sollen im folgenden Abschnitt Methoden erläutert werden, mit denen diese Frage in Zukunft geklärt werden könnte.

Es gibt unterschiedlichste Methoden, mit welchen die Adenosin- oder auch ATP-Freisetzung direkt detektiert werden kann. Die Freisetzung von ATP aus neuronalen Zellen ist in der Literatur sowohl mit der Methode der Luciferin-Luciferase Reaktion [194] als auch mit einer NADPH Reaktion [135] nachgewiesen worden.

Die Luciferin-Luciferase Reaktion ist eine enzymkatalysierte Chemielumineszenz bei welcher das Enzym Luciferase, unter Verbrauch von ATP, mit dem oxidierbaren Substrat Luciferin (aus dem Lateinischen lucifer = lichtbringend) reagiert, wobei Energie in Form von Licht abgegeben wird (Abb. 41). Dieser Naturstoff kommt in unterschiedlichsten Organismen vor, wie zum Beispiel Bakterien, Krebstiere, Mollusken, Quallen und Käfer. Das wohl bekannteste Beispiel für Biolumineszenz ist *Lampyris noctiluca* (Leuchtkäfer) [195].

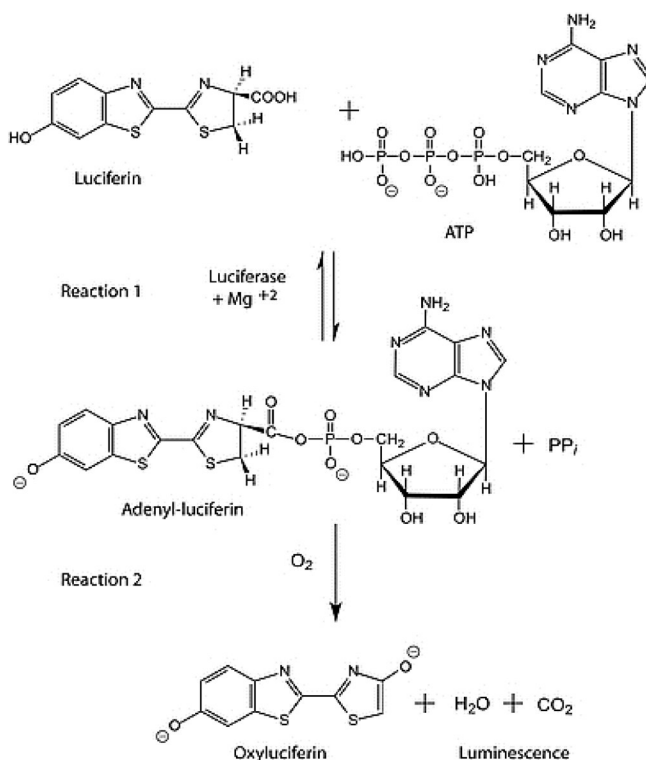


Abb. 41: Schematische Darstellung der ATP Bioluminescent Somatic Cell Assay Kits zur Detektion von ATP der Firma Sigma Aldrich. Luciferase katalysiert die Komplexbildung von Luciferin und ATP in Anwesenheit des Ko-Faktors Mg<sup>2+</sup> zu Adenyl-Luciferin. Unter Verbrauch von Sauerstoff wird Adenyl-Luciferin in Oxyluciferin überführt. Die Energie wird in Form von Emission sichtbaren Lichts (Lumineszenz) abgegeben. Abbildung entspricht dem Original der Firma Sigma-Aldrich.

Weiter ist in der Literatur ein zwei-Enzym System beschrieben, bei dem durch Hexokinase und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase bei Vorhandensein von ATP und Glucose, Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) in die reduzierte Form NADPH umgewandelt wird. NADPH ist eine fluoreszierende Verbindung, die Fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann (Abb. 42) [196].

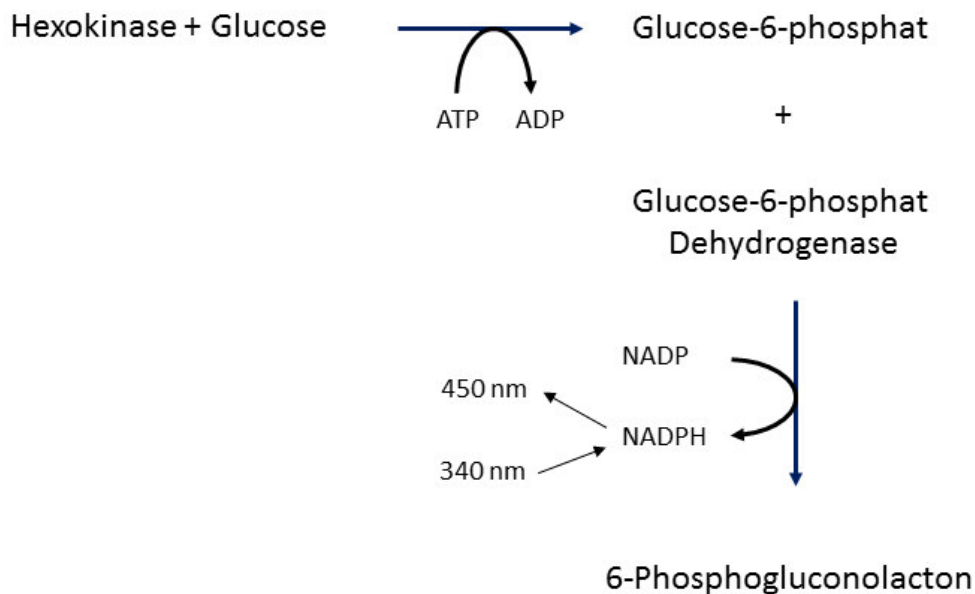


Abb. 42: Zeigt die Zusammenfassung der Tandem-Enzym Reaktion. Dabei wird mit Hilfe von Glucose und ATP das fluoreszierende Produkt NADPH generiert. Die Absorption von NADPH liegt bei 340 nm die Emission bei 450 nm [196]. Abbildung entspricht dem Original [196].

Eine weitere Methode für die Detektion von ATP oder Adenosin ist die ATP- oder Adenosinmessung mit Hilfe von Biosensoren. Unter Biosensoren werden Analysesysteme verstanden, die biologisch sensitive Elemente an Signalwandler koppeln [197]. Durch Biosensoren können analytische und funktionale Informationen durch physikalische oder chemische Stimuli erhalten werden [198]. Neuartige Adenosin-Biosensoren von der Firma Sarissaprobe® können die Freisetzung von Adenosin in Echtzeit detektieren. Das Prinzip dieser Sensoren beruht auf einer Enzymkaskade, die auf der Oberfläche einer Platin/Iridium Elektrode verankert ist. Für die Messung von Adenosin besteht diese Enzymkaskade aus Adenosin Desaminase, Nukleosid Phosphorilase und Xanthine Oxidase.

Durch diese Enzyme wird Adenosin metabolisiert und das dabei entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf der Platin/Iridium Elektrode oxidiert. Dies führt zu einem messbaren elektrischen Strom, proportional zur Adenosinkonzentration [199]. Das gleiche Prinzip kann auch zur Messung von ATP verwendet werden. Die ATP-Biosensoren unterscheiden sich nur bezüglich der Enzymkaskade, welche für ATP aus der Glycerolkinase und Glycerol-3-phosphat Oxydase besteht.

Durch diese Enzyme wird ATP verstoffwechselt und wie auch bei den Adenosin-Biosensoren wird das dabei entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf der Platin/Iridium Elektrode oxidiert [200].

