

"Charakterisierung ionotroper purinergere Rezeptoren
im *Nucleus arcuatus* des Rattengehirns"



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

durchgeführt am
Institut für Veterinär-Physiologie
und -Biochemie

vorgelegt von

Diplombiologe
Eric Pollatzek
aus Mittweida

Gießen 2014

Aus "Institut für Tierphysiologie"
Betreuer: Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan

"Institut für Veterinär-Physiologie
und -Biochemie"
Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

"Charakterisierung ionotroper purinergere Rezeptoren im
Nucleus arcuatus des Rattengehirns"

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

durchgeführt am
Institut für Veterinär-Physiologie
und -Biochemie

vorgelegt von

Diplombiologe
Eric Pollatzek
aus Mittweida

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereiches Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan

2. Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

(Ort / Datum)

(Eric Pollatzek)

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| 2-MeSATP | 2-Methylthioadenosin-5'triphosphat |
| α -MSH | α -Melanozyten-stimulierendes Hormon |
| α,β me-ATP | α,β -Methylenadenosin-5'triphosphat |
| ABC | <i>ATP binding cassette</i> |
| aCa | <i>Commissura anterior</i> |
| ACh | Acetylcholin |
| ACTH | adrenocorticotrophes Hormon |
| ADH | Antidiuretisches Hormon |
| ADP | Adenosin-5`diphosphat |
| AGRP | <i>agouti gene-related peptide</i> |
| AMP | Adenosin-5`monophosphat |
| ANOVA | analysis of variance |
| AP | <i>Area postrema</i> |
| AR | metabotroper Adenosin-Rezeptor |
| ARC | <i>Nucleus arcuatus</i> |
| ARW | Anregungswellenlänge |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosin-5`triphosphat |
| BDNF | <i>brain-derived neurotrophic factor</i> |
| BHS | Blut-Hirn Schranke |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| BzATP | 2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'triphosphat |
| CA1-3 | <i>Cornu ammonis</i> -Regionen 1 – 3 |
| Caa | <i>Commissura alba anterior</i> |
| cAMP | zyklisches Adenosin-5`monophosphat |
| Cap | <i>Commissura alba posterior</i> |
| CART | Cocain- und Amphetamin regulierendes Transkript |
| cc | <i>Corpus callosum</i> |
| CCK | Cholecystokinin |
| Cd | <i>Cornu dorsale</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| ChP | <i>Plexūs chorioidei</i> |
| CREB | cAMP-responsives Element-bindendes Protein |
| CRH | <i>corticotropin-releasing hormone</i> |
| CSF | cerebrospinale Flüssigkeit |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| C _T | <i>cycle threshold</i> |
| Cv | <i>Cornu ventrale</i> |
| CVO | zirkumventrikuläres Organ |
| DA | Dopamin |
| DAG | Diacylglycerol |
| DAPI (-Dilaktat) | 4', 6-diamidino-2-phenylindol (-Dilaktat) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMH | <i>Nucleus dorsomedialis hypothalami</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DRG | <i>Ganglion spinale</i> |
| dsDNA | <i>double strand DNA</i> |
| DTT | Dithiothreitol |
| EC ₅₀ | mittlere effektive Konzentration |
| E-NPP | Ekto-Nukleotidpyro-Phos-phatasen/-Phosphodiesterase |
| E-NTPDase | schließen Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase |
| EDTA | Ethylendiamin Tetraessigsäure |
| EM | <i>Eminentia mediana</i> |
| ERK | <i>extracellular signal-related kinase</i> |
| EW | Emissionswellenlänge |
| f | <i>Fornix cerebri</i> |
| FAM® | 6-Carboxy-Fluoreszin |
| FKS | fetales Kälberserum |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers |
| GABA | γ-Amino-Buttersäure |
| GBSS | <i>Gey's balanced salt solution</i> |
| GFAP | <i>glial fibrillary acidic protein</i> |
| GH | <i>growth hormone</i> |
| GHRH | <i>growth hormone-releasing hormone</i> |
| GHS | <i>growth hormone secretagogues</i> |
| GnRH | <i>gonadotrophin-releasing Hormon</i> |
| GPCR | G-Protein-gekoppelten Rezeptoren |
| GPI | Glykosylphosphatidylinosit |
| HBSS | <i>Hank's buffered salt solution</i> |
| HEK | <i>human embryonic kidney</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2- Ethansulfonsäure) |
| hip | <i>Hippocampus proprius</i> |
| HHL | Hypophysenhinterlappen |
| HVL | Hypophysenvorderlappen |
| HYP | Hypothalamus |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| icv | intracerebroventrikulär |
| IGF-1 | <i>insulin-like growth factor 1</i> |
| IH | <i>inhibiting</i> Faktor |
| IL | Interleukin |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| JAK | Janus Kinase |
| KT | Körpertemperatur |
| LH | <i>Regio lateralis hypothalamica</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LuH | luteinisierendes Hormon |
| LV | lateraler Ventrikel |
| M-MLV | <i>monkey murine leukemia virus</i> |
| MAP | <i>microtubule associated protein 2</i> |
| MAP-Kinasen | <i>mitogen-activated</i> Kinasen |
| MCH | <i>melanin concentrating hormone</i> |
| MDT | Magen-Darm-Trakt |
| MHC-II | Haupthistokompatibilitätskomplex-II |
| MnPO | <i>Nucleus praeopticus medianus</i> |
| MPOA | <i>Regio praeoptica medialis</i> |
| mRNA | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure |
| NA | Noradrenalin |
| NAc | <i>Nucleus accumbens</i> |
| NANC | nicht-adrenerg, nicht-cholinerg |
| NBA | Neurobasal |
| NBS | unspezifischen Bindung |
| NFQ | Nicht-fluoreszierende Quencher |
| NHERF | <i>Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor</i> |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxidsynthase |
| NPY | Neuropeptid Y |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| NSE | neuronenspezifische Enolase |
| NT | Neurotensin |
| NTG | <i>Nucleus trigeminalis</i> |
| NTS | <i>Nucleus tractus solitarius</i> |
| och | <i>Chiasma opticum</i> |
| OD | optische Dichte |
| ODC | Oligodendrozyten |
| opt | <i>Tractus opticus</i> |
| OT | Oxytocin |
| OVLТ | <i>Organum vasculosum laminae terminalis</i> |
| P1 | Adenosin-Rezeptoren |
| P2 | purinerge Rezeptoren |
| P2XR | ionotrope P2X-Rezeptoren |
| P2YR | metabotrope P2Y-Rezeptoren |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| PC12 | Phäochromocytom-Zelllinie 12 |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PE | <i>Nucleus periventricularis</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PIF | <i>PRL-inhibiting</i> Faktoren |
| PIN | <i>Glandula pinealis</i> |
| PLC | Phospholipase C |
| PM | Plasmamembranfraktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| POA | <i>Regio praeoptica</i> |
| POMC | Proopiomelanocortin |
| PPADS | Pyridoxalphosphat-6-Azo(Benzoyl-2,4-Disulfonsäure) |
| PRF | <i>PRL-releasing</i> Faktoren |
| PRL | Prolaktin |
| PVN | <i>Nucleus paraventricularis</i> |
| qRT-PCR | Quantitative real-time PCR |
| Rb-2 | Reactive blue-2 |
| RH | <i>releasing</i> Faktor |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| RM | Rückenmark |
| RP | Rezeptorpuffer |
| RQ | relative quantity, Relative Menge |
| RRA | Radiorezeptor-Assays |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | reverse Transkriptase PCR |
| SCN | <i>Nucleus suprachiasmaticus</i> |
| S.E.M. | <i>standard error of the mean</i> |
| SFO | <i>Organum subfornicale</i> |
| SOM | Somatostatin |
| SON | <i>Nucleus supraopticus</i> |
| ssDNA | single-strand DNA |
| STAT | <i>signal transducer and activator</i> |
| TH | Tyrosinhydroxylase |
| TIDA | tuberoinfundibuläre Dopaminsystem |
| TJ | <i>tight junctions</i> |
| TRL | <i>Toll-like</i> Rezeptor |
| TM | transmembranalen Domäne |
| TMN | <i>Nucleus tuberomammillare</i> |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| TNP-ATP | 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)Adenosin-5'triphosphat |
| TO | Gesamtbindung |
| TRH | Thyreotropin- <i>releasing hormone</i> |
| TRM | thorakales Rückenmark |
| TSH | Thyreoidea-stimulierendes Hormon |
| UDP | Uridin-5`diphosphat |
| UTP | Uridin-5`triphosphat |
| UV | ultraviolett |
| V-III | <i>Ventriculus tertius cerebri</i> |
| VLPO | <i>Nucleus ventrolateralis praeopticus</i> |
| VMH | <i>Nucleus ventromedialis hypothalami</i> |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

| | | |
|-------------|---|----|
| Abb. EIN 1: | Freisetzungsmechanismen für ATP im ZNS | 15 |
| Abb. EIN 2: | Die Funktion von Ektonukleotidasen in der sequentiellen Aktivierung purinerner Rezeptoren | 16 |
| Abb. EIN 3: | Regulation der Somatotropinsynthese und -freisetzung aus dem HVL | 19 |
| Abb. EIN 4: | Regulation der Prolaktinsynthese und -freisetzung aus dem HVL | 22 |
| Abb. EIN 5: | Vereinfachtes Model der Energiehomöostase auf hypothalamischer Ebene | 29 |

2. Material und Methoden

| | | |
|-------------|---|-----|
| Abb. MM 1: | Prinzip des "Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers" (FRET) | 49 |
| Abb. MM 2 : | Funktionsweise der <i>TaqMan</i> ®-Hydrolysesonde am Beispiel eines Einzelstrangs | 50 |
| Abb. MM 3: | Lokalisation des <i>Nucleus arcuatus</i> im coronalen Gehirnschnitt einer früh-postnatalen Ratte | 60 |
| Abb. MM 4: | Exzitationsspektrum von Fura-2 | 64 |
| Abb. MM 5: | Schematischer Aufbau des Superfusions-Systems zur Stimulation der neuroglialen Zellen der ARC-angereicherten Primärkultur | 66 |
| Abb. MM 6: | Graphische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Kalzium Ratio-Imaging Messprotokolls der vergleichenden Superfusionsstimulation in Zellen der ARC-Primärkultur mit verschiedenen P2XR-Agonisten bei RT | 70 |
| Abb. MM 7: | Graphische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Kalzium Ratio-Imaging Messprotokolls bei repetitiver, 2-MeSATP-induzierter Stimulation der Zellen der ARC-Primärkultur in An- bzw. Abwesenheit an extrazellulärem Kalzium | 72 |
| Abb. MM 8: | Graphische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Kalzium Ratio-Imaging Messprotokolls bei 2-MeSATP-induzierter Stimulation der Zellen der ARC-Primärkultur in An- bzw. Abwesenheit von Purinozeptorantagonisten | 74 |
| Abb. MM 9: | Sagittalschnitt durch das <i>Cerebrum</i> der Ratte | 86 |
| Abb. MM 10: | Sagittalschnitt durch das <i>Cerebrum</i> der Ratte | 99 |
| Abb. MM 11: | Schematischer Aufbau des Autoradiographiestandes | 100 |

3. Ergebnisse

| | | |
|-------------|--|-----|
| Abb. ERG 1: | Relative mRNA-Expression ionotroper Purinozeptoren im ARC resp. MnPO adulter und neonataler Ratten, sowie in den neuroglialen Primärkulturen des ARC bzw. MnPO (N = 3 - 4) | 107 |
|-------------|--|-----|

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abb. ERG 2: Immunzytochemische Identifizierung der Zellen in der ARC-Primärkultur neonataler Ratten | 109 |
| Abb. ERG 3: Prozentualer Anteil der immunzytochemisch nachgewiesenen Zelltypen in der neuroglialen ARC-Primärkultur | 109 |
| Abb. ERG 4: Immunhistochemischer Nachweis wichtiger Neurotransmitter- bzw. Neurohormonsysteme im <i>Nucleus arcuatus</i> der adulten Ratte | 110 |
| Abb. ERG 5: Immunzytochemischer Nachweis von ACTH, NPY, NT, SOM und TH in Neuronen der ARC-Primärkultur neonataler Ratten | 112 |
| Abb. ERG 6: Darstellung der Kolokalisation von dopaminergen Zellen mit ACTH, NPY, NT bzw. SOM in Zellen der ARC-Primärkultur neonataler Ratten | 117 |
| Abb. ERG 7: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit den Purinozeptoragonisten ATP, 2-MeSATP und α,β -meATP in äquimolarer Konzentration bei RT | 120 |
| Abb. ERG 8: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit den Purinozeptoragonisten BzATP sowie 2-MeSATP bei KT | 122 |
| Abb. ERG 9: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in aufsteigender Konzentration (Dosisabhängigkeit) bei RT | 125 |
| Abb. ERG 10: Repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in konstanter Konzentration. | 130 |
| Abb. ERG 11: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulären Kalziumionen bei RT | 135 |
| Abb. ERG 12: Vergleichende repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP (10^{-6} M) unter wechselnden RT- und KT-Temperaturbedingungen | 139 |
| Abb. ERG 13: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten PPADS (10^{-4} M) bei KT | 142 |
| Abb. ERG 14: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten PPADS (10^{-5} M) bei KT | 145 |
| Abb. ERG 15: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten Suramin (10^{-4} M) bei KT | 148 |
| Abb. ERG 16: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten Suramin (10^{-5} M) bei KT | 150 |
| Abb. ERG 17: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten Reactive blue-2 (10^{-5} M) bei KT | 152 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abb. ERG 18: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten Reactive blue-2 (10^{-6} M) bei KT | 155 |
| Abb. ERG 19: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des Subtyp-spezifischen P2X-Rezeptorantagonisten TNP-ATP (10^{-5} M) bei KT | 160 |
| Abb. ERG 20: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des Subtyp-spezifischen P2X-Rezeptorantagonisten TNP-ATP (10^{-7} M) bei KT | 165 |
| Abb. ERG 21: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des P2X ₂ R-spezifischen Antagonisten PSB1011 (10^{-5} M) bei KT | 167 |
| Abb. ERG 22: Immunhisto- und zytochemischer Nachweis des P2X ₂ -Rezeptorproteins im <i>Nucleus arcuatus</i> der adulten Ratte sowie in der neuroglialen ARC-Primärzellkultur früh-postnataler Ratten | 170 |
| Abb. ERG 23: Immunzytochemischer Nachweis der P2X ₂ - und P2X ₄ -Rezeptorproteine in Neuronen respektive Mikroglia der ARC-Primärzellkultur neonataler Ratten | 171 |
| Abb. ERG 24: Radiorezeptor Bindungsassay: Temperatur- und Zeitabhängigkeit spezifischer Bindung des Radioliganden [³⁵ S]dATPαS | 175 |
| Abb. ERG 25: kompetitive Verdrängung des Radioliganden [³⁵ S]dATPαS von Purinoreptoren einer angereicherten PM-Fraktion aus Hypothalamus und thorakalem Rückenmark adulter Ratten | 177 |
| Abb. ERG 26: Autoradiographischer Nachweis von [³⁵ S]dATPαS-spezifischen Bindungsstellen im coronalen Gehirnschnitt der Ratte | 181 |
| Abb. ERG 27: Autoradiographischer Nachweis der kompetitiven Verdrängung von [³⁵ S]dATPαS-Bindungsstellen im thorakalen Rückenmark der adulten Ratte | 183 |
| Abb. ERG 28: Kompetitive Verdrängungsstudien mit dem Radioliganden [³⁵ S]dATPαS im coronalen Gehirnschnitt der Ratte | 184 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Der Hypothalamus als zentralnervöses Integrationszentrum | 1 |
| 1.2. Der <i>Nucleus arcuatus</i> als integratives Kerngebiet des mediobasalen Hypothalamus | 3 |
| 1.3. Adenosin-5`triphosphat (ATP) als Neurotransmitter | 5 |
| 1.4. Purinerge Rezeptoren | 6 |
| 1.4.1. P1-Rezeptoren (Adenosin-Rezeptoren) | 7 |
| 1.4.2. Ionotrope P2X-Rezeptoren | 8 |
| 1.4.3. Intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung von P2X-Rezeptoren | 12 |
| 1.4.4. Metabotrope P2Y-Rezeptoren und deren intrazelluläre Signaltransduktion | 13 |
| 1.4.5. ATP-Speicherung, -Freisetzung und extrazellulärer Abbau | 14 |
| 1.5. Regulatorische Kontrolle des endokrinen Hypophysenvorderlappens durch <i>releasing</i> und <i>inhibiting</i> Faktoren des <i>Nucleus arcuatus</i> | 17 |
| 1.5.1. <i>Nucleus arcuatus</i> : Regulation des Körperwachstum | 17 |
| 1.5.2. <i>Nucleus arcuatus</i> : Regulation der Prolaktinsekretion | 20 |
| 1.5.3. Physiologische Bedeutung purinerger Signalübertragung in der Hypothalamus-HVL Achse | 24 |
| 1.6. Rolle des <i>Nucleus arcuatus</i> im Rahmen der zentralen Kontrolle des Energiehaushalts | 26 |
| 1.6.1. Nervale und humorale Signale als sensorische Afferenzen an den Hypothalamus im Rahmen der Homöostase des Energiehaushaltes | 26 |
| 1.6.2. Der ARC des Hypothalamus als Zielstruktur für Leptin und Ghrelin | 27 |
| 1.6.3. Physiologische Bedeutung purinerger Signalübertragung in der Regulation der Energiehomöostase | 31 |
| 1.7. Purinerge Rezeptoren und Gliazellen | 32 |
| 1.7.1. Astrozyten | 32 |
| 1.7.2. Oligodendrozyten | 34 |
| 1.7.3. Mikrogliazellen | 35 |
| 1.8. Ziele und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit | 38 |
| 2. Material und Methoden | 42 |
| 2.1. Material allgemein | 42 |
| 2.2. Versuchstiere | 44 |
| 2.3. Analyse Purinozeptorsubtyp spezifischer mRNA Expression im <i>Nucleus arcuatus</i> durch quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR) | 45 |
| 2.3.1. Materialien für qRT-PCR | 45 |
| 2.3.2. Allgemeine Grundlagen der qRT-PCR | 47 |
| 2.3.2.1. PCR | 47 |
| 2.3.2.2. Quantitative <i>real-time</i> PCR | 48 |

| | | |
|------------|---|----|
| 2.3.2.3. | Relative Quantifizierung der qRT-PCR Reaktion | 51 |
| 2.3.3. | Gewinnung der Gewebeproben für die qRT-PCR | 52 |
| 2.3.3.1. | Präparation der ARC- und MnPO-spezifischen Gehirn- gebiete adulter Ratten | 52 |
| 2.3.3.2. | Präparation der ARC- und MnPO-spezifischen Gehirn- gebiete neonataler Ratten | 53 |
| 2.3.3.3. | Präparation der ARC- und MnPO-spezifischen neuro- glialen Primärkulturen neonataler Ratten | 53 |
| 2.3.4. | RNA-Extraktion und -Aufbereitung | 54 |
| 2.3.5. | Synthese der cDNA - Reverse Transkription | 55 |
| 2.3.6. | Durchführung der quantitativen <i>real-time</i> PCR | 56 |
| 2.3.7. | Auswertung | 56 |
| 2.4. | <i>In vitro</i> Modell: primäre Zellkultur des hypothalamischen ARC der Ratte | 57 |
| 2.4.1. | Materialien | 57 |
| 2.4.2. | Etablierung einer neuroglialen Primärkultur des ARC | 58 |
| 2.5. | Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik | 61 |
| 2.5.1. | Materialien | 61 |
| 2.5.2. | Grundlagen der Kalzium Ratio-Imaging Technik | 63 |
| 2.5.3. | Kalzium-Imaging Messstand | 65 |
| 2.5.4. | Vorbereitung der Versuchsdurchführung | 67 |
| 2.5.5. | Versuchsdurchführung | 67 |
| 2.5.6. | Messprotokolle für die Kalzium Ratio-Imaging Technik | 68 |
| 2.5.6.1. | Vergleichende Superfusionsstimulation der ARC-Primär- kultur mit den Purinozeptoragonisten ATP, 2-MeSATP, α,β -meATP und BzATP | 69 |
| 2.5.6.2. | Vergleichende Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen den Purinozeptor- agonisten ATP, 2-MeSATP und α,β -meATP | 70 |
| 2.5.6.3. | Repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit ATP, 2-MeSATP und α,β -meATP in äquimolaren Konzentrationen | 71 |
| 2.5.6.4. | Repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP bei RT: Herkunft des Kalziums | 71 |
| 2.5.6.4.1. | Vergleichende repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP: Temperatur- abhängigkeit | 72 |
| 2.5.6.5. | Modulation der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der [Ca ²⁺] _i z in Zellen der ARC-Primärkultur durch genera- lisierte P2 Purinozeptorantagonisten | 73 |
| 2.5.6.6. | Modulation der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der [Ca ²⁺] _i z in Zellen der ARC-Primärkultur durch P2X- Rezeptorsubtyp spezifische Antagonisten | 73 |
| 2.5.7. | Datenevaluierung und Statistik | 74 |
| 2.6. | Immunzytochemie / Immunhistochemie | 76 |
| 2.6.1. | Material | 76 |
| 2.6.2. | Grundlagen der Methode | 78 |

| | |
|---|------------|
| 2.6.3. Verwendete Antikörper / -seren | 79 |
| 2.6.4. Immunzytochemische Charakterisierung der ARC-Primärkultur | 81 |
| 2.6.4.1. Versuchsprotokoll | 81 |
| 2.6.4.2. Immunzytochemische Charakterisierung der in der ARC-Primärkultur vorhandenen neuroglialen Zelltypen | 82 |
| 2.6.4.3. Transmitterspezifische Charakterisierung der Neurone in der ARC-Primärkultur | 83 |
| 2.6.4.4. Immunzytochemischer Nachweis der Expression ionotroper Purinozeptoren in der ARC-Primärkultur und Transmitter <i>coding</i> 2-MeSATP responsiver ARC-Neurone | 84 |
| 2.6.5. Immunhistochemische Charakterisierung ARC-spezifischer Neurotransmittersysteme | 84 |
| 2.6.5.1. Transkardiale Perfusionsfixierung adulter Ratten | 84 |
| 2.6.5.2. Anfertigung von Gefrierschnitten | 86 |
| 2.6.5.3. Versuchsprotokoll | 87 |
| 2.6.6. Fluoreszenzmikroskopie | 88 |
| 2.7. Purinozeptor-Expression im ARC adulter Ratten: Radiorezeptorstudien | 89 |
| 2.7.1. Materialien | 89 |
| 2.7.2. Grundlagen: Liganden-Rezeptor Bindungskinetik | 90 |
| 2.7.3. Gewinnung der Gewebeproben für die Radiorezeptorstudien | 93 |
| 2.7.4. Radioligand - Rezeptor Interaktion: Der Radiorezeptor-assay (RRA) | 94 |
| 2.7.4.1. Membranbindungsassay: Einfluss der Inkubationsdauer und -temperatur | 94 |
| 2.7.4.2. Membranbindungsassay: Kompetitive Verdrängungsstudien | 96 |
| 2.7.4.3. Membranbindungsassay: Messung der gebundenen Radioaktivität und Datenevaluierung | 97 |
| 2.7.5. Radioligand - Rezeptor Interaktion: Rezeptorautoradiographie | 98 |
| 2.7.5.1. Rezeptorautoradiographie: Grundlagen | 98 |
| 2.7.5.2. Rezeptorautoradiographie: Anfertigung nicht-fixierter Gewebeschnitte | 98 |
| 2.7.5.3. Rezeptorautoradiographie: Kompetitive Verdrängungsstudien | 99 |
| 2.7.5.4. Rezeptorautoradiographie: Datenevaluierung | 101 |
| 3. Ergebnisse | 103 |
| 3.1. Quantitative <i>real-time</i> PCR | 103 |
| 3.1.1. Expression ionotroper Purinozeptoren im ARC adulter Wistar-Ratten | 103 |
| 3.1.2. Expression ionotroper Purinozeptoren im ARC neonataler Wistar-Ratten | 103 |
| 3.1.3. Expression ionotroper Purinozeptoren in der neuroglialen ARC-Primärkultur | 104 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.1.4. | Vergleichende Betrachtung: Expression ionotroper Purinozeptoren im ARC | 104 |
| 3.1.5. | Expression ionotroper Purinozeptoren im MnPO adulter Wistar-Ratten | 105 |
| 3.1.6. | Expression ionotroper Purinozeptoren im MnPO neonataler Wistar-Ratten | 105 |
| 3.1.7. | Expression ionotroper Purinozeptoren in der neuroglialen MnPO-Primärkultur | 105 |
| 3.1.8. | Abschließende Betrachtung: Expression ionotroper Purinozeptoren im MnPO | 106 |
| 3.1.9. | Vergleichende Analyse der P2XR Expressionsmuster in ARC und MnPO | 106 |
| 3.2. | Immunzytochemische Charakterisierung der neuroglialen Primärkultur des <i>Nucleus arcuatus</i> | 108 |
| 3.2.1. | Immunzytochemische Charakterisierung der neuroglialen Zelltypen in der ARC-Primärkultur | 108 |
| 3.2.2. | Immunhistochemischer Nachweis wichtiger Neurotransmittersysteme im <i>Nucleus arcuatus</i> der adulten Ratte | 110 |
| 3.2.3. | Immunhistochemischer Nachweis wichtiger Neurotransmittersysteme in der Primärkultur des <i>Nucleus arcuatus</i> | 111 |
| 3.3. | Funktionelle Charakterisierung ionotroper Purinozeptoren in der ARC-Primärkultur mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik | 118 |
| 3.3.1. | Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit den Purinozeptoragonisten ATP, 2-MeSATP und α,β -meATP bei RT | 118 |
| 3.3.2. | Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur bei KT mit den Purinozeptoragonisten BzATP und 2-MeSATP | 119 |
| 3.3.3. | Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Purinozeptoragonisten ATP und 2-MeS-ATP hinsichtlich intrazellulärer Kalziumsignale | 123 |
| 3.3.3.1. | Dosis-Wirkungs-Beziehung für 2-MeSATP bei RT | 123 |
| 3.3.3.2. | Dosis-Wirkungs-Beziehung für ATP bei RT | 124 |
| 3.3.4. | Repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit ATP bzw. 2-MeSATP in äquimolaren Konzentrationen | 126 |
| 3.3.4.1. | Repetitive Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP bei RT | 127 |
| 3.3.4.2. | Repetitive Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP bei KT | 129 |
| 3.3.4.3. | Repetitive Superfusionsstimulation mit ATP bei RT | 131 |
| 3.3.5. | Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP: Herkunft des Kalziums (extra- vs. intrazellulär) | 132 |
| 3.3.6. | Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP: Temperatur-abhängigkeit (RT vs. KT) | 134 |
| 3.3.6.1. | Repetitive Stimulation mit 2-MeSATP: Temperaturprofil RT - KT - RT | 136 |
| 3.3.6.2. | Repetitive Stimulation mit 2-MeSATP: Temperaturprofil KT - RT - KT | 137 |
| 3.3.7. | Modulation der Agonist-induzierten Kalziumsignale in Zellen der ARC-Primärkultur durch generalisierte P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten bei KT | 140 |
| 3.3.7.1. | PPADS | 140 |
| 3.3.7.2. | Suramin | 146 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.3.7.3. | Reactive blue-2 | 151 |
| 3.3.8. | Modulation der Agonist-induzierten Kalziumsignale in Zellen der ARC-Primärkultur durch Subtyp-spezifische P2X-Purinozeptorantagonisten bei KT | 156 |
| 3.3.8.1. | P2X ₁ -, P2X _{2/3} - und P2X ₃ -spezifischer Purinozeptorantagonist TNP-ATP | 156 |
| 3.3.8.2. | P2X ₂ -spezifischer Purinozeptorantagonist PSB1011 | 166 |
| 3.4. | Immunhisto- und zytochemischer Nachweis ionotroper purinergerezeptorsubtypen | 169 |
| 3.4.1. | Immunhistochemischer Nachweis des purinergen P2X ₂ -Rezeptorsubtyps im <i>Nucleus arcuatus</i> der adulten Ratte | 169 |
| 3.4.2. | Zelltyp-spezifische Expression purinergerezeptorsubtypen in der Primärkultur des <i>Nucleus arcuatus</i> | 169 |
| 3.4.3. | Immunzytochemische Charakterisierung 2-MeSATP-responsiver Neurone der ARC-Primärkultur : Transmitter <i>coding</i> | 172 |
| 3.5. | Pharmakologische Charakterisierung des purinergen Rezeptorsystems in Hypothalamus / thorakalem Rückenmark adulter Ratten: Radiorezeptor Bindungsassay (RRA) und Autoradiographie | 173 |
| 3.5.1. | RRA: Temperatur- und Zeitabhängigkeit | 174 |
| 3.5.2. | RRA: Charakterisierung der Purinozeptorsubtypen durch kompetitive Verdrängungsstudien | 176 |
| 3.5.2.1. | Kompetitive Verdrängungsstudien an der angereicherten Plasmamembranfraktion des Hypothalamus adulter Ratten | |
| 3.5.2.2. | Kompetitive Verdrängungsstudien an der angereicherten Plasmamembranfraktion des thorakalen Rückenmarks adulter Ratten | 178 |
| 3.5.3. | Autoradiographische Darstellung der [³⁵ S]dATP α S-spezifischen Bindungsstellen in neuronalen Gewebe | 180 |
| 4. | Diskussion | 186 |
| 4.1. | Immunzytochemische Charakterisierung ARC-spezifischer Neurotransmittersysteme in der Primärkultur | 186 |
| 4.2. | Charakterisierung purinergerezeptoren am ARC | 189 |
| 4.2.1. | Betrachtung der Expression purinergerezeptoren in der Ontogenese des Zentralnervensystems der Ratte | 190 |
| 4.2.2. | Die Expression purinergerezeptoren in der neuroglialen Primärkultur des ARC und MnPO der Ratte | 194 |
| 4.2.3. | Funktionelle Purinozeptorexpression in Neuronen | 197 |
| 4.2.4. | Funktionelle Purinozeptorexpression in Astrozyten | 206 |
| 4.2.5. | Funktionelle Purinozeptorexpression in Mikrogliazellen | 213 |
| 4.3. | Ausblick | 215 |
| 5. | Zusammenfassung | 218 |
| 6. | Summery | 221 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 225 |

8. Danksagung

262

1. Einleitung

1.1. Der Hypothalamus als zentralnervöses Integrationszentrum

Der basal des Thalamus gelegene Hypothalamus bildet den ventralen Teil des *Diencephalon* (Zwischenhirn) und umschließt beidseitig den *Ventriculus tertius cerebri* (dritter Gehirnventrikel; V-III). Im Sagitalschnitt wird der anteriore Bereich des Hypothalamus, die *Regio praeoptica* (POA), dorsal durch die *Commissura anterior* und anteroventral durch die *Stria diagonalis* (Diagonales Band von Broca) begrenzt. Posterior endet der Hypothalamus im Bereich der ventral gelegenen *Corpora mamillaria* (Paxinos & Watson, 2004; Simerly & Swanson, 1988; Swanson 1987).

Der Hypothalamus repräsentiert das oberste zentralnervöse Koordinationszentrum für die Homöostase vegetativer Funktionen im Rahmen der geregelten Konstanthaltung der Körperkerntemperatur (Gerstberger et al., 2001; Simon et al., 1986), der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushaltes (Morton et al., 2006), des Wasser- und Elektrolythaushaltes (Anderson, 1978; Gerstberger et al., 2001), des peripheren Kreislaufes (Cruz et al., 2010) oder etwa der zirkadianen Rhythmik (Aschoff, 1990; Stephan & Zucker, 1972). Darüber hinaus stellt der Hypothalamus mit seinen neuroendokrinen Funktionen, primär vermittelt über die Steuerung der Hormonsekretion des Hypophysenvorderlappens (HVL, Adenohypophyse) bzw. die direkte Neurohormon-Freisetzung im Bereich des Hypophysenhinterlappens (HHL, Neurohypophyse), die efferente Verbindung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit dem endokrinen System dar (Sam & Frohman, 2008; Stojilkovic, 2009). So projizieren magnozellularer Neurone des *Nucleus paraventricularis* (PVN) und des *Nucleus supraopticus* (SON) durch das *Infundibulum* in den HHL. Die Axonterminalen dieser Neurone entlassen zur Induktion des Milcheinschusses im Rahmen der Laktation bzw. bei extrazellulärer Dehydratation die Neurohormone Oxytocin (OT) bzw. Antidiuretisches Hormon (ADH) vermehrt in den Blutkreislauf (Freeman et al., 2000; Stojilkovic, 2009). Parvozelluläre Neurone des PVN sowie anderer Kerngebiete wie der POA oder des *Nucleus arcuatus* (ARC) setzen sogenannte *releasing* oder *inhibiting* Faktoren nach axonalem Transport in das hypophysäre Pfortadersystem aus ihren Synapsen frei. Diese peptidergen bzw. catecholaminergen Faktoren erreichen den HVL und modulieren dort die Aktivität spezialisierter endokriner Zellen, die ihrerseits über die freigesetzten Proteo-Hormone eine weitere periphere Hormondrüse kontrollieren ("glandotroph") oder periphere Organe in deren Funktion beeinflussen ("nicht-glandotroph") (Freeman et al., 2000; Tannenbaum et al., 2003).

Neurohistologisch wird der Hypothalamus von rostral nach caudal in den präoptischen, anterioren, tuberalen und mammillaren Bereich und mediolateral in drei Zonen (lateral,

medial und periventriculär) untergliedert. Diese Bereiche beinhalten jeweils eine Vielzahl an zytoarchitektonisch und hinsichtlich ihrer physiologischen Bedeutung distinkte Regionen (*Areae*) und Kerngebiete (*Nuclei*), die an den oben angedeuteten neuroendokrinen und homöostatischen Steuerungsprozessen beteiligt sind (Paxinos & Watson, 2004; Swanson 1987).

Diese hypothalamischen *Nuclei* sind durch axodendritische Nervenbahnen mit anderen Regionen des Gehirns, des Rückenmarks, aber auch untereinander verbunden (Boswell, 2010; Cham et al., 2006, Fan et al., 2004; Oldfield et al., 1991; Schwartz, 2006; Swanson & Kuypers, 1980). Für Konstanzhaltung etwa des Energiehaushaltes oder der Körperkerntemperatur werden in hypothalamischen Kerngebieten über afferent-sensorische Projektionen einlaufende Informationen aus der Peripherie sowie zentralnervösen Einheiten etwa der *Medulla oblongata*, der Pons oder des limbischen Systems verarbeitet. Im Rahmen der genannten autonomen Regelkreise für die Homöostase physiologischer Funktionen werden dabei Informationen (patho-)physiologischer Natur als Istwerte mit vorgegebenen "Sollwerten" noch unbekannter Natur verglichen. Nach nucleo-zellulärer Integration werden efferente neuronale Signale über vegetative sowie motorische Zentren in Hirnstamm und Rückenmark an periphere Effektororgane gesendet, welche als Stellglieder zur Wiederherstellung des jeweiligen Istwerts dienen (Langhans et al., 2010; Simon et al., 1986).

Neben der neuronalen Übermittlung sensorischer Informationen aus der Körperperipherie an den Hypothalamus besteht ein weiterer Weg der afferenten Signalweiterleitung im Übertritt humoraler Mediatoren über die endotheliale Blut-Hirn Schranke (BHS) (Banks, 2012), bzw. dem direkten Kontakt zirkulierender Signalmoleküle mit sensorischen sowie integrativen Zentren ausschließlich des Hypothalamus und der *Medulla oblongata* im Bereich spezifischer *Nuclei*, deren endotheliale BHS unvollständig ausgeprägt ist. Diese als zirkumventrikuläre Organe (CVOs) bezeichneten Gehirnstrukturen sind durch die neuroanatomische Lokalisation in direkter Nähe zum dritten bzw. vierten Gehirnventrikel, eine hohe Gefäßdichte sowie die Ausprägung eines fenestrierten Kapillarendothels charakterisiert (Hofer, 1958; Duvernoy & Risold, 2007; McKinley et al., 2003; Roth et al., 2004). Dabei werden CVOs prinzipiell als sensorische oder neurosekretorische (= neuroendokrine) CVOs (Price et al., 2008) klassifiziert. Zu den sensorischen CVOs wird das *Organum subfornicale* (SFO) und das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) des präoptisch-anterioren Hypothalamus sowie die *Area postrema* (AP) der *Medulla oblongata* gezählt (Cottrell & Ferguson, 2004; Simon 2000). Diesen Strukturen ist neben einer lecken endothelialen BHS das Vorhandensein efferent projizierender Nervenzellen gemeinsam. Die neuroendokrinen CVOs hingegen weisen keine Neurone auf und um-

fassen die *Eminentia mediana* (ME), die Neurohypophyse, die *Glandula pinealis* (PIN) und im weiteren Sinne die *Plexūs chorioidei* (ChP) des Ventrikelsystems (Norsted et al., 2008; Price et al., 2008). Das OVLT zeichnet sich neben seinen sensorischen Funktionen auch durch neuroendokrine Eigenschaften aus (McKinley et al., 2003). Außer den genannten neuroglialen Strukturen zeigen zwei weitere *Nuclei* des Hirnstammes partiell fenestrierte Kapillarendothelien auf, wodurch deren Neurone für in der Blutbahn zirkulierende Faktoren wie etwa Hormone oder Zytokine erreichbar sind, nämlich der *Nucleus tractus solitarius* (NTS) der *Medulla oblongata* und der ARC des tuberalen Hypothalamus (Gross, 1991).

1.2. Der *Nucleus arcuatus* als integratives Kerngebiet des mediobasalen Hypothalamus

Der *Nucleus arcuatus* als ventraler Bestandteil des tuberalen Hypothalamus umschließt den basalen V-III und ist in unmittelbarer Nähe zur *Eminentia mediana* (EM) und der Adenohypophyse lokalisiert, zu denen er über die Axone parvozellulärer Neurone eine neurohämale Verbindung unterhält. Zytoarchitektonisch wird der ARC in eine dorsale (ARCd), mediale (ARCM) und laterale (ARCl) Komponente untergliedert (Paxinos & Watson, 2005). Caudal der EM, im Bereich des *Infundibulum*, liegen die posterioren Substrukturen des medialen (ARCmp) und lateralen ARC (ARClp).

Im Rahmen der Energiehomöostase wirken eine Vielfalt hormonaler und metabolischer Faktoren sowie neuronaler Afferenzen aus der Peripherie und dem ZNS in einem komplexen Wechselspiel zusammen. Hormone und vagale Afferenzen übermitteln Informationen über die gastroenterale Energieaufnahme sowie über den Status der Fett- und Glukosedepots an das ZNS (Langhans et al., 2010). Dabei kommt dem ARC aufgrund seiner partiell lecken BHS eine zentrale Schlüsselrolle für die Perzeption afferenter Signale zur Kontrolle des Körpergewichtes und der Nahrungsaufnahme zu (Kohno & Yada, 2012; Morton et al., 2006) (*Kap. EIN 1.6*). Gleichzeitig übt der ARC durch die neuronale Produktion und axonale Freisetzung bestimmter *releasing* (RH) bzw. *inhibiting* (IH) Faktoren eine wichtige modulatorische Funktion auf die Hormonsekretion somatotropher, laktotropher oder corticotropher Zellen des HVL aus und hat somit einen Einfluss auf Wachstum und Reproduktion des tierischen Organismus (Brawer, 1971; Fehér et al., 2010; Grossman et al., 1986; Horváth & Palkovits, 1988). Die von den neurosekretorischen Neuronen des ARC synthetisierten und axonal transportierten Faktoren (Neuropeptide und Dopamin / Serotonin) gelangen über die neurohämalen Verbindungen im Bereich der unvollständigen BHS des ARC und der EM, welche primär neurosekretori-

sche Synapsen enthält, in das Pfortadersystem des HVL oder in den interzellularen Raum der EM (Ferguson & Bains, 1996; Rodriguez et al., 2010). Um zu verhindern, dass diese Mediatoren wieder zurück in das neurogliale Parenchym des ARC bzw. in die cerebrospinale Flüssigkeit (CSF) des V-III gelangen, weisen EM und ARC im Bereich der den Ventrikel auskleidenden Ependymzellen sogenannte Tanyzyten mit hoher Dichte interzellulärer *“tight junctions“* auf (Horstmann, 1954; Krisch et al., 1978; 1983; Rodriguez et al., 2010).

Der ARC verfügt über neuronale Afferenzen und Efferenzen zu zahlreichen neuroglialen Strukturen des ZNS, vor allem aber zu zahlreichen *Nuclei* bzw. *Areae* des Hypothalamus. Mit Hilfe von antero- und retrograden Methoden des neuronalen Tracings konnten - den präoptischen und anterioren Hypothalamus betreffend - neuronale Verbindungen mit reziprokem Charakter zur *Regio praeoptica medialis* (MPOA) (Kawano & Masako, 2000; Sim & Joseph, 1991; Zaborszky & Makara, 1979), sowie oxytocinergen Neuronen des SON (Douglas et al., 2002; Leng et al., 1988; Sawchenko et al., 1982) aufgezeigt werden. In Kombination mit autoradiographischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden ausgeprägte Projektionsbahnen des ARC von und zum anterioren PVN nachgewiesen (Beaulieu et al., 1996; Conrad & Pfaff, 1976b; Jhanwar-Uniyal et al., 1993; Wittmann et al., 2009). Dabei kommt den parvozellulären Komponenten des PVN (pPVN) eine bedeutende Rolle als hypothalamischen Schaltzentren in der Regulation der Energiehomöostase, des peripheren Kreislaufs sowie der komplexen Reaktion des tierischen Organismus auf Stress zu (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Herman et al., 2003; Morton et al., 2006). Nervenzellen des pPVN werden etwa durch Proopiomelanocortin (POMC) bzw. Neuropeptid Y (NPY) resp. *“agouti gene-related peptide“* (AGRP) exprimierende Projektionsneurone des ARC innerviert (Bagnol et al., 1999; Blouet & Schwartz, 2010; Cone, 2005; Palkovits, 1999). Darüber hinaus existieren reziproke Projektionen zwischen dem ARC und dem *Nucleus dorsomedialis hypothalami* (DMH) resp. der *Regio lateralis hypothalamica* (LH) im tuberalen Hypothalamus. Bei beiden Strukturen handelt es sich um neurogliale Kerngebiete mit nachgewiesener Funktion im Rahmen der zentralnervösen Kontrolle des Energiehaushaltes (Bouret et al., 2004; Chronwall, 1985; Saper et al., 1979; Sim & Joseph, 1991) (*Kap. EIN 1.6*).

Extrahypothalamische Konnektivitäten mit teilweise reziprokem Charakter verbinden u.a. das *Corpus amygdaloideum*, welches an der emotionalen Bewertung von Situationen beteiligt ist (Sah et al., 2003), und Kerngebiete des *Truncus cerebri* (Hirnstamm) mit dem ARC. Zu diesen Kerngebieten des Hirnstammes zählen der NTS, die *Formatio reticularis*, die *Nuclei raphe*, der *Nucleus striae terminalis* oder die *Substantia grisea centralis*

(Azmitia & Segal, 1978; Conrad & Pfaff, 1976a, b; Kobayashi et al., 1974; Palkovits et al., 1980a, b; Ricardo & Koh, 1978; Sim & Joseph, 1991).

