Von der Form zur Richtung

Eine Untersuchung über den Einfluss der Form eines cytoplasmatischen cAMP Gradienten auf das Richtungswachstum von Wachstumskegeln sensorischer Nerven von *Gallus gallus*

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

vorgelegt von

Sebastian Munck

München im März, 2004

Erstgutachter:	Prof. Dr. Rainer Uhl
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Benedikt Grothe
Tag der mündlichen Prüfung:	26. April 2004-05-01

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet.
München, März 2004

Munck Sebastian

Hinweis

Verehrter Leser:

Es wurde in der vorliegenden Arbeit versucht weitgehend die Regeln der neuen Rechtschreibung zu befolgen. Für wissenschaftliche Wörter fand überwiegend die alte Rechtschreibung Anwendung, da es mir schien, dass beispielsweise ein „Foton“ auf wenig Akzeptanz stoßen würde. Für Richtungsantworten der Neurone, die über weite Strecken verlaufen, wurde das Wort Lenkung verwendet, da Dr. F. Bonhoeffer diesen Terminus etabliert hat. Für den Begriff des „growth cone turnings“ aus der englischsprachigen Literatur, hat sich innerhalb unserer Arbeitsgruppe das Wort Orientierungsreaktion, wegen des Ausrichtens (sprich: des Orientierens) in einem Konzentrationsgefälle durchgesetzt, weshalb er auch hier benutzt wurde.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG **1**

EINLEITUNG **2**

Die Orientierungsreaktionen nicht-neuronaler Zellen 3

Das Gehirn ist ein dynamisches System 5

Der Wachstumskegel 6

Die Orientierung in Gradienten 7

Die Rolle des cAMP 12

Die Entstehung des cAMP in Neuronen 13

Was sind die molekularen Wirkorte des cAMP 16

Der medizinische Aspekt der Arbeit 17

Die Aufgabenstellung 18

MATERIAL UND METHODEN **21**

Das Prinzip 21

Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen und ihre Anwendung 21

Die Zellen 32

Der Messaufbau und die Ausführung der Messungen 35

ERGEBNISSE **55**

Die Zielsetzung 55

Etablierung der Methode 56

Die Abbildung der cAMP Gradienten in HeLa Zellen 60

Der Einfluss der raum-zeitlichen Eigenschaften der cAMP Gradienten auf das Wachstumsverhalten der Neurone 63

Die Lenkung der Fortsätze sensorischer Neurone mit freigesetztem cAMP 82

Theoretische Erwägungen 84

DISKUSSION **86**

Die Methode 87

Die Physiologie 98

LITERATUR **114**

ANHANG **126**

Liste der verwendeten Abkürzungen, Symbole und Fachausdrücke 126

Curriculum Vitae 130

Publikationsliste 131

Danksagung 132

Zusammenfassung

Sowohl bei der Entwicklung als auch der Regeneration des Nervensystems spielen die wachsenden Enden von Nerven, sogenannte neuronale Wachstumskegel, eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass beide Prozesse durch den Zweitbotenstoff cAMP reguliert werden und dass dieser das Richtungswachstum beeinflussen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Zeitraffer-Mikroskopie und der Freisetzung von cAMP aus biologisch inaktiven Käfigsubstanzen das Richtungswachstum von neuronalen Wachstumskegeln untersucht. Durch asymmetrische Freisetzung des cAMP auf einer Seite des Wachstumskegels wurden intrazelluläre cAMP Gradienten erzeugt. Mit einer neu entwickelten Methode, bei der mit verschiedenen Freisetzungsmustern immer die gleiche Menge cAMP freigesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass eine *gepulste* Freisetzung im Gegensatz zur kontinuierlichen das Richtungswachstum beeinflusst. Experimente mit verschiedenen Pharmaka legen den Schluss nahe, dass die Protein Kinase A für die Antworten der Zellen und die Gradientensteilheit für die unterschiedliche Wirksamkeit von gepulster und kontinuierlicher Erzeugung des cAMP verantwortlich sind.

In Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern konnte des Weiteren ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Ergebnisse bei kontinuierlicher und gepulster Freisetzung durch einen Artefakt oder nichtlineare Effekte bei der Freisetzung der Käfigsubstanz zustandekamen. Zudem konnte mit Hilfe einer Zellinie, die cAMP sensitive Kanälen stabil exprimiert, gezeigt werden, dass es möglich ist, intrazelluläre cAMP Gradienten zu erzeugen und dass unterschiedliche Freisetzungsmuster, das heißt kontinuierliche und gepulste Freisetzung, zu unterschiedlichen Gradienten führen. Dieser Befund konnte des Weiteren mit Hilfe einer numerischen Simulation mit den gängigen Theorien abgeglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die raum-zeitliche Form von intrazellulären Gradienten für die Orientierung von neuronalen Fortsätzen ausschlaggebend ist.

Einleitung

Wenn ich spielerischer Laune bin,
mach ich mir aus den Längen- und Breitengraden ein Netz
und fange damit im Atlantischen Ozean Wale.
Aus: Leben auf dem Mississippi
(Mark Twain 1835 – 1910)

Die richtige Bestimmung der Längengrade stellte einst ein kniffliges Problem dar, für dessen Lösung die britische Königin Anne im Jahre 1714 einen der ersten Wissenschaftspreise der Neuzeit ausgesetzt hat (Sobel 1998). Für die heutige Biologie erweist sich dagegen die Funktionsweise des Gehirns als eines der größten Geheimnisse, das erst in Ansätzen verstanden ist.

Das Gehirn ist ein Rätsel von enormer Komplexität – kein Wunder, dass der Nobelpreisträger Murray Gell-Mann davon spricht, dass Komplexität das Paradigma für das 21. Jahrhundert ist (Gell-Mann 1996). Ein kleiner, aber nicht unwesentlicher Teilaspekt dieses Rätsels birgt die Frage in sich, wie sich die komplexe Struktur des Gehirns aufbaut, wie die Fortsätze der Milliarden Nervenzellen den richtigen Weg zu ihren Zielzellen finden, mit denen sie bis zu Tausende von Synapsen bilden.

So wie es bei der Frage nach den Längengraden um Navigation geht, spricht die angelsächsische Literatur auch bei der Orientierung von Neuronen von „navigational processes“. Origineller Weise wurde auch der

erste Preis des Münchner Research Festivals für Fortschritte auf diesem Gebiet vergeben (Uhl 1998).

Zweifellos wäre ohne koordinierte Verschaltung ein funktionierendes Gehirn nicht möglich. Es ist bekannt, dass extrazelluläre Signale das Wachstum von neuronalen Fortsätzen beeinflussen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Eigenschaften, die intrazelluläre Vorgänge haben müssen, um neuronale Fortsätze zu lenken.

Die Orientierungsreaktionen nicht-neuronaler Zellen

Wenn man über die Orientierungsprozesse der Nervenzellen spricht, liegt es nahe diese damit zu vergleichen, was über die Orientierungsreaktionen anderer, teilweise sehr gut untersuchter Zellsysteme bereits bekannt ist.

Da ist zum Beispiel die Chemotaxis der Bakterien oder auch die Lichtorientierungsreaktionen von Algen mit Augenfleck zu nennen, die aber relativ wenig mit den Orientierungsreaktionen höherer Zellen zu tun haben. Am ehesten lassen sich Orientierungsreaktionen neuronaler Fortsätze mit denen von sich amöboid fortbewegender Zellen vergleichen. Ein gut untersuchtes Beispiel für eine solche amöboide Zelle ist die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum,* bei der extrazelluläre cAMP Gradienten eine große Rolle spielen (Miura und Siegert 2000, Parent und Devreotes 1999).

Auch innerhalb eines Organismus gibt es zielgerichtete Bewegungen einzelner Zellen, wie zum Beispiel Lymphozyten, die sich zu einem Entzündungsherd hin bewegen, oder das Wanderverhalten von reifenden Gliazellen zu ihrem Bestimmungsort im Gehirn.

Viele dieser Erkenntnisse lassen sich recht gut auf Nervenzellen übertragen, gerade was die gerichteten Veränderungen des Cytoskeletts, die beteiligten Signalketten oder die Gradiententheorie anbelangt. Man sollte jedoch nicht übersehen, dass es sich bei den Orientierungsreaktionen der Wachstumskegel um eine Reaktion eines Zellorgans und nicht um die einer ganzen, mehr oder weniger autonomen Zelle handelt. Zudem zielt der Mechanismus darauf ab, nicht nur an einen Ort zu gelangen, sondern auch eine Verbindung zu erstellen. Es handelt sich also viel eher um eine Art Tropismus als um eine Taxis, woraus verschiedene Unterschiede resultieren.

Als einer der wichtigsten Unterschiede erweist sich wohl der strukturelle Aufbau des Wachstumskegels im Vergleich zu einer amöboiden Zelle. Bei vielen amöboiden Zellen gibt es eine aktivierte und eine nichtaktivierte Form, der Wachstumskegel hingegen ist nur eine „aktivierte“ Form. Auch gibt es keine Unterteilung in eine aktive Zone und ein Hinterende, da letzteres sozusagen der Neurit ist. Daraus ergeben sich für die Bewegungsmöglichkeiten große Unterschiede.

Das Gehirn ist ein dynamisches System

Das Gehirn erschließt sich als ein veränderliches System, das zeitlebens dazu in der Lage ist, neue Synapsen zu bilden. Um diese zu knüpfen, müssen die Fortsätze der Nervenzellen den Weg zu der richtigen Zielzelle finden. So stellt neuronale Navigation einen essentiellen Prozess während der Entwicklung des Nervensystems dar (Tessier Lavigne und Goodman 1996). Aber auch bei der Regeneration spielen Orientierungs-prozesse eine wesentliche Rolle (Tessier-Lavigne und Goodman 2000).

Ein Mechanismus des Wegfindens von Neuriten ist die Chemoattraktion oder Chemorepulsion von Wachstumskegeln durch Gradienten extrazellulärer Lenkungssignalmoleküle (Song und Poo 1999). Diese gerichtete Information wird vom Wachstumskegel in einer komplexen Signalübertragungskette verarbeitet und führt zu Veränderungen im Cytoskelett (Song und Poo 2001, Tanaka und Sabry 1995). Signalmoleküle, die als cytoplasmatische Umwandler der extrazellulären Lenkungs-information wirken, müssen wenigstens für eine gewisse Zeit einen Gradienten ihrer Aktivität über den Wachstumskegel zeigen (Song und Poo 2001).

Man vermutet, dass die Eigenschaften eines intrazellulären Gradienten von denen des extrazellulären aufgrund von Verstärkungsmechanismen abweichen (Bonhoeffer und Gierer 1984, Meinhardt 1999). Dass dem auch

so ist, konnte bei der chemotaktischen Bewegung der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* direkt gezeigt werden (Parent und Devreotes 1999). Über die raum-zeitlichen Eigenschaften eines intrazelluären Gradienten, der neuronale Orientierungsprozesse auszulösen vermag, ist bislang wenig bekannt.

Der Wachstumskegel

Man weiß vom sich entwickelnden Nervensystem, dass Nervenzellen, um mit ihren Zellfortsätzen zu anderen Zellen projizieren zu können, sogenannte Wachstumskegel bilden (Landis 1983). Chemotropismus dieser Strukturen ist bereits im 19ten Jahrhundert von Ramón y Cajal (1893, 1998) postuliert worden. Wachstumskegel sind handförmige Strukturen an den Enden von wachsenden Neuriten und zeichnen sich durch ein hohes Maß an Autonomie aus (Kater und Rehder 1995). Eine wichtige Fragestellung ist, wie diese Strukturen ihr Ziel, beispielsweise eine andere Nervenzelle, mit der eine Synapse gebildet werden soll, finden. Die Bedeutung der dabei beteiligten Prozesse kann kaum überbewertet werden. Begründet sich darauf doch unter anderem die Plastizität (Kandel 2000), welche die Versatilität des Nervensystems ausmacht. Wachstumskegel spielen dabei auf verschiedenen Organisationsebenen des Gehirns eine entscheidende Rolle. Das gilt sowohl in der Embryogenese, der Optimierung von Schaltkreisen oder auch bei der Regeneration. Das heißt, dass Nervenzellen während der gesamten Lebenszeit die Fähigkeit

beibehalten, ihre Verschaltung zu modulieren und zu verändern (Kao et al. 2002).

Ein Mechanismus, der hier aber nicht näher beleuchtet wird, ist der Kollaps von Wachstumskegeln, der mit Abbauvorgängen einher geht (Kapfhammer und Raper 1987, Schwab 1996). Dabei findet eine starke Rückzugsbewegung des betreffenden Zellfortsatzes statt. Dieses Phänomen kann sowohl mit einem erhöhten intrazellulären Calciumniveau (Kater et al. 1988) als auch mit G-Protein-Aktivierung (Igarashi et al. 1993) in Zusammenhang gebracht werden. Bei pathologischen Vorgängen im Organismus, wie zum Beispiel bei Rückenmarksverletzungen kann ein Kollaps auswachsender Nerven eine wichtige Rolle spielen (Bandtlow et al. 1993).

Die Orientierung in Gradienten

Neben dem Kollaps gibt es auch das Phänomen des Chemotropismus, bei dem ein neuronaler Fortsatz in einem Stoffgradienten in eine bestimmte Richtung wächst. Damit ein diffusibler Stoff orientierend wirken, genauer gesagt in eine Richtung lenken kann, muss dieser Stoff so dargereicht werden, dass eine Richtungsinformation übertragen wird. Dazu muss ein ausreichend großes physiologisch relevantes Konzentrationsgefälle, ein sogenannter Gradient, mit einer mittleren Konzentration im Bereich der Bindungskonstante des Rezeptors über dem Wachstumskegel anliegen (Goodhill 1998). Diese vektorielle konzentrationsabhängige

Information wird in ein intrazelluläres Signal umgewandelt, welches ebenfalls vektoriell ist (siehe Abbildung 1). Dabei führt die räumliche Ausdehnung des Wachstumskegels dazu, dass der anfallende Konzentrationsunterschied über die gesamte Oberfläche wahrgenommen werden kann.

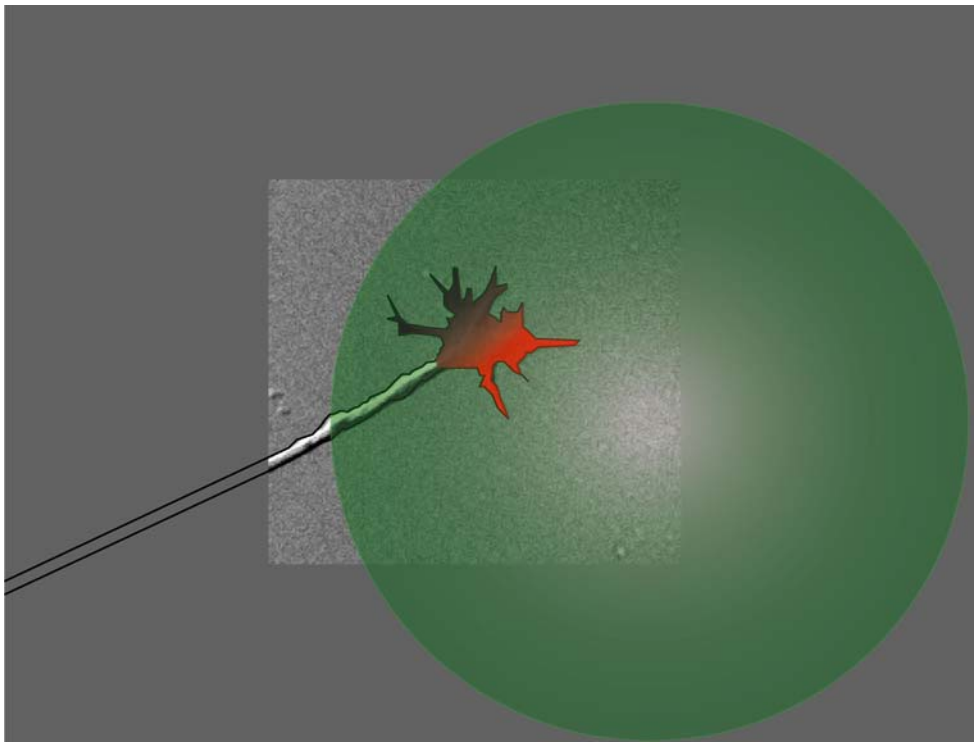


Abbildung 1 Veranschaulichung der Übersetzung extrazellulärer Gradienten (grün) in steilere intrazelluläre (rot). Dargestellt ist das wachsende Ende eines Neuriten, der Wachstumskegel. In diesen wurde in einer Überlagerung ein extrazellulärer und ein intrazellulärer Gradient als Farbverläufe zur Veranschaulichung eingezeichnet. Höhere Konzentrationen erscheinen beim extrazellulären Gradienten heller. Der intrazelluläre Gradient wird von rot zu grau in absteigender Konzentration dargestellt. Abbildung verändert nach Bonhoeffer und Gierer (1984).

Über eine Strecke von 25 µm muss ein Konzentrationsgefälle von mindestens 1% anliegen um orientierend auf Wachstumskegel wirken zu

können (Baier und Bonhoeffer 1992). Die Orientierung in einem Glutamatgradienten zeigt, dass diese nur in einem engen Konzentrationsfenster möglich ist (Zheng et al. 1996a). Dabei versteht sich von selbst, dass sich nur Zellen in einem Stoffgradienten orientieren können, die für den im Gradienten vorliegenden Stoff auch Rezeptoren aufweisen. Diese Responsivität kann sich aber auch während des Wachstums ändern, das bedeutet ein Wachstumskegel muss nicht über die gesamte Strecke seines Wachstums die gleiche Rezeptorausstattung haben (Grunwald und Klein 2002).

Die Gradienten, die für die Orientierung der Sehnerven, das heißt für die richtige Projektion der Nerven zu ihren Zielorten im optischen Tektum sorgen, sind gut dokumentiert. Bei diesen Vorgängen spielen Gradienten, die durch räumliche Expressionsmuster immobiler Faktoren erzeugt wurden, eine große Rolle (Drescher et al. 1995). Aber auch durch die lokale Freisetzung von diffusiblen Substanzen können Gradienten aufgebaut werden (siehe Abbildung 2). Diese können orientierend auf Nervenzellen wirken, wie mit Acetylcholin gezeigt werden konnte (Zheng et al. 1994b).

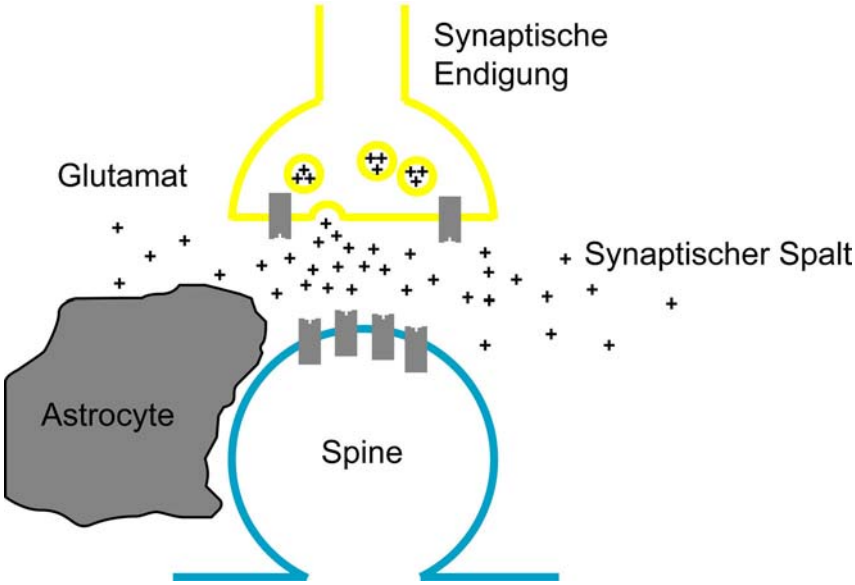


Abbildung 2 Schematische Wiedergabe der Entstehung von extrazellulären Neurotransmitter-Gradienten *in vivo*. Aus einer Synapse leckt der Neurotransmitter in diesem Fall das Glutamat heraus. Abbildung verändert nach Bergles et al. (1999).

Die erste Substanz, für die eine chemotrope Wirkung nachgewiesen wurde, war das Protein mit dem bezeichnenden Namen Nerv Growth Factor (NGF; Levi-Montalcini 1987). Die gängige Meinung, dass chemotrope Substanzen entweder nur als Attraktant oder nur als Repulsor wirken (Tessier Lavigne und Goodman 1996), scheint seit den bahnbrechenden Ergebnissen von Song et al. (1997) nicht mehr haltbar. In dieser und in darauffolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass das intrazellulare cAMP Niveau beziehungsweise das intrazellulare Calcium Niveau zwischen attraktiver und und repulsiver Wirkung eines Agens umschalten kann.

Auch von Neurotransmittern wie Acetylcholin und Glutamat ist eine orientierende Wirkung beschrieben worden (Zheng et al. 1994a, Zheng et al. 1996a). Für Neurotransmitter gibt es sowohl metabotrope, als auch ionotrope Rezeptoren (Kandel 2000). Metabotrope vermitteln ihre Antwort

durch Protein-Protein Interaktion. Ionotrope Rezeptoren sind ligandenaktivierte Ionenkanäle. Viele dieser Kanäle haben eine Leitfähigkeit für Calcium (Unwin 1993). Für die Orientierung von neuronalen Fortsätzen in Acetylcholingradienten beschrieben Zheng et al. (1994a) einen Calcium-gradienten im Inneren des Wachstumskegels. Diese Messung wurde von Kollegen Smith (1994) damals als noch vorläufig eingestuft, repräsentierte aber die gängige Meinung, dass ein extrazellulärer Gradient in einen intrazellulären Calciumgradienten umgewandelt wird (Bonhoeffer und Gierer 1984). Mittlerweile hat sich die Ansicht durchgesetzt, dass es zumindest über einen kurzen Zeitraum einen Aktivierungsgradienten über den Wachstumskegel geben muss (Song und Poo 2001). Für Calcium konnten auf Filipodien beschränkte Ereignisse beschrieben werden, die auf die Orientierung von Wachstumskegeln wirken (Zheng 2000).

Ein weiterer Mechanismus, auf den hier nicht weiter eingegangen werden soll, ist die kontaktvermittelte Orientierung. Sogenannte „guide post“ Zellen wirken hierbei quasi als Wegweiser (Reichert und Boyan 1997, Tessier Lavigne und Goodman 1996).

Die Rolle des cAMP

Da das cAMP in der vorliegenden Arbeit von zentraler Bedeutung ist, soll im Folgenden etwas näher auf dessen mannigfaltigen Wirkungen eingegangen werden.

Der Name second messenger (deutsch Zweitbotenstoff) wurde durch die Entdeckung des cAMP geprägt (Sutherland 1971). Seither hat man erstaunlich viele Funktionen des cAMP gefunden (Noegel und Schleicher 2000, Song und Poo 2001). Änderungen im intrazellulären cAMP Niveau steuern fundamentale metabolische, elektrische, cytoskelettorische und transkriptionelle Antworten (Zaccolo et al. 2000) in den unterschiedlichsten Organismen, die von der Organisationsstufe der Schleimpilze bis zu der der Vertebraten reichen. Auch im Zusammenhang mit den neuronspezifischen Eigenschaften ist cAMP von wesentlicher Bedeutung.

Die Beteiligung des Zweitbotenstoffes cAMP an der Regulation des Richtungswachstums der Wachstumskegel ist gut dokumentiert (Song et al. 1997, Song und Poo 1999). Die Tatsache, dass cAMP auch alleine Wachstumskegel lenken kann, wenn es als intrazellulärer Gradient vorliegt, ist seit längerem bekannt (Gundersen und Barrett 1980, Lohof et al. 1992). In jüngster Zeit wurde dieser Befund noch durch die Entdeckung eines Ca^{2+} unabhängigen cAMP Signalwegs, der Wachstumskegel zu orientieren vermag, weiter bestätigt (Guirland et al. 2003). Darüber hinaus entscheidet

das intrazelluläre cAMP Niveau bei verschiedenen chemotropen Substanzen zwischen attraktiver und repulsiver Antwort (Ming et al. 1997, Song et al. 1997). Ebenfalls ist bekannt, dass die Signalketten von Ca^{2+} und cAMP, auch was die Orientierung von Wachstumskegeln anbelangt, eng miteinander verquickt sind (Ming et al. 2001).

Die Entstehung des cAMP in Neuronen

cAMP wird durch Adenylatcyklasen gebildet. Viele Adenylatcyclasen und die große Mehrheit der Cyclasen im Zentralen Nervensystem zeigen eine Ca^{2+}-Abhängigkeit (Eliot et al. 1989, Mons et al. 1998, Xia und Storm 1997). Adenylatcylasen können Koinzidenzdetektoren für das Auftreten von Ca^{2+}-Erhöhung und die Aktivierung stimulatorischer G-Proteine bei der Gedächtnisbildung sein (Mons et al. 1999). Weiterhin wird auch eine räumliche Kolokalisierung von Adenylatcyclasen und den entsprechenden Rezeptoren beschrieben (Hanoune und Defer 2001).

Verschiedene aktivitätsabhängig ausgeschüttete Substanzen wirken auf den cAMP Haushalt; hierzu gehören zum Beispiel Neurotransmitter (Bacskai et al. 1993, Hempel et al. 1996) oder Neuromodulatoren und Neurotrophine (Berninger und Poo 1999, Zhang et al. 1999). Im Fall von Serotonin konnten in neuronalen Fortsätzen cAMP Gradienten gemessen werden (Bacskai et al. 1993). Die Verknüpfung von aktivitätsabhängig ausgeschütteten Substanzen und der cAMP Produktion legt zeitliche Modulationen in der cAMP Produktion mehr als nahe. Die Wirkung von

Neurotransmittern kann dabei sehr vielfältig sein. So können diese sowohl über stimulatorische G-Proteine auf die Adenylatcyklasen als auch über Ca^{2+} zu cAMP Dynamiken führen (Lauder 1993, Price und Goldberg 1993, Weiss et al. 1998).

Die Signalwege von cAMP und Ca^{2+} und andere Komponenten sind dabei auch untereinander eng vernetzt (Cooper et al. 1995). So zeigten Gorbunova und Spitzer (2002) in Messungen und einer Modellrechnung, dass cAMP Oszillationen durch Interaktion mit Ca^{2+}-Transienten auftreten können. Nicht zuletzt scheint das Auftreten von Zweitbotenstoffen in zeitlichen Mustern ein weit verbreitetes Phänomen zu sein. Buonanno und Fields (1999) beschreiben, dass bei der Genregulation die zeitliche Dynamik des Calciumeinstroms wichtiger ist als die Calciumkonzentration selbst. Ein weiteres Beispiel ist die c-fos Expression in Hinterwurzelganglien (Dolmetsch et al. 1998, Li et al. 1998).

Scheinbar besitzen bestimmte Enzyme eine Art „Eigenfrequenz“, die sich zur optimalen Stimulierung eignet (De Koninck und Schulman 1998). Ein Beispiel ist die Calcium-Calmodulin-Kinase II Aktivität. Sie wird durch die Frequenz von Aktionspotentialen moduliert (Eshete und Fields 2001). Spitzer (2002) spekulierte, dass Zellen sich wie kinetische Patchworkdecken verhalten und ungleichmäßige Oszillationen von Zweitbotenstoffen aufweisen können. Insgesamt lässt sich sagen, dass eine derartige Vernetzung zu Eigenschaften des Netzwerkes führt, welche die Signalwege einzeln betrachtet nicht haben (Bhalla und Iyengar 1999).

Aus der Regulation der Adenylatcyclasen und der Stoffe, die auf den cAMP Haushalt wirken, allen voran die Neurotransmitter, kann geschlossen werden, dass gepulste cAMP Gradienten entstehen können.

Damit ein intrazellulär Gradient orientierend wirken kann, ist es nötig, dass ein Konzentrationsgefälle über den Wachstumskegel abfällt. Dafür wird ein Zweitbotenstoff mit kurzer Reichweite benötigt, wie zum Beispiel das Ca^{2+}. cAMP ist als „long range" Botenstoff bekannt, der schnell diffundiert und relativ langsam abgebaut wird (Kasai und Petersen 1994). So ist in der Literatur, etwa in der Arbeit von Zheng et al. (1994b), ein sogenannter „long range" also weitreichender Effekt gezeigt worden, der aber auch auf die Diffusion von anderen Komponenten der Signalkette zurückgeführt werden könnte.

Neuere Arbeiten von Rich et al. (2000) zeigen, dass cAMP auch sehr lokal wirken kann. Sowohl die cAMP als auch die Inositol 1,4,5-triphosphat (IP_3) abhängige Orientierung von Wachstumskegeln (Lohof et al. 1992, Nishiyama et al. 2003) ist ein Beispiel dafür, dass Gradienten von Zweitbotenstoffen, die als „long range" Botenstoff bekannt sind (Allbritton et al. 1992), auch Wachstumskegel orientieren können.

Zusammen genommen liegt die Existenz von gepulsten cAMP Gradienten, die sich über den Wachstumskegel erstrecken, nahe. Die vorliegende Arbeit basiert unter anderem auf der plausiblen Überlegung, dass diese gepulsten Gradienten entstehen können, auch wenn sie bisher noch nicht nachgewiesen werden konnten. Ein Grund dafür könnte sein, dass

Methoden, die einen solchen Nachweis zulassen, noch nicht lange verfügbar sind (Rich und Karpen 2002).

Was sind die molekularen Wirkorte des cAMP

Eine der wesentlichen Fragen, die sich in diesem Zusammenhang stellt, ist die nach dem Wirkort des cAMP und welches die nächsten Glieder der Signalkette des cAMP sind. Als Hauptwirkort des cAMP erweist sich die Proteinkinase A (PKA), ein Holotetramer, bestehend aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Einheiten (Alberts 2002). Verschiedene Arbeiten heben einen Einfluss des cAMP auf das Cytoskelett und das neuronale Wachstum hervor. So ist die PKA am F-Aktin und den Mikrotubuli verankert (Sato et al. 2002); die PKA fördert durch Phosphorilierung des Synapsin das Wachstum von Xenopus Neuronen (Kao et al. 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass die Injektion von cAMP in den Wachstumskegel zum Ausbilden von Lamellopodien führt und auch die Beweglichkeit des Wachstumskegels gesteigert ist (Bolsover et al. 1992). Obwohl man die Mechanismen, die der cAMP vermittelten Regulation des Wachstumskegelverhaltens zugrunde liegen, nicht komplett versteht, weiß man unter anderem, dass die PKA wiederum IP_3 Rezeptoren und das profilinbindende Protein Mena als Substrat hat (Mizuhashi et al. 2001). Die beiden letztgenannten Molekühle vermitteln das Auswachsen von Axonen und ihre Zielfindung (Lanier et al. 1999, Takei et al. 1998).

RhoA, ein Mitglied der kleinen GTP-bindenden Proteine, ist an der Regulierung des Cytoskeletts beteiligt und gilt als Substrat für die PKA. So weiß man, dass die Phosphorilierung von RhoA wahrscheinlich den Kollaps von Wachstumskegeln in Neuroblastomazellen (Kozma et al. 1997), in Pheochromocytoma PC12 (Tigyi et al. 1996) und in Hinterwurzelganglien von Hühnchen (Jin und Strittmatter 1997) verhindert. Ein fehlender Teil der nur unvollständig bekannten Signalkette von cAMP und der Förderung des Neuronenwachstums könnten Synapsine sein, die auf die Aktinpolymerisation wirken (Kao et al. 2002).

Der medizinische Aspekt der Arbeit

Ein generelles Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen der Orientierung von neuronalen Fortsätzen ist die zentrale Herausforderung zukünftiger Forschung und zugleich die nächste Stufe auf dem Weg zur Regeneration des Nervensystems. So sind sowohl die Wachstumskegel, als auch das cAMP von großer Bedeutung für die Regeneration eines beschädigten Nervensystems (Bandtlow 2003, Horner und Gage 2000, Neumann et al. 2002, Snider et al. 2002, Tessier Lavigne und Goodman 1996).