Die letzte hier aufgeführte Methode für die Detektion von ATP ist die über FRET-basierte Sensorproteine. Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist eine häufig verwendete Methode, um biochemische Vorgänge mikroskopisch detektieren zu können. Der FRET-Mechanismus beruht auf einer strahlungslosen Energieübertragung. Ein Fluorophor, welches sich in einem angeregten Zustand befindet, agiert als Donor und überträgt seine Energie auf ein Chromophor, das wiederum den Akzeptor darstellt. Dabei müssen sich Donor- und Akzeptorprotein in einer räumlichen Nähe von 1-10 nm befinden. Weiter muss das Absorptionsspektrum des Akzeptors mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappen [201].



2009 entwickelte die Arbeitsgruppe um Noji einen ATP-Sensor (AT1.03) mit einer  $\epsilon$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase von *Bacillus subtilis*. Bevor ATP an die  $\epsilon$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase bindet, sind beide Fluoreszenzproteine weiter voneinander entfernt, was zu einem geringen FRET Signal führt. In der ATP gebundenen Form kommt es zu einer Konformationsänderung und das FRET Signal wird durch die so entstandene Nähe der beiden Fluoreszenz Proteine erhöht. Dieser Mechanismus in Abbildung 43 dargestellt [202].

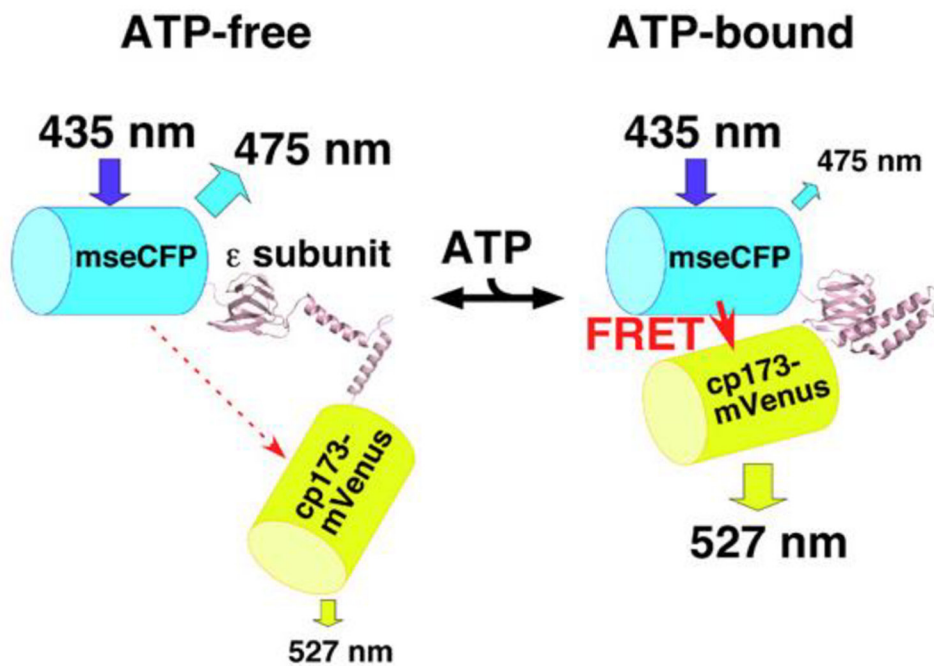


Abb. 43: Schematische Darstellung des ATP-Sensors AT1.03. CFP (mseCFP) und YFP (cp173-mVenus) wurden mit einer  $\epsilon$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase von *Bacillus subtilis* verbunden. Ohne eine ATP-Bindung an der  $\epsilon$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase ist auf Grund der separiert vorliegenden Fluoreszenzproteine nur ein schwaches FRET-Signal messbar (links). Nach Bindung von ATP ändert sich die Konformation der  $\epsilon$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase und der Abstand der beiden Fluoreszenzproteine verringert sich. Dies hat ein erhöhtes FRET Signal zur Folge (rechts). [202]. Abbildung entspricht dem Original [202].

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung ist es möglich, ATP oder Adenosin durch unterschiedlichste Methoden zu messen. Bei der Wahl der Methode für Neurone muss beachtet werden, dass Zellen nicht beschädigt oder gestresst werden, wodurch ungewollt eine ATP ausgeschüttet werden könnte. Darüber hinaus ist es wichtig, dass die Methode empfindlich genug ist, um kleinste Mengen von Nukleotiden zu messen.

Um die Frage zu klären, ob Adenosin oder ATP aus dem Soma, den Neuriten, den Wachstumskegeln oder aus mehreren Bereichen freigesetzt wird, würde sich TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) Mikroskopie anbieten. TIRF ist eine Form der Fluoreszenzmikroskopie, durch die, mit dem Prinzip der Totalreflexion beim Übergang von einem Medium mit höherem Brechungsindex ( $n$ ) in ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex, ausschließlich Strukturen sichtbar gemacht werden können, welche sehr nahe an der ( $<50-100$  nm) Brechungsindex-Grenzfläche liegen. Durch dieses Messprinzip, wird die Fluoreszenzanregung außerhalb dieser dünnen Schicht ausnahmslos unterdrückt. Dies verbessert das Signal-Rausch-Verhältnis, wodurch einzelne Fluorophore gemessen werden können [203]. So könnten mögliche Fusionen von ATP-Vesikel mit der Zellmembran direkt gezeigt werden.

Im Hinblick auf die hier gezeigten Daten wäre auch noch die Frage zu klären, ob auch P2-Rezeptoren eine Rolle beim Wachstum von sensorischen Neuronen spielen. Der Fokus dieser Arbeit lag auf den vier Subtypen der P1-Rezeptoren. Aufgrund der Vielzahl der P2-Rezeptoren, welche weiter in P2X, mit sieben Subtypen und P2Y, mit acht Subtypen, unterteilt werden, konnte in dieser Arbeit nicht auf diese Rezeptoren eingegangen werden. Diese Rezeptorfamilie wird sowohl durch Purin- als auch durch Pyrimidinnukleotide aktiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Versuchsabschnitt der Untersuchung des Effektes von Apyrase, einem ATP abbauenden Enzym, gewidmet. Die Zugabe dieses Enzyms führte zu einem Rückgang in der Neuritengesamtlänge (vgl. Abb. 31,35 und Tab. 2). Die Abnahme des Wachstums bei Zugabe von Apyrase lag bei 5,7%. Dieser Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, dass mit Apyrase der physiologische membranständige Abbau von ATP zu Adenosin gestört ist. Infolgedessen geht nur ein Teil des natürlichen Liganden Adenosin für die Adenosinrezeptoren in den Neuronen verloren. Bei der Zugabe von Apyrase muss jedoch auch bedacht werden, dass durch den Abbau von ATP auch mögliche, vom P2-Rezeptor abhängige Mechanismen, inhibiert worden sind.

Um diese Versuchsergebnisse in Bezug auf die P1- und P2-Rezeptoren richtig einordnen zu können, müssten weitere Versuche folgen. Der Literatur ist zu entnehmen, dass Hinterwurzelganglien von Ratten P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub> Rezeptoren exprimieren [204]. Denkbar wären hier zunächst immunohistochemische Versuche, um genauer eingrenzen zu können, welche Vertreter der P2-Rezeptoren im Modellsystem *Gallus gallus* eine Rolle spielen könnten. Nachfolgend sollten pharmakologische Studien durchgeführt werden.