1.3. Adenosin-5`triphosphat (ATP) als Neurotransmitter

Das Nukleotid Adenosin-5`triphosphat (ATP) stellt nicht nur die ubiquitär in allen Zellen des tierischen Organismus vorhandene und damit wichtigste biochemische Energiequelle für unzählige Stoffwechselfvorgänge dar, sondern wird auch von Zellen freigesetzt, um als ein extrazellulärer, primärer Botenstoff ("*messenger*") zu fungieren. Bereits im Jahr 1929 demonstrierten Drury und Szent-Györgyi eine extrazelluläre Wirkung von "Adenin-Komponenten" auf die Herztätigkeit von Hund und Katze. Die intravenöse Applikation von ATP bewirkte in späteren Studien bei der Katze eine Senkung von Herzfrequenz und arteriellem Blutdruck, sowie Veränderungen der Lungenventilation. Dabei wurde in Betracht gezogen, dass diese Aktivitäten u.a. durch eine ATP-vermittelte Stimulation des "Vaguszentrums" in der *Medulla oblongata* induziert worden sein könnten (Emmelin & Feldberg, 1948). Intracerebroventrikuläre (icv) Applikationen von ATP in den lateralen Gehirnventrikel resultierten in Muskelschwäche, Ataxie und einem erhöhtem Schlafbedürfnis bei Katzen (Burnstock, 2006a; Feldberg & Sherwood, 1954). Bereits 1959 erarbeitete Pamela Holton durch elektrische Stimulation des *Nervus auricularis* des Kaninchens erste Anhaltspunkte dafür, dass ATP durch nervale Freisetzung als Neurotransmitter im peripheren Nervensystem (PNS) dienen könnte. Es dauerte weitere elf Jahre, bis Burnstock und Kollegen (1970) durch Kontraktionsmessungen am Magen-Darm-Trakt verschiedener Tierarten (Amphibien, Vögel, Säugetiere) extrazelluläres ATP in nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC) Neuronen des vegetativen Nervensystems als Neurotransmitter in Betracht zogen. 1972 wurde von Ginsborg und Hirst die präsynaptische Modulation der ACh-Freisetzung an neuromuskulären Endplatten durch Adenosin bei der Ratte nachgewiesen (Burnstock, 2006a). Im selben Zeitraum wurde durch die detaillierte Untersuchung der NANC-Aktivierungsmuster in der Harnblase von Meerschweinchen das Konzept der purinergen Neurotransmissions-Hypothese erstmals von Geoffrey Burnstock (1972; 1976; 2006a; b) postuliert. Diese Untersuchungen beinhalteten: (1) den Nachweis der ATP-Freisetzung während der Stimulation der NANC-Nerven, (2) die ATP-vermittelte Harnblasenkontraktion *via* Aktivierung spezifischer "ATP-Rezeptoren" (purinerge Rezeptoren), (3) die Antagonisierung dieser Wirkung unter Verwendung eines Inhibitors, (4) den dilatatorischen Einfluss der ATP-spezifischen Degradationsprodukte AMP und Adenosin auf die Harnblase (Burnstock, 1972; 2006a).

Die purinerge Kotransmission mit Noradrenalin in sympathischen Nervenfasern wurde in *in vitro* Untersuchungen an der *Vas deferens* des Meerschweinchens nachgewiesen (Fedan et al., 1981). Die erhaltenen Daten lieferten ebenfalls Interpretationsansätze für Resultate, die 20 Jahre zuvor in elektrophysiologischen Untersuchungen der neuromuskulären Signalübertragung in der *Vas deferens* beobachtet wurden (Burnstock, 2006a; Burnstock & Holman, 1961). In der Zusammenfassung stellt sich dar, dass ATP von Nervenzellen in präsynaptischen Vesikeln gespeichert und aus diesen freigesetzt wird. Freigesetztes ATP ist chemisch oder pharmakologisch identifizierbar (Dale & Frenquelli, 2012) und ruft postsynaptisch bei Zielzellen des PNS und auch ZNS eine spezifische Wirkung hervor, welche durch Antagonisten dosisabhängig blockierbar ist. ATP wird rasch durch Ektoenzyme abgebaut, wobei dessen Wirkung aufgehoben wird. Diese Eigenschaften treffen klassischerweise auf alle Neurotransmitter zu (Stojilkovic, 2009; 2010).

1.4. Purinerge Rezeptoren

Als putative Signalmoleküle repräsentieren Purine wie das ATP (teilweise auch UTP = Uridin-5`triphosphat) bzw. deren Degradationsprodukte endogene Agonisten für zwei Unterfamilien purinergere Rezeptoren (Purinozeptoren). Während Adenosin als Ligand für P1-Rezeptoren (Adenosin-Rezeptoren) dient, sind ATP und ADP sowie teilweise UTP und UDP (Uridin-5`diphosphat) spezifische Liganden für die P2-Rezeptoren (Burnstock, 1978; 2006). 1985 wurden die P2-Rezeptoren durch pharmakologische Untersuchungen an der Kaninchenportalvene und am Meerschweinchenkolon in zwei Unterfamilien, die ligandengesteuerten ("*ligand-gated*") P2X-Rezeptor-Ionenkanäle und die metabotropen P2Y-Rezeptoren untergliedert (Burnstock & Kennedy, 1985; Burnstock, 2006). Purinozeptoren spielen nicht nur bei der Kotransmission und auto- bzw. parakrinen, positiven resp. negativen *feedback* Modulation der Neurotransmitterfreisetzung in verschiedenen Nervenzellen des PNS und ZNS eine Rolle, sondern werden auch von nicht-neuronalen Geweben resp. Zellen exprimiert. So moduliert im Bereich des juxtaglomerulären Apparates gebildetes Adenosin rezeptorvermittelt die Reninsekretion aus Endothelzellen der *Vasa afferentia* der Nierenkörperchen (= *Glomerula*) bzw. eine Konstriktion dieser Arterien im Rahmen der tubulo-glomerulären *feedback* Kontrolle der glomerulären Filtration (Vallon et al., 2006). Darüber hinaus sind Purinozeptoren an so komplexen Vorgängen wie der zellulären Exo- und Endozytose, der Zellproliferation und -differenzierung bzw. Apoptose, Aspekten der Immunantwort oder der Schmerzwahrnehmung beteiligt (Bailey et al., 2004; Burnstock, 2006; Sperlágh et al., 2007).

1.4.1. P1-Rezeptoren (Adenosin-Rezeptoren)

Die metabotropen P1-Rezeptoren werden durch Adenosin aktiviert und gehören zur Proteinfamilie der klassischen sieben-transmembranalen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Bis *dato* sind vier Subtypen der Adenosin-Rezeptoren identifiziert: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ (Fredholm et al., 2001; Olah & Stiles, 2000; Yaar et al., 2005). Alle Adenosinrezeptoren weisen einen kurzen, 7 - 13 Aminosäuren (AS) langen intrazellulären C-Terminus und einen 32 - 120 AS langen extrazellulären N-Terminus auf. Die hydrophoben transmembranalen Domänen (TM) der Adenosin-Rezeptorproteine (*Abb. EIN 2*) bilden als Sekundärstruktur α -Helices aus, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre, hydrophile peptiderge Schleifen verbunden sind (Ravelic & Burnstock, 1998; Stojilkovic, 2009). Primär bezogen auf das Gehirn der Ratte, werden A₁-Rezeptoren (A₁R) in der präoptischen Region des Hypothalamus (POA), in *Cerebellum*, *Cortex*, *Hippocampus*, Hirnstamm und Rückenmark exprimiert (Dixon et al., 1996; Reppert et al., 1991). A_{2A}-Rezeptoren (A_{2A}R) finden sich im *Nucleus ventrolateralis praeopticus* (VLPO) des Hypothalamus, im *Nucleus accumbens* und im *Bulbus olfactorius* (Gallopini et al., 2005; Jarvis & Williams; 1989; Morairty et al., 2004; Ongini & Fredholm; 1996). Nahezu ubiquitär in allen Gewebetypen ist der A_{2B}-Rezeptor (A_{2B}R) lokalisiert (Ravelic & Burnstock, 1998). A₃-Rezeptoren (A₃R) werden vor allem in peripheren Geweben und Leukozyten exprimiert (Bar-Yehuda et al., 2007; Dixon et al., 1996).

Alle Adenosin-Rezeptoren vermitteln ihre intrazelluläre Wirkung in erster Linie über die Modulation der Adenylylzyklase-Aktivität und die davon abhängige Bildung des sekundären Botenstoffes cAMP (zyklisches Adenosin-5'-monophosphat) aus ATP. Die A₁R- und A₃R-Aktivierung hemmt die Adenylylzyklase über die α -Untereinheit des G_{i/o}-Proteins und bedingt somit einen Abfall von cAMP in der Zelle (Londos et al., 1980; van Calker et al., 1978). Die A_{2A}R- und A_{2B}R aktivieren die Adenylylzyklase unter Einschaltung eines G_s-Proteins. Das aus ATP gebildete cAMP induziert die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) mit nachgeschalteter Phosphorylierung bestimmter Membranproteine (Glutamat-rezeptoren, Kalzium- oder Kaliumkanäle, Na⁺/K⁺-Pumpe), metabolische Inhibitoren (Inhibitor 1, DARPP-32) oder den Transkriptionsfaktor CREB (= cAMP-responsives Elementbindendes Protein). Phosphoryliertes CREB erhöht die Transkription des fos-Gens, welches wiederum die Transkription anderer Zielgene reguliert. Außerdem wird beschrieben, dass der humane A_{2B}-Rezeptor über das G_{q/11}-Protein die Phospholipase C (PLC) und nachfolgend die Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃)-Synthese aktivieren soll (Burnstock, 2006; Linden et al., 1999; Reshkin et al., 2000; Stojilkovic, 2009; Williams & Jarvis, 2000) (*Kap. EIN 1.4.5*).

1.4.2. Ionotrope P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren (P2XR) repräsentieren ATP-gesteuerte Ionenkanäle in der Zellmembran, welche den Nettoflux von Natrium- (Na^+), Kalium- (K^+); und Kalziumionen (Ca^{2+}) durch diese beeinflussen, wodurch es zum Einstrom von Natrium und Kalzium und damit zur Depolarisation der Zelle kommt. Der Membrandepolarisation folgend werden zusätzlich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert, die eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) im Zytoplasma verursachen. Bis *dato* sind sieben P2X-Rezeptorsubtypen (P2X₁₋₇) mit zusätzlichen Spleißformen kloniert worden, welche individuelle Kinetiken aufweisen und pharmakologische Phänotypen repräsentieren (Brake et al., 1994; Burnstock, 2004; Garcia-Guzman, 1996; 1997; Lynch et al., 1999; North, 2002; Simon et al., 1997). Die P2X-Rezeptor-Ionenkanäle bestehen aus drei Untereinheiten (= Trimer), welche ihrerseits jeweils 79 (P2X₆R) bis 595 (P2X₇R) AS aufweisen, inklusive zweier membrandurchspannender Domänen (TM1 und TM2) aus jeweils etwa 20 AS (*Abb. EIN 2*) (Burnstock, 2004). Diese hydrophoben Segmente aller drei Untereinheiten bilden im Wesentlichen die Pore des Kanalproteins. Bis *dato* sind sechs funktionell exprimierte Homotrimere (P2X₁₋₅, P2X₇) und sechs Heterotrimere (P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6} und P2X_{4/6}) charakterisiert. Der purinerge P2X₆R formt keine funktionellen Homotrimere, und P2X₇R bildet mit anderen Subtypuntereinheiten keine Heterotrimere.

Eine lange hydrophile, extrazelluläre Schleife (ca. 300 AS), welche die beiden TM miteinander verbindet, beinhaltet 10 hoch konservierte Cysteinreste, die Disulfidbrücken ausbilden und zusammen mit einer membrannahen, hydrophoben H5-Region eine mögliche Bindungsstelle für Metallionen darstellen, welche an der allosterischen Rezeptormodulation durch Magnesium-, Zink- und Kupferionen beteiligt ist. Zusätzlich enthält diese Schleife eine ATP-Bindungsstelle (Coddou et al., 2011; Erb et al., 2006). Der N-Terminus aller P2XR ist ca. 25 AS lang, wohingegen der C-Terminus in seiner Länge variabel (P2X₆R: 30 AS, P2X₇R: 215 AS) ausgeprägt ist. Beide Termini befinden sich intrazellulär und fungieren als Zielstruktur ("target") einer Reihe möglicher posttranskriptionaler Modifikationen einschließlich RNA "splicing" und Protein-Protein Interaktion.

Alle P2X-Rezeptorsubtypen werden im Nervensystem von Säugetieren exprimiert, mit signifikant differentiellen Expressionsmustern in Regionen des PNS und ZNS (Abbraccio et al., 2009; Nörenberg & Iles, 2000). Dabei können mehrere P2X-Rezeptorsubtypen z.B. in derselben neuroglialen Struktur oder Gehirnregion exprimiert werden (Burnstock & Verkhratsky, 2012; Pankratov et al., 2003). Nachfolgend wird diese differentielle Expression homotrimerer P2X-Rezeptoren in Strukturen des PNS wie auch ZNS inklusi-

ve des Hypothalamus sowie erregbaren Geweben dargestellt, wobei auf deren Funktionalität ausführlich erst später (*Kap. EIN 1.5 & 1.6*) eingegangen wird. Ebenso erfolgt hier keine detaillierte pharmakologische Charakterisierung einzelner P2XR, da dies einen wichtigen Aspekt der Diskussion (*Kap. DIS 4.2*) der vorliegenden Arbeit darstellt.

Die RNA des P2X₁R wurde erstmals aus dem *Vas deferens* der Ratte und aus der humanen *Vesica urinaria* von Valera und Evans (1994; 1995) kloniert. Dieser Rezeptor-subtyp konnte peripher hauptsächlich in glatten Muskeln von Arterien, des Darms und der Harnblase lokalisiert werden, wo er an der parasymphatisch bzw. sympathisch vermittelten Muskeltonusänderung beteiligt ist. Für das PNS zeigte sich eine P2X₁R Expression in Neuronen sensorischer Ganglien (*Ganglion spinale*, DRG) (Aoyama et al., 2011). Das ZNS betreffend gibt es erste Hinweise für eine Expression in Purkinjezellen sowie Astrozyten des *Cerebellum*, sowie in *Cortex*, *Hippocampus*, *Nucleus accumbens* und *Striatum* (Franke et al., 2001a; Kidd et al., 1995; Petruska et al., 2000). Im Hypothalamus der Ratte konnte eine zelluläre Expression des P2X₁R auf Ebene des *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) (Hitzel, 2009) sowie des PVN (Cham et al., 2006) immunhistochemisch nachgewiesen werden. Quantitative RT-PCR Analysen für SON-intrinsische Neurone in Gehirnschnittpräparationen der Ratte erbrachten den Hinweis auf eine marginale Expression des P2X₁R (Vavra et al., 2011).

Der P2X₂R wurde ursprünglich aus der Phäochromocytom-Zelllinie PC12 der Ratte kloniert (Brake et al., 1994). Der Rezeptor ist gleichermaßen im ZNS und im PNS zu finden. So ist dieser Subtyp in *Cortex*, *Cerebellum*, *Hippocampus* und Hypothalamus, sowie im NTS und im Dorsalhorn des Rückenmarks präsent. Auf der Ebene des Hypothalamus wurde dieser Rezeptor-subtyp vor allem in den Kerngebieten des ARC (einschließlich der EM) sowie des MnPO, des PVN, des SON und des *Nucleus ventromedialis hypothalami* (VMH) aufgrund des Einsatzes immunhistochemischer und elektrophysiologischer Methoden charakterisiert (Burnstock & Knight, 2004; Collo et al., 1996; Hitzel, 2009; Kanjhan et al., 1999; Kidd et al., 1995; Shibuya et al., 1996; Simon et al., 1997; Vulchanova et al., 1996; Xiang et al., 1998b). Den HVL betreffend konnte für alle endokrinen Zelltypen sowohl die Expression P2X₂R spezifischer mRNA als auch die Stimulation der entsprechenden Hormonsekretion demonstriert werden (Birder et al., 2004; Lee et al., 2000; Stojilkovic & Koshimizu, 2001; 2010). Als einzigartig für alle Vertreter der P2XR-Familie bei Maus, Mensch, Meerschweinchen und Ratte ist das Auftreten mehrerer Spleißvarianten dieses Purinozeptor-subtyps, die untereinander homo- und heterotrimere Ionenkanäle mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften bilden können (Brändle et al., 1997; Koshimizu et al., 1998; Stojilkovic et al., 2000). Für nahezu alle Varianten gilt, dass beide intrazellulären Termini *consensus* Phosphorylierungsstellen für

die PKA und Proteinkinase C (PKC) enthalten, welche v.a. die P2X₂R-Aktivität modulieren (Boue-Grabot et al., 2000; Chow & Wang, 1998). Zudem spielt der C-Terminus eine wichtige Rolle im Rahmen der P2X₂R Desensibilisierung (Coddou et al., 2011).

P2X₃-Rezeptorsubtyp-spezifische mRNA Expression wurde erstmals in humanem Herzgewebe sowie sensorischen Neuronen des Hinterwurzelganglions der Ratte nachgewiesen, welche auch die mRNA des P2X₂R Subtyps exprimieren, so dass es zur Bildung neuronaler, heterotrimerer P2X_{2/3}R kommen kann (Chen et al., 1995; Garcia-Guzman et al., 1997; Lewis et al., 1995). Homo- und heterotrimerer P2X₃R spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung nozizeptiver und mechanosensorischer Signale aus viszerale Organen (Ford et al., 2006; Galligan, 2004). Im ZNS werden P2X₃R resp. P2X_{2/3}R in der *Medulla oblongata* (NTS) und im Dorsalhorn des Rückenmarks exprimiert und sind möglicherweise an der Glutamatfreisetzung beteiligt (Jin et al., 2004; Nakatsuka & Gu, 2001). Im Hypothalamus findet sich der P2X₃R v.a. in Neuronen des PVN, welche efferent in die ventrolaterale *Medulla oblongata* projizieren, bzw. des SON, sowie in neurohypophysären Terminalen vasopressinerner PVN-Neurone (Cham et al., 2006; Knott et al., 2005).

Der P2X₄-Rezeptor wurde nahezu zeitgleich von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander aus dem *Ganglion cervicale superior*, dem *Hippocampus* und aus Pankreaszellen der Ratte kloniert (Bo et al., 1995; Buell et al., 1996; Wang et al., 1996). P2X₄R werden weit verbreitet im Gehirn, in den kortikalen Pyramidenzellen und in Interneuronen der CA1-3 Regionen des *Hippocampus* sowie in den Purkinjezellen des *Cerebellum* exprimiert. Den Hypothalamus betreffend konnte eine signifikante Expression dieses Purinozeptorsubtyps in zahlreichen *Areae* wie der POA und in Kerngebieten wie MnPO, PVN, SCN, SON und *Nucleus tuberomammillare* (TM) nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte der P2X₄R im Rückenmark und in autonomen und sensorischen Ganglien detektiert werden (Buell et al., 1996; Burnstock, 2007; Burnstock & Knight, 2004; Collo et al., 1996; Hitzel, 2009; Le et al., 1998; Rubio & Soto, 2001; Surprenant & North, 2009; Wang et al., 1996; Xiang et al., 1998a). Außerdem wird dieser Rezeptorsubtyp in laktotrophen HVL-Zellen exprimiert, wobei es nach Ligandenbindung zur gesteigerten Freisetzung von Prolaktin in den Blutkreislauf kam (Coddou et al., 2011; He et al., 2003; Zemkova et al., 2010). Neuere Untersuchungen zeigten, dass der P2X₄R zelltypspezifisch zwar auch in einzelnen Neuronen zu finden ist, vorrangig jedoch in mikroglialen Zellen und Makrophagen exprimiert wird. Verletzungen des Rückenmarks bzw. der Spinalnerven induzierten eine „up“-Regulation dieses Rezeptorsubtyps in aktivierten lokalen Mikrogliazellen, welche am Prozess der neurogenen Schmerzübermittlung und an der inflammatorischen Antwort beteiligt sind (Bowler et al., 2003; Tsuda et al., 2003; Ulmann et al., 2008).

Der P2X₅-Rezeptorsubtyp wurde ursprünglich aus dem *Ganglion coeliacum* und dem Herzen der Ratte kloniert (Collo et al., 1996; Garcia-Guzman, 1996). Wie die Untereinheiten der P2X₂, P2X₄ und P2X₆ Purinozeptorsubtypen konnten auch die Untereinheiten des P2X₅-Rezeptorsubtyps in zahlreichen neuroglialen ZNS-Strukturen wie dem cervikalen Rückenmark, dem *Nucleus trigeminalis* (NTG) oder der *Medulla oblongata* demonstriert werden. Bezüglich des Hypothalamus ergaben sich bis *dato* sowohl molekularbiologische, immunhistochemische als auch pharmakologisch-funktionelle Hinweise auf P2X₅R Expression für vasopressinerge bzw. nitrerge, magnozellularäre Neurone des PVN sowie SON des Rattengehirns bzw. Nervenzellen des VMH, SON und ARC sowie des LH im Mäusegehirn (Burnstock & Knight, 2004; Collo et al., 1996; Guo et al., 2008; Xiang et al., 2006). Den PVN betreffend konnten P2X₅R auch auf parvozellulären PVN-Neuronen mit efferenter Projektion in die rostro-ventrolaterale *Medulla oblongata* demonstriert werden (Cham et al., 2006).

Der rattenspezifische P2X₆R wurde erstmals aus dem *Ganglion cervicale superior* sowie dem Gehirn kloniert (Collo et al., 1996; Soto et al., 1996). Auf mRNA- und Proteinebene konnte dieser Purinozeptor in zahlreichen Hirnstrukturen einschließlich des *Bulbus olfactorius*, der Purkinjezellen des *Cerebellum*, der Pyramidenzellen des *Hippocampus*, sowie moderat der hypothalamischen Kerngebiete ARC, MnPO, POA, PVN, SON und VMH aufgezeigt werden (Burnstock & Knight, 2004; Collo et al., 1996; Rubio & Soto, 2001; Soto et al., 1996; Xiang & Burnstock, 2005b). Zudem wurde die P2X₆R Expression für sensorische Ganglien, Skelettmuskeln und die glatte Muskulatur des *Uterus* beschrieben (Collo et al., 1996; Meyer et al., 1999; Xiang et al., 1998a). Wie bereits erwähnt, bilden P2X₆R-Untereinheiten keine funktionellen Homotrimere, sondern verbleiben als Monomere im endoplasmatischen Retikulum. Jedoch bilden die einzelnen P2X₆R-Monomere mit Untereinheiten der Purinozeptorsubtypen P2X₂ und P2X₄ funktionelle Heterotrimere (Coddou et al., 2011b; North, 2003; Ormond et al., 2006). Es wird angenommen, dass diese heterotrimeren, Liganden-gesteuerten Ionenkanäle durch die Vereinigung der pharmakologischen Eigenschaften der jeweiligen P2XR eine signifikante Rolle bei der Regulation der Hormonfreisetzung aus axonalen Synapsen des PVN und SON übernehmen könnten (Loesch & Burnstock, 2001).

Der P2X₇-Rezeptor wurde erstmals aus dem Rattengehirn isoliert (Surprenant et al., 1996). Unter Verwendung von Genexpressionsanalysen und Immunzytochemie wurde eine verstärkte Expression dieses Subtyps in *Cortex*, *Hippocampus*, Hirnstamm, *Nucleus accumbens* und DRG detektiert (Franke et al., 2001; Kobayashi et al., 2005; Papp et al., 2004; Sperlágh et al., 2003; 2006). Auf zellulärer Ebene konnte die Expression des P2X₇R in kultivierten sympathischen Neuronen und kleinvolumigen Neuronen des Cere-

bellum ermittelt werden (Allgaier et al., 2004; Cavaliere et al., 2002; Hervás et al., 2003), und neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Rezeptorsubtyp an der Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) in hippocampalen Neuronen beteiligt ist. Auf neuronales oder erregbares Gewebe sowie die Hirnanhangsdrüse bezogen werden P2X₇R überwiegend in verschiedenen glialen Zellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Schwannsche Zellen) exprimiert (Chessell et al., 2005; Coddou et al., 2011; Collo et al., 1996; Di Virgilio et al., 2001; 2009; Franke et al., 2001; Rassendren et al., 1997; Skaper et al., 2010). In hypothalamischen SON-Neuronen sowie in neurohypophysären Synapsen vasopressinergischer SON-Neurone ließ sich durch immunhistochemische und funktionelle elektrophysiologische Untersuchungen der P2X₇R nachweisen (Shibuya et al., 1999). Zusammen mit den Purinozeptoren P2X₂₋₄ könnte P2X₇R an der Sekretion von ADH aus neurohypophysären Terminalen beteiligt zu sein (Lemos et al., 2012). Zusätzlich ist P2X₇R im Rahmen der Synthese und Freisetzung von Zytokinen, der inflammatorischen Antwort und der neurogenen Schmerzübermittlung aktiv (Chakfe et al., 2002; Ferrari et al., 1997c; Mehta et al., 2001; Perez-Medrano et al., 2009).

1.4.3. Intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung von P2X-Rezeptoren

Elektrophysiologische "whole-cell" Experimente zeigten, dass drei extrazelluläre ATP-Moleküle zur Aktivierung und Öffnung eines trimeren P2XR-Ionenkanals nötig sind (Ding & Sachs, 1999; Jiang et al., 2003). Die Aktivierung des P2XR führt zu einer vorwiegend Na⁺- und Ca²⁺-abhängigen Depolarisation der Zellmembran und Änderung des elektrochemischen Potentials von Neuronen und Gliazellen, sowie einer Aktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle vom L-Typ (Soto et al., 1997). Die Erhöhung der [Ca²⁺]_i *per se* induziert in Nervenzellen über eine Bindung an Calmodulin z.B. "mitogen-activated" MAP-Kinasen (Erb et al., 2006) und sekundär die Proteinkinase II, welche Synapsin auf der Oberfläche synaptischer Vesikel phosphoryliert. Dies führt zur Abtrennung der Vesikel vom Aktinzytoskelett, der nachfolgenden Fusion der Vesikel mit der Zellmembran in den präsynaptischen Nervenendigungen und einer exozytotischen Freigabe des Neurotransmitterinhalts in den synaptischen Spalt. Unter anderem wurde so bereits die P2XR-vermittelte Freisetzung von Glutamat demonstriert (Khak et al., 1998; Lin et al., 1990). Eine weitere Variante der purinergen Signalübertragung besteht im Falle des P2X₇R etwa in Mikrogliazellen darin, die MAP-Kinasen ERK (*extracellular signal-related kinase*) und p38 zu aktivieren, wodurch es zur Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) kommt, welches u.a. in Zusammenhang mit

der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung gebracht wird (Hide et al., 2000).

1.4.4. Metabotrope P2Y-Rezeptoren und deren intrazelluläre Signaltransduktion

Bis *dato* sind für Säugetiere acht P2Y-Rezeptorsubtypen (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) identifiziert und kloniert worden; sie gehören wie die P1-Rezeptoren zu den GPCRs (Abbraccio et al., 2003; 2006) (*Kap. EIN 1.4.1*). Grundsätzlich werden P2Y-Rezeptoren (P2YR) durch extrazelluläre Uridin-Nukleotide wie Uridin-5`triphosphat (UTP), und/oder Adenosin-Nukleotide wie ATP und ADP aktiviert. Einige P2YR werden prinzipiell durch Nukleotiddiphosphate (P2Y_{1,6,12,13}), andere hauptsächlich durch Nukleotidtriphosphate (P2Y_{2,4}) aktiviert. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen eine Lokalisation von P2Y₁ resp. P2Y₄ im präoptischen (MPOA, SON) sowie anterioren und tuberalen Teil des Hypothalamus (ARC, DMH, LH, PVN und VMH). Alle genannten Kerngebiete des letzteren sind maßgeblich an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt. Hierbei wird in der Literatur hervorgehoben, dass gliale Astrozyten im *Nucleus arcuatus* P2Y₁R exprimieren (Seidel et al., 2006; Song et al., 2011). Weiterhin wird die mRNA der Purinozeptorsubtypen P2Y₁ und P2Y₄ im tuberomammillaren Kerngebiet des Hypothalamus exprimiert, welches vermutlich in der Kontrolle des Schlaf- / Wachrhythmus involviert ist (Serveeva et al., 2006). Erste Hinweise einer physiologischen Rolle von ATP im Rahmen der zentralen Kontrolle der Futteraufnahme von Ratten wurden durch die icv Injektion von Purinozeptoragonisten und -antagonisten gezeigt; die Bedeutung des P2Y₁R sowie von P2XR für die Regulation der Futteraufnahme wird diskutiert (Kittner et al., 2006).

Generell vermitteln die Purinozeptorsubtypen P2Y_{1,2,4,6,11} über den G_{q/11}-Signalweg, teilweise auch den G_s-Typ (P2Y₁₁R), die Aktivierung der PLC mit Generierung von IP₃ und Diacylglycerol (DAG). In Folge der Stimulation IP₃-abhängiger Ionenkanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulum resultiert eine Ca²⁺-Mobilisierung aus diesem intrazellulären Speicher (Burnstock, 2006; Ravelic & Burnstock, 1998; Stojilkovic, 2009). Die Aktivierung der P2Y₁₂₋₁₄-Rezeptoren inhibiert durch Bindung an G_{i/o}-Proteine die Adenylylzyklase und die Bildung von cAMP (Abbraccio et al., 2003; 2006; Burnstock, 2006; Jin et al., 2001; Muller, 2002; Stojilkovic, 2009). Der humane P2Y₁₁R ist sowohl an den IP₃- (G_{q/11}-Protein) als auch den cAMP-Signalweg (G_s-Protein) gekoppelt und führt folgerichtig nach Aktivierung durch ATP zu einem Anstieg von cAMP, IP₃ und Ca²⁺ im Zytoplasma, wohingegen durch UTP-Bindung die Erhöhung der [Ca²⁺]_iz ohne Stimulation des cAMP- und IP₃-Spiegels verläuft (Abbraccio et al., 2006; Communi et al., 1999, White et al., 2003). Die weitere Signalübertragung ist - wie bei den P1-Rezep-

toren - abhängig vom jeweiligen Zelltyp, der den Rezeptor exprimiert, sowie den zellulär exprimierten Klassen an MAP-Kinasen, Proteinkinasen, Ca²⁺- und K⁺-Kanälen. Darüber hinaus konnte in den letzten Jahren vermehrt gezeigt werden, dass u.a. an Neuronen GPCRs wie einige P2YR direkt, ohne die G-Protein-abhängige Aktivierung von Proteinkinasen, an spannungsabhängige Ca²⁺- und K⁺-Kanäle, Transportproteine oder Integrine der Zellmembran koppeln (Brown et al., 2000; Filippov, 2000; Simon, 2002) und deren Konformationszustand modulieren können (Abbraccio et al., 2006; Dolphin, 2003; Hille, 1994; Mantegazza et al., 2005). So interagiert die Proteinbindungsdomäne am C-Terminus des P2Y₁R direkt mit dem Na⁺/H⁺ "exchanger regulatory factor" (NHERF) und übt Einfluss auf den Ionenaustausch über die Plasmamembran aus (Erb et al., 2006; Hall et al., 1998).

1.4.5. ATP-Speicherung, -Freisetzung und extrazellulärer Abbau

Das Zytoplasma von Neuronen weist eine Konzentration an freiem ATP im niedrigen millimolaren Bereich (< 5 mM) auf, wohingegen ATP in synaptischen Vesikeln in einer Konzentration von über 100 mM gespeichert werden kann (Burnstock, 2007). Als bei neutralem pH negativ geladenes Molekül kann ATP Biomembranen nur limitiert passieren. Es werden daher mehrere Mechanismen diskutiert, wie synaptisch lokalisiertes ATP als Neuromodulator in den Extrazellularraum gelangt (*Abb. EIN 1*). (1) Neurone aber auch Astrozyten setzen ATP mit Hilfe der Ca²⁺-abhängigen vesikulären Exozytose frei (Sperlágh & Vizi, 1996; Coco et al., 2003). Dabei wird ATP zunächst mittels einer spezifischen ADP/ATP-Translokase, vergleichbar derjenigen in der inneren Mitochondrienmembran, vesikulär aufgenommen, wobei auch eine kanal-medierte Diffusion von ATP in die Vesikel diskutiert wird (Gualix et al., 1999; Lee & Witzmann, 1983; Luqmani, 1981; Pankratov et al., 2006; Rikhy et al., 2003). (2) PNS-Neurone setzen ATP als Ko-transmitter mit Acetylcholin (ACh) oder Noradrenalin (NA) gemeinsam aus demselben oder aus verschiedenen sekretorischen Vesikeln frei (Morel & Meurier, 1981; Stjarne, 2001). Im ZNS entlassen Neurone ATP durch Exozytose alleine oder zusammen mit Glutamat bzw. γ -Amino-Buttersäure (GABA) in den synaptischen Spalt (Jo & Role, 2002; Jo & Schlichter, 1999; Robertson & Edwards, 1998; Trueta & De-Miguel, 2012), wobei dessen Konzentration an ATP dabei auf Werte von 5 - 500 μ M ansteigt (Khakh, 2001; Pankratov et al., 2006). (3) Neben der Exozytose kann ATP von Astrozyten und anderen nicht-neuronalen Zellen über Connexin-Hemikanäle, Volumen-sensitive Chloridkanäle oder sogar dilatierte P2X₇R aus der Zelle gelangen (Darby et al., 2003; Pearson et al., 2005; Stout et al., 2002; Suadicani et al., 2006). (4) Nicht-neurogliale Zellen bedienen

sich zur Ausschleusung von ATP auch einiger "ATP binding cassette" (ABC) Transportproteine (Al-Awqati, 1995; Burnstock, 2007; Schwiebert, 1999; Sperlágh et al., 2007; Wang et al., 1996). (5) ATP kann auch aufgrund einer erhöhten Membranpermeabilität aus geschädigten bzw. sterbenden Zellen austreten (Burnstock, 2007).

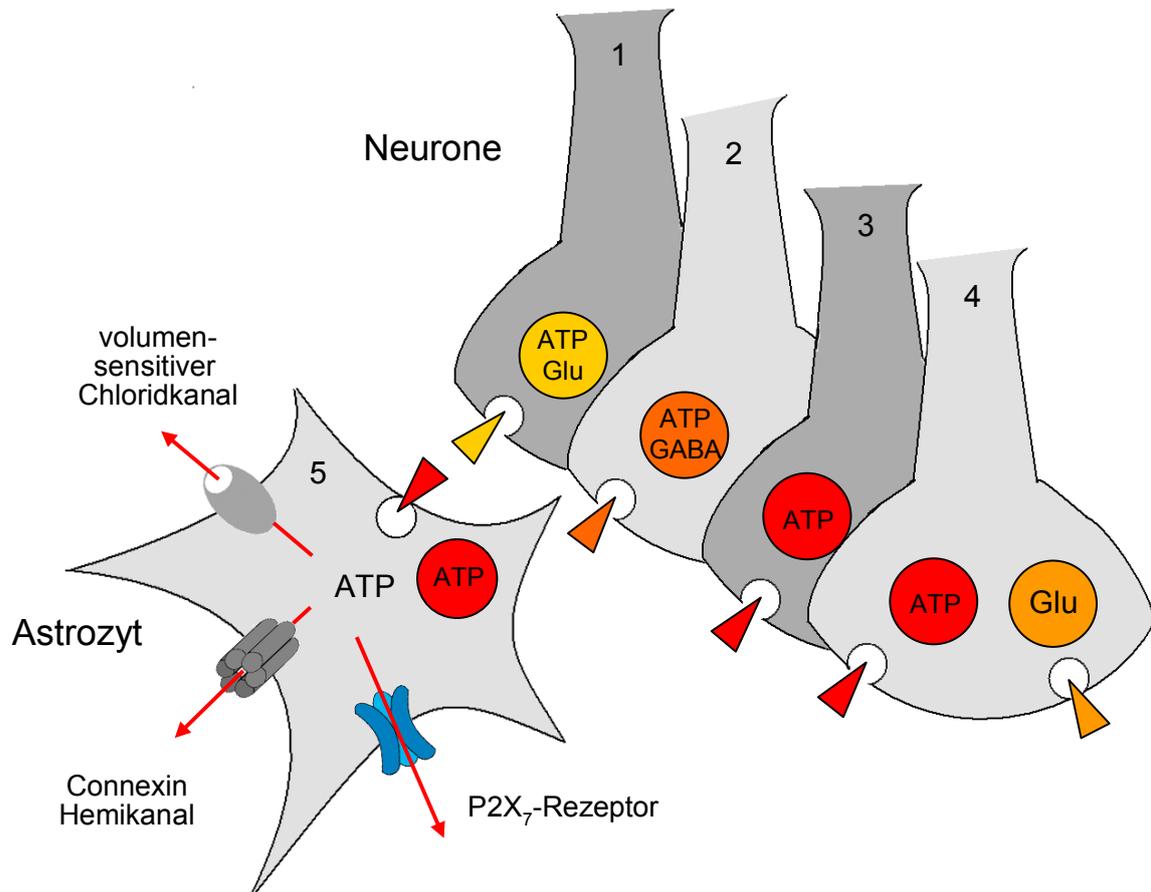


Abb. EIN 1: Freisetzungsmechanismen für ATP im ZNS

In synaptischen Nervenendigungen ist ATP vesikulär gespeichert, wobei es als einziger Neurotransmitter einer Synapse (3), kolokalisiert in denselben Vesikeln mit klassischen Neurotransmittern wie Glutamat (Glu) oder γ -Amino-Buttersäure (GABA) (1,2) sowie kodistribuiert mit Speicherung von ATP und Glu, GABA in verschiedenen Vesikeln (4) vorkommen kann. Die Freisetzung der Vesikel kann räumlich (lokal) und zeitlich (spatial) unabhängig voneinander erfolgen. Die Freisetzung von ATP aus Astrozyten (5) kann zusätzlich über Connexin-Hemikanäle, volumensensitive Chloridkanäle oder den Purinozeptor P2X₇ erfolgen. Diese Darstellung berücksichtigt nicht die Freisetzung von ATP durch ABC-Transporter. Modifiziert nach Hitzel (2009).

Extrazelluläre Nukleotide werden im Nervensystem durch mehrere Enzymfamilien, zum großen Teil membranständige Ekto-Nukleotidasen, degradiert. Diese schließen Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDasen), Ekto-Nukleotidpyro-Phosphatasen/-Phosphodiesterasen (E-NPPs), die Glykosylphosphatidylinosit- (GPI-) veran-

kerten alkalischen Phosphatasen und die ebenfalls GPI-verankerte Ekto-5'-Nukleotidase ein (Zimmermann, 2001). Die NTPDase-Enzymfamilie besteht aus acht Subtypen (NTPDase1-8), die sich in ihrer Substratspezifität resp. der Hydrolyserate für Nukleotiddiphosphate und ihrer zellulären Lokalisation unterscheiden. NTPDase1-3,8 sind integrale Zellmembranproteine mit einer extrazellulären Aktivitätsdomäne, die mit Ausnahme von NTPDase8 alle im ZNS exprimiert werden (Robson et al., 2006; Wang et al., 1997; Wang & Guidotti, 1998). Der Subtyp NTPDase1 wird sowohl in Neuronen und Gliazellen, als auch in Endothel- und HVL-Zellen exprimiert (Braun et al., 2000; 2001; He et al., 2005; Sperlágh et al., 2007; Wang & Guidotti, 1998). NTPDase2 wird während der neuronalen Entwicklung des Rattengehirns in Stamm- und Vorläuferzellen für Astrozyten und postnatal in reifen Astrozyten exprimiert (Braun et al., 2003; Shukla et al., 2005). Für NTPDase3 wird eine Lokalisation in der Zellmembran beschrieben, jedoch konnte dieses Enzym immunhistochemisch auch in Mitochondrien von Neuronen im Bereich des ARC und der LHA des Hypothalamus detektiert werden (Zsarnovszky et al., 2009). Die NTPDasen4-7 sind ebenfalls intrazellulär in Zellorganellmembranen zu finden (Robson et al., 2006).

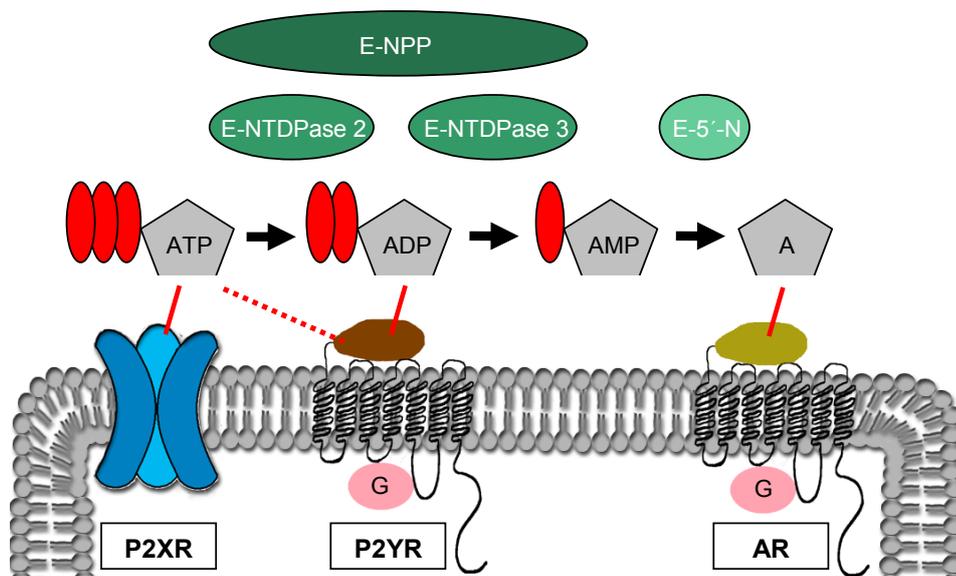


Abb. EIN 2: Die Funktion von Ektonukleotidasen in der sequentiellen Aktivierung purinergischer Rezeptoren

In den Extrazellulärraum freigesetztes ATP kann durch zwei, meist membranständige Enzymfamilien, die Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDasen) und die Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen/-Phosphodiesterasen (E-NPPs) zu AMP hydrolysiert werden. AMP wird mit Hilfe der Ekto-5'-Nukleotidase (E-5'-N) zu Adenosin (A) abgebaut. ATP aktiviert sowohl membranständige, ionotrope P2X- als auch verschiedene G-Protein gekoppelte metabotrope P2Y-Rezeptorsubtypen. Das Hydrolyseprodukt ADP aktiviert ebenfalls P2YR, jedoch keine P2XR. Adenosin dient als Signalmolekül an G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren (AR).

Modifiziert nach Stojilkovic (2009)

Die NTPDasen1-3 hydrolysieren nicht nur ATP und/oder ADP zu AMP, sondern bauen auch Uridin-Nukleotide wie UTP und UDP ab. NTPDase1 und NTPDase3 weisen eine vergleichbare Affinität zu ATP und ADP auf, und NTPDase1 führt ATP durch zweifache Dephosphorylierung direkt in AMP über (Abb. EIN 2). Die NTPDase2 hingegen zeichnet sich durch eine Substratpräferenz für ATP >> ADP aus, wodurch es zu einer Akkumulation von ADP im extrazellären Raum kommen kann (Robson et al., 2006; Zimmermann, 2001). Die bereits erwähnte Familie der E-NPPs mit ihren drei Vertretern (E-NPP1-3) hydrolysiert ATP, analog zur NTPDase1, direkt zu AMP, und schließlich degradieren die Ekto-5'-Nukleotidase sowie die alkalische Phosphatase AMP zu Adenosin (Abb. EIN 2) (Sperlágh et al., 2007; Zimmermann, 2000; 2001). Somit begrenzen diese Enzyme die Aktivierung ATP-sensitiver P2-Rezeptoren, schützen zudem die P2XR durch raschen Abbau von ATP vor Desensibilisierung und ermöglichen es, dass die ATP-Abbauprodukte ihrerseits als Signalmoleküle mit Aktivierung unterschiedlicher purinergere Rezeptoren (P1, P2Y) dienen (Sperlágh et al., 2007; Stojilkovic, 2009).

1.5. Regulatorische Kontrolle des endokrinen Hypophysenvorderlappens durch *releasing* und *inhibiting* Faktoren des *Nucleus arcuatus*

Die neuroendokrine Komponente des *Nucleus arcuatus* als ventralem Kerngebiet des tuberalen Hypothalamus, für das menschliche Gehirn auch als *Nucleus infundibularis* bezeichnet (Kahle, 2001), stellt eine bedeutende neurogliale Schnittstelle zwischen ZNS und dem peripher-endokrinen System dar. Dabei steht die übergeordnete neuronale Kontrolle der hypophysären Freisetzung an Wachstumshormon (Somatotropin = STH; "growth hormone" = GH) einerseits und Prolaktin (PRL) andererseits im Vordergrund.