Auch pathologische Vorgänge stehen im größeren Zusammenhang mit den Ergebnissen. So entpuppt sich Alzheimer als eine Krankheit, die mit der Selbstorganisation des Gehirns verknüpft ist (Arendt 2001). Dies bedeutet,

dass die Krankheit die permanente Dynamik und Umgestaltung stört, die für die korrekte Funktionsweise des Gehirns notwendig sind. Auch wurde von abnormalem Aussprießen von Nervenendigungen im Zusammenhang mit der Entwicklung von posttraumatischer Epilepsie berichtet (Dickson et al. 2000, McKinney et al. 1997). Nicht zuletzt ist auch der Trigeminusnerv, ebenso wie die untersuchten Hinterwurzelganglien, ein sensorischer Nervenstrang, der über eine hohe Regenerationsfähigkeit verfügt. So reinnerviert er unter anderem nach Verletzung die Zähne (Holland 1996).

Die Aufgabenstellung

Orientierungsprozesse von Wachstumskegeln sind ein zentraler Aspekt bei der Formierung neuronaler Netzwerke. Die Fortsätze von Nervenzellen können sich in extrazellulären Gradienten von chemotropen Substanzen orientieren. Diese Gradienten werden in steilere intrazelluläre Gradienten von Zweitbotenstoffen umgewandelt. Genauso wie der Wachstumskegel sowohl für die Entwicklung als auch für die Regeneration von Bedeutung ist (Tessier-Lavigne und Goodman 2000), erweist sich cAMP als wichtiges Molekül bei der Steuerung dieser Orientierungs-prozesse und der Regeneration (Bandtlow 2003, Kao et al. 2002, Ming et al. 2001, Neumann et al. 2002, Snider et al. 2002).

Da, wie oben beschrieben, ein gepulstes Auftreten von cAMP wahrscheinlich ist, lag es nahe, dass raum-zeitliche Phänomene ähnlich wie beim Ca^{2+} eine Rolle bei den Steuerungsvorgängen des cAMP spielen.

Tatsächlich wurden während der Durchführung der vorliegenden Arbeit auch andere raum-zeitliche Phänomene des cAMP in Herzzellen beschrieben (Zaccolo et al. 2002).

Die vorliegende Arbeit untersucht, welchen Einfluss eine Modulierung des raum-zeitlichen Auftretens des intrazellulären Botenstoffs cAMP auf das Richtungswachstumsverhalten eines neuronalen Wachstumskegels hat. Das heißt, es musste aus biophysikalischer Sicht untersucht werden, wie sich die Gradientensteilheit eines intrazellulären Gradienten auf die Orientierungsreaktion von Wachstumskegeln auswirkt. Hierzu war es nötig, eine Methode anzuwenden, mit der sich – unabhängig von vorgeschalteten Signalketten – Gradienten in Wachstumskegeln erzeugen und die dadurch ausgelösten Antworten des Wachstumskegels untersuchen ließen.

Die Gradienten wurden in der vorliegenden Arbeit durch die Freisetzung aus Käfigverbindungen erzeugt. Käfigverbindungen sind biologisch inaktive photolysierbare Substanzen, deren biologisch aktives Molekül mit einer chemischen Gruppe versehen ist, die bei Absorption eines geeigneten Lichtquants abgespaltet werden kann und die aktive Substanz freisetzt.

Das heißt im Falle von Adenosin 3',5'-cyclisches monophosphat, P^1-(2-nitrophenyl) Ethyl Ester (NPE-caged cAMP; McCray und Trentham 1989; siehe Abbildung 3), dass sich durch Manipulation mit einer geeigneten Lichtquelle das räumliche und zeitliche Auftreten sowie die Menge des cAMP steuern lässt. Ein positiver Nebeneffekt, der bei Käfigsubstanzen

häufig auftritt, ist, dass diese durch die Käfiggruppe membrangängig werden (Gregory 2002). Dieses gilt auch für das hier verwendete caged cAMP.

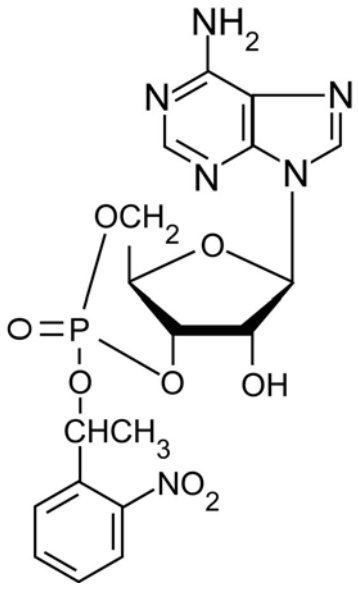


Abbildung 3 Strukturformel des Adenosin 3',5'-cyclisches Monophosphat, P1-(2-nitrophenyl) Ethyl Ester (NPE-caged cAMP) Nach Gregory (2002).

Material und Methoden

Das Prinzip

Ein Großteil der Messungen in dieser Arbeit beruhte auf digitalen Zeitrafferaufnahmen von Wachstumsbewegungen neuronaler Fortsätze und deren quantitativer Auswertung. Einzelne Wachstumskegel von Spinalnervneuronen wurden stimuliert und anschließend die Wachstums-bewegungen verfolgt. Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit intrazellulären Calciummessungen. Das Ca^{2+} wurde fluoreszenzoptisch nachgewiesen.

Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen und ihre Anwendung

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen. Ein pH-Meter (Calimatik pH-Meter 766; Knick) mit einer pH-Elektrode (Blue Line 18 PH; Schott) wurde zur pH-Wertbestimmung verwendet. Die Sterilisation erfolgte mit einem Autoklav (Systec 2540 EL; Tuttnauer). Glukosehaltige oder hitze-sensitive Lösungen wurden mit Hilfe einer Druckfiltration durch einen Membranfilter (Schleicher und Schuell) mit 0,2 µm Porengröße und 50 mm Durchmesser sterilfiltriert.

Die Stammlösungen

Die Färbelösung

- Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM (Molecular Probes) wurde in trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Stocklösungen in einer Konzentration von 1 mM wurden bei -20° gelagert.

- Die HeLa Zellen (siehe Material und Methoden: Die Zellen) wurden in D10 Medium (siehe Material und Methoden: Puffer und Medien) mit einer Endkonzentration an Fluo-4 AM von 2,5 µM bei Raumtemperatur gefärbt.

Der Nerve Growth Factor (NGF)

- 7S NGF (Falcon) wurde in PBS—dem 1 mg/ml Cytochrom C (Roche Diagnostics GmbH) beigemengt wurde, in einer Konzentration von 100 ng/µl gelöst und bei -20° C gelagert.

- NGF (Levi-Montalcini 1987) war ein Bestandteil des DRG-Mediums (siehe Material und Methoden: Puffer und Medien) um das Überleben der Neurone zu gewährleisten.

Die Vitaminstammlösungen (1000fach)

- Vitamin E (α-Tocopherol) wurden vor jeder Verwendung frisch in einer Konzentration von 25 mM in p.a. EtOH gelöst.

- Vitamin C (Na-Ascorbat) wurde vor jeder Verwendung frisch in einer Konzentration von 250 mM in $PBSS^{--}$ (siehe Material und Methoden: Puffer und Medien) gelöst.

- Glutathion wurde vor jeder Verwendung frisch in einer Konzentration von 250 mM in PBS^{--}, (siehe Material und Methoden: Puffer und Medien) gelöst.

- Na-Selenit wurde in einer Konzentration von 500 nM in destillierten H_2O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Die Antibiotikastammlösung für Neurone

- 6,21 mg/ml Penicillin G und 10 mg/ml Streptomycinsulfat wurden in 154 mM NaCl-Lösung (physiologische Kochsalzlösung) gelöst, anschließend mit einem Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm; Neolab) sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Das caged cAMP und die Inhibitoren

- NPE-caged cAMP wurde von Calbiochem in Probenröhrchen zu je 500 µg bezogen. Als Lösungsmittel wurde wasserfreies DMSO verwendet und eine Stammlösung von 5 mM angesetzt. Aliquots von 20 µl lagerten bei -20 °C. Da es sich um eine lichtempfindliche Substanz handelt, wurden alle Arbeitsschritte bei Rotlicht durchgeführt und auch beim weiterem Umgang wurde die Exposition zu Licht vermieden.

- Der PKA Inhibitor KT5720 (Kase et al. 1987; Calbiochem) wurde mit DMSO gelöst. Stocklösungen mit einer Konzentration von 500 µM wurden bei -20 °C gelagert.

- Der PKA Inhibitor Rp-cAMPS (Botelho et al. 1988; Biomol) wurde mit destilliertem Wasser gelöst. Stocklösungen mit einer Konzentration von 50 mM wurden bei -20 °C gelagert.

- Der Phosphodieserase Inhibitor IBMX (Elks und Manganiello 1985) wurde mit DMSO gelöst. Stocklösungen mit einer Konzentration von 40 mM wurden bei -20 °C gelagert.

- Diese Lösungen wurden in doppelter Endkonzentration in einem Milliliter DRG-Medium (siehe Material und Methoden: Puffer und Medien) gelöst und zu den explantierten Hinterwurzelganglien, die jeweils in einem Milliliter DRG-Medium über Nacht kultiviert worden

waren, zugegeben. Diese Zugabe fand jeweils 40 min vor der Messung statt. Die ersten 20 min wurden die Schälchen im Brutschrank inkubiert und danach für die restlichen 20 min zum Equilibrieren der Temperatur auf den beheizten Kreuztisch des Mikroskops gestellt. Mit eventuell zugegebenen Pharmaka wurde ebenso wie mit dem caged cAMP verfahren.

Die Beschichtungslösungen

- Das Polylysin wurde in destilliertem Wasser (1 mg/ml) gelöst und bei -20 °C gelagert.

- Das Laminin (Roche) wurde steril zu 20 µl (500 µg/ml) aufgeteilt und bei -20 °C aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurde es mit Hanks zu einer 2 % Lösung verdünnt.

- Zunächst wurden die Kulturschälchen mit 1 mg/ml Poly-D-Lysin-Hydrobromid, beschichtet. Die polylysinbeschichteten Schälchen wurden anschließend mit Laminin beschichtet (siehe Material und Methoden: Beschichtung der Schälchen).

Die Puffer und Medien

Die Badlösung setzte sich wie folgt zusammen

NPE-caged cAMP	100 µM
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
Hepes	10 mM
Glukose	10 mM

pH 7,4 (NaOH/HCl)

- Diese Lösungen wurde in der Elektrophysiologie als Badlösung eingesetzt. Auf Ca^{2+} und Mg^{2+} wurde verzichtet, da beide Ionen die Leitfähigkeit der untersuchten CNG-Kanäle (siehe Material und Methoden: Die Zellen) herabsetzen.

Die Pipettenlösung

NPE-caged cAMP	100 µM
KCl	140 mM
$MgCl_2$	2 mM
$CaCl_2$	1 mM
EGTA	11 mM
Hepes	10 mM

pH 7,2 (KOH/HCl).

- Diese Lösungen wurde in der Elektrophysiologie als Pipettenlösung eingesetzt. Auch hier wurde, wie bei der Badlösung, auf Ca^{2+} und Mg^{2+} verzichtet.

Ca^{2+} und Mg^{2+} freie Phosphat gepufferte Saline (PBS^{--})

NaCl	136,89 mM
KCl	2,68 mM
Na_2HPO_4	10,14 mM
KH_2PO_4	1,76 mM

pH 7,4 (NaOH/HCl)

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

Der Puffer Hanks

KCl	5,36 mM
KH_2PO_4	0,44 mM
NaCl	136,89 mM
$NaHCO_3$	4,17 mM
Na_2HPO_4	0,34 mM
Glucose	5,55 mM
Phenolrot	26,57 µM

pH 7,1 (NaOH/HCl)

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

Physiologische Kochsalzlösung

- NaCl wurde in destilliertem Wasser (154 mM) gelöst und bei -20 °C gelagert.

Das D10 Medium für die HeLa Zellen

Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM) (Live Technologies)	90 %
Fötales Kälber Serum (FCS) (Live Technologies)	10 %
Puromycin	1 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 µg/ml

- DMEM mit 1 g Glucose pro Liter wurde als vorgefertigtes Pulver bezogen und gemäß den Angaben des Hersteller rekonstituiert. Der pH-Wert wurde mit NaOH oder HCl auf 7,1 eingestellt. Anschließend wurde das Medium sterilfiltriert und bei 8 °C gelagert. Zur Selektion der Transfektanten (siehe Material und Methoden: Die HeLa Zellen) wurde außer dem Medium ein Antibiotikamix aus Penicillin, Streptomycin und Puromycin zugegeben. Dieser wurde analog zu der Antibiotikastammlösung für die Neurone angesetzt.

Das DRG-Medium für die Hinterwurzelganglienzellen

DMEM-F12	90 % (v/v)
FCS	10 % (v/v)
Antibiotikastammlösung	10 µl/ml
NGF-Stammlösung	0,25 µl/ml
α-Tocopherol	1 µl/ml
Na-Ascorbat	1 µl/ml
Glutathion	1 µl/ml
Na-Selenit	1 µl/ml

- Das sogenannte DRG-Medium (von englisch: Dorsal Root Ganglion-Medium; DRG: siehe Material und Methoden: Die Zellen) wurde direkt vor der Verwendung frisch aus den entsprechenden Stammlösungen angesetzt. DMEM-F12 mit HEPES (Live Technologies) wurde als Pulver bezogen und gemäß den Angaben des Hersteller rekonstituiert. Anschließend wurde es sterilfiltriert und bei 8 °C gelagert. Das FCS wurde in 1,2 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Experimentelle Prozeduren

Herstellung der Kulturschälchen

Um die Nervenzellen nach der Präparation zu kultivieren und anschließend damit Messungen durchführen zu können, mussten spezielle Zellkulturschälchen hergestellt werden. Als Basis dienten hierzu 35 mm

Petrischalen mit Nocken (Greiner), die im Boden mit einer zentrischen Bohrung von 15 mm Durchmesser versehen wurden.

Um die Schälchen zu bohren wurde eine Ständerbohrmaschine verwendet. Es wurde ein Schälbohrer von Hoffmann, 8 bis 20 mm, eingesetzt. Nach dem Einspannen einer eigens angefertigten Bohrlehre im Schraubstock wurden 15 mm durchmessende Löcher zentrisch bei 970 UPM in die Schälchen gebohrt. Der Durchmessers der Bohrung wurde durch Einstellung des Tiefenanschlags der Bohrmaschine angepasst.

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

Auf einer Heizplatte (Monotherm; H+P Labortechnik) wurde Paraffin (rotiplast; Roth) bei 130 °C verflüssigt und mit Hilfe eines auf der Heizplatte erwärmten Aluminiumstempels zentrisch auf die Unterseite der Schälchen gestempelt.

Die gereinigten Deckgläschen wurden im nächsten Arbeitsschritt auf einem Metallring ebenfalls auf der Heizplatte erwärmt. Die parafinisierten Schälchen wurden anschließend auf die angewärmten Deckgläschen gedrückt. Dies führte zum Anschmelzen der Paraffinschicht und somit zur

Fixierung der Deckgläschen auf der Unterseite der Schälchen. Damit die Nervenzellen auf dem eingeklebten Deckglas wachsen konnten, war es nötig eine Beschichtung mit Molekülen der extrazellulären Matrix aufzubringen.

Die Beschichtung der Deckgläschen

Da Nervenzellen zum Wachsen extrazelluläre Matrixmoleküle benötigen, wurden die Deckgläschen, auf denen die Ganglien ausgelegt werden sollten, beschichtet. Substratadhäsionsmoleküle ermöglichen das Anheften und das Auswachsen der Nervenzellen.

Zunächst wurden die Schälchen über Nacht mit 200 µl Poly-D-Lysin-Lösung bei Raumtemperatur beschichtet und anschließend je zweimal mit PBS^{--} und Wasser gewaschen. Die trockenen Schälchen wurden zum Sterilisieren nachfolgend für 40 min unter eine UV-Lampe (HNS 30W OFR; Osram) gelegt. Der Abstand zwischen Schälchen und UV-Lampe betrug 13 cm. Die Schälchen lagerten bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank.

Die Schälchen wurden unmittelbar vor der Präparation mit 150 µl Laminin-lösung beschichtet. Das Laminin wurde dazu mit Hanks auf 2 % verdünnt. Nach zwei Stunden Beschichtungszeit im Zellkulturbrutschrank (Forma Scientific) wurde zweimal mit jeweils 5 ml Hanks gewaschen. Anschließend wurden die Schälchen mit 1 ml DRG-Medium aufgefüllt und für weitere 20 min bis zur Präparation im Inkubationsschrank aufbewahrt. Während der ganzen Prozedur durfte die Lamininschicht nicht austrocknen.

Die Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden, um die Medien und Zellkulturen steril zu halten, in einer Reinluftbank (BDK) durchgeführt. Die Zellen wuchsen in einem Zellkulturschrank (Forma Scientific), der bei 37 °C und 7,5 % CO_2 betrieben wurde.

Die HeLa Zellen

Die hier verwendeten HeLa Zellen (ursprünglich ATCC CCC2) exprimierten stabil funktionelle α_3-Untereinheiten von CNG-Kanälen (von englisch: Cyclic nucleotide gated). Diese Kanäle stammen aus dem Riechsystem des Rindes (Ludwig et al. 1990). Die Zellen wurden, wie bei Elfgang et al. (1995) beschrieben, kultiviert. Als Selektionsmarker diente Puromycin, das dem Medium zugegeben wurde (siehe Material und Methoden:D10 Medium für die HeLa Zellen). Diese Zellen (Bedner et al. 2003) wurden von Peter Bedner hergestellt und uns Dankbarerweise von der Gruppe von Professor Willeke aus Bonn zur Verfügung gestellt.

Die Spinalnervganglienzellen

Die Aufbewahrung der Eier

Befruchtete Hühnereier wurden von einer Geflügelzucht (Hölzl) bezogen. Die Eier wurden zwischen Lieferung und Bebrüten bei 13 °C in einem Weintemperierschrank (Liebherr) gelagert. Sie wurden in einem

Brüter (Turbo-Fan 70; Hova) mit motorisierter Eierwendung bei 36 °C und bei circa 80 % Luftfeuchtigkeit bebrütet.

Die Präparation und Kultur der sensorischen Nervenzellen

Für die Untersuchungen wurden Spinalganglienzellen (DRG) aus dem Lumbosakralbereich von Haushuhnsembryonen (Gallus gallus) verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um sensorische Zellen des peripheren Nervensystems (Rüsse 1991). Zunächst wurden die Ganglien aus den Haushuhnembryonen präpariert, aus denen dann die Fortsätze der Nervenzellen mit den Wachstumskegeln über Nacht ausgewachsen sind. Die Ganglien wurden aus elf Tage alten Haushuhnembryonen präpariert. Dies entspricht einem Entwicklungsstadium nach Hamburger von 36 bis 38 (Bellairs 1988). Das Ei wurde an der stumpfen Seite, an der sich das Luftreservoir befindet, mit einer Pinzette geöffnet. Der Hühnerembryo wurde nach Entfernen der Schalenmembran aus dem Ei entnommen und rasch dekapitiert. Zur weiteren Präparation wurde ein Binokular (Olympus, SZX90) und eine Kaltlichtquelle (Schott, KL 1500 elctronic) mit zwei Schwanenhalslichtleitern verwendet. Anschließend wurde die Wirbelsäule freigelegt indem der Bauchraum von ventral geöffnet und die inneren Organe entfernt wurden. Aus der Bauchhöhle wurden Blut und Gewebereste mit Hanks herausgespült. Zunächst mussten die auf der Wirbelsäule liegenden Sympathikusstränge entfernt werden, um im Lumbosakralbereich die Ganglien links und rechts neben der Wirbelsäule entnehmen zu können (siehe Abbildung 4).

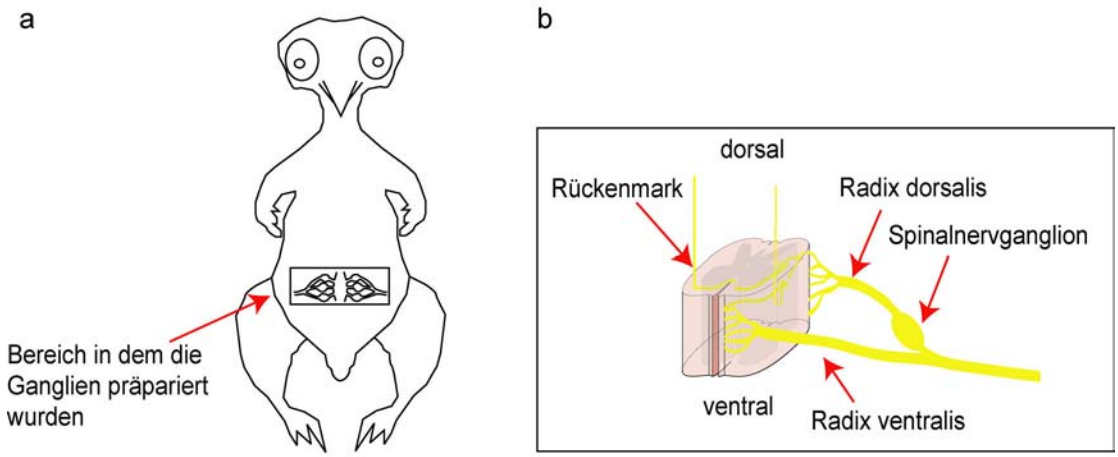


Abbildung 4 Die Lage der dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG) im Hühnchen. **a** zeigt den Hühnerembryo. Der Ausschnitt verdeutlicht den Bereich der Wirbelsäule, an dem die Ganglien entnommen wurden. **b** gibt eine schematische Darstellung der Nervenstränge im Bereich der Ganglien wieder. Abbildung verändert nach Bartl (2002) und Grau (2000).

Anschließend wurden die Ganglien in ein Schälchen mit DRG-Medium überführt. Im Folgenden wurden die Ganglien von Bindegewebsresten und Nervenfortsätzen befreit. Zur Präparation wurden Pinzetten (Nr. 5 mit Biologiespitze; Dumont) verwendet. Die Präparation wurde in einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Kulturmedien wurden vor Gebrauch im Brutschrank vorgewärmt und dabei mit CO_2 angereichert.

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

Die Erhaltung der Wachstumsbedingungen während der Messung

Um während der Messung die Wachstumsbedingungen, die für die Nervenzellen nötig sind, aufrecht zu halten, wurde ein Heizsystem (NPI) verwendet. Dieses wurde mit einer selbstgebauten Aufnahme für die Kulturschälchen und einer Objektivheizung kombiniert, die bei Munck (1999) beschrieben ist. Um zusätzlich zu verhindern, dass CO_2 verloren geht, sich die Osmolarität ändert und Konvektionsströmungen auftreten, wurden Deckel verwendet, die speziell für die Kulturschälchen angepasst worden waren. Diese Deckel hatten, ähnlich wie die Schälchen, eine zentrische Bohrung an die ein Deckgläschen geklebt worden war, um das Licht vom Kondensor für die Zeitrafferaufnahmen zu nutzen. Alle Experimente mit Neuronen wurden bei 37 °C durchgeführt.

Der Messaufbau und die Ausführung der Messungen

Das Mikroskop

Alle Wachstumsmessungen wurden an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (IX70-S1F; Olympus) durchgeführt. Das Mikroskop war mit einem UV-Licht korrigierten 40fach Ölimmersions-objektiv (UAPO 40x OL/340/1.35; Olympus) bestückt. Um das UV-Licht in die Objektebene einzuspiegeln, wurde für die Wachstumsmessungen ein dichroitischer Strahlteiler (FURA; DCLP410; siehe Abbildung 5) verwendet. Für die Calciummessungen wurde ein anderer Filtersatz mit einem

Strahleteiler (FITC; DCLP490) und einem Emitter (LP515) verwendet (siehe Abbildung 6).

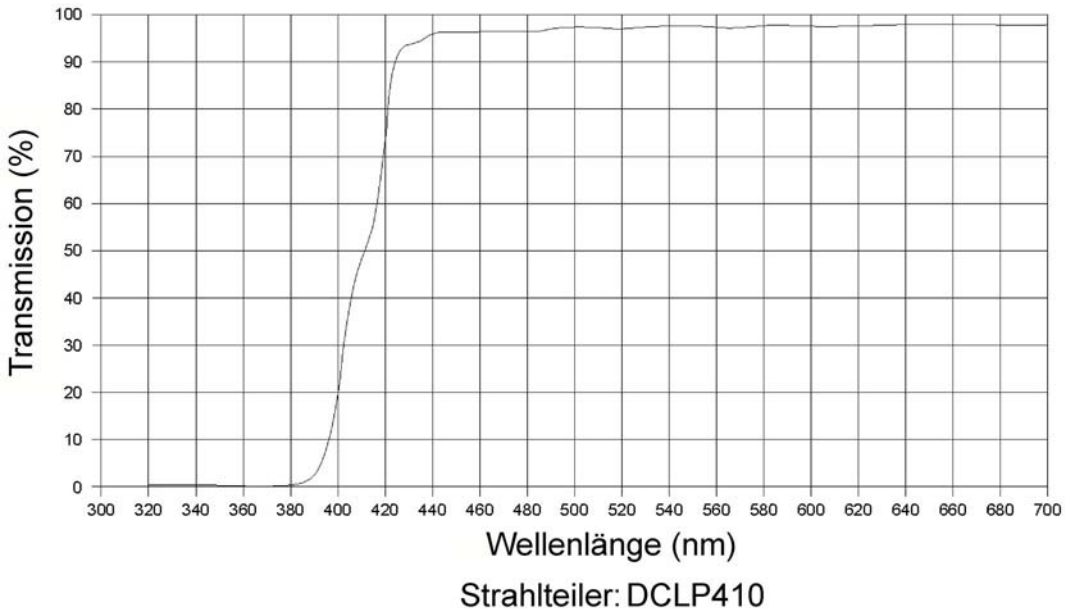
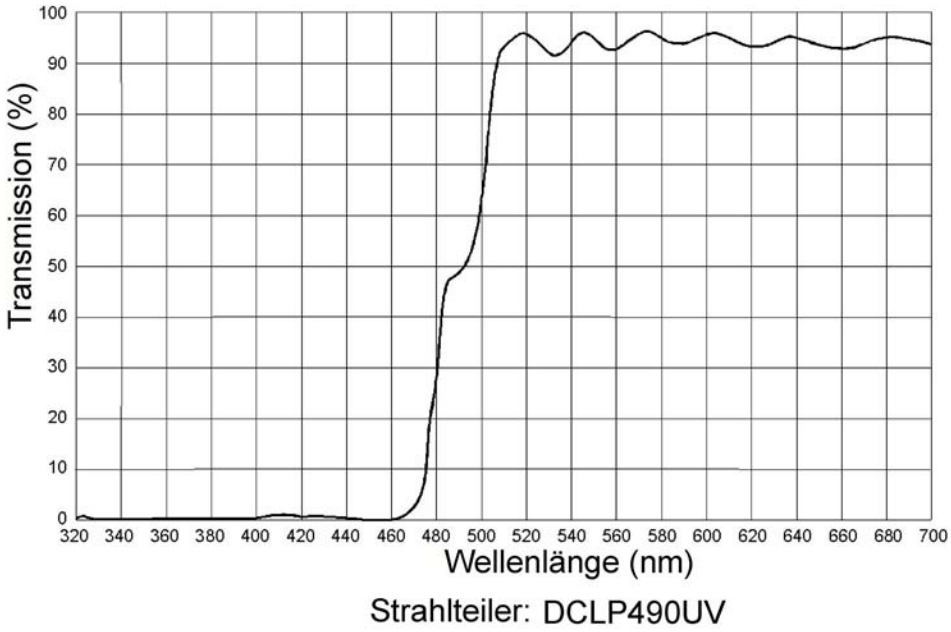


Abbildung 5 Das Spektrum des dichroitischen Strahlteilers der für das Einspiegeln des UV-Lichtes bei den Orientierungsmessungen benützt wurde.

a



b

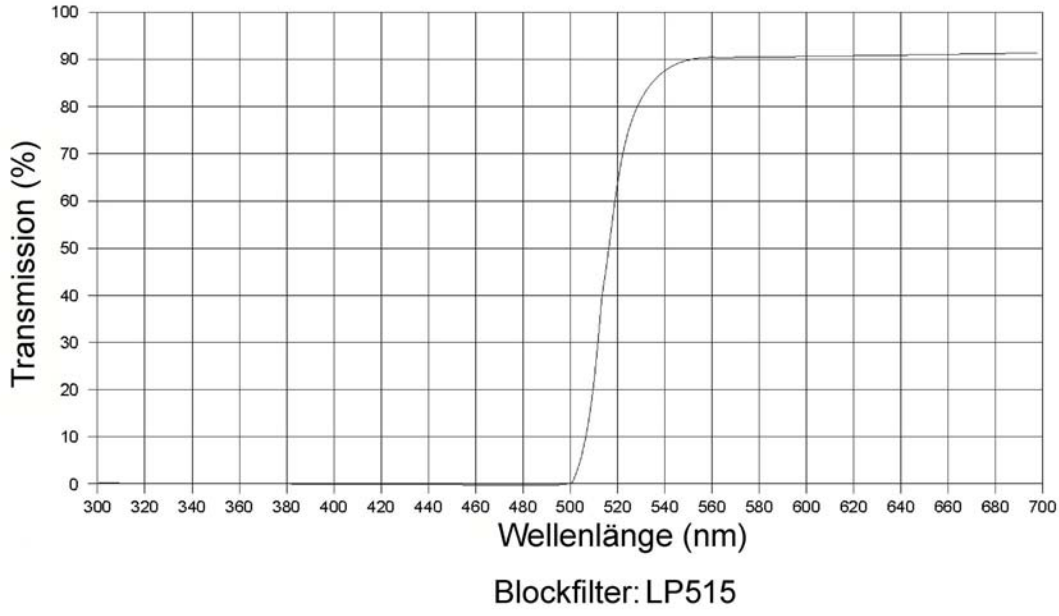


Abbildung 6 Die Spektren des dichroitischen Strahlteilers und des Blockfilters, die für die Ca^{2+} Messungen in den HeLa Zellen verwendet wurden. **a** zeigt den Dichroiten und **b** den Blockfilter

Die Lampe

Als Lichtquelle für die Photolyse der Käfigverbindungen diente eine Quecksilberdampflampe. Bei dieser Lampe handelte es sich um einen Eigenbau (siehe Abbildung 7) mit einem integrierten mechanischen Verschluss (Uniblitz). Dieser Verschluss diente dazu, das UV-Licht in Pulse zu portionieren. Der Brenner war eine Osram HBO 102W/3 und den nötigen Strom dazu lieferte ein Netzteil von Heinzinger (LNX 150-1 economy line). Zusätzlich befand sich in der Lampe ein Kurzpassfilter (siehe Abbildung 8) und im parallelen Teil des Strahlengangs eine Irisblende zum Dimmen der Lichtintensität.