#### 4.11 Physiologische Bedeutung

Der Energiespeicher des Lebens, das ATP, kommt in allen bekannten Lebensformen vor. Karl Lohman, der als Entdecker dieses Moleküls gilt, isolierte das Adenosintriphosphat (ATP) 1929 aus Muskel- und Leberextrakten und klärte so die Struktur dieses Nukleotids auf [205]. Doch auch wenn dieses Molekül erst im frühen neunzehnten Jahrhundert entdeckt wurde, ist es mit eines der ältesten Moleküle auf der Erde. Cyanobakterien, deren Entstehung man vor 2,7 Milliarden Jahre datiert, betreiben oxygene Photosynthese. ATP ist eines der Bausteine die für diese Art der Photosynthese gebraucht werden und zeigt somit, dass auch schon vor 2,7 Milliarden Jahren ATP als Energiespeicher von Zellformen genutzt wurde [206]. In dieser Arbeit lag der Fokus auf Adenosin, das ein Bestandteil der energiereichen Verbindung ATP ist und somit auch ein Molekül darstellt, welches in Organismen schon vor mehreren Milliarden Jahren eine Rolle spielte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in sensorischen Neuronen, durch einen autokrinen Adenosin-Loop, A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptoren aktiviert werden und so das Wachstum der Neuriten beeinflusst wird. Zum Ende dieser Arbeit, konnte eine unabhängige Arbeitsgruppe den Effekt, der in der vorliegenden Arbeit an Neuronen des peripheren Nervensystems gezeigt, wurde auch im zentralen Nervensystem nachweisen [160].

Diese erst kürzlich erschienene Publikation unterstützt die in dieser Arbeit gewonnenen Daten und zeigt dass der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor ein Bestandteil der Wachstumskoordination neuronaler Fortsätze, sowohl im zentralen als auch peripheren System ist. Es ist somit ein grundlegender Mechanismus in neuronalen Zellen gefunden worden.

## 5.0 Zusammenfassung

Das komplexeste Organ des Menschen, sein Gehirn, besteht aus etwa hundert Billionen Neuronen und der zehnfachen Zahl an Gliazellen [2, 3]. Dank der fortschreitenden Technik und dem großen Interesse der letzten Jahrzehnte ist das Wissen im Bereich der Neurobiologie stetig gestiegen. Trotz des heutigen Wissensstandes sind bislang noch viele Funktionsweisen, Abläufe und ihre Zusammenhänge ungeklärt. Die Komponenten und Mechanismen des gerichteten neuronalen Wachstums, im Besonderen die Regeneration von neuronalen Zellen, ist eine zentrale Fragestellung im Bereich der Neurobiologie. In der hier vorliegenden Arbeit wurde zum Einen der Einfluss purinerger Rezeptoren auf das Längenwachstum von neuronalen Zellen untersucht. Zum Anderen sollten die Versuche Aufschluss über einen möglichen autokrinen Mechanismen und deren Einfluss auf das Wachstum sensorischer Neurone geben. Als Modellsystem dienten hierfür sensorische Neurone von E11 Hühnerembryonen (*Gallus gallus*). Die behandelten Aspekte in dieser Arbeit waren:

- **Einfluss von purinerger Rezeptoren auf das Wachstum sensorischer Neurone**

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse, eines *in vitro* Wachstumsassays, zeigen, dass Adenosinrezeptoren eine Rolle im Wachstumsprozess von sensorischen Neuronen spielen. P1-Rezeptoren, oder auch Adenosinrezeptoren, zählen zu den G-protein gekoppelten Transmembranrezeptoren. Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt durch den natürlichen Liganden Adenosin. Die Zugabe von verschiedenen Adenosinrezeptoragonisten und –antagonisten zeigte, dass der A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor, der einen von vier Subtypen der P1-Rezeptoren darstellt, sowohl durch seine Aktivierung als auch durch seine Inhibierung Einfluss auf das Wachstum sensorischer Neurone haben kann. Die Aktivierung des A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptors führte zu einer signifikanten Zunahme der durchschnittlichen Neuritenlänge um 9,2 %. Die unspezifische Hemmung der Adenosinrezeptoren führte zu einer signifikanten Abnahme der durchschnittlichen Neuritenlänge der Neurone von knapp 17%.

- **Beteiligung eines autokrinen Mechanismus am Wachstum von sensorischen Neuronen**

Grundlage des Richtungswachstums und der Wegfindung ist die Steuerung der Axone durch Signale aus der Umgebung [26]. Die zentrale Struktur ist hierbei der Wachstumskegel. Sowohl die Vorwärtsbewegung als auch die Orientierung dieser handförmigen Struktur erfolgt durch einen fortlaufenden Umbau von zellulären Komponenten, wodurch ein gerichtetes Wachstum generiert wird [34, 35]. Ein Experimentaltteil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob ein autokriner Adenosin-Loop den Wachstumsprozess neuronaler Zellen beeinflusst. Diese These stützt die schon oben erläuterte, Abnahme der durchschnittlichen Neuritenlänge durch das Inhibieren der P1-Rezeptoren. Um sicherzustellen, dass zu keinem Zeitpunkt eine Beeinflussung der Neurone in diesem *in vitro* Zellsystem durch Adenosin oder andere Nukleotide von außen stattfindet, wurde mit einem serumfreien Medium gearbeitet. Auch in diesem Medium hat das Blocken des A<sub>2a</sub>-Rezeptors wachstumshemmende Wirkung. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Basisaktivierung der Adenosinrezeptoren vorliegen muss. Weiter zeigte auch die Zugabe von Adenosin Desaminase, einem Enzym, welches Adenosin zu Inosin abbaut, eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum dissoziierter sensorischer Neurone.

- **Freisetzung von ATP oder Adenosin**

Der genaue Prozess der Freisetzung von Adenosin-Derivaten in diesem Zellsystem konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Da es sich bei diesem hier gezeigten autokrinen Loop um einen auf dem Liganden Adenosin basierenden Effekt handelt, wäre es denkbar, dass Adenosin direkt von den sensorischen Neuronen freigesetzt wird. Die hier generierten Daten sowie die Literatur zeigen, dass die Freisetzung von Adenosin meist in pathophysiologischen Prozessen zu finden ist. Aus diesen Gründen ist es wahrscheinlicher, dass ATP freigesetzt wird, dieses durch membranständige Ektonukleotidasen bis hin zu Adenosin abgebaut wird und anschließend auf den A<sub>2a</sub>-Adenosinrezeptor wirken kann.

Hierfür sprechen sowohl die Versuche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Quinacrin, mit welchem vesikuläres ATP in diesem Zellsystem gezeigt werden konnte, als auch Versuche mit dem Enzym Apyrase, welches zur Familie der NTPDasen zählt und ATP bis hin zu AMP abbaut. Die Zugabe von Apyrase zeigte ebenfalls eine Abnahme der Gesamtneuritenlänge von sensorischen Neuronen. Anders wie bei den Versuchen mit der Adenosin Desaminase, wobei Adenosin direkt abgebaut wird, können diese Effekte nicht ohne weiteres den P1-Rezeptoren zugeschrieben werden. Da das verwendete Enzym ATP abbaut, könnte dieser Effekt auch den P2-Rezeptoren zuzuschreiben sein und es müssten weitere Versuche folgen um dies genauer bestimmen zu können. Das unspezifische Blocken der E-NTPDasen und somit die Unterbrechung der möglichen Generierung von Adenosin aus ATP, zeigten ebenfalls eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der Neuriten. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass ein autokriner Mechanismus den Wachstumsprozess neuronaler Fortsätze von sensorischen Neuronen beeinflusst.