1.5.1. *Nucleus arcuatus*: Regulation des Körperwachstum

Wachstum beschreibt die Größen- und Massenzunahme auf der Organisationsebene von Zellen, Organen und Organismen, und stellt für einen vielzelligen Organismus einen komplexen Prozess dar, abhängig vom Gleichgewicht zwischen zellulärer Hyperplasie, Hypertrophie und extrazellulärer Matrixzubildung einerseits, sowie allen Formen des Zelltodes (Apoptose, Nekrose etc.) andererseits (Murray & Clayton, 2013). Diese Mechanismen sind endokrin durch Hormone sowie auto- und parakrin durch zahlreiche Wachstumsfaktoren gesteuert.

Das "zentrale" Hormon der Wachstumsregulation ist das aus 191 AS bestehende Somatotropin (STH = GH), das von den somatotrop(h)en Zellen des HVL synthetisiert und in pulsatilem Form im Bereich des HVL in die Blutbahn entlassen wird (Bertherat et al.,

1995; Tena-Sempere et al., 2000; Veldhuis & Bowers, 2003). GH ist ein anaboles Hormon, welches das Wachstum von Knochen und Muskulatur einerseits direkt über den GH-Rezeptor in der Muskulatur oder der Epiphysenfuge von Röhrenknochen, andererseits indirekt *via* Freisetzung des *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) aus Hepatozyten, Chondro- und Myoblasten stimuliert (Domené et al., 1993; Schwander et al., 1983; Straus & Takemoto, 1990; Tannenbaum et al., 2003).

Kleinzellige meist bi- und tripolare Neurone des ARC synthetisieren *releasing-* und *inhibiting* Faktoren, die nach axonalem Transport in das erste Kapillarnetz der *Eminentia mediana* entlassen werden (Chronwall, 1985; Halász, 2000). Dabei ist als *releasing* Faktor vorrangig *growth-hormone-releasing hormone* (GHRH) aus Neuronen des ventrolateralen ARC (teilweise auch des VMH) zu nennen, welches seinerseits *via* G-Protein gekoppelter GHRH-Rezeptoren sowohl die GH-spezifische Gentranskription (Corazzini & Salvatori, 2013; Mano-Otagiri et al., 2006), als auch die Freisetzung des Wachstumshormons GH aus den somatotrophen Drüsenzellen des HVL stimuliert (*Abb. EIN 3*) (Minami et al., 1998; Wehrenberg & Giustina, 2000). Ausschließlich die Sekretion des GH kann andererseits durch den hypothalamischen *inhibiting* Faktor Somatostatin (SOM) unterdrückt werden (Wehrenberg & Giustina, 2000), ein Neuropeptid, welches in erster Linie von den terminalen Synapsen kleinzelliger Neurone des *Nucleus periventricularis* (PE) in das Kapillarnetz der EM sezerniert wird (Vincent et al., 1985). Darüber hinaus wirkt aus Interneuronen des ARC synaptisch freigesetztes SOM hemmend auf die GHRH-Neurone in unmittelbarer Umgebung ein, so dass weniger GHRH den HVL erreicht (*Abb. EIN 3*) (Bluet-Pajot et al., 2001; Minami et al., 1998). Von fünf bis *dato* charakterisierten SOM-spezifischen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren exprimieren die somatotrophen HVL-Zellen der Ratte ausschließlich den SSTR₂-Rezeptorsubtyp (Ben-Shlomo et al., 2013; Bruno et al., 1993, 1994). Durch Ligandenbindung kommt es zu einer Öffnung von K⁺-Kanälen mit nachfolgender Membranhyperpolarisation (Corazzini & Salvatori, 2013; Tsaneva-Atanasova et al., 2007) und damit reduzierter GH-Freisetzung (*Abb. EIN 3*) (Zheng et al., 1997). Durch detaillierte Untersuchungen an adenohipophysären Primärzellkulturen konnte dabei ausgeschlossen werden, dass GH autoreflekto-risch seine eigene Sekretion aus somatotrophen Zellen inhibiert (Richman et al., 1981).

Im Rahmen einer kurzfristigen Regulation der Synthese und/oder Freisetzung von GH kann die neuroendokrine Aktivität hypothalamischer SOM-Neurone durch eine in der Endokrinologie ungewöhnliche, positive *feedback* Stimulation eines hypothalamischen *inhibiting* Faktors durch in diesem Fall GH selbst erfolgen. GH-Rezeptoren werden dabei vor allem im Bereich des PE (*Abb. EIN 3*), teilweise auch des ARC exprimiert (Burton et

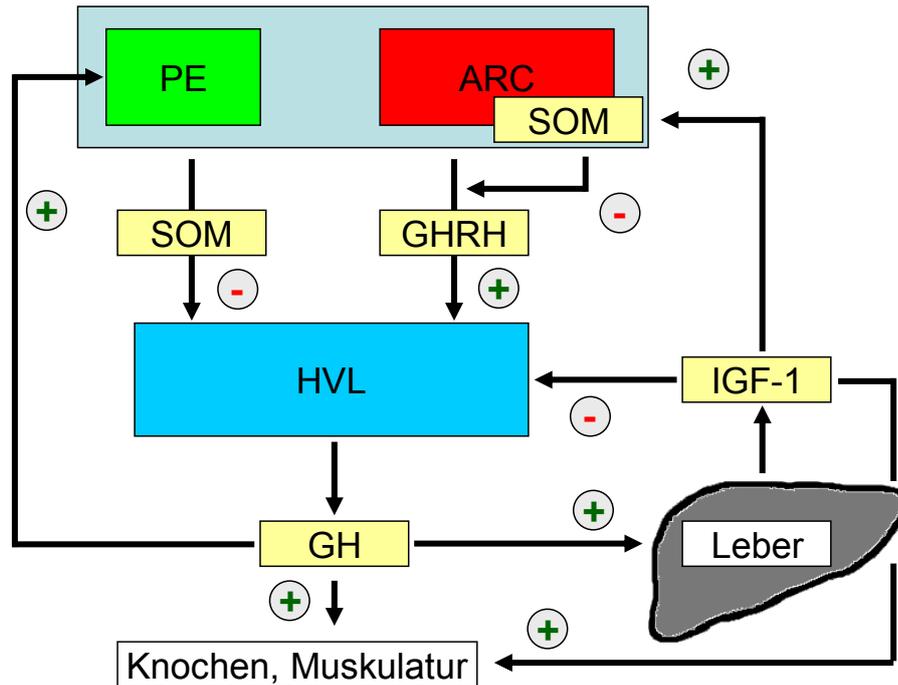


Abb. EIN 3: Regulation der Somatotropinsynthese und -freisetzung aus dem HVL

Wachstumshormon (GH) wird in somatotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) gebildet und in die Blutbahn freigesetzt. Auf die Skelettmuskulatur sowie v.a. Röhrenknochen (Epiphysenfuge) wirkt GH entweder *per se* wachstumsfördernd oder indirekt über die (vor allem in der Leber, aber auch Chondroblasten und Myoblasten) induzierte Synthese und Freisetzung des *insulin-like growth factor* IGF-1. Somatostatin (SOM) exprimierende Neurone des *Nucleus periventricularis* (PE) und *growth hormone-releasing hormone* (GHRH) synthetisierende Neurone des *Nucleus arcuatus* (ARC) hemmen bzw. aktivieren somatotrophe Zellen des HVL.

Durch einen direkt positiven, indirekt negativen *feedback* Mechanismus bewirkt hypophysäres GH eine gesteigerte Synthese von SOM in Neuronen des PE und damit Reduktion der GH-Sekretion im HVL. IGF-1 hemmt einerseits die Expression von GH in den glandotropen HVL-Zellen und stimuliert andererseits in einem ebenfalls direkt positiven, indirekt negativen "*feedback loop*" SOM-produzierende Neurone des ARC, die ihrerseits durch synaptische SOM-Freisetzung benachbarte ARC-Neurone, die GHRH exprimieren, inhibieren und somit die GH-Synthese und -Freisetzung reduzieren.

al., 1992). Wie Studien an Hand von Maus- und Rattenmodellen belegen, induziert dabei GH in erster Linie die Expression seiner eigenen Rezeptorproteine über den STAT5-Signalweg (*signal transducer and activator 5*) (Bennett et al., 2005; Zheng et al., 1997). Darüber hinaus scheint GH auch Neuropeptid Y (NPY) exprimierende Nervenzellen des ARC zu aktivieren, die ihrerseits efferent SOM exprimierende Zellen des PE aktivieren, wodurch wiederum vermehrt SOM in das portale Blutgefäßbett des HVL gelangt (Minami et al., 1998).

Bei der bedeutenderen Langzeitkontrolle der GH-Sekretion spielt der Wachstumsfaktor IGF-1 die zentrale Rolle. Betrachtet man das GH-System als den glandotropen Hor-

monsystemen des HVL zugehörig - was in den meisten Lehrbüchern bis *dato* unverständlicherweise nicht so gesehen wird - so bewirkt die klassische negative *feedback* Regulation eine IGF-1 vermittelte *down*-Regulation der GH-Genexpression in den somatotrophen HVL-Zellen (*Abb. EIN 3*) (Berelowitz et al., 1981; Niiori-Onishi et al., 1999; Romero et al., 2012). Darüber hinaus lassen sich IGF-1 spezifische Rezeptoren auf ARC-intrinsischen, SOM-immunopositiven Neuronen nachweisen, die, wie schon erwähnt, hemmend auf GHRH-Neurone des ARC einwirken (*Abb. EIN 3*) (Bluet-Pajot et al., 2001). Die icv Mikroapplikation von IGF-I an GH-defizienten Ratten hatte folgerichtig eine Senkung der GHRH-spezifischen mRNA-Expression im ARC zur Folge (Bermann et al., 1994; Sato & Frohman, 1993).

In den letzten Jahren wurde ein weiterer, potentieller neuroendokriner Signalweg für die GH-Regulation postuliert. So wurde bei Applikation kurzkettiger synthetischer Peptide wie GHRH-6, sogenannter *growth hormone secretagogues* (GHS), eine erhöhte hypophysäre GH-Sekretion beschrieben (Smith, 2005; Smith et al., 1997; Tannenbaum et al. 2003). Kojima und Kollegen (1999) identifizierten das aus 28 AS aufgebaute Hormon Ghrelin, das u.a. in den Fundusdrüsen des Magens gebildet wird und offensichtlich einen endogenen Liganden des GHS Rezeptors (GHS-R) darstellt. Ghrelin ist darüber hinaus ein bedeutender Mediator im Rahmen der Energiehomöostase und stimuliert über die Aktivierung vor allem von NPY exprimierenden Neuronen im ARC den Appetit und die Nahrungsaufnahme (*Kap. EIN 1.6*) (Nogueiras et al. 2008; Puztai et al. 2008). GHS-R ließen sich v.a. im HVL und im ARC, sowie hypothalamischen Kerngebieten wie dem SCN, SON oder VMH lokalisieren (Guan et al., 1997; Smith, 2005). Die Ghrelin-induzierte GH-Sekretion erfolgt somit einerseits durch die Aktivierung der somatotrophen HVL-Zellen oder der GHRH-Neurone des ARC, bzw. durch die Hemmung der ARC-intrinsischen SOM-Neurone (Mano-Otagiri et al., 2006; Osterstock et al., 2010; Smith, 2005; Tannenbaum et al. 2003). Die Sekretion von GH in das zweite hypophysäre Kapillarbett durch die somatotrophen Zellen unterliegt letztendlich einer weiteren, im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher beleuchteten Kontrolle etwa durch Sexual- oder Schilddrüsenhormone (Anderson et al., 2004; Bideci & Camurdan, 2009; Bilezikjian & Vale, 1983; Clark et al., 1988). Auf die mögliche Bedeutung purinerge Agonisten wird im *Kap. EIN 1.5.3* näher eingegangen

1.5.2. *Nucleus arcuatus*: Regulation der Prolaktinsekretion

Das strukturell mit dem GH eng verwandte und im Laufe der letzten 400 Millionen Jahre aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein hervorgegangene Prolaktin (PRL) wird in

den lactotrophen Drüsenzellen des HVL und deren mammosomatotrophen Vorläuferzellen synthetisiert (Frawley & Boockfor, 1986; Frawley et al., 1986). PRL repräsentiert das wichtigste Hormon für die Laktogenese und Galaktopoese der Milchdrüse (*mamma*) weiblicher Säugetiere (Ben-Jonathan, 1985; Benker et al., 1990). Das 197 AS große Polypeptidhormon wird darüber hinaus auch in *Cortex*, *Hippocampus*, *Amygdala* und einigen CVOs gebildet (Devito, 1988; Freeman et al., 2000; Thompson, 1982). Immunhistochemische Analysen lokalisierten dieses Hormon ebenfalls in den hypothalamischen Kerngebieten des DMH, PVN, SON und VMH (Griffond et al., 1994; Hanson et al., 1982).

Die hypophysäre PRL-Sekretion wird durch eine Vielfalt an Stimuli aus der externen Umwelt (Licht, Stress) sowie fortpflanzungsbiologisch relevante Verhaltensweisen (Paarung, Stillen) beeinflusst (Neill, 1970; 1974; Neill et al., 1982; Terkel et al., 1972). Die übergeordnete, hypothalamische Kontrolle der hypophysären PRL-spezifischen Synthese und Sekretion gestaltet sich im Wesentlichen inhibitorisch. Die hohe basale Aktivität der lactotrophen Zellen bei vor allem weiblichen Säugetieren wird durch hypothalamische *PRL-inhibiting* Faktoren (PIF) gehemmt. Dabei spielt das Dopamin (DA) die entscheidende Rolle (Anderson et al., 2006; Ben-Jonathan, 1985; 2001; Bishop et al., 1972; Freeman et al., 2000; Kanematsu & Sawyer, 1973). Eine eingehende immunhistochemische Charakterisierung aller dopaminergen Zellgruppen des Hypothalamus wurde für die Ratte anhand des Nachweises der Tyrosinhydroxylase als Schlüsselenzym der DA-Biosynthese durch Chan-Palay et al. (1984) erbracht. Primär regulieren zwei katecholaminerge, neuronale Systeme die Aktivität der lactotropen Zellen des HVL. Rundliche bzw. fusiforme kleinzellige Neurone hauptsächlich des medialen und dorsolateralen ARC konnten sowohl auf mRNA als auch Proteinebene schon früh als dopaminerg charakterisiert werden und wurden auf Grund ihrer Prominenz als das "tuberoinfundibuläre Dopaminsystem" (TIDA) des Hypothalamus bezeichnet (Chan-Palay et al., 1984; Chronwall, 1985; Tucker, 2000). Diese TIDA-Zellen repräsentieren auch die als klassisch, gemäß der Falck-Hillarp Methode charakterisierte Gruppe A12 katecholaminerger Neurone (Dahlström & Fuxe; 1964), projizieren in die *Zona externa* der EM und entlassen den Transmitter DA über den perivaskulären Raum in das Hypophysenportadersystem. DA wirkt dann als *inhibiting* Faktor für zwei wichtige Hormonsysteme des HVL, das glandotrophe, Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) sowie vor allem das nicht-glandotrophe PRL. Dabei führt v.a. die Aktivierung des Dopamin-D₂ Rezeptors in der Zellmembran lactotropher HVL-Zellen mit nachgeschalteter Hemmung der Adenylylzyklase und des IP₃ / DAG Systems zur Hemmung der PRL-Genexpression sowie durch Hyperpolarisation der Zellmembran auch der PRL-Sekretion (*Abb. EIN 4*) (Canonica et al., 1983; Enjalber & Bochaert; 1983;

Enjalbert et al., 1990; Fitzgerald und Dinan, 2005; Freeman et al., 2000; Israel et al., 1987). Im Bereich des perivaskulären Raums der EM sind in den Axonterminalen der TIDA-Zellen DA-Transporter lokalisiert, mit deren Hilfe sezerniertes DA wieder "recycled" werden kann (Demaria et al., 2000; Freeman et al., 2000). Eine zweite Gruppe dopaminergischer Neurone (A14) entstammen dem hypothalamischen PE, wobei deren Axone durch das *Infundibulum* in den Hypophysenzwischenlappen verlaufen und auf noch nicht genau geklärte Weise die adenohypophysäre PRL-Sekretion zu modulieren vermögen (Ben-Jonathan, 1980; 1982; Goudreau, 1995; Peters, 1981). Neben DA sind auch SOM und GABA als *inhibiting* Faktoren an der hypothalamischen Hemmung des PRL-Systems beteiligt (Abb EIN 4). Thyreotropin-releasing Hormon (TRH), Oxytocin (OT) und Neuroten-

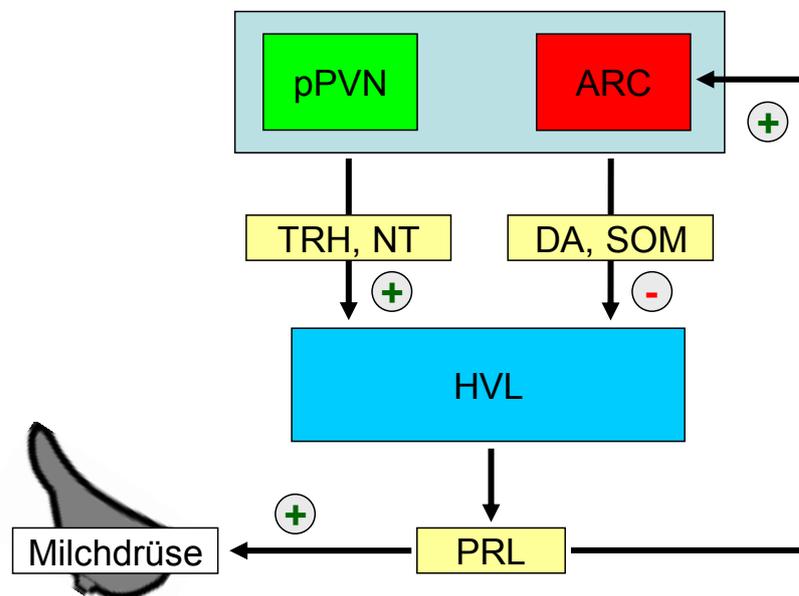


Abb. EIN 4: Regulation der Prolaktinsynthese und -freisetzung aus dem HVL

Prolaktin (PRL) wird in den laktotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) gebildet und in die Blutbahn freigesetzt. An der Milchdrüse weiblicher Säugetiere ist PRL hauptverantwortlich an der Laktogenese und Galaktopoese beteiligt. Dopamin (DA) bzw. Somatostatin (SOM) exprimierende Neurone des *Nucleus arcuatus* (ARC), teilweise des *Nucleus paraventricularis* (PE), und *thyrotropin-releasing hormone* (TRH) bzw. Neurotensin (NT) synthetisierende Neurone des ARC und des paraventriculären *Nucleus paraventricularis* (pPVN) hemmen bzw. aktivieren laktotrophe Zellen des HVL.

Durch einen direkt positiven, indirekt negativen *feedback* Mechanismus bewirkt hypophysäres PRL eine gesteigerte Synthese von DA und SOM in Neuronen des ARC, und damit Hemmung seiner eigenen Synthese / Sekretion.

sin fungieren als PRL-releasing Faktoren (PRF) (Abb. EIN 4). Der pPVN innerviert einerseits über seine TRH-Neurone die dopaminergen TIDA-Neurone des ARC und vermindert somit deren Aktivität (Arey & Freeman, 1992; Freeman et al., 2000; Hökfelt et al.,

1975; Lechan & Jackson, 1982). Andererseits projizieren neuroendokrine THR-Neurone direkt zur *Zona externa* der EM (Brownstein et al., 1982; Hökfelt et al., 1975; Lechan & Jackson, 1982), mit nachfolgender Aktivierung der Synthese und Sekretion des bioaktiven PRL durch die laktotrophen HVL-Zellen (Fomina & Levitan, 1995; Haymes & Hinkel, 1993; Lamberts & MacLeod, 1990). Das Nonapeptid OT, in magnozellulären Neuronen des PVN und SON synthetisiert, gelangt zum größten Teil durch axonalen Transport in den HHL, wo es granulär synaptisch gespeichert wird. Dabei verlaufen die Axone der OT-Neurone durch die *Zona interna* der EM und weisen teilweise bereits hier synaptische Endknöpfchen auf. Einige oxitocinerge Neurone v.a. des PVN haben auf dieser Ebene synaptischen Kontakt zum adenohipophysären Pfortadersystem, wodurch OT über die EM in den Pfortaderkreislauf gelangt und offensichtlich im HVL wirkt (Freeman et al., 2000; Gibbs, 1984; Nishino, 1993). So vermochte es die intravenöse Applikation von OT, die PRL-Abgabe ins Blut sowohl bei männlichen als auch ovariectomierten weiblichen Ratten, nicht jedoch stillenden Weibchen zu erhöhen (Lumpkin et al., 1983; Samson et al., 1986). Zusätzlich wird OT als Neurotransmitter mit direkter Wirkung auf TIDA-Neurone des ARC diskutiert (Freeman et al., 2000; Yuan & Pan, 1996). Das Neuropeptid NT (13 AS) wird im Hypothalamus v.a. in den Kerngebieten PE, ARC und pPVN exprimiert. In den laktotrophen Zellen des HVL führt NT durch eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ sowohl aus intrazellulären Speichern als auch aufgrund einer Aktivierung spannungabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran zur erhöhten PRL-Sekretion (Memo et al., 1985). Im Bereich des PE und ARC konnte eine partielle Kolokalisation von NT aber auch NT-spezifischen Rezeptoren mit dopaminergen bzw. GHRH-positiven Neuronen demonstriert werden (Everitt et al., 1986; Hökfelt et al., 1984; Ibata et al., 1983; Meister & Hökfelt, 1988; Nicot et al., 1994; Rostène & Alexander, 1997). NT entfaltet darüber hinaus eine (in-)direkte, stimulierende Wirkung auf neurosekretorische Zellen, die u.a. *corticotropin-releasing hormone* (CRH), DA, GnRH oder SOM synthetisieren.

Synthese und v.a. Freisetzung von PRL aus laktotrophen HVL-Zellen werden durch klassische Rückkopplungsmechanismen kontrolliert. Im Rahmen des negativen *short-loop feedback* Mechanismus beeinflusst PRL in positiver Weise die Freisetzung von DA und SOM aus Neuronen des ARC (*Abb. EIN 4*) (Freeman et al., 2000; Milenko-vic et al., 1990). Ein Anstieg des Prolaktinspiegels im Blut erhöht die hypothalamische DA-Synthese und dessen Sekretion in das Hypophysenpfortadersystem (Demarest et al., 1981; Gudelsky & Porter, 1980). Um die BHS auf der Ebene des Hypothalamus überwinden zu können, postulierten Walsh und Kollegen (1987) für PRL die Expression eines spezifischen, Rezeptor-vermittelten Transportmechanismus im Bereich des Epithels des *Plexus chorioideus*. Über den *Liquor cerebrospinalis* könnte PRL dann direkt mit dopami-

nergen TIDA-Neuronen des ARC interagieren (Mangurian et al., 1992). Andererseits ist die endotheliale BHS im Bereich des ventromedialen ARC durchlässig für zirkulierende Botenstoffe, wodurch ein direkter Kontakt von PRL mit den ARC-Neuronen möglich wird (Gross, 1992). PRL bindet an membranständige Rezeptoren (PRL-R) und induziert in den dopaminergen Neuronensubpopulationen der Kerngebiete ARC (TIDA) und PE eine gesteigerte Expression der Tyrosinhydroxylase durch Aktivierung des JAK / STAT-Signaltransduktionswegs (Ma et al., 2005; Fitzgerald & Dinan, 2008) sowie eine stimulierte Exozytose. Bei der *long-loop feedback* Regulation agiert eine Vielzahl weitere Modulatoren auf der Ebene des Hypothalamus, z.B. durch Disinhibition des dopaminergen Tonus etwa durch Serotonin, Östrogene oder Substanz P (Fitzgerald & Dinan, 2008; Freeman et al., 2000).

1.5.3. Physiologische Bedeutung purinerger Signalübertragung in der Hypothalamus-HVL Achse

Bis *dato* finden sich in der Fachliteratur trotz detaillierter Kenntnisse etwa hinsichtlich der Lokalisation purinerger Rezeptoren in Kerngebieten des Hypothalamus (*Kap. EIN 1.4*), sowie nachgeschalteter Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion nur limitierte Hinweise auf die (patho-)physiologische Relevanz funktioneller Purinozeptoren im Rahmen der neuroendokrinen Hypothalamus - HVL Achse. Zumeist parvozelluläre Neurone der präoptischen Region, des medialen bzw. periventrikulären PVN sowie des ARC projizieren in den Bereich der EM, um dort die entsprechenden *releasing* (GnRH, TRH, CRH, GHRH) oder *inhibiting* (Dopamin, SOM) Faktoren in das hypophysäre Pfortadersystem zu entlassen (*Kap. EIN 1.5.1*). Diese modulieren die biosynthetische und sekretorische Aktivität endokriner Zellgruppen des HVL spezifisch für GH (= STH), PRL, TSH oder FSH (Follikel-stimulierendes Hormon), LH (luteinisierendes Hormon) bzw. ACTH (adrenocorticotrophes Hormon) (Albertson et al., 1987; Bartke, 1986; Ben-Jonathan, 1985; 2001; Christensen et al., 2011; Freeman et al., 2000; Tannenbaum et al., 2003).

Hinsichtlich der neuroendokrinen Regulation der hypophysären PRL-Sekretion lieferten zentrale (icv) Mikroapplikationen von Adenosin(-analoga) erste Hinweise auf eine purinerge Beteiligung (Ondo et al., 1989; Stewart & Pugsley, 1985), wobei Adenosin auf hypothalamischer Ebene (vermutlich auf Ebene des ARC) P1R-vermittelt die dopaminerge Hemmung der Sekretionsaktivität laktotropher HVL-Zellen zu supprimieren vermochte (Stewart & Pugsley, 1985). Das zur Erhaltung der Reproduktionsfähigkeit adulter Tiere essentielle *gonadotrophin-releasing* Hormon (GnRH) wird außer in der POA auch in Neuronen des ARC synthetisiert (King et al., 1975; Naik, 1975; 1976; Stojkovic, 2009).

Dabei könnte es sich um die von Wakamori und Sorimachi (2004) beschriebenen Nervenzellen handeln, für welche durch elektrophysiologische Experimente im Gehirnschnitt die Expression funktioneller homo- und / oder heterotrimerer P2X₂-Rezeptoren identifiziert wurde. Pharmakologische und immunzytochemische Experimente an embryonalen Neuronen der olfaktorischen Plakoden von Affen demonstrierten, dass ATP *via* Aktivierung von P2X₂R und P2X₄R eine pulsatile GnRH-Sekretion induzieren kann (Terasawa et al., 2005). Zudem wurden im Maus-Modell die Purinozeptorsubtypen P2X₂ und P2X₆ prä- und postsynaptisch in GnRH-Neuronen nachgewiesen (Fu et al., 2009).

Darüber hinaus konnte an einer murinen Zelllinie veranschaulicht werden, dass GnRH-produzierende Neurone in der Lage sind, ATP freizusetzen (He et al., 2005; Stojilkovic, 2009). Das würde bedeuten, dass GnRH-Neurone etwa des ARC synaptisch im Bereich der EM den Neuromodulator ATP in die kapilläre Blutbahn entlassen, und ATP nachfolgend auf endokrine Drüsenzellen des HVL wirken könnte. So implizieren zahlreiche Studien an primären Zellkulturen des HVL und immortalisierten HVL-Zelllinien, dass Purine wichtige Faktoren in der autokrin / parakrin oder eben hypothalamisch induzierten Signalübertragung im Rahmen der Hormonsekretion repräsentieren (Chen et al., 1995; Chung et al., 2000; He et al., 2005; Nunez et al., 1997; Tomic et al., 1996; Villalobos et al., 1997). Nahezu alle endokrinen Zellpopulationen des HVL (corticotrophe, gonadotrophe, laktotrophe, somatotrophe und thyrotrophe) exprimieren Purinozeptoren. So weisen laktotrophe, PRL-produzierende Zellen die Purinozeptorsubtypen P2X_{3,4,7} und P2Y₂ auf (Stojilkovic & Koshimizu, 2001). Pharmakologische Experimente zur Messung der Hormonsekretion in der HVL-Primärkultur deuten darauf hin, dass auch der Rezeptorsubtyp P1A₁ in laktotrophen Zellen exprimiert wird und durch die Hemmung der Adenylylzyklase die Sekretion von PRL sowie von GH unterdrückt (Delahunty et al., 1988; Dorflinger & Schonbrunn, 1985; Stojilkovic & Koshimizu, 2001; Yu et al., 1998). Expressionsanalysen demonstrierten die mRNA-Expression zweier Spleißvarianten des P2X₂-Rezeptorsubtyps in somatotrophen und in gonadotropen Adenohypophysenzellen von Sprague-Dawley Ratten (Stojilkovic & Koshimizu, 2001), wohingegen Chen und Kollegen (1994, 1995) in pharmakologischen Experimenten an gonadotropen Zellen von Wistar Ratten die funktionelle Expression von P2Y₂R und die ATP- bzw. UTP-induzierte Sekretion von LH postulierten.

1.6. Rolle des *Nucleus arcuatus* im Rahmen der zentralen Kontrolle des Energiehaushalts

Die Nahrungsaufnahme bildet die Grundvoraussetzung für die Energiegewinnung des Organismus sowie für die Biosynthese körpereigener Substanzen und Wirkstoffe wie Hormone, Enzyme oder Abwehrstoffe (Thews & Vaupel, 2001).

1.6.1. Nervale und humorale Signale als sensorische Afferenzen an den Hypothalamus im Rahmen der Homöostase des Energiehaushaltes

Im Rahmen der Homöostase des Energiehaushaltes und der Nahrungsaufnahme höherer Wirbeltiere übermitteln metabolische, humorale und nervale Afferenzen letztlich dem Hypothalamus mit seinen Kerngebieten wichtige Informationen aus dem viszeralen Bereich sowie dem Fettgewebe hinsichtlich der aufgenommenen Energiemenge und -qualität sowie deren Speicherung bzw. Verfügbarkeit (Blouet & Schwartz, 2010; Harrold et al., 2012; Schwartz, 2006). Zu den metabolischen Faktoren gehören in erster Linie die Höhe des hepatischen Glykogenspeichers und der Glukoseverfügbarkeit einerseits sowie das Ausmaß der vorhandenen Fettspeicher andererseits (Bagdade et al., 1967; Considine et al., 1996; Harrold et al., 2012).

Bei der Kontrolle des Energiehaushaltes wird in kurzfristige, v.a. der Beendigung der Nahrungsaufnahme (Sättigung hervorrufend) dienende, und langfristige Kontrollmechanismen unterschieden, welche eher die Frequenz der Nahrungsaufnahme determinieren (*Abb. EIN 5*) (Podingbauer & Ekmekcioglu, 2005). Im Rahmen der kurzfristigen resp. episodischen Regulation führen die durch submukosale Dehnungs- und Chemosensoren v.a. des Ösophagus, Magens sowie Dünndarms in Folge des Verdauungsprozesses perzipierten mechanischen und biochemischen Stimuli dazu, dass afferente vagale Fasern mit rezeptiven Feldern im Magen-Darm-Trakt (MDT) diese Informationen zum *Nucleus tractus solitarius* (NTS) der *Medulla oblongata* und von dort aus zum Hypothalamus weiterleiten. Somit wird eine negative *feedback* Kontrolle zur Reduktion der Nahrungsaufnahme bzw. der Größe der Einzelmahlzeit induziert (*Abb. EIN 5*) (Schwartz, 2006; Sclafani et al., 2003).

Wichtige afferent humorale, teilweise durch Bindung an vagale Nervenfasern auch nerval wirkende Faktoren aus dem Verdauungstrakt stellen dabei die zahlreichen gastrointestinalen Hormone mit meistens zentral vermitteltem Sättigungsgefühl dar, von denen dem anorexigenen Cholecystokinin (CCK) eine besondere Bedeutung zukommt (Dockray, 2009; Valassi et al., 2008). Demgegenüber steht als nahezu einziger Vertreter mit aus-

geprägt orexigener Wirkung das Ghrelin (*Abb. EIN 5*) (Dong & Brubaker, 2012; Kojima et al., 1999; Riediger, 2012).

Appetit oder Hunger sind nicht nur von der täglichen Nahrungsaufnahme und dem Fressverhalten, sondern auch von energiespeichernden Prozessen und dem Zustand der Energiereserven ("*adiposity signals*"), v.a. dem Körperfettanteil, abhängig. Das von Adipozyten des weißen Fettgewebes synthetisierte Leptin (sowie das pankreatische Insulin) fungieren dabei als humorale Langzeitregulatoren der Energiehomöostase, wobei deren Blutplasmakonzentration entweder mit dem Zustand des Fettdepots oder dem Glukosespiegel korreliert (*Abb. EIN.5*) (Bagdade et al., 1967; Considine et al., 1996; Harrold et al., 2012). Leptin stellt dabei das bedeutendste afferent auf den Hypothalamus wirkende Hormon dar, welches Informationen über den Status des Fettgewebes vermittelt (*Abb. EIN 5*) (Bray, 1996; Schwartz, 2006; Scalfani et al., 2003).

Bei der neuronalen Verarbeitung aller nervalen und humoralen, afferenten Signale ist eine Vielzahl an intrahypothalamischen Kerngebieten sowie Neurotransmittern involviert, die entweder anorexigene oder orexigene Wirkungen vermitteln, sodass die kurz- und langfristige Nahrungsaufnahme und Energiespeicherung mit dem Energiebedarf bzw. -verbrauch koordiniert werden können (Blouet & Schwartz, 2010; Henry, 2007). Basierend auf stereotaktischen Läsions- sowie Stimulationsstudien v.a. an Ratten und Katzen konnte die eminente Bedeutung spezifischer hypothalamischer Kerngebiete wie ARC, DMH, LH, PVN und VMH für die Erhaltung der Energiehomöostase ermittelt werden. So induzierte die elektrolytische bzw. neurotoxische Mikroläsion des ARC und VMH Hyperphagie und die Entwicklung einer Obesitas (Brobeck, 1946; Gao & Horvath, 2008; Hetherington & Ranson, 1940). Läsionen des lateralen Hypothalamus (LH) hingegen resultierten in Hypophagie, Anorexie und Kachexie (Anand & Brobeck, 1951). Neben den genannten hypothalamischen *Nuclei* spielen auch die *Amygala*, der NAc des cortico-limbischen Systems sowie Strukturen des Hirnstammes (NTS und AP) eine entscheidende Rolle (Harrold et al., 2012; Morton et al., 2006; Woods & D'Alessio, 2009).

1.6.2. Der ARC des Hypothalamus als Zielstruktur für Leptin und Ghrelin

Das antagonistisch zu gastrointestinalen Peptiden wie CCK bei reduziertem Nahrungsangebot oder negativer Energiebilanz vermehrt aus den Funduszellen des Magens freigesetzte Peptidhormon Ghrelin stimuliert *via* Aktivierung von GHS Rezeptoren primär sowohl zahlreiche NPY-erge als auch einige GHRH exprimierende Neurone des ARC (*Kap. EIN 1.2*) (Harrold et al., 2008; Nakazato et al., 2001; Shintani et al., 2001). NPY-Neurone des ARC projizieren intrahypothalamisch zu Neuronen vor allem des parvozel-

lulären PVN, aber auch des DMH, VMH und LH. Mikroinjektionen von NPY direkt in den PVN oder in den LH führten bei Ratten einerseits zu einem raschen Einsetzen vermehrter Nahrungsaufnahme und Anstieg der Dauer und Größe der Mahlzeit, andererseits zu einer Verzögerung der Sättigung (Harrold et al., 2012; Stanley et al., 1985). Dabei wird kontrovers diskutiert, ob NPY neben diesen ausgeprägt orexigenen Wirkungen auch die Energiehomöostase über die metabotropen Rezeptorsubtypen NPY_{1,2,5} zu beeinflussen vermag (Alexander et al., 2008; Leibowitz & Wortley, 2004; Lin et al., 2005). Zusätzlich exprimieren die überwiegende Zahl der NPY-ergen Neurone (90 %) ebenfalls den Neuromodulator AGRP (*Abb. EIN 5*) (Schwartz et al., 2000; Valassi et al., 2008). Die GHRH-propagierte Sekretion des glykogeno- und lipolytischen Somatotropins (= GH) wirkt einem Energiedefizit durch Mobilisierung körpereigener Reserven entgegen (Takaya et al., 2000). Zusätzlich zeigten *in vivo* Versuche sowie Untersuchungen auf mRNA- bzw. Proteinebene an Ratten, dass die zentrale Wirkung von Ghrelin zum Teil auch durch Orexin-synthetisierende Neurone des LH vermittelt wird (Mondal et al., 2005; Toshinai et al., 2003).

Leptin als Produkt des *ob*-Genes interagiert über Bindung an Ob-Rezeptoren (Ob-R) primär mit zwei Neuronenpopulationen des ARC, welche die Transmitterpaare AGRP / NPY bzw. Proopiomelanocortin (POMC) / CART (Cocain- und Amphetamin regulierendes Transkript) produzieren (*Abb. EIN 5*), aber auch mit Neuronen des LH, PVN, VMH und des NTS (Meister & Hakansson, 2001; Rodriguez et al., 2010; Sindelar et al., 1999; Tartaglia et al., 1995). Erhöhte Leptinspiegel senken die neuronale Aktivität, die Neuropeptidsekretion und die Gentranskription der AGRP / NPY Neurone des ARC, was in einer Verminderung der Nahrungsaufnahme resultiert (*Abb. EIN.5*) (Boswell, 2010; Broberger & Hökfelt, 2001; Leibowitz & Wortley, 2004). Die zweite Leptin-sensitive Neuronenpopulation des ARC exprimiert, wie schon erwähnt, POMC als Proprotein des α -Melanozyten-stimulierenden Hormons (α -MSH) sowie CART, welche beide anorexigene Effekte vermitteln (*Abb. EIN 5*). Hierbei ist die präzise, CART vermittelte Signaltransduktion, einschließlich Rezeptor, bis *dato* nicht genau identifiziert worden (Harrold et al., 2012; Kristensen et al., 1998). Interessanterweise konkurrieren AGRP und α -MSH kompetitiv um die Bindung an die Melanocortinrezeptorsubtypen MC3R und MC4R; diese antagonistische Wirkung von AGRP führt zur Hyperphagie, Adipositas und einem reduzierten Energieumsatz (Lu et al., 1994). Es wird auch diskutiert, wie Leptin als Proteohormon mit einem Molekulargewicht von 18,6 kDa Zugang zu den Neuronen des ARC finden kann. Einerseits weist der ARC in seiner medialen Komponente eine schwach ausgeprägte, teilweise sogar fehlende endotheliale BHS auf (Gross, 1992). Darüber hinaus könnte Leptin auch die lecken *tight junctions* (TJ) der EM permeieren und somit in

den Bereich des ARC gelangen. Letztlich wird auch ein Ob-R vermittelter Transportmechanismus in CVOs wie dem *Plexus chorioideus* postuliert, der das Hormon aus der Blutbahn in die Liquorflüssigkeit transportiert (Meister & Hakansson, 2001; Rodriguez et al., 2010; Zlokovic et al., 2000), und selbst die transendotheliale Aufnahme von Leptin im ZNS scheint möglich (Banks, 2010).

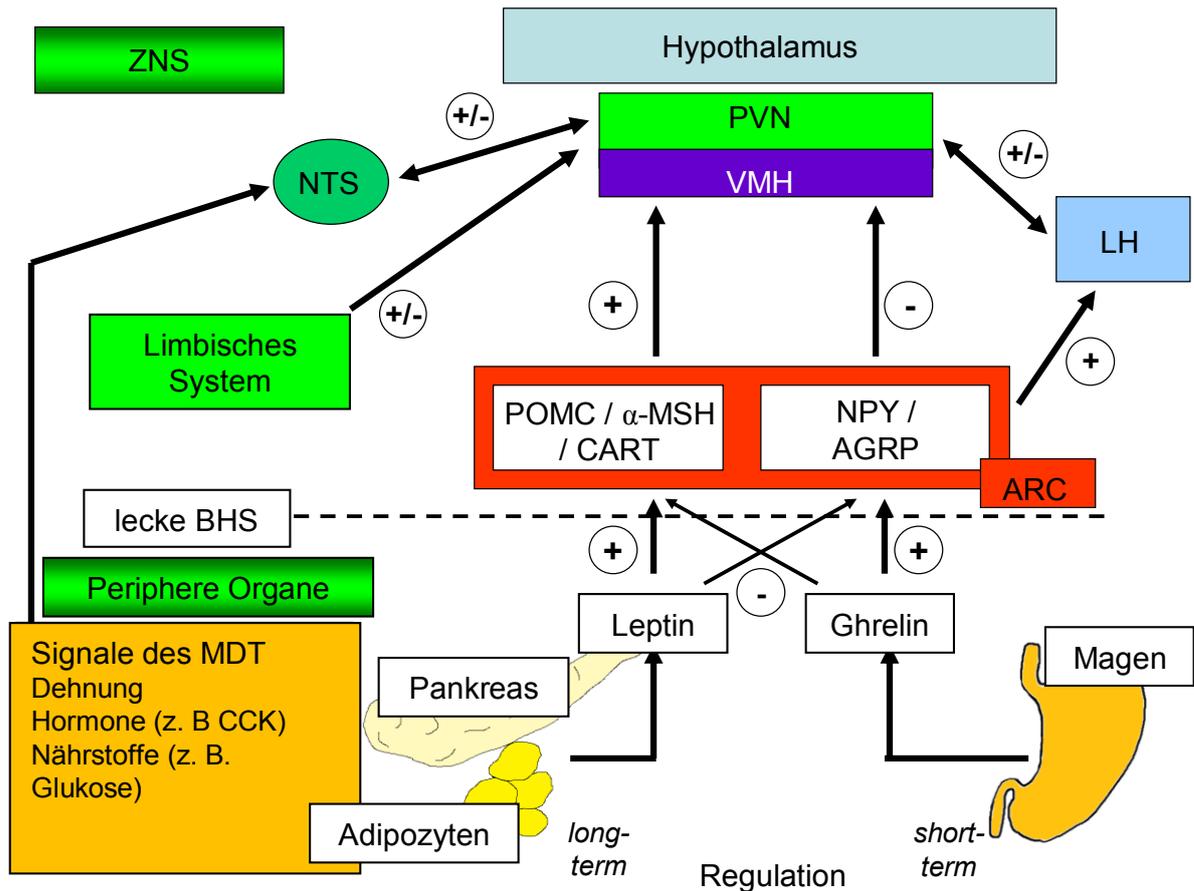


Abb. EIN 5: Vereinfachtes Model der Energiehomöostase auf hypothalamischer Ebene

Leptin und Insulin aktivieren die POMC / CART-Neurone des ARC, inhibieren die NPY / AGRP-Neurone und vermitteln somit "Sättigung". Im Gegensatz dazu aktiviert Ghrelin die NPY / AGRP-Neurone des ARC, die wiederum orexinerge Neurone des LH stimulieren und so die Nahrungsaufnahme anregen, während gleichzeitig die POMC / CART-Neurone gehemmt werden.

Periphere vagale Afferenzen übermitteln mechanische und chemische Signale aus dem Magen-Darm-Trakt direkt an Neurone des NTS in der *Medulla oblongata*. Der NTS seinerseits integriert diese mit längerfristigen Regulationsmechanismen über reziproke Konnektivitäten sowohl in den PVN, als auch in den LH (Weg nicht dargestellt). Das limbische System wirkt über die Motivation "Appetit" zusätzlich auf die Nahrungsaufnahme ein.