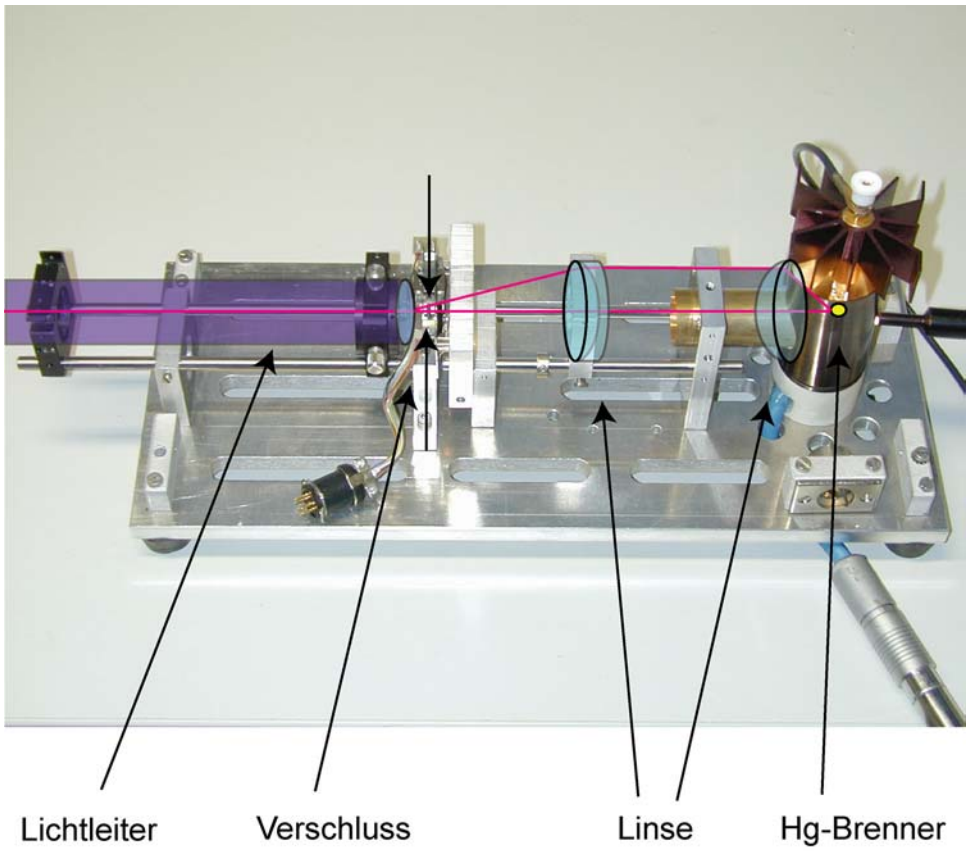


Abbildung 7 Veranschaulichung der Strahlengänge in der Hg-Lampe, die für die Freisetzung des cAMP verwendet wurde. In einer Überlagerung von Foto und schematischer Zeichnung soll dargestellt werden, wie der Strahlengang in der Lampe verläuft. Die Pfeile bezeichnen wichtige Details in der Lampe. Der Kurzpassfilter (siehe Abbildung 8), der sich zwischen den beiden Linsen befand, ist hier nicht zu sehen.

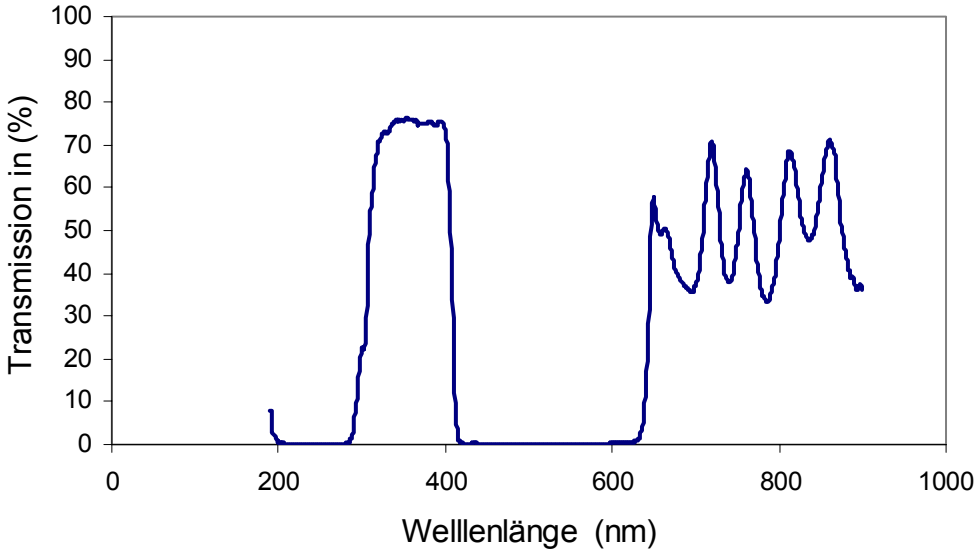


Abbildung 8 Das Spektrum des Interferenzfilters in der Hg-Lampe. Dieser Filter ließ im UV-Bereich zwischen 310 nm und 410 nm das Licht passieren. Zusätzlich transmittierte der Filter Licht im roten Bereich um das Justieren der Lichtquelle mit sichtbarem Licht zu ermöglichen.

Die Einkoppelung und der Spalt

Das UV-Licht wurde mit einem Epifluoreszenskondensor (dual port; Imaging) in das Mikroskop eingekoppelt. Durch den variablen Spalt in der Leuchtfeldblendenebene konnte man den zu bestrahlenden Bereich in der Objektebene auswählen. Die so entstandene rechteckige Leuchtfläche wurde genutzt um caged cAMP zu spalten.

Das Bildverarbeitungssystem

Der Messaufbau (siehe Abbildung 9) war mit einer charge coupled device (CCD) Kamera, die eine Auflösung von 12 Bit hatte (Imago), versehen um Zeitrafferaufnahmen und Fluoreszenzaufnahmen zu

ermöglichen. Das Anregungslicht für die optischen Ca^{2+} Bestimmungen wurde von einem Monochromator (Polychrome II; Messler et al. 1996) erzeugt, der mit einem Eingang des Auflichtkondensors (dual port imaging) verbunden war.

Der zweite seitliche Eingang koppelte mit Hilfe eines dichrotitischen Strahlteilers (FURA; DCLP410) das UV-Licht der Hg-Lampe ein. Der gesamte Messaufbau wurde von der TILLvisIon Software (Version 4) gesteuert. Dieselbe Software wurde auch für die Analyse der Bilddaten verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, wurde das gesamte Equipment für die Bildaufnahme und Auswertung von TILL Photonics bezogen.

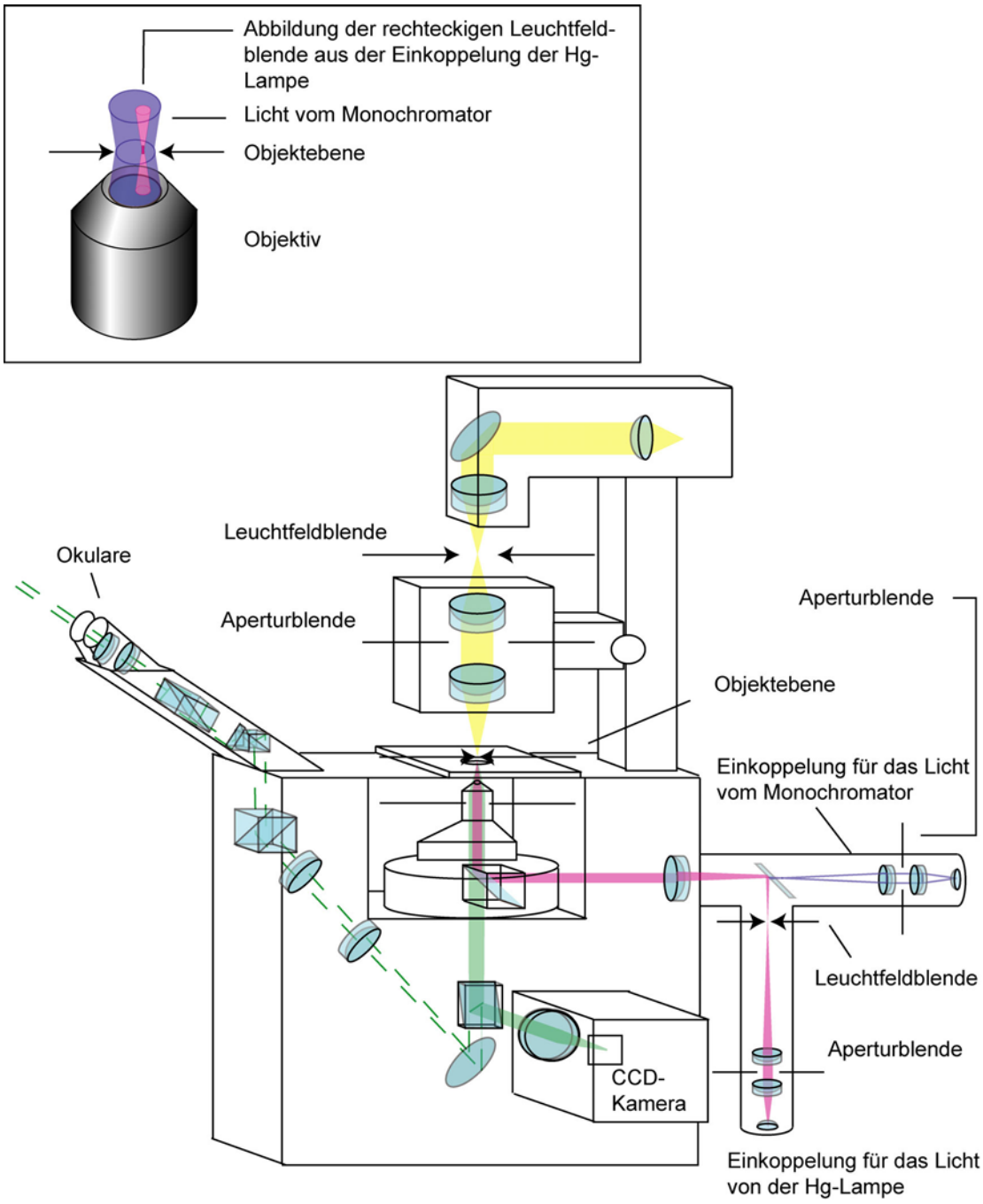


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Strahlengänge im Mikroskop. Das UV-Licht (365 nm) für die Freisetzung des cAMP wird in violett angezeigt. Da sich der Strahlengang des Anregungslichtes für den Ca^{2+} Indikator Fluo-4 (465 nm) weitgehend mit dem UV-Lichtstrahlengang überschneidet, ist dieser in blau nur in der Einkoppelung angedeutet. Der Emmisions-Strahlengang des Fluoreszenzsignals wurde in grün und das Durchlicht für die Zeitrafferaufnahmen in gelb eingezeichnet. Der Strahlengang zu den Okularen ist nur gestrichelt angedeutet, da er für die Messungen nicht relevant war. Im Rechteck ist der Strahlengang in der Objektebene vergrößert dargestellt.

Einstellung und Messung der Photonenflussdichte

Da in der vorliegenden Arbeit mehrere Stimulationsprotokolle bezüglich ihrer Effizienz untersucht wurden und diese es erforderten die Lichtintensität, mit der das caged cAMP gespalten wurde, anzupassen, wurden Lichtmessungen in der Pupillenebene des Mikroskops und in der Objektebene durchgeführt. Der Photostrom wurde mit einer Photodiode (S1337-1010BQ; Hamamatsu), deren spektrale Kennlinie bekannt war, vermessen (siehe Abbildung 10). Die Photodiode war mit einer Stromspannungswandlerkarte verbunden, die 10 V pro mA ausgab. Die Spannung wurde anschließend mit einem Multimeter (PM97; Philips) gemessen.

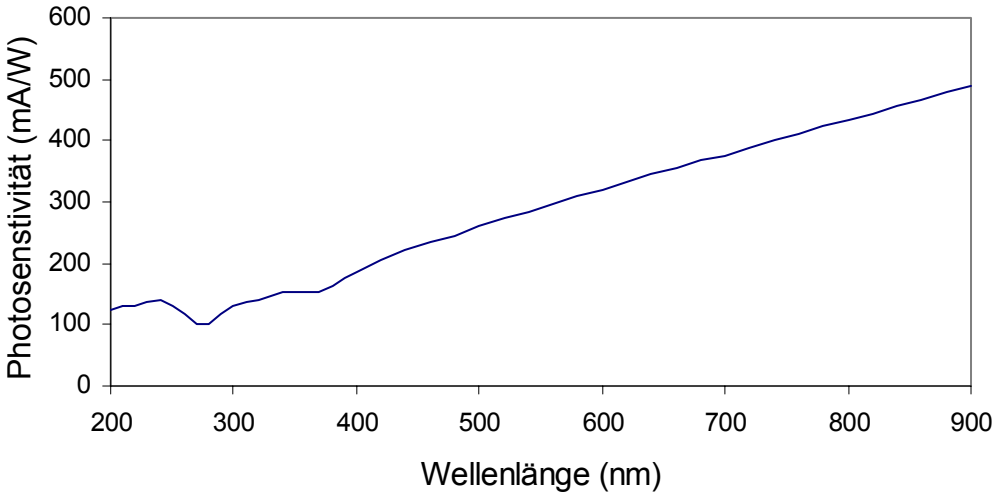


Abbildung 10 Die spektrale Responsivität der Photodiode, die für die Messung des UV-Lichts im Mikroskop verwendet wurde. Dargestellt ist das Typspektrum der Quarzphotodiode gemäß dem Datenblatt der Firma Hamamatsu Nummer: S1337-1010BQ.

Die Effizienz der Photolyse der Käfigverbindungen hängt von der spektralen Charakteristik der verwendeten Lichtquelle ab. Deshalb wurde die Lichtintensität mit einer Irisblende, die im parallelen Teil der UV-

Lichtquelle integriert wurde, reguliert. Die Ergebnisse der Messung mit der Photodiode wurden mit Messungen der CCD Kamera abgeglichen (siehe Abbildung 11). Durch Anpassung der Belichtungszeit, also der Integrationszeit der Kamera zur jeweiligen Lichtintensität, wurde die Messgenauigkeit erhöht. Auf diese Art und Weise war es möglich die Photonenflussdichte zu bestimmen und so die unten aufgeführten Messungen durchzuführen (siehe Ergebnisse: Etablierung der Methode). Diese Messungen wurden zu jedem Messtag durchgeführt.

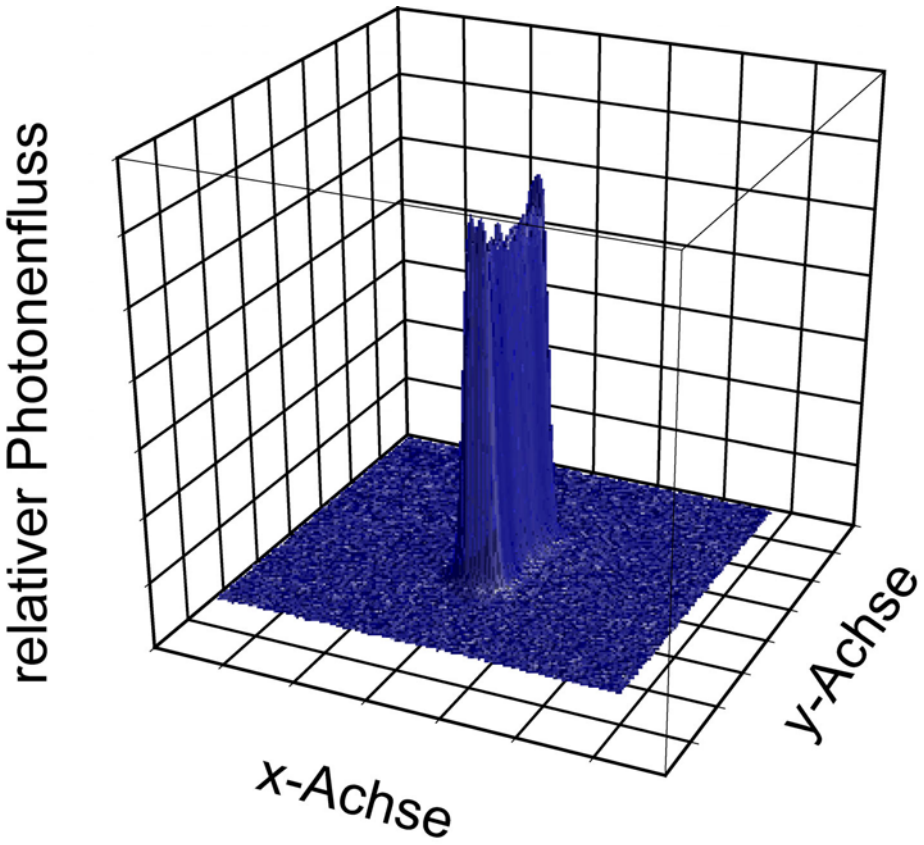


Abbildung 11 Die Intensitätsverteilung des UV-Lichts in der Objektebene. Die Intensitätsverteilung wurde mit einem Oberflächenspiegel und der CCD-Kamera gemessen. Sie ist als Höhenprofil dargestellt. Man kann erkennen, wie die Rechteckblende in der Objektebene abgebildet wird. Eine Einheit in x- und y-Richtung entspricht 3,75 µm.

Das Verhältnis zwischen der Anzahl von UV-Licht Photonen und der Menge an photolysierten caged cAMP Molekülen

Folgende Messungen, welche hier nur der Vollständigkeit und des besseren Verständnises wegen beschrieben sind, wurden von Peter Bedner durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

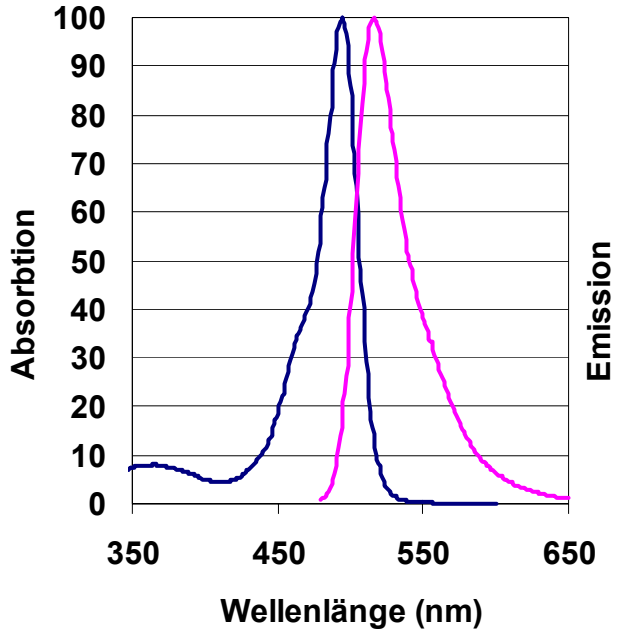
Für verschiedene Käfigverbindungen ist ein linearer Zusammenhang zwischen der Zahl der eingestrahlten Photonen und der Zahl der photolysierten Moleküle beschrieben worden (Hagen et al. 1998, Hagen et al. 1996, Kaupp et al. 1998). Da dies für das hier verwendete NPE-caged cAMP noch nicht gezeigt worden ist, wurden elektrische Messungen durchgeführt, die sich an die obengenannten Publikationen anlehnten. Für die Messungen wurde die oben beschriebene HeLa Zelllinie, die funktionelle Untereinheiten des olfaktorischen CNG-Kanals exprimierte, verwendet. An diesen Zellen wurden Ganz-Zellstrommessungen mit einem sogenannten „switched single-electrode voltage clamp Verstärker“ (SEC-05LX; NPI Electronic; Polder 1984) durchgeführt. Dieser Verstärker wurde mit einer Wechselfrequenz von 35 kHz betrieben. Es wurden nur Pipetten mit einem Widerstand von 2-4 MΩ verwendet.

Die Visualisierung der cAMP Gradienten in den HeLa Zellen

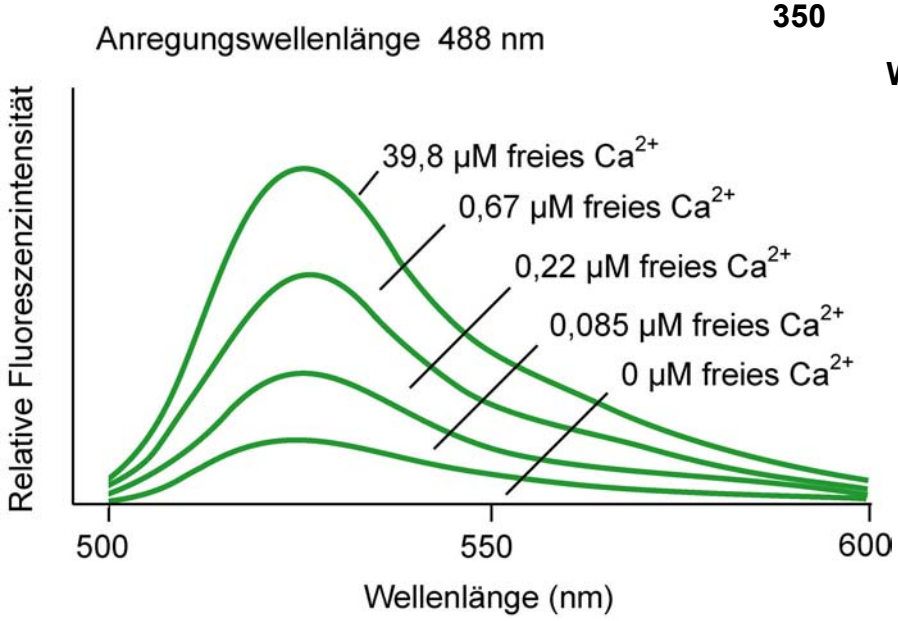
Um zu testen, ob es möglich ist, mit der hier verwendeten Methode cAMP Gradienten in lebenden Zellen zu erzeugen, wurden HeLa Transfektanten (die funktionelle Untereinheiten (α_3) des olfaktorische CNG-Kanals aus dem Rind exprimierten) zur Visualisierung verwendet (siehe Material und Methoden: Die HeLa Zellen). Das durch diese Kanäle einströmende Ca^{2+} lässt sich mit fluoreszenzoptischen Methoden nachweisen. Hierfür wurde das membranpermeable Fluo-4 AM (2,5 µM; Molecular Probes; siehe Abbildung 12) verwendet, welches zusammen mit NPE-caged cAMP (50 µM) 40 min vor dem Experiment zu dem Zell-kulturmedium der HeLa Zellen gegeben wurde und während des ganzen Experiments präsent war.

cAMP Verteilungen wurden durch die Photolyse von identischen Mengen caged cAMP, das in einem Teil der Zelle freigesetzt wurde, erzeugt (siehe Abbildung 13). Die nach der photolytischen Freisetzung von cAMP entstandenen intrazellulärem Ca^{2+}-Transienten wurden mit einer Anregungswellenlänge von 465 nm gemessen. Bevor für die Auswertung $\Delta f/f_0$ Bilder berechnet wurde, wurde eine Hintergrundkorrektur auf der Basis der mittleren Intensität einer Region, die der untersuchten Zelle benachbart war, durchgeführt.

a



b



c

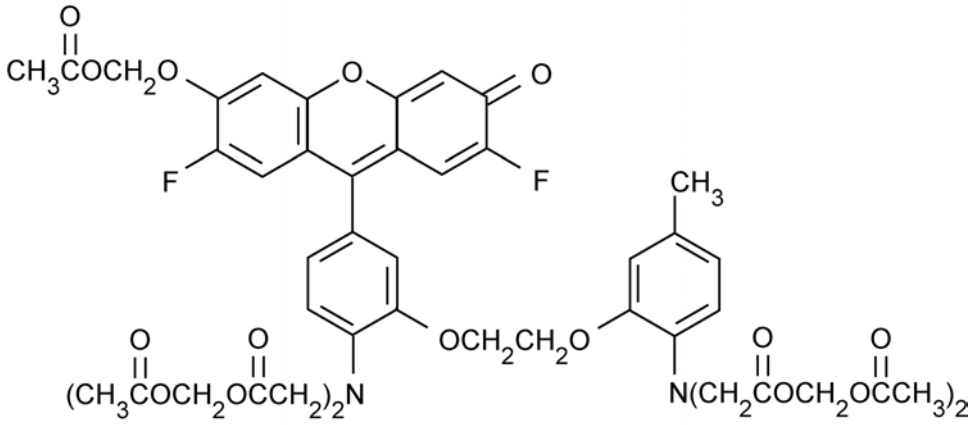


Abbildung12 Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4. **a** zeigt das Anregungs- und Emissionsspektrum, **b** die Intensitätsverteilung der Emission in Abhängigkeit von der Ca^{2+}-Konzentration, **c** die Strukturformel des Fluo 4. Nach (Gregory 2002).

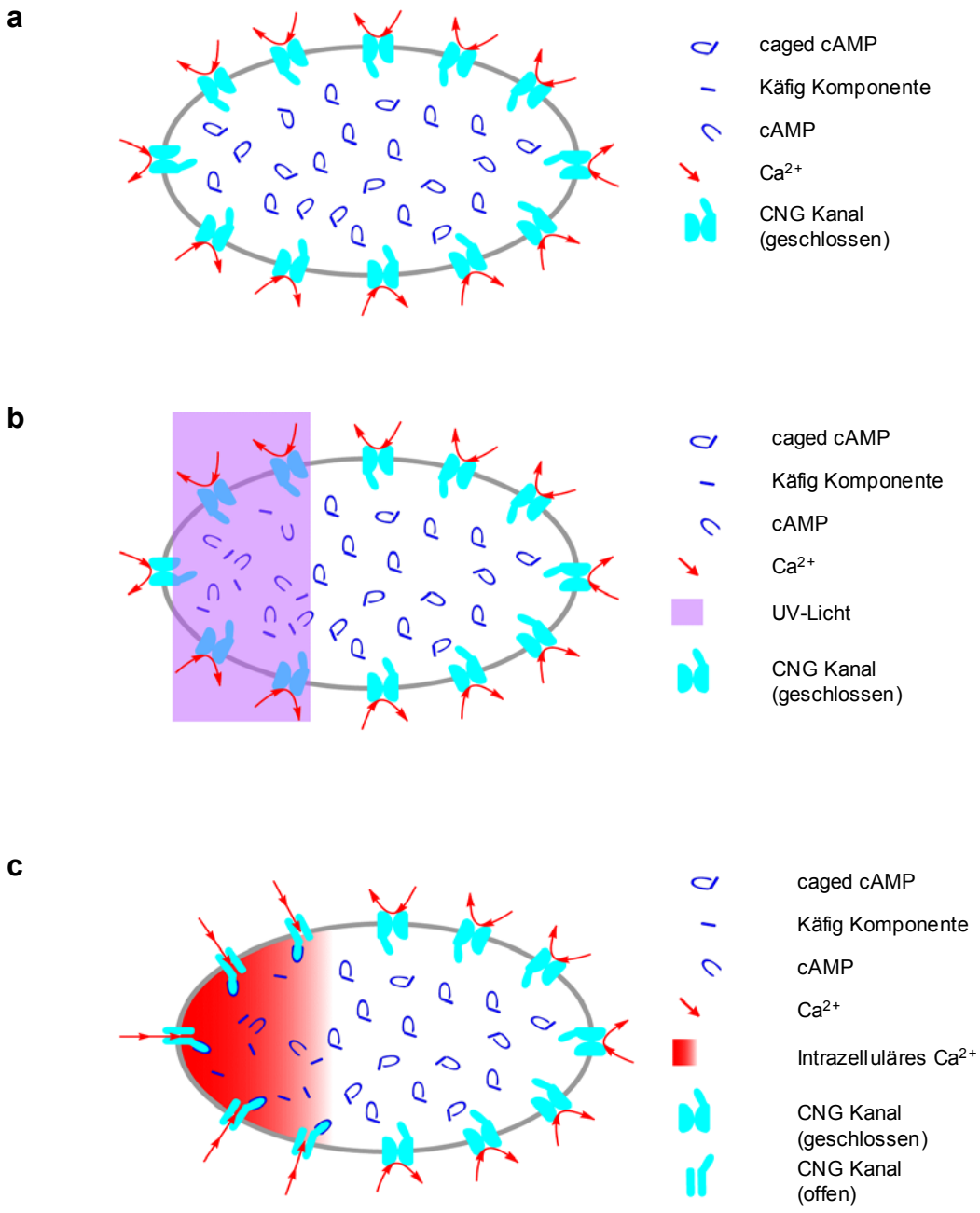
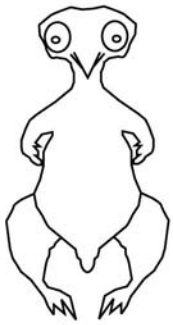


Abbildung 13 Schematischer Ablauf der cAMP-Gradientenmessungen in HeLa Zellen. **a** zeigt die CNG-Kanäle exprimierende HeLa Zelle, die mit caged cAMP geladen ist. Ohne UV-Licht wurde kein cAMP freigesetzt und die cAMP sensitiven Kanäle waren geschlossen. **b** verdeutlicht, wie die Zelle mit UV-Licht bestrahlt wurde. Das UV-Licht wurde mit einem violetten Rechteck dargestellt. Dass UV-Licht setzte das cAMP aus seiner Käfigverbindung frei. **c** Durch Bindung des cAMP öffneten sich die CNG-Kanäle und Ca^{2+} strömte in die Zelle. Dieser Ca^{2+}-Einstrom ließ sich fluoreszenzoptisch nachweisen (siehe Ergebnisse: Die Abbildung der cAMP Gradienten in HeLa Zellen und Abbildung 18).

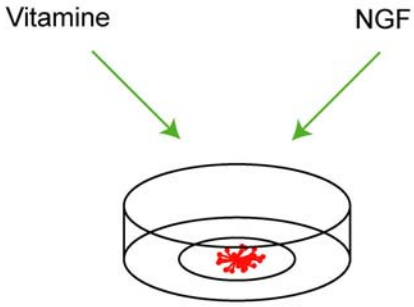
Um Artefakte zu vermeiden, welche aus Zell zu Zell Variationen der transfizierten Zellen entwachsen könnten, wurden die beiden Stimuli immer an der selben Zelle gemessen. Zwischen beiden Stimuli wurde 10 min gewartet, damit sich die Ruhkonzentration von Ca^{2+} wieder einstellen und sich das caged cAMP aus dem Kulturmedium wieder anreichern konnte. Die gemessenen Ergebnisse waren unabhängig von der Reihenfolge der Stimuli.

Die Induktion der Orientierung von neuronalen Wachstumskegeln

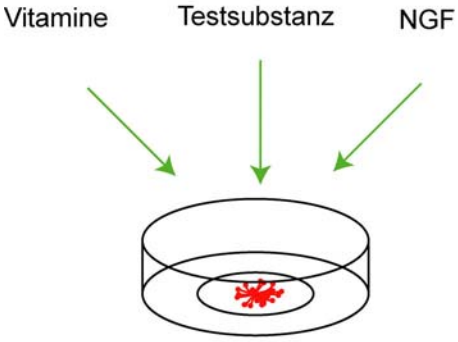
Mit den am Tag zuvor präparierten und über Nacht kultivierten DRG Neuronen wurden Orientierungsexperimente durchgeführt (siehe Abbildung 14). In allen Experimenten war das mit UV-Licht bestrahlte Rechteck (2 x 10 μm^2), in dem das cAMP freigesetzt wurde, in einem 45° Winkel zu der Wachstumsrichtung der Wachstumskegel ausgerichtet und stimulierte die rechte Seite des Wachstumskegels (siehe Abbildung 15). Um die Anzahl der Photonen im Fall der gepulsten und der kontinuierlichen Freisetzung konstant zu halten, wurde die Photonenflussdichte für die kontinuierliche Freisetzung um den Faktor 1538 reduziert. Der Faktor 1538 ergibt sich aus dem Verhältnis von 2 min kontinuierlicher Stimulation und 6 mal 13 ms gepulster Stimulation. Um Irritationen zu vermeiden, möchte ich darauf hinweisen, dass die „pulsatile“ Freisetzung, die Lohof et al. (1992) verwendet hat, eine andere Methode ist, die auf eine möglichst *stabilen* Gradienten abzielt.



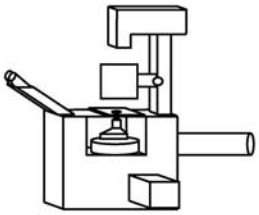
1. Präparation der Ganglien aus den Hinterwurzelganglien am Tag 11 der Embryonalentwicklung



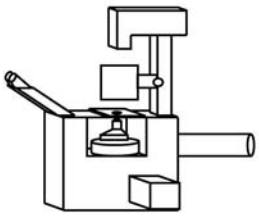
2. Kultur der Ganglien in 1 ml Medium über Nacht



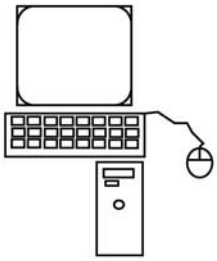
3. Am nächsten Tag Zugabe von 1 ml Medium und dem caged cAMP, den Inhibitoren oder dem Lösungsmittel



4 . Justage und überprüfen der Intensität des UV-Licht Strahlen-gangs



5.Equilibrieren der Schälchen auf dem Mikroskop



6.Durchführung der Messung am Computer

Abbildung 14 Der Messablauf der Orientierungsmessungen als Schema. Gezeigt werden die einzelnen Schritte von der Präparation zur Messung. 1. beginnt am Tag 11 der Embryonalentwicklung des Hühnchens.