## 6.0 Modell des autokrinen Adenosin-Loop

Das in Abbildung 44 dargestellte Modell einer Nervenzelle zeigt den autokrinen Mechanismus, für den die in dieser Arbeit generierten Daten sprechen. Zur Vereinfachung stellt das Modellsystem eine unipolare Nervenzelle dar, den einfachsten Typ von Neuronen. Diese unipolaren Nervenzellen herrschen im Nervensystem von wirbellosen Tieren vor, existieren aber auch in bestimmten Ganglien im autonomen System von Wirbeltieren. Sensorische Neurone in Vertebraten sind zumeist bipolare oder pseudobipolare Nervenzellen. Beide Typen von Nervenzellen haben zwei Fortsätze, einen Dendrit und ein Axon. Der Dendrit übermittelt Informationen aus der Peripherie des Körpers, das Axon leitet die Informationen vom Soma weiter zum zentralen Nervensystem [207]. Aufgrund der Ergebnisse der Wachstumsversuche mit Apyrase und der Detektion von vesikulären ATP-Strukturen im Soma, Neuriten und auch im Wachstumskegel mit einer Quinacrinefärbung, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Neurone ATP und nicht Adenosin freisetzen. Weiter wird die These durch die in der Literatur beschriebene Ko-Lokalisation der NTPDase3 und der 5'-nukleotidase (e5NT) in Hinterwurzelganglien [183] gestützt. Denkbar wäre, dass Neurone ATP freisetzen und dieses durch die NTPDase3 bis hin zu AMP abgebaut wird. Das so generierte AMP wird weiter durch die 5'-nukleotidase zu Adenosin abgebaut. Anschließend bindet Adenosin an den  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptor was eine wachstumsstimulierende Signalkaskade angeregt. Dieser Mechanismus an der Oberfläche des Wachstumskegels ist in Abbildung 44 schematisch dargestellt. Die in dieser Arbeit gezeigte wachstumsregulierende Wirkung des  $A_{2a}$ -Adenosinrezeptors im sensorischen System steht in Übereinstimmung mit einer erst kürzlich veröffentlichten Publikation, die diesen Effekt im zentralen Nervensystem untersuchte [160].

Die in dieser Arbeit generierten Daten, im Besonderen aber die ubiquitäre Verteilung des  $A_{2a}$ -Rezeptors in der Zellmembran, lassen keinen eindeutigen Schluss zu, wo die ATP-Freisetzung lokalisiert ist. Eine immunohistochemische Färbung zeigte, dass der  $A_{2a}$ -Rezeptor in den Neuriten, dem Soma und auch dem Wachstumskegel vorkommt.

Gestützt auf diese Daten, wäre eine Freisetzung von ATP sowohl am Wachstumskegel als auch am Soma selbst denkbar. Auf Grund der Distanz, die zwischen dem Zellkörper, bedingt durch die Lage im Nervenknotten und dem Wachstumskegel, welcher am Ender der Neuriten liegt, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass dieser autokrine Adenosin-Loop am Wachstumskegel selbst abläuft.

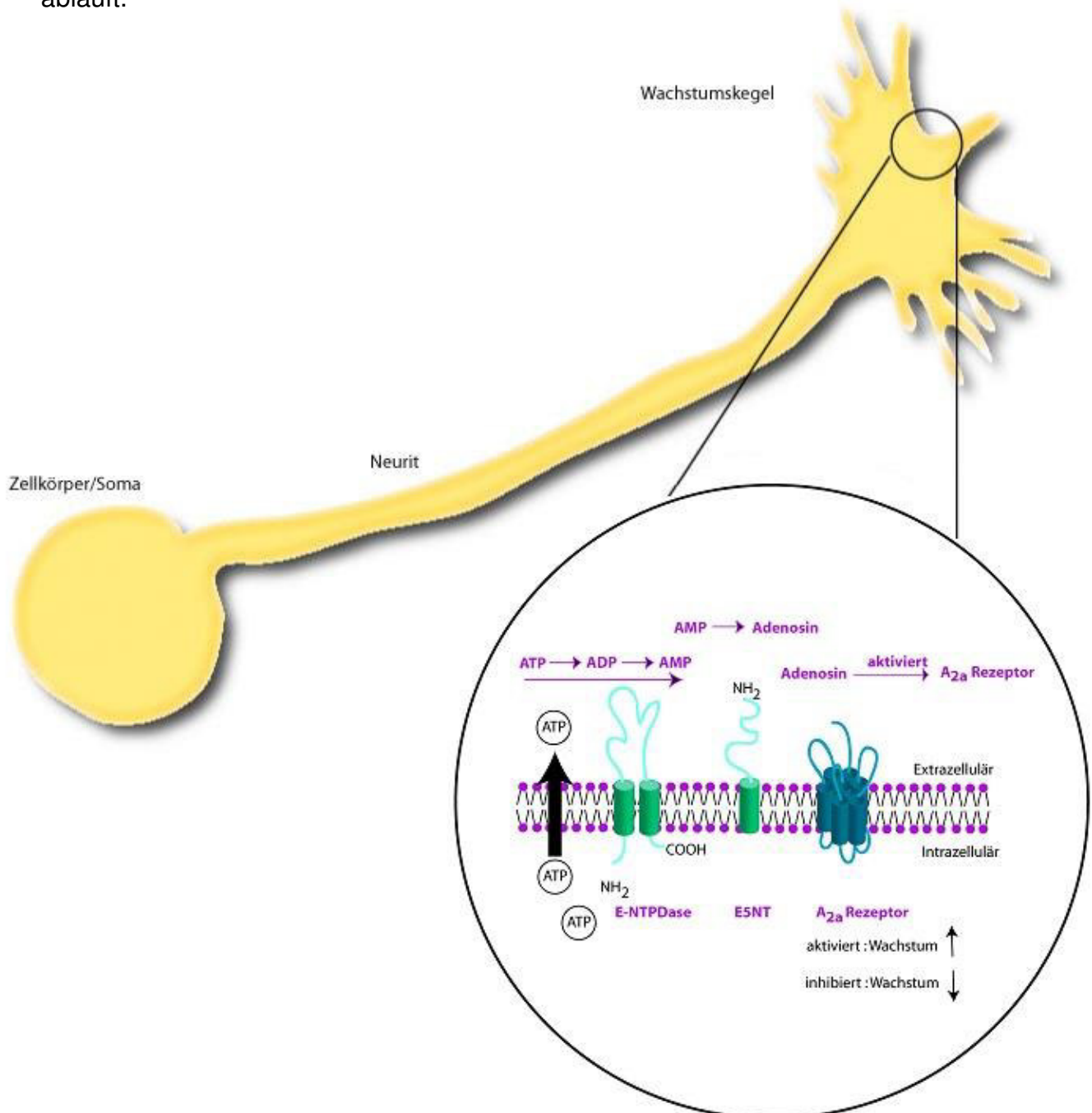


Abb. 44: Modellsystem einer unipolaren Nervenzelle. Hier ist ein möglicher Mechanismus der vesikulären Freisetzung von ATP gezeigt. Dieses wird anschließend durch die E-NTPDase und die ESNT zu Adenosin abgebaut, um danach den A<sub>2a</sub>-Rezeptor zu aktivieren.