Abk.: AGRP = *agouti gene related peptide*, α -MSH = Melanozyten stimulierendes Hormon, ARC = *Nucleus arcuatus*, BHS = Blut-Hirn Schranke, CART = Cocain und Amphetamin regulierendes Transkript, CCK = Cholecystokinin, LH = *Regio lateralis hypothalamica*, MDT = Magen-Darm-Trakt, NPY = Neuropeptid Y, NTS = *Nucleus tractus solitarius*, POMC = Proopiomelanocortin, PVN = *Nucleus paraventricularis*, ZNS = Zentrales Nervensystem.

Zusätzlich werden NPY-ergen und POMC-ergen Neuronen des ARC Glukose-sensitive Eigenschaften zugeschrieben. Ein absinkender Glukosespiegels stimuliert die Aktivität der NPY-Neurone, wohingegen ein Anstieg die Impulsrate der POMC-Neurone erhöht (Dietrich & Horvath, 2013; Fioramonti et al., 2007; Leibowitz & Wortley, 2004; Muroya et al., 1999). Dabei scheinen innerhalb des neuronalen Netzwerkes des ARC zwischen beiden Neuronenpopulationen reziproke Verbindungen für die gegenseitige Regulation ausgeprägt zu sein (Broberger & Hökfelt, 2001; Leibowitz & Wortley, 2004; Mains et al., 1977). Über einen hemmenden *feedback* Mechanismus wirkt beispielsweise NPY auto-regulatorisch sowohl auf die Aktivität der AGRP / NPY-Neurone als auch der POMC / CART-Neurone des ARC zurück, wodurch die Abgabe von α -MSH gesenkt wird (Abb. EIN 5) (Broberger et al., 1997; King et al., 1999; 2000).

Als zentrales Empfangs- und Integrationszentrum für metabolische Informationen aus dem Extrazellulärraum bzw. der Blutbahn innerviert der ARC über Efferenzen der AGRP / NPY- und POMC / CART-Neurone beispielsweise Neurone des DMH, LH, PVN sowie NTS (Boswell, 2010). Offensichtlich NPY-erge Efferenzen des pPVN zur *Medulla oblongata* bedingen eine Reduktion des Energieumsatzes über eine Hemmung des sympathischen "outflow" u.a. zum braunen Fettgewebe, und bewirken somit eine Hemmung der zitterfreien Thermogenese (Billington et al., 1994; Saper et al. 1976).

Die Leptin-induzierte Freisetzung von α -MSH hingegen stimuliert *via* MC4R neurosekretorische, parvozelluläre PVN-Neurone zur Sekretion anorexigen wirkender und den Energieverbrauch steigernder Transmitter wie CRH und TRH (Abb. EIN.5) (Dallman et al., 1993; Harrold et al., 2012; Kow & Pfaff, 1991). Im Gegenzug supprimiert α -MSH die Abgabe der orexigenen Neuropeptide Orexin A und B sowie des *melanin concentrating hormone* (MCH) aus dem LH und der perifornicalen Region (Elias et al., 1999). Zusammen mit neuralen Projektionen der POMC-Neurone des ARC zu einer POMC-Neuronenpopulation im NTS bilden beide ein zentrales Melanocortinsystem, welches durch Modifikation der CCK-Sättigungssignalwirkung und der Sympathikusaktivität eine Möglichkeit zur Integration der kurzfristigen Regulation der Mahlzeitgröße und der Langzeitkontrolle der Energiespeicher bietet (Fan et al., 2004; Harrold et al., 2012; Zheng et al., 2005). Intrahypothalamisch interagieren leptin- resp. glukosensitive orexinerge Neurone des LH regulatorisch mit AGRP / NPY sowie POMC / CART-Neuronen des ARC (Elias et al., 1998; Hörvath et al., 1999; Muroya et al., 2004; Rodgers et al., 2002). So resultiert eine Glukosedepprivation oder eine icv-Applikation von Orexin-A in einer ausgeprägten hyperphagischen Antwort und einer Verzögerung der Sättigung (Cai et al., 1999; Harrold et al., 2012; Rodgers et al., 2002). Das Orexinsystem ist außerdem an der Regulation des mesolimbischen "Belohnungssystem" und der Kontrolle des Schlaf- / Wachzustandes

beteiligt (Harrold et al., 2012; Lin et al., 1999). Der homöostatische Regelkreis zur Konstanzhaltung des Energiehaushaltes sollte somit nicht losgelöst von anderen autonomen Regelkreisen betrachtet werden. Dieses veranschaulicht z.B. die Verbindung von NPY zur Thermoregulation oder von Orexinen zur Regulation des Schlaf- / Wachzustandes.

1.6.3. Physiologische Bedeutung purinerger Signalübertragung in der Regulation der Energiehomöostase

Für das purinerge Transmittersystem mit ATP als endogenem Liganden zeichnen sich hinsichtlich seiner physiologischen Bedeutung für die Homöostase von Futteraufnahme und Energiehaushalt erste experimentelle Hinweise ab. So konnte außer der Detektion des ionotropen Purinozeptorsubtyps P2X₂R auf mRNA- auf Proteinebene im ARC, PVN, VMH sowie zahlreichen Axonterminalen in der EM der Ratte auch die Expression von P2X₄₋₆ Purinozeptoren im PVN nachgewiesen werden (Florenzano et al. 2006; Guo et al., 2009; Kanjhan et al. 1999; Zemkova et al. 2008; Xiang et al., 1998). Basierend auf elektrophysiologischen *in vitro* Experimenten an (1) orexinergen Neuronen des LH resp. (2) Neuronen des ARC in Gehirnschnitten transgener Mäuse (1) bzw. von Ratten (2) führte die Stimulation mit ATP bzw. ATP γ S, nicht jedoch α,β me-ATP, zu einem nicht-selektiven Kationeneinstrom bzw. einer Depolarisation der Zelle, wahrscheinlich auf eine Aktivierung des P2X₂ Purinozeptors zurückzuführen (Wakamori & Sorimachi, 2004; Wollmann et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnte immunhistochemisch eine Kollokalisierung von P2X₂R mit Nahrungsaufnahme-assoziierten Transmittern (AGRP resp. NPY) sowie in einem deutlich geringeren Umfang auch mit anorexigenen Mediatoren (α -MSH resp. CART) in Neuronen des ARC für die Ratte demonstriert werden (Colldén et al., 2010). Erste *in vivo* Hinweise auf die mögliche Bedeutung des purinergen Systems im Rahmen der zentral regulierten Nahrungsaufnahme können den Arbeiten von Kittner und Mitarbeitern (2006) an Ratten entnommen werden. So induzierte die icv Mikroapplikation der Purinozeptoragonisten 2-MeSATP bzw. ADP β S, nicht jedoch α,β me-ATP, in nahrungsdeprivierten Mäusen eine signifikant gegenüber Kontrolltieren gesteigerte Futteraufnahme. Dieser Effekt konnte durch die zentrale Koapplikation des generellen Purinozeptorantagonisten PPADS vollkommen revertiert werden. Eine Periode restriktiver Fütterung (3 - 10 Tage) ging bei Ratten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mit einer Überexpression des P2Y₁R in neuronalen Perikaryen der hypothalamischen Kerngebiete ARC, DMH, VMH und LH einher. Zudem weisen besonders viele Astrozyten des ARC eine Immunreaktivität für P2Y₁R auf (Kittner et al., 2003; Seidel et al., 2006). Die genannten Autoren postulierten somit eine primäre Beteiligung des metabotropen

Purinozeptorsubtyps P2Y₁ an der gesteigerten Nahrungsaufnahme, ohne die funktionelle Aktivierung etwa des P2X₂R bzw. P2X_{2/3}R ausschließen zu können.

Die meisten der an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligten hypothalamischen Schlüsselstrukturen sind in unmittelbarer Nähe zum dritten Gehirnventrikel angeordnet, dessen ependymale Auskleidung im Bereich der sCVOs sowie des ARC von sogenannten Tanyzyten unterbrochen wird. Tanyzyten (*Kap. EIN 1.2*) stehen mit ihren apikalen Zellsomata in direkten Kontakt mit dem *Liquor cerebrospinalis* des V-III und nehmen mit den Neuronen des ARC und des VMH Kontakt auf. In neuesten Untersuchungen konnten einige Tanyzyten im Bereich des ARC als für Glukose chemosensorisch charakterisiert werden, da sie nach geeigneter Stimulation mit einer Erhöhung der [Ca²⁺]_iz und Freisetzung von ATP als Mediator reagierten (Bolborea & Dale, 2013; Dale, 2011). Eine mögliche Beteiligung dieser Tanyzyten an der hypothalamischen Kontrolle der Energiehomöostase wird diskutiert.

1.7. Purinerge Rezeptoren und Gliazellen

Im Rahmen der Darstellung wichtiger neuroendokriner und homöostatischer Funktionen des Hypothalamus, v.a. des ARC, wurde die mögliche Bedeutung der purinergen Signalübertragung angeführt. Hierbei wurde das Augenmerk auf die zellulär-neuronale Komponente gelegt. Neben den Neuronen exprimieren aber auch gliale Zelltypen ektodermalen Ursprungs, wie Astrozyten und Oligodendrozyten, oder mesodermaler Herkunft wie z.B. Mikrogliazellen, im ZNS u.a. mehrere Purinozeptorsubtypen mit teils komplexen Expressionsmustern, die sich je nach physiologischem und Entwicklungsstatus der Zellen ändern können. Die Stimulation der Zellen kann in der Freisetzung von Gliotransmittern wie Glutamat, ATP oder Zytokinen resultieren (Burnstock, 2007; Inoue et al., 2010; Kasymov et al., 2013; Verkhratsky et al., 2009).

1.7.1. Astrozyten

Astrozyten stellen eine hinsichtlich morphologischer und funktioneller Aspekte heterogene Gruppe neuroglialer Zellen dar. So unterscheidet man bezüglich morphologischer Aspekte protoplasmatische von fibrillären Astrozyten (Kahle, 1979), hinsichtlich ihrer Aufgaben und Lokalisation z.B. perivaskuläre Astrozyten, Müller-Zellen der Retina oder Pituizyten des HHL. Sie sind am Stoffaustausch über die BHS, an der Neuro- und Synaptogenese, an der metabolischen Homöostase von Neuronen sowie an der Erhaltung des molekularen Gleichgewichts im synaptischen Spalt beteiligt (Illes et al., 2012). Obwohl eine Vielzahl iono- und metabotroper Purinozeptoren auf mRNA- und Protein-

ebene in Astrozyten unterschiedlichster Gehirnareale sowie in Primärzellkulturen identifiziert werden konnten (A_{1-3} ; $P2X_{1-7}$; $P2Y_{1,2,4,6,12-14}$), ist das Wissen über deren funktionelle Expression noch begrenzt (Burnstock, 2007; Daré et al., 2007; Verkhratsky et al., 2009). Immunhistochemische Untersuchungen demonstrierten die Expression von $P2X_{2-4}$ in Astrozyten des NAc, oder von $P2X_{1-4}$ und $P2X_{6,7}$ im *Hippocampus* (Franke et al., 2001; Kukley et al., 2001; Lalo et al., 2011). Zahlreiche Studien zeigen, dass ATP als physiologischer Mediator an der neuroglialen Kommunikation und der Interaktion zwischen Gliazellen beteiligt ist. Spezifische Purinozeptorsubtypen werden somit abhängig vom funktionellen Zustand der Zelle transkribiert, translatiert und letztendlich in die Zellmembran transloziert (Abbracchio & Ceruti, 2006; Barres, 1991; Verkhratsky et al., 2009).

Durch Aktivierung spezifischer Purinozeptoren können ATP, ADP, Adenosin oder selbst Polyphosphate einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Gliazellen induzieren (Holmström et al., 2013). Erste Fluoreszenz-Ratio Imagingversuche an Astrozyten-spezifischen Primärkulturen aus dem *Cortex* neonataler Mäusen und Ratten, oder hippocampalen Mischkulturen aus Astrozyten und Mikrogliazellen demonstrierten, dass extrazelluläres ATP als Zell-zu-Zell Signalmolekül innerhalb der Gliadomäne fungieren kann (Fields & Burnstock, 2006; Guthrie et al., 1999; Hassinger et al., 1996; Haydon, 2001; Newman & Zahs, 1997). Diese Purinozeptor-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ überträgt sich direkt mittels Diffusion von Ca^{2+} oder IP_3 durch *gap junctions* auf benachbarte Zellen und breitet sich wellenartig über eine Gruppe assoziierter Astrozyten aus (Scemes & Giaume, 2006). Während dieser wellenartigen Ca^{2+} -Signalübertragung wird ATP von Astrozyten darüber hinaus entweder *per* Exozytose oder über Kanäle der Zellmembran (Hemiconnexine, volumenregulierte Anionenkanäle) in den extrazellulären Raum freigesetzt. Dieses ATP kann wiederum Purinozeptoren auf anderen Astrozyten aktivieren und die Abgabe von Gliotransmittern hervorrufen. Diese Effekte ließen durch unspezifische Purinozeptorantagonisten wie PPADS hemmen (Inoue et al., 2010). In primären Astrozytenzellkulturen des *Hippocampus* bzw. des Rückenmarks wurde nachgewiesen, dass der metabotrope $P2Y_1$ R an Induktion und Aufrechterhaltung der wellenartigen Signalübertragung wesentlich beteiligt ist (Bowser & Khakh, 2007; Verkhratsky et al., 2009). Hinsichtlich der funktionellen Expression heterotrimerer $P2X_{1/5}$ R in kortikalen Astrozyten der Maus wird angenommen, dass die Aktivierung ionotroper Rezeptoren einen lokalen Kationeninflux von Na^+ und Ca^{2+} hervorruft (Lalo et al., 2011), wodurch sekundär eine "ortsgebundene" Exozytose (ATP, Glutamat) oder lokale Stimulation der ATP-Synthese in Mitochondrien bewirkt wird. Der rasche Anstieg an zytosolischem Na^+ könnte zu einer Umkehr des $3 Na^+/Ca^{2+}$ Antiporters führen und damit den Einstrom von Ca^{2+} verstärken (Illes et al., 2012).

Freigesetztes ATP, welches durch Ektonukleotidasen zu Adenosin hydrolysiert wird, kann bei astroglialen Zellen über eine Interaktion mit A₁R zu einem erhöhten K⁺-Einstrom und zu einer Hyperpolarisation der Zelle führen (Hosli et al., 1987; Verkhratsky et al., 2009). In hippocampalen Astrozyten kann wiederum eine A_{2A}R-induzierte Hemmung der Glutamatenaufnahme aus dem extrazellulären Raums sowie eine Stimulation der Glutamatfreisetzung erfolgen. In Folge der erhöhten Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt würde die neuronale Aktivität im *Hippocampus* verstärkt (Nishizaki et al., 2002; Verkhratsky et al., 2009).

Neben dieser raschen Ca²⁺-medierten Signalübertragung bewirkt ATP auch langfristige Effekte wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Burnstock, 2007). In Folge von traumatischen oder hypoxischen Schädigungen des Gehirns wird massiv ATP, bzw. anschließend durch Hydrolyse entstandenes Adenosin, von neuroglialen Zellen freigesetzt. Diese wirken auto- bzw. parakrin über Purinozeptoren auf Gliazellen und induzieren eine Astrozytenproliferation mit gleichzeitiger Zunahme der GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) Expression. Letztendlich resultiert dies in einer reaktiven Astroglie, u.a. zum Schutz des neuronalen Gewebes (Neary et al., 1996; Verkhratsky et al., 2009). *In vivo* Mikroinjektionen von Adenosin in den *Cortex* der Ratte lösten ebenfalls eine reaktive Astroglie aus (Hindley et al., 1994). Pharmakologische *in vitro* Untersuchungen an Primärzellkulturen striataler Astrozyten neonataler Ratten mit A₂R-Antagonisten hemmten folgerichtig die induzierte Astroglie, wohingegen die Stimulation des P2Y₁R über eine Aktivierung der ERK_{1/2} und der Proteinkinase B eine Astroglie induzierten (Brambilla et al., 2003a; 2003b).

1.7.2. Oligodendrozyten

Gliale Oligodendrozyten (ODC) repräsentieren die Myelinscheiden-bildenden Zellen des ZNS, welche die Axone der Neurone spiralförmig umgeben und dadurch eine elektrische Isolierung und saltatorische Ausbreitung der Aktionspotentiale ermöglichen, sowie die Axone vor Schädigungen schützen (Bunge et al., 1978; Kastriasis & McCarthy, 1993; Lecca et al., 2012). Mittels Immuno-Blot Analysen wurden in primären ODC-Zellkulturen des ZNS neonataler Ratten die Expression sowohl ionotroper (P2X₁₋₄ und P2X₇) als auch metabotroper (P2Y_{1,2,4}) Purinozeptoren nachgewiesen (Agesti et al., 2005; Meomartini et al., 2003). Die Myelinisierung im ZNS wird wie im PNS durch extrazelluläre Signale und intrazelluläre Faktoren, welche an der Reifung der ODC beteiligt sind, reguliert. Adenosin stellt dabei einen wichtigen Faktor in der Entwicklung der ODC-Vorläuferzellen dar, denn es stimuliert die Differenzierung dieser Zellen und die nachfolgende Myelinbil-

dung. Im Gegensatz dazu hemmt ATP in Schwann'schen Zellen des PNS diese beiden Prozesse (Burnstock, 2007; Fields & Burnstock, 2006). Pharmakologische *in vitro* Untersuchungen an ODC-Vorläuferzellen in Kokultur mit Neuronen von Spinalganglien (DRG) deuten darauf hin, dass axonal, nicht-synaptisch freigesetztes ATP bzw. das durch Hydrolyse gebildete Adenosin die Entwicklung von axonnahen ODC-Vorläuferzellen zu reifen OCD induziert und die Myelinsynthese stimuliert. Dies stellt einen der wichtigsten Mechanismen in der Kommunikation zwischen neuronalen Axonen und Myelinscheidenbildenden Gliazellen dar, wobei die Beteiligung metabotroper P2Y₁R und P2Y₁₂R und AR diskutiert wird (Burnstock, 2007; Stevens et al., 2002).

Untersuchungen an Kokulturen aus ODC, Astrozyten und Neuronen der DRG embryonaler Mäuse demonstrierten eine ATP-induzierte, astrozytäre Abgabe des Zytokins Leukämie-inhibierender-Faktor (LIF), welcher die Myelinbildung durch ODC stimulierte (Burnstock, 2007; Ishibashi et al., 2006; Verkhratsky et al., 2009). Neben Wachstumsfaktoren, wie dem basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), wirkt in Primärzellkulturen ATP bzw. ADP proliferierend und migrationsfördernd auf ODC-Vorläuferzellen. Beiden Molekülen wird dabei eine synergetische Wirkung auf Gliazellen zugeschrieben (Agesti et al., 2005; Burnstock, 2007; Verkhratsky et al., 2009). Diese Resultate liefern erste Hinweise dafür, dass bei Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose (*Encephalomyelitis disseminata*), die mit einer axonalen Demyelinisierung einhergehen, unter inflammatorischen Bedingungen freigesetztes ATP die Migration von ODC-Vorläuferzellen zu demyelinisierten Axonen beschleunigen und somit den Prozess der Remyelinisierung verstärken könnte (Agesti et al., 2005).

1.7.3. Mikrogliazellen

Mikrogliazellen repräsentieren immunkompetente Zellen des ZNS, die während der Embryonalentwicklung aus Vorläuferzellen des blutbildenden Systems und damit aus dem Mesoderm entstehen. Dabei wird angenommen, dass während der späten embryonalen bzw. frühen postnatalen Entwicklung von Makrophagen des Dottersacks ("Dotter-sackmakrophagen") abstammende Mikrogliazellen ins Parenchym des ZNS einwandern (Ashwell, 1991; Burnstock, 2007; London et al., 2013; Milligan et al., 1991; Perry et al., 1985). Als Träger eines membranständigen MHC-II Komplexes gehören sie neben Monozyten, Gewebsmakrophagen, dendritischen Zellen und einigen B-Lymphozyten zur Familie der antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems (Ransohoff & Cardona, 2010). Daher ist für ihre Funktionalität eine molekulare Aktivierung notwendig. Mikrogliazellen haben entscheidende Aufgaben in der Überwachung des ZNS einschließlich der

Reaktion auf Infektionen, Inflammation und Traumata, sowie der Phagozytose von Zellfragmenten und der Reorganisation des neuralen Gewebes nach einer Verletzung. Diese Zellen sind amöboid beweglich und können somit direkten Kontakt mit Neuronen, Astrozyten und Blutgefäßen aufnehmen. Unter physiologischen Bedingungen sind im "Ruhestadium" befindliche Mikrogliazellen im gesamten, gesunden Gehirn weitverbreitet und weisen eine verästelte Morphologie auf (Lecca et al., 2012). In diesem Zustand sind sie an der Neurogenese und Sekretion von Wachstumsfaktoren beteiligt. Unter pathologischen Voraussetzungen, z.B. bei Traumata oder Inflammationen, werden Mikrogliazellen aktiviert und nehmen eine rundliche und amöboide Form an (Boucsein et al., 2000; Kreutzberg, 1996). Abhängig vom Aktivierungssignal verändern sie sich zu unterschiedlichen Phänotypen (neuroprotektiv oder neurotoxisch) (London et al., 2013). Aktivierte Mikrogliazellen sind in der Lage zur Chemotaxis und zur Proliferation, und darüber hinaus synthetisieren und sezernieren sie immunmodulatorische Substanzen wie Chemokine, Zytokine (IL-6, TNF- α) oder Sauerstoffradikale und Proteasen (Garden & Möller, 2006; Harnisch & Kettenmann, 2007; Lecca et al., 2012).

In immortalisierten Mikrogliazelllinien der Maus (Maus-N9), bzw. in naiven und aktivierten Mikrogliazellen der Maus konnte die Expression sowohl von purinergen A_{1-3} , sowie $P2X_{4,7}$ und $P2Y_{1-4,6,12}$ Rezeptorproteinen nachwiesen werden (Burnstock, 2007; Fields & Burnstock, 2006). In Mikrogliazellen der Ratte werden v.a. die Purinozeptorsubtypen $P2X_4R$ und $P2X_7R$, sowie $P2Y_2R$, $P2Y_6R$ und $P2Y_{12}R$ exprimiert (Lecca et al., 2012). *In vitro* Analysesysteme zur Untersuchung der chemotaktischen Wirkung von ATP und ADP auf kultivierte Mikrogliazellen neonataler Ratten ermöglichten den Nachweis einer migrationsfördernden Aktivität. Dabei vermitteln metabotrope $P2Y_{12}R$, gekoppelt an $G_{i/o}$ -Proteine, einen frühen Signalweg in der Aktivierung und morphologischen Veränderung der Mikroglia und somit in der Antwort auf eine Schädigung des umliegenden Gewebes (Haynes et al., 2006; Honda et al., 2001). So wurde in *in vitro* Untersuchungen an Gehirnschnittpräparationen auf Ebene des *Hippocampus* neonataler Mäuse veranschaulicht, dass die Expression von $P2Y_{12}R$ in verzweigten, naiven Mikroglia während der Veränderung in den aktiven Zustand herunterreguliert wird (Haynes et al., 2006; Lecca et al., 2012). Durch Applikation von Purinozeptorantagonisten konnte ebenfalls demonstriert werden, dass eine Aktivierung und Migration von Mikroglia *in vivo* aufgrund einer Verletzung des ZNS möglicherweise durch die Freisetzung von ATP aus umliegenden, geschädigten Neuronen zurückzuführen war (Davalos et al., 2005; Lecca et al., 2012).

Extrazelluläre Nukleotide spielen nicht nur eine wichtige Rolle in der positiv chemotaktischen Migration von Mikroglia bei Zellschädigungen, sie können auch die mikrogliale Phagozytose *via* $P2Y_6R$ vermitteln. So demonstrierten Phagozytoseassays sowohl an

primären Mikrogliazellkulturen neonataler Ratten, als auch *in vivo* Experimenten, dass der Einsatz P2Y₆R-spezifischer Antagonisten resp. die Vorbehandlung der Zellen mit P2Y₆R-spezifischen *antisense*-Oligonukleotiden die UDP-induzierte Phagozytose zu supprimieren vermochte (Koizumi et al., 2007; Lecca et al., 2012).

Im Rahmen der hypothalamisch induzierten Fiebergenese etwa während einer Infektion mit gram-negativen Bakterien spielen die proinflammatorischen Zytokine oder endogenen Pyrogene Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und TNF- α eine bedeutende Rolle (Fernandez-Botran, 2000; Roth et al., 2009; Rummel et al., 2005). Diese werden u.a. von Mikrogliazellen hypothalamischer *Nuclei* gebildet und in den Extrazellulärraum abgegeben (Skaper et al., 2010; Wuchert et al., 2008; 2009). Dabei wird die Wichtigkeit von Purinen als beteiligtes Gliotransmittersystem divergent diskutiert (Lecca et al., 2012). Während ATP in hohen Konzentrationen (> 1mM) in primären Mikrogliazellkulturen neonataler Ratten die mRNA-Expression von TNF- α sowie die Freisetzung des Zytokins über P2X₇R stimulierte, schien ATP in etwas niedrigerer Konzentration (100 μ M) *via* P2YR nur auf die morphologische Veränderung der Zellen, jedoch nicht auf die Freisetzung von TNF- α einzuwirken (McIlvain et al., 2010; Suzuki et al., 2004). In der Mikrogliazelllinie MG5 bewirkte ATP eine detektierbare Freisetzung von IL-6, möglicherweise in Folge einer vorausgegangenen Freisetzung von TNF- α (Burnstock, 2007; Norris et al., 1994). Da der P2X₇-spezifische Agonist BzATP jedoch nicht die Sekretion von IL-6 anzuregen vermochte, gingen die Autoren - eventuell fälschlicherweise - von einer Beteiligung metabotroper P2YR aus (Shigemoto-Mogami et al., 2001). Schließlich konnten *in vivo* Untersuchungen an Ratten mit zentraler Applikation von LPS eine erhöhte mRNA-Expression des P2X₇R und der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) in Mikrogliazellen aufzeigen (Choi et al., 2007). Mikrogliazellen exprimieren, wie angedeutet, neben P2X₇ vorrangig P2X₄-Purinozeptoren (Ott et al., 2010). Im Rahmen der Immunabwehr von Pathogenen werden diese durch verschiedene *pattern-recognition* Rezeptoren wie den *Toll-like* Rezeptoren (TRLs) oder *nucleotide-binding oligomerization domains* (NOD2) der Immunzellen erkannt. Die Stimulation von TRLs oder NOD2 durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) etwa induzierte in primären Mikrogliazellkulturen eine erhöhte Expression dieser P2X₄ Rezeptoren sowie eine gesteigerte Synthese von TNF- α und NO (Guo et al., 2006). Darauf aufbauend konnte Hitzel (2009) für Primärkulturen des MnPO neonataler Ratten überzeugend demonstrieren, dass die durch LPS induzierte TNF- α Sekretion mikroglialen Ursprungs war und in Gegenwart des unspezifischen Purinozeptorantagonisten PPADS signifikant erniedrig war. Diese Resultate deuten auf eine Beteiligung von ATP und P2X₄R im inflammatorischen Geschehen hin.

1.8. Ziele und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit

Neben den klassischen Neurotransmittern (GABA, Glutamat etc.) sowie zahlreichen Neuropeptiden wird auch extrazellulärem Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in vielen Bereichen der Neurowissenschaften sowohl für das zentrale (ZNS) als auch das periphere (PNS) Nervensystem seit den Pionierstudien von Burnstock und Mitarbeitern (1970) eine bedeutende Funktion als Neuromodulator zugeschrieben. Neuronal synthetisiertes ATP agiert dabei im Bereich des ZNS nach synaptischer Freisetzung als *messenger* Molekül über purinerge P2-Rezeptoren mit nachgeschalteten Neuronen (Pankratov et al., 2006) bzw. möglicherweise parakrin mit umgebenden Gliazellen. P2-Purinorezeptoren werden in zwei Familien untergliedert: die P2X-Familie bestehend aus *dato* sieben (P2X₁ - P2X₇) ligandengesteuerten Ionenkanal-Rezeptoren (McKenzie et al., 1999) und die P2Y-Familie bestehend *dato* 8 (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) metabotropen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (von Kügelgen & Harden, 2011). Die Beteiligung von Purinorezeptoren sind für so unterschiedliche, neurogliale Prozesse wie Apoptose, Neuroimmunologie, Schmerzverarbeitung, Gedächtnisbildung oder Neuroprotektion nachgewiesen worden (Burnstock 2006).

Neuere experimentelle Untersuchungen legen auch für hypothalamische neuronale Netzwerke eine funktionelle Beteiligung von synaptisch freigesetztem ATP nahe. So gibt es für Kerngebiete wie den *Nucleus paraventricularis* oder *supraopticus* erste Resultate bezüglich einer physiologischen Relevanz von ATP etwa für die magnozelluläre Neurosekretion von Oxytocin oder Antidiuretischen Hormon (Custer et al., 2012; Gomes et al., 2009). Für den an der neuroendokrinen Kontrolle des Hypophysenvorderlappens (HVL) sowie der hypothalamischen Regulation des Energiehaushaltes inkl. der Nahrungsaufnahme bedeutsamen *Nucleus arcuatus* (ARC) von Ratte und Maus gibt es erste Hinweise auf die funktionelle Expression von P2X-Purinorezeptoren (P2X₂, P2X₄ und P2X₆ als Heterotrimer) aufgrund histologischer (*in situ* Hybridisierung, Immunhistochemie) und elektrophysiologischer Studien an Gehirnschnitten der Ratte (Collo et al., 1996; Xiang et al., 1998b; Colldén et al., 2010; Wakamori & Sorimachi, 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollte die pharmakologische, molekularbiologische, sowie immunhisto- und immunzytochemische Charakterisierung ionotroper purinergere Rezeptoren im ARC des Rattenhypothalamus anhand einer Primärzellkultur des ARC erfolgen.

[1] Grundvoraussetzung für alle Teilstudien stellte daher die *de novo* Etablierung einer neuroglialen Primärkultur des ARC früh-postnataler, 4 - 6 Tage alter Ratten dar, sowie deren eingehende Charakterisierung hinsichtlich (a) der verschiedenen Zelltypen der Primärkultur und (b) der neuronalen Expression ARC-spezifischer Transmit-

tersysteme durch den immunzytochemischen Nachweis von Tyrosinhydroxylase (TH) für dopaminerge (DA) Nervenzellen sowie folgender Neuropeptide: adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Neuropeptid Y (NPY), Neurotensin-1 (NT-1) und Somatostatin (SOM).

[2] Mit Hilfe der *real-time* qPCR und dem Einsatz geeigneter "*primer*" Paare sollte die relative mRNA-Expression aller ionotropen Purinozeptorsubtypen (P2X₁ - P2X₇) sowohl im Bereich der hypothalamischen Kerngebiete des ARC und - zum Vergleich (Hitzel, 2009) - des MnPO adulter und früh-postnataler Tiere, als auch in neuroglialen ARC- bzw. MnPO-angereicherten Primärkulturen quantitativ erfasst werden. Diese Untersuchungen sollten sowohl mögliche ontogenetische Unterschiede in der mRNA-Expressionsrate ionotroper Purinozeptoren in ARC resp. MnPO erfassen, als auch P2X-spezifische Expressionsmuster der Primärkulturen aufzeigen und als Hilfestellung für die Auswahl geeigneter Agonisten / Antagonisten für die pharmakologische Charakterisierung funktionell exprimierter Purinozeptorsubtypen dienen.

[3] Die pharmakologische Charakterisierung von P2X Purinozeptoren auf Einzelzellebene in der ARC-Primärkultur sollte durch mikrospektrofluorimetrische Untersuchungen zum *on-line* Nachweis der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) unter Verwendung der Fura-2 AM Technologie (= "Kalzium Ratio-Imaging") erfolgen. Dabei sollte die funktionelle Expression der P2X-Purinorezeptorsubtypen durch die Aufzeichnung der durch zahlreiche Manipulationen im Superfusionsmodus der ARC-spezifischen Primärkultur erzeugten Änderungen der $[Ca^{2+}]_{iz}$ in Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen ermittelt und quantitativ ausgewertet werden. Eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ würde als Maß für die Aktivierung des Rezeptor-vermittelten Kalziumeinstroms aus dem Extrazellulärraum bzw. der intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} aus Speicherorganellen als "*second messenger*" fungieren.

Es ergeben sich folgende Teilprojekte:

- Potentielle Aktivierung der zu analysierenden Zellen der ARC-angereicherten Primärkultur durch Superfusionsstimulation mit den generellen Purinozeptoragonisten ATP resp. 2Me-SATP sowie den P2X-Rezeptorsubtyp-spezifischen Agonisten α,β -meATP (P2X₁, P2X₃) und Bz-ATP (P2X₇). Experimentelle Erarbeitung von Dosis-Wirkungsbeziehungen und Ermittlung des Extrazellulärraums bzw. der zellulären Speicherorganellen als Ursprungsort der intrazellulären Kalziumsignale.
- Quantitativ vergleichende Analyse der intrazellulären Kalziumsignale nach Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem generellen Purinozeptoragoni-

sten 2-MeSATP bei Raumtemperatur (25°C) und der physiologischen Körpertemperatur der Ratte (37°C).

- Ionotrope P2X-Rezeptoren zeigen bezüglich ihres Aktivierungsprofils subtypspezifisch ein fehlendes, langsames oder schnelles Desensibilisierungsverhalten (DSV). Quantitative Erfassung des DSV in Superfusionsstudien mit ATP bzw. 2-MeSATP in repetitiv applizierter, äquimolarer Ligandenkonzentration für die Zellen der ARC-angereicherten Primärkultur. Die ermittelten Daten dienen zudem als Basis für nachfolgende Versuchsreihen mit dem Einsatz von Purinozeptorantagonisten für die pharmakologische Charakterisierung funktionell exprimierter P2XR-Subtypen.
- Potentielle kompetitive Hemmung der durch Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in den untersuchten Zelltypen der ARC-angereicherten Primärkultur durch generelle (PPADS, Suramin, RB-2) sowie die subtypspezifischen Purinozeptor Antagonisten TNP-ATP (P2X₁, P2X₃, P2X_{2/3}) und PSB1011 (P2X₂). Dabei sollen Ligand und jeweiliger Antagonist in meist zwei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen (1:10 bis 1:1000) eingesetzt werden, sowie eine Kategorisierung der Daten in "starke" resp. "schwache" Hemmung vorgenommen werden.
- Post-experimentelle Identifizierung der durch Kalzium Ratio-Imaging in allen ARC-angereicherten Primärkulturen charakterisierten Zellen durch den immunzytochemischen Nachweis zelltypspezifischer Markerproteine und der folglich eindeutigen Zuordnung als Neuron, Astrozyt oder Mikrogliazelle. In einigen Zellpräparationen Durchführung (a) zelltypspezifischer, immunzytochemischer Markierung der membranständigen Purinozeptorsubtypen P2X₁₋₇ oder (b) transmitterspezifischer, immunzytochemischer Markierung 2-MeATP responsiver ARC-Neurone.

[4] Die Charakterisierung funktioneller P2X Purinozeptoren durch Radioligandenbindung im Hypothalamus bzw. hypothalamischen Kerngebieten adulter Ratten. Mit Hilfe von Radiorezeptor-Assays (RRA) sowie rezeptorautoradiographischen Studien unter Verwendung des purinergen Radioliganden [³⁵S]dATPαS sollte eine detaillierte pharmakologische Charakterisierung ionotroper Purinozeptoren im Gesamthypothalamus bzw. spezifischen hypothalamischen Kerngebieten inkl. des ARC adulter Ratten durchgeführt werden.

- Mittels RRA sollte in kompetitiven Verdrängungsstudien unter Verwendung des Radioliganden [³⁵S]dATPαS in konstanter, sowie unmarkierter, subtypspezifischer Agonisten bzw. Antagonisten in logarithmisch steigender Konzentration das

Expressionsmuster der P2X Rezeptoren im Gesamthypothalamus, sowie vergleichend dem thorakalen Rückenmark adulter Ratten charakterisiert werden. Dazu werden *in vitro* Untersuchungen an einer angereicherten Plasmamembranfraktion beider neuroglialen Gewebe durchgeführt, und durch Computer-gestützte Analyse die entsprechenden IC₅₀-Werte ermittelt.

- Mit Hilfe der semiquantitativen Rezeptorautoradiographie sollte zudem die optische Lokalisation mit [³⁵S]dATPαS markierter Bindungsstellen in Feinstrukturen des unfixierten Gehirns adulter Ratten, mit Fokus auf hypothalamischen Kerngebieten inkl. des ARC, demonstriert werden. Darüber hinaus sollten semiquantitative, kompetitive Verdrängungsstudien an seriellen, coronalen Gehirnschnitten, vergleichbar den an angereicherten Plasmamembranen durchgeführten Studien, erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1. Material allgemein

Technische Geräte allgemein

| Bezeichnung: | Modell: | Hersteller: |
|--|---------------------------|---|
| Autoklav | 2540 EL | Systec, D-Wettenberg |
| Bipolarer Temperatur-Controller | CL-100 | Warner Instruments, Hamden, CT, USA |
| Binokular | SMZ-V | Nikon, Tokio, Japan |
| CO ₂ -Inkubator | BB-15 | Thermo Scientific, D-Dreieich |
| Cell Harvester | M-24R | Brandel, Gaithersburg, MD, USA |
| Eismaschine | Icematic F120 | CastelMAC S.p.A., Castelfranco Veneto, Italien |
| Fluoreszenzmikroskop mit: | BX50 | Olympus Optical, D-Hamburg |
| Digitale schwarz-weiß Kamera | Spot Insight, Model 3.1.0 | Diagnostic Instruments – Visitron Systems, D-Puchheim |
| Kamera-Software | Spot Insight | Diagnostic Instruments, MI, USA |
| Flüssigkeitsszintillationszähler | WinSpectral 1414 | Wallac-ADL GmbH, D-Freiburg |
| Heißluftsterilisator | ED 115/E2 | Binder GmbH, D-Tuttlingen |
| Homogenisator (Ultraschall) | SONOPULS | Bandelin Electronic GmbH & Co KG, D-Berlin |
| Homogenisator (mechanisch) | Ultra Turrax T25 | Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, D-Staufen |
| Kryostat | Typ HM 500 O | Microm GmbH, D-Walldorf |
| Leuchttisch mit Kamerastativ | | W.G. Kerckhoff Institut, D-Bad Nauheim |
| Digitale Kamera | PowerShot S3 IS | Canon Deutschland GmbH, D-Krefeld |
| Mikrospektrofluorimetrisches Imaging System bestehend aus: | | Diagnostic Instruments – Visitron System, D-Puchheim |
| Digitale schwarz-weiß Kamera | Spot Pursuit, Model 23.0 | Diagnostic Instruments – Visitron Systems, D-Puchheim |
| Invers-Mikroskop | IMT-2 | Olympus Optical, D-Hamburg |
| Filterrad | | Ludl Electronic Products Ltd, New York, NY, USA |
| Steuereinheit | MAC 5000 | Diagnostic Instruments – Visitron System, D-Puchheim |
| Zellkultur-Messkammer | | W.G. Kerckhoff Institut, D-Bad Nauheim |
| Minishaker/Vortex | MS1 | IKA Works Inc., Wilmington, |

Material und Methoden

| | | |
|---|-------------------------------------|--|
| | | NC, USA |
| Mikrospektrofluorimeter | Nanotrop 2000 | Thermo Scientific, D-Dreieich |
| Peltier Kühlung | | W.G. Kerkhoff Institut, D-Bad Nauheim |
| Perfusionsanlage | | W.G. Kerkhoff Institut, D-Bad Nauheim |
| pH-Meter | inoLab® 7110 | Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, D-Weilheim |
| Pipetten | 500-2000, 100-1000, 10-100, 2-10 µl | Eppendorf AG, D-Hamburg |
| Pipetten | 0,5-2 µl | Gilson, Inc., Middleton, WI, USA |
| Pipettiergerät | Pipetboy | Integra Biosciences GmbH, D-Fernwald |
| Pipettierhelfer | Easypet | Eppendorf AG, D-Hamburg |
| Reinstwassersystem | Milli-Q Biocel | Millipore, D-Eschborn |
| Schlauchpumpe | Minipuls-3 | Abimed Analysen Technik, D-Langenfeld |
| Schüttler Rotomix | Type 50800 | Barnstead International, Dubuque, IA, USA |
| Schüttelwasserbad | Typ 1083 | Gesellschaft für Labortechnik mbH, D-Burgwedel |
| Schwanenhalslampe | Intralux 500 | Volpi AG, Zürich, Schweiz |
| Sicherheits-Bunsenbrenner | Fireboy | Technomara, D-Fernwald |
| Solution In-line Heater/Cooler Two Line | | Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA |
| Spektrophotometer | DU ® 50 | Beckman Coulter, Brea, CA, USA |
| Real-Time PCR System | StepOnePlus™ | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Sterilbank | Microflow Biological Safety Cabinet | Thermo Electrocorporation, D-Langenselbold |
| Thermoblock | QBT | VWR, D-Darmstadt |
| Tischrühr- und Heizgerät | Combimag | Roth GmbH, D-Karlsruhe |
| Tischrühr- und Heizgerät | PCT Basic | IKA Labortechnik, D-Staufen |
| Ultraschall-Wasserbad | Sonorex RK 100 | Bandelin Electronic GmbH & Co KG, D-Berlin |
| Vakuumpumpe | XF 54 230 50 | Millipore, D-Eschborn |
| Vibratom | TSE 550752/M | Technical & Scientific GmbH, D-Kronberg |
| Waage zum Wiegen der Tiere | universal | Sartorius AG, D-Göttingen |
| Waagen zum Abwiegen von Trockensubstanzen | P1210N; AE 50 und PM 2500 | Mettler Toledo, D-Gießen |
| Wärmeschrank | Typ 5050 EK | Heraeus, D-Hanau |
| Zentrifuge | 5417R | Eppendorf AG, D-Hamburg |
| Zentrifuge (Kühlzentrifuge) | J2-21 | Beckman Coulter, D- |

| | | |
|----------------------------------|------------------|--|
| | | Krefeld |
| Zentrifuge | Megafuge 1.0 R | Heraeus, D-Hanau |
| | | |
| Zentrifuge | PerfectSpinP | peqlab Biotechnologie GmbH, D-Erlangen |
| Zentrifuge für 96-“well“ Platten | Spectrafuge mini | neo Lab, D-Heidelberg |

Gebrauchsmaterial allgemein

| Bezeichnung: | Modell: | Hersteller: |
|----------------------------------|--|---|
| Einstreu für Tierkäfige | Altromin animal bedding | Altromin GmbH & Co KG, D-Lage-Lippe |
| Standard Rattenfutter | Standard Rattenfutter R-Z V1324-000 | Sniff, D-Soest |
| Tierfutter | Zucht-Diätfutter | Altromin GmbH & Co KG, D-Lage-Lippe |
| Transparente Polycarbonat-Käfige | Typ III (28 x 42 x 15 cm), Typ IV (38 x 59 x 18 cm) | FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmerdingen |

Computerprogramme

| Bezeichnung: | Hersteller |
|--------------------------------------|---|
| Adobe Photoshop, Version 6.0 | Adobe Systems GmbH, D-Unterschleißheim |
| Graph Pad Prism®, Version 5.0 | GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA |
| MCID Analysis, Version 7.0 | InterFocus GmbH, D-Mering |
| Metafluor, Version 7.7.8 | Diagnostic Instruments – Visitron Systems, D-Puchheim |
| Metamorph, Version 5.05 / 7.7.5 | Diagnostic Instruments – Visitron Systems, D-Puchheim |
| Microsoft® Office Excel, Version 6.0 | Microsoft Corporation, D-München |
| Microsoft® Office Word, Version 6.0 | Microsoft Corporation, D-München |
| StepOne Software, Version 2.1 | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| WinSpectral™ | Perkin Elmer, Boston, MA, USA |

2.2. Versuchstiere

Die im Rahmen der experimentellen Untersuchungen zur Charakterisierung des Purinozeptorsystems im *Nucleus arcuatus* des Hypothalamus eingesetzten Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*) wurden aus institutseigener Zucht bezogen. Die Elterntiere stammten von der Versuchstieranstalt Charles River WIGA (Sulzfeld). Sowohl die Aufzucht als auch die Haltung der Tiere wurde bei geregelter Raumtemperatur ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12 / 12 Stunden hell / dunkel Rhythmus (Licht von 7:00 bis 19:00 Uhr) durchgeführt. Die gemeinsame Haltung der Jungtiere mit dem jeweiligen Muttertier erfolgte bis zum Absetzen (110 ± 10 g Körpergewicht) in

transparenten Typ IV Polycarbonat-Käfigen. Danach wurden die Tiere nach Geschlechtern separiert und in Gruppen von bis zu fünf Tieren in transparente Typ III Polycarbonat-Käfige umgesetzt. Während der gesamten Zeit standen Wasser und Rattenzuchtfutter *ad libitum* zur Verfügung.