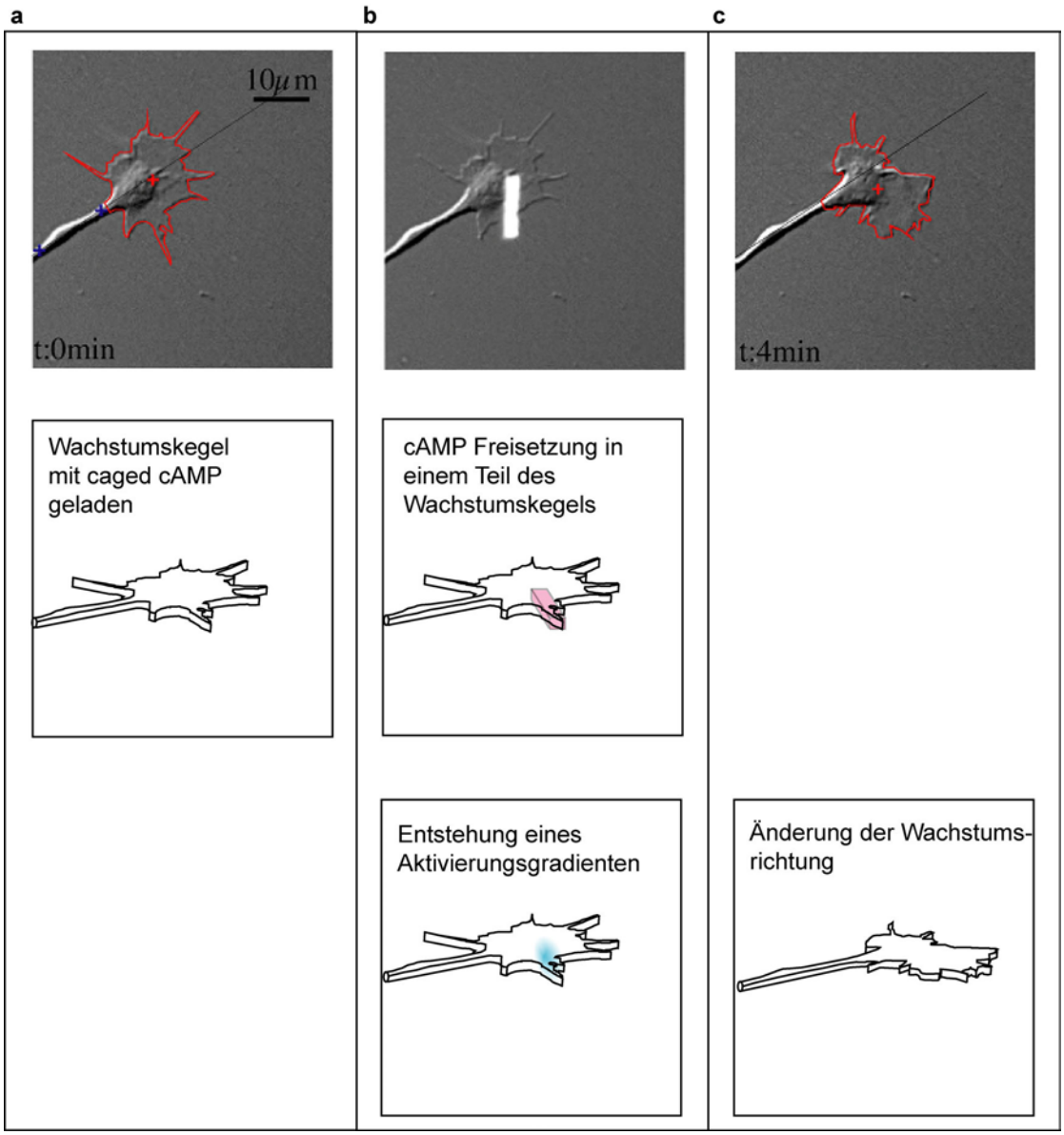


Abbildung 15 Die Durchführung der Orientierungsmessungen. Dargestellt ist eine Messung an einem Wachstumskegels eines sensorischen Neurons und die Hintergrundinformation zu den einzelnen Schritten. **a** Wachstumskegel vor der Stimulation. **b** zeigt den Wachstumskegel von **a** überlagert mit der mit UV-Licht bestrahlten Fläche, in der das cAMP freigesetzt wurde. **c** Wachstumskegel 2 min nach dem Ende der 2 min Stimulation mit 6 mal 13 ms UV-Lichtpulsen. Die roten Linie, das rote Kreuz und die schwarze Linie bezeichnen den Umriss, den Schwerpunkt und die Wachstumsrichtung des Wachstumskegels. Die blauen Kreuze bezeichnen die Punkte an denen die Wachstumsrichtung festgelegt wurde.

Analyse der Orientierungsprozesse

Es wurden differentielle Interferenz Kontrast Bilder nach Normarski aufgenommen um die Orientierungsbewegungen der Wachstumskegel zu beobachten. Die Wachstumsrichtung vor Beginn der Messung wurde durch zwei 5-10 μm voneinander entfernt liegende Punkte, die am Wachstumskegel gelegenen Ende des Neuriten eingezeichnet wurden, bestimmt. Die Wachstumsspuren der untersuchten Neuriten wurden so ausgerichtet, dass sie vom Ursprung des Koordinatensystems starteten und in Richtung der Ordinate wuchsen. Die Position des Wachstumskegels wurde bestimmt, indem der Umriss jedes Wachstumskegels im digitalen Bild nachgezeichnet und der Schwerpunkt des sich ergebenden Polygons bestimmt wurde (siehe Abbildung 16).

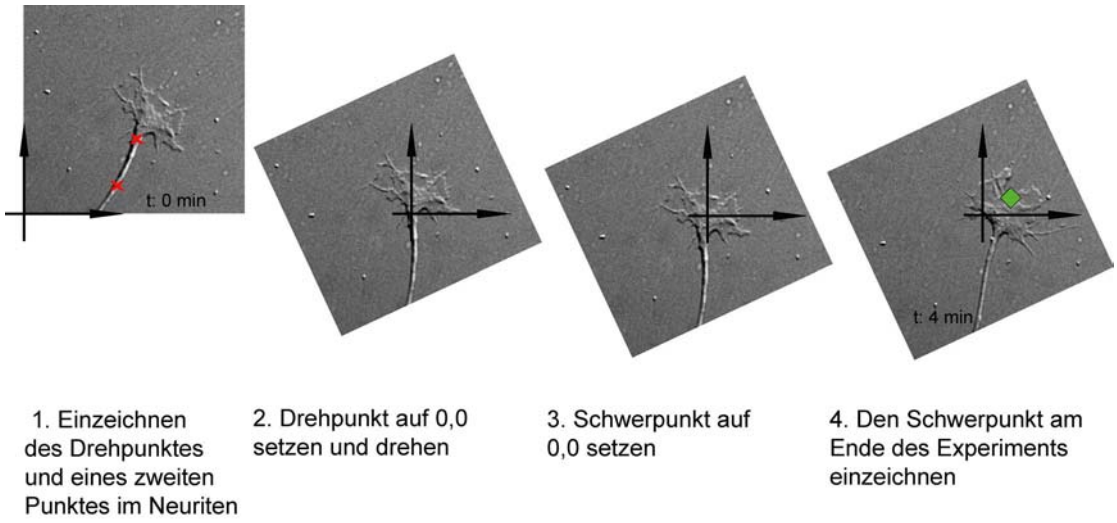


Abbildung 16 Veranschaulichung wie die Orientierungsmessungen ausgewertet wurden in vier Schritten. In den Bildern wurden die benötigten Koordinaten erfasst, anschließend wurden die Messdaten exportiert und mit Hilfe von Excel™ weiterverarbeitet. Die Abbildung veranschaulicht die einzelnen Rechenschritte.

Es wurden nur Wachstumskegel ausgewertet, die innerhalb der 4 min ein positives Wachstum zeigten. Die sogenannten Knickwinkel ergaben sich aus dem Winkel zwischen der Ordinate und einer Linie die durch den Ursprung des Koordinatensystems und dem Endpunkt des Wachstums gelegt wurde. Es wurde festgelegt, dass positive Winkel rechts von der Ordinate liegen und negative auf der linken Seite der Ordinate. Dies bedeutet, dass Wachstumskegel, die in Richtung des Stimulus gewachsen sind, positive Knickwinkel hatten. Für die statistische Auswertung wurden sowohl die Knickwinkel mit dem Mann-Whitney *U* Test getestet als auch die Verteilung der Wachstumskegel auf den beiden Seiten der Ordinate mit der Binomialverteilung verglichen.

Des Weiteren wurden die Knickwinkel der Orientierungsmessungen in einem kumulativen Verteilungsdiagramm dargestellt. Bei dieser Darstellung beziehen sich die Angaben der Ordinate auf den prozentualen Anteil der Wachstumskegel, die einen niedrigeren oder gleichen Knick-winkel haben, als der, der auf der Abszisse angegeben ist. Das bedeutet, wenn viele Wachstumskegel in Richtung des Stimulus geknickt sind, ist die Kurve, die sich darauf bezieht, im Vergleich zu einer Gleichverteilung nach rechts verschoben.

Das Induzieren der Lenkung

Der Lenkungsversuch wurde als eine Art fortgesetzte Orientierung realisiert. Die Zellen wurden hierzu genauso wie bei den zuvor beschriebenen Orientierungsexperimenten mit dem Spalt auf einer Seite des Wachstumskegels belichtet, so dass dort cAMP freigesetzt wurde. Die Wachstumskegel wurden mit 5 Pulsen von je 13 ms Länge, die alle 20 s erfolgten, stimuliert. Um zu garantieren, dass die Zellen über längere Zeiträume trotz des Wachstums optimal stimuliert werden konnten, wurde der Kreuztisch des Mikroskops nach jeweils 5 Pulsen verschoben.

Auf diese Weise wurden die Zellen vier mal mit insgesamt 20 Pulsen stimuliert. Anschließend konnten die Zellen unbeinflusst für 9 min weiterwachsen. Nach dieser Zeit wurden die Zellen, genauso wie oben beschrieben, erneut stimuliert und zwar mit dem Unterschied, dass nun die Seite des Wachstumskegels stimuliert wurde, die vorher unstimuliert war. Die zusammengesetzte Abbildung zu dieser Messung wurde später um diese Verschiebungen des Kreuztisches korrigiert.

Ergebnisse

> As soon as we started programming, we found to our surprise that it wasn't as easy to get programs right as we had thought. Debugging had to be discovered. I can remember the exact instant when I realized that a large part of my life from then on was going to be spent in finding mistakes in my own programs.
>
> Ausspruch zur Entdeckung des Debuggens
> (Maurice Wilkes, Director of the Cambridge Computer Laboratory geboren 1913)

Die Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss cytoplasmatischer cAMP Gradienten auf das Richtungswachstum von neuronalen Wachstumskegeln aus Hühnchen zu untersuchen. Dazu wurde wie im Folgenden beschrieben, vorgegangen. Der Ergebnisteil gliedert sich in folgende Teilbereiche:

- Beschreibung der Methode, mit der es möglich war, verschiedene Freisetzungsmuster für die Stimulation zu generieren und die dabei freigesetzte Menge an cAMP konstant zu halten.
- Überprüfung, ob bei der verwendeten Käfigverbindung ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der applizierten Photonen und der Zahl der photolysierten Moleküle besteht.
- Visualisierung intrazellulärer cAMP Gradienten.
- Untersuchung des Einflusses von verschiedenen cAMP Gradienten auf das Richtungswachstum des Wachstumskegels.

- Experimente, die zeigen, dass die Orientierung durch intrazelluläre cAMP Gradienten auch über längere Strecken möglich ist.
- Theoretische Evaluierung der Auswirkung des cAMP Freisetzungsmusters auf die Gradientenform.

Etablierung der Methode

Einstellung und Messung der Photonenflussdichte

Da die korrekte Messung der Photonenflussdichte eine Voraussetzung ist, um mit unterschiedlichen Stimulationsprotokollen immer die gleiche Menge cAMP freisetzen zu können, wurde eine Methode etabliert um den Photonenfluss zu messen und einzustellen.

Eine Schwierigkeit dabei war, die Photonenflussdichte über drei Größenordnungen hinweg hinreichend genau zu bestimmen. Aus den gewonnenen Daten wurde die Photonenflussdichte von $3{,}69 \times 10^{23}$ Photonen $m^{-2}s^{-1}$ der mit UV-Licht beleuchteten Fläche in der Objektebene berechnet. Die exakte Reduzierung des Lichts war von wesentlicher Bedeutung für die Experimente, denn nur so war zu gewährleisten, dass mit immer der selben Anzahl an Photonen stimuliert wurde.

Wenn man davon ausgeht, dass der Extinktionskoeffizient von NPE-caged cAMP $\varepsilon = 500\ cm^{-1}M^{-1}$ bei 347 nm ist und die Quanteneffizienz der Photoreaktion 0,39 beträgt (McCray und Trentham 1989), dann kann man daraus ableiten, dass ein 13 ms Puls mit voller Intensität

(3,69x10^{23} Photonen $m^{-2}s^{-1}$) etwa 35,8 % der NPE-caged cAMP Menge spaltet. Bei 50 µM Ausgangskonzentration führte das zu einer Endkonzentration von 17,9 µM in der bestrahlten Region, wenn man die Diffusion vernachlässigt und davon ausgeht, dass die intrazelluläre NPE-caged cAMP Konzentration der des umgebenden Mediums entsprach. Dieser Wert ist eine obere Grenze, da der Absorptionsquerschnitt des caged cAMP unter den experimentellen Bedingungen kleiner war. Das lag zum einen daran, dass der größte Anteil des UV-Lichts aufgrund der Spektrallinie der Quecksilberlampe eine Wellenlänge von 365 nm hatte und zum anderen an der Charakteristik des verwendeten Filters (SP410), der Licht zwischen 305 nm und 410 nm durchlässt.

Zusammenhang zwischen der Anzahl der UV-Licht Photonen und photolysierten NPE-caged cAMP

Als nächstes war es notwendig sicherzustellen, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl der applizierten UV-Licht Photonen und der Anzahl der freigesetzten Moleküle gibt. Als Testsystem für die photolytische Freisetzung von cAMP wurden elektrische Messungen an HeLa Zellen durchgeführt, die mit cAMP sensitiven Kanälen (CNG) transfiziert waren.

Der CNG-Kanal ist ein nichtselektiver Kationenkanal und wird durch cAMP Bindung geöffnet (Altenhofen et al. 1991). Diese Zelllinie war von Peter Bedner hergestellt und freundlicherweise von Prof. Klaus Willeke zur Verfügung gestellt worden. Peter Bedner hat die elektrischen Messungen durchgeführt und die Ergebnisse zur Auswertung weitergegeben. Sie sollen

hier der Vollständigkeit halber und zum besseren Verständnis vorgestellt werden. Für die beiden Substanzen 8-Br-cGMP und 8-Br-cAMP, mit jeweils der Käfiggruppe 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl und der NPE-Käfiggruppe versehen, ist ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl von UV-Licht Photonen und der Anzahl der freigesetzten Moleküle gezeigt worden (Hagen et al. 1998, Hagen et al. 1996, Kaupp et al. 1998). Dieser Nachweis fehlte noch für das in dieser Arbeit verwendeten NPE-caged cAMP.

Um die Mengen an cAMP zu bestimmen, die durch UV-Licht freigesetzt werden, wurden die CNG transfizierten HeLa Zellen elektrisch vermessen. Die cAMP Konzentration konnte bestimmt werden, da der gemessene Ganzzellstrom, in Abhängigkeit von der Dosiswirkungskurve des CNG-Kanals, mit der freigesetzten cAMP Konzentration korreliert.

Die Experimente zeigen die Stromantwort der CNG-Kanäle als Reaktion auf die Freisetzung von caged cAMP durch 9 aufeinanderfolgende UV-Licht Pulse von 2 ms Länge. Die Form der Lichttitrationskurve gleicht der von Hagen et al. (1996, 1998) publizierten Lichttitrationskurve, die den Effekt der Photolyse von caged Nukleotiden in Zellen die CNG-Kanäle exprimieren darstellt. Die Gleichheit der beiden Kurven ist ein starkes Indiz dafür, dass der lineare Zusammenhang zwischen der Anzahl der UV-Licht Photonen und photolysierten NPE-caged 8-Br-cAMP auch für NPE-caged cAMP gilt. Die unterschiedlichen Amplituden der Stromstufen korrelieren mit der Dosiswirkungskurve des CNG-Kanals. Daher lässt sich eine Hill Kurve an die Amplituden anpassen. Die Werte der angepassten Kurve

stimmen im Rahmen der zu erwartenden Genauigkeit mit den Parametern der publizierten Dosiswirkungskurve des CNG-Kanals überein (siehe Abbildung 17).

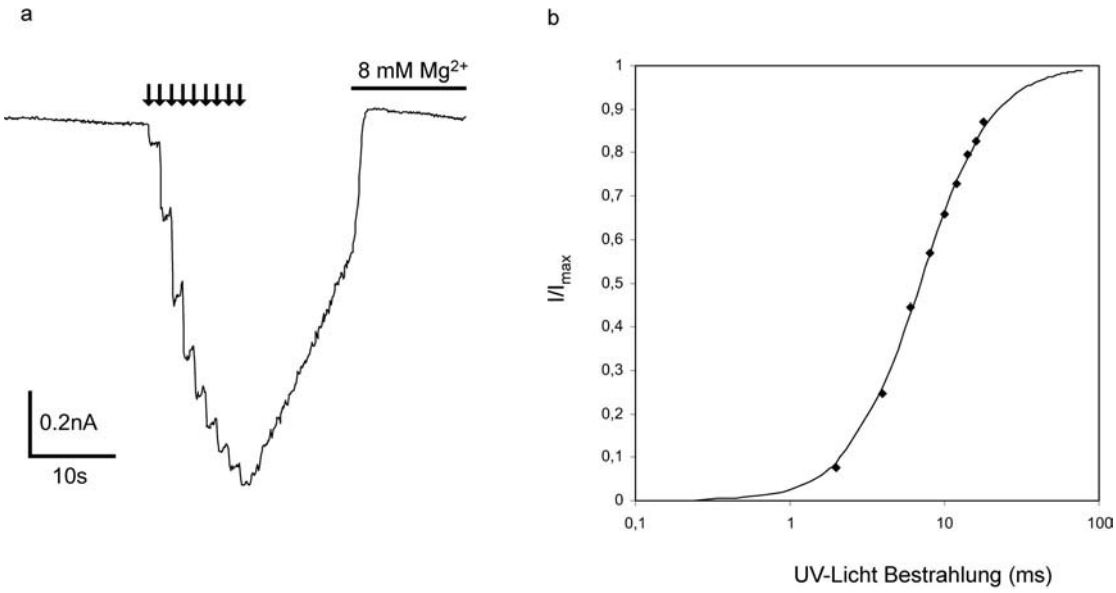


Abbildung 17 Der Zusammenhang zwischen der UV-Licht Menge und der Menge des photolysierten caged cAMP. Durch das freigesetzte cAMP wurden Ströme in HeLa Zellen, die CNG-Kanäle exprimierten induziert. Die Zellen waren mit caged cAMP geladen. Die Messungen wurden mit einem switched single-electrode voltage clamp Verstärker im Ganzzell-Modus durchgeführt. **a** zeigt die Stromantworten einer HeLa Zelle auf 9 aufeinanderfolgende UV-Lichtpulse von jeweils 2 ms Länge. Der Balken in **a** korrespondiert zu der Gabe von Mg^{2+}, welches den CNG-Kanal blockiert. Die Amplituden der Einwärtsstromstufen spiegeln die Dosis-Wirkungskurve des CNG-Kanals wider. **b** zeigt eine Anpassung der Hill Funktion an die Daten, wobei sich ein hohes Maß an Übereinstimmung ergab ($R^2 > 0.998$). Der Hill Koeffizient der Anpassung (n = 1.88) stimmt weitestgehend mit den veröffentlichen Werten des Kanals überein (n = 1,51± 0,37; Altenhofen et al. 1991). Die anderen Parameter der Anpassung waren $K_{1/2}$ = 6,96 ms UV-Licht und der maximal Strom I_{max} = 1330 pA.

Die Abbildung der cAMP Gradienten in HeLa Zellen

Im Folgenden soll gezeigt werden, dass sich cAMP Gradienten intrazellulär erzeugen lassen, und dass das Zeitmuster der Freisetzung die Gradientenform mitbestimmt.

Die Effizienz und die räumliche Verteilung der photolytischen cAMP Freisetzung wurde in den oben beschriebenen HeLa Zellen, die cAMP sensitive CNG-Kanäle exprimieren, untersucht. Die Calciumleitfähigkeit dieser Kanäle nach intrazellulärer Bindung von cAMP wurde genutzt, um mit Hilfe von eines Ca^{2+} Fluoreszensfarbstoffs (Fluo-4) den räumlichen wie den zeitlichen Verlauf der Ausbreitung des freigesetzten cAMP zu untersuchen.

Das UV-Licht einer Hg-Lampe wurde auf eine rechteckige Fläche in der Objektebene fokussiert um die Freisetzung räumlich zu begrenzen. Für die Messungen waren die HeLa Zellen so platziert, dass die mit UV-Licht bestrahlte Region nur einen Teil der mit caged cAMP geladen Zelle traf. So wurde nur an einem Ende der Zelle cAMP freigesetzt. Ein Verschluss steuerte die Zeit, in der die Zellen mit UV-Licht bestrahlt wurden. In 8 von 9 Zellen war nach einem 78 ms UV-Lichtpuls ein intrazellulärer Ca^{2+} Gradient nachweisbar.

Um zu zeigen, dass das Freisetzungsmuster den Gradienten verändert, wurde anschließend anstelle des 78 ms Puls mit 2 min kontinuierlichem

Licht stimuliert. Hierzu war es nötig, die Lampe um den Faktor 2 min/78ms=1538 zu dimmen, um in beiden Fällen die gleiche Menge an cAMP freizusetzen. Dies war möglich, da – wie oben gezeigt – ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der UV-Licht Photonen und der Menge freigesetztem cAMPs besteht. Mit dem 2 min Stimulus wurde in 3 von 9 Zellen kein Calciumanstieg nachgewiesen, während in 6 von 9 Zellen ein gleichförmig verteilter Calciumanstieg zu beobachten war. Offensichtlich konnten nur im Falle des 78 ms Stimulus intrazelluläre Ca^{2+} Gradienten gemessen werden. Im Falle des 2 min Stimulus ist in keinem Fall während oder nach dem Stimulus ein Gradient nachgewiesen worden. Die Messungen der beiden unterschiedlichen Stimuli wurden jeweils an der selben Zelle durchgeführt um Zell zu Zell Variationen bei den einzelnen Messungen zu vermeiden (siehe Abbildung 18). Die Heterogenität der Antwort im Falle des 2 min Stimulus liegt wahrscheinlich an dem Erreichen oder Nicht-Erreichen von Aktivierungsschwellen des CNG-Kanals in unterschiedlichen Zellen.

Auf diese Weise ließ sich das raum-zeitliche Ausbreiten des Ca^{2+}-Transienten, der durch das cAMP ausgelöst wurde, verfolgen. Die Ergebnisse zeigen, dass cAMP Gradienten erzeugt werden können, und dass das Freisetzungsmuster einen Einfluss auf die Form des Gradienten hat.

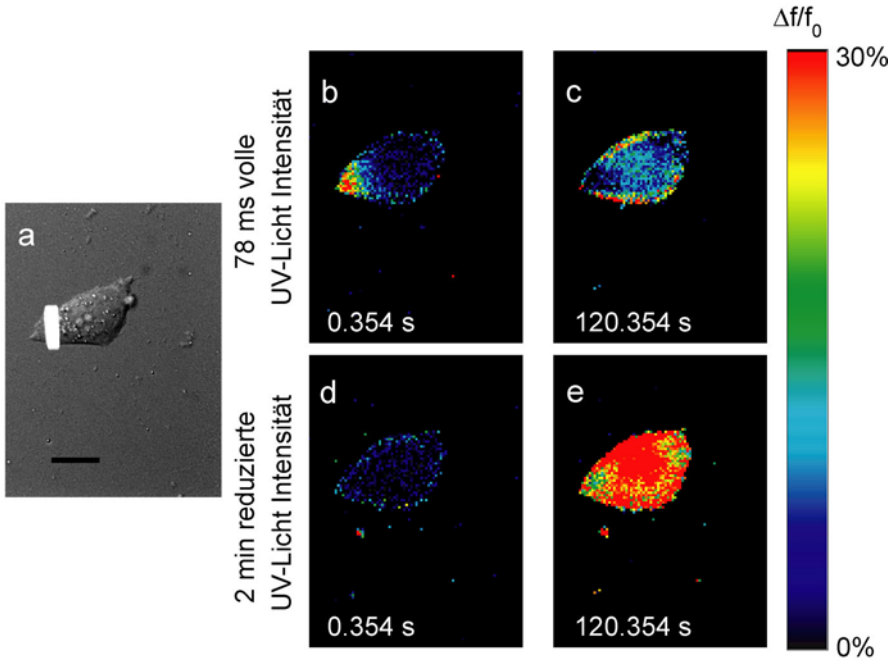


Abbildung 18 Darstellung von cAMP Gradienten in HeLa Zellen. HeLa Zellen, die CNG-Kanäle exprimieren waren mit Fluo-4 und caged cAMP geladen. Lokale Photolyse von caged cAMP erzeugte cytoplasmatische cAMP Gradienten. Durch Bindung des cAMP an den CNG-Kanälen wurde ein Ca^{2+}-Einstrom ausgelöst, der sich mit Hilfe des Fuoreszenzfarbstoffes Fluo-4 nachweisen ließ. **a** zeigt eine Überlagerung der untersuchten Zelle mit dem mit UV-Licht bestrahlten Bereich, in dem cAMP freigesetzt wurde. **b** und **c** zeigen die räumliche Verteilung des Ca^{2+} in der selben Zelle. Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf den Beginn der cAMP-Freisetzung mit einem 78 ms UV-Lichtpuls. **d** und **e** nach einer Pause von 10 min wurde die selbe Zelle mit 2 min kontinuierlicher Freisetzung stimuliert. Dargestellt sind die Bilder zu den Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation. Es wurde für **d** und **e** die Lichtintensität reduziert, um in beiden Fällen die gleiche Menge an cAMP freizusetzen. Der Balken in **a** entspricht 10 µm.

Der Einfluss der raum-zeitlichen Eigenschaften der cAMP Gradienten auf das Wachstumsverhalten der Neurone

Um den Effekt von intrazellulären cAMP Gradienten auf neuronale Wachstumskegel zu untersuchen, wurden Explantatkulturen der Hinterwurzelganglien von Hühnchen verwendet. Die intrazelluären cAMP Gradienten wurden – ähnlich wie bei den vorher beschriebenen HeLa Experimenten – erzeugt, indem UV-Licht auf eine Seite eines Wachstumskegels fokussiert wurde. Das UV-Licht spaltete dann lokal die Käfigverbindung NPE-caged cAMP und setzte cAMP frei. Ein Problem bei diesen relativ aufwendigen Messungen war es Bedingungen zu finden, bei denen die Wachstumskegel reagierten. Ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer Methode, mit der sich die relativ kleinen Richtungsänderungen der Wachstumskegel frei von Beeinflussung durch den Experimentator reproduzierbar messen lassen. Hierzu wurde der Umriss der Wachstumskegel im digitalen Bild am Anfang und am Ende jeder Messung umrandet und der Schwerpunkt des daraus resultierenden Polygons bestimmt. Die Orientierung konnte so durch die Verlagerung des Schwerpunktes bestimmt werden. Die weitere Auswertung dieser Messdaten erfolgte in Analogie zu publizierten Arbeiten (siehe Material und Methoden und vergleiche: Lohof et al. 1992).

Die gepulste Freisetzung

Es sollte untersucht werden, ob das Zeitmuster der Freisetzung einen Effekt auf das Richtungswachstum des Wachstumskegels hat. Während eines Zeitraumes von 2 min ist das Vorwärtswachstum des Wachstumskegels gering genug, so dass man den Freisetzungsort des cAMP nicht nachjustieren muss. Die Messung kann dadurch unabhängig von der Beeinflussung durch den Experimentator durchgeführt werden. Nach weiteren 2 min des Weiterwachsens ohne Stimulierung wurde die Ausrichtung des Wachstumskegels gemessen.

Gepulste Freisetzung wurde realisiert, indem die cAMP Käfigverbindung mit 6 mal 13 ms langen Lichtpulsen, die gleichmäßig über 2 min verteilt waren, also alle 20 s freigesetzt wurde. Mit dieser gepulsten Freisetzung konnte ein signifikantes Hinwenden von Wachstumskegeln, die mit der Käfigverbindung geladen waren, in die Richtung der stimulierten Kegel-seite festgestellt werden. Der durchschnittliche Knickwinkel unter diesen Bedingungen betrug 25,0° ± 7,1° (Standardfehler des Mittelwertes) bei einem Stichprobenumfang von 21 Wachstumskegeln (siehe Abbildung 19).

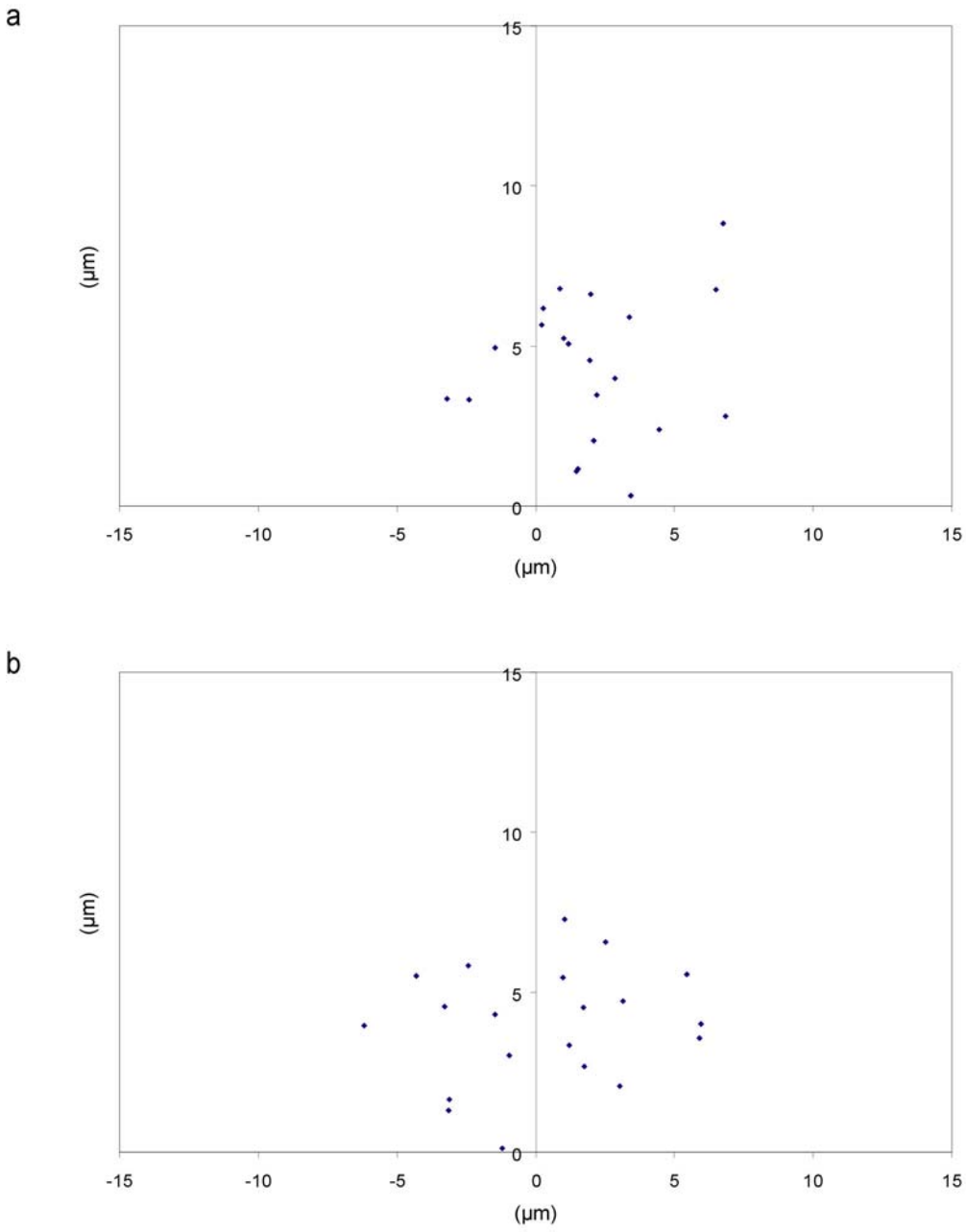


Abbildung 19 Induktion der Orientierungsreaktion in Wachstumskegeln mit 6 mal 13 ms cAMP-Freisetzungs-Pulsen. Dargestellt sind die Schwerpunkte der Wachstumskegel als Punktwolke in einem Kartesischen Koordinatensystem, 2 min nach Ende der 2 min andauernden Stimulationsperiode. Das Wachstum begann im Ursprung und ging in Richtung der Ordinate. **a** Stimulation durch Freisetzung von cAMP mit 6 mal 13 ms UV-Licht Pulsen aus der entsprechenden Käfigverbindung. **b** zeigt die Kontrolle mit dem selben Stimulationsmuster ohne caged cAMP. Die Überwiegende Mehrzahl der Wachstumskegel in **a** haben sich in Richtung der stimulierten Seite bewegt. Der Unterschied ist signifikant (siehe Tabelle 1).