## 7.0 Literatur

1. Patro, N., K. Kumar, and I. Patro, *Quick Golgi method: modified for high clarity and better neuronal anatomy*. Indian J Exp Biol, 2013. **51**(9): p. 685-93.
2. Azevedo, F.A., et al., *Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain*. J Comp Neurol, 2009. **513**(5): p. 532-41.
3. Herculano-Houzel, S., *The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain*. Front Hum Neurosci, 2009. **3**: p. 31.
4. Roe, S.A., *Rationalism and embryology: Caspar Friedrich Wolff's theory of epigenesis*. J Hist Biol, 1979. **12**(1): p. 1-43.
5. Mörike, K.D., *Biologie des Menschen Lehrbuch der Anatomie, Physiologie und Entwicklungsgeschichte*. 15. Aufl., ed. 2007, Hamburg: Nikol. XIX,S. 898, p. 584.
6. Trepel, M., *Neuroanatomie : Struktur und Funktion* 5. Aufl. ed. 2012, München: Elsevier. XII, S. 420, p. 1.
7. Patestas, M.A. and L.P. Gartner, *A textbook of neuroanatomy*. 2006, Malden, MA [u.a.]: Blackwell Publ. IX, S. 454, p. 3.
8. Waxman, S.G., *From neuroscience to neurology*. 2005, Amsterdam: Elsevier Academic Press. S. 513, p. 406.
9. Belarbi, K. and S. Rosi, *Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 145.
10. Kim, J. and I. Mook-Jung, *Special issue on neurodegenerative diseases and their therapeutic approaches*. Exp Mol Med, 2015. **47**: p. e146.
11. Anand, R., K.D. Gill, and A.A. Mahdi, *Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future*. Neuropharmacology, 2014. **76 Pt A**: p. 27-50.
12. van den Berg, B., et al., *Guillain-Barre syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(8): p. 469-82.
13. Burnett, M.G. and E.L. Zager, *Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review*. Neurosurg Focus, 2004. **16**(5): p. E1.
14. Faroni, A., et al., *Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **82-83**: p. 160-7.
15. Horner, P.J. and F.H. Gage, *Regenerating the damaged central nervous system*. Nature, 2000. **407**(6807): p. 963-70.
16. Huebner, E.A. and S.M. Strittmatter, *Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems*. Results Probl Cell Differ, 2009. **48**: p. 339-51.
17. Silver, J., M.E. Schwab, and P.G. Popovich, *Central nervous system regenerative failure: role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(3): p. a020602.
18. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
19. Kanno, H., *Regenerative therapy for neuronal diseases with transplantation of somatic stem cells*. World J Stem Cells, 2013. **5**(4): p. 163-71.
20. Venkataramana, N.K., et al., *Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease*. Transl Res, 2010. **155**(2): p. 62-70.
21. Herberts, C.A., M.S. Kwa, and H.P. Hermsen, *Risk factors in the development of stem cell therapy*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 29.
22. Stoll, E.A., *Advances toward regenerative medicine in the central nervous system: challenges in making stem cell therapy a viable clinical strategy*. Mol Cell Ther, 2014. **2**: p. 12.
23. Snyder, E.Y., L.M. Hinman, and M.W. Kalichman, *Can science resolve the ethical impasse in stem cell research?* Nat Biotechnol, 2006. **24**(4): p. 397-400.
24. King, N.M. and J. Perrin, *Ethical issues in stem cell research and therapy*. Stem Cell Res Ther, 2014. **5**(4): p. 85.
25. Dickson, B.J., *Molecular mechanisms of axon guidance*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1959-64.

26. Raper, J. and C. Mason, *Cellular strategies of axonal pathfinding*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(9): p. a001933.
27. Myers, J.P., M. Santiago-Medina, and T.M. Gomez, *Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions*. Dev Neurobiol, 2011. **71**(11): p. 901-23.
28. Harrington, A.W. and D.D. Ginty, *Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(3): p. 177-87.
29. Kater, S.B. and V. Rehder, *The sensory-motor role of growth cone filopodia*. Curr Opin Neurobiol, 1995. **5**(1): p. 68-74.
30. de Castro, F., L. Lopez-Mascaraque, and J.A. De Carlos, *Cajal: lessons on brain development*. Brain Res Rev, 2007. **55**(2): p. 481-9.
31. Meldolesi, J., *Neurite outgrowth: this process, first discovered by Santiago Ramon y Cajal, is sustained by the exocytosis of two distinct types of vesicles*. Brain Res Rev, 2011. **66**(1-2): p. 246-55.
32. Bear, M.F., B.W. Connors, and M.A. Paradiso, *Neurowissenschaften ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie Neuroscience <dt.>*. 3. Aufl. ed. 2009, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XXVII, S. 980, p. 790.
33. Campbell, N.A. and J.B. Reece, *Biologie*. 2016, Hallbergmoos: Pearson. XLVIII, S. 1808, p. 1102.
34. Lin, C.H., C.A. Thompson, and P. Forscher, *Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility*. Curr Opin Neurobiol, 1994. **4**(5): p. 640-7.
35. Sanes, D.H., T.A. Reh, and W.A. Harris, *Development of the nervous system*. 3. ed. 2012, Amsterdam [u.a.]: Elsevier. XVI, S. 341, p. 111.
36. Vitriol, E.A. and J.Q. Zheng, *Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane*. Neuron, 2012. **73**(6): p. 1068-81.
37. Engel, J., et al., *The polymerization reaction of muscle actin*. Mol Cell Biochem, 1977. **18**(1): p. 3-13.
38. Goldberg, J.L., *How does an axon grow?* Genes Dev, 2003. **17**(8): p. 941-58.
39. Klein, R., *Eph/ephrin signalling during development*. Development, 2012. **139**(22): p. 4105-9.
40. Battistini, C. and L. Tamagnone, *Transmembrane semaphorins, forward and reverse signaling: have a look both ways*. Cell Mol Life Sci, 2016.
41. Lai Wing Sun, K., J.P. Correia, and T.E. Kennedy, *Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions*. Development, 2011. **138**(11): p. 2153-69.
42. Zhao, H., et al., *The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans*. Chem Commun (Camb), 2013. **49**(40): p. 4444-52.
43. Chu, S., et al., *Regulation of adenosine levels during cerebral ischemia*. Acta Pharmacol Sin, 2013. **34**(1): p. 60-6.
44. Benarroch, E.E., *Adenosine triphosphate: a multifaceted chemical signal in the nervous system*. Neurology, 2010. **74**(7): p. 601-7.
45. Grau, B., et al., *Adenosine induces growth-cone turning of sensory neurons*. Purinergic Signal, 2008. **4**(4): p. 357-64.
46. Drury, A.N. and A. Szent-Gyorgyi, *The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart*. J Physiol, 1929. **68**(3): p. 213-37.
47. van Calker, D., M. Muller, and B. Hamprecht, *Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells*. J Neurochem, 1979. **33**(5): p. 999-1005.
48. Londos, C., D.M. Cooper, and J. Wolff, *Subclasses of external adenosine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2551-4.
49. Fredholm, B.B., et al., *Nomenclature and classification of purinoceptors*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 143-56.
50. Burnstock, G., *Purine and pyrimidine receptors*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(12): p. 1471-83.

51. Katritch, V., V. Cherezov, and R.C. Stevens, *Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(1): p. 17-27.
52. Johnston, C.A. and D.P. Siderovski, *Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(2): p. 219-30.
53. Alexander, S.P.H., A. Mathie, and J.A. Peters, *LIGAND-GATED ION CHANNELS*. British Journal of Pharmacology, 2011. **164**: p. S115-S135.
54. Thimm, D., et al., *Characterization of new G protein-coupled adenine receptors in mouse and hamster*. Purinergic Signal, 2013. **9**(3): p. 415-26.
55. Ahmad, S., et al., *Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16317-25.
56. Chekeni, F.B., et al., *Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis*. Nature, 2010. **467**(7317): p. 863-7.
57. Junger, W.G., *Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(3): p. 201-12.
58. King, A.E., et al., *Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(8): p. 416-25.
59. Lovatt, D., et al., *Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(16): p. 6265-70.
60. Corti, F., et al., *Adenosine is present in rat brain synaptic vesicles*. Neuroreport, 2013. **24**(17): p. 982-7.
61. Larsson, M., et al., *Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release*. Cereb Cortex, 2012. **22**(5): p. 1203-14.
62. Jung, J., et al., *ATP release through lysosomal exocytosis from peripheral nerves: the effect of lysosomal exocytosis on peripheral nerve degeneration and regeneration after nerve injury*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 936891.
63. Lazarowski, E.R., *Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 359-73.
64. al-Rashida, M. and J. Iqbal, *Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors*. Med Res Rev, 2014. **34**(4): p. 703-43.
65. Braun, N. and H. Zimmermann, *ATP-Hydrolyse an der Zelloberfläche: Neue Enzyme und funktionelle Zusammenhänge*. BIOSPEKTRUM-HEIDELBERG-, 2001. **7**(2): p. 115-117.
66. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 299-309.
67. Grau, B., *Einfluss purinergischer Substanzen auf das Wachstum sensorischer Neurone (Dissertation) 2004*, in Biomedizinisches Zentrum. Ludwig-Maximilians-Universität: München.
68. Chen, Y., et al., *Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation*. Sci Signal, 2010. **3**(125): p. ra45.
69. Vaupel, P., et al., *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. 2015*, Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges. XX, S. 1047, p. 715
70. König, H.E., *Anatomie der Haussäugetiere Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 5., überarb. u. erw. Aufl. ed. 2012*, Stuttgart [u.a.]: Schattauer. XXI, S. 782, p. 44
71. Smith, C.L., *Cultures from chick peripheral ganglia*, in *Culturing nerve cells*, G. Banker and K. Goslin, Editors. 1998, MIT Press: Cambridge, Mass. p. 261-287.
72. Goldberg, J.L., et al., *Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity*. Neuron, 2002. **33**(5): p. 689-702.
73. Lin, Y.C., et al., *Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4767.
74. Bodin, P. and G. Burnstock, *Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38**(6): p. 900-8.