Männliche Wistar-Ratten mit einem Alter von sechs bis 15 Wochen und einem Körpergewicht (KG) von 200 - 350 g wurden für immunhistochemische Untersuchungen, quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) Analysen, Rezeptorautoradiographien (RAG) und Radio-rezeptor Assay (RRA) Studien eingesetzt. Für die Versuche an primären, neuroglialen Zellkulturen (Fura-2 Ratio-Imaging, immunzytochemische Untersuchungen und qRT-PCR) wurden männliche, neonatale 4 - 6 Tage alte Ratten verwendet. Vor Beginn der Studien wurden beim Regierungspräsidium Hessen die durchzuführenden Tiertötungen angezeigt (GI 18/2; GI 18/2-Nr. A 33 / 2012) bzw. nach Antragstellung genehmigt (GI 18/2-Nr. 66 / 2011).

2.3. Analyse Purinozeptorsubtyp-spezifischer mRNA Expression im *Nuc-leus arcuatus* durch quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

2.3.1. Materialien für qRT-PCR

Gebrauchsmaterial

| Bezeichnung: | Hersteller: |
|---|--|
| MicroAMP™ 96- Well Support Base | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| MicroAmp®Fast 8-Tube Strip 0,1 ml | |
| MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate 0,1 ml | |
| MicroAMP™ 96- Well Tray for VeriFlex™ Blocks | |
| MicroAMP™ optical 96- Well Reaction Plate | |
| Mikro Küvette (45 x 12,5 x 12,5 mm; Schichtdicke 10 mm) aus Quarzglas Suprasil® | |
| Optical Adhesive Cover | Hellma Analytics, D-Mühlheim |
| Optical Flat Cap 8 / Strip | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| RNeasy® Micro Kit | QIAGEN GmbH, D-Hilden |
| RNeasy® Mini Kit | QIAGEN GmbH, D-Hilden |

Chemikalien

| Bezeichnung: | Hersteller: |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>bidest.</i> Reinstwasser, steril | |
| Desoxynukleotide (dNTP) Mix | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | |

| | |
|--|--|
| Dithiothreitol (DTT) | Invitrogen, San Diego, CA, USA |
| Ethanol absolut | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Isopropanol | |
| M-MLV Reverse Transcriptase; 200 I.U./ μ l | Invitrogen, San Diego, CA, USA |
| Random Hexamers (Random Primers) | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| RNAlater® RNA Stabilization Reagent | QIAGEN GmbH, D-Hilden |
| TaqMan® Gene Expression Master Mix | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |

Primer

TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| Assay ID: | Gen (<i>Rattus norvegicus</i>) |
|------------------|---------------------------------------|

endogene Kontrolle / Referenzen:

| | |
|---|-----------------|
| Rn00667869_m1 Rat Actb Endogenous Control (VIC/MGB Probe, Primer Limited) | β - Aktin |
|---|-----------------|

Zielgene:

| | |
|---------------|-------|
| Rn005644_m1 | P2X1R |
| Rn00586491_m1 | P2X2R |
| Rn579301_m1 | P2X3R |
| Rn00580949_m1 | P2X4R |
| Rn00589966_m1 | P2X5R |
| Rn00562354_m1 | P2X6R |
| Rn00570451_m1 | P2X7R |

Die Hydrolysesonden für alle Zielgene enthielten am 5'-Ende je ein FAM®-Fluorochrom. Am 3'-Ende befand sich der nicht-fluoreszierende Quencher (NFQ). Die Sonde im β -Aktin Assay war stattdessen mit VIC™-Fluorochrom markiert.

Lösungen und Puffer

| Bezeichnung: | Zusammensetzung/Herstellung: |
|---|---|
| DEPC H ₂ O | DEPC (0,1 %) in Reinstwasser, autoklaviert nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur |
| <i>real-time</i> Mix (Ansatz pro well) | 3,5 μ l steriles H ₂ O 5 μ l Mastermix 0,5 μ l Primer (50 μ M in 10 mM Tris-HCl; pH 8,3) |
| Reverse Transkriptase-Mix I (Ansatz pro 9 μ l RNA) | 1 μ l Random Hexamers 1 μ l dNTPs (10 mM) |
| Reverse Transkriptase -Mix II (Ansatz pro 9 μ l RNA) | 4 μ l 5 x First Strand Buffer 2 μ l steriles H ₂ O 2 μ l DTT (0,1 M) 1 μ l M-MLV Reverse Transkriptase (200 IU./ μ l) |

2.3.2. Allgemeine Grundlagen der qRT-PCR

2.3.2.1. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) stellt ein Verfahren zur enzymatischen Vervielfältigung (Amplifikation) definierter, einzel- (*single strand*, ss) oder doppelsträngiger (*double strand*, ds) DNA-Sequenzen dar. Zu diesem Zweck werden sogenannte Primer verwendet; dies sind Oligodeoxynukleotide aus max. 30 Nukleotiden, welche sich komplementär an eine zu amplifizierende ssDNA-Sequenz anlagern und als Startpunkte für DNA-replizierende Enzyme wie z.B. der Taq-Polymerase dienen.

Der typische Ablauf einer PCR lässt sich in drei Schritte unterteilen (Mullis & Faloona, 1987): (1) Denaturieren des dsDNA "Template" (Vorlage), (2) Hybridisierung (Annealing) der spezifischen Primer an die entstehenden ssDNA und (3) Elongation des dsDNA Amplifikats. Die Trennung der beiden DNA-Stränge des Templates erfolgt bei einer Temperatur von 94 - 95°C. Während der Absenkung der Temperatur auf 55°C wird die Anlagerung der im Überschuss vorhandenen Primer an die dann einzelsträngige DNA ermöglicht. Danach wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der thermostabilen Taq-Polymerase von 72°C erhöht. Dieses Enzym synthetisiert, ausgehend vom gebundenen Primer, einen komplementären Strang aus den im Reaktionsansatz vorliegenden dNTP-Molekülen (Desoxyribonukleosidtriphosphate), bis am Schluss eines Reaktionszyklus eine exakte Kopie des dsDNA Templates vorliegt. Da während der Elongation die Komplementierung an beiden Einzelsträngen der Template-DNA abläuft, hat man in einem Reaktionszyklus die Anzahl der Template-DNA verdoppelt. Werden die Zyklen wiederholt, dienen die Produkte der vorherigen Zyklen als Vorlagen der nächsten Zyklen und ermöglichen somit theoretisch eine exponentielle Amplifikation der spezifischen Sequenz (Mülhardt, 2002). Es entsteht eine Vielzahl an identischen dsDNA-Fragmenten mit spezifischer Basensequenz und Länge.

Tatsächlich jedoch zeigt die Reaktionskinetik mit Zunahme der dsDNA Vervielfältigungen eine Abnahme der Amplifikationsrate (lineare Phase), die nach einer bestimmten Reaktionsanzahl letztendlich in eine Plateau- oder Endpunktphase übergeht. Gründe sind die Verringerung der zur Verfügung stehenden intakten dNTPs und Oligonukleotidprimer, sowie die Anhäufung von Pyrophosphat und die mögliche Bindung der Amplifikate untereinander anstelle der Primer.

Nach einer traditionellen PCR erfolgt die elektrophoretische Auftrennung aller Fragmente zuzüglich eines parallel aufgetragenen Größenmarkers im Agarose-Gel. Zur Visualisierung werden die aufgetrennten dsDNA Fragmente anschließend mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, wie Ethidiumbromid markiert (Gyllensten & Erlich, 1988; Saiki

et al., 1988; Kemp et al., 1989). Zur Quantifizierung der Amplifikatmenge erfolgt die Bestimmung der Bandendicke bzw. der Intensität der Bandenfluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm (Higuchi et al., 1992). Dieses Verfahren zum Nachweis der PCR-Amplifikation nutzt die Plateauphase oder den Endpunkt der PCR-Reaktion nach einer definierten Zyklenanzahl. Die Reaktionskinetik wird dabei nicht berücksichtigt. Eine Quantifizierung der Ausgangsmenge an Template ist folgerichtig relativ unpräzise.

2.3.2.2. Quantitative *real-time* PCR

Eine genauere Quantifizierung der für ein bestimmtes Protein von Interesse kodierenden DNA oder RNA Sequenz ist durch die *real-time* PCR unter Berücksichtigung der Reaktionskinetik gegeben. Die heute gängigen, quantitativen *real-time* PCR-Methoden verbinden dabei die Amplifizierung von Nukleinsäuren (Prinzip der PCR) mit der Möglichkeit der Quantifizierung in Echtzeit (Cardullo et al., 1988). Die Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion während eines PCR-Zyklus. Dabei wird die reale Akkumulation des PCR-Produkts (Amplicon) während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion nachgewiesen. Ein Sichtbarmachen der Amplifikate auf einem Gel wie bei der traditionellen PCR ist nicht nötig. Weil man somit geringfügige Unterschiede etwa der Expressionsrate eines bestimmten Gens objektiv nachweisen kann, hat sich die quantitative *real-time* PCR als bevorzugte Methode für Genexpressions-Untersuchungen etabliert.

Die *real-time* PCR auf Basis des *TaqMan*®- bzw. Hydrolysesondensystems baut auf der Nutzung des "Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers" (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) (Förster, 1948) als Detektionsmethode zur Darstellung der Nukleinsäurehybridisierung auf (Cardullo et al., 1988). Das Prinzip des FRET (*Abb. MM 1*) beruht auf der Verwendung zweier verschiedener Fluorochrome (F1 bzw. F2), die jeweils durch Licht einer spezifischen Wellenlänge (Anregungswellenlänge ARW1 bzw. ARW2) angeregt werden und dadurch wiederum Licht in einer höheren, für sie charakteristischen Wellenlänge (Emissionswellenlänge EW1 bzw. EW2) emittieren. Die Eigenschaft von F2 besteht darin, dass dessen ARW2 genau auf die Emissionswellenlänge EW1 von F1 abgestimmt ist. Befinden sich beide Fluorochrome in einer ausreichenden räumlichen Nähe zueinander, so emittiert das angeregte Fluorochrom F1 Licht der Wellenlänge EW1, und dies entspricht genau der ARW2 des Fluorochroms F2. Auf diese Weise überträgt F1 die Energie direkt auf F2 und regt es dazu an, Licht der Emissionswellenlänge EW2 abzustrahlen. Als Folge kann EW1 nicht detektiert werden. Durch Messung der emittierten Lichtintensität bei EW1 und / oder EW2 bzw. deren jeweiligen Ab- bzw. Zunahme kann die relative Lage der beiden Fluorochrome zueinander bestimmt werden.

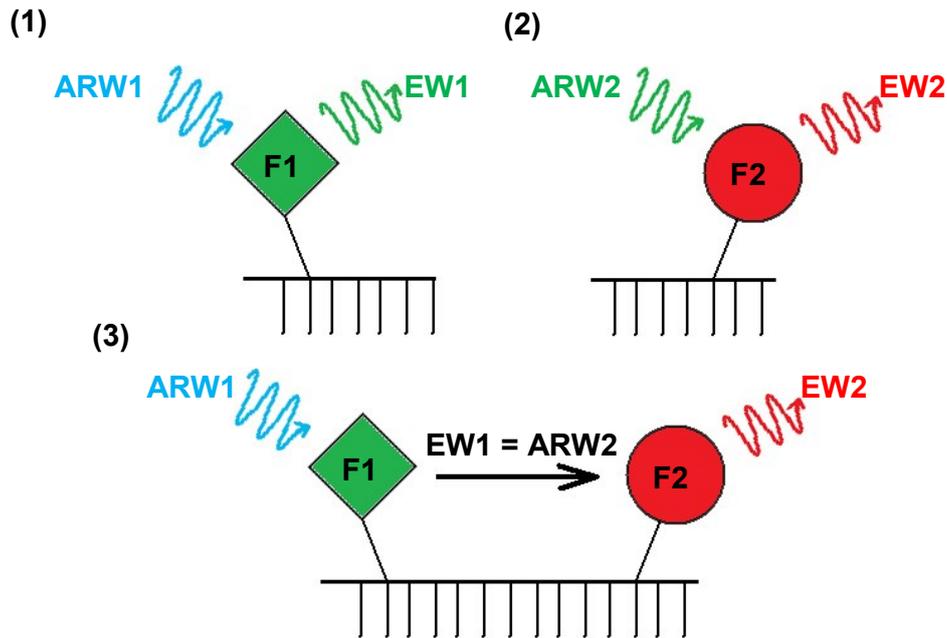


Abb. MM 1 : Prinzip des "Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers" (FRET)

(1) Das Fluorochrom 1 (F1) emittiert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge ARW1 Licht der Emissionswellenlänge EW1, welches der Anregungswellenlänge ARW2 des Fluorochroms 2 (F2) entspricht. Dieses emittiert nach Aktivierung Licht der Emissionswellenlänge EW2 (2). Bei ausreichender räumlicher Nähe findet somit ein direkter Energietransfer zwischen den beiden Fluorochromen statt (3). Die Emissionsintensität bei EW2 ist messbar, die bei EW1 somit nicht.

Modifiziert nach Damm (2012) und Livak et al. (1995).

Bei einer *TaqMan*[®]-Hydrolysesonde handelt es sich um ein kurzes, Sequenz-spezifisches Oligonukleotid (Abb. MM 2), dessen 5'-Ende mit dem Fluorochrom F1 markiert ist, welches auch als "Reporter" bezeichnet wird. Am 3'-Ende der Sonde befindet sich der "Quencher", der entweder das zweite Fluorochrom F2 repräsentiert oder aber ein selbst nicht-fluoreszierendes Akzeptor-Molekül darstellt. Der Einsatz eines solchen Quenchers, der nach dem Energietransferprozess also selbst kein Licht abgibt (*non-fluorescent quencher*, NFQ), vermindert die Hintergrundfluoreszenz der Reaktion. Reporter und Quencher befinden sich bei intakten *TaqMan*[®]-Hydrolysesonden in enger räumlicher Nähe zueinander, wodurch die Fluoreszenzemission (EW1) des Reporters durch den Energietransfer auf den Quencher weitgehend unterdrückt wird. Während der PCR hybridisiert die Sonde innerhalb des von *forward* und *reverse* Primern vorgegebenen Abschnittes an das einsträngige Template. Bei der Elongation baut die Taq-Polymerase aufgrund ihrer zusätzlichen intrinsischen 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Hydrolysesonde ab, wobei zuerst der Reporter vom 5'-Ende der Sonde und anschließend der Rest des Oligonukleotids mit dem gebundenen Quencher entfernt wird. Der Reporter befindet sich nun nicht mehr in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Quencher, sodass die Lichtstärke

der EW1 des Reporters nicht mehr unterdrückt und damit messbar wird. Da die Fluoreszenzintensität der EW1 proportional zur Amplifikation des Templates ansteigt, kann über verschiedene Rechenmodelle eine relative oder absolute Quantifizierung erfolgen (Holzapfel & Wickert, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden *TaqMan*[®]-Hydrolysesonden mit einem FAM[®]-Fluorochrom am 5'-Ende und einem nicht-fluoreszierenden "Quencher" (3'-NFQ) am 3'-Ende verwendet.

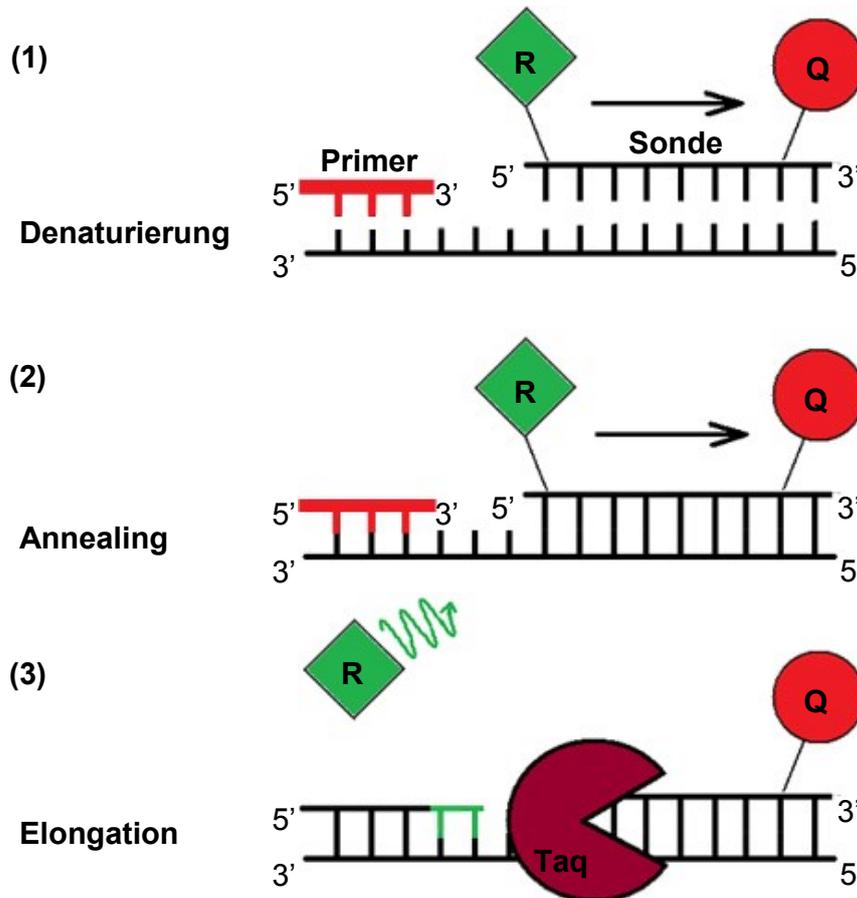


Abb. MM 2: Funktionsweise der *TaqMan*[®]-Hydrolysesonde am Beispiel eines Einzelstrangs

(1) Das Reporterfluorochrom (R) befindet sich an 5'-Ende, das "Quencher" Molekül (Q) am 3'-Ende der intakten Hydrolysesonde. (2) Die doppelmarkierte Sonde hybridisiert an einem Bereich des Templates, der sich "downstream" von der Primerbindungsstelle befindet. Der Quencher hindert den Reporter durch dessen räumliche Nähe an der Emission von Licht in der für den Reporter spezifischen Emissionswellenlänge EW1. (3) Während der Synthese eines komplementären Strangs (Elongationsphase) spaltet die Exonuklease-Funktion der Taq-Polymerase die Hydrolysesonde. Reporter und Quencher entfernen sich voneinander, wodurch Licht der Emissionswellenlänge EW1 des Reporters detektiert werden kann. Modifiziert nach Damm (2012), Holzapfel & Wickert (2007) und Mülhardt (2009).

2.3.2.3. Relative Quantifizierung der qRT-PCR Reaktion

Mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR kann die Ausgangsmenge an nachfolgend amplifizierter Template-DNA ermittelt werden. Basierend auf der Reaktionskinetik wird die exponentielle Phase der Amplifikation zur Quantifizierung genutzt. Dabei wird der Reaktionszyklus (= Schwellenwert), an dem das Fluoreszenzsignal erstmalig die Hintergrundfluoreszenz, den sogenannten "*cycle threshold*" (= C_T -Wert) überschreitet, angegeben (Pfaffl, 2004). Während die absolute Quantifizierung die jeweiligen C_T -Werte mit einer Standardkurve des Zielgenes vergleicht, um die ursprünglich eingesetzte Menge an DNA-Template zu ermitteln, werden bei der relativen Quantifizierung zwei verschiedene Gene miteinander verglichen. Basierend auf dem $\Delta\Delta C_T$ -Verfahren beschreibt diese Methode die Expressionsrate eines Zielgenes relativ zu derjenigen eines Referenzgens (= Referenzgruppe) (Livak & Schmittgen, 2001). Die Referenzproben (Kalibratoren) einer Referenzgruppe stammen im einfachsten Fall aus Kontrollgruppen mit basaler Expression des Zielgens (Damm, 2012; Holzapfel & Wickert, 2007; Livak & Schmittgen, 2001). Werden die Expressionsraten mehrerer verschiedener Zielgene miteinander verglichen, so entfällt die sogenannte "Kontrollgruppe". Als Referenzgruppe wird dann das am geringsten exprimierte Zielgen eingesetzt. Die Grundlage der "*relative quantity*" (= relative Menge RQ) bildet der ΔC_T -Wert, der sich aus der Differenz zwischen Ziel- und Referenzgenexpression ergibt (Tab. MM 1). Ein solches Referenzgen, ebenfalls als "*housekeeping*"-Gen bezeichnet, zeichnet sich durch seine ubiquitäre und homogene Expression aus und dient als endogene Kontrolle. Als ein solches Referenzgen kann beispielsweise das für β -Aktin des Zytoskeletts kodierende Gen herangezogen werden (Pfaffl, 2004). Dieses Vorgehen dient der Normalisierung und damit der Reduktion von Variationen der Ausgangsmenge der jeweils eingesetzten RNA- oder DNA-Proben, welche ihrerseits auf Unterschieden der analysierten Gewebeproben oder der Effizienz der RNA-Extraktion beruhen können. Zur $\Delta\Delta C_T$ -Berechnung wird die Expression der Referenzgruppe vom normierten C_T -Wert des Zielgens (ΔC_T -Wert) subtrahiert. Schließlich ergibt sich die relative Menge (RQ) an exprimiertem Zielgen in den einzelnen Proben als n-fache Expression der Referenzprobe durch die Berechnung von $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Pfaffl, 2004). Diese Berechnung hat zur Bedingung, dass in jedem Reaktionszyklus die Menge an Template exakt verdoppelt wird, was einer Effizienz von 100 % (Holzapfel & Wickert, 2007) entspricht. Vom Hersteller der *TaqMan*® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, wurde bei der Verwendung des StepOnePlus™ Real-Time PCR System eine Effizienz von 100 ± 10 % in der *real-time* PCR für die relative Quantifizierung von Genen angegeben.

| Variable | Berechnung |
|--------------------|---|
| ΔC_T | $C_T\text{-Zielgen} - C_T\text{-Referenzgen}$ |
| $\Delta\Delta C_T$ | $\Delta C_T\text{-Zielgen} - \Delta C_T\text{-Zielgen der Referenzprobe}$ |
| RQ | $2^{-\Delta\Delta C_T}$ |

Tab.MM 1 : Formeln zur Berechnung der relativen Menge (RQ) an exprimiertem Zielgen

Formellegende:

ΔC_T = Differenz zwischen Ziel- und Referenzgenexpression
 $\Delta\Delta C_T$ = Vergleich der Zielgenexpressionen der Probe und Referenzprobe
RQ = relative Menge an exprimierten Zielgen in der einzelnen Probe als n-fache Expression der Referenzprobe

2.3.3. Gewinnung der Gewebeproben für die qRT-PCR

Für Genexpressionsanalysen in Organen, Geweben bzw. auf Einzelzellebene werden vorrangig Expressionsmuster der für spezifische Proteine kodierenden mRNAs untersucht. Mit Hilfe der Reversen Transkription (RT-PCR) und des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus Gewebeproben bzw. Zellen extrahierte mRNA in komplementäre DNA (= cDNA) umgeschrieben werden. Danach kann die jeweilige cDNA mittels PCR vervielfältigt werden. Die cDNA kann darüber hinaus als Template zur Quantifizierung der Genexpression (*Kap. MM 2.3.5*) verwendet werden (Holzapfel & Wickert, 2007), sodass sich die Expressionsrate der zugrundeliegenden mRNA bestimmen lässt. Mit Hilfe der qRT-PCR sollte in der vorliegenden Arbeit die relative mRNA-Expression verschiedener ionotroper Purinozeptoren (P2XR) sowohl im Bereich des hypothalamischen ARC adulter und neonataler Wistar-Ratten als auch in neuroglialen, ARC-angereicherten Primärkulturen des Hypothalamus quantitativ erfasst werden. Als Referenz dienten Gewebeproben des *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) adulter und neonataler Rattengehirne (Hitzel, 2009).

2.3.3.1. Präparation der ARC- und MnPO-spezifischen Gehirngebiete adulter Ratten

Für eine rasche Präparation des Gehirngewebes adulter Ratten wurden die Tiere inhalatorisch mit 4 Vol. % Isofluran-Sauerstoffgemisch betäubt, durch zervikale Dislokation getötet und dekapitiert. Im Anschluss wurde mit einem Skalpell die Kopfhaut caudocranial aufgeschnitten und die dem Schädel anliegende Kau- und Halsmuskulatur, sowie die Halswirbel entfernt. Beginnend am *Foramen magnum* wurde vorsichtig das Schädeldach nach cranial bis zum *Bregma* mit Hilfe einer Hohlmeißelschere abgetragen und das

Gehirn freigelegt. Nach Entfernung der *Dura mater* sowie Durchtrennen der *Nervi optici* und des *Bulbus olfactorius* konnte das intakte Gehirn entnommen werden. Nach Teilung des Gehirns auf dem Niveau der *Fissura transversa cerebelli* wurde das anteriore *Telencephalon* inkl. *Diencephalon* in eine Petrischale (35 mm) mit sterilem, 4°C kaltem GBSS überführt. Unter Verwendung zweier steriler Spatel wurde die caudale Schnittfläche des Vorderhirns auf einen Teflon-Block gehoben und mit Histoacryl-Gewebekleber fixiert (Kap. MM 2.4.2). Dieser Teflon-Block wurde in eine mit oxygeniertem GBSS (4°C) gefüllte Plexiglaskammer eingespannt. Mit Hilfe eines Vibratoms wurden seriell-coronale Gehirnschnitte (500 µm) auf Höhe des Hypothalamus angefertigt und diese in sterile Petrischalen mit GBSS (4°C) überführt. Mit Hilfe einer Pinzette und einer Augenschere wurden unter mikroskopischer Kontrolle die entsprechenden Kerngebiete (ARC, MnPO) präpariert. Zur Lokalisierung des ARC dienten die charakteristischen Strukturen des dritten Hirnventrikels (V-III) sowie der *Eminentia mediana* (Kap. MM 2.4.2) (Abb. MM 3). Zur genauen Präparation des MnPO im coronalen Gehirnschnitt wurde die *Commissura anterior* herangezogen. Die adäquaten Gewebeexplantate eines adulten Tieres wurden umgehend in sterile, 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, gewogen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -55°C gelagert.

2.3.3.2. Präparation der ARC- und MnPO-spezifischen Gehirngebiete neonataler Ratten

Männliche, 4 – 6 Tage alte, neonatale Ratten wurden mit einer Schere dekapitiert und der Kopf kurz (< 1 min) in 4°C kaltes Ethanol überführt. Anschließend wurden Kopfhaut und die Schädeldecke mit Schere und Pinzette gelöst. Die weitere Präparation und Lagerung der spezifischen Gewebeproben erfolgte wie in Kap. MM 2.3.3.1 und Kap. MM 2.4.2 beschrieben. Je nach Präparation wurden die adäquaten hypothalamischen *Nuclei* (ARC und MnPO) von 3 - 5 Jungtieren vereinigt, umgehend in sterile, 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, gewogen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -55°C gelagert.

2.3.3.3. Präparation der ARC- und MnPO-spezifischen neuroglialen Primärkulturen neonataler Ratten

Die Gewinnung und Kultivierung von angereicherten neuroglialen Primärkulturen spezifischer hypothalamischer Gehirngebiete (ARC, MnPO) erfolgte wie in Kap. MM 2.4.2 beschrieben. Für die RNA-Extraktion wurde eine Zellsuspension von 100.000 Zellen / ml in den 0,35 ml fassenden flexiPerm Mikrozellkulturkammern ausgebracht. Die neuroglialen

Zellen in der ARC- oder MnPO-angereicherten Primärkulturen wurden jeweils vier Tage nach der Zellpräparation für die RNA-Extraktion dreimalig mit sterilem und RNase freiem Reinstwasser gewaschen, mit 100 µl RNAlater® überschichtet und bei -20°C gelagert.

2.3.4. RNA-Extraktion und -Aufbereitung

Für die Gewinnung und Aufreinigung der Gesamt-RNA aus hypothalamischen Kerngebieten (ARC, MnPO) adulter respektive 4 - 6 Tage alter Ratten wurden pro Versuchsansatz (N = 4) die unter sterilen Kautelen präparierten Gehirngewebsproben jeweils eines adulten Tieres (ARC, MnPO) respektive von drei (MnPO) oder fünf (ARC) neonatalen Ratten herangezogen. Hinsichtlich der RNA-Isolierung aus Kerngebiet-spezifischen, neuroglialen Primärkulturen wurde das Zellmaterial aus jeweils drei (MnPO) respektive sechs (ARC) flexiPerm Mikrozellkulturkammern vereinigt.

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte in gemeinsamer Aufarbeitung mit Frau Dr. Christina Nassenstein und Herrn Dr. Rajender Nandigama (Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie, Institut für Anatomie und Zellbiologie der JLU Gießen). Zur Extraktion der RNA aus den entsprechenden Gewebeproben wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen), aus den Kerngebiet-spezifischen Primärkulturen das RNeasy® Micro Kit (Qiagen) verwendet. Die Gewebeproben wurden in 350 µl β-Mercaptoethanol-haltigem RTL-Puffer (RNeasy® Mini Kit) aufgetaut und mit Hilfe einer Schwingmühle homogenisiert. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen der Kerngebiet-spezifischen Primärkultur mit Hilfe einer Pipette in 350 µl β-Mercaptoethanol-haltigem RTL-Puffer resuspendiert und mechanisch aufgebrochen. Die homogenisierten Proben wurden in einem Volumen von jeweils 350 µl 70 % Ethanol resuspendiert und im direkten Anschluss auf spezielle Aufreinigungssäulen (RNeasy MinElute spin column) überführt. Der weitere Verlauf der RNA-Extraktion entsprach den standardisierten Protokollen ("Quick-StartProtocol") des Herstellers Qiagen für die jeweiligen RNeasy® Kits.

RNeasy® Micro Kit- Handbuch (2011):

<http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id={5A5AEBB5-1603-4A71-82F5-3EB56054417E}&lang=en&ver=1>

RNeasy® Mini Kit-Handbuch (2010):

<http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id={0E32FBB1-C307-4603-AC81-A5E98490ED23}&lang=en&ver=1>

Die Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der Proben-RNA wurde jeweils mit Hilfe eines Nanodrop-Mikrospektrophotometers bestimmt. Die isolierte RNA wurde umgehend für das Umschreiben in cDNA-Templates mit Hilfe der Reversen Transkription versiegelt

und bei -55°C aufbewahrt. Basierend auf der durch spektrophotometrische Analyse bei 260 resp. 280 nm Wellenlänge ermittelten Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der isolierten Proben-RNA erfolgte eine Normalisierung der RNA-Konzentrationen in den zu amplifizierenden Proben wie folgt: ARC Ratte adult (59,6 ng / µl), MnPO Ratte adult (26,4 ng / µl), ARC Ratte neonatal (103,6 ng / µl), MnPO Ratte neonatal (46 ng / µl), ARC Primärkultur (16,5 ng / µl) und MnPO Primärkultur (21,3 ng / µl).

2.3.5. Synthese der cDNA – Reverse Transkription

Für die Anwendung der *real-time* PCR musste zunächst mit Hilfe der Reversen Transkription aus der Proben-mRNA die jeweils komplementäre cDNA hergestellt werden. Die cDNA-Synthese umfasst das Umschreiben einer mRNA-Matrize in komplementäre cDNA-Stränge mittels einer RNA-abhängigen DNA Polymerase, der "Reversen Transkriptase" (Mülhardt, 2009). Dieses Enzym, erstmals in Retroviren beschrieben, benötigt zum Start der Synthese, wie auch andere DNA-Polymerasen, einen Primer. Natürlich vorkommende mRNA weist meist einen poly(A)-"Schwanz", eine Verlängerung der RNA aus mehreren hundert Adenin-Nukleotiden, am 3'-Ende auf. Als Primer kann entweder ein Oligonukleotid bestehend aus Thymin-Nukleotiden [Oligo(dT)], die komplementär zum poly(A)-Schwanz sind, verwendet werden, oder ein *random Hexamer* Primer. Letzterer setzt sich aus sechs zufällig angeordneten Nukleotiden zusammen. Die Kombination aus beiden Primern ermöglicht die Transkription auch von beschädigter mRNA.

Zur Aufspaltung der mRNA-Sekundärstrukturen wird das kurzzeitige Erhitzen des Versuchsansatzes auf 65 - 70°C in Gegenwart von reduzierendem Dithiothreitol (DTT) angewendet (*Tab. MM 2*). Dies erleichtert den Zugang bzw. die Bindung der Primer und der Polymerase an die mRNA. Bei 37 - 42°C synthetisiert die Reverse Transkriptase aus den im Versuchsansatz vorliegenden dNTPs zuerst einen zur mRNA-Matrize komplementären DNA-Strang (*first strand*). Auf diesem aufbauend stellt die Reverse Transkriptase dazu einen komplementären DNA-Strang her, sodass schließlich eine doppelsträngige cDNA vorliegt. Abschließend erfolgt die Inaktivierung des Enzyms durch das Erhitzen auf 90°C (*Tab. MM 2*). In der vorliegenden Arbeit wurde die Reverse Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV) verwendet.

Zum Nachweis auf mögliche Kontaminationen der verwendeten Lösungen mit RNA oder DNA ohne Applikation des eigentlichen Templates wurde als Kontrolle der Reaktionsschritte jeweils ein Reaktionsgefäß mit 9 µl DEPC-Wasser anstelle der RNA (Blank1) bzw. 11 µl DEPC-Wasser statt des erhitzten ersten Ansatzes (Blank2) verwendet. Die so gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -55°C aufbewahrt.

| Arbeitsschritt | Bedingungen / Vorgehen | Dauer |
|------------------|---|---------|
| ansetzen | 9 µl RNA mit 7 µl RT-Mix I / Reaktionsgefäß | |
| erhitzen | im <i>real-time</i> Cycler, 65°C | 10 min. |
| abkühlen | 4°C, auf Eis | |
| Zugabe RT-Mix II | 9 µl pro Reaktionsgefäß | |
| erwärmen | im <i>real-time</i> Cycler, 37°C | 60 min. |
| erhitzen | im <i>real-time</i> Cycler, 90°C | 5 min. |
| abkühlen | 4°C, auf Eis | |

Tab. MM 2: Protokoll der Reversen Transkription von mRNA in komplementäre cDNA

2.3.6. Durchführung der quantitativen *real-time* PCR

Im nächsten Schritt erfolgte neben den Kontrollen Blank1 und Blank2 eine Kontrolle auf eventuelle Verunreinigung des autoklavierten Wassers. Hierfür wurde 1 µl autoklaviertes Wasser anstatt der cDNA eingesetzt.

| Arbeitsschritt | | Bedingungen / Vorgehen | Dauer | |
|-------------------|----------|--|-----------------------------------|--------|
| vorlegen | | 9 µl <i>real-time</i> Mix pro well in der 96-well Platte | | |
| Zugabe der cDNA | | 1 µl pro well | | |
| erwärmen | | real-time Cycler | 50°C (Aktivierung der Polymerase) | 2 min. |
| 35 – 44 Zyklen | erhitzen | | 95°C (Denaturierung) | 15 s |
| | abkühlen | | 60°C (Annealing, Elongation) | 30 s |

Tab. MM 3: Protokoll der qRT-PCR

2.3.7. Auswertung

Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte über die ΔC_T -Methode. Die C_T -Werte wurden über die endogene Kontrolle β -Aktin als Referenzgen normalisiert. Die $\Delta\Delta C_T$ -Berechnung erfolgte, indem die Differenz aus den ΔC_T -Werten des jeweils am geringsten exprimierten ionotropen Purinozeptors, als Kalibrator, von den ΔC_T -Werten der anderen Purinozeptorproteine von P2X-Typus gebildet wurde. Für die RQ-Berechnung wurden für jede Probe Doppelbestimmungen durchgeführt, die nochmals arithmetisch gemittelt wurden. Die RQ wurde anhand der oben genannten Formeln ermittelt (Tab. MM 1). Nach der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ließ sich berechnen, um wie viel höher die Expression von Rezeptor A zu Rezeptor B war (Livak & Schmittgen, 2001).

2.4. *In vitro* Modell: primäre Zellkultur des hypothalamischen ARC der Ratte

2.4.1. Materialien

Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial

| Bezeichnung: | Modell: | Hersteller: |
|--|---|--|
| Deckgläschen für die Immunzytochemie | 15 x 15 mm Stärke 1 | Menzel GmbH, D-Braunschweig |
| Deckgläschen für das Ca ²⁺ -Imaging | 25 x 25 mm CELL-VU Grid Coverslips DRM800 | Millennium Sciences, New York, NY, USA |
| Gewebekleber | Histoacryl | B. Braun, D-Meslungen |
| Irisschere, fein | gerade | Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg |
| Nachstarschere | Vannas | Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg |
| Pasteurpipetten | 230 mm aus Glas | MAGV, D-Rabenau |
| Petrischale (Glas) | Ø 11 cm | MAGV, D-Rabenau |
| Petrischalen (Plastik) | 100 x 20 und 35 x 10 mm | Sarstedt, D-Nümbrecht |
| Pinzette | Dumont # 5, gerade | Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg |
| Rasierklängen | 752/1/SS | Campden Instruments Limited, Loughborough, England |
| serologische Pipetten | 1, 5, 10 und 25ml | Sarstedt, D-Nümbrecht |
| Spatel, fein | gebogen | Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg |
| Sterilfilter | FP 30/0,2 CA-S | Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel |
| Teflonschläuche | Innendurchmesser 0,75 und 1,98 mm | Kronlab, D-Sinsheim |
| Zählkammer | Neubauer | Brand GmbH + CO KG, D-Wertheim |
| Zellkulturkammer | flexiPerm micro 12, Volumen: 0,35 ml / Kompartiment | Greiner-Bio One GmbH, D-Frickhausen |
| Zentrifugenröhrchen, steril | 15 und 50 ml | Sarstedt, D-Nümbrecht |

Chemikalien

| Bezeichnung: | Hersteller: |
|--|-----------------------------------|
| B 27 | Invitrogen, San Diego, CA, USA |
| Reinstwasser, steril | Reisntwasseranlage im Haus |
| Carbogen | Messer Griesheim GmbH, D-Neuried |
| D-Glukose | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Dispase I | Roche Diagnostics, D-Mannheim |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Gey's Balanced Salt Solution (GBSS) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Hank's Bufferd Salt Solution (HBSS) | Biochrom, D-Berlin |
| HEPES Natriumsalz (N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2- Ethansulfonsäure) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| L-Glutamat (Monosodium-Salz) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

| | |
|-------------------------|--------------------------------|
| L-Glutamin | Biochrom, D-Berlin |
| Neurobasal-A Medium | Invitrogen, San Diego, CA, USA |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom, D-Berlin |
| Poly-L-Lysin | Biochrom, D-Berlin |

Lösungen und Puffer

| Bezeichnung: | Zusammensetzung/Herstellung: |
|---|--|
| Dispase - Lösung | Dispase Trockensubstanz in HBSS-Puffer |
| Dispase - Gebrauchslösung (37°C) | Dispase I (1 ml) + 2 ml HBSS-Puffer; Enzymaktivität der Gebrauchslösung: 2 I.U./ml |
| GBSS - Lösung | Grundlage: GBSS Supplemente: Glukose (5 %); oxygeniert über CO ₂ - Flasche mittels Schlauchsystem mit Kanüle |
| HBSS – Puffer | HBSS unter Zugabe von 20 mM HEPES; oxygeniert über CO ₂ - Flasche mittels Schlauchsystem mit Kanüle |
| Inaktivierungs - Lösung (37°C) | 1 mM EDTA in HBSS- Lösung |
| Kulturmedium für die primäre neurogliale Zellkultur (Neurobasal-A / B 27 Medium, = NBA) | Grundlage: Neurobasal-A Medium Supplemente: B 27 (2 %), Penicillin/Streptomycin: (100 µg/ml) Glutamin (2 mM): (1 %) |

2.4.2. Etablierung einer neuroglialen Primärkultur des ARC

Für die Durchführung einer analytischen *in vitro* Charakterisierung funktionell exprimierter, ionotroper P2X-Rezeptoren in neuronalen bzw. glialen Zellen des *Nucleus arcuatus* (ARC) wurde eine primäre neurogliale Zellkultur aus dem Kerngebiet des ARC neonataler Rattengehirne etabliert. Die funktionellen Studien wurden Zelltyp-spezifisch an Neuronen und Astrozyten, partiell auch Mikrogliazellen durchgeführt. Das im folgenden Kapitel beschriebene Verfahren zur Etablierung der Zellkultur ermöglichte auf Grund der neuroanatomischen Gegebenheiten (Kerngebiete weisen keine klar definierte räumliche Begrenzung auf) keine zu 100 % ausschließlich auf ARC-spezifisches Gehirngewebe beschränkte Präparation, da von einer "Kontamination" durch Mitpräparation eines geringen Anteils an unmittelbar umgebendem Fremdgewebe etwa aus dem Bereich der *Eminentia mediana* (EM) oder des *Nucleus ventromedialis hypothalami* (VMH) (Abb. MM 3) ausgegangen werden muss. Die exakte Bezeichnung der Primärkultur lautet daher "ARC-angereicherte neurogliale Zellkultur", wird in dieser Studie jedoch als "Primärzellkultur des ARC" bezeichnet. Die Etablierung neuroglialer Primärkulturen spezifischer hypothalamischer bzw. medullärer Strukturen des Rattengehirns wurde von der Arbeits-

gruppe von Prof. Dr. R. Gerstberger am Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung (Bad Nauheim) von 1994 - 2000 ausgearbeitet. Auf Grundlage der in dieser Zeitperiode für das *Organum subfornicale* (SFO) und das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) ausgearbeiteten Protokolle und veröffentlichten Daten (Gebke et al., 1998, 2000; Jurzak et al., 1994, 1995a, 1995b) wurden von 2000 bis *dato* am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie angereicherte neurogliale Mikroprimärkulturen für das OVLT (Ott et al., 2010, 2012) sowie erfolgreich auch für den MnPO (Hatzelmann, 2013; Hitzel, 2009), den *Nucleus paraventricularis* (PVN) (Hatzelmann et al., 2013) sowie die *Area postrema* (AP) (Wuchert et al., 2008, 2009; Ott et al., 2012) etabliert. Diese Studien bildeten die Basis für die *de novo* Etablierung einer angereicherten neuroglialen Primärkultur des ARC in der vorliegenden Arbeit.

Zur Gewährleistung keimfreier Bedingungen wurden alle notwendigen Arbeitsprozesse in einer "laminar flow" Sterilbank durchgeführt. Für die Kultivierung der Zellen wurde ein miniaturisiertes Kultivierungssystem bestehend aus flexiPerm Mikrozellkulturkammern (Grundfläche 28 mm²) mit Deckgläschen hergestellt. Borosilikatglas eignet sich für das Adhären und Wachsen von Zellen und bietet optimale optische Eigenschaften für die weiterführenden Ratio-Imaging Studien zur kontinuierlichen Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) (Kap. MM 2.5), da es eine hohe Durchlässigkeit für monochromatisches Licht bis zu einer Wellenlänge von 290 nm aufweist, bei vernachlässigbarer sphärischer und chromatischer Aberration. Um ein optimales Anheften und Wachsen der Zellen zu gewährleisten, wurde das Deckgläschen lichtgeschützt mit ca. 100 µl Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) bei 4°C für zwölf Stunden beschichtet. Zur Prävention von potentiellen, Lysin-verursachten Zellmembranschäden wurden die Zellkulturkammern nach der Beschichtung mit sterilem Reinstwasser gewaschen und Lösungsreste entfernt. Bis zum Kultivieren der Zellen wurden die Gefäße zur Erwärmung auf 37°C im Brutschrank aufbewahrt.