Die kontinuierliche Freisetzung

Anschließend wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz der Effekt von kontinuierlicher Freisetzung des cAMP auf die Orientierungsreaktion der Wachstumskegel untersucht. Kontinuierliche Freisetzung von cAMP wurde dadurch erreicht, dass über die 2 min Stimulusdauer ununterbrochen cAMP mittels UV-Licht freigesetzt wurde. Um sicher zu stellen, dass mit dem zuvor beschriebenen und diesem Stimulusprotokoll die gleiche Menge an cAMP freigesetzt wurde, musste die Lichtquelle, also die Photonenflussdichte, im Falle der kontinuierlichen Freisetzung, um den Faktor 1538 reduziert werden. Dieser Faktor ergab sich aus dem Verhältnis zwischen 2 min und 6 mal 13 ms.

Bei Stimulierung der Wachstumskegel mit kontinuierlicher cAMP Freisetzung konnte überraschenderweise keine signifikante Richtungsantwort beobachtet werden, obwohl im selben Zeitraum mit der selben Menge cAMP stimuliert wurde. Der durchschnittliche Knickwinkel unter diesen Bedingungen betrug -4,6° ± 6,7° (Standardfehler des Mittelwertes) bei einem Stichprobenumfang von 24 Wachstumskegeln (siehe Abbildung 20).

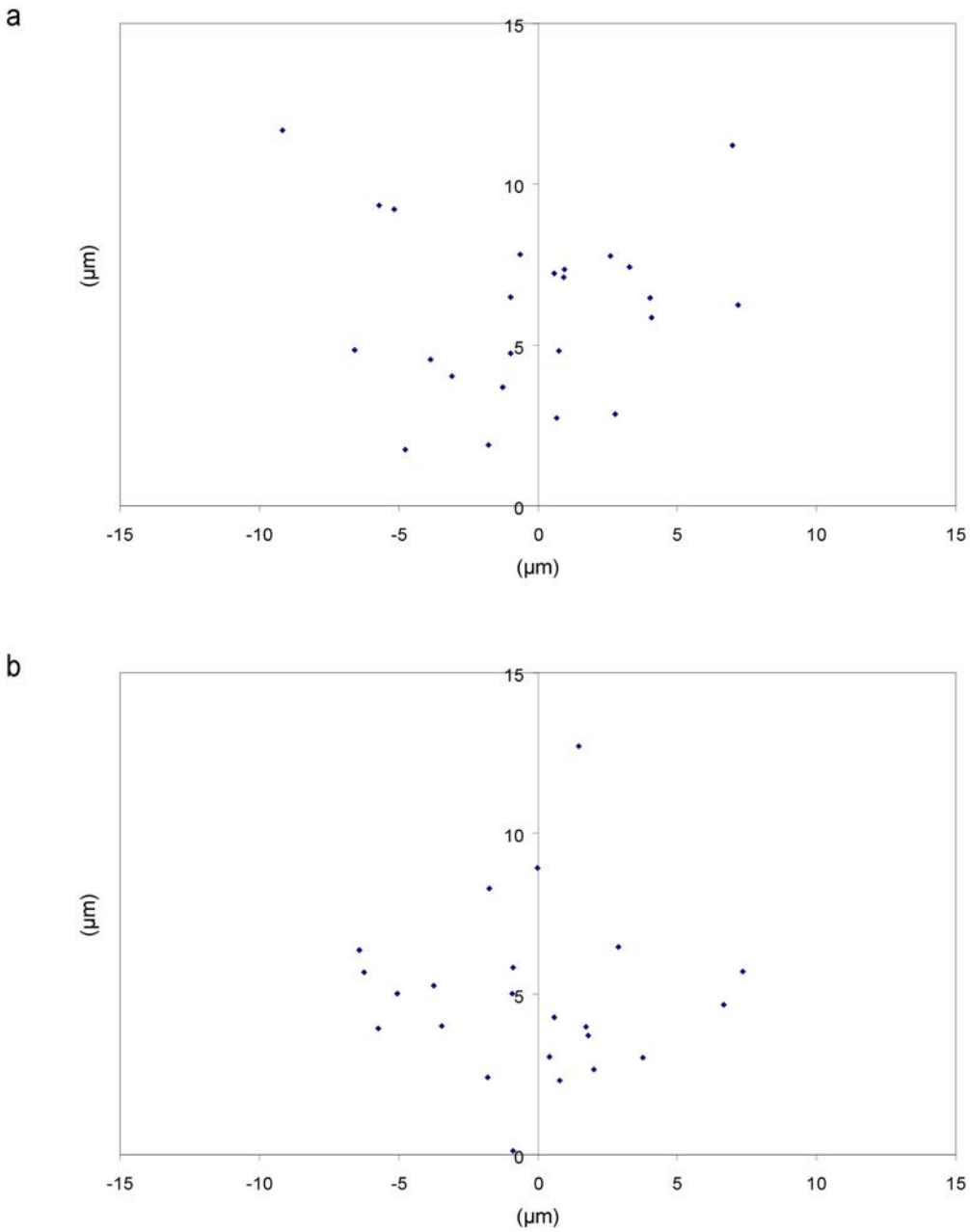


Abbildung 20 Stimulation der Wachstumskegel mit der gleichen Menge cAMP, wobei kontinuierlich mit geringerer Freisetzungsrate stimuliert wurde. Die Art der Darstellung entspricht Abbildung 19. **a** zeigt die Stimulation durch kontinuierliche cAMP Freisetzung über 2 min. Der Unterschied zur Abbildung 19 besteht nur im Zeitmuster, in dem stimuliert wurde. Die Intensität der Lampe war hierbei um den Faktor 1/1538 reduziert, um mit der selben Menge cAMP zu stimulieren wie in Abbildung 19. **b** zeigt die Kontrolle dazu ohne caged cAMP. Die Verteilungen der Wachstumskegel in **a** und **b** unterscheiden sich nicht signifikant.

Die 44 mal 1,8 ms Pulse

In einer weiteren Versuchsreihe sollte ein Pulsprotokoll verwendet werden, das zwar ebenfalls aus Pulsen aufgebaut ist, sich aber im Zeitmuster der Verteilung mehr dem Fall der kontinuierlichen Freisetzung annähert. Dazu diente ein Stimulationsprotokoll mit 44 Pulsen von je 1,8 ms Dauer. Diese 44 Pulse wurden wie bei den anderen Stimulations-protokollen während einer Stimulationsdauer von 2 min appliziert. Das UV-Licht der Lampe wurde hierfür mit voller Intensität genutzt, so dass wieder in etwa die selbe Menge Photonen, wie in den beiden vorhergehenden Versuchen appliziert wurde. Der durchschnittliche Knickwinkel unter diesen Bedingungen betrug 9,5° ± 8° (Standardfehler des Mittelwertes) bei einem Stichprobenumfang von 20 Wachstumskegeln (siehe Abbildung 21).

Diese 44 Pulse induzierten, verglichen mit der Kontrolle, ebenfalls keine signifikante Richtungsantwort der Wachstumskegel. Mit diesem Experi-ment konnte ausgeschlossen werden, dass der Unterschied zwischen gepulster und kontinuierlicher Freisetzung nur auf einen Effekt des Dimmens der Lampe, also der Photonenflussdichte zurückgeht, da sowohl die 44 mal 1,8 ms als auch die 6 mal 13 ms Pulse bei voller Intensität gemessen wurden, die Orientierungsreaktionen sich dennoch signifikant unterscheiden. Dies unterstreicht die Bedeutung der raum-zeitlichen cAMP Freisetzung für die Wachstumskegelorientierung.

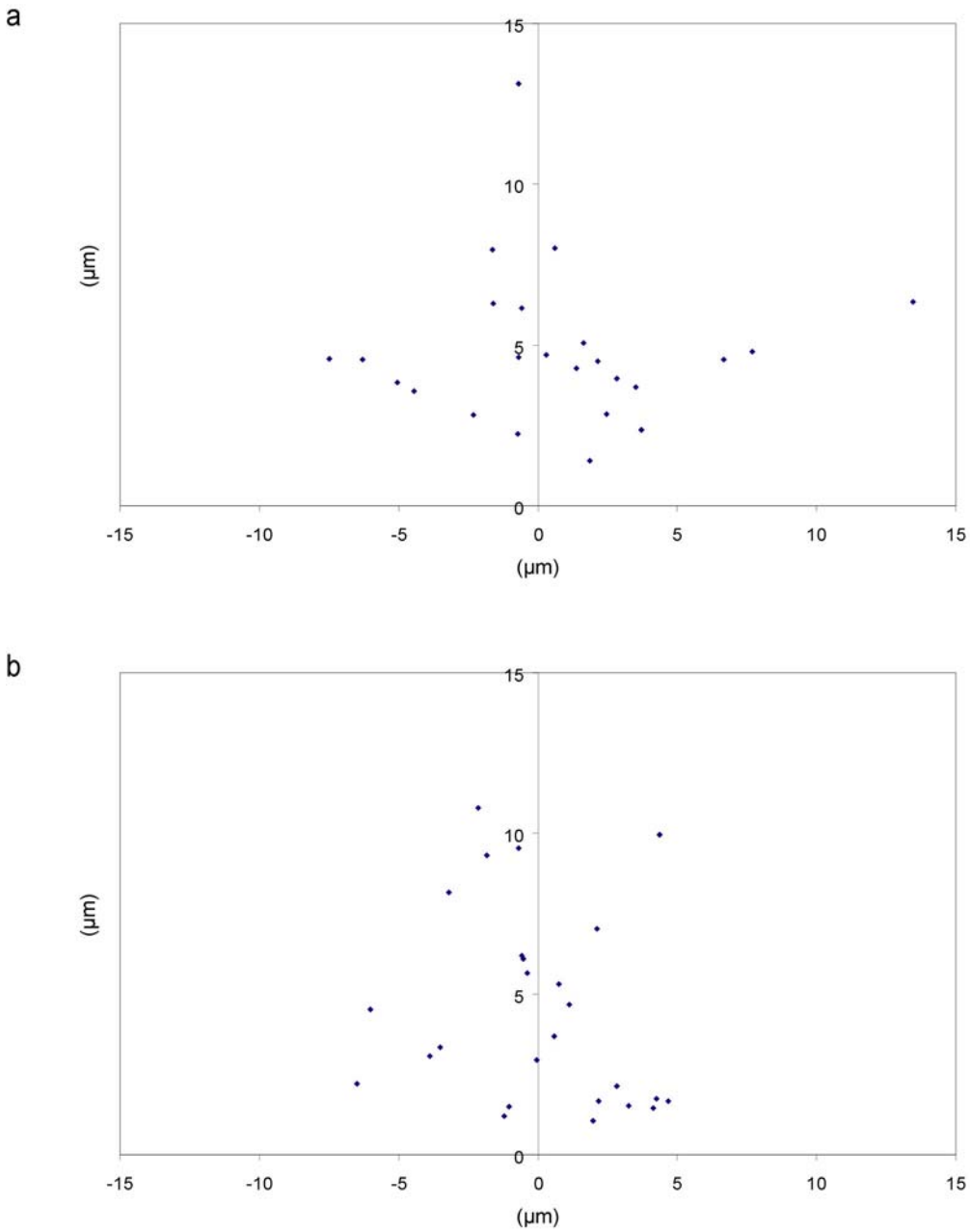


Abbildung 21 Stimulation der Wachstumskegel mit der gleichen Menge cAMP in 44 mal 1,8 ms Pulsen. Die Art der Darstellung entspricht Abbildung 19. Wie in der vorhergehenden Abbildung besteht der einzige Unterschied zur Abbildung 19 im Stimulationsmuster. Es wurde hier ein Zeitmuster gewählt, das der kontinuierlichen Freisetzung ähnlich ist, aber keine Reduktion der Lichtintensität erfordert. **a** zeigt die Stimulation durch 44 mal 1,8 ms Pulse bei voller Intensität der UV-Lichtquelle. **b** gibt die Kontrolle dazu ohne caged cAMP wieder. Die Verteilungen der Wachstumskegel in **a** und **b** unterscheiden sich nicht signifikant.

Vergleich von gepulster und kontinuierlicher Freisetzung

Der Unterschied zwischen dem Effekt der 6 mal 13 ms Pulse und der kontinuierlicher Freisetzung (siehe Abbildung 22) war mit einem p-Wert von 0,0037 (Mann-Whitney *U* Test) signifikant. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass, obwohl in beiden Fällen die gleiche Menge cAMP freigesetzt worden ist, unterschiedliche Orientierungsantworten ausgelöst wurden. Daraus muss geschlossen werden, dass die raum-zeitliche Veränderung der cAMP-Gabe den Unterschied ausgemacht hat und sich sowohl die intrazelluläre Verteilung des cAMP als auch die Aktivierung der in der Signalkette nachgeschalteten Moleküle unterscheiden.

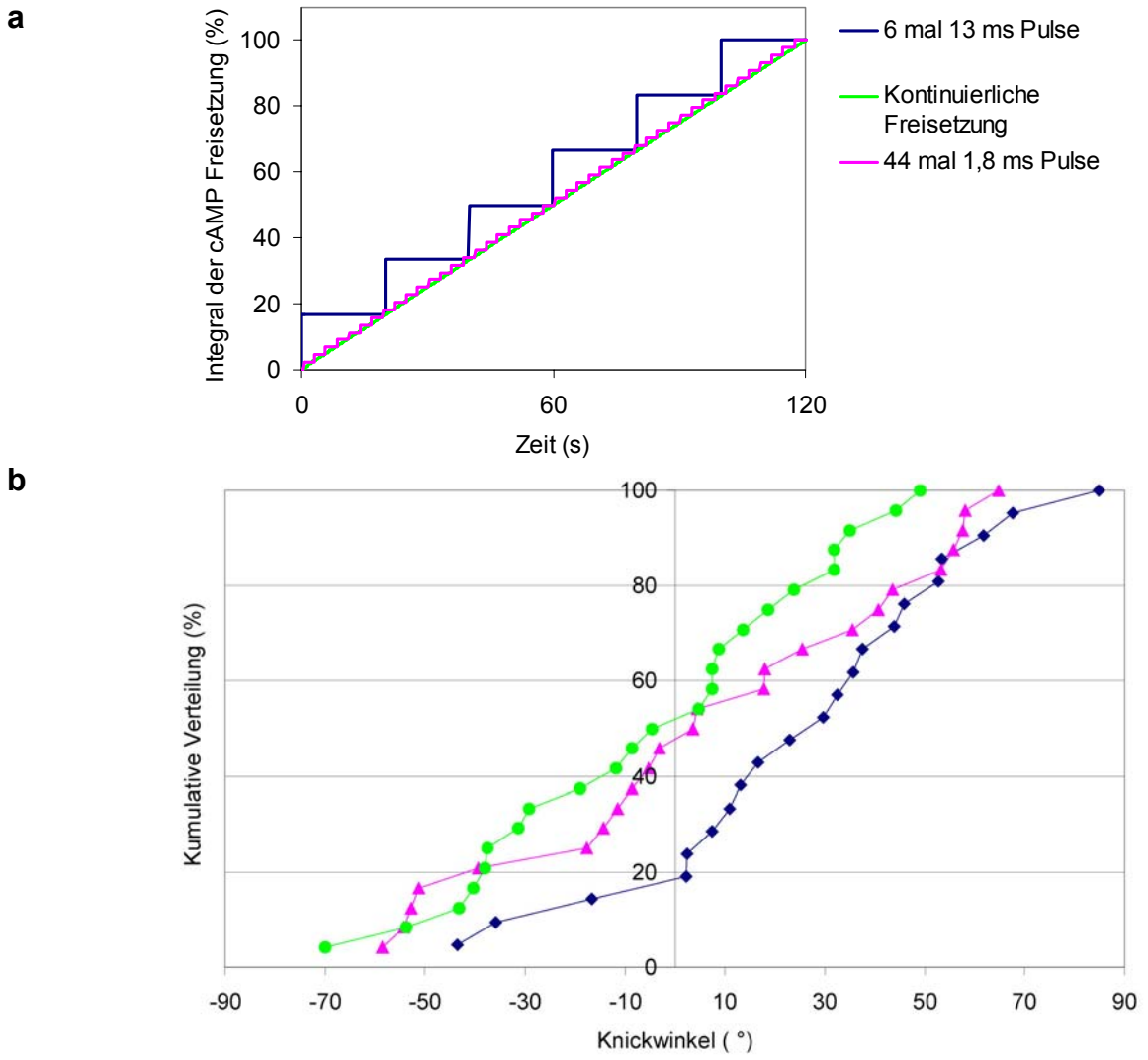


Abbildung 22 cAMP Freisetzung in verschiedenen zeitlichen Mustern und die dazugehörigen Orientierungsreaktionen. **a** zeigt die Integrale der cAMP Freisetzung während der Stimulationszeit. Alle Freisetzungsmuster setzen die gleiche Menge cAMP frei. Der Konzentrationsverlauf in den Wachstumskegeln wird aber durch Diffusion und Abbauprozesse beeinflusst. **b** verglichen wird der Winkel der Orientierungsreaktion der Wachstumskegel nach gepulster cAMP Freisetzung mit 6 mal 13 ms UV-Licht Pulsen (blaue Rauten) mit cAMP Freisetzung in kurzen Pulsen (44 mal 1,8 ms UV-Licht Pulse; violette Dreiecke) und kontinuierlicher Freisetzung über 2 min mit reduziertem UV-Licht (grüne Kreise). Die Liniendiagramme zeigen die kumulative Verteilung der Knickwinkel. Die Werte auf der Ordinate beziehen sich auf den Prozentsatz der Wachstumskegel, die einen Knickwinkel haben, der kleiner oder gleich dem Winkel auf der Abszisse ist. Die Kurve der Stimulierung mit 6 mal 13 ms UV-Licht Pulsen ist gegenüber den anderen, aufgrund des vermehrten Hinwendens der Wachstumskegel in Richtung des Stimulus, nach rechts verschoben.

Die Verwendung von KT5720

Um zu überprüfen, ob die Richtungsantwort tatsächlich auf cAMP zurückzuführen ist, wurden die Wachstumskegel in Anwesenheit des Protein Kinase A (PKA) Inhibitors KT5720 (Kase et al. 1987) mit 6 mal 13 ms Pulsen innerhalb von 2 min stimuliert. Der Inhibitor wurde ausgewählt, weil die PKA ein sehr wahrscheinliches Ziel des cAMP ist und dieser Inhibitor in anderen Studien, die sich mit der Orientierung von Wachstumskegeln beschäftigten, erfolgreichen Einsatz fand (Song et al. 1997). Es wurden 200 nM KT5720 in das Medium gegeben. Nach 40 min Inkubationszeit konnte keine signifikante Reaktion der Wachstumskegel nach Freisetzten von cAMP mit 6 mal 13 ms Pulsen innerhalb von 2 min (dem effektiven Stimulusprotokoll) festgestellt werden (Mann-Whitney *U* Test, $p = 0{,}0062$) . Der durchschnittliche Knickwinkel unter diesen Bedingungen betrug $-2{,}4° \pm 7{,}6°$ (Standardfehler des Mittelwertes) bei einem Stichprobenumfang von 24 Wachstumskegeln (siehe Abbildung 23).

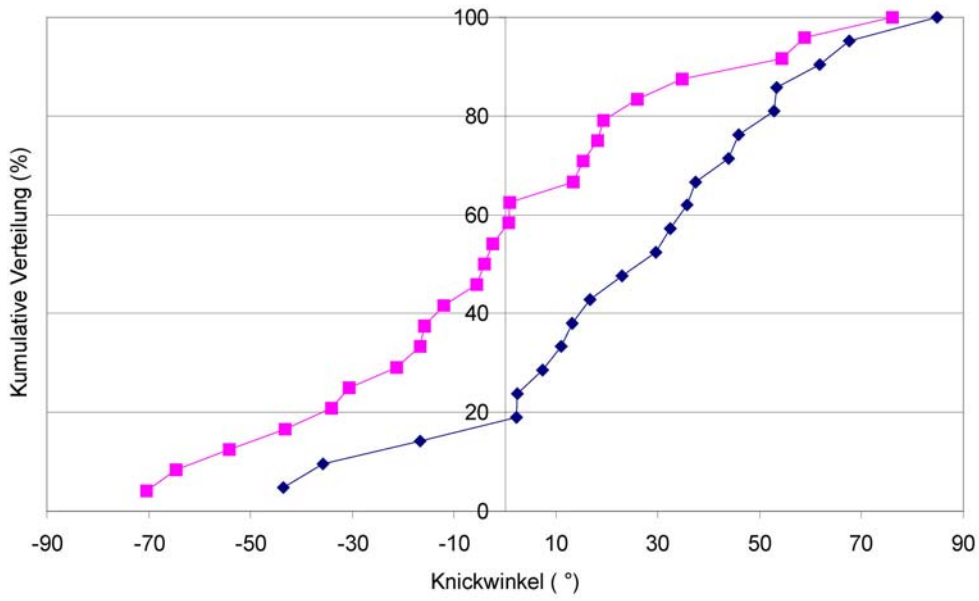


Abbildung 23 Der Einfluss von KT5720 auf die Orientierungsreaktion der Wachstumskegel. Verglichen wird der Winkel der Orientierungsreaktion der Wachstumskegel nach Freisetzung von cAMP mit 6 mal 13 ms UV-Licht Pulsen (blaue Rauten) mit der gleichen Stimulation in Anwesenheit von 200 nM des PKA Blockers KT5720 (magentafarbene Quadrate). Die Art der Darstellung entspricht Abbildung 22 **b**.
KT5720 blockt die Orientierungsreaktion.

Der Einsatz von Rp-cAMPS

In einer weiteren Versuchreihe wurde die Auswirkung von verschiedenen Konzentrationen eines kompetitiven cAMP Antagonisten untersucht. Bei Zellen, die mit 6 mal 13 ms Pulsen innerhalb von 2 min stimuliert wurden, konnte bei Zugabe von 20 µM Rp-cAMPS (Rothermel und Parker Botelho 1988) gezeigt werden, dass die Orientierungsreaktion nicht geblockt wird. Der durchschnittliche Knickwinkel unter diesen Bedingungen betrug 22° ± 6,2° (Standardfehler des Mittelwertes) bei einem Stichprobenumfang von 25 Wachstumskegeln. 100 µM Rp-cAMPS hingegen blockten die Orientierungsreaktion bei gleichem Stimulus. Der durchschnittliche Knickwinkel unter diesen Bedingungen betrug 3° ± 8,4° (Standardfehler des Mittelwertes) bei einem Stichprobenumfang von 17 Wachstumskegeln (siehe Abbildung 24).

Die Orientierungsreaktion dieses Experiments unterscheidet sich signifikant vom dem Ergebnis der Messung ohne Rp-cAMPS (Mann-Whitney *U* Test, p = 0,032). Die Tatsache, dass nur hohe Konzentrationen des Blockers einen Effekt haben ist nicht überraschend, da es sich, wie bereits erwähnt, um einen kompetetiven Inhibitor handelt. Am Freisetzungsort stehen etwa 17,9 µM cAMP (siehe oben) den 20 µM Rp-cAMPS gegenüber, die obendrein eine geringere Affinität zur PKA haben als das cAMP (Botelho et al. 1988, Rothermel und Parker Botelho 1988). Dass trotz des Einsatzes von 20 µM Rp-cAMPS so eine starke Orientierungsreaktion stattfindet, deutet darauf hin, dass die Gradientensteilheit und nicht die Maximalkonzentrationen am

Freisetzungsort eine Rolle spielt (siehe Diskussion: Gradientensteilheit oder lokale Spitzenkonzentration).

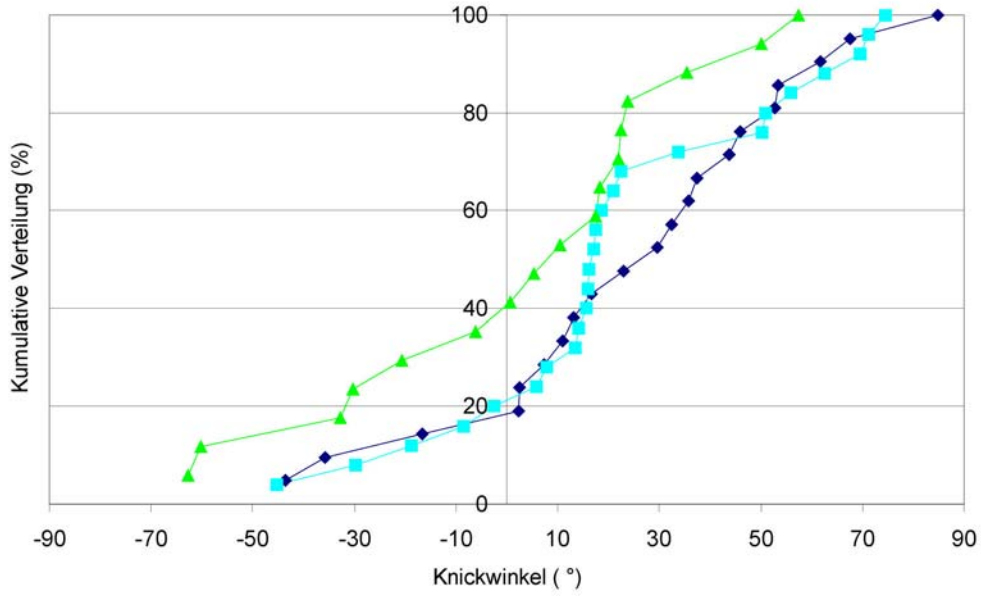


Abbildung 24 Der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Rp-cAMPS auf die Orientierungsreaktion der Wachstumskegel. Verglichen wird der Winkel der Orientierungsreaktion der Wachstumskegel nach Freisetzung von cAMP mit 6 mal 13 ms UV-Licht Pulsen (blaue Rauten) mit der gleichen Stimulation in Anwesenheit von 20 µM (türkisfarbene Quadrate) und 100 µM (grüne Dreiecke) des cAMP Analoges RP-cAMPS. Die Art der Darstellung entspricht Abbildung 22 **b**.
Während 100 µM Rp-cAMPS die Orientierungsreaktion blocken, sind 20 µM Rp-cAMPS ohne signifikanten Effekt.

Die Aktivierung der 44 mal 1,8 ms Pulse

Wie beschrieben, führt die Stimulation mit 44 mal 1,8 ms Pulsen zu keiner signifikannten Orientierung der Wachstumskegel. Eine Interpretation, warum die 44 mal 1,8 ms Pulse unwirksam sind, geht dahin, dass durch diese Stimulation ein flacherer Gradient erzeugt wurde als durch die 6 mal 13 ms Pulse. Die Eigenschaften des kompetitiven Inhibitors Rp-cAMPS wurden für folgenden Versuch genützt: Wachstumskegel in Anwesenheit von 20 µM Rp-cAMPS und 50 µM caged

cAMP (wie in den vorangegangenen Experimenten) wurden mit 44 mal 1,8 ms Pulsen innerhalb von 2 min stimuliert und nach weiteren 2 min vermessen. Es konnte eine Bewegung der Wachstumskegel in Richtung der Freisetzung festgestellt werden. Der durchschnittliche Knickwinkel unter diesen Bedingungen betrug 17,9 ± 6,9° (Standardfehler des Mittelwertes) bei einem Stichprobenumfang von 23 Wachstumskegeln (siehe Abbildung 25). Die Verteilung der Wachstumskegel zwischen stimulierter und nicht-stimulierter Seite unterschied sich nicht mehr signifikant von den 6 mal 13 ms Pulsen und war auch unter Annahme einer Gleichverteilung als Kontrolle beim Test auf Binomialverteilung signifikant (zum Vergleich des Tests auf Binomialverteilung mit dem Mann-Whitney *U* Test siehe Diskussion: Bewertung der Messungen durch die Statistik).

Dieses überraschende Ergebnis, dass ein unwirksames Stimulationsmuster durch die Anwesenheit eines kompetitiven Blockers in ein wirksames verwandelt wurde, kann dadurch erklärt werden, dass das Rp-cAMPS, welches mit cAMP um die Bindung an der PKA konkurriert auch gleichzeitig den Aktivierungsgradienten der PKA vergrößert. Durch die generelle Herabsetzung der Bindungswahrscheinlichkeit des cAMP an der PKA wird der relative Konzentrationsunterschied der aktivierten PKA Moleküle über den Wachstumskegel vergrößert und so eine Richtungsantwort ausgelöst. Dieser durch Rp-cAMPS „verschärfte“ Gradient macht aus den 44 mal 1,8 ms Pulsen ein orientierendes Stimulationsprotokoll. Dies ist aber auch ein Hinweis darauf, dass nicht die Maximalkonzentration von ausschlag-gebender Bedeutung ist, sondern die Steilheit des Gradienten über die Reaktion des Wachstumskegels entscheidet.

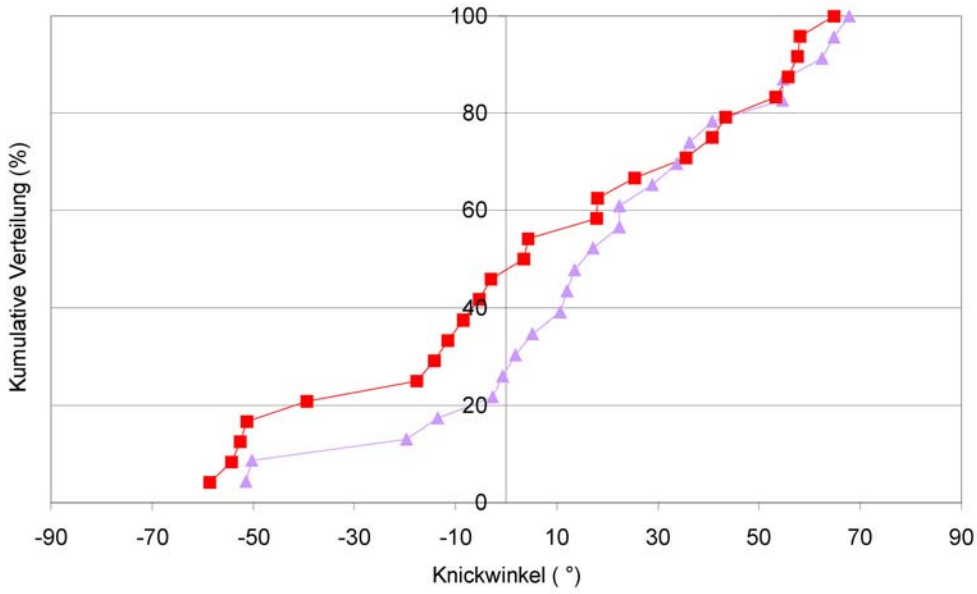


Abbildung 25 Der Einfluss von Rp-cAMPS auf auf die Orientierungsreaktion der Wachstumskegel, die mit kurzen UV-Licht Pulsen stimuliert wurden. Verglichen wird der Winkel der Orientierungsreaktion der Wachstumskegel nach Freisetzung von cAMP mit 44 mal 1,8 ms UV-Licht Pulsen (rote Quadrate) mit der gleichen Stimulation in Anwesenheit von 20 µM des cAMP Analoges Rp-cAMPS (lavendelfarbene Dreiecke). Die Art der Darstellung entspricht Abbildung 22 **b**.
Die Anwesenheit von Rp-cAMPS verschiebt die Verteilung nach rechts (zur Signifikanz siehe Diskussion: Bewertung der Messungen durch die Statistik)

Die Verwendung von IBMX

In einer weiteren Versuchsreihe sollte der Einfluss eines Phosphodiesterase (PDE) Blockers untersucht werden. Die Überlegung war, mit einem solchen Agens den Abbau des cAMP zu stören und somit die Gradientenform unabhängig vom Belichtungsmuster zu verändern. IBMX ist ein Breitspektrum PDE Blocker (Elks und Manganiello 1985, Price und Goldberg 1993). Durch Einsatz dieses Agens konnten in Herzzellen auftretende cAMP Gradienten stark zerstreut werden (Zaccolo et al. 2002).