75. Sorensen, C.E. and I. Novak, *Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32925-32.
76. Akopova, I., et al., *Imaging exocytosis of ATP-containing vesicles with TIRF microscopy in lung epithelial A549 cells*. Purinergic Signal, 2012. **8**(1): p. 59-70.
77. Meijering, E., et al., *Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images*. Cytometry A, 2004. **58**(2): p. 167-76.
78. Chen, Z., et al., *Primary neuron culture for nerve growth and axon guidance studies in zebrafish (Danio rerio)*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57539.
79. Speranza, L., et al., *Activation of 5-HT7 receptor stimulates neurite elongation through mTOR, Cdc42 and actin filaments dynamics*. Front Behav Neurosci, 2015. **9**: p. 62.
80. Grau, B., *Einfluss purinerge Substanzen auf das Wachstum sensorischer Neurone*. 2004: in Biolmaging Zentrum. Ludwig-Maximilians-Universität: München. p. 114.
81. Lindemann, A., *Der Einfluss von Adenosin-Rezeptoren auf die Ca<sup>2+</sup>-Transienten in Neuronen*. 2012, in Biolmaging Zentrum. Ludwig-Maximilians-Universität: München. p. 57.
82. Werner, A., *Wachstumsmessungen an dissoziierten sensorischen Neuronen des Gallus gallus*. 2011, in Biolmaging Zentrum, Ludwig-Maximilians-Universität: München. p. 36.
83. Walzl, M.G., *Meilensteine der embryologischen Forschung für das Verständnis von Entwicklungsgeschehen* Stapfia, Welträtsel und Lebenswunder : Ernst Haeckel - Werk, Wirkung und Folgen ed. E. Aescht. 1998, Linz: Biologiezentrum des Oberösterreichischen Landesmuseums, OÖ. Landesmuseum. p. 506.
84. Gilbert, S.F., *Developmental biology*. 2000, Sunderland, Mass.: Sinauer. XVIII, S. :749, p. 6.
85. Beier, H.M., *Die Entdeckung der Eizelle der Säugetiere und des Menschen*. Reproduktionsmedizin, 2002. **18**(6): p. 333-338.
86. Knippers, R., *Eine kurze Geschichte der Genetik*. 1. Aufl. ed. 2012, Berlin Springer Spektrum. XVII, S. 366, p. 175-176.
87. Burnstock, G., *Purinergic signalling: past, present and future*. Braz J Med Biol Res, 2009. **42**(1): p. 3-8.
88. Nelson, D.L., M.M. Cox, and A.L. Lehninger, *Lehninger Biochemie*. 2011, Berlin [u.a.]: Springer. XLIII, S. 1667, p. 559.
89. Jarvis, M.F., et al., *[3H]CGS 21680, a selective A2 adenosine receptor agonist directly labels A2 receptors in rat brain*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **251**(3): p. 888-93.
90. Lebon, G., et al., *Molecular Determinants of CGS21680 Binding to the Human Adenosine A2A Receptor*. Mol Pharmacol, 2015. **87**(6): p. 907-15.
91. Bürge, S., *Der Einfluss von Adenosin auf die Wachstumsgeschwindigkeit sensorischer Neurone von Gallus gallus*. (Diplomarbeit) 2008: in Biolmaging Zentrum, Ludwig-Maximilians-Universität: München.
92. Jacobson, K.A. and Z.G. Gao, *Adenosine receptors as therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 247-64.
93. Dubey, R.K., et al., *Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts: role of A2B receptors*. Circulation, 1997. **96**(8): p. 2656-66.
94. Werner, A., *Stabilität von Adenosin im fötalen Kälberserum*. 2012, in Biolmaging Zentrum. Ludwig-Maximilians-Universität: München. p. 32.
95. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. ed. 2011, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.,p. 116.
96. Conn, P.M., *Cell Culture: Methods in Neurosciences*. Vol. 2. 1990, San Diego, California 92101: Academic Press Inc. S. 440, p. 24.
97. Werner, A., *Wachstumsmessungen an dissoziierten sensorischen Neuronen des Gallus gallus* (Bachelorarbeit) 2011, in Biolmaging Zentrum. Ludwig-Maximilians-Universität: München.
98. Williams, M., et al., *Biochemical characterization of the triazoloquinazoline, CGS 15943, a novel, non-xanthine adenosine antagonist*. J Pharmacol Exp Ther, 1987. **241**(2): p. 415-20.

99. Klotz, K.N., *Adenosine receptors and their ligands*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 382-91.
100. Dunwiddie, T.V. and S.A. Masino, *The role and regulation of adenosine in the central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 31-55.
101. Eisenstein, A., S. Patterson, and K. Ravid, *The Many Faces of the A2b Adenosine Receptor in Cardiovascular and Metabolic Diseases*. J Cell Physiol, 2015. **230**(12): p. 2891-7.
102. Nemeth, Z.H., et al., *Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes*. FASEB J, 2007. **21**(10): p. 2379-88.
103. Ji, X., et al., *[3H]MRS 1754, a selective antagonist radioligand for A(2B) adenosine receptors*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(6): p. 657-63.
104. Sun, C.X., et al., *Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2173-2182.
105. Stewart, M., et al., *[3H]OSIP339391, a selective, novel, and high affinity antagonist radioligand for adenosine A2B receptors*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(2): p. 305-12.
106. Borrmann, T., et al., *1-alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of adenosine A2B receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity*. J Med Chem, 2009. **52**(13): p. 3994-4006.
107. Muller, C.E. and K.A. Jacobson, *Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(5): p. 1290-308.
108. Mills, J.H., et al., *Human brain endothelial cells are responsive to adenosine receptor activation*. Purinergic Signal, 2011. **7**(2): p. 265-73.
109. Wei, Q., et al., *A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells*. Purinergic Signal, 2013. **9**(2): p. 271-80.
110. Baraldi, P.G., et al., *Recent improvements in the development of A(2B) adenosine receptor agonists*. Purinergic Signal, 2008. **4**(4): p. 287-303.
111. Fernandez, F., et al., *1,3-dialkyl-8-N-substituted benzyloxycarbonylamino-9-deazaxanthines as potent adenosine receptor ligands: Design, synthesis, structure-affinity and structure-selectivity relationships*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(10): p. 3618-29.
112. Beukers, M.W., I. Meurs, and A.P. Ijzerman, *Structure-affinity relationships of adenosine A2B receptor ligands*. Med Res Rev, 2006. **26**(5): p. 667-98.
113. Hinz, S., et al., *BAY60-6583 acts as a partial agonist at adenosine A2B receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2014. **349**(3): p. 427-36.
114. Rosentreter, U., et al., *Substituted 2-thio-3,5-dicyano-4-aryl-6-aminopyridines and the use thereof as adenosine receptor ligands*. 2001, Google Patents.
115. Yan, L., et al., *Adenosine receptor agonists: from basic medicinal chemistry to clinical development*. Expert Opin Emerg Drugs, 2003. **8**(2): p. 537-76.
116. Rahman, A., *The role of adenosine in Alzheimer's disease*. Curr Neuropharmacol, 2009. **7**(3): p. 207-16.
117. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): p. 527-52.
118. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(1): p. 1-34.
119. Dixon, A.K., et al., *Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(6): p. 1461-8.
120. Lopes, L.V., et al., *Adenosine A3 receptors are located in neurons of the rat hippocampus*. Neuroreport, 2003. **14**(12): p. 1645-8.
121. Chen, G.J., et al., *Activation of adenosine A3 receptors reduces ischemic brain injury in rodents*. J Neurosci Res, 2006. **84**(8): p. 1848-55.
122. Rebola, N., et al., *Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons*. Neurochem Int, 2005. **47**(5): p. 317-25.