Die Präparation des Gehirns von vier bis sechs Tage alten neonatalen Tieren erfolgte mit ethanol- bzw. hitzesterilisierten Instrumenten. Nach Dekapitation mit Hilfe einer Schere wurde der Kopf kurzzeitig (< 1 min) in eiskaltes Ethanol überführt, danach mit einer Pinzette in den medianen Augenwinkeln in einer Petrischale fixiert, Kopfhaut sowie Schädeldecke mit Schere und Pinzette gelöst und das Gehirn im Schädel mit einem Skalpell in je einen anterioren (Großhirn inkl. *Diencephalon*) und posterioren (Hirnstamm mit *Cerebellum*) Anteil getrennt. Die anteriore Komponente wurde in eine Petrischale (35 mm) mit oxygeniertem GBSS kurzzeitig bis zur Feinpräparation auf Eis gelagert.

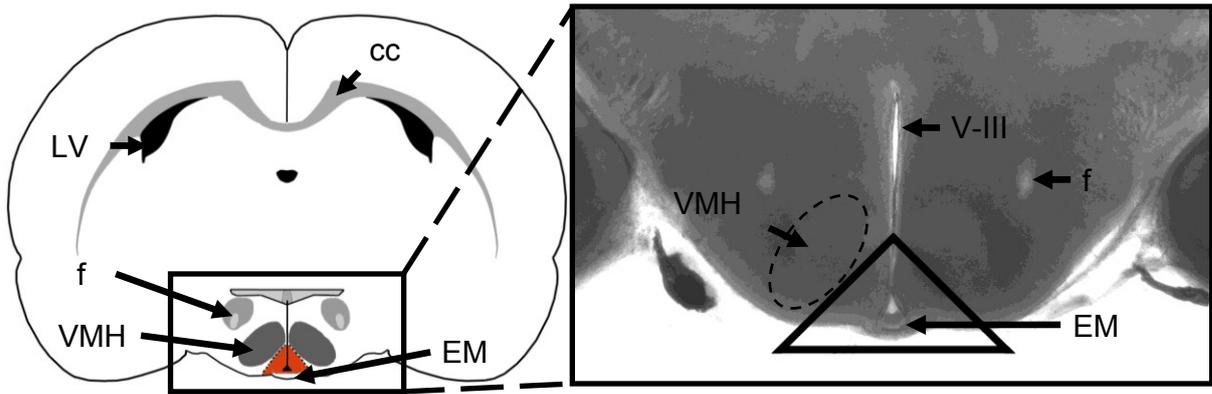


Abb. MM 3 : Lokalisation des *Nucleus arcuatus* im coronalen Gehirnschnitt einer früh-postnatalen Ratte

Links: Schematische Darstellung des *Nucleus arcuatus* (ARC) (rot) im coronalen Querschnitt des Gehirns einer vier Tage alten Ratte.

Rechts: Ausschnitt des frisch präparierten, coronalen Gehirnschnittes einer vier Tage alten Ratte auf Ebene des ARC (-2,04 mm in Bezug auf das Bregma). Der zur Gewebepreparation herangezogene ARC liegt im Bereich des Dreiecks. Schema modifiziert nach Paxinos & Watson (2005).

Abkürzungen: cc = *Corpus callosum*, EM = *Eminentia mediana*, f = *Fornix cerebri*, LV = lateraler Ventrikel, V-III = dritter Ventrikel; VMH = *Nucleus ventromedialis hypothalami*

Unter Verwendung zweier Spatel und Gewebekleber wurde die caudale Schnittfläche des Vorderhirns auf einem Teflonblock fixiert, welcher in eine mit 4°C kaltem, oxygeniertem GBSS-Puffer befüllte Plexiglas-Kammer eingesetzt wurde. Mit Hilfe eines Vibratoms wurden serielle, coronale Gehirnschnitte (500 µm) angefertigt und in GBSS überführt. Unter einem Binokular wurde der ARC aus dem coronalen Gehirnschnitt (Abb. MM 3) mit Pinzette und Augenschere herauspräpariert und kurzzeitig bis zur enzymatischen Behandlung in einer HBSS-gefüllten Petrischale unter Sauerstoffzufuhr auf Eis aufbewahrt. Für die topographische Lokalisierung des ARC im coronalen Gehirnschnitt diente die charakteristischen Strukturen der *Eminentia mediana* und des dritten Ventrikels. Für das Vereinzeln der Zellen aus dem Gewebeverbund und das Lösen der interzellulären Verbindungen wurde eine Kombination aus proteolytischer und mechanischer Dissoziation (Jurzak et al., 1994; Gebke et al., 1998) gewählt. Dazu wurden die ARC-Explantate von 3 - 5 Tieren zunächst bei 37°C für 50 min in 0,5 ml Dispase-1-HBSS-Gebrauchslösung (2 I.U. /ml) unter Oxygenierung inkubiert. Die Anwendung dieses enzymatischen Verfahrens *per se* führt nur zu einer unvollständigen Auflösung des Gewebeverbandes bzw. der interzellulären Verbindungen, bedingte jedoch keine Schädigung der zellulären Plasmamembran (Frangakis & Kimelberg, 1984; Frangakis et al., 1982) und sollte eine Erleichterung der nachfolgenden mechanischen Dissoziation der Zellen bewirken. Die enzymatische Dissoziation wurde durch dreimaliges Waschen der Gewebsexplantate mit Inaktivierungslösung (1 mM EDTA in HBSS) und Neurobasal-A Medium gestoppt. Mittels

einer 1 ml-Pipette erfolgte durch Auf- und Abpipettieren die zusätzliche mechanische Vereinzelung der Gewebeproben zu einer milchigen Zellsuspension. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Verdünnung der Zellsuspension auf 32.000 Zellen / ml wurden hiervon 350 µl in jede Zellkulturkammer ausgebracht und bei 37°C und einem Gasgemisch aus Luft mit 5 % CO₂ im Inkubator aufbewahrt. Mit dem nach 24 h erfolgten Mediumwechsel ging ein Entfernen von Zellfragmenten und nicht-adhäsiven Zellen einher. Ein weiterer Austausch des Neurobasal-A Mediums erfolgte am dritten Tag nach der Präparation. Nach einer 3 - 4 tägigen Differenzierungsphase wurden diese ARC-Primärkulturen sowohl für die immunzytochemische Charakterisierung Neuronen-spezifischer Transmitter- und Purinozeptorsysteme (Kap. MM 2.6.4.3 und Kap. MM 2.6.4.4) herangezogen, als auch den Kalzium Ratio-Imaging Versuchen zur pharmakologischen Analyse der funktionell exprimierten Purinozeptorsubstypen auf Neuronen und Gliazellen zugeführt (Kap. MM 2.5.6). Post-experimentell erfolgte die immunzytochemische Zuordnung sämtlicher, biophysikalisch analysierten ARC-Zellen zu bestimmten Zelltypen (Neurone, Astrozyten, Mikrogliazellen) der Primärkultur (Kap. MM 2.6.4.2).

2.5. Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik

2.5.1. Materialien

Chemikalien

| Bezeichnung: | Hersteller: |
|--|---|
| 2-Methylthioadenosin-5'triphosphat (2-MeSATP) | Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln |
| 2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'triphosphat (BzATP) | Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln |
| α,β-Methylenadenosin-5'triphosphat (α,β-meATP) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Adenosin-5'triphosphat (ATP) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Reinstwasser, steril (<i>Aqua bidest.</i>) | |
| Kalziumchlorid (CaCl ₂) | Merck, D-Darmstadt |
| D-Glukose | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Ethylenglykol-bis-(β-Aminoethylether) N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| HEPES Natriumsalz (N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2- Ethansulfonsäure) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Kaliumchlorid (KCl), | Merck, D-Darmstadt |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Merck, D-Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

| | |
|--|---|
| PSB 1011 Dinatrium 1-Amino-4-[3-(4,6-Dichloro[1,3,5]Triazin-2-ylamino)-4-Sulfo-phenylamino]-9,10-dioxo-9,10-Dihydro-anthracen-2-Sulfonat | Prof. Dr. Christa E. Müller, Pharmazeutisches Institut, Rheinische Friedrich-Wilhelms- Universität, D-Bonn |
| Pyridoxalphosphat-6-Azo(Benzoyl-2,4-Disulfonsäure) (PPADS) | Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln |
| Reactive blue-2 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Suramin Natriumsalz | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)Adenosin-5'triphosphat (TNP-ATP) | Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln |

Lösungen und Puffer

| Bezeichnung: | Zusammensetzung/Herstellung: |
|---|---|
| 2-MeSATP - Stocklösung | Grundlage: Reinstwasser, steril 2-MeSATP (10 mM) |
| α,β -meATP - Stocklösung | Grundlage: Reinstwasser, steril α,β -meATP (10 mM) |
| ATP - Gebrauchslösung | Lyophilisiert abgewogen und vor Versuch direkt in Ca^{2+} -Imaging Messpuffer gelöst |
| BzATP - Stocklösung | Grundlage: Reinstwasser, BzATP (1 mM) |
| Ca^{2+} -freier Imaging Messpuffer, pH 7,4 | Grundlage: Reinstwasser Na-HEPES (5 mM), NaCl (120 mM) Glukose (10 mM), KCl 5 (mM) MgCl_2 (6 mM), EGTA (1 mM) |
| Ca^{2+} -Imaging Messpuffer, pH 7,4 | Grundlage: Reinstwasser Na-HEPES (5 mM), NaCl (130 mM) Glukose (10 mM), KCl 5 (mM) MgCl_2 (1 mM), CaCl_2 (1,25 mM) |
| kaliumreicher Ca^{2+} -Imaging Messpuffer, pH 7,4 | Grundlage: Reinstwasser Na-HEPES (5 mM), NaCl (85 mM) Glukose (10 mM), KCl 5 (50 mM) MgCl_2 (1 mM), CaCl_2 (1,25 mM) |
| Fura-2 - Gebrauchslösung | Grundlage: Neurobasal-A Kulturmedium Fura-2 (2 μM) |
| Fura-2 - Stocklösung | Grundlage: DMSO Fura-2 (1 mM) |
| Kulturmedium für die primäre neurogliale Zellkultur (Neurobasal-A-Medium, NBA) | Grundlage: Neurobasal-A Supplemente: B 27 (Endkonz. 2 %), Glutamin (2 mM), (Endkonz. 1 %) Penicillin / Streptomycin (100 μg / ml) |
| PPADS - Stocklösung | Grundlage: Reinstwasser, steril PPADS (10 mM) |
| PSB 1011 - Stocklösung | Grundlage: Reinstwasser, steril PSB 1011 (10 mM) |
| Reactive blue-2 - Stocklösung | Grundlage: Reinstwasser, steril Reactive blue-2 (1 mM) |
| Suramin - Stocklösung | Grundlage: Reinstwasser, steril Suramin (1 mM) |
| TNP-ATP - Stocklösung | Grundlage: Reinstwasser, steril TNP-ATP (10 mM) |

2.5.2. Grundlagen der Kalzium Ratio-Imaging Technik

Die Ratio-Imaging Technik stellt eine Methode zur kontinuierlichen Messung der Konzentration freier intrazellulärer Ionen, wie etwa Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$), in einzelnen lebenden Zellen z.B. des Nervensystems dar (Baylor & Hollingworth, 2000; Hinman & Sammak, 1998). Sie bietet damit ein effizientes Verfahren zum Studium der Transmitter-induzierten, intrazellulären Signalübertragung in kultivierten Zellen neuronaler Strukturen wie Nervenzellen, Neuro- und Mikrogliazellen (Gebke et al., 2000; Hatzelmann, 2013; Jurzak et al., 1995; Ott et al., 2010; 1012; Wuchert et al., 2008; 2009).

Als Grundlage zur Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ werden selektive Ca^{2+} -chelierende Fluoreszenzfarbstoffe genutzt (Moreton, 1994). Neben Aequorin, einem ursprünglich aus Quallen (Gattung: *Aequorea*) isolierten Photoprotein (Hastings et al., 1969; Shimomura et al., 1963), steht heute für die Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ eine große Auswahl selektiver Indikatoren, wie Derivate des Fluoresceins (z.B. Fluo-3), des Rhodamins (z.B. Rhod-2) bzw. des EGTA (z.B. Quin-2, Indo-1, Fura-2) zur Verfügung (Grynkiewicz et al., 1985). Diese werden in zwei Hauptgruppen untergliedert: Wellenlängen-stabile (*wavelength stable*) und Wellenlängen-ändernde (*wavelength shifting*) Fluoreszenzfarbstoffe. Zu den Wellenlängen-stabilen Kalziumindikatoren zählen neben den Fluo-Indikatoren auch Rhod-2 und Quin-2. Diese ändern bei Kalziumbindung nur die Emissionsintensität, das Exzitations- und Emissionsspektrum aber bleiben konstant. Die Wellenlängen-ändernden Fluorophore werden auch als ratiometrische Fluoreszenzfarbstoffe bezeichnet. Bekanntester Vertreter dieser Klasse für quantitative Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ist Fura-2. Durch Bindung von Kalzium kommt es zu einer Verschiebung ihrer maximalen Exzitations- oder Emissionsspektren (Moreton, 1994; Paredes et al., 2008; Thomas & Delaville, 1991; Tsien, 1980; 1989; Tsien & Poenie, 1986). Das Exzitationsmaximum des kalziumfreien Fura-2 liegt bei einer Wellenlänge von 363 nm. Die kalziumgesättigte Form zeigt dagegen ein Anregungsmaximum bei 335 nm. Das Emissionsmaximum beider Fura-2-Isoformen bleibt hingegen relativ konstant bei etwa 510 nm (kalziumfreies Fura-2: 512 nm; kalziumgesättigtes Fura-2: 505 nm) (*Abb. MM 4*).

Zur Ermittlung der Emissionsintensität werden in der Praxis – wie auch in der vorliegenden Arbeit - eine Anregungswellenlänge (ARW) für die kalziumbeladene Fluorophor-Isoform von 340 nm, und für die kalziumfreie Isoform von 380 nm gewählt. Der Grund für die Wahl der Anregungswellenlänge von 380 nm anstatt von 363 nm für die Exzitation des kalziumfreien Fura-2 ist die Nähe der optimalen ARW (363 nm) zum isoemissiven Punkt von 358 nm im Fura-2 spezifischen Emissionsverhalten. Bei diesem Punkt (358 nm) ergibt sich, unabhängig von der Menge an gebundenen Kalzium, immer die gleiche

Emissionsintensität (Malgaroli et al., 1987). Zusätzlich wird bei einer ARW von 380 nm die Differenz der Fluoreszenzintensitäten für kalziumfreies und -gebundenes Fura-2 am größten (Abb. MM 4).

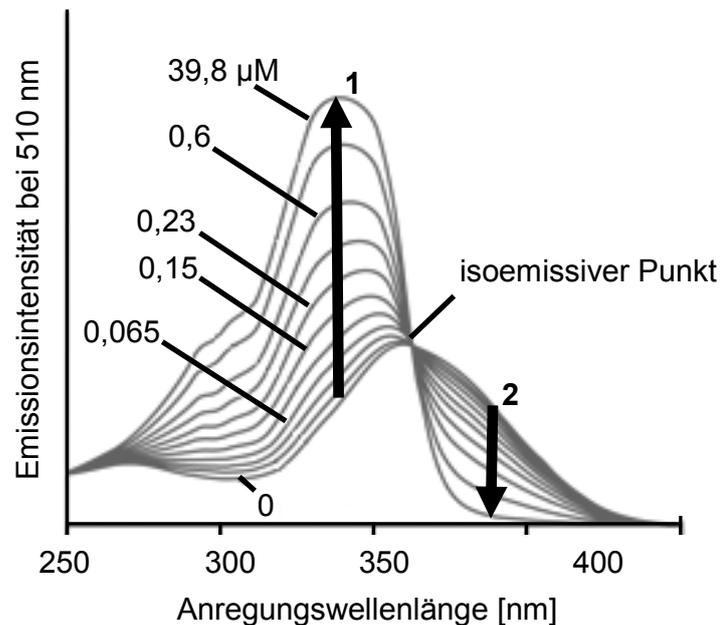


Abb. MM 4 : Exzitationspektrum von Fura-2

Darstellung der Fluoreszenzintensität bei 510 nm von Fura-2 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge [nm] und in Anwesenheit steigender Konzentrationen freien Kalziums [μM].

Kurve 1: Fura-2 kalziumbeladen; Emissionsmaximum bei 340 nm

Kurve 2: Fura-2 in Abwesenheit von Kalzium; Emissionsmaximum bei 380 nm

Pfeile zeigen Emissionsintensitäten bei ARW von 340 und 380 nm für die verwendete Ratio-Imaging Methode. Hier ist jeweils die Differenz der Fluoreszenzintensität für Ca^{2+} -freies und -gebundenes Fura-2 am größten. Isoemissiver Punkt = ARW, bei welche kalziumfreies und kalziumgesättigtes Fura-2 identische Emmissionswerte zeigen. Modifiziert nach O'Connor & Silver (2007).

Bei der Ratio-Imaging Methode wird der Quotient [Emission (340 nm ARW) / Emission (380 nm ARW)] aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei den beiden ARWs 340 nm und 380 nm berechnet. Dieser stellt das Verhältnis (Ratio) von kalziumbeladenem zu -freiem Fura-2 dar. Die Verwendung eines Wellenlängen-ändernden Fluoreszenzindikators, die Anregung bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen und die Ratiobildung der gemessenen Emissionsintensitäten lassen es zu, verschiedene Faktoren, welche die Messungen beeinflussen können, in ihrer Bedeutung zu minimieren. Zu diesen Faktoren gehören die Zelldicke, die Menge bzw. die eventuell ungleichmäßige Verteilung des Farbstoffes in den Zellen sowie Ausbleicheffekte (*photo bleaching*). Diese sollten die Messungen bei beiden Wellenlängen gleichermaßen beeinflussen. Die Fluoreszenz-

Ratio verhält sich gemäß des Massenwirkungsgesetzes proportional zur Konzentration des vorhandenen freien bzw. gebundenen Kalziums. Aus dem ermittelten Quotienten kann mit Hilfe der folgenden Gleichung (Grynkiewicz et al., 1985) die absolute, intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) bestimmt werden:

$$[Ca^{2+}]_{iz} = K_D \times ((R - R_{min}) / (R_{max} - R)) \times (S_{f2} / S_{b2})$$

Formellegende:

| | | |
|-----------|---|--|
| K_D | = | Dissoziationskonstante des Fura-2 für Kalzium (145 nmol/l) |
| R | = | Ratio der Emissionsintensitäten bei 340 nm und 380 nm |
| R_{min} | = | Ratio bei kalziumfreiem Fura-2 |
| R_{max} | = | Ratio bei kalziumgesättigtem Fura-2 |
| S_{f2} | = | <i>Proportionalitätskoeffizienten</i> des kalziumfreien Fura-2 (ARW von 380 nm) |
| S_{b2} | = | <i>Proportionalitätskoeffizienten</i> des kalziumgesättigten Fura-2 (ARW von 380 nm) |

In der vorliegenden Arbeit wurden aus den ermittelten Fluoreszenz-Ratio-Werten allerdings nicht die $[Ca^{2+}]_{iz}$ errechnet. Es wurde ausschließlich die Ratioänderung (Δ Ratio) als quantifizierbares Zeichen einer zellulären Reaktion herangezogen. Beruhend auf der Tatsache, dass die Zellmembran impermeabel für hydrophile Moleküle wie Fura-2, ist, wurde für die Beladung der zu untersuchenden Zellen das Acetoxymethylester-Derivat Fura-2 AM verwendet. Dieses ungeladene, amphiphile Molekül kann die Zellmembran permeieren und ermöglicht es somit, die Zellen ohne Schädigung zu beladen. Intrazelluläre Esterasen hydrolysieren die Acetoxymethylester, wodurch der Farbstoff membranimpermeabel in der Zelle verbleibt und Ca^{2+} reversibel binden kann (Tsien & Poenie, 1986).

2.5.3. Kalzium-Imaging Messstand

Der Ca^{2+} -Imaging-Messstand setzte sich aus einer Quecksilberdampf-Lampe als Lichtquelle, einem Filterrad mit Filtern für 340 nm und 380 nm, einem Shutter, einer Steuereinheit für Filterrad und Shutter, einer 14-bit-CCD-Restlichtkamera, einem inversen Fluoreszenzmikroskop und einer Messkammer zusammen. Ein CELL-VU-Deckglas bildete die Basis der Messkammer (Abb. MM 5). Dieses saß mittig auf der konzentrischen, runden Öffnung einer Stahlscheibe (\varnothing 11 mm) und wurde mittels eines Teflonringes, welcher gleichzeitig der Außenwand der Messkammer entsprach, auf der Scheibe befestigt. An zwei gegenüberliegenden Seiten der Messkammer befanden sich Anschlüsse für Zu- bzw. Abfluss von Messpuffer, um die auf dem Deckglas adhärenen Zellen zu superfundieren.

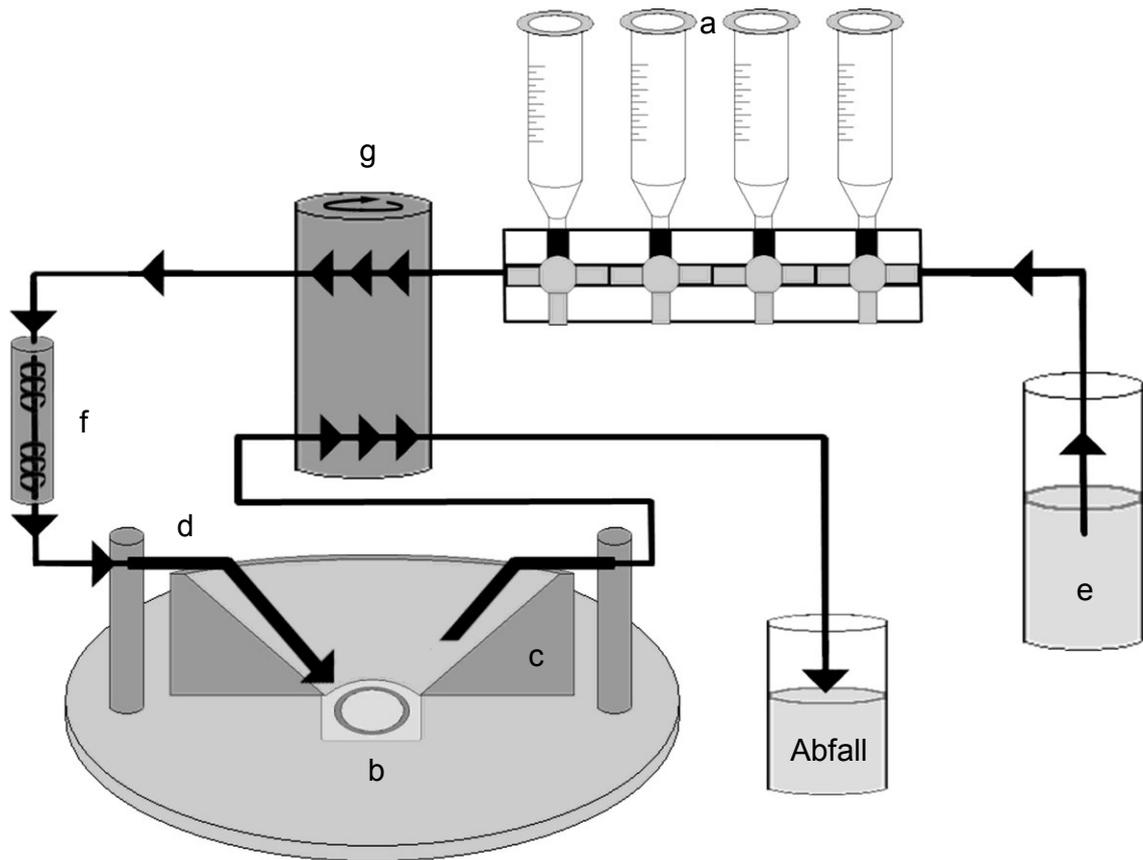


Abb. MM 5 : Schematischer Aufbau des Superfusions-Systems zur Stimulation der neuroglialen Zellen der ARC-angereicherten Primärkultur.

Für die Charakterisierung der in den Zellen exprimierten P2X-Rezeptoren wurden spezifische P2-Agonisten bzw. -Antagonisten über eine Drei-Wege Hahnenbank (a) im Schlauchsystem direkt in die Messkammer, bestehend aus CELL-VU-Deckglas (b) und Teflonring (c), eingeleitet. Zur Temperierung des Messpuffers wurde zwischen der Messpuffer-zuführenden Kanüle (d) und dem Puffer-Reservoir (e) ein elektronisch regulierbares Heizelement (f) geschaltet. Mit Hilfe der Schlauchpumpe (g) und des Heizelementes wurde eine gleich bleibende Füllung der Messkammer von 1,0 ml, und eine stabile Temperatur ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) in der Kammer bei kontinuierlichem Pufferwechsel ermöglicht.

Modifiziert nach Hatzelmann (2012).

Licht der Wellenlänge 340 bzw. 380 nm wurde alternierend mittels zweier entsprechender Filter eines rotierenden Filterrades und einer Quecksilberlampe auf die neurogliale Primärkultur eingestrahlt. Über eine Steuereinheit wurden das Filterrad und ein Shutter elektronisch reguliert. Diese Steuereinheit ermöglichte es somit, sowohl die Wellenlänge des erzeugten Lichtes, die Abstände zwischen den Belichtungen, als auch die Belichtungszeit zu regulieren. Das durch den Filter durchtretende, monochromatische Licht wurde über einen sich im Inversmikroskop befindenden, dichromatischen Spiegel und durch ein Fluoreszenzobjektiv in die Messkammer geleitet, wo es das in den Zellen vorhandene Fura-2 zur Lichtemission anregte. Aus der Messkammer wurde das von

Fura-2 emittierte Licht wiederum zurück durch das Fluoreszenzobjektiv, über einen 515 nm-Sperrfilter und über den dichromatischen Spiegel in eine 14-bit-CCD-Restlichtkamera gelenkt. Mit Hilfe der systemeigenen Metafluor-Software konnten die daraus resultierenden Werten dokumentiert und die Fluoreszenz-Ratiowerte (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW) gebildet werden.

2.5.4. Vorbereitung der Versuchsdurchführung

Die neuroglialen Zellen der ARC-angereicherten Primärkultur wurden jeweils drei bis vier Tage nach der Zellpräparation für die Ratio-Imaging Versuche verwendet. Für die pharmakologische Charakterisierung der in den neuroglialen Zellen funktionell exprimierten purinergen P2X-Rezeptoren wurden die zu untersuchenden Zellen im Dunkeln mit 2 μ M Fura-2 AM (Stocklösung 1 mM in DMSO) in Neurobasal-A Medium (1:500 verdünnt) bei 37°C und 5 % CO₂ für 45 min im Brutschrank inkubiert. Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden unmittelbar vor dem Versuchsbeginn in das Messsystem verbracht. Zunächst wurde das CELL-VU-Glas mit den adhären Zellen von der flexiPerm-Kammerwand gelöst und in die Messkammer eingespannt, dessen Basis es dann bildete. Nachdem Einsetzen der Messkammer in eine hierfür vorgesehene Öffnung des Objektisches am Inversmikroskop wurde der Zu- und Ablauf einer Schlauchpumpe mittels zweier gebogener Kanülen an der Kammer fixiert. Über die Kanülen wurde Messpuffer mit einer konstanten Flussrate von 2 ml / min eingeleitet bzw. abgesaugt.

Für die Charakterisierung der in den Zellen exprimierten P2X-Rezeptoren konnten die spezifischen P2-Agonisten bzw. -Antagonisten über eine Drei-Wege Hahnenbank im Schlauchsystem direkt in die Messkammer eingeleitet werden. Um den Messpuffer dem Messprotokoll entsprechend zu temperieren, wurde zwischen die Messpuffer zuführende Kanüle und das Puffer-Reservoir ein elektronisch regulierbares Peltier-Element geschaltet. Mit Hilfe der Schlauchpumpe und des Heizelementes konnten eine gleich bleibende Füllung der Messkammer von 1,0 ml und eine stabile Temperatur ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) in der Kammer bei kontinuierlichem Pufferwechsel und minimaler Bildung von Turbulenzen gewährleistet werden (Ott et al., 2010, 2012).

2.5.5. Versuchsdurchführung

Jeder der zwölf experimentellen Versuchsansätze (*Kap. MM 2.5.6*) wurde an Zellkammern mit neuroglialen Zellen aus mehreren Zellpräparationen durchgeführt. Dies ermöglichte die Untersuchung von Neuronen, Astrozyten und teilweise auch Mikrogliazellen aus den isolierten ARC-Proben neonataler Ratten verschiedene Würfe und minimierte

Einflüsse einer einzelnen Zellpräparation auf die Resultate. Vor Versuchsbeginn wurde die erfolgreiche Fura-2 Beladung der Zellen am Inversmikroskop überprüft und ein zur Messung geeigneter Bereich auf dem CELL-VU-Glas mit vorrangig vereinzelt liegenden Zellen eingestellt, um mögliche indirekte Stimulationen oder Hemmungen einzelner Neurone bzw. Astrozyten auf Grund einer direkten Zellinteraktion während der Superfusionsstimulation zu minimieren. Danach wurden mittels Metamorph-Software die zu messenden Zellsomata als "*regions of interests*" (ROIs) markiert und fortlaufend nummeriert, sodass den entsprechenden Zellen die ermittelten Fluoreszenz-Ratio-Werte direkt für die Datenauswertung zugeordnet wurden. Während des gesamten Versuchs speicherte das Programm Metamorph die Fluoreszenz-Ratio-Werte in einem Excel-Datenblatt, welches zur Auswertung herangezogen wurde.

Zu Beginn der Messung wurde während einer 5 - 10 minütigen Messpuffer-Superfusion nicht zellulär aufgenommenes Fura-2 AM entfernt. Dies äußerte sich im 340 / 380 nm Ratio-Graph in einer konstanten Basislinie der Fluoreszenz-Ratiowerte für die einzelnen ROIs. Im Anschluss an diese Äquilibrationsphase wurde mit dem entsprechenden Messprotokoll begonnen. Am Ende jedes Protokolls wurde ein dreiminütiger Vitalitätstest mittels Superfusion mit kaliumreichem Ca^{2+} -Imaging Messpuffer zur besseren Unterscheidung von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen ausgeführt. Bei vitalen Neuronen führt KCl zur Depolarisation und damit unter anderem zum Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellulärraum.

2.5.6. Messprotokolle für die Kalzium Ratio-Imaging Technik

Zur Charakterisierung der ionotropen purinergen Rezeptoren (P2XR) in der neuroglialen ARC-Primärkultur wurden für die einzelnen Experimentalstudien mittels Ca^{2+} -Ratio-Imaging Methode verschiedene Messprotokolle verwendet, die im Folgenden erläutert werden. Die Ermittlung der Fluoreszenz Ratio-Werte aller ROIs erfolgte bei einer Frequenz von 0,15 - 0,33 Hz, und bei Belichtungszeiten von jeweils 70 msec (bei 340 nm) bzw. 35 msec (bei 380 nm). Die zur Charakterisierung der P2X-Purinozeptoren eingesetzten Agonisten bzw. Antagonisten wurden als Aliquots auf Trockeneis gelagert und unmittelbar vor der Applikation aufgetaut, um eine Degradation derselben zu minimieren. Die erwünschte Endkonzentration wurde durch Verdünnung mit temperiertem Messpuffer erreicht. Durch Betätigen der entsprechenden Drei-Wege-Hähne einer Hahnenbank (Abb. MM 5) wurde von reinem Messpuffer als Superfusat (2 ml / min) auf substanzhaltigen Puffer umgeschaltet und dieser in die Messkammer geleitet.

2.5.6.1. Vergleichende Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit den Purinozeptoragonisten ATP, 2-MeSATP, α,β -meATP und BzATP

Ziel dieser Teilstudie war es zu untersuchen, ob Neurone, Astrozyten und partiell auch Mikrogliazellen der ARC-angereicherten Primärkultur auf die transiente Superfusionsstimulation mit den Purinozeptoragonisten Adenosin-5'-triphosphat (ATP) sowie seinen Analoga 2-Methylthioadenosin-5'-triphosphat (2-MeSATP) und α,β -Methylenadenosin-5'-triphosphat (α,β -meATP) bei Raumtemperatur (25°C) ein differentielles Aktivierungsmuster zeigen. ATP und 2-MeSATP repräsentieren generelle P2X-Rezeptoragonisten, bei reduzierter enzymatischer Hydrolyse des 2-MeSATP, wohingegen α,β -meATP als relativ spezifischer P2X₁R- und P2X₃R Agonist gilt (Bianchi et al., 1999; Burgard et al. 1999; Valera et al., 1994).

Nach einer achtminütigen Äquilibrierungsphase mit Ca²⁺-Imaging Messpuffer wurden die Zellen in randomisierter Reihenfolge für jeweils drei min mit einem der genannten Agonisten in einer äquimolaren Endkonzentration von jeweils 10⁻⁶ M in Messpuffer superfundiert. Vor der nachfolgenden Stimulationsperiode erfolgte eine jeweils achtminütige Auswasch- bzw. Regenerationsphase mittels reiner Messpuffer-Superfusion. Für die Durchführung eines Vitalitätstests am Ende des Versuches wurden die Zellen nach einer letzten achtminütigen Regenerationsphase der Superfusion mit kaliumreichem (50 mM KCl) Messpuffer und einem finalen Auswaschschritt (6 min) unterzogen (*Abb. MM 6*).

Für die Charakterisierung der funktionellen Rezeptorsubtypen P2X₁ und P2X₇ wurde der spezifische Agonist 2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin 5'-triphosphat (BzATP) eingesetzt (Chessell et al., 1997; Hibell et al., 2000; Rassendren et al., 1997). Um das Antwortverhalten einzelner Zellen der ARC-Primärkultur einerseits vergleichend für 2-MeATP und BzATP in äquimolarer Endkonzentration zu charakterisieren, und andererseits die für die Ratte regulierte Körperkerntemperatur nachzuahmen (*Kap. MM 2.5.6.5*), wurden mehrere neurogliale Zellen jeweils eines "wells" mit den in Messpuffer (36,0 ± 0,3°C) suspendierten Agonisten in alternierender Reihenfolge bei Endkonzentrationen von 10⁻⁷ M sowie nachfolgend 10⁻⁶ M superfundiert. Das Messprotokoll wurde dabei dem in *Abb. MM 6* dargestellten angeglichen, mit jeweils dreiminütigen Applikationsphasen (Stimulus I - IV) und achtminütigen Auswasch- bzw. Regerationsphasen sowie einem finalen Vitalitätstest mit kaliumreichem Messpuffer.

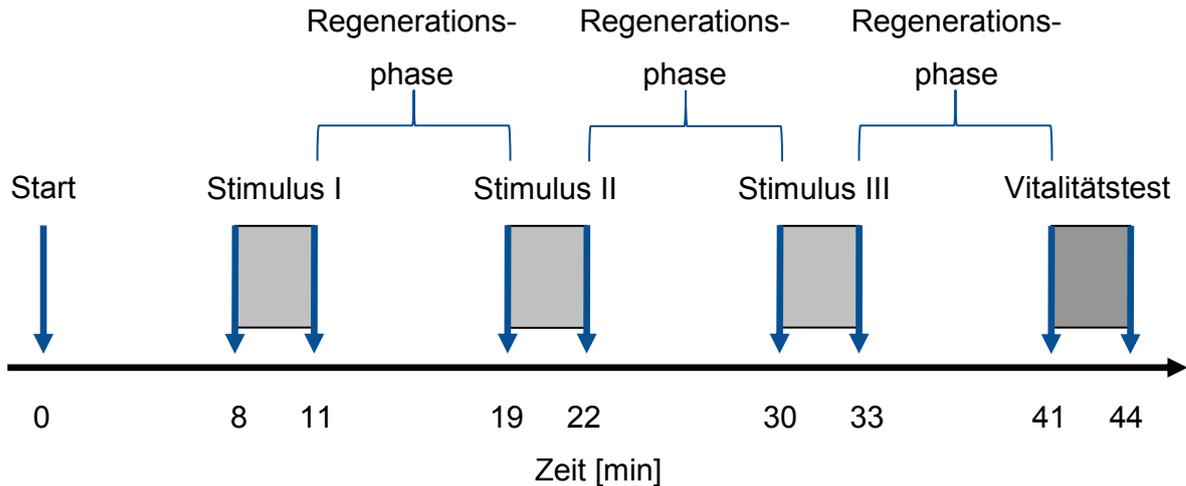


Abb. MM 6 : Graphische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Kalzium Ratio-Imaging Messprotokolls der vergleichenden Superfusionsstimulation in Zellen der ARC-Primärkultur mit verschiedenen P2XR Agonisten bei RT.

Schematisches Messprotokoll zur kontinuierlichen Erfassung der 340 / 380 nm Fluoreszenz-Ratiowerte mehrerer Zellen (Neurone, Astrozyten, Mikrogliazellen) eines "wells" während der alternierenden Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur für jeweils drei min mit den P2XR Agonisten ATP, 2-MeSATP bzw. α,β -meATP in einer Endkonzentration von jeweils 10^{-6} M (Stimulus I bis III) bei 25°C . Auf jede Stimulationsperiode folgte eine achtminütige Regenerations- bzw. Auswaschphase. Am Ende des Versuches diente die Superfusionsstimulation mit kaliumreichem (50 mM) Ca^{2+} -Imaging Messpuffer als Vitalitätstest vorrangig für Neurone, mit abschließender sechsminütiger Auswaschphase.

2.5.6.2. Vergleichende Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen den Purinozeptoragonisten ATP, 2-MeSATP und α,β -meATP

Zur vergleichenden Untersuchung einer jeweils dosisabhängigen, kalziumvermittelten Signaltransduktion in Zellen der angereicherten ARC-Primärkultur, ausgelöst durch die Purinozeptoragonisten ATP, 2-MeSATP und α,β -meATP, wurden diese gemäß des in *Abb. MM 6* dargestellten Schemas in jeweils sequentiell aufsteigender Konzentration (10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M) eingesetzt (= Stimulus I – III). Jeder Versuch mit einem der Agonisten wurde dabei an mehreren neuroglialen Zellen jeweils eines "wells" bei Raumtemperatur (RT; 25°C) durchgeführt. Sowohl die Dauer der jeweiligen Superfusionsperioden mit agonistenhaltigem Messpuffer als auch die Länge der nachfolgenden Auswasch- resp. Regenerationsphasen mit Ca^{2+} -Imaging Messpuffer wurden analog zu dem in *Abb. MM 6* dargestellten schematischen Messprotokoll gewählt, inkl. des finalen Vitalitätstests mit kaliumreichem Messpuffer.

2.5.6.3. Repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit ATP, 2-MeSATP und α,β -meATP in äquimolaren Konzentrationen

Um mögliche Desensibilisierungs-Phänomene der durch P2X-Agonisten induzierten Änderungen der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration in Neuronen und Astrozyten der angereicherten ARC-Primärkultur zu erfassen, wurde das in *Abb. MM 6* skizzierte Versuchsprotokoll einer repetitiven Superfusionsstimulation mit je einem Agonisten angepasst. Diese Teilstudien sollten außerdem als Vorversuche für die nachfolgende, detaillierte pharmakologische Charakterisierung der beteiligten P2X-Purinozeptoren durch den Einsatz Subtyp-spezifischer Antagonisten dienen. Der Versuchsablauf entsprach dem in *Kap. MM 2.5.6.1* dargestellten Messprotokoll, und die Zellen eines "wells" wurden dabei dreimal repetitiv (Stimulus I - III) mit ATP bzw. 2-MeSATP oder α,β -meATP in einer äquimolaren Endkonzentration von 10^{-6} M bei RT superfundiert einschließlich des finalen Vitalitätstests mit kaliumreichem Messpuffer.

Für alle nachfolgenden Versuchsserien (*Kap. MM 2.5.6.4. bis 2.5.6.7*) wurde nur noch 2-MeSATP als purinerge Rezeptoragonist verwendet, da das 2-Thioalkyl-Derivat des ATP als relativ hydrolyseresistentes Analog des ATP bei nahezu identischer dreidimensionaler Struktur angesehen wird (Chessell et al., 1997; Gomez-Villafuertes et al., 2000; Hibell et al., 2000; Rassendren et al. 1997; Zimmermann, 2006). Da alle weiteren Studien ab *Kap. MM 2.5.6.6* zudem bei einer Messpuffer-Temperatur von $36,0 \pm 0,3$ °C erfolgten, wurde kongruent zu den eben skizzierten Experimenten mit repetitiver Superfusionsstimulation bei RT lediglich für 2-MeSATP eine weitere Versuchsreihe mit dreimaliger Wiederholung in einer Konzentration von 10^{-6} M aufgezeichnet.

2.5.6.4. Repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP bei RT: Herkunft des Kalziums

Durch die alternierende Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP (10^{-6} M) in An- bzw. Abwesenheit an extrazellulärem Kalzium sollte ermittelt werden, ob die stimulationsbedingte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, gemessen als Anstieg der ermittelten Fluoreszenz-Ratio nach Anregung bei 340 respektive 380 nm für Fura-2, lediglich aus dem extrazellulären Raum oder teilweise auch aus intrazellulären Speichern (endoplasmatisches *Reticulum*, Mitochondrien) stammt. Dazu wurde zunächst das Antwortverhalten der untersuchten Zellen auf Stimulation mit 2-MeSATP allein untersucht (Stimulus I, *Abb. MM 7*). Nach einer achtminütigen Auswasch- resp. Regenerationsphase erfolgte eine fünfminütige Superfusion mit kalziumfreiem, EGTA-haltigen Messpuffer. Nachfolgend wurden die neuroglialen Primärzellen eines "wells" erneut für drei min mit

2-MeSATP (10^{-6} M) unter weiterhin kalziumfreien Bedingungen stimuliert (Stimulus II). Im sofortigen Anschluss wurde kalziumfreier wieder durch kalziumhaltigen Messpuffer ersetzt. Nach einer Äquilibrationsphase (8 min) wurden die Zellen ein weiteres Mal mit 2-MeSATP (10^{-6} M) superfundiert (Stimulus III), um einen Vergleich der gemessenen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zu den alternierenden Superfusionsstimulationen zu ermöglichen und eine Desensibilisierung der Zellen auszuschließen.

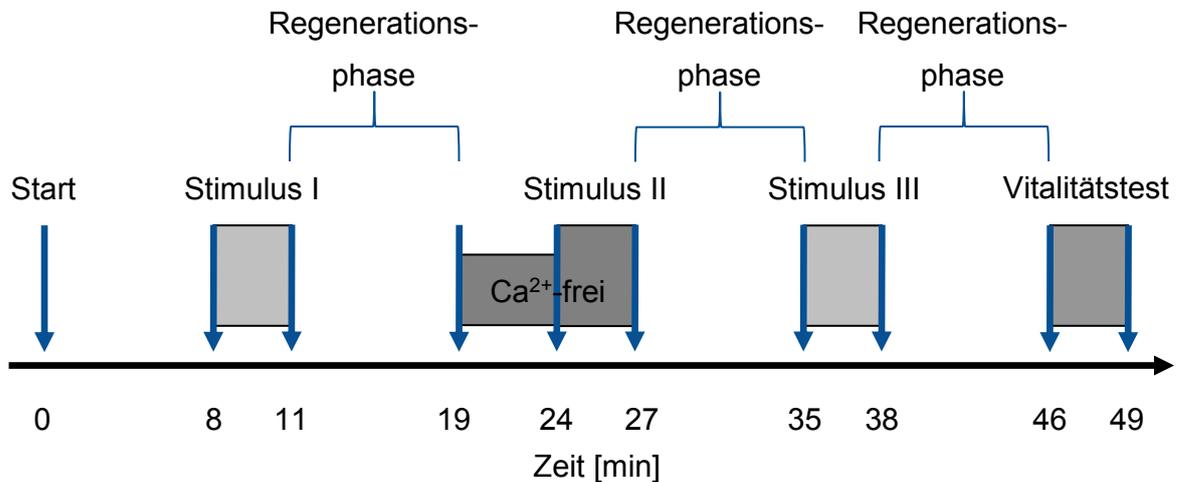


Abb. MM 7 : Graphische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Kalzium Ratio-Imaging Messprotokolls bei repetitiver, 2-MeSATP-induzierter Stimulation der Zellen der ARC-Primärkultur in An- bzw. Abwesenheit an extrazellulärem Kalzium.