Der Einsatz von 40 µM IBMX in Kombination mit dem 6 mal 13 ms Pulse Stimulationsprotokoll führte dazu, dass die Orientierung zur Seite der Stimulation aufgehoben war. Der durchschnittliche Knickwinkel unter diesen Bedingungen betrug 2,9° ± 6,1° (Standardfehler des Mittelwertes) bei einem Stichprobenumfang von 15 Wachstumskegeln. Dieses Ergebnis unterschied sich signifikant von der Reaktion der Wachstumskegel die mit 6 mal 13 ms Pulsen in Abwesenheit von IBMX stimuliert wurden (Mann-Whitney *U* Test, $p = 0{,}012$; siehe Abbildung 26). Dies bedeutet, dass nicht nur die Blockade der Ziele des cAMP, sondern auch eine Störung im Abbau des cAMP die Orientierungsreaktion verhindert. Da IBMX die Form von cAMP Gradienten verändert, lässt sich daraus unabhängig von den verschiedenen Lichtstimulusmessungen schließen, dass eben die Form des cAMP Gradienten für die Orientierungsreaktion entscheidend ist.

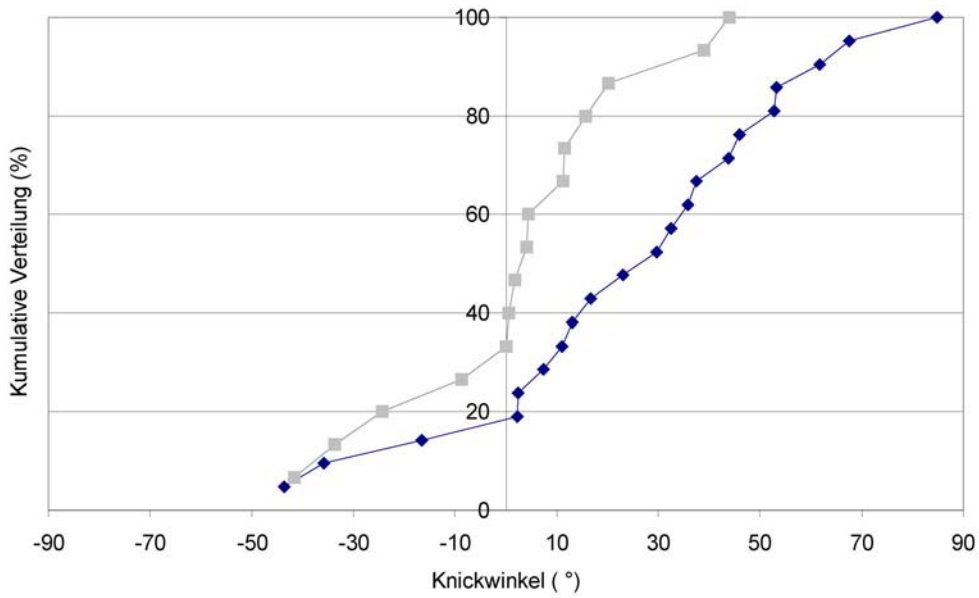


Abbildung 26 Der Einfluss von IBMX auf die Orientierungsreaktion der Wachstumskegel. Verglichen wird der Winkel der Orientierungsreaktion der Wachstumskegel nach Freisetzung von cAMP mit 6 mal 13 ms UV-Licht Pulsen (blaue Rauten) mit der gleichen Stimulation in Anwesenheit von 40 µM des PDE Blockers IBMX (graue Quadrate). Die Art der Darstellung entspricht Abbildung 22 **b**.
Durch IBMX wird die Orientierungsreaktion geblockt.

Kontrollexperimente

Um auszuschließen, dass die gefundenen Antworten durch Artefakte beeinflusst waren, sind systematisch Kontrollexperimente durchgeführt worden (siehe Abbildung 27). Das heißt, die Wachstumskegel wurden den selben Belichtungsprotokollen in Anwesenheit des Solvens für das cAMP, beziehungsweise für die Inhibitoren ausgesetzt und zusätzlich wurden Messungen in Anwesenheit von caged cAMP und in Abwesenheit von UV-Licht durchgeführt. Diese Kontrollexperimente zeigten, dass weder

UV-Licht noch das unphotolysierte caged cAMP eine signifikante Richtungsantwort auslöste.

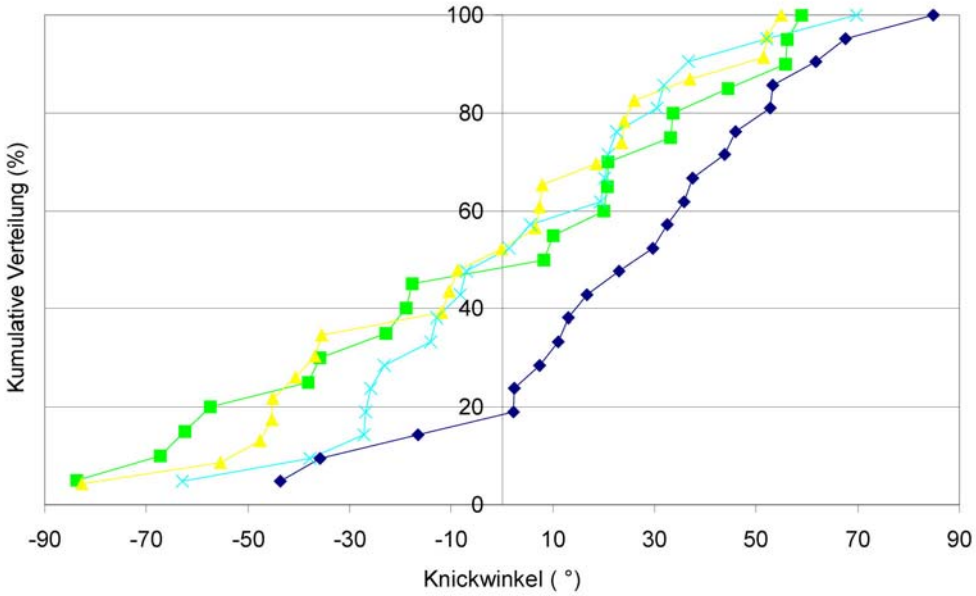


Abbildung 27 Die Orientierungsreaktion ausgelöst durch gepulste cAMP Freisetzung und die Kontrollen. Verglichen wird der Winkel der Orientierungsreaktion der Wachstumskegel nach Freisetzung von cAMP mit 6 mal 13 ms UV-Licht Pulsen (blaue Rauten) mit den Kontrollen der verschiedenen Freisetzungsmuster ohne caged cAMP (6 mal 13 ms UV-Licht Pulse: grüne Quadrate; 44 mal 1,8 ms UV-Licht Pulse: gelbe Dreiecke) und einer Kontrolle ohne UV-Licht aber in Anwesenheit von caged cAMP (türkisfarbene Kreuze). Die Art der Darstellung entspricht Abbildung 22 **b**.
Die Reaktion auf die Stimulation mit 6 mal 13 ms UV-Licht Pulsen (blaue Rauten) unterscheidet sich signifikant von den Kontrollen.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Orientierungsexperimente

Die Experimente der Orientierungsmessungen sind hier in der Tabelle 1 zusammen mit dem Signifikanzniveau des Mann-Whitney *U* Tests zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Zeitmuster der cAMP Freisetzung das Richtungswachstum der Wachstumskegel beeinflussen.

Messung: (Stimulation innerhalb von 2 min und Messung nach weiteren 2 min)	*N*	*Knickwinkel in °*	*Standardfehler des Mittelwerts*	*p-wert des Mann-Whitney U Test*
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP	21	25	±7,1	-
6 mal 13 ms Pulse ohne caged cAMP	20	-2,1	±9,9	0,034
2 min Dauerlicht mit caged cAMP *	24	-4,6	±6,7	0,0037
2 min Dauerlicht ohne caged cAMP *	23	-4,8	±8,0	0,0062
44 mal 1,8 Pulse mit caged cAMP	24	6,7	±8,1	0,067
44 mal 1,8 Pulse ohne caged cAMP	26	5,6	±8,3	0,045
44 mal 1,8 Pulse mit caged cAMP und mit RP-cAMPS	23	17,9	±6,9	0,23
Dunkelkontrolle #	21	3,1	±7,1	0,0017
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP und mit KT5720	24	-2,4	±7,6	0,0062
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP und mit IBMX	15	2,9	±6,1	0,012
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP und mit 20 µM Rp-cAMPS	25	22	±6,2	0,37
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP und mit 100 µM Rp-cAMPS	17	3	±8,4	0,032

* Das Licht war in diesem Protokoll um den Faktor 1/1538 gedimmt
# Dieses Protokoll wurde ohne UV-Licht gemessen

Tabelle 1 Die Zusammenfassung der Orientierungsexperimente. Die Messungen werden mit der Messung in der ersten Zeile mit Hilfe des Mann-Whitney *U* Tests verglichen und das Signifikanzniveau ist dargestellt.

Die Lenkung der Fortsätze sensorischer Neurone mit freigesetztem cAMP

Die bisher beschriebenen Ergebnisse beziehen sich, bewirkt durch die gewählten Versuchsbedingungen, nur auf kurze Distanzen und kleine Richtungsänderungen. Es sollte deshalb in einem weiteren Versuch gezeigt werden, ob mit der verwendeten Methode die Nervenfortsätze auch über größere Distanzen hinweg gelenkt werden können, und ob die Freisetzung des cAMP in Pulsen auch zu nachhaltigen Richtungsänderungen führt.

Durch ein Bestrahlungsmuster von 20 Lichtpulsen mit jeweils 13 ms Länge über einen Zeitraum von 7,5 min, konnte eine nachhaltige Änderung der Wachstumsrichtung der Wachstumskegel in die Richtung des Stimulus, ausgelöst werden (siehe Abbildung 28 a) Des Weiteren konnte, nach 9 min ohne Stimulus, mit dem selben Belichtungsmuster auf der anderen Seite des Wachstumskegels stimuliert, wieder eine Richtungsänderung zur Seite des Stimulus hin ausgelöst werden (siehe Abbildung 28 b). Während des ganzen Experimentes war es nötig den Kreuztisch des Mikroskops von Hand zu verschieben um eine akkurate Bestrahlung des Wachstumskegels zu gewährleisten.

Die Tatsache, dass neuronale Wachstumskegel mit intrazellulärem cAMP gelenkt werden können, ist bereits früher beschrieben worden. Auf diese Weise konnte, in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Gundersen und Barrett 1980, Lohof et al. 1992), die Wirksamkeit der hier verwendeten Methode überprüft werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die

Stimulation mit Pulsen von 13 ms Länge auch auf die Lenkung über größere Distanzen übertragen werden kann.

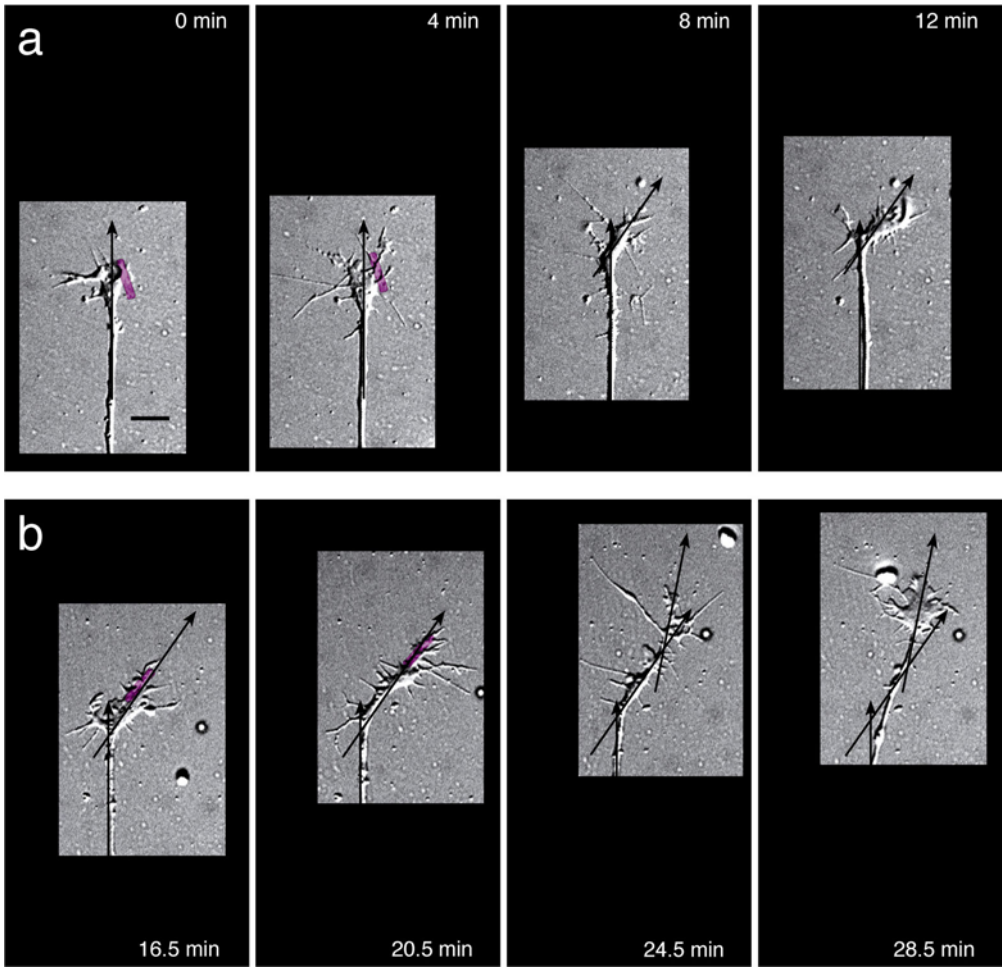


Abbildung 28 Nachweis der Lenkung von Wachstumskegeln sensorischer Neuronen durch intrazelluläre Gradienten von cAMP. Die mit caged cAMP geladenen Wachstumskegel wurden durch lokale Freisetzung von cAMP in der violett markierten Region stimuliert. **a** durch Freisetzung von cAMP durch 20 UV-Licht Pulse von jeweils 13 ms Dauer konnte eine nachhaltige Richtungsänderung herbeigeführt werden. Die 20 Pulse wurden während 7,5 min appliziert, anschließend wuchs der Wachstumskegel in Richtung des Stimulus. **b** durch die gleiche Stimulierung wie in **a** der bisher unstimulierten Seite konnte wieder eine positive Richtungsantwort ausgelöst werden. Während des gesamten Experiments wurde der Mikroskoptisch mit der Hand verschoben, um eine optimale Stimulierung des Wachstumskegels, trotz seines Wachstums, zu gewährleisten. Bezüglich der Verschiebungen erfolgte eine Korrektur der Darstellung. Der Balken in **a** entspricht 10 µm.

Theoretische Erwägungen

In Zusammenarbeit mit Thierry Bottaro von der Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles in Paris wurde ein Diffusionsprofil des cAMP quer durch den Wachstumskegel simuliert um den Unterschied des Gradienten bei gepulster und kontinuierlicher Freisetzung darzustellen. Hierzu wurde eine Diffusionsgleichung mit konzentrationsabhängigem Abbau des cAMP von Kasai und Petersen (1994) verwendet.

$$\frac{d}{dt}c(x,t) = D\left(\frac{d^2}{dx^2}c(x,t)\right) - \frac{c(x,t)}{\tau} \qquad (1)$$

Thierry Bottaro löste die Formel (1) für eine Dimension mit einer Diffusionsgrenze und erstellte ein MathCAD (Mathsoft Engineering & Education) Arbeitblatt, das für die Berechnungen verwendet wurde. Für die nachfolgende Simulation wurden folgende Parameter eingesetzt: Diffusionsstrecke $x = 20$ µm, Zeit $t = 20$ s, Diffusionskoeffizient $D = 780$ µm²/s und Abbaukonstante $\tau = 2$ s. Der Wert für τ und D wurde der Veröffentlichung von (Kasai und Petersen 1994) entnommen. Der Ort der Freisetzung hatte eine Ausdehnung von 2 µm. In dieser Rechnung sollte das prinzipielle Verhalten von cAMP Diffusionsgradienten veranschaulicht werden (siehe Abbildung 29). Es war nicht das Ziel die Ergebnisse direkt auf Wachstumskegel zu übertragen. Neben anderen Unwägbarkeiten, wie nichtlineare cAMP Abbauprozesse, steht einer

Übertragung der Ergebnisse auch die komplexe Geometrie des Wachstumskegels entgegen, die in der Simulation stark vereinfacht wurde.

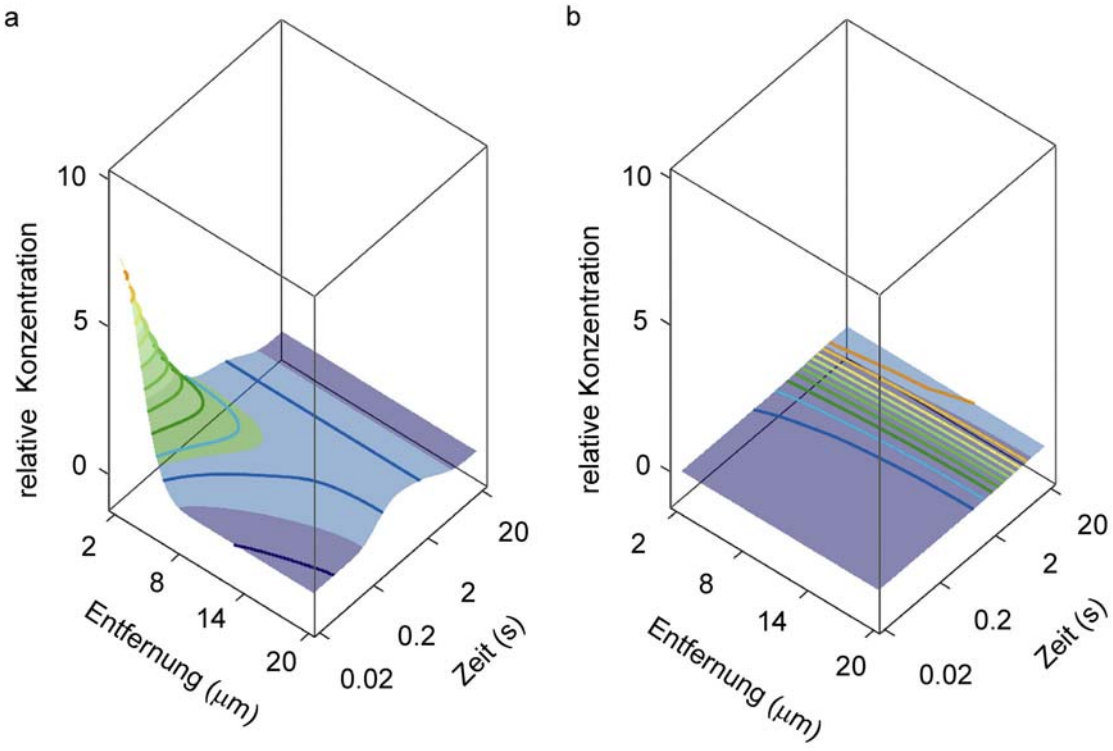


Abbildung 29 Veranschaulichung, dass bei unterschiedlicher Freisetzung von cAMP unterschiedliche Gradientenformen entstehen. Die Berechnungen und eingesetzten Werte basieren auf einer Gleichung von (Kasai und Petersen 1994)) mit einem Diffusionskoeffizienten von $D_{cAMP} = 780\ mm^2/s$ und einer Abbaukonstante von $\tau = 2$ s. Angenommen wurde eine Diffusionsstrecke von 20 µm Länge. Der Bereich, in dem freigesetzt wurde, reichte von 0–2 µm. Gezeigt werden die Gradienten in einer Dimension über die Zeit. **a** Freisetzung von cAMP während einer infinitesimal kurzen Zeit. Ein steiler Gradient ist erkennbar. **b** bei kontinuierlicher Freisetzung entsteh ein wesentlich flacherer Gradient. In **a** und **b** wurden insgesamt die gleiche Menge cAMP freigesetzt. In beiden Graphen stellen die selben Farben, die gleiche Konzentration dar, während die topographischen Linien den Gradienten charakterisieren. Diese Berechnungen sind nur zur Verdeutlichung des in dieser Arbeit gezeigten Effektes gedacht. Quantitative Schlüsse sollten nur mit größter Vorsicht gezogen werden, da sich die Simulation auf vielen Annahmen und Vereinfachungen stützt.

Diskussion

Die Methode, mit UV-Licht Käfigkomponenten freizusetzen, erlaubt es definierte Mengen cAMP zu dosieren. Auf diese Weise war es möglich die Auswirkungen des zeitlichen Freisetzungsmusters und damit die Auswirkungen unterschiedlicher intrazellulärer Gradienten auf die Orientierungsreaktion von neuronalen Wachstumskegeln zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Effizienz, mit der eine bestimmte Menge cAMP die untersuchten Neurone orientiert, vom Zeitmuster, mit dem das cAMP appliziert wurde, abhing. Verschiedene experimentelle Herangehensweisen zeigten, dass die raum-zeitlichen Eigenschaften der erzeugten cAMP Gradienten der Grund für die unterschiedliche Wirksamkeit waren. Dies unterstreicht die Bedeutung raum-zeitlicher Phänomene beim Auf- und Umbau des Nervensystems.

Die Methode

Die Wahrheit ist eine Lüge
Aus: Der perfekte Ehemann
(Oscar Wilde 1854 - 1900)

Die Methode Zweitbotenstoffe direkt (mit Hilfe von caged Komponenten) freizusetzen hat den Vorteil, dass sich damit Phänomene unabhängig von vorhergehenden Signalwegschritten untersuchen lassen und somit quantitative Effekte *eines* Zweitbotenstoffes messbar sind.

Vergleich der Effizienz der verschiedenen Bestrahlungs-Methoden

Das Verhältnis der Anzahl der UV-Licht Photonen zu der Anzahl der photochemisch freigesetzten cAMP Moleküle

Es ist eine naheliegende Annahme, dass innerhalb der Grenzen der verwendeten Bestrahlungsintensitäten ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl an UV-Licht Photonen und der Anzahl der photochemisch freigesetzten cAMP Moleküle besteht. Darüber hinaus ist für die ähnlichen Moleküle NPE-caged 8-Br-cGMP und 8-Br-cAMP sowie bei DMNB-caged 8-Br-cGMP und 8-Br-cAMP einen linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der absorbierten Photonen und photochemisch gespaltenen Molekülen gezeigt worden (Hagen et al. 1998, Hagen et al. 1996, Kaupp et al. 1998). Die in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit durchgeführten elektrischen Messungen an HeLa Zellen zeigen, dass diese Linearität ebenso für NPE-caged cAMP gilt.

Das Wiederherstellen der NPE-caged cAMP Konzentration nach einem UV-Lichtpuls

Eine wichtige Frage bei der Betrachtung der Orientierungs-experimente ist, ob Bleicheffekte beim Unterschied zwischen gepulster und kontinuierlicher Freisetzung eine Rolle spielen könnten. Die Durchschnittsgeschwindigkeit, mit der sich ein cAMP Molekül in drei Dimensionen fortbewegt, liegt zwischen 40 µm s^{-1} und 68 µm s^{-1} (1) Deshalb sind 20 s eine lange Zeit um die caged cAMP Konzentration in der 2 x 10 μm^2 großen beleuchteten Fläche wiederherzustellen, selbst wenn der Diffusionskoeffizient von caged cAMP aufgrund der Käfigkomponente kleiner sein dürfte, was sich aus dem 1. Fickschen Gesetz der Diffusion ableiten lässt (Klages 1997).

Eine Erschöpfung des caged cAMP Vorrats im Wachstumkegel scheint unwahrscheinlich, da sich die Photolyse nur auf etwa 25 % der Fläche des Wachstumskegels beschränkte und membranpermeables caged cAMP im Medium vorrätig war.

Die Unterschiede während des Pulses

Die Schlüsse, die aus der vorliegenden Arbeit gezogen wurden, stützen sich im wesentlichen auf die Annahme, dass die verschiedenen Stimulationen, die verwendet wurden, die gleiche Menge an cAMP freisetzen. Zwar wurde in der Arbeit gezeigt, dass generell ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der eingestrahlten Photonen und der

---

[1] berechnet für $D_{[cAMP]} = 2.7x10^{-6}$ cm^2s^{-1} (Chen et al. 1999) und $7.8x10^{-6}$ cm^2s^{-1} (Bacskai et al. 1993).

freigesetzten Menge besteht, das gilt allerdings nur innerhalb gewisser Grenzen. So ist zum Beispiel vorstellbar, dass nichtlineare optische Effekte, die in der vorliegen Arbeit nicht von Bedeutung sind, im Gegensatz zum hier beschriebenen Zusammenhang stehen.

Ein Puls mit voller Intensität von 13 ms Dauer photolysiert rund 35 % der caged cAMP Menge (siehe Einstellung und Messung der Photonenflussdichte im Ergebnisteil). Daher ist die Freisetzungsrate gegen Ende des Pulses aufgrund von Bleichungseffekten reduziert, das heißt, die Konzentration der spaltbaren Moleküle nimmt während des 13 ms Pulses ab. Während der kontinuierlichen Freisetzung mit geringerer Intensität tritt derselbe Effekt ein, wenn in beiden Fällen am Ende des Stimulus die gleiche Anzahl an Photonen appliziert wurde. Doch muss man auch die Diffusion in Betracht ziehen, die bei geringerer Freisetzungsrate die Verarmung an spaltbaren Molekülen stärker kompensiert. Das heißt, dass während der kontinuierlichen Freisetzung, obwohl mit der gleichen Anzahl Photonen stimuliert wurde, im geringen Ausmaß mehr cAMP freigesetzt wird (siehe auch Diffusionsgeschwindigkeit im vorhergehenden Abschnitt). Die Tatsache, dass die gepulste Freisetzung, bei der weniger cAMP freigesetzt wurde, die effektivere ist, legt nahe, dass dieser Effekt die Ergebnisse nicht nachhaltig beeinflusst.

Die cAMP Gradienten in HeLa Zellen

In HeLa Zellen sollte untersucht werden, ob sich mit der verwendeten Methode cAMP Gradienten erzeugen ließen und ob das Freisetzungsmuster einen Einfluss auf den Gradienten hat. Dies konnte verifiziert werden. Die Methode cAMP Gradienten mit dieser Methode darzustellen, war von Rich et al. (2000) vorgeschlagen worden und erwies sich hier als nützlich. Das Ergebnis, dass sich mit gepulster Freisetzung steilere Gradienten erzeugen lassen, stimmt mit der Vorhersage von Kasai und Petersen (1994) überein.

Bei der Übertragung der Ergebnisse aus den HeLa Experimenten auf die Neuronen stellen sich allerdings folgende Probleme: Zum einen, wie weiter unten dargelegt, stellt die Messung nur ein indirektes Maß für das cAMP dar. Es lassen sich also keine quantitativen Aussagen treffen (Rich et al. 2000). Zum anderen handelt es sich dabei nicht nur um zwei grundsätzlich unterschiedliche Zellsysteme, die, so muss man annehmen, eine unterschiedliche Sensitivität haben, sondern man vergleicht auch zwei unterschiedliche biologische Reaktionen.

Dies erklärt auch den Unterschied in den verwendete Stimulationsprotokollen: Vorversuche haben gezeigt, das 6 mal 13 ms Pulse bei den HeLa Zellen unwirksam waren, weshalb ein 78 ms Puls verwendet wurde, der ja auch wie die 6 mal 13 ms Pulse bei den Neuronen zusammen 78 ms ergibt. Dieser 78 ms Puls wurde den 2 min kontinuierlicher Freisetzung

gegenüber gestellt und zeigte, dass das Freisetzungsmuster einen Einfluss auf den erzeugten Gradienten hat. Bei Neuronen erwies sich ebenfalls in Vorversuchen ein wiederholtes Freisetzen als effektiver.

Die Vor- und Nachteile der verwendeten cAMP Messmethode

Die Messung von cAMP in Einzelzellen erfordert eine Methode mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Deshalb wurden hier Kanäle verwendet, die durch cyclische Nukleotide geschaltet werden. Diese Kanäle stammen aus dem Riechsystem von Rindern. Die Bindung von cAMP auf der intrazellulären Seite führt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit für das Ca^{2+}, so dass cAMP Gradienten als Ca^{2+} Gradienten fluoreszenzoptisch dargestellt werden können (Rich et al. 2000). Die Frage nach der Exaktheit dieser in der vorliegender Arbeit erstmals verwendeten Methode ist deshalb um so bedeutender. Die Vorteile des Messsystems sind: Die CNG-Kanäle sind schnelle cAMP Sensoren (Lowe und Gold 1993) und puffern das cAMP Signal in keinem nennenswerten Ausmaß (Rich et al. 2000). Da der Diffusionskoeffizient von cAMP [(2)] wesentlich größer ist als der Diffusionskoeffizient von intrazellulärem Ca^{2+} [(3)] wird das Abbild des cAMP Gradienten nur zu einem geringen Anteil durch die Ca^{2+} Diffusion gestört.

---

[2] liegt zwischen $D_{[cAMP]}$ $2.7x10^{-6}$ cm^2s^{-1} (Chen et al. 1999) und $7.8x10^{-6}$ cm^2s^{-1} (Bacskai et al. 1993)

[3] dieser liegt bei $D_{[Ca^{2+}]} = 1.3x10^{-7}$ μm^2s^{-1} (Allbritton et al. 1992), wenn man von einer intrazellulären Ca^{2+} Konzentration von 90 nM ausgeht

Dennoch sollten die verschiedenen Nachteile auch nicht unerwähnt bleiben: das intrazelluläre Ca^{2+} Niveau hängt von dem Integral des Ca^{2+}-Stromes ab und ist somit kein Indikator der aktuellen cAMP Konzentration. Die Ca^{2+} Konzentration reflektiert in diesem Fall vielmehr die cAMP Konzentration über einen gewissen Zeitraum hinweg. Die Situation wird durch die Vielzahl von Mechanismen weiter verkompliziert, die auf die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration wirken (Clapham 1995).

Die Dosiswirkungskurve des CNG-Kanals zeigt, dass es sich bei den CNG-Kanälen nicht um lineare Detektoren handelt, es ist somit kein linearer Zusammenhang zwischen cAMP und Ca^{2+} zu erwarten (Altenhofen et al. 1991). Dies bedeutet, dass die Ca^{2+} Gradienten, welche nach lokaler Photolyse von cAMP gemessen werden können, nur ein ungefähres Abbild des eigentlichen cAMP Gradienten darstellen. Ein Vorteil ist, dass, bedingt durch künstlich eingeführte Mutationen, an der Bindungsstelle für das cyklische Nucleotid Ionenkanäle mit unterschiedlichen Bindungskonstanten (und damit unterschiedlichen Empfindlichkeiten) zur Verfügung stehen.

Die Messung von intrazellulärem cAMP mit den CNG-Kanälen ist aber nicht die einzige Methode, mit der sich cAMP nachweisen lässt. Auch mit Hilfe von Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Mikroskopie (FRET) kann man cAMP nachweisen. Hierbei wird zum Beispiel eine PKA mit Fluorescein markiert und die zugehörige regulatorische Untereinheit mit Rhodamin. Ohne cAMP bilden die Proteine einen Komplex, sodass Energietransfer vom Fluorescein auf das Rhodamin erfolgen kann. Nach Bindung von cAMP zerfällt der Komplex, so dass bei Anregung von Fluorescein keine

Rhodamin Emission mehr auftritt (Adams et al. 1991). Diese Methode wurde zum Beispiel von Bacskai et al. (1993) und Hempel et al. (1996) angewendet.