123. Varani, K., et al., *A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release*. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(6): p. R197.
124. Kim, T.H., Y.K. Kim, and J.S. Woo, *The adenosine A3 receptor agonist CI-IB-MECA induces cell death through Ca(2+)-/ROS-dependent down regulation of ERK and Akt in A172 human glioma cells*. *Neurochem Res*, 2012. **37**(12): p. 2667-77.
125. Abedi, H., et al., *Mitochondrial and caspase pathways are involved in the induction of apoptosis by IB-MECA in ovarian cancer cell lines*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(11): p. 11027-39.
126. Gessi, S., et al., *Adenosine receptors and cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1808**(5): p. 1400-12.
127. Choi, I.Y., et al., *A3 adenosine receptor agonist reduces brain ischemic injury and inhibits inflammatory cell migration in rats*. *Am J Pathol*, 2011. **179**(4): p. 2042-52.
128. Fishman, P., et al., *Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists*. *Drug Discov Today*, 2012. **17**(7-8): p. 359-66.
129. Lee, E.J., et al., *A novel adenosine analog, thio-CI-IB-MECA, induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **70**(6): p. 918-24.
130. Antonioli, L., et al., *Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(12): p. 842-57.
131. Jiang, J., et al., *Structure-activity relationships of 4-(phenylethynyl)-6-phenyl-1,4-dihydropyridines as highly selective A3 adenosine receptor antagonists*. *J Med Chem*, 1997. **40**(16): p. 2596-608.
132. Lang, G., *Histotechnik*. 2006, Wien Springer. IX, S. :427, p. 258-281.
133. Kaebisch, C., et al., *The role of purinergic receptors in stem cell differentiation*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2015. **13**: p. 75-84.
134. Cristalli, G., et al., *Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors*. *Med Res Rev*, 2001. **21**(2): p. 105-28.
135. Stettler, O., et al., *Engrailed homeoprotein recruits the adenosine A1 receptor to potentiate ephrin A5 function in retinal growth cones*. *Development*, 2012. **139**(1): p. 215-24.
136. Jung, J., et al., *Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **430**(2): p. 488-93.
137. Zimmermann, H., M. Zebisch, and N. Strater, *Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases*. *Purinergic Signal*, 2012. **8**(3): p. 437-502.
138. Handa, M. and G. Guidotti, *Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (Solanum tuberosum)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **218**(3): p. 916-23.
139. Casali, E.A., et al., *Ectonucleotidase activities in Sertoli cells from immature rats*. *Braz J Med Biol Res*, 2001. **34**(10): p. 1247-56.
140. Yegutkin, G.G., *Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(5): p. 673-94.
141. Baqi, Y., *Ecto-nucleotidase inhibitors: recent developments in drug discovery*. *Mini Rev Med Chem*, 2015. **15**(1): p. 21-33.
142. Iqbal, J., et al., *A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction*. *Purinergic Signal*, 2005. **1**(4): p. 349-58.
143. Levesque, S.A., et al., *Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases*. *Br J Pharmacol*, 2007. **152**(1): p. 141-50.
144. Vetri, F., et al., *ATP hydrolysis pathways and their contributions to pial arteriolar dilation in rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(4): p. H1369-77.
145. Huang, R.M., et al., *Marine nucleosides: structure, bioactivity, synthesis and biosynthesis*. *Mar Drugs*, 2014. **12**(12): p. 5817-38.

146. Hicks-Berger, C.A., et al., *Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2)*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34041-5.
147. Barreto-Chang, O.L. and R.E. Dolmetsch, *Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM*. J Vis Exp, 2009(23).
148. Chhabra, A., et al., *Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: As referenced to Seddon and Sunderland classifications*. Indian J Radiol Imaging, 2014. **24**(3): p. 217-24.
149. Song, Y., et al., *Regulation of axon regeneration by the RNA repair and splicing pathway*. Nat Neurosci, 2015. **18**(6): p. 817-25.
150. Jacobson, K.A. and Z.G. Gao, *Adenosine receptors as therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 247-264.
151. Merighi, S., et al., *A2a and a2b adenosine receptors affect HIF-1 $\alpha$  signaling in activated primary microglial cells*. Glia, 2015. **63**(11): p. 1933-1952.
152. Hocher, B., *Adenosine A1 receptor antagonists in clinical research and development*. Kidney Int, 2010. **78**(5): p. 438-45.
153. Rassow, J., *Biochemie*. 2016, Stuttgart: Thieme. S: 880, p. 561-562.
154. Fredholm, B.B., et al., *Structure and function of adenosine receptors and their genes*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 364-74.
155. de Lera Ruiz, M., Y.H. Lim, and J. Zheng, *Adenosine A2A receptor as a drug discovery target*. J Med Chem, 2014. **57**(9): p. 3623-50.
156. Fredholm, B.B., *Adenosine receptors as drug targets*. Exp Cell Res, 2010. **316**(8): p. 1284-8.
157. Kaelin-Lang, A., T. Lauterburg, and J.M. Burgunder, *Expression of adenosine A2a receptor gene in rat dorsal root and autonomic ganglia*. Neurosci Lett, 1998. **246**(1): p. 21-4.
158. Ramirez, S.H., et al., *Activation of adenosine A2A receptor protects sympathetic neurons against nerve growth factor withdrawal*. J Neurosci Res, 2004. **77**(2): p. 258-69.
159. Li, L., et al., *Peripheral adenosine A2A receptors are involved in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice*. Neuroscience, 2010. **170**(3): p. 923-8.
160. Ribeiro, F.F., et al., *Axon elongation is regulated by adenosine A2A receptors*. Int J Dev Neurosci, 2015. **47**(Pt A): p. 83-4.
161. Thimm, D., et al., *Ligand-specific binding and activation of the human adenosine A(2B) receptor*. Biochemistry, 2013. **52**(4): p. 726-40.
162. Vidi, P.A., et al., *Adenosine A(2A) receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane*. FEBS Lett, 2008. **582**(29): p. 3985-90.
163. Gracia, E., et al., *Homodimerization of adenosine A(1) receptors in brain cortex explains the biphasic effects of caffeine*. Neuropharmacology, 2013. **71**: p. 56-69.
164. Brugarolas, M., et al., *G-protein-coupled receptor heteromers as key players in the molecular architecture of the central nervous system*. CNS Neurosci Ther, 2014. **20**(8): p. 703-9.
165. Agnati, L.F., et al., *Molecular mechanisms and therapeutic implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(3): p. 509-50.
166. Ciruela, F., et al., *Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers*. J Neurosci, 2006. **26**(7): p. 2080-7.
167. Kaczor, A.A. and J. Selent, *Oligomerization of G protein-coupled receptors: biochemical and biophysical methods*. Curr Med Chem, 2011. **18**(30): p. 4606-34.
168. Moriyama, K. and M.V. Sitkovsky, *Adenosine A2A receptor is involved in cell surface expression of A2B receptor*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 39271-88.
169. Seibt, B.F., *A2B-Adenosin-Rezeptor-Homo- und Heterodimere Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Studien und pharmakologische Charakterisierung in Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät (Dissertation) 2012*, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