Schematisches Messprotokoll zur kontinuierlichen Erfassung der 340 / 380 nm Fluoreszenz-Ratowerte mehrerer Zellen (Neurone, Astrozyten) eines "wells" während der repetitiven Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur für jeweils drei min mit dem P2XR Agonisten 2-MeSATP in einer Endkonzentration von jeweils 10^{-6} M (Stimulus I bis III) bei $25^{\circ}C$. Vor und während der Stimulationsperiode II erfolgte ein fünfminütiger Austausch des kalziumhaltigen Messpuffers im Superfusat gegen EGTA-haltigen, kalziumfreien Messpuffer. Auf jede Stimulationsperiode folgte eine achtminütige Regenerations- bzw. Auswaschphase. Am Ende des Versuches diente die Superfusionsstimulation mit kaliumreichem (50 mM) Ca^{2+} -Imaging Messpuffer als Vitalitätstest vorrangig für Neurone, mit abschließender sechsminütiger Auswaschphase.

2.5.6.5. Vergleichende repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP: Temperaturabhängigkeit

Bis *dato* wurden mehrere Kalzium Ratio-Imaging Studien an Primärkulturen hypothalamischer bzw. medullärer Kerngebiete früh-postnataler Ratten von der Arbeitsgruppe Gerstberger veröffentlicht, die durchweg - wie im international Vergleich üblich - bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt wurden (Gebke et al., 2000; Hatzelmann, 2013; Jurzak et al., 1995; Kopp et al., 1999; 2001; Ott et al., 2010; 1012; Wuchert et al., 2008; 2009). Um die *in vivo* Situation im Rahmen der *in vitro* Untersuchungen besser nachzuahmen, sollten daher alle weiteren in der vorliegenden Arbeit geplanten Experimente im Bereich der

Körperkerntemperatur der Ratte ausgeführt werden. Mit Hilfe eines Peltier-Elementes wurde daher der Messpuffer unmittelbar vor Eintritt in die Messkammer vorgewärmt, sodass im Zentrum der Kammer nachweislich eine Temperatur von 36,0°C (nahe der Körpertemperatur) innerhalb enger Grenzen (\pm °C) konstant gehalten werden konnte.

Ein "cluster" vereinzelt liegender Neurone, Astrozyten und begrenzt auch Mikrogliazellen pro "well" wurde repetitiv (dreimal) mit 2-MeSATP (10^{-6} M) superfusionsstimuliert, wobei folgende Variationen durchgespielt wurden : KT - RT - KT bzw. RT - KT - RT. Dabei wurde der Messpuffer während der ersten Äquilibrationsphase (10 min) auf derjenigen Temperatur gehalten, in welcher auch der Superfusionsstimulation I durchgeführt wurde. Alle weiteren Auswasch- resp. Regenerations- resp. Äquilibrationsphasen dauerten 10 min, wobei die vollständige Änderung der Messpuffertemperatur nach jeweils zwei min erreicht worden war.

2.5.6.6. Modulation der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{ij}$ in Zellen der ARC-Primärkultur durch generalisierte P2-Purinozeptorantagonisten

In dieser Teilstudie wurde die Modulation der durch 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{ij}$ in Zellen der ARC-Primärkultur durch die generalisierten P2X / P2Y Purinozeptorantagonisten PPADS und Suramin sowie Reactive blue-2 (Rb-2) bei einer Kammer-temperatur von $36 \pm 0,3^\circ\text{C}$ untersucht. Gemäß des in *Abb. MM 8* dargestellten schematischen Messprotokolls wurde ein "cluster" freiliegender Zellen pro "well" der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP (10^{-7} M) (Stimulus I), dem jeweiligen Purinozeptorantagonist (Stimulus II), dem Antagonist und 2-MeSATP (10^{-7} M) gemeinsam (Stimulus III), sowie abschließend wieder mit 2-MeSATP (10^{-7} M) (Stimulus IV) sequentiell superfusionsstimuliert. Sowohl die Dauer der jeweiligen Superfusionsperioden der Zellen mit agonisten- / antagonistenhaltigem Messpuffer als auch die Länge der Auswasch- resp. Regenerationsphasen mit Messpuffer wurden analog zur unter *Kap. MM 2.5.6.5* beschriebenen Superfusion mit 2-MeSATP gewählt. Die generellen P2R Antagonisten PPADS und Suramin wurden in finalen Konzentrationen von 10^{-5} M und 10^{-4} M, der für P2X₂R sowie mehrere P2YR-Subtypen selektive Antagonist Rb-2 in Endkonzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-5} M eingesetzt (*Abb. MM 8*).

2.5.6.7. Modulation der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{ij}$ in Zellen der ARC-Primärkultur durch P2X-Rezeptorsubtyp-spezifische Antagonisten

Das in *Abb. MM 8* dargestellte und in *Kap. MM 2.5.6.6* beschriebene, schematische Messprotokoll war ebenfalls Grundlage der Experimente mit den Subtyp-spezifischen

P2X-Purinozeptorantagonisten PSB1011 und TNP-ATP. Der P2X₂ Subtyp-spezifische Antagonist PSB1011 (Baqi et al., 2011) wurde dabei in einer Endkonzentration von 10⁻⁵ M verwendet, wohingegen der P2X₁, P2X_{2/3} und P2X₃ Subtyp-spezifische Antagonist TNP-ATP (Lewis et al., 1998; Nunes et al., 2012; Thomas et al., 1998; Virginio et al. 1998) in Endkonzentrationen von 10⁻⁷ M bzw. 10⁻⁵ M zum Einsatz kam.

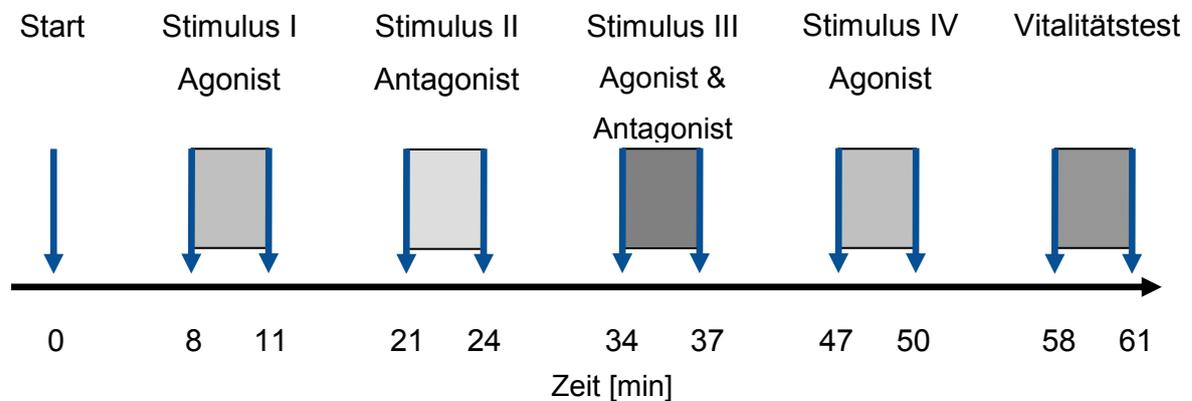


Abb. MM 8 : Graphische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Kalzium Ratio-Imaging Messprotokolls bei 2-MeSATP-induzierter Stimulation der Zellen der ARC-Primärkultur in An- bzw. Abwesenheit von Purinozeptorantagonisten

Schematisches Messprotokoll zur kontinuierlichen Erfassung der 340 / 380 nm Fluoreszenz-Ratiowerte mehrerer Zellen (Neurone, Astrozyten, Mikrogliazellen) eines "wells" während der repetitiven Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur für jeweils drei min mit dem P2XR Agonisten 2-MeSATP in einer Endkonzentration von jeweils 10⁻⁷ M (Stimulus I und IV) bei 36,0°C. Während der Stimulationsperiode II erfolgte die Superfusion mit dem jeweiligen P2R Antagonist alleine, und Stimulationsperiode III repräsentierte eine Ko-Applikation von 2-MeSATP und dem jeweiligen Antagonist in derselben Konzentration wie zuvor. Auf jede Stimulationsperiode folgte eine achtminütige Regenerations- bzw. Auswaschphase. Am Ende des Versuches diente die Superfusionsstimulation mit kaliumreichem (50 mM) Ca²⁺-Imaging Messpuffer als Vitalitätstest vorrangig für Neurone, mit abschließender sechsminütiger Auswaschphase.

2.5.7. Datenevaluierung und Statistik

Mit Hilfe eines computergestützten Messsystems konnten die anregungswellenabhängigen Intensitätsänderungen der Fura-2-spezifischen Fluoreszenzsignale durch Kalziumbindung von mehreren ROIs zeitabhängig mit einer Frequenz von 0,15 - 0,33 Hz kontinuierlich erfasst und gespeichert werden. Der Quotient der digitalisierten Fluoreszenzintensitäten wurde von der Metamorph-Software in Excel-Datenblättern für jede erfasste Zelle registriert. Nach jeder Superfusionsstimulationsperiode wurde die maximale, absolute Änderung der Fluoreszenz-Ratio als Reaktion der Zelle gewertet und in Bezug zu den zuvor aufgezeichneten Basiswerten ermittelt. Die 340 / 380 nm Ratiowerte jeder einzelnen Zellen wurden zeitabhängig digital in einem Koordinatensystem dargestellt. Für die Auswertungen wurden lediglich Zellen herangezogen, deren Fura-2 Ratio-Werte

und somit intrazelluläre Kalziumkonzentration unter Kontrollbedingungen eine stabile Basislinie zeigten. Zellen, die während der Messung etwa einen ausgeprägten, kontinuierlichen Anstieg der Basislinie aufwiesen oder deren Ratio-Werte nach einer Stimulation nicht mehr zu einer stabilen Basislinie zurückkehrten, wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Zur eindeutigen Differenzierung zwischen methodenbedingtem, spektrofluorimetrischem Hintergrundrauschen und Stimulations-induzierten marginalen Kalziumantworten wurde eine Δ Ratio-Erhöhung von $\geq 0,05$ zur Basislinie als Schwellenwert für ein eindeutiges Kalziumsignal gesetzt. Zusätzlich zu diesen Ausschlusskriterien wurde Zellen von der statistischen Analyse, nicht jedoch der gesamten Datenevaluierung, ausgeschlossen, die innerhalb eines Messprotokolls mit repetitiven Superfusionsstimulationen etwa mit 2-MeSATP auf den ersten Stimulus eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zeigten, jedoch keine Responsivität auf die letzte Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP aufwiesen. Darüber hinaus wurden Zellen aus der Datenevaluierung ausgeschlossen, die durch den post-experimentellen, immunzytochemischen Nachweis (*Kap. MM 2.6.4*) nicht eindeutig einem Zelltyp zugeordnet werden konnten.

Alle gemessenen Werte wurden gespeichert und zur Bearbeitung und graphischen Darstellung in das Programm Graph Pad Prism® (Version 5.0) exportiert. Für jeden der applizierten Purinozeptoragonisten oder -antagonisten, bzw. für jede Änderung physiologischer Parameter (Temperatur, extrazelluläres Kalzium) wurde prozentual ermittelt, wieviele der jeweils untersuchten Zellen (Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen) hinsichtlich ihrer $[Ca^{2+}]_i$ moduliert werden konnten. Für diese "responsiven" Zellen wurden die jeweils arithmetischen Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.) der Ratio-Änderung für alle Stimulationsperioden eines Messprotokolls ermittelt. Die Daten wurden mit Hilfe von Graph Pad Prism® in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Ebenfalls mittels der Graph Pad Prism®-Software wurden die statistischen Analysen der Ratio-Änderungen innerhalb eines Messprotokolls durchgeführt. Dabei wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) in Kombination mit dem Kruskal-Wallis-Test als nichtparametrisches Verfahren und dem Dunn's Post-hoc Test zur statistischen Signifikanzanalyse verwendet. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratio-Änderungen (Δ Ratio) bei einzelnen Teilstudien wurden auf folgende Signifikanzniveaus getestet: $p \leq 0,05$ (# / * / \$), $p \leq 0,01$ (## / ** / \$\$) oder $p \leq 0,001$ (### / *** / \$\$\$).

2.6. Immunzytochemie / Immunhistochemie

2.6.1. Material

Ge - und Verbrauch

| Bezeichnung: | Modell: | Hersteller: |
|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Deckgläschen | 15 x 15 mm und 24 x 60 mm; Stärke 1 | Menzel GmbH, D-Braunschweig |
| Einmalpasteurpipetten | 3 ml | MAGV, D-Rabenau |
| Einwegkanülen | Sterican® 0,45 x 12 mm | Braun Melsungen AG, D-Melsungen |
| Einwegspritzen | 1 ml | BD Plastipak, Becton-Dickinson, D-Heidelberg |
| Faltenfilter | Typ 604; ½ (Ø 240 mm) | Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel |
| Fettstift | Pap-Pen | G. Kisker, D-Steinfurt |
| Glasschale (free floating) | 500 ml | MAGV, D- Rabenau |
| Inkubationskästen mit Deckel | 20 x 30 x 5 cm | Biochem Instrumente GmbH, D-Weilburg |
| Klebeband | Silkafix® 2,5 cm x 9,2 m | Lohmann Rauscher International GmbH & Co.KG, D-Rengsdorf |
| Multi-Dishplatten | 8-fach | Nalge Nunc International, Pennfield, NY, USA |
| Multi-Wellplatten | 12-fach | Greiner-Bio One GmbH, D-Frickenhausen |
| Objektträger | 76 x 26 mm | Menzel GmbH, D-Braunschweig |
| Objektträgermappen | für 20 Objektträger | LAT-Labor- und Analysen-Technik GmbH, D-Garbsen |
| Parafilm® | | Roth GmbH, D-Karlsruhe |
| Pinsel | Rotmarderhaar | Renensis, D-Flensburg |
| Reaktionsgefäße | 0,5; 1,5; 2 und 5 ml | Eppendorf AG, D-Hamburg |
| serologische Pipetten | 1, 5, 10 und 25 ml | Sarstedt, D-Nümbrecht |
| Siebeinsätze für Multi-Wellplatten | | Corning Incorporated, Corning, NY, USA |
| Zentrifugenröhrchen, steril | 15 und 50 ml | Sarstedt, D-Nümbrecht |

Chemikalien

| Bezeichnung: | Hersteller: |
|---|---------------------------|
| 4'6 - Diamidin - 2-Phenylindol Dilaktat (DAPI; Anregungswellenlänge 359 nm) | MoBiTec, D-Göttingen |
| Chromalaun | Merk, D-Darmstadt |
| Citifluor® (Glycerin in PBS - Lösung) | Cityfluor LTD, London, UK |
| D(+) Saccharose | Roth GmbH, D-Karlsruhe |
| Di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat (Na ₂ HPO ₄) | Merk, D-Darmstadt |
| Ethanol, unvergällt | Merk, D-Darmstadt |
| Ethanol, vergällt | Schmidt, D-Dillenburg |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| Fetales Kälberserum (FKS) | PAA, Pasching, Österreich |
| Gelatine | Serva, D-Heidelberg |
| Immersionsöl (Refraktionsindex 1,51) | Olympus Optical, D-Hamburg |
| Kalibrierlösung für pH-Meter: Technischer Puffer pH 4,01; 7,00 und 10,01 | Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, D-Weilheim |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merk, D-Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (NaH ₂ PO ₄) | Merk, D-Darmstadt |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Normal Donkey Serum (NDS) | PAA, Pasching, Österreich |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merk, D-Darmstadt |
| Phosphate-Buffered Saline Tablets (PBS) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Poly-L-Lysin | Biochrom, D-Berlin |
| Tissue Freezing Medium® | Leica Instruments GmbH, D-Nussloch |
| Triton-X-100 (t-Octylphenoxyethyl-Ethoxyethanol) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

Lösungen und Puffer

| Bezeichnung: | Zusammensetzung/Herstellung: |
|--|--|
| 0,2 M Na ₂ HPO ₄ - Lösung (Stocklösung A) | 27,6 g Na ₂ HPO ₄ (137,99 g / mol) in 1 l <i>Aqua bidest.</i> |
| 0,2 M NaH ₂ PO ₄ - Lösung (Stocklösung B) | 35,6g NaH ₂ PO ₄ (177,9 g / mol) in 1 l <i>Aqua bidest.</i> |
| 20 % Saccharose – Lösung | 20 % Saccharose in PBS |
| DAPI – Inkubationslösung | DAPI 1:1000 in PBS |
| Inkubationspuffer für Immunzytochemie (mit Triton-X) (Block - Lösung) | 10 % FKS in PBST |
| Inkubationspuffer für Immunzytochemie (ohne Triton-X) (Block – Lösung) | 10 % FKS in PBS |
| Inkubationspuffer für Immunhistochemie (Block – Lösung) | 10 % NDS in PBS; Zugabe von 0,3 % - Triton-X-100 |
| Paraformaldehyd - Lösung (PFA); 4 % | Ansatz von PFA (Pulverform) in PBS, unter Rühren bei max. 60°C; Filtration mit Faltenfilter (Ø 240 mm); auf Eis abkühlen |
| PBS (Phosphatpuffer), pH 7,4; 0,1 M | 28 % Stocklösung A + 72 % Stocklösung B in <i>Aqua bidest.</i> Verdünnen |
| PBS (instant), pH 7,4 | Ansatz aus PBS tablets in <i>Aqua bidest.</i> (1 Tablette / 200 ml) |
| PBST (für Immunzytochemie), pH 7,4 | PBS (instant) unter Zugabe von 0,05 % Triton-X-100 |
| Physiologische NaCl - Lösung, 0,9 % | 0,9 % NaCl in <i>Aqua bidest.</i> |

Medikamente

| Bezeichnung: | Wirkstoff: | Hersteller: |
|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Narkoren® | Pentobarbital – Natrium | Merial, D-Hallbergmos |

2.6.2. Grundlagen der Methode

Die Grundlage der Immunhisto- bzw. Immunzytochemie beruht auf der Interaktion von Paratopen spezifischer Antikörper (AK) mit bestimmten Epitopen des entsprechend vorbehandelten Gewebeschnitt bzw. in der Zellkultur zu detektierenden Antigens (Ag). Beruhend auf der komplexen Immunbiologie der Immunglobulin-bildenden Plasmazellen des adaptiven Immunsystems bildet ein gereifter B-Lymphozyt (= Plasmazelle) lediglich ein, in seiner F_{ab}-Komponente für eine bestimmte antigene Struktur spezifisches Immunglobulin der Klassen IgG, IgA oder etwa IgM (Köhler et al., 1976; Smith-Gill et al., 1982). Ak und Ag bilden einen Antigen-Antikörper Komplex hoher Affinität. Durch Verwendung Antigen-spezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper/-seren und nachfolgender "Sichtbarmachung" dieser Komplexe auf mikroskopischer Ebene können somit antigene Strukturen in/auf Zellen bzw. in Gewebeschnitten lokalisiert werden. Dazu erfolgt der Einsatz kommerzieller Sekundärantikörper, an deren F_c-Komponente entweder ein Enzym oder ein Fluorophor gekoppelt wurde (Harlow & Lane, 1988; Janeway et al., 1999).

Die für die vorliegende Arbeit eingesetzten Antikörper / -seren gehörten im Wesentlichen der IgG-Klasse an; alle polyklonalen AK waren durch Immunisierung von Kaninchen oder Ziegen (Primärantikörper) sowie Eseln (Sekundärantikörper) "erzeugt" worden (Harlow et al., 1988) und in den meisten Fällen kommerziellen Ursprungs (*Tab. MM 4*). Einige der gegen Neuropeptide gerichtete Immunseren stellen eine Gabe von Frau Prof. Dr. Blähser (Institut für Anatomie und Zellbiologie, FB 11 der JLU Giessen) dar. Die kommerziell erworbenen, monoklonalen Primärantikörper basieren sämtlich auf der Immunglobulin-Produktion muriner Hybridoma-Zelllinien (Janeway et al., 1999) (*Tab. MM 4*). Der Nachweis spezifischer Antigene sowohl in coronalen Gefrierschnitten des Rattengehirns als auch in Zellen der neuroglialen Primärkulturen des *Nucleus arcuatus* erfolgte durch die Methode der indirekten Immunfluoreszenz (Coons, 1958; Ott et al., 2010; 2013; Wuchert et al., 2008; 2009). In einem ersten Schritt wird ein spezifisch gegen das zu lokalisierende Antigen gerichteter Antikörper (Primärantikörper) verwendet. Danach wird ein zweiter, seinerseits mit einem Fluorophor gekoppelter Antikörper zur Detektion des Primärantikörpers eingesetzt; er bindet mit seinem F_{ab}-Fragment an das konservierte F_c-Fragment des Primärantikörpers. Die beiden Immunglobuline müssen aus zwei verschiedenen Tierspezies stammen. Durch Anregung des antikörpergebundenen Fluorophors mit Licht geeigneter Wellenlänge (300 - 550 nm) in einem mit den entsprechenden Anregungsfiltern ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop kommt es zur Lichtemission durch das Fluorophor im längerwelligen Bereich des sichtbaren Lichtspektrums (450 - 700 nm). Durch die Verwendung primärer AK aus unterschiedlichen Tierspezies und der Wahl geeigneter

Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Fluorophoren kann mit der indirekten Immunfluoreszenz die gleichzeitige Detektion mehrerer Antigene erfolgen (Doppel- und Dreifachmarkierung). Bei hoher Sensitivität des immunfluoreszenzmikroskopischen Antigen-nachweises besteht ein Nachteil der Methode darin, dass Fluorophore bei Anregung im UV-Bereich relativ schnell ausbleichen.

Zusätzlich zur sowohl im Gehirnschnitt als auch der ARC-Primärkultur vorrangig durchgeführten immunologischen Doppelmarkierung durch jeweils zwei verschiedene Primärantikörper wurden Kerne aller Zellen mit Hilfe des interkalierenden Fluorophors 4'6-Diamidin-2-Phenylindol Dilaktat (DAPI) markiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interagiert sowohl mit DNA als auch RNA, wobei sich die Emissionsintensitäten und -maxima des DNA- (461 nm) und RNA-gebundenen DAPI (500 nm) unterscheiden.

2.6.3. Verwendete Antikörper / -seren

Primärantikörper

Für die bezüglich der Fura-2 Ratio-Imaging Untersuchungen post-experimentelle Zuordnung der biophysikalisch analysierten Zellen der Primärkulturen zu bestimmten neuroglialen Zelltypen wurden immunzytochemische Doppelmarkierungen zum Nachweis von jeweils zwei verschiedenen Zellmarkerproteinen vorgenommen. Zur Darstellung von Neuronen wurden Primärantikörper eingesetzt, die entweder gegen das *microtubule associated protein 2* (MAP_{2a+2b}) oder die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) gerichtet waren. Die beiden für *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) spezifischen Antikörper / -seren markierten ein zytoplasmatisches Intermediärfilament in Astrozyten. Mikrogliazellen bzw. perivaskuläre Makrophagen ließen sich durch den gegen das Oberflächenprotein CD (*cluster of differentiation*) 68 gerichteten "ED1"-Antikörper detektieren, und Oligodendrozyten exprimieren das Enzym CNPase (*Tab. MM.4*).

Der ARC repräsentiert ein wichtiges hypothalamisches Kerngebiet für die neuroendokrine Kontrolle des HVL sowie im Rahmen der zentralen Homöostase des Energiehaushaltes und der Nahrungsaufnahme (*Kap.EIN 1.6*). Dabei spielen *inhibiting* und *releasing* Faktoren, klassische Neurotransmitter sowie zahlreiche Neuropeptide eine bedeutende Rolle als Neuromodulatoren. Unter anderem exprimieren ARC-Neurone nachweislich Dopamin (DA), Somatostatin (SOM), Neuropeptid Y (NPY), Produkte des POMC-Gens wie ACTH oder α -MSH, oder Neurotensin (NT), wie von zahlreichen Autoren bestätigt (Chronwall, 1985; Chronwall & Zukowska, 2004; Colldén et al., 2010; Cowley et al., 2003; Gruber & Callahan, 1989; Li & Pelletier, 1986; Maaloud & Meister, 2008). Zur Charakterisierung der zellulären Expression dieser ARC-spezifischen Neurotransmitter-

| Antigen: | Spezies | Verdünnung / Anteil Triton-X100 | Katalog-Nr. / Hersteller |
|------------------------|------------------|--|---|
| ACTH ₍₁₋₂₄₎ | rabbit | 1:1000 / 0,05 % | Serum, Gabe von Dr. Blähler (Justus-Liebig-Universität Giessen) |
| NPY | rabbit | 1:2000 / 0,05 % | T-4070; Bachem AG, Bubendorf, Schweiz |
| NT-1 | rabbit | 1:6000 / 0,05 % | Serum, Gabe von Dr. Blähler (Justus-Liebig-Universität Giessen) |
| SOM | rabbit | 1:8000; 0,05 % | Serum, Gabe von Dr. Blähler (Justus-Liebig-Universität Giessen) |
| TH | mouse | 1:2000; 0,05 % | MAB5280; Merck, D-Darmstadt |
| P2X ₁ R | rabbit | 1:1000 | AB5224; Merck, D-Darmstadt |
| P2X ₂ R | rabbit | 1:1000 | APR-003; alomone labs, Jerusalem, Israel |
| P2X ₃ R | rabbit | 1:1000; 0,05% | alomone labs, Jerusalem, Israel |
| P2X ₄ R | rabbit | 1:1000; 0,05 % | APR-002; alomone labs, Jerusalem, Israel |
| P2X ₅ R | rabbit | 1:1000 | Merck, D-Darmstadt |
| P2X ₇ R | rabbit | 1:1000 | Merck, D-Darmstadt |
| CNPase | mouse | 1:1000; 0,05 % | Cat. C-5922; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| ED1 (CD68) | mouse | 1:1500; 0,05 % | MCA341R; AbD seroTec, D-Düsseldorf |
| GFAP | rabbit; mouse | 1:1500; 0,05 % | Z0334; DakoCytomation, D-Eching |
| MAP _(2a+2b) | mouse | 1:1500; 0,05 % | M-1406; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| NSE | rabbit | 1:2000; 0,05 % | 16625; Polysciences Europe GmbH, D-Eppelheim |

Tab MM 4 : Liste der verwendeten Primärantikörper

| Fluorophor / Exzitationsmaximum | aus Spezies | gegen Spezies | Katalog-Nr. / Hersteller |
|--|--------------------|----------------------|--|
| Alexa Fluor® 488 (495 nm) | donkey IgG | mouse | AZA21202; MoBiTec, D-Göttingen |
| | | rabbit | AZA11055; MoBiTec, D-Göttingen |
| Cy TM 3 (550) | donkey IgG | rabbit | Cat. 711-165-152; Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA |
| Cy TM 3 (550) | goat IgG | mouse | Cat. 115-165-003; Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA |

Tab. MM 5 : Liste der verwendeten Sekundärantikörper

systeme in den Nervenzellen der ARC-Primärkultur, sowie als interne Kontrolle auch in Neuronen von Substrukturen des hypothalamischen ARC in Gefrierschnitten des Gehirns adulter Ratten, wurden die in *Tab. MM 4* aufgelisteten Primärantikörper eingesetzt. Die Markierung des adrenocorticotrophen Hormons (ACTH) bzw. dessen Vorläuferproteins Proopiomelanocortin (POMC) erfolgte mit Hilfe eines gegen die ersten 24 AS des ACTH gerichteten, polyklonalen Antiserums (Blähser, 1988). Zur Synthese von Dopamin befähigte Neurone wurden über den monoklonalen Nachweis des Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) identifiziert (Le Brun et al, 2008). Die ebenfalls in Neuronenpopulationen des ARC nachweislich exprimierten Neuropeptidhormone SOM (Tan et al., 2013) und Neurotensin (NT) (Alexander, 1999) ließen sich durch gut charakterisierte polyklonale Antisera aufzeigen (Blähser et al., 1978; Blähser & Dubois, 1980; Ramamoorthy & Whim, 2008). Sowohl im Gehirnschnitt adulter Ratten als auch in der ARC-Primärkultur erfolgte der immunhisto- bzw. zytochemische Nachweis der Expression verschiedener Purinozeptorsubtypen (*Tab. MM 4*).

Sekundärantikörper

Die mit den Fluorophoren CyTM3 (550) bzw. Alexa Fluor® 488 markierten Sekundärantikörper (*Tab. MM 5*) wurden sämtlich in einer Endkonzentration von 1:1000 im jeweiligen Inkubationspuffer angesetzt.

2.6.4. Immunzytochemische Charakterisierung der ARC-Primärkultur

2.6.4.1. Versuchsprotokoll

Die durch eine 15-min Inkubation mit frisch präpariertem 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixierten neuroglialen Zellen der ARC-Primärkulturen wurden direkt oder innerhalb von sieben Tagen (Lagerung im Dunkeln bei 4°C in PBS) nach der Fixierung dem immunzytochemischen Antigennachweis unterzogen. Zur Permeabilisierung der Zellen erfolgten alle Inkubationsschritte unter Zugabe von 0,05 % Triton-X-100 nach dem in *Tab. MM 6* aufgeführten Protokoll. Lediglich zur Markierung der P2XR wurde keine Inkubation mit Triton-X-100 durchgeführt. Die Inkubation der Block-Lösung diente der Absättigung unspezifischer Antigenstrukturen.

| Arbeitsschritt | Bedingungen / Vorgehen | Dauer |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| waschen | RT, mit PBS | 3 x 5 min |
| blocken | RT, mit Block-Lösung (10 % FKS) | 1 h |
| Inkubation I: Primärantikörper | 4°C, feuchte Kammer, in Block-Lösung | 36 - 48 h |

| | | |
|------------------------------------|--|-----------|
| waschen | RT, mit PBS-T | 3 x 5 min |
| Inkubation II: Sekundäntikörper | RT, feuchte Kammer, abgedunkelt, in Block-Lösung | 120 min |
| waschen | RT, mit PBS-T | 5 min |
| Inkubation III: DAPI- Lösung | RT, abgedunkelt | 8 min |
| waschen | RT, mit PBS-T | 3 x 5 min |
| deckeln | mit Citifluor auf Objektträger, Deckgläschen zuvor kurz in <i>Aqua bidest.</i> Dippen | |

Tab. MM 6: Protokoll der Immunzytochemie

2.6.4.2. Immunzytochemische Charakterisierung der in der ARC-Primärkultur vorhandenen neuroglialen Zelltypen

Zur Bestimmung der in der ARC-Primärkultur nachweisbaren Zelltypen wurden im Rahmen von Doppel- und Dreifachmarkierungen mittels Zelltyp-spezifischer Primäntikörper (MAP_{2a+b}, GFAP, ED1, CNPase) sowie der Kernfärbung mit DAPI (1) die absolute Anzahl und (2) der prozentuale Anteil an Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen in den "wells" der neuroglialen ARC-Primärkulturen ermittelt. Für die Auswertung wurden immunreaktive Zellen aus fünf Präparationen herangezogen. Pro Präparation und "well" wurden sieben rechteckige Zählfelder (Einzelfläche: ~0,28 mm²) auf einem Deckgläschen randomisiert ausgewählt und die immunreaktiven Zellen Zelltyp-spezifisch gezählt. Nach Zelltyp geordnet wurden pro "well" aus den sieben Zählfeldern die jeweils mittleren Zellzahlen (\pm S.E.M.) errechnet. Anschließend wurde die ermittelte Anzahl an Neuronen, Astrozyten oder Mikrogliazellen auf die Gesamtfläche der Primärkultur (28 mm²) extrapoliert. Dies ergab die Gesamtzellzahl für den jeweiligen Zelltyp pro "well" (Deckgläschen). Schließlich wurde aus den Gesamtzellzahlwerten aller fünf Präparationen (1) der finale Mittelwert für jeden Zelltyp und (2) der finale prozentuale Anteil jedes Zelltyps an der Gesamtzellzahl ermittelt (\pm S.E.M.).

Im Anschluss an die Ratio-Imaging Versuche wurden die hinsichtlich ihrer funktionellen Expression ionotroper Purinozeptoren charakterisierten ARC-Zellen ebenfalls mit 4 % PFA fixiert und durch den immunzytochemischen Nachweis Zell-spezifischer Markerproteine bestimmten Zelltypen zugeordnet. Mit Hilfe (1) eines auf dem CELL-VU-Gläschen eingezätzten Koordinatensystems, anhand dessen die genaue Position der untersuchten Zellen auf dem dokumentiert werden konnte, (2) eines digitalen Durchlichtbildes der Kultur sowie (3) der nachfolgenden immunzytochemischen Analyse konnte eine eindeutige Zuordnung und Typisierung der untersuchten Zellen vorgenommen werden.

2.6.4.3 Transmitter-spezifische Charakterisierung der Neurone in der ARC-Primärkultur

Um, wie in *Kap. MM 2.4.2* angedeutet, ARC-spezifische Neuromodulatoren in Neuronen der ARC-Primärkultur qualitativ und quantitativ nachzuweisen, wurden zahlreiche immunzytochemische Studien durchgeführt. Zum einen sollte dadurch die Präparation einer zumindest "ARC-angereicherten" Primärkultur manifestiert werden, zum anderen ein Transmitter *coding* der durch purinerge Agonisten aktivierten ARC-intrinsischen Neurone ermöglicht werden (*Kap. MM 2.6.4.4*). Folgerichtig ergaben sich immunzytochemische Doppelmarkierungen mit einem Neuronen-spezifischen Primärantikörper sowie einem Primärantikörper / -serum gegen eines der folgenden Neuropeptide: ACTH, NPY, NT1 oder SOM, sowie Tyrosinhydroxylase als Schlüsselenzym der DA-Synthese (*Tab. MM 7*). Für jede Kombination an Doppelbestimmungen wurden 5 - 7 Zellpräparationen resp. "*wells*" analysiert; dabei wurden 5 - 7 zufällig ausgewählte Zählfelder hinsichtlich ihrer Anzahl an eindeutig als Nervenzellen identifizierten Zellen, Neuropeptid "X" exprimierenden Zellen sowie doppelmarkierten Zellen erfasst. Die Auswertung erfolgte dann sinngemäß zu dem in *Kap. MM 2.6.4.2* beschriebenen Vorgehen.

| | 1. Antigen | Spezies | Verdünnung | | 2. Antigen | Spezies | Verdünnung |
|---|----------------------|---------|------------|--|--------------------|---------|------------|
| 1 | MAP _{2a+2b} | mouse | 1 : 1.500 | | ACTH | rabbit | 1 : 1.000 |
| 2 | MAP _{2a+2b} | mouse | 1 : 1.500 | | NPY | rabbit | 1 : 1.000 |
| 3 | MAP _{2a+2b} | mouse | 1 : 1.500 | | NT1 | rabbit | 1 : 6.000 |
| 4 | MAP _{2a+2b} | mouse | 1 : 1.500 | | P2X ₂ R | rabbit | 1 : 1.000 |
| 5 | MAP _{2a+2b} | mouse | 1 : 1.500 | | SOM | rabbit | 1 : 6.000 |
| 6 | NSE | rabbit | 1 : 2.000 | | TH | mouse | 1 : 2.000 |

Tab. MM 7: Antikörerkombinationen (Doppelmarkierung) für das Neurotransmitter *coding* der Neurone in der ARC-Primärkultur

Im Rahmen der Untersuchungen zur Kolokalisation von Tyrosinhydroxylase (TH) mit einem der Neuropeptide ACTH, NPY, NT oder SOM in Neuronen der ARC-Primärkultur wurden ebenfalls immunzytochemische Doppelmarkierungen durchgeführt. Für die Auswertung wurden 4 - 6 Präparationen resp. "*wells*" herangezogen. Pro Präparation wurden, wie für *Kap. MM 2.6.4.2* durchgeführt, 7 - 10 Zählfelder (Einzelfläche: ~0,28 mm²) auf einem Deckgläschen zufällig ausgewählt und die Anzahl der TH-immunpositiven Zellen, der für einen peptidergen Neuromodulator immunpositiven sowie der doppelmarkier-

ten Nervenzellen ermittelt. Anschließend erfolgte die Auswertung analog zu derjenigen in *Kap. MM 2.6.4.2*.

2.6.4.4. Immunzytochemischer Nachweis der Expression ionotroper Purinozeptoren in der ARC-Primärkultur und Transmitter *coding* 2-MeSATP-responsiver ARC-Neurone

Um die Expression purinerner Rezeptoren in der ARC-Primärkultur auch auf Proteinebene näher charakterisieren zu können, wurden jeweils für einen Purinozeptorsubtyp spezifische und immer gegen den intrazellulären Carboxy-Terminus gerichtete, polyklonale Antiseren (*Tab. MM 4*) sowohl im Gehirnschnitt als auch in der Zellkultur eingesetzt. Da aufgrund der Kalzium Ratio-Imaging Versuche (*Kap. MM 2.5.6*) neben der neuronalen vor allem auch von einer astrozytären Expression einiger P2XR ausgegangen werden kann, erfolgten die immunzytochemischen Untersuchungen immer als Doppelmarkierungen mit Primärantikörpern gegen Zelltyp-spezifische Markerproteine (*Tab. MM 4*).

Neurogliale Zellen der ARC-Primärkultur, welche auf eine singuläre Superfusionsstimulation durch 2-MeSATP mit einem ausgeprägten intrazellulären Kalziumsignal antworteten, wurden post-experimentell immunzytochemisch auf die Expression vornehmlich des P2X₂-Purinozeptors sowie von TH, ACTH, NPY, SOM oder NT1 untersucht. Die Auswertung erfolgte dann sinngemäß zu dem in *Kap. MM 2.6.4.2* beschriebenen Vorgehen.

2.6.5. Immunhistochemische Charakterisierung ARC-spezifischer Neurotransmittersysteme

Für die Umsetzung der Immunhistochemie an Gehirnschnitten der Ratte musste das Gewebe zunächst gewonnen und aufbereitet werden.

2.6.5.1 Transkardiale Perfusionsfixierung adulter Ratten

Alle Tiere, deren Gehirne für immunhistochemische Untersuchungen verwendet werden sollten, wurden transkardial zuerst mit eiskalter physiologischer Kochsalz-Lösung und anschließend mit eiskaltem 4 % PFA perfundiert. Unmittelbar vor der Perfusion wurden die Ratten mit Pentobarbitalinjektion (Narcoren®; 0,1 ml / 100 g KG; 160 mg/kg KG) intraperitoneal tief narkotisiert und nach Aussetzen der Flexor- und Corneareflexe unter einem Abzug in Rückenlage an einem Gitter über einer Perfusionswanne durch Klebeband fixiert. Die Bauchhöhle wurde praeumbilical bis zum *Diaphragma* und beidseitig entlang des Rippenbogens eröffnet, und mit einem Nadelhalter wurde der Schwertfort-

satz des *Sternum* fixiert und leicht angehoben. Mit einer Schere erfolgten die Perforation des *Diaphragma* und die Durchtrennung der Rippen. Das *Sternum* wurde kranial umgeklappt, um das Herz und die großen Blutgefäße offen zu legen. Nach Inzision des Herzbeutels wurde durch den linken Herzventrikel eine Knopfkanüle, die über einen Polypropylenschlauch mit der Perfusionsanlage verbunden war, vorsichtig bis in den Aortenbogen vorgeschoben. Über Dreiwegehähne konnte die Perfusionskanüle aus abgedichteten Vorratsflaschen abwechselnd mit 4°C kalter physiologischer NaCl-Lösung oder 4 % PFA in PBS durchspült werden. Dies erfolgte durch ein Drucksystem mit integrierter Fußpumpe, wodurch zunächst 300 ml der Kochsalzlösung bei einem konstanten Perfusionsdruck von 100 mmHg in den Körperkreislauf eingebracht wurden, entsprechend dem mittleren arteriellen Blutdruck von Ratten. Die rasche Stichinzision im rechten Atrium ermöglichte den Austritt von Blut bzw. den Perfusionslösungen aus dem Körperkreislauf, wodurch innerhalb kürzester Zeit das zirkulierende Blut gegen Kochsalzlösung ausgetauscht werden konnte. Als Kennzeichen der vollständigen Ausblutung wurde die Blässe der Leber und der Nieren herangezogen. Danach erfolgte durch Betätigung eines Dreiwegehahns die Einleitung von 300 ml eiskalten PFA-Lösung in das Kreislaufsystem.

Im Anschluss an die Perfusion wurde das Rückenmark durchtrennt, mit einem Skalpell die Kopfhaut caudo-cranial aufgeschnitten und die dem Schädel anliegende Kau- und Halsmuskulatur sowie die Halswirbel entfernt. Beginnend am *Foramen magnum* wurden die Schädelplatten bis zum *Bregma* mit Hilfe einer Hohlmeißelschere komplett abgetragen und das Gehirn freigelegt. Nach Entfernung der *Dura mater* wurde der Kopf um 180° gedreht, so dass das Gehirn leicht aus der Schädelgrube (*Cavum cranii*) kippte. Nach Durchtrennen der *Nervi optici* und des *Bulbus olfactorius* konnte das intakte Gehirn entnommen werden. Nach Durchtrennen des Gehirns an der *Fissura transversa cerebelli* wurden die beiden Gehirnteile (*Cerebrum* und *Cerebellum* mit Stammhirn) sowie die Hypophyse in 4°C PFA für 150 min nachfixiert und anschließend über Nacht in eiskalter 20 % Saccharoselösung gelagert. Die Behandlung des Gehirngewebes mit PFA bewirkt Quervernetzungen reaktiver Gruppen in Polypeptiden, wodurch in der vorliegenden Arbeit die Antigene für das Verfahren der immunhistochemischen Untersuchung in ihrer Form erhalten und vor Abbau geschützt wurden. Die anschließende Inkubation des Gewebes in der Saccharoselösung erfolgte zum Schutz des Gehirngewebes vor Gefrierschäden im Rahmen des nachfolgenden Tieffrierens in pulverisiertem Trockeneis. Der Bereich des Hypothalamus wurde zuvor zusätzlich mit Tissue Freezing Medium® überschichtet, um die Herstellung von Gefrierschnitten zu erleichtern. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gehirnproben in Parafilm und Aluminiumfolie eingewickelt und bis

zur Anfertigung der Gehirnschnitte bei -40°C in luftdichten Kunststoffbeuteln gelagert.

2.6.5.2. Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung serieller Kryostatschnitte wurde das tiefgefrorene *Cerebrum* adulter Ratten unter Verwendung von Tissue Freezing Medium® auf dem Objektblock des Kryostaten aufgefroren (Kammertemp. -25 bis -20°C ; Objektstemp. -15 bis -10°C), und in rostro-caudaler Richtung $20\ \mu\text{m}$ dicke, coronale Gehirnschnitte auf gekühlten, mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgezogen (Abb. MM 9). Die Poly-L-Lysin Beschichtung diente der besseren Adhäsion der Gehirnschnitte am Objektträger, da anionische Bestandteile der Zelloberfläche mit den kationischen L-Lysin-Polymeren interagieren (Mazia et al., 1975). Der zu schneidende Bereich (*Bregma* $-1,56$ mm bis $-4,20$ mm; Paxinos & Watson, 2005) umfasste den PVN, die *Eminentia mediana* und den ARC. Es wurden zwei parallele Schnittserien desselben Gehirns mit einfach alternierender Abfolge der Schnitte angefertigt in gekühlten Schnittboxen auf Eis gelagert.