Als Nachteil dieser Methode erweist sich: dass die zu untersuchenden Zellen mikroinjiziert werden müssen, dass aufgrund der langsamen Dissoziationsrate der PKA keine schnellen Änderungen gemessen werden können und dass durch hohe Indikatorkonzentrationen das intrazelluläre cAMP stark gepuffert wird (Rich und Karpen 2002). Eine Variante dieser Methode basiert auf einer genetisch veränderten PKA (Zaccolo et al. 2000).

Eine weitere cAMP Nachweismethode ist ein immuno-histochemischer Nachweis mit Hilfe von Antikörpern gegen cAMP. Die Anwendung dieser Methode zum Nachweis von intrazellulärem cAMP erfordert eine Fixierung des cAMP. Eine solche wird von (Wiemelt et al. 1997) beschrieben. Im Fall der vorliegenden Arbeit wäre es aber nötig, dass der Antikörper zwischen cAMP und caged cAMP differenzieren kann. Aufgrund der Strukturunterschiede gibt es vermutlich solche Antikörper aber kommerzielle Antikörper sind daraufhin nicht getestet.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die verwendete Methode cAMP Gradienten darzustellen zwar sehr schnell ist und sich diese gut nachweisen lassen, aber quantitative Aussagen nicht möglich sind. Quantitative Aussagen sind aber auch für cAMP Imaging mit Hilfe von FRET an modifizierten PKA Molekülen nicht möglich (Rich und Karpen 2002).

Gibt es eine Abhängigkeit zwischen dem Freisetzungsmuster und der Gradientenform

Diese Annahme ist durch ein breites Fundament an theoretischen Arbeiten wie zum Beispiel Crank (1975) untermauert. Darüber hinaus wurde die Abhängigkeit der Form des Gradienten vom zeitlichen Freisetzungsmuster in der vorliegenden Arbeit mit einer Simulation, mit Inhibitor-Experimenten in Wachstumskegeln und mit der direkten Darstellung der cAMP Gradienten in HeLa Zellen gezeigt.

Für die Simulation der cAMP Diffusion wurde eine Formel von (Kasai und Petersen 1994) verwendet. In dieser Simulation konnte dargestellt werden, dass verschiedene Freisetzungsmuster zu unterschiedlichen Gradienten führen. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der Theorie der oben genannten Publikation, die die Ausbreitung von Zweitbotenstoff-Signalen untersucht. Wie erwartet wurde bei der gepulsten Freisetzung eine höhere Maximalkonzentration an der Stelle der Freisetzung und ein steilerer Gradient über den Wachstumskegel hinweg gefunden. Diese Ergebnisse decken sich auch mit der Theorie von Goodhill (1997) über das Verhalten extrazelluläre Gradienten.

Die in der Literatur dokumentierten wie auch die eigenen Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass verschiedene Freisetzungsmuster zu unterschiedlichen Gradienten führen.

Bewertung der Messungen durch die Statistik

Der Bewertung der Messungen durch die Statistik wird üblicherweise viel Aufmerksamkeit gewidmet. In dieser Arbeit wurden zwei statistische Tests verwendet, der Mann-Whitney *U* Test und der Test auf Binomialverteilung mit einem Binomialkoeffizienten von 0,5 (Lorenz 1984). Der Mann-Whitney *U* Test ist ein Rangordnungstest, der auch auf nicht normalverteilte Daten angewendet werden kann. Er eignet sich deshalb Orientierungsreaktionen von Wachstumskegeln zu untersuchen, da es Hinweise gibt, dass die Knickwinkel nicht normalverteilt sind (Kolmogorov Smirnoff Test auf Normalverteilung).

Der Mann-Whitney *U* Test ist auch in der Literatur, die sich mit Orientierungsreaktionen von Wachstumskegeln beschäftigt, weit verbreitet (vergleiche unter anderem: Lohof et al. 1992, Ming et al. 2001, Zheng 2000, Zheng et al. 1994a). Bisweilen kann man auch vom Kruskal Wallis Test lesen, der aber wie der Mann-Whitney *U* Test auf den Rangordnungs-Vergleich zweier Stichproben angewendet wird und daher zu ähnlichen Ergebnisse wie der Mann-Whitney *U* Test führt. Da es sich bei der Orientierung der Wachstumskegel um ein klassisches Entscheidungs-experiment handelt und die Kontrollen zeigen, dass es keine Seitenpräferenz gibt, sondern die Entscheidung zwischen beiden Seiten gleich wahrscheinlich ist, können solche Daten auch gut mit einem Test auf Binomialverteilung (mit einem $p = 0,5$) bewertet werden. Dabei fällt nur ins Gewicht, wie viele Zellen sich zwischen der Hin- und Abwende-

reaktion entschieden haben und nicht die statistische Verteilung der jeweiligen Kontrolle, die das Ergebnis bei kleinen Stichproben verfälschen kann.

Für die Ergebnisse dieser Arbeit hat das jedoch kaum Auswirkung. Die Grundaussage bleibt bei beiden statistischen Tests signifikant. Lediglich beim Vergleich der Aktivierung der 44 mal 1,8 ms Pulse durch den Einsatz von Rp-cAMPS, verglichen mit ihrer Kontrolle, muss man zwischen einem Trend zur Signifikanz und der 5 % Signifikanz (beim Test auf Binomial-verteilung) unterscheiden. Die Ergebnisse und Signifikanzniveaus der Orientierungsmessungen sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Messung: (Stimulation innerhalb von 2 min und Messung nach weiteren 2 min	*N*	*Verhältnis links/rechts*	*Test auf Binomial-verteilung*	*p-Wert des Mann-Witney U Test*
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP	21	3/18	≦ 0,05	-
6 mal 13 ms Pulse ohne caged cAMP	20	9/11	> 0,05	0,034
2 min Dauerlicht mit caged cAMP *	24	12/12	> 0,05	0,0037
2 min Dauerlicht ohne caged cAMP *	23	11/12	> 0,05	0,0062
44 mal 1,8 Pulse mit caged cAMP	24	11/13	> 0,05	0,067
44 mal 1,8 Pulse ohne caged cAMP	26	14/12	> 0,05	0,045
44 mal 1,8 Pulse mit caged cAMP und mit RP-cAMPS	23	6/17	≦ 0,05	0,23
Dunkelkontrolle #	21	10/11	> 0,05	0,0017
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP und mit KT5720	24	13/11	> 0,05	0,0062
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP und mit IBMX	15	4/11	> 0,05	0,012
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP und mit 20 µM Rp-cAMPS	25	5/20	≦ 0,05	0,37
6 mal 13 ms Pulse mit caged cAMP und mit 100 µM Rp-cAMPS	17	6/11	> 0,05	0,032

* Das Licht war in diesem Protokoll um den Faktor 1/1538 gedimmt
# Dieses Protokoll wurde ohne UV-Licht gemessen

Tabelle 2 Die Ergebnisse der Orientierungsmessungen in Bezug auf Ihre Verteilung zwischen rechter und linker Seite. Die Ergebnisse des Tests auf Binomialverteilung zeigen die Abweichung der Messung von einer angenommenen Grundverteilung in diesem Fall mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,5. Der Mann-Whitney *U* Test hingegen vergleicht zwei Stichproben in diesem Fall die 6 mal 13 ms Pulse mit den anderen Messungen.

Die Physiologie

Für jedes komplexe Problem
gibt es eine einfache Lösung – und die ist falsch.
Aus: Das Foucaultsche Pendel
(Umberto Eco geboren 1932)

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Form eines intrazellulären Gradienten einen Einfluss auf die Orientierungreaktion von Wachstumskegeln hat. Ein anderes Beispiel für die Bedeutung der Form des intrazellulären Gradienten für die Orientierung von Wachstumskegeln ist die Form des cytoplasmatischen Ca^{2+} Gradienten, der durch Gabe von Netrin-1 induziert wurde (Hong et al. 2000). In letzt genannter Veröffentlichung wird beschrieben, dass die Form des Ca^{2+} Gradienten zwischen attraktiver und abstoßender Antwort entscheidet. Hier wurde im Unterschied dazu zum ersten Mal gezeigt, dass die Gradientensteilheit von cAMP bei Konstanz der Menge des Zweitbotenstoffs einen Unterschied in der Orientierungsreaktion macht.

cAMP ist nicht der einzige Botenstoff im Wachstumskegel

In Neuronen vermittelt cAMP verschiedenste Funktionen, darunter sind das Auswachsen von Neuriten, die neuronale Differenzierung und das Überleben der Neurone zu nennen. Des Weiteren moduliert der cAMP-Signalweg auch die Lenkung von Axonen durch diffusible Faktoren

einschließlich Neurotrophine, Netrin und inhibitorische Faktoren, die mit Myelin assoziiert sind (Kao et al. 2002). cAMP scheint sowohl bei der Axonregeneration (Bandtlow 2003) als auch bei dem Aufbau von neuronalen Netzen während der Entwicklung beteiligt zu sein (Mizuhashi et al. 2001, Song et al. 1997). Das heißt, cAMP ist für die Forschung an Wachstumskegeln ein sehr bedeutsames Molekül.

Seit dem Beginn der Wachstumskegelforschung hat sich das Bild, welche Moleküle das Richtungsswachstum beeinflussen, sehr verändert und auch verkompliziert. Die Hoffnung auf einen einfachen Mechanismus konnte man spätestens seit Mitte des letzten Jahrhunderts aufgeben. Verschiedene Meilensteine auf diesem Gebiet haben das Bild, das wir vom Wachstumskegel haben, immer wieder umgestoßen. Einige dieser Meilensteine, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind, sollen im folgenden aufgezählt werden. In einigen Fällen wird auf Übersichtsartikel verwiesen, wobei kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben wird. Es sollte vielmehr ein grober Überblick über die Ergebnisse der letzten Jahre gegeben werden.

Alles beginnt mit Ramón y Cajal (1893, 1998), der Wachstumskegel und Chemotropismus als erster postulierte. Später kamen weitere Pioniere, wie Harris und Weiss und dann Sperry und Bonhoeffer, hinzu, die an Anheftungsfaktoren beziehungsweise am Sehnerv arbeiteten (Dickson und Senti 2002, Song und Poo 2001). Mit dem Nerv Growth Faktor (NGF; Levi-Montalcini 1987) wurde das erste lenkende Molekül gefunden, welches extrazellulär wirkt (Gundersen und Barrett 1980). Weitere für die

Orientierung von Wachstumskegeln ausschlaggebende extrazellulär wirkende Moleküle sind unter anderem Netrine, Semaphorine, Slits, Neurotrophine, Fibroplasten-Wachstumsfaktoren und Moleküle der extrazellulären Matrix (Höpker et al. 1999, Mueller 1999, Song und Poo 2001, Tessier Lavigne und Goodman 1996). Auch Vertreter der Neurotransmitter können Wachstumskegel orientieren (Zheng et al. 1994a, Zheng et al. 1996b).

Unter den intrazelluläre Molekülen, die Orientierungsreaktionen regulieren, sind zunächst die Zweitbotenstoffe cAMP (Gundersen und Barrett 1980, Lohof et al. 1992) und Ca^{2+} zu nennen. Im Laufe der Zeit zeigte es sich, dass es scheinbar keine spezielle Orientierungssignalkette gibt, sondern vielmehr sehr viele Bestandteile weit verbreiteter Signalketten in die Regulation der Orientierungsreaktionen eingreifen. Darunter sind zum Beispiel G-Proteine (Xiang et al. 2002), Phospholipide (Ming et al. 1999), kleine GTPasen (Dickson 2001, Luo et al. 1997) und nicht zuletzt auch das Cytoskelett selbst zu nennen (Goodman 1996, Tanaka und Sabry 1995).

Das Bild ist aber noch weiter dadurch verkompliziert, dass das intrazelluläre Niveau von cAMP oder cGMP über das Vorzeichen der Richtungsantwort von verschiedenen chemotropen Stoffen entscheiden kann (Ming et al. 1997, Song et al. 1997). Hinzu kommt, dass dieses Phänomen anscheinend ebenso für Ca^{2+} gilt (Petersen und Cancela 2000).

Auch die für Neurone spezifischen aktivitätsabhängigen Prozesse können die Orientierung von Wachstumskegeln regulieren. So kann zum Beispiel

die elektrische Aktivität über das Vorzeichen der Orientierungsreaktion entscheiden (Ming et al. 2001). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass auch adaptative Prozesse eine Rolle spielen (Gallo und Letourneau 2002, Ming et al. 2002).

Weitere Arbeiten zeigen, dass Proteinsynthese und –abbau von großer Bedeutung sind (Campbell und Holt 2001, Dickson und Senti 2002).

Schließlich wurde ein eigenständiger Signalweg für cAMP, der unabhängig von Ca^{2+} ist, gezeigt (Guirland et al. 2003). Dieser Signalweg weist offensichtlich nicht die sonst beschrieben Vermengung und gegenseitigen Abhängigkeit von Ca^{2+} und cAMP (Gorbunova und Spitzer 2002, Nishiyama et al. 2003, Xiang et al. 2002) auf. Daraus muss man schließen, dass es auf der einen Seite eng vernetzte hochregulierte Signalwege gibt und parallel dazu Signalketten, die direkter wirken. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass es neben der bekannten PKA auch noch weitere unbekannte Wirkorte für das cAMP gibt (Dremier et al. 2003), was das Verständnis der Regulation der Orientierung des Wachstumskegels weiter erschwert (siehe Abbildung 30).

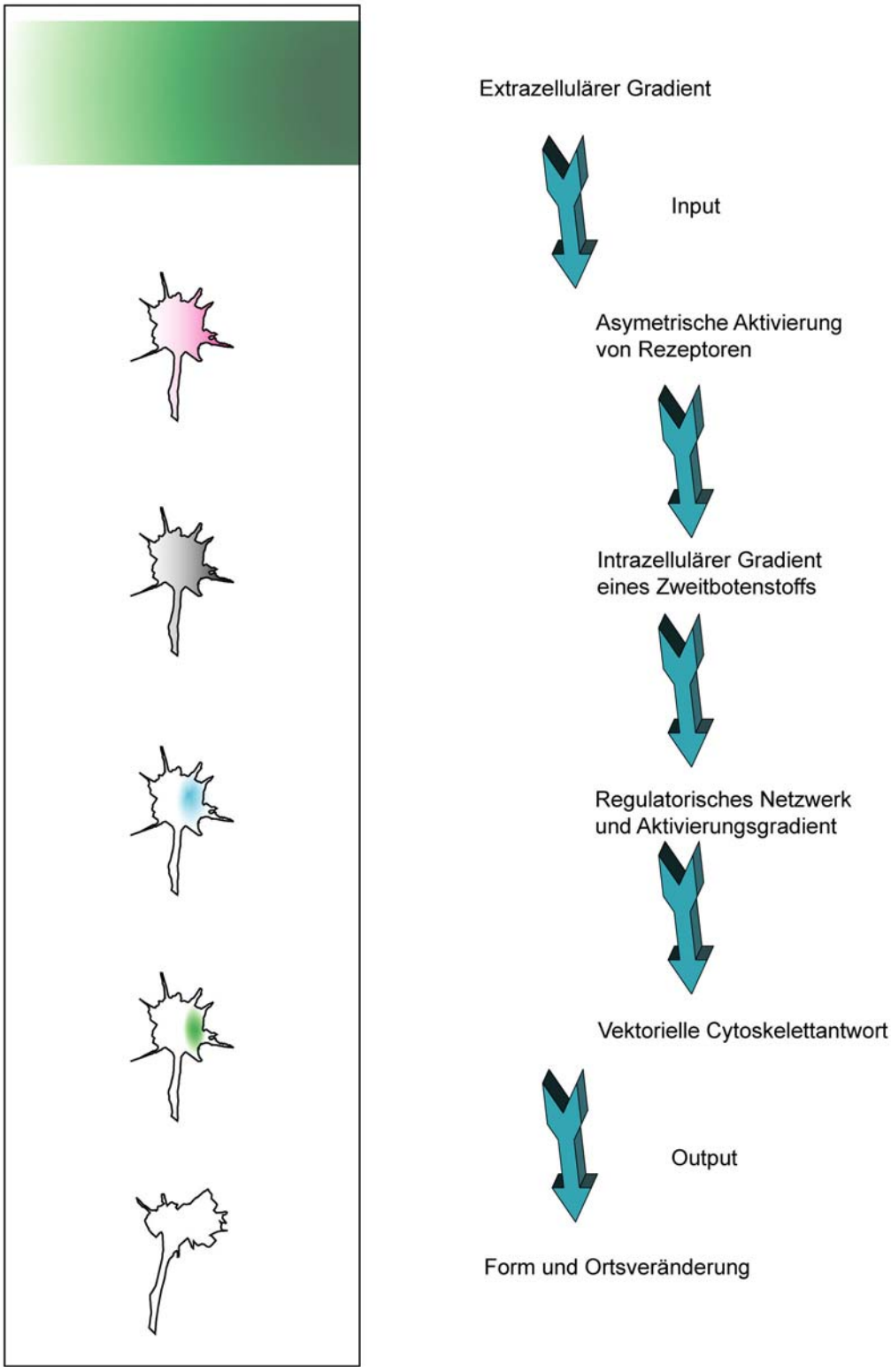


Abbildung 30 Flussdiagramm, das die verschiedenen Ebenen der Regulation der Orientierungsreaktionen, auf denen verktorielle Informationen auftreten können, darstellt. Wobei unterschiedliche Substanzen in unterschiedlichen Farben dargestellt sind.

Die Orientierungsreaktionen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von cytoplasmatischen cAMP Konzentrationsgradienten auf das Orientierungsverhalten von Wachstumskegeln von sensorischen Nerven aus dem Haushuhn untersucht. Frühere Untersuchungen zeigten in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen, dass Wachstumskegel mit cAMP gelenkt werden können (Guirland et al. 2003, Gundersen und Barrett 1980, Lohof et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden die cAMP Gradienten durch Photolyse von caged cAMP erzeugt. Der Einsatz von Käfigkomponenten hat sich für den Einsatz in der Forschung an dem Orientierungsverhalten von Wachstumskegeln als nützlich erwiesen (Guirland et al. 2003, Zheng 2000). Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen über das bisher Bekannte hinaus aber auch, dass unterschiedliche Belichtungsprotokolle, welche die gleiche Menge cAMP freisetzen zu unterschiedlichen Reaktionen der Wachstumskegel führen. Aus diesen Experimenten kann man zusammen mit den Inhibitorexperimenten (siehe unten) schließen, dass die Form des Gradienten für die Orientierungsreaktion verantwortlich ist. Dies weist auf die Bedeutung biophysikalischer Phänomene bei der neuronalen Orientierung hin und könnte ein weiteres Beispiel für die Wichtigkeit von zeitgesteuerten Prozessen für die Entwicklung von Neuronen sein. Auf die Frage, ob die Gradientensteilheit oder die lokale Spitzenkonzentration den Unterschied zwischen der Effizienz der gepulsten und der kontinuierlichen Freisetzung ausmacht, wird im Folgenden noch eingegangen.

Was zeigen die Experimente mit den verschiedenen Inhibitoren

Die Experimente mit dem kompetetiven cAMP Analog Rp-cAMPS und dem spezifischen Inhibitor der PKA, KT5720 zeigen zunächst, dass die Orientierungsreaktion tatsächlich durch cAMP hervorgerufen wurde und dass die PKA an der Orientierungsreaktion beteiligt ist. Die Experimente zeigen des Weiteren zusammen mit den Kontrollen, die ohne cAMP oder ohne UV-Licht durchgeführt wurden, dass weder das UV-Licht noch Spaltprodukte der Käfigverbindung für die Reaktion der Zellen verantwortlich sind. Ein weiterer eingesetzter Inhibitor war der Phosphodiesterase Inhibitor IBMX. Dieses Pharmakon führte dazu, dass sich die Wachstumskegel nicht mehr orientierten. Mit diesem Stoff wurde gezeigt, dass durch die Blockade des cAMP Abbaus die cAMP Gradienten in Herzzellen zerstreut werden (Zaccolo und Pozzan 2002). Das bedeutet, dass nicht nur die Blockade der Ziele des cAMP, sondern auch eine Inhibition des Abbaus des cAMP die Orientierungsreaktion verhindert. Da man schließen muss, dass das IBMX in den Wachstumskegeln ebenso wie in den Herzellen den cAMP Gradienten verzerrt, kann man schließen, dass die Form des Gradienten für die Orientierungsreaktion entscheidend ist.

Gradientensteilheit oder lokale Spitzenkonzentration

Eines der zentralen Probleme, das sich bei der Betrachtung der Ergebnisse stellt, ist die Frage, ob die Gradientensteilheit oder die lokale Spitzenkonzentration über die unterschiedlichen Orientierungsreaktionen der Wachstumskegel entscheidet.

Die Ergebnisse der Messungen mit den Inhibitoren IBMX und Rp-cAMPS zeigen, dass die Gradientensteilheit und nicht die Spitzenkonzentration am Freisetzungsort entscheidend ist. Das IBMX deutet darauf hin, da es durch Blockierung des cAMP-Abbaus die Spitzenkonzentration erhöht und trotzdem die Orientierung verhindert; das Rp-cAMPS, weil es in geringeren Konzentrationen die Orientierungsreaktion nicht verhindert, obwohl es aufgrund seiner kompetitiven Eigenschaften vergleichbar wirkt wie eine Reduktion der Spitzenkonzentration. Diese Interpretation wird durch die Ergebnisse der 44 mal 1,8 ms Pulse in Anwesenheit mit Rp-cAMPS unterstrichen. Bei diesem Experiment wird ein unwirksamer Stimulus durch den Einsatz von Rp-cAMPS in ein wirksames umgewandelt, wobei die Spitzenkonzentration reduziert ist. Dies kann man dadurch erklären, dass ein zu flacher Gradient, der zur Stimulation der gesamten Wachstumskegelfläche führt, geschärft und damit wirksam wird.

Über die Eigenschaften intrazellulärer Gradienten gibt es in der Literatur kaum Aussagen. Man nimmt aber an, dass diese eine größere Steilheit aufweisen als die extrazelulären Gradienten, die sie auslösen (Bonhoeffer und Gierer 1984, Meinhardt 1999, Parent und Devreotes 1999). Die

Diskussion über die Bedeutung der Gradientensteilheit bei extrazellulären Gradienten auf die Orientierungsreaktion wird dennoch teilweise kontrovers geführt. Ältere und theoretische Arbeiten streichen die Bedeutung der Gradientensteilheit heraus (Baier und Bonhoeffer 1992, Bonhoeffer und Gierer 1984, Goodhill 1997, Goodhill 1998, Meinhardt 1999).

Demgegenüber ist bei Bagnard et al. (2000) zu lesen, dass die Orientierungsreaktion reproduzierbar und weitgehend unabhängig von der absoluten Konzentration oder der Steigung des Gradienten ist. Eine Erklärung für diesen Befund könnten in diesem Fall adaptive Prozesse darstellen, wie sie von Ming et al. (2002) beschrieben wurden. Der *in vitro* Arbeit von Bagnard und Kollegen steht gegenüber, dass in jüngster Vergangenheit beim Heupferd (*Schistocerca gregaria*) *in vivo* histochemisch festgestellt wurde, dass an Entscheidungspunkten der Sema 2a Gradient sich in der Steilheit aber nicht in der absoluten Konzentration unterscheidet (Isbister et al. 2003).

Die Lenkung über weitere Strecken

Die Ergebnisse der Lenkungsversuche in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mit der gepulsten Freisetzung auch eine Lenkung über längere Distanzen (hier circa 20 µm) möglich ist. Außerdem konnte beobachtet werden, dass eine Stimulation der zuvor unstimulierten Seite auch in eine Orientierung zu dieser Seite hin resultiert. Das heißt, dass die Orientierungsreaktion umkehrbar ist. Man könnte nun fragen, ob ebenso

wie in der vorangegangenen Versuchsreihe die kontinuierliche Freisetzung ineffektiv ist. Um dies zu testen, wäre es aber nötig, den Mikroskoptisch mit der Hand zu verschieben, um eine optimale Stimulation einer Seite des Wachstumskegels zu gewährleisten, da dieser weiterwächst (siehe Abbildung 31). Aus diesem Grund wurden die Orientierungsmessungen mit nur 2 min Stimulationszeit durchgeführt, so dass sich diese, dann standardisiert, ohne Beeinflussung des Menschen realisieren ließen. Für die Lenkung wurde dies nicht angestrebt, da es aufwändig und die Interpretation wegen des hohen Anteils an Einflussnahme durch den Experimentator schwierig gewesen wäre. Es bleibt aber festzuhalten, dass eine cAMP abhängige Orientierung auch auf längeren Distanzen möglich ist und diese auch zu einer nachhaltigen Richtungsänderung führt.

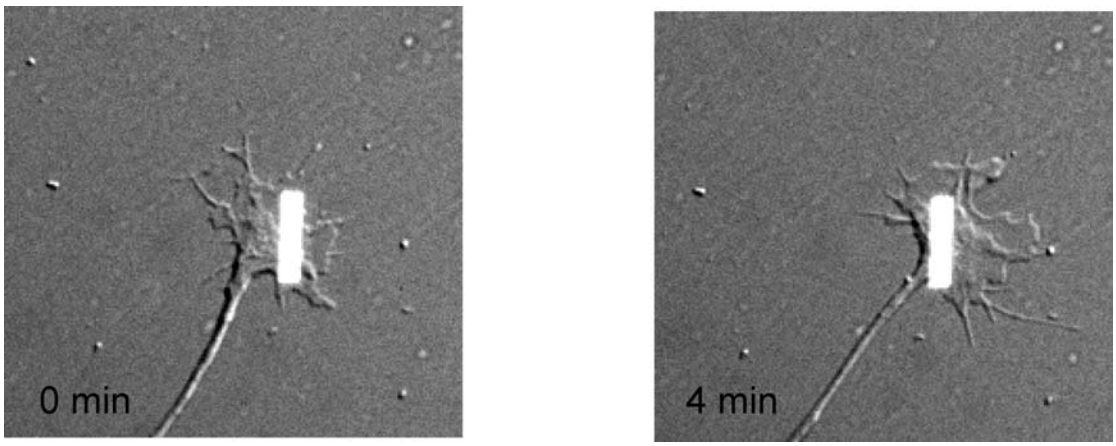


Abbildung 31 Veranschaulichung der verwendbaren Messzeit bei Orientierungsmessungen mit optischer Freisetzung durch einen fixen Spalt. Durch die Bewegung der Wachstumskegel relativ zu der mit UV-Licht beleuchteten Fläche ist die Zeit, in der sinnvoll stimuliert werden kann, begrenzt. In einer Überlagerung ist der Wachstumskegelund die mit UV-Licht beleuchteten Fläche dargestellt. Eine Verlängerung der Stimulationsdauer würde zur Stimulation der gegenüberliegenden Seite und somit zu schwer interpretierbaren Ergebnissen führen.

Welche Rolle spielt cAMP aus dem extrazellulären Raum

Bedingt durch die bildgebenden Eigenschaften des Photolyse-Strahlenganges, wird auch im extrazellulären Raum cAMP freigesetzt. Daher ergibt sich die Frage, ob extrazelluläres cAMP für die Orientierungsreaktion von Neuronen von Bedeutung ist, zumal sich die Amöbe *Dictyostelium discoideum* in einem extrazellukären cAMP Gradienten orientiert.

Aus der Tatsache, dass durch Gabe von KT5720, welches die PKA blockiert auch die Orientierungsreaktion blockiert wird, kann geschlossen werden, dass auf den cAMP Gradienten ein PKA Aktivierungsgradient folgt. Dies legt nahe, dass das cAMP im Cytosol den wesentlichen Effekt der Orientierungsreaktion ausmacht, was bedeutet, dass es sich um eine intrazelluläre Signalkette handelt. Es sind aber Transporter von cAMP aus dem extrazellulären Raum beschrieben worden (Orlov und Maksimova 1999), so dass man eine extrazelluläre Wirkung nicht ausschließen kann.

Dennoch ist in der Veröffentlichung von Gundersen und Barrett (1980), die mit extrazellulären Pipetten Gradienten erzeugten und an Hinterwurzelganglien von Hühnchen Orientierungsversuche gemacht haben, zu lesen, dass nur das membranpermeable 8-Br-cAMP orientierende Wirkung hatte. Das cAMP, das nicht membrangängig ist, war ohne Effekt. Darüber hinaus unterscheidet sich der extrazelluläre Raum von Neuronen in Vertebraten derart von der Außenwelt des Schleimpilzes, dass cAMP aufgrund der Anwesenheit von Phosphodiesterasen nur eine kurze Lebensdauer haben sollte (Jackson und Dubey 2001).

Gibt es Anzeichen dafür, dass gepulste cAMP Gradienten unter physiologischen Bedingung auftreten

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit favorisieren ein Modell, das gepulste Freisetzung von cAMP effektiver zelluläre Antworten auslöst als kontinuierliche Freisetzung der selben Menge cAMP. Obwohl, direkte Beweise für die Existenz dieses Phänomens in lebenden Organismen fehlen, darf spekuliert werden, dass gepulste Zweitbotenstoff-Gradienten nicht nur existieren, sondern auch weit verbreitet sind (siehe Abbildung 32).

Obwohl die direkte Evidenz fehlt, legen verschiedene publizierte Arbeiten nahe, dass gepulste cAMP Gradienten entstehen können. Ursprünglich wurde cAMP als weitreichender Signalstoff beschrieben (Kasai und Petersen 1994), aber mittlerweile kennt man auch sehr lokale Wirkungen des cAMP (Karpen und Rich 2001, Zaccolo et al. 2002), wobei in der Nähe der Adenylatcyclase noch höhere Konzentrationen gefunden wurden (Rich et al. 2000) als hier photolytisch freigesetzt wurden. Weiterhin weiß man, dass Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Neurotrophine sowohl gepulst als auch repetetiv ausgeschüttet werden und intrazelluläre Signal-ketten beeinflussen (Ghosh und Greenberg 1995).

Abbildung 32 Illustration, dass gepulste Quellen häufiger für die „Orientierung“ verwendet werden, wie das Beispiel aus der Seefahrt zeigt, das hier den Bezug zu den „navigational processes“ der Einleitung wieder herstellt.

Das heißt, man muss annehmen, dass gepulste Gradienten dieser Substanzen im Extrazellulärraum entstehen. Diese Substanzen sind auch dafür bekannt, das cAMP Niveau zu erhöhen (Bacskai et al. 1993, Hempel et al. 1996). Daraus kann man schließen, dass gepulste intrazelluläre Gradienten entstehen, da extrazelluläre Gradienten in intrazelluläre umgewandelt werden, die dann die Orientierungsreaktion auslösen

(Goodhill 1998, Song und Poo 2001, Song und Poo 1999, Tessier Lavigne und Goodman 1996).

Des Weiteren regulieren diese repetitiv ausgeschütteten Substanzen, wie zum Beispiel die Neurotransmitter und Neuromodulatoren, auch den Calciumhaushalt. Von Ca^{2+} wiederum weiß man, dass es sowohl in Gradienten als auch in gepulster Form auftritt (Davenport et al. 1996, Gomez et al. 2001, Hong et al. 2000, Silver et al. 1990, Zheng et al. 1994a, Zheng et al. 1996a). Die Adenylatcyklasen, die das cAMP produzieren, können durch das Ca^{2+} Niveau reguliert werden (Hanoune und Defer 2001, Mons et al. 1998). So könnten gepulste Ca^{2+} Gradienten die Vorläufer zu gepulsten cAMP Gradienten sein. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur von verflochtenen Signalketten gesprochen (Gorbunova und Spitzer 2002). Solche verflochtene Signalketten sind regulatorische Netzwerke. Diese wiederum erwerben neue Eigenschaften, welche die einzelnen Komponenten der Netzwerke nicht haben (Bhalla und Iyengar 1999). So könnte es sein, dass gepulste cAMP Gradienten nur in Zusammenhang mit gepulsten Ca^{2+} Gradienten entstehen.