170. Rampon, C., et al., *Adenosine enhances progenitor cell recruitment and nerve growth via its A2B receptor during adult fin regeneration*. *Purinergic Signal*, 2014. **10**(4): p. 595-602.
171. Chen, J.F., H.K. Eltzschig, and B.B. Fredholm, *Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges?* *Nat Rev Drug Discov*, 2013. **12**(4): p. 265-86.
172. Ghimire, G., et al., *Regadenoson: a focused update*. *J Nucl Cardiol*, 2013. **20**(2): p. 284-8.
173. Darnell, J.E., H.F. Lodish, and D. Baltimore, *Molekulare Zellbiologie*. 1994, Berlin u.a.: de Gruyter. XLII, S. 1277, p. 814.
174. Doganer, B.A., L.K. Yan, and H. Youk, *Autocrine Signaling and Quorum Sensing: Extreme Ends of a Common Spectrum*. *Trends Cell Biol*, 2015.
175. Werner, A., *Stabilität von Adenosin im fötalen Kälberserum* (Masterarbeit) 2012, in Biolumineszenz Zentrum. Ludwi-Maximilians-Universität: München.
176. Fields, R.D. and G. Burnstock, *Purinergic signalling in neuron-glia interactions*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(6): p. 423-36.
177. Chen, Y., et al., *ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors*. *Science*, 2006. **314**(5806): p. 1792-5.
178. Fields, R.D., *Nonsynaptic and nonvesicular ATP release from neurons and relevance to neuron-glia signaling*. *Semin Cell Dev Biol*, 2011. **22**(2): p. 214-9.
179. Thauerer, B., S. Zur Nedden, and G. Baier-Bitterlich, *Purine nucleosides: endogenous neuroprotectants in hypoxic brain*. *J Neurochem*, 2012. **121**(3): p. 329-42.
180. Schicker, K., et al., *A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(2): p. 325-34.
181. Augusto, E., et al., *Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A2A receptor functions*. *J Neurosci*, 2013. **33**(28): p. 11390-9.
182. Sowa, N.A., B. Taylor-Blake, and M.J. Zylka, *Ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits nociception by hydrolyzing AMP to adenosine in nociceptive circuits*. *J Neurosci*, 2010. **30**(6): p. 2235-44.
183. Vongtau, H.O., et al., *Distribution of ecto-nucleotidases in mouse sensory circuits suggests roles for nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3 in nociception and mechanoreception*. *Neuroscience*, 2011. **193**: p. 387-98.
184. McCoy, E., et al., *Deletion of ENTPD3 does not impair nucleotide hydrolysis in primary somatosensory neurons or spinal cord*. *F1000Res*, 2014. **3**: p. 163.
185. Polosa, R. and M.R. Blackburn, *Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. *Trends Pharmacol Sci*, 2009. **30**(10): p. 528-35.
186. Schulte, G., *Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege*. *BIOSPEKTRUM-HEIDELBERG*-, 2004. **10**(2): p. 159-161.
187. Cai, D., et al., *Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate*. *J Neurosci*, 2001. **21**(13): p. 4731-9.
188. Peace, A.G. and D.A. Shewan, *New perspectives in cyclic AMP-mediated axon growth and guidance: The emerging epoch of Epac*. *Brain Res Bull*, 2011. **84**(4-5): p. 280-8.
189. Munck, S., et al., *Spatiotemporal properties of cytoplasmic cyclic AMP gradients can alter the turning behaviour of neuronal growth cones*. *Eur J Neurosci*, 2004. **19**(4): p. 791-7.
190. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. *Cell*, 2007. **131**(6): p. 1047-58.
191. Rosenberg, S.S. and N.C. Spitzer, *Calcium signaling in neuronal development*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. **3**(10): p. a004259.
192. Sutherland, D.J., Z. Pujic, and G.J. Goodhill, *Calcium signaling in axon guidance*. *Trends Neurosci*, 2014. **37**(8): p. 424-32.
193. Schulte, G. and B.B. Fredholm, *Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases*. *Cell Signal*, 2003. **15**(9): p. 813-27.
194. Fields, R.D., *Imaging single photons and intrinsic optical signals for studies of vesicular and non-vesicular ATP release from axons*. *Front Neuroanat*, 2011. **5**: p. 32.
195. Hastings, J.W. and C.H. Johnson, *Bioluminescence and chemiluminescence*. *Methods Enzymol*, 2003. **360**: p. 75-104.



196. Corriden, R., P.A. Insel, and W.G. Junger, *A novel method using fluorescence microscopy for real-time assessment of ATP release from individual cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(4): p. C1420-5.
197. Grieshaber, D., et al., *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. *Sensors*, 2008. **8**(3): p. 1400.
198. Fernández-Grandon, G.M., R.D. Girling, and G.M. Poppy, *Utilizing insect behavior in chemical detection by a behavioral biosensor*. *Journal of Plant Interactions*, 2011. **6**(2-3): p. 109-112.
199. zur Nedden, S., et al., *Intracellular ATP influences synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampus via metabolism to adenosine and activity-dependent activation of adenosine A1 receptors*. *J Neurosci*, 2011. **31**(16): p. 6221-34.
200. Heinrich, A., et al., *K<sup>+</sup> depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study*. *Br J Pharmacol*, 2012. **167**(5): p. 1003-20.
201. Jares-Erijman, E.A. and T.M. Jovin, *FRET imaging*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(11): p. 1387-95.
202. Imamura, H., et al., *Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(37): p. 15651-6.
203. Tsivaliaris, G., *TIRF-Mikroskopie und ihre Anwendung in der Biologie*. BIOSPEKTRUM-HEIDELBERG-, 2003. **9**(5): p. 596-600.
204. Kobayashi, K., H. Yamanaka, and K. Noguchi, *Expression of ATP receptors in the rat dorsal root ganglion and spinal cord*. *Anat Sci Int*, 2013. **88**(1): p. 10-6.
205. Langen, P. and F. Hucho, *Karl Lohmann and the discovery of ATP*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. **47**(10): p. 1824-7.
206. Munk, K. and W. Bilger, *Botanik*. 2009, Stuttgart: Thieme. XVII, S. :573, p. 174.
207. Kandel, E.R., *Neurowissenschaften eine Einführung* 2011, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XXII, S. :786, p. 26.

## Publikationen

## Fachartikel

Werner A., Bürge S., Lindemann A., H. Harz, 2016. Neurite elongation is regulated by an autocrine mechanism.

Status: Manuskript in Vorbereitung

## Poster

Werner, Lindemann, Bürge, Harz (2015), *The function of A2A receptors for neurite elongation in sensory neurons of gallus gallus*, International Conference on Purinergic Signalling, Hamburg (23.7 – 25.7)

Eilert, Bürge, Werner, Harz (2011), *Adenosine-receptor induced effects on sensory neurons*, International Conference on Purinergic Signalling, Bonn (22.7 – 25.7)