All diese Argumente legen die Existenz von gepulsten cAMP Gradienten, die sich über einen Wachstumskegel erstrecken, nahe, obwohl sie bisher noch nicht direkt gemessen wurden. Ein Grund, warum es noch keine Beschreibung gepulster cAMP Gradienten gibt, liegt wahrscheinlich darin, dass die Methode diese nachzuweisen, erst seit jüngerer Vergangenheit verfügbar ist (Rich und Karpen 2002).

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Experimente der vorliegenden Arbeit legen die Schlussfolgerung nahe, dass es sich bei der hier gezeigten besseren Wirksamkeit von gepulster cAMP Freisetzung um einen generellen Mechanismus handelt, der weit verbreitet sein dürfte. Der Grund hierfür könnte in den Eigenschaften der Diffusion liegen. Diffusible Signalmoleküle, die gepulst freigesetzt werden, wirken grundsätzlich lokaler als solche, die kontinuierlich freigesetzt werden. Damit würde die Asymmetrie nachgeschalteter Signalmoleküle erhöht, was zur Signalverstärkung der vektoriellen Information eines extrazellulären Signals führen kann.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht, zusammen mit anderen Publikationen, die Bedeutung von zeitabhängigen Mechanismen für die neuronale Entwicklung (Gomez und Spitzer 1999, Gu und Spitzer 1995, Ming et al. 2001) und von raum-zeitlichen Phänomenen des Zweitbotenstoffes cAMP (Zaccolo et al. 2002) im besonderen. Die Tatsache, dass gepulste Gradienten wirksamer sind als kontinuierliche, könnte gerade bei der Entwicklung des Gehirns von weitreichender Bedeutung sein. Vor allem, wenn man sich vorstellt, dass Neurotransmitter gepulst ausgeschüttet werden, könnten solche gepulsten Gradienten zu gepulsten intrazellulären Zweitbotenstoffgradienten führen und so ein wesentlicher Teil der Zielauswahl sich orientierender Zellen sein.

Es ist aber auch denkbar, dass andere Botenstoffe als cAMP und Ca^{2+} gepulst vorkommen, beziehungsweise, dass Proteine eine zeitlich modulierte Aktivität haben. Auf diese Weise kann ein Signal sowohl verstärkt als auch lokal gehalten werden. Ein interessanter Aspekt wird es sein, die Verzahnung der Signalketten, die sich für den Fall cAMP und Ca^{2+} schon angedeutet hat (Gorbunova und Spitzer 2002), weiter aufzudecken. Der Komplexität der Regulation scheinen dabei keine Grenzen gesetzt, da an Entscheidungspunkten mehrere Gradienten überlappen können (Isbister et al. 2003). Dabei kann man sich gerade im Zusammenhang mit gepulsten intrazellulären Gradienten ganz neue Mechanismen der Regulation der Orientierung von Wachstumskegeln vorstellen.

Literatur

Adams, S. R., A. T. Harootunian, Y. J. Buechler, S. S. Taylor, and R. Y. Tsien. 1991. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349: 694-7.

Alberts, B. J., A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Wabler, P., ed. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.

Allbritton, N. L., T. Meyer, and L. Stryer. 1992. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5- trisphosphate. *Science* 258: 1812-5.

Altenhofen, W., J. Ludwig, E. Eismann, W. Kraus, W. Bonigk, and U. B. Kaupp. 1991. Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proceeding of the National Acadamy of Science of the United States of America* 88: 9868-9872.

Arendt, T. 2001. Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization. *Neuroscience* 102: 723-765.

Bacskai, B. J., B. Hochner, M. Mahaut-Smith, S. R. Adams, B. K. Kaang, E. R. Kandel, and R. Y. Tsien. 1993. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons. *Science* 260: 222-226.

Bagnard, D., N. Thomasset, M. Lohrum, A. W. Puschel, and J. Bolz. 2000. Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *The Journal of Neuroscience* 20: 1030-1035.

Baier, H., and F. Bonhoeffer. 1992. Axon guidance by gradients of a target-derived component. *Science* 255: 472-475.

Bandtlow, C. E. 2003. Regeneration in the central nervous system. *Experimental Gerontology.* 38: 79-86.

Bandtlow, C. E., M. F. Schmidt, T. D. Hassinger, M. E. Schwab, and S. B. Kater. 1993. Role of Intracellular Calcium in NI-35-Evoked Collapse of Neuronal Growth Cones. *Science* 259: 80-83.

Bartl, E. 2002. Untersuchungen zum Einfluss des Adenosins auf das Zytoskelett der Spinalganglienzellen des Haushuhns - Charakterisierung beteiligter Rezeptoren. *BioImaging Zentrum*. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.

Bedner, P., H. Niessen, B. Odermatt, K. Willecke, and H. Harz. 2003. A method to determine the relative cAMP permeability of connexin channels. *Experimental Cell Research* 291: 25-35.

Bellairs, R. O., M. 1988. *The Atlas of Chick Development*. Academic Press, London.

Bergles, D. E., J. S. Diamond, and C. E. Jahr. 1999. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 293-8.

Berninger, B., and M. Poo. 1999. Exciting neurotrophins. *Nature* 401: 862-863.

Bhalla, U. S., and R. Iyengar. 1999. Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* 283: 381-387.

Bolsover, S. R., S. H. Gilbert, and I. Spector. 1992. Intracellular cyclic AMP produces effects opposite to those of cyclic GMP and calcium on shape and motility of neuroblastoma cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 22: 99-116.

Bonhoeffer, F., and A. Gierer. 1984. How do retinal axons find their targets on the tectum? *Trends in Neurosciences* 7: 378-381.

Botelho, L. H. P., J. D. Rothermel, R. V. Coombs, and B. Jastorff. 1988. cAMP analog antagonists of cAMP action. *Methods in Enzymology* 159: 159-172.

Buonanno, A., and R. D. Fields. 1999. Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 110-120.

Campbell, D. S., and C. E. Holt. 2001. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32: 1013-1026.

Chen, C., T. Nakamura, and Y. Koutalos. 1999. Cyclic AMP diffusion coefficient in frog olfactory cilia. *Biophysical Journal* 76: 2861-2867.

Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell* 80: 259-68.

Cooper, D. M., N. Mons, and J. W. Karpen. 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374: 421-424.

Crank, J. 1975. *The Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press, Oxford.

Davenport, R. W., P. Dou, L. R. Mills, and S. B. Kater. 1996. Distinct calcium signaling within neuronal growth cones and filopodia. *Journal of Neurobiology* 31: 1-15.

De Koninck, P., and H. Schulman. 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca2+ oscillations. *Science* 279: 227-230.

Dickson, B. J. 2001. Rho GTPases in growth cone guidance. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 103-110.

Dickson, B. J., and K.-A. Senti. 2002. Axon guidance: growth cones make an unexpected turn. *Current Biology: CB* 12: R218-R220.

Dickson, T. C., P. A. Adlard, and J. C. Vickers. 2000. Sequence of cellular changes following localized axotomy to cortical neurons in glia-free culture. *Journal of Neurotrauma* 17: 1095-1103.

Dolmetsch, R. E., K. Xu, and R. S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392: 933-936.

Dremier, S., R. Kopperud, S. O. Doskeland, J. E. Dumont, and C. Maenhaut. 2003. Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Letters* 546: 103-107.

Drescher, U., C. Kremoser, C. Handwerker, J. Loschinger, M. Noda, and F. Bonhoeffer. 1995. In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82: 359-370.

Eco, U. *Das Foucaultsche Pendel*. 2002 Deutscher Taschenbuch Verlag, München.

Elfgang, C., R. Eckert, H. Lichtenberg-Frate, A. Butterweck, O. Traub, R. A. Klein, D. F. Hulser, and K. Willecke. 1995. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *The Journal of Cell Biology* 129: 805-17.

Eliot, L. S., Y. Dudai, E. R. Kandel, and T. W. Abrams. 1989. Ca2+/calmodulin sensitivity may be common to all forms of neural adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9564-9568.

Elks, M. L., and V. C. Manganiello. 1985. A role for soluble cAMP phosphodiesterases in differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Cellular Physiology* 124: 191-198.

Eshete, F., and R. D. Fields. 2001. Spike frequency decoding and autonomous activation of Ca2+-calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience* 21: 6694-6705.

Gallo, G., and P. Letourneau. 2002. Axon guidance: proteins turnover in turning growth cones. *Current Biology: CB* 12: R560.

Gell-Mann, M. 1996. *Das Quark und der Jaguar*. Piper, München.

Ghosh, A., and M. E. Greenberg. 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268: 239-47.

Gomez, T. M., E. Robles, M. Poo, and N. C. Spitzer. 2001. Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science* 291: 1983-1987.

Gomez, T. M., and N. C. Spitzer. 1999. *In vivo* regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 397: 350-355.

Goodhill, G. J. 1997. Diffusion in axon guidance. *European Journal Neuroscience* 9: 1414-1421.

—. 1998. Mathematical guidance for axons. *Trends in Neurosciences* 21: 226-231.

Goodman, C. S. 1996. Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annual Review of Neuroscience* 19: 341-377.

Gorbunova, Y. V., and N. C. Spitzer. 2002. Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca(2+) spikes. *Nature* 418: 93-96.

Grau, B. 2000. Eine Methode zur halbquantitativen Bestimmung des F-Aktins in subzellulären Kompartimenten. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Gregory, J., ed. 2002. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Haugland, P. R., Eugen.

Grunwald, I. C., and R. Klein. 2002. Axon guidance: receptor complexes and signaling mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology* 12: 250-259.

Gu, X., and N. C. Spitzer. 1995. Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca^{2+} transients. *Nature* 375: 784-787.

Guirland, C., K. B. Buck, J. A. Gibney, E. DiCicco-Bloom, and J. Q. Zheng. 2003. Direct cAMP signaling through G-protein-coupled receptors mediates growth cone attraction induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *The Journal of Neuroscience 23: 2274-2283.*

Gundersen, R. W., and J. N. Barrett. 1980. Characterization of the turning response of dorsal root neurites toward nerve growth factor. *The Journal of Cell Biology* 87: 546-554.

Hagen, V., C. Dzeja, J. Bendig, I. Baeger, and U. B. Kaupp. 1998. Novel caged compounds of hydrolysis-resistant 8-Br-cAMP and 8-Br-cGMP: photolabile NPE esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 42: 71-78.

Hagen, V., C. Dzeja, S. Frings, J. Bendig, E. Krause, and U. B. Kaupp. 1996. Caged compounds of hydrolysis-resistant analogues of cAMP and cGMP: synthesis and application to cyclic nucleotide-gated channels. *Biochemistry* 35: 7762-7771.

Hanoune, J., and N. Defer. 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41: 145-174.

Hempel, C. M., P. Vincent, S. R. Adams, R. Y. Tsien, and A. I. Selverston. 1996. Spatio-temporal dynamics of cyclic AMP signals in an intact neural circuitm. *Nature* 384: 166-169.

Holland, G. R. 1996. Experimental trigeminal nerve injury. *Critical Reviews In Oral Biology And Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 7: 237-258.

Hong, K., M. Nishiyama, J. Henley, M. Tessier-Lavigne, and M. Poo. 2000. Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature* 403: 93-98.

Höpker, V. H., D. Shewan, M. Tessier-Lavigne, M. Poo, and C. Holt. 1999. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin- 1. *Nature* 401: 69-73.

Horner, P. J., and F. H. Gage. 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407: 963-70.

Igarashi, M., S. M. Strittmatter, T. Vartanian, and M. C. Fishman. 1993. Mediation by G Proteins of Signals that Cause Collapse of Growth Cones. *Science* 259: 77-79.

Isbister, C. M., P. J. Mackenzie, K. C. W. To, and T. P. O'Connor. 2003. Gradient steepness influences the pathfinding decisions of neuronal growth cones in vivo. *Journal of Neuroscience* 23: 193-202.

Jackson, E. K., and R. K. Dubey. 2001. Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology. *American Journal of Physiology: Renal Physiology* 281: F597-612.

Jin, Z., and S. M. Strittmatter. 1997. Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *The Journal Of Neuroscience* 17: 6256-6263.

Kandel, E. R. S., J. H. Jessel, T. M., ed. 2000. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, New York.

Kao, H.-T., H.-j. Song, B. Porton, G.-l. Ming, J. Hoh, M. Abraham, A. J. Czernik, V. A. Pieribone, M.-m. Poo, and a. Greengard et. 2002. A protein kinase A-dependent molecular switch in synapsins regulates neurite outgrowth. *Nature Neuroscience* 5: 431-437.

Kapfhammer, J. P., and J. A. Raper. 1987. Collapse of growth cone structure on contact with specific neurites in culture. *The Journal of Neuroscience* 7: 201-12.

Karpen, J. W., and T. C. Rich. 2001. The fourth dimension in cellular signaling. *Science* 293: 2204-2205.

Kasai, H., and O. H. Petersen. 1994. Spatial dynamics of second messengers: IP3 and cAMP as long-range and associative messengers. *Trends in Neurosciences* 17: 95-101.

Kase, H., K. Iwahashi, S. Nakanishi, Y. Matsuda, K. Yamada, M. Takahashi, C. Murakata, A. Sato, and M. Kaneko. 1987. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 142: 436-40.

Kater, S. B., M. P. Mattson, C. Cohan, and J. Connor. 1988. Calcium Regulation of the Neuronal Growth Cone. *Trends in Neurosciences* 11: 315-321.

Kater, S. B., and V. Rehder. 1995. The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Current Opinion in Neurobiology* 5: 68-74.

Kaupp, U. B., C. Dzeja, S. Frings, J. Bendig, and V. Hagen. 1998. Applications of caged compounds of hydrolysis-resistant analogs of cAMP and cGMP. *Methods in Enzymology* 291: 415-430.

Klages, S. 1997. *Kurzes Lehrbuch der Physik*. Springer, Berlin.

Kozma, R., S. Sarner, S. Ahmed, and L. Lim. 1997. Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Molecular and Cellular Biology* 17: 1201-1211.

Landis, S. C. 1983. Neuronal Growth Cones. *Annual Review of Physiology* 45: 567-580.

Lanier, L. M., M. A. Gates, W. Witke, A. S. Menzies, A. M. Wehman, J. D. Macklis, D. Kwiatkowski, P. Soriano, and F. B. Gertler. 1999. Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 22: 313-325.

Lauder, J. M. 1993. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends in Neurosciences* 16: 233-240.

Levi-Montalcini, R. 1987. The Nerve Growth Factor 35 Years Later. *Science* 237: 1154-1162.

Li, W., J. Llopis, M. Whitney, G. Zlokarnik, and R. Y. Tsien. 1998. Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca2+ spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 392: 936-941.

Lohof, A. M., M. Quillan, Y. Dan, and M.-M. Poo. 1992. Asymmetric modulation of cytosolic cAMP activity induces growth cone turning. *The Journal of Neuroscience* 12: 1253-1261.

Lorenz, R. J. 1984. *Grundbegriffe der Biometrie*. Gustav Fischer, Stuttgart.

Lowe, G., and G. H. Gold. 1993. Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander. *The Journal Of Physiology* 462: 175-196.

Ludwig, J., T. Margalit, E. Eismann, D. Lancet, and U. B. Kaupp. 1990. Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Letters* 270: 24-29.

Luo, L., L. Y. Jan, and Y. N. Jan. 1997. Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling. *Current Opinion in Neurobiology* 7: 81-86.

McCray, J. A., and D. R. Trentham. 1989. Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annual Review in Biophysics and Biophysical Chemistry* 18: 239-270.

McKinney, R. A., D. Debanne, B. H. Gahwiler, and S. M. Thompson. 1997. Lesion-induced axonal sprouting and hyperexcitability in the hippocampus in vitro: implications for the genesis of posttraumatic epilepsy. *Nature Medicine* 3: 990-996.

Meinhardt, H. 1999. Orientation of chemotactic cells and growth cones: models and mechanisms. *Journal of Cell Science* 112: 2867-2874.

Messler, P., H. Harz, and R. Uhl. 1996. Instrumentation for multiwavelengths excitation imaging. *Journal of Neuroscience Methods* 69: 137-47.

Ming, G., J. Henley, M. Tessier Lavigne, H. Song, and M. Poo. 2001. Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* 29: 441-452.

Ming, G., H. Song, B. Berninger, N. Inagaki, M. Tessier-Lavigne, and M. Poo. 1999. Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. *Neuron* 23: 139-148.

Ming, G. L., H. J. Song, B. Berninger, C. E. Holt, M. Tessier Lavigne, and M. M. Poo. 1997. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19: 1225-1235.

Ming, G.-L., S. T. Wong, J. Henley, X.-B. Yuan, H.-J. Song, N. C. Spitzer, and M.-M. Poo. 2002. Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* 417: 411-418.

Miura,K., and F. Siegert. 2000. Light affects cAMP signaling and cell movement activity in Dictyostelium discoideum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:2111-6.

Mizuhashi, S., N. Nishiyama, N. Matsuki, and Y. Ikegaya. 2001. Cyclic nucleotide-mediated regulation of hippocampal mossy fiber development: a target-specific guidance. *The Journal of Neuroscience* 21: 6181-6194.

Mons, N., L. Decorte, R. Jaffard, and D. M. Cooper. 1998. Ca2+-sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sciences* 62: 1647-1652.

Mons, N., J. L. Guillou, and R. Jaffard. 1999. The role of Ca2+/calmodulin-stimulable adenylyl cyclases as molecular coincidence detectors in memory formation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 55: 525-533.

Mueller, B. K. 1999. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annual Review of Neuroscience* 22: 351-388.

Munck, S. 1999. Wachstum und Calciumtransienten in Spinalnervneuronen von Gallus gallus. *Botanisches Institut*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Neumann, S., F. Bradke, M. Tessier-Lavigne, and A. I. Basbaum. 2002. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34: 885-893.

Nishiyama, M., A. Hoshino, L. Tsai, J. R. Henley, Y. Goshima, M. Tessier-Lavigne, M.-M. Poo, and K. Hong. 2003. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 423: 990-995.

Noegel, A. A., and M. Schleicher. 2000. The actin cytoskeleton of Dictyostelium: A story told by mutants. *Journal of Cell Science* 113: 759-766.

Orlov, S. N., and N. V. Maksimova. 1999. Efflux of cyclic adenosine monophosphate from cells: mechanisms and physiological implications. *Biochemistry (Moscow)* 64: 127-135.

Parent, C. A., and P. N. Devreotes. 1999. A cell's sense of direction. *Science* 284: 765-770.

Petersen, O. H., and J. M. Cancela. 2000. Attraction or repulsion by local Ca(2+) signals. *Current Biology* 10: R311-314.

Polder, H. R., Swandulla, D., Konnerth, A. Lux, H.D. 1984. An improved high current single electrode currentrvoltage clamp system. *Pflügers Arch* 406: R43.

Price, C. J., and J. I. Goldberg. 1993. Serotonin activation of a cyclic AMP-dependent sodium current in an identified neuron from Helisoma trivolvis. *The Journal of Neuroscience* 13: 4979-4987.

Ramón y Cajal, S. 1893. La Retine des Vertebres. *La Cellule* 9: 119-258.

—. 1998. *Texture of the nervous system of men and vertebrates An annotated and edited translation of the original Spanish text with the additi*. Springer, Berlin.

Reichert, H., and G. Boyan. 1997. Building a brain: developmental insights in insects. *Trends in Neurosciences* 20: 258-264.

Rich, T. C., K. A. Fagan, H. Nakata, J. Schaack, D. M. Cooper, and J. W. Karpen. 2000. Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *The Journal of General Physiology* 116: 147-61.

Rich, T. C., and J. W. Karpen. 2002. Review article: Cyclic AMP sensors in living cells: What signals can they actually measure? *Annals of Biomedical Engineering* 30: 1088-1099.

Rothermel, J. D., and L. H. Parker Botelho. 1988. A mechanistic and kinetic analysis of the interactions of the diastereoisomers of adenosine 3',5'-(cyclic)phosphorothioate with purified cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochemical Journal* 251: 757-762.

Rüsse, I. S. F. 1991. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Paul Parey Verlag, Hamburg.

Sato, T., R. Sato-Harada, M. Takano, S. Kato, S. Saburi, and A. Harada. 2002. Localization of cAMP-dependent protein kinase in the actin and microtubule cytoskeletons in mouse hippocampal neurons. *Neuroscience Letters* 325: 83-86.

Schwab, M. E. 1996. Molecules inhibiting neurite growth: a minireview. *Neurochemical Research* 21: 755-61.

Silver, R. A., A. G. Lamb, and S. R. Bolsover. 1990. Calcium hotspots caused by L-channel clustering promote morphological changes in neuronal growth cones. *Nature* 343: 751-4.

Skaper, S. D., L. Facci, D. Milani, A. Leon, and G. Toffano. 1990. Culture and use of primary and clonal neural cells. Pages 17-33 in C. M.P., ed. *Cell Culture*. Academic Press, New York.

Smith, S. J. 1994. Neurobiology. Just a chemical attraction. *Nature* 368: 101-102.

Snider, W. D., F.-Q. Zhou, J. Zhong, and A. Markus. 2002. Signaling the Pathway to Regeneration. *Neuron* 35: 13-16.

Sobel, D. 1998. *Längengrad*. Goldmann, Berlin.

Song, H., and M. Poo. 2001. The cell biology of neuronal navigation. *Nature Cell Biology* 3: E81-8.

Song, H. J., G. L. Ming, and M. M. Poo. 1997. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388: 275-279.

Song, H. J., and M. M. Poo. 1999. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 355-363.

Spitzer, N. C. 2002. Activity-dependent neuronal differentiation prior to synapse formation: the functions of calcium transients. *Journal of Physiology, Paris* 96: 73-80.

Sutherland. 1971. *From Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1971-1980*. World Scientific Publishing Co., Singapore.

Takei, K., R. M. Shin, T. Inoue, K. Kato, and K. Mikoshiba. 1998. Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in growth cones. *Science* 282: 1705-1708.

Tanaka, E., and J. Sabry. 1995. Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83: 171-176.

Tessier Lavigne, M., and C. S. Goodman. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274: 1123-1133.

Tessier-Lavigne, M., and C. S. Goodman. 2000. Regeneration in the Nogo zone. *Science* 287: 813-814.

Tigyi, G., D. J. Fischer, A. Sebok, F. Marshall, D. L. Dyer, and R. Miledi. 1996. Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: neurite-protective effects of cyclic AMP signaling. *Journal Of Neurochemistry* 66: 549-558.

Twain, M. 1835 - 1910. *Leben auf dem Mississipi*. Bitter, 1977 Recklinghausen.

Uhl, R. 1998 Erster Preis des Münchner Research Festivals p. Kommunikation, München.

Unwin, N. 1993. Neurotransmitter Action: Opening of Ligand-Gated Ion Channels. *Cell* 72: 31-41.

Weiss, E. R., P. Maness, and J. M. Lauder. 1998. Why do neurotransmitters act like growth factors? *Perspectives on Developmental Neurobiology* 5: 323-335.

Wiemelt, A. P., M. J. Engleka, A. F. Skorupa, and F. A. McMorris. 1997. Immunochemical visualization and quantitation of cyclic AMP in single cells. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31489-95.

Wilde, O. *An ideal husband*. 1999 Penguin Books, New York.

Wilkes, M. geboren 1913. Ausspruch. Wikipedia.

Xia, Z., and D. R. Storm. 1997. Calmodulin-regulated adenylyl cyclases and neuromodulation. *Current Opinion in Neurobiology* 7: 391-6.

Xiang, Y., Y. Li, Z. Zhang, K. Cui, S. Wang, X.-b. Yuan, C.-p. Wu, M.-m. Poo, and S. Duan. 2002. Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nature Neuroscience* 5: 843-848.

Zaccolo, M., F. De Giorgi, C. Y. Cho, L. Feng, T. Knapp, P. A. Negulescu, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, and T. Pozzan. 2000. A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nature Cell Biology* 2: 25-9.

Zaccolo, M., P. Magalhães, and T. Pozzan. 2002. Compartmentalisation of cAMP and Ca signals. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 160-166.

Zaccolo, M., and T. Pozzan. 2002. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295: 1711-1715.

Zhang, H. L., R. H. Singer, and G. J. Bassell. 1999. Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *The Journal of Cell Biology* 147: 59-70.

Zheng, J. Q. 2000. Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions. *Nature* 403: 89-93.

Zheng, J. Q., M. Felder, J. A. Connor, and M. M. Poo. 1994a. Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 368: 140-144.

Zheng, J. Q., M. M. Poo, and J. A. Connor. 1996a. Calcium and chemotropic turning of nerve growth cones. *Perspectives on Developmental Neurobiology* 4: 205-213.

Zheng, J. Q., J. J. Wan, and M. M. Poo. 1996b. Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *The Journal of Neuroscience* 16: 1140-1149.

Zheng, J. Q., Z. Zheng, and M. Poo. 1994b. Long-range signaling in growing neurons after local elevation of cyclic AMP-dependent activity. *The Journal of Cell Biology* 127: 1693-701.

Anhang

Liste der verwendeten Abkürzungen, Symbole und Fachausdrücke

°C	Grad Celsius
%	Prozent
°	Winkeleinheit (Grad)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AM	Acetoxymethyl Ester, eine von Esterasen abspaltbare Gruppe, die Fluo-4 (und auch andere Stoffe) membrangängig macht
Bad	ein Puffer (siehe Material und Methoden)
Ca^{2+}	Calciumionen
Caged cAMP	Kafigverbindung des cAMP (siehe Einleitung)
cAMP auch cyclisches AMP	Adenosin 3',5'-cyclisches monophosphat
CNG	Cyclic nucleotide gated, bezieht sich auf Kanäle die auf Bindung von Nukleotiden ihre Offenwahrschein-lichkeit verändern
D	Diffusionskoeffizient

Dichroit	Halbdurchlässiger Spiegel, die Spiegeleigenschaften hängen von der Wellenlänge ab
DMEM	Dulbecos Modified Eagle Medium, ein Bestandteil der Medien (siehe Material und Methoden)
DMEM-F12	Dulbecos Modified Eagle Medium mit dem Supplement F12, ein Bestandteil der Medien (siehe Material und Methoden)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	Dorsal root ganglion, Hinterwurzelganglion, Ganglion sensorischer Nerven
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälber Serum
Fluo-4	Ein Fluoreszenzfarbstoff, der Ca^{2+} bindet und daraufhin seine Fluoreszenzeigenschaften ändert (K_d=345 nM, siehe Material und Methoden)
G-Protein	Heterotrimeres Guanosinphosphat-bindeprotein
Hanks	Ein Puffer (siehe Material und Methoden)
HeLa	Zelllinie die aus einem Gebärmutterhalskarzinom hervorging
Hepes	Eine Pufferlösung
Hg-Lampe	Quecksilberdampflampe
I	Stromstärke in Ampere
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine, ein PDE Inhibitor
IP_3	Inositol 1,4,5-triphosphat

Knickwinkel	Winkel zwischen der Ordinate und einer Linie die durch den Ursprung des Koordinatensystems und dem Endpunkt des Wachstums gelegt wurde.
KT5720	(9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid hexyl ester, ein PKA Ihnhibitor
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
max	Maximal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
NGF	Nerv growth factor, ein Neurotrophin
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPE-caged cAMP	Adenosin 3',5'-cyclisches monophosphat, P1-(2-nitrophenyl) Ethyl Ester. cAMP mit Käfiggruppe versehen
MΩ	Megaohm
PDE	Phosphodiesterase
p	Wahrscheinlichkeit
p.a.	Per analysi

pA	Picoampere
PBS	Phosphat Buffered Saline, ein Puffer (siehe Material und Methoden)
pH	pH-Wert, Angabe zum Säure beziehungsweise Basegehalt
Photonenflussdichte	Anzahl der Photonen pro Fläche
PKA	Protein Kinase A
Rp-cAMPS	Rp-cAMPS triethylammoniumsalz, ein PKA Inhibitor
S	Svedberg
s	Sekunde
Spine	Auch Dendritendorn genannt
t	Zeit
τ	Zerfalls- oder Abbaukonstante
-trop	Richtungsreaktioninduzierend
-troph	Wachstumsfördernd
Tropismus	Eine Richtungsantwort eines Organs
U	Testwert eines statistischen Tests (Mann-Whitney *U*)
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultra violettes Licht
V	Volt
v	Volumen
x	Strecke

Curriculum Vitae

Munck Sebastian Ludwig Victor

Landshoffstr. 24
81247 München

geboren am	26.03.1974
in	München
Familienstand	verheiratet; ein Kind
Schulbildung	
1980-1984	Grundschule in Germering
1984-1993	Carl Spitzweg Gymnasium in Germering Abschluss: Abitur
Studium	
November 1993 – März 1999	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München Abschluss: Diplom
Praktika	
August - September 1993	Alkor GmbH Kunststoffe
Oktober 1997	Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (in Uganda)
November 1997-Februar 1998	Lehrassistent für das Tierphysiologische Praktikum
Weiterer Werdegang	
April 1999 – September 2003	Doktorarbeit am BioImaging Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Abschluss der praktischen Arbeit im September 2003
Freie Mitarbeit	
Mai 2000 & Juni 2003	TILL Photonics GmbH
seit September 2003	Produktmanager, TILL Photonics GmbH
Sonstiges	gute Sprachkenntnisse in Englisch, routinierter Umgang mit den Macintosh und Microsoft Betriebssystemen, dem Officepacket sowie Bildverarbeitungsoftware und Scripting
Hobbys	Fotografieren, Wörter

München, den 18. März 2004

Publikationsliste

Munck, S. 1999. Wachstum und Calciumtransienten in Spinalnervneuronen von Gallus gallus. *Diplomarbeit am Botanischen Institut*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Grau, B., S. Steinhaus, S. Munck, S. Lücker, R. Uhl, and H. Harz. 2001. Purinergic compounds affect the F-actin content of sensory neurons. Pages 947 in N. Elsner and W. Kreutzberg, eds. *Göttingen Neurobiology Report 2001: Proceedings of the 4th Meeting of the German Neuroscience Society 2001; 28th Göttingen Neurobiology Conference 2001*. Georg Thieme, Stuttgart.

Munck, S., R. Uhl, and H. Harz. 2002. A ratiometric imaging method for mapping ion flux densities. *Cell Calcium* 31: 27-35.

Munck, S. G., B. Bartl, E. Harz, H. 2002. Poster Session: Development and Plasticity. Pages 711-731. *International Society of Developmental Neuroscience 2002 Meeting*. International Journal of Developmental Neuroscience, Sydney.

Munck, S. 2002. How to turn cells on: Spatially confined uncaging techniques. *1st International Workshop Kinetic Fluorescence Imaging of Plants in Nove Hrady*.

Grau, B., S. Munck, E. Bartl, S. Steinhaus, and H. Harz. 2003. New Player in neuronal Guidance. Adenosine and Dopamine. *33rd Annual Meeting*. Society for Neuroscience, New Orleans.

Munck, S. 2003. Workshop: Towards automated fluorescence microscopic measurements. *EMBO Workshop on Advanced Light Microscopy 3rd International Meeting of ELMI Barcelona 2003*: 35.

Munck, S., P. Bedner, T. Bottaro, and H. Harz. 2004. Spatio temporal properties of cytoplasmic cAMP gradients can alter the turning behavior of neuronal growth cones. *European Journal of Neuroscience* 19: 791-797

Danksagung

Ich danke:

Prof. Dr. Rainer Uhl für die reichhaltigen Möglichkeiten und die Erfahrungen, die ich aus der ersten Reihe erleben durfte

Dr. Hartmann Harz für die Lebenshilfe und Angsttherapie

Aurelia Munck dafür, dass sie immer da war für mich

Iolanda Munck dafür, dass sie mir gezeigt hat worauf es wirklich ankommt

Meinen Eltern für ihre Geduld

Florian Munck für: „Studiere nie Chemie“

Meine Schwiegereltern für die Steigerung der Lebensfreude

Meinen Schwägern und Schwägerinnen für die großartige Unterstützung

Benjamin Grau für: „Jeder sollte einen Ben haben“ und unersetzlich zu sein

Michael Fleuchaus für: das Vorausgehen und die gute Zusammenarbeit

Eva Bartl für: „Hihihi“ und die gute Zusammenarbeit

Peter Bedner für: „Hey wart ihr das schon wieder“ und die gute Zusammenarbeit

Thierry Bottaro für: „Confiserie sans frontieres“ und die gute Zusammenarbeit

Allegra und Jules Mumm für das Bereitstellen der Neurotrophine