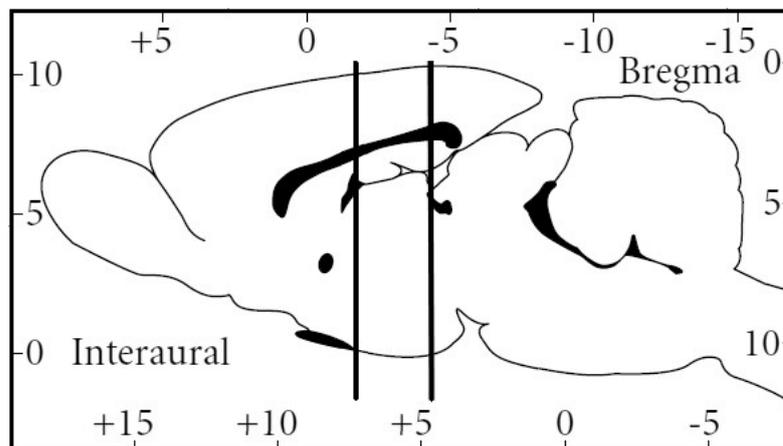


Abb. MM 9 : Sagittalschnitt durch das *Cerebrum* der Ratte

Aus dem zwischen den schwarzen Linien liegenden Bereich wurden die Gewebeschnitte für die Immunhistochemie gewonnen. Modifiziert nach Paxinos & Watson (2005).

Zur Durchführung der Immunhistochemie nach dem "free floating" Verfahren (Rummel et al., 2005; Mütze et al., 2007; Yoshida et al., 2003) wurden serielle, coronale ($40\ \mu\text{m}$) Gehirnschnitte am FrigoCut geschnitten. Auf einen CO_2 -gekühlten Objekthalter wurde das *Cerebrum* caudal mit Hilfe von Tissue Freezing Medium® aufgefroren und zur Schnittebene am offenen C-Messer ausgerichtet. Um einen raschen und gleichmäßigen Gefriervorgang zu gewährleisten, wurde ein Kunststoffdeckel über Gehirn und Objekt-

halter gehalten, sodass das ausströmende CO₂-Gas innerhalb der Abdeckung einheitlich verwirbelt wurde. Mit einem Marderhaarpinsel wurden die Gewebeschnitte vom Mikrotom direkt in PBS-gefüllte 12-Well-Platten mit speziellen Siebeinsätzen überführt. Diese ermöglichten es, dass Schnitte "frei" schwimmend in Lösung inkubiert werden konnten und von beiden Seiten für Reagenzien bzw. Antikörper zugänglich waren. Die PBS-Waschschritte und Inkubationszeiten mit Primär- bzw. Sekundärantikörpern waren identisch zu der unter *Kap.MM 2.6.3* beschriebenen Methode. Erst nach Beendigung des Protokolls wurden die Gewebeschnitte nass auf mit Gelatine (0,5 %) und Chromalaun (0,05 %) beschichtete Objektträger unter Zuhilfenahme des Pinsels aufgezogen. Nach der "free-floating" Markierungsmethode hergestellte Gewebeschnitte zeigten gegenüber der zuvor beschriebenen Methode intensivere Markierungssignale bei reduzierter "Hintergrundfärbung". Nachteilig wirkte sich die höhere Schnittdicke für die Fokussierung der Signale während der Beobachtung am Fluoreszenzmikroskop aus.

2.6.5.3. Versuchsprotokoll

Zur Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte nach der Rehydrierung (3 x 5 min.) in PBS in Inkubationspuffer (Blocklösung), der 10 % Serum (NDS) und 0,3 % Triton-X-100 enthielt, inkubiert. Um ein vorzeitiges Ausbleichen der fluoreszierenden, sekundären Antikörper zu verhindern, wurden alle Arbeitsschritte, die Sekundärantikörper und DAPI enthielten, unter lichtarmen Bedingungen vollzogen. Die Immunhistochemie wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Die Objektträger mit

| Arbeitsschritt | Bedingungen / Vorgehen | Dauer |
|--------------------------------------|---|-----------|
| | RT, Umrandung der Schnitte mit Fettstift | |
| waschen / rehydrieren | RT, mit PBS | 3 x 5 min |
| Blocken | RT, mit Block-Lösung (10 % NDS, 0,3 % Triton-X-100) | 1 h |
| Inkubation I: Primärantikörper | 4°C, feuchte Kammer, in Block-Lösung, ca. 250 µl / Objektträger | 36 – 48 h |
| Waschen | RT, mit PBS | 3 x 5 min |
| Inkubation II: Sekundärantikörper | RT, feuchte Kammer, abgedunkelt, in Block-Lösung, ca. 250 µl / Objektträger | 120 min |
| Waschen | RT, mit PBS | 5 min |
| Inkubation III: DAPI – Lösung | RT, abgedunkelt | 8 min |
| Waschen | RT, mit PBS | 3 x 5 min |
| Deckeln | 2 – 4 Tropfen Citifluor auf Objektträger, Deckgläschen auflegen, mit Nagellack Ränder abdichten | |

Tab. MM 8: Protokoll Immunhistochemie

adherierten Gehirnschnitten wurden lichtdicht bei 4°C bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop gelagert (*Tab. MM 8*).

Zum Nachweis der Spezifität aller Primärantikörper erfolgte die parallele Durchführung sogenannter Negativkontrollen, wobei der jeweilige Primärantikörper durch unspezifisches Serum ersetzt wurde. Dadurch konnte gleichzeitig eine potentielle Fremdmarkierung durch den Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper abgeschätzt werden. Im Falle der P2XR-spezifischen Antikörper / -seren waren die zur Immunisierung benutzten peptidergen Antigene kommerziell erhältlich, wodurch sich eine prä-experimentelle Absättigung des jeweiligen Antikörpers mit seinem Antigen durchführen ließ. Für diese Präabsorptionskontrolle wurden Antikörper und Antigen in einem Verhältnis von 1 µg AK pro 1 µg Antigen für 60 min bei RT vorinkubiert; dies entsprach einem molaren Verhältnis von etwa 1:100. Danach wurde der "abgesättigte" AK in der aus *Tab. MM 4* entnehmbaren Verdünnung in das immunzytochemische bzw. -histochemische Versuchsprotokoll eingesetzt.

2.6.6. Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der immunhisto- und zytochemischen Untersuchungen im Gehirnschnitt bzw. der ARC-Primärkultur erfolgte direkt am Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener digitaler Schwarzweißkamera bei verschiedenen Vergrößerungen. Spezielle Filter (Alexa488 Filter, ARW 450 - 490 nm und Cy3-Filter, ARW 510 - 530 nm) wurden zur Detektion der Antigen-Antikörper Komplexe verwendet. Zum Nachweis der Zellkerne wurde DAPI bei 359 nm angeregt, welches blaues Licht bei einer Wellenlänge von 461 nm emittierte. Mit Hilfe der Kamera und dem Programm Metamorph wurden die einzelnen Farbkanäle (rot, grün, blau) zu einem dreifarbigem Bild zusammengefügt. Dies vereinfachte die Beurteilung, inwieweit etwa eine Kollokalisierung bzw. -distribution zweier oder dreier Einzelsignale vorlag.

2.7. Purinozeptorexpression im ARC und Gesamthypothalamus adulter Ratten: Radiorezeptorstudien

2.7.1. Materialien

Ge- und Verbrauch

| Bezeichnung: | Modell: | Hersteller: |
|------------------------------|---|---|
| Glassfaserfilter | GF/C 1,2 µm | Whatman International Ltd, Maidstone, England |
| PS – Röhrchen | 3,5 ml GLKL | Greiner-Bio One GmbH, D-Frickenhausen |
| Szintillationsmessfläschchen | 20 ml Typ Vial LDPE | Carl Roth, D-Karlsruhe |
| Zentrifugenröhrchen, steril | 15 und 50 ml | Sarstedt, D-Nümbrecht |
| Autoradiographie-Film | BioMax® MR-2 (20 x 25 cm) | KODAK GmbH, D-Stuttgart |
| Radioaktivitätsstandard | [¹⁴ C]-Microscales RPA504, 31 - 883 nCi/g | GE Healthcare Europe GmbH, D-Freiburg |
| Zentrifugenröhrchen, steril | 15 und 50 ml | Sarstedt, D-Nümbrecht |

Chemikalien

| Bezeichnung: | Hersteller: |
|--|---|
| 2-Methylthioadenosin-5'triphosphat (2-MeSATP) | Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln |
| 2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl) Adenosin-5'triphosphat (BzATP) | Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln |
| α,β-Methylenadenosin-5'triphosphat (α,β-meATP) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| [α- ³⁵ S]Deoxyadenosine-5'thio-triphosphat = [³⁵ S]dATPαS (37 TBq / mmol) | Hartmann Analytics GmbH, D-Braunschweig |
| Adenosin-5'triphosphat (ATP) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Bacitracin (50 kU / g) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| bidest. Reinstwasser (<i>Aqua bidest.</i>) | |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| D(+) Saccharose | Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Ethanol, absolut | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Ethylenglykol-bis-(β-Aminoethylether) N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6H ₂ O) | Merck, D-Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Pepstatin A (98 % Reinheit) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | AppliChem GmbH, D-Darmstadt |
| Pyridoxalphosphat-6-Azo(Benzoyl-2,4-Disulfonsäure) (PPADS) | Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln |
| Reactive blue-2 (Rb-2) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Rotiszint® eco plus | Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe |
| Suramin Natriumsalz | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

| | |
|--|---|
| 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)Adenosin-5'triphosphat (TNP-ATP) | Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln |
| Trizma Hydrochlorid | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

Lösungen und Puffer

| Bezeichnung: | Zusammensetzung/Herstellung: |
|--------------------------------------|---|
| 2-MeSATP – Stocklösung | Grundlage: Rezeptorpuffer 2-MeSATP (1,5 mM) |
| α,β -meATP – Stocklösung | Grundlage: Rezeptorpuffer α,β -meATP (1,5 mM) |
| ATP – Stocklösung | Grundlage: Rezeptorpuffer ATP (1,5 mM) |
| BzATP – Stocklösung | Grundlage: Rezeptorpuffer BzATP (1,5 mM) |
| Pepstatin A - Gebrauchslösung | 1 mg / ml in DMSO gelöst |
| PMSF – Gebrauchslösung | Grundlage: Ethanol, absolut PMSF (0,1 M) |
| Reactive blue-2 (Rb-2) - Stocklösung | Grundlage: Rezeptorpuffer Reactive blue-2 (15 mM) |
| Rezeptorpuffer (RP), pH 7,4 | Grundlage: <i>Aqua bidest.</i> 50 mM Trizma 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 1 mM EGTA 90 mM Saccharose 0,025 % Bacitracin 0,1 % BSA 1 ml / l Pepstatin A - Gebrauchslösung 0,1 mM PMSF |
| Suramin – Stocklösung | Grundlage: Rezeptorpuffer Suramin (15 mM) |
| TNP-ATP – Stocklösung | Grundlage: Rezeptorpuffer TNP-ATP (10 mM) |
| Waschpuffer (WP), pH 7,4 | Grundlage: <i>Aqua bidest.</i> 50 mM Trizma 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 0,1 mM EGTA 90 mM Saccharose 0,001 % BSA |

2.7.2. Grundlagen : Liganden-Rezeptor Bindungskinetik

Hydrophile Hormone, parakrine Botenstoffe, Neurotransmitter und Zytokine repräsentieren "*first messenger*" und interagieren als Botenstoffe mit den jeweiligen Zielzellen durch Bindung an und Aktivierung von membranständige(n) Rezeptor- bzw. Kanalproteine(n). Der experimentelle Nachweis dieses Vorgangs inklusive seiner Kinetiken lässt sich durch

den Einsatz (oft radioaktiv) markierter Botenstoffe und einer angereicherten Fraktion der zellulären Plasmamembranen (PM) des Zielgewebes erbringen, welche die Rezeptorproteine enthalten.

Diese "Radiorezeptor Bindungsassays" (RRA) beruhen auf der Grundlage, dass biologische Signalmoleküle bzw. "Liganden" (L) an Rezeptorproteine (R) binden, einen Ligand-Rezeptor Komplex (RL) formen und nachfolgend eine entsprechende zelluläre Reaktion auslösen. Die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor basiert auf einem komplexen Zusammenspiel von ionischen Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräften. Diese Bindungen sind reversibel, spezifisch sowie sättigbar und können im Liganden Bindungsassay charakterisiert werden (Crevat-Pisano et al., 1986). Dabei können die Affinität des Liganden für einen Rezeptor (K_D) und die maximale Rezeptordichte (B_{max}) berechnet werden. Der K_D -Wert repräsentiert dabei die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante und ist ein Maß für die Stärke des Bindungsbestrebens zwischen Ligand und Rezeptor. *Per Definition* gibt der K_D -Wert die Ligandenkonzentration bei halbmaximaler Besetzung der vorhandenen Rezeptormoleküle durch Ligandenmoleküle an, und ist damit dem K_m -Wert der Michaelis-Menten Gleichung zur Beschreibung der Enzymkinetik vergleichbar (Chen et al., 2010). Je kleiner der K_D -Wert, desto höher ist die Bindungsaffinität. B_{max} gibt die maximale Rezeptordichte bzw. Bindungskapazität an. Durch Bestimmung der Proteingesamtmenge wird dieser Wert korrigiert und als Menge des gebundenen Liganden pro mg Protein angegeben (Davenport & Russel, 1996). Die Beziehung zwischen Rezeptor, Ligand und Ligand-Rezeptor Komplex wird beschrieben durch:



Formellegende:

| | | |
|-------|---|---|
| [R] | = | Konzentration des freien Rezeptors |
| [L] | = | Konzentration des freien Liganden |
| [RL] | = | Konzentration des Ligand-Rezeptor Komplexes |
| K_D | = | Dissoziationskonstante |

Um mit biologischem Material solche Rezeptor oder Liganden Bindungsassays durchführen zu können, wird im Idealfall ein Radionuklid-markierter Ligand eingesetzt, da die Primärstruktur des Liganden kaum (bzw. gar nicht) verändert wird und Radioaktivität mit außerordentlich hoher Sensitivität nachweisbar ist.

Mit einem Radionukleotid wie [^3H], [^{14}C], [^{32}P], [^{35}S] oder [^{125}I] markierte Liganden werden als Radioliganden (L^*) bezeichnet und sollten sich auszeichnen durch:

- identische chemische Eigenschaften wie der nicht-markierte Ligand
- eine hohe Affinität zum entsprechenden Rezeptorprotein und eine geringe Affinität, unspezifische Bindungen einzugehen
- eine hohe spezifische Aktivität (Ci/mmol), um auch geringe Rezeptormengen detektieren zu können.

Eine langsame Abbaurate des Radioliganden unterstützt die Bindungsuntersuchungen. Die spezifische Bindung (*specific binding*, SB) beschreibt die reversible Bindung eines Radioliganden an eine bestimmte Klasse von Rezeptoren. Neben der spezifischen Bindung an den Rezeptor kann der Ligand unspezifisch (*non specific binding*, NSB) mit verschiedenen Komponenten des zu untersuchenden Gewebes bzw. mit den Versuchsmaterialien interagieren. Diese unspezifischen Interaktionen sind irreversibel, nicht sättigbar und steigen linear mit zunehmender Radioligandenkonzentration an (Davenport & Russell, 1996). Basierend auf dem Massenwirkungsgesetz (MWG) wird durch Zugabe einer deutlich höheren Konzentration (100 - 1000 fach) an unmarkiertem Ligand (Kompetitor) der Radioligand aus der spezifischen Bindung vom Rezeptor verdrängt. Zurück bleibt der Anteil an unspezifisch gebundenem Radioligand (Crevat-Pisano et al., 1986).

Kompetitive Verdrängungsstudien

Liganden können in Agonisten und Antagonisten unterschieden werden. Agonisten bilden mit dem Rezeptor einen Komplex und aktivieren diesen. Antagonisten weisen häufig eine sehr ähnliche chemische Struktur wie die entsprechenden Agonisten auf und können ebenfalls an den Rezeptor binden. Sie lösen jedoch keine zelluläre Wirkung aus und hemmen den Rezeptor. Agonist und Antagonist konkurrieren um die Besetzung des Rezeptorproteins kompetitiv, da beide Liganden direkt im aktiven Zentrum des Rezeptors binden. Entsprechend dem MWG kann der kompetitive Antagonist somit durch eine höhere Agonistenkonzentration von der Bindungsstelle verdrängt werden und *vice versa*. Nichtkompetitive Antagonisten binden an eine allosterische Bindungsstelle des Rezeptors und hemmen die Bindung des Agonisten meist indirekt durch Konformationsänderung des Rezeptorproteins.

Kompetitive Bindungsexperimente können zum Nachweis und zur Charakterisierung eines oder mehrerer Rezeptorsubtypen sowie zur Bestimmung deren Selektivität für einen bestimmten Liganden genutzt werden. Im Gegensatz zu Sättigungsstudien gemäß der Michaelis-Menten Kinetik, bei denen bei konstanter Rezeptorkonzentration die

Radioligandenmenge systematisch erhöht wird, wird in kompetitiven Verdrängungsstudien die Radioligandenkonzentration konstant gehalten und die Konzentration des entsprechenden, nicht markierten Liganden (Kompetitor) z.B. in aufsteigenden Zehnerpotenzen erhöht. Radioligand und Ligand konkurrieren entsprechend des Verdrängungsprinzips um die Bindungsstellen des Rezeptors. Zur Erstellung einer kompetitiven Verdrängungskurve wird die spezifische Bindung des Kompetitors als Prozentanteil an der maximalen Bindung (*total binding*; TO) des Radioliganden in Abwesenheit eines Kompetitors) gegen die Konzentration (log M) des kompetitiven Liganden aufgetragen. Die maximale Bindung des Radioliganden wird zu 100 % gesetzt. Es entsteht ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Anhand dieser Daten kann die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}), also diejenige Ligandenkonzentration, bei welcher dieser 50 % des Radioliganden von der Rezeptorbindungsstelle verdrängt, ermittelt werden. Bei kompetitiven Antagonisten ist der IC_{50} -Wert von der Michaeliskonstante, der Dissoziationskonstante und der Ligandenkonzentration abhängig. Je höher die Affinität des unmarkierten Liganden für die vom Radioliganden besetzte Bindungsstelle ist, desto niedriger ist der entsprechende IC_{50} -Wert. Nach Cheng und Prusoff (1973) wird die lineare Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes eines kompetitiven Inhibitors von der Konzentration des Agonisten beschrieben. Je niedriger die Ligandenkonzentration ist, desto stärker gleicht sich der IC_{50} -Wert der Verdrängungskurve dem K_i -Wert an:

$$K_i = IC_{50} + [L^*] / K_P$$

Formellegende:

| | | |
|-----------|---|---|
| K_i | = | Verdrängungskonstante |
| $[L^*]$ | = | Konzentration des freien Radioliganden |
| IC_{50} | = | Konzentration des Ligand-Rezeptor Komplexes |
| K_P | = | Dissoziationskonstante des Radioliganden |

2.7.3. Gewinnung der Gewebeproben für die Radiorezeptorstudien

Sämtliche Radiorezeptorstudien zur Lokalisation und pharmakologischen Charakterisierung purinergere Rezeptoren wurden an neuroglialen Geweben durchgeführt, die *post mortem* adulten Ratten entnommen wurden, welche (1) zum Zwecke der behördlich genehmigten Organentnahme (AG Prof. Diener, Justus-Liebig Universität Giessen; GI 18/2, A57 / 2011) durch zervikale Dislokation oder (2) im Rahmen des Zuchterhaltungsprogrammes der Philipps-Universität Marburg (zentrale Tierhaltung) durch CO_2 -Betäubung euthanasiert worden waren. Für die Präparation von Hypothalamus und

thorakalem Rückenmark (TRM) wurden unter Verwendung einer Hohlmeißelschere Schädel bzw. Wirbelkanal eröffnet und Gehirn (*Kap. MM 2.6.5.1*) bzw. TRM entnommen. Der Hypothalamus wurde durch Skalpell-Schnitte auf der Höhe des OVL, *posterior* des ARC und dorsal der *Commissura anterior* (AC) separiert, das TRM mittels sterilen Spateln und Pinzetten präpariert. Es wurden der Hypothalamus und das TRM-Segment sofort nach Organentnahme jeweils separat in Rezeptorpuffer (RP) gewaschen und nach sterilem Abtupfen überschüssiger Flüssigkeit entweder in flüssigem Stickstoff oder pulverisiertem Trockeneis schockgefroren und bei -40°C , vor Feuchtigkeitsverlust durch Einwickelung in Aluminiumfolie sowie Parafilm® geschützt, gelagert.

2.7.4. Radioligand – Rezeptor Interaktion : Radiorezeptor Bindungsassay (RRA)

Für die Durchführung des Radiorezeptor Bindungsassays (RRA) mit Bindung des purinergen Radioliganden an eine die Purinozeptoren enthaltende, frisch präparierte, angereicherte Plasmamembranfraktion (PM) entsprechender Gewebeproben (Hypothalamus = HYP, thorakales Rückenmark = TRM) erfolgte zunächst die Überführung der tiefgefrorenen Gewebe (-40°C) in eiskalten (4°C) Rezeptorpuffer (RP; w / v Verhältnis von 1 : 20 für HYP und 1 : 6 für RM) und deren Zerkleinerung mittels steriler Einmalskalpelle. Der anschließende grobmechanische Gewebsaufschluss mit rotierenden, sterilen Messern (Ultra-Turrax T25) für zweimal 30 s bei 2.000 U / min und 4°C ergab ein Homogenat, das einer schonenden Ruptur der zellulären Plasmamembranen (PM) sowie teilweise der Kern- und Mitochondrienmembranen mittels Potter-Elvehjem Homogenisator (Glaszylinder mit rotierendem Teflonpistill) in eiskaltem RP unterzogen wurde. Zur Elimination unaufgeschlossenen Zellmaterials und zur Anreicherung der Plasmamembranfraktion im Überstand wurde das so erhaltene Feinhomogenat für 10 min und 2.500 U / min bei 4°C zentrifugiert. Die anschließende Hochgeschwindigkeitszentrifugation (20.000 U / min, 4°C , 25 min) des Überstandes resultierte in einem deutlich geschichteten Pellet, bestehend aus Zellkernen und Mitochondrien, deren Membranen, dem Endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit frischem, eiskaltem RP vorsichtig überschichtet. Die oberste, transluzente Plasmamembranschicht wurde mit einem sterilen Spatel abgenommen und in RP-Puffer (w / v Verhältnis von 1 : 10 für HYP und RM) und Elvehjem-Potter rehomogenisiert. Für die spätere Proteinbestimmung wurde 0,5 ml der jeweiligen, angereicherten Plasmamembransuspension bei -40°C eingefroren, während der Großteil in den anschließenden Bindungsstudien (*Kap. MM 2.7.4.1* und *2.7.4.2*) eingesetzt wurde.

2.7.4.1. Membranbindungsassay : Einfluss der Inkubationsdauer und -temperatur

Zur grundlegenden Charakterisierung der Plasmamembranbindung des kommerziell erworbenen Radioliganden [³⁵S]dATPαS hoher spezifischer Aktivität (1.000 Ci / mmol) wurden vergleichende Bindungsstudien, bei konstanter Radioligandenkonzentration (50 pM), mit angereicherten Plasmamembranfraktionen von HYP und TRM durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss der Temperatur (4°C, RT und 37°C) und der Inkubationszeit (10 s bis 25 min) auf die Ligand-Rezeptor Interaktion bestimmt. Zur Hemmung von in der angereicherten Plasmamembranfraktion vorhandenen katabolen Enzymen, vornehmlich Proteasen und Peptidasen, enthielt der RP mehrere potente Enzyminhibitoren wie Bacitracin, Pepstatin A und PMSF (*Kap. MM 2.7.1*). Die Experimente wurden in einem Inkubationsvolumen von 0,6 ml pro PS-Röhrchen (Probenansatz), und für jeden der acht Zeitpunkte (10 s bis 25 min) sowohl zur Ermittlung der Gesamtbindung (TO) als auch der unspezifischen Bindung (NSB) als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Bestimmung des NSB-Wertes des RRA erfolgte in Gegenwart von final $1,6 \times 10^{-5}$ M unmarkiertem 2-MeSATP.

Im Folgenden das Pipettierschema:

Bestimmung der Gesamtbindung:

400 µl RP
100 µl [³⁵S]dATPαS (300 pM) in RP
100 µl PM-Suspension in RP

Bestimmung der unspezifischen Bindung:

400 µl RP
100 µl [³⁵S]dATPαS (300 pM) mit 10^{-4} M 2-MeSATP in RP
100 µl PM-Suspension in RP

Diese Versuche erfolgten sowohl bei 4°C, bei Raumtemperatur als auch im Wasserbad bei 37°C. Durch Zugabe der Plasmamembran (PM) -Suspension und rasches Mischen der Probenansätze wurde das jeweilige Experiment gestartet. Die Bindungsreaktion wurde nach den jeweiligen Inkubationszeiten (10 s bis 25 min) mit Hilfe des halbautomatisierten "cell harvester" (M-24R) durch Vakuumfiltration, Adhäsion der mit [³⁵S]dATPαS markierten PM an den GF/C Glasfaserfilter und dreimaliges Auswaschen des ungebundenen Radioliganden mit eiskaltem Waschpuffer (*Kap. MM 2.7.1*) beendet (Schütz et al., 1992). Dabei konnten gleichzeitig 24 Proben bearbeitet werden.

2.7.4.2. Membranbindungsassay : Kompetitive Verdrängungsstudien

Zur weiteren pharmakologischen Charakterisierung des purinergen Rezeptorsystems im Hypothalamus und thorakalen Rückenmark adulter Ratten wurden kompetitive Verdrängungsstudien an PM-Suspensionen mit [³⁵S]dATPαS als Radioligand in einer konstanten Konzentration von 0,5 nM und jeweils einem nicht markierten, kompetitiven Liganden in 8 - 16 Konzentrationen, aufsteigend von 1 pM bis 100 μM, durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Pufferlösungen, Materialien etc., wie in *Kap. MM 2.7.4.1* beschrieben, eingesetzt. Als dATPαS Analoga dienten ATP und 2-MeSATP als generelle Agonisten für Purinozeptoren, α,β-meATP als P2X₁- und P2X₃-spezifischer Agonist, sowie BzATP als P2X₁- und P2X₇-spezifischer Agonist. Als Antagonisten wurden Rb-2, Suramin und TNP-ATP eingesetzt. Das endgültige Reaktionsvolumen betrug 0,6 ml pro PS-Röhrchen. Es wurden Dreifachbestimmungen für TO sowie für jede der 8 - 16 Konzentrationen eines Kompetitors durchgeführt.

Im Folgendem das Pipettierschema:

Bestimmung der Radioligandenbindung:

- 400 μl RP bzw. unmarkierter Kompetitor (Konz. 8 - 16) (6x) in RP
- 100 μl [³⁵S]dATPαS (3 nM) in RP
- 100 μl PM-Suspension in RP

| Purinozeptorligand | minimale Endkonzentration [pM] | maximale Endkonzentration [μM] |
|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ATP | 1 | 100 |
| 2-MeSATP | 10 | 100 |
| BzATP | 100 | 100 |
| α,β-meATP | 10 | 100 |
| Suramin | 100 | 1000 |
| Reactive blue-2 | 100 | 1000 |
| TNP-ATP | 50 | 50 |

Tab. MM 9: Kompetitiver Radiorezeptor Bindungsassay (RRA) an Plasmamembranfraktionen des Hypothalamus und Rückenmarks mit [³⁵S]dATPαS als Radioligand

Kompetitive Verdrängungsstudien an eine mit 0,5 nM [³⁵S]dATPαS markierte, angereicherte Plasmamembranfraktion des Hypothalamus bzw. thorakalen Rückenmarks adulter Ratten zum Nachweis der Expression spezifischer Purinozeptorsubtypen. Als unmarkierte Liganden kamen kompetitive Purinozeptor Agonisten (ATP, 2-MeSATP, α,β-meATP und BzATP) sowie Agonisten (Suramin, Reactive blue-2 und TNP-ATP) in den angegebenen Konzentrationsbereichen (maximal – minimal) zum Einsatz.

Diese Versuche erfolgten, basierend auf den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Versuchsserie zur Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Radioligandenbindung, bei 4°C für 20 min (Kap. M 2.7.4.1). Auch hier wurde die Bindungsreaktion mit Hilfe des "cell harvester" durch Vakuumfiltration, Adhäsion der mit [³⁵S]dATPαS markierten PM an den GF/C Glasfaserfilter und dreimaliges Auswaschen des ungebundenen Radioliganden mit eiskaltem Waschpuffer (Kap. MM 2.7.1) beendet (Schütz et al., 1992; Brenner & Gerstberger, 1999).

2.7.4.3. Membranbindungsassay : Messung der gebundenen Radioaktivität und Datenevaluierung

Für beide Versuchsserien wurden nach der Vakuumfiltration mit Hilfe einer sterilen Pinzette die 24 Filterplättchen aus dem jeweilig prozessierten Glasfaserfilter gelöst, in Szintillationsröhrchen überführt und mit jeweils 8,0 ml Rotiszint® eco plus Szintillatorcocktail überschichtet. Nach Verschluss und kräftigem Mischen der Szintillationsröhrchen wurden zur vollständigen Lösung des Radioliganden aus dem Filter in die organische Szintillator-Phase die Proben eines Versuchs über Nacht in einem Abzug gelagert und am nächsten Tag der Radioaktivitätsmessung zugeführt. Die durch den Radioliganden [³⁵S]dATPαS emittierte β-Strahlung wurde indirekt mittels Flüssigkeits-Szintillationsspektrometrie ermittelt (Yamamura & Hulme, 1992). Der Szintillatorcocktail enthielt einen auf Polyphenolen basierenden Aromaten, dessen π-Elektronen durch Energieübertragung von β-Teilchen zur Emittierung von Fluoreszenzlicht angeregt wurde, welches von hochsensitiven Photomultipliern des gekühlten Flüssigkeitsszintillationszählers (Win-Spectral-1414) detektiert wurde. Die pro radioaktivem β-Zerfall induzierten Lichtblitze wurden für jeden Probenansatz nach dreiminütiger Messung als Zerfälle pro min (CPM) quantitativ erfasst und computergestützt (Win-Spectral™-Software) in Excel-Datenblättern registriert. Da während der Fluoreszenzdauer generell keine weiteren Zerfälle gemessen werden können, entsprachen die CPM-Werte nicht der tatsächlichen Anzahl der Zerfälle pro min (*decays per minute*, DPM). Unter Berücksichtigung der Effizienz des WinSpectral-1414 (69,5 %), des Inkubationsvolumens (0,6 ml) sowie der Tages-aktualisierten, spezifischen Aktivität des Radioliganden (ca. 1.000 Ci / mmol) ergaben sich die korrigierten CPM-Werte. Die Berechnung der K_i- bzw. IC₅₀-Werte sowie die graphische Darstellung der kompetitiven Verdrängungskurven und der Bindungskurven in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und -zeit wurden mit Hilfe von GraphPad Prism® (unter Verwendung nichtlinearer Regressionsanalysen in Kombination mit einer "one-site competition" Gleichung ausgeführt.

2.7.5. Radioligand – Rezeptor Interaktion : Rezeptorautoradiographie

2.7.5.1. Rezeptorautoradiographie : Grundlagen

Die theoretischen Grundlagen der Rezeptorautoradiographie zur "Sichtbarmachung" spezifischer Rezeptor-Liganden Interaktion in nicht-fixierten Gewebeschnitten entsprechen denen des Radiorezeptor Bindungsassays (*Kap. MM 2.7.2*). Es handelt sich um ein bildgebendes Verfahren unter Verwendung radioaktiv markierter Liganden sowie photosensitiven Materials zur Lokalisation und pharmakologischen Charakterisierung gewebespezifischer Rezeptorproteine. Mit einem Radionuklid ($[^3\text{H}]$, $[^{35}\text{S}]$, $[^{32}\text{P}]$, $[^{125}\text{I}]$) markierte Liganden zeichnen bei optimierter Versuchsdurchführung (*Kap. MM 2.7.5.3*) nach nicht-kovalenter Bindung an entsprechende Rezeptoren durch "Schwärzungsbilder" (Autoradiogramme) ihre Lokalisation in adäquat präparierten Gewebeschnitten (*Kap. MM 2.7.5.2*) auf einer photochemischen Schicht (fester Autoradiographiefilm, Flüssigemulsion) nach. Dabei reduziert die β - bzw. γ -Strahlung des Radioisotops bei relativ hoher räumlicher Auflösung (rA) in der photosensitiven Beschichtung des Röntgen- bzw. Autoradiographiefilms (rA: 30 μm) bzw. der Flüssigemulsion (rA: bis zu 1 μm) die vorliegenden Silberhalogenid-Kristalle zu atomarem Silber. Die räumliche Auflösung ist dabei abhängig vom Radioisotop, dessen mittlerer Reichweite, der Streubreite der emittierten Strahlung, dem optimalen Kontakt des Präparats mit der Emulsion und der Emulsionsempfindlichkeit (Anzahl der erzeugten Silberkörner pro 100 radioaktiven Zerfälle). Dadurch lassen sich Informationen hinsichtlich der Lokalisation und Quantität der Markierung im Gewebeschnitt über das Schwärzungsmuster des Autoradiogramms densitometrisch gewinnen (Doniach & Pelc 1949; Pelc, 1947; Rogers, 1961).

2.7.5.2. Rezeptorautoradiographie : Anfertigung nicht-fixierter Gewebeschnitte

In der vorliegenden Arbeit sollte die spezifische Bindung von $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$ an membranständige Purinozeptoren in ausgesuchten Gehirnarealen (u.a. MnPO, PVN und ARC des Hypothalamus) adulter Ratten untersucht werden. Als Referenzgewebe diente thorakales Rückenmark adulter Ratten, da für diese neurogliale Struktur die Expression purinergere Rezeptoren mehrfach beschrieben wurde (Xiang et al., 1998; Kobayashi et al., 2005; He et al., 2011; Kobayashi et al., 2013). Analog zu den zuvor beschriebenen Membranbindungsassays für den gesamten Hypothalamus (*Kap. MM 2.7.4*) erfolgte zur pharmakologischen Charakterisierung der markierten Purinozeptoren in einzelnen Gehirnstrukturen, hypothalamischen Kerngebieten sowie im Rückenmark die Durchführung kompetitiver Verdrängungsstudien an Gewebeschnitten (*Kap. MM 2.7.5.3*). Dabei dienten als nicht-markierte Liganden Purinozeptoragonisten (ATP, 2-MeSATP, α,β -meATP, BzATP)

bzw. -antagonisten (Suramin, TNP-ATP). Wie schon zuvor beschrieben, sind die hohe Rezeptoraffinität zum Radioliganden, die Reversibilität der Liganden-Rezeptor Interaktion, die Sättigbarkeit des Rezeptors und die sigmoidale Dosisabhängigkeit der Ligandenbindung am Rezeptor bestimmend (Stoll & Müller, 1991).

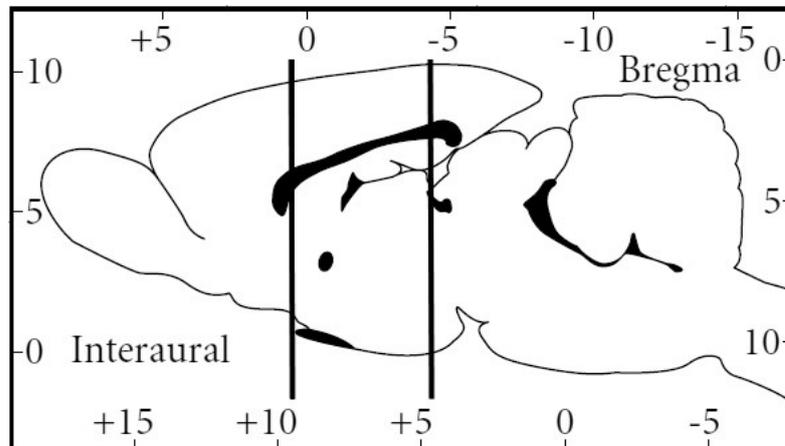


Abb. MM 10: Sagittalschnitt durch das Cerebrum der Ratte.

Aus dem zwischen den schwarzen Linien liegenden Bereich wurden die Gewebeschnitte für die Autoradiographie gewonnen. Der entsprechende Bereich des Gehirns (Bregma 0,5 mm bis -4,5 mm beinhaltet den *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO), den *Nucleus paraventricularis* (PVN) sowie den *Nucleus arcuatus* (ARC) Modifiziert nach Paxinos & Watson (2005).

Analog zu dem in *Kap. MM 2.6.5.2* beschriebenen Vorgehen wurden serielle Kryostat-schnitte (20 µm) in rostro-caudaler Richtung aus Gehirn und TRM hergestellt, auf gekühlte und mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (OT) aufgenommen und anschließend in Schnittkästen auf Eis gelagert. Sowohl hinsichtlich der Gehirn- als auch TRM-Schnitte wurden für den späteren autoradiographischen Purinozeptornachweis pro Versuchsansatz (kompetitive Verdrängungsstudien) jeweils 16 - 20 OT belegt, wobei pro OT lediglich ein (Gehirn) bzw. sechs (TRM) Gewebeschnitte aufgebracht wurden. Für den schonenden aber vollständigen Entzug von Wasser aus den Gewebeschnitten wurden die Objektträger über Nacht bei 4°C in einem Exsikkator unter Vakuum gefriergetrocknet. Die so lyophilisierten Gewebeschnitte wurden in ebenfalls getrockneten, luft- und lichtdichtverschlossenen Objektträgerboxen bei -40°C gelagert.

2.7.5.3 Rezeptorautoradiographie : Kompetitive Verdrängungsstudien

Für die neuropharmakologische Charakterisierung der in Gehirn und TRM exprimierten Rezeptorsubtypen der P2X-Familie wurden kompetitive Verdrängungsstudien bei kon-

stanter Konzentration des Radioliganden [^{35}S]dATP α S (0,65 nM) durchgeführt. Als kompetitive, nicht markierte Agonisten der Purinozeptoren in Hypothalamus bzw. Rückenmark dienten ATP als endogener Agonist, 2-MeSATP, α,β -meATP als P2X $_1$ - und P2X $_3$ -spezifischer Agonist und sowie BzATP als P2X $_1$ - und P2X $_7$ -spezifischer Agonist. Als Antagonisten kamen Suramin und TNP-ATP zum Einsatz, wobei für alle Liganden ein Konzentrationsbereich von 10^{-10} M bis 10^{-4} M (Doppelbestimmungen) gewählt wurde.

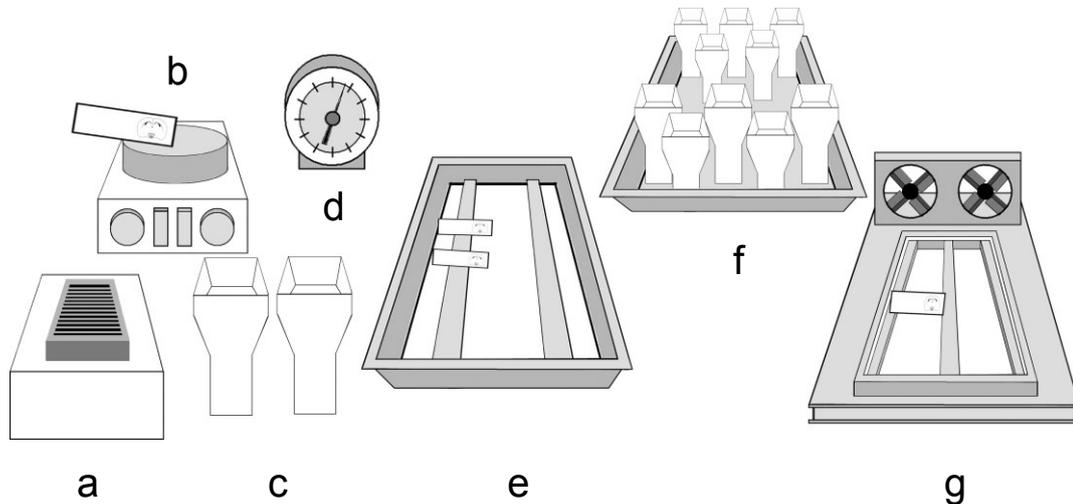


Abb. MM 11: Schematischer Aufbau des Autoradiographiestandes.

(a) Luftdichte Objektträgerbox (OT-Box) auf Trockeneis; (b) Wärmeplatte mit OT (37°C); (c) OT-Küvetten für Präinkubation; (d) Stoppuhr; (e) Wanne mit Aluminiumschienen auf Aluminiumplatte und Eis zur Inkubation der Gewebeschnitte mit Radioligand (und nicht-markierten Liganden) bei 4°C (f) OT-Küvetten auf Eis für Waschvorgang der OT (getrennt in totale (oben) und nicht-spezifische Bindung (unten)); (g) Ventilatorstation zur OT Trocknung.

Modifiziert nach Müller & Gerstberger (1994).

Zur Durchführung kompetitiver Verdrängungsstudien für die Charakterisierung funktionell exprimierter Purinozeptorsubtypen in bestimmten *Nuclei* des Hypothalamus sowie des *Hippocampus* bzw. in Substrukturen der grauen Substanz des TRM erfolgte die Inkubation serieller Gehirn- und TRM-Schnitte mit Radioligand (0,65 nM [^{35}S]dATP α S) und steigenden Konzentrationen an unmarkiertem Kompetitor. Dazu wurde im Abstand von exakt 2 min jeweils ein von max. 16 (8 x 2) OT in folgendes Prozedere eingeschleust:

Der lyophilisiert auf Trockeneis (-80°C) gekühlte OT (Abb.MM 11a) wurde mittels Wärmeplatte bei 37°C für 2 s kurz angewärmt (Abb.MM 11b) und umgehend zur Rehydrierung des(r) gefriergetrockneten Gewebeschnitte(s) in einer Glasküvette mit BSA-haltigem (0,1 %) Rezeptorpuffer bei RT für 20 min einer Präinkubation unterzogen (Abb. MM 11c). Danach erfolgte die Inkubation mit 0,65 nM [^{35}S]dATP α S in Abwesenheit (Gesamt-

bindung = *total binding* = TO) bzw. Anwesenheit eines unmarkierten P2-Rezeptorliganden in einer bestimmten finalen Konzentration (10^{-10} bis 10^{-4} M) durch Überschichten der/ des Gewebeschnitte(s) mit 100 μ l ligandehaltigem Rezeptorpuffer für 40 min bei 4°C auf gekühlten Aluminiumschienen (Abb. MM 11e). Die unspezifische Bindung (*non-specific binding*; NSB) wurde an 1 x 2 OT in Anwesenheit von 10^{-4} M 2-MeSATP ermittelt. Anschließend wurden nichtgebundene Liganden durch dreimaliges Waschen in Waschpuffer bei 4°C für je 2 min vom OT entfernt (Abb. MM 11f). Durch kurzes Dippen des OT in *Aqua bidest.* wurde das Gewebe von Puffersalzen befreit, und zur Trocknung der(s) Gewebeschnitte(s) wurde der OT dem trockenen Luftstrom eines Lüftungssystems exponiert (Abb. MM 11g).

Die OT mit vollkommen getrockneten Gewebeschnitten wurden auf Fotokarton aufgeklebt, in völliger Dunkelheit (Fotolabor) mit einem [35 S]-sensitiven Autoradiographiefilm (BioMax® MR-2) plan überlagert und in einer lichtdichten Röntgenkassette für genau 24 h bei RT exponiert. Die Filmentwicklung erfolgte wiederum bei vollständiger Dunkelheit. Während der Entwicklung des Autoradiographiefilms wurde durch reduzierende Substanzen im Entwickler atomares Silber in metallisches Silber überführt und durch eine lokale Schwärzung (Änderung der optischen Dichte; OD) im entwickelten Film sichtbar.

2.7.5.4. Rezeptorautoradiographie : Datenevaluierung

Unter Verwendung eines Leuchttisches, einer Digitalkamera und des Programmes Photoshop® wurden die Autoradiogramme entsprechender Gehirn- bzw. TRM-Schnitte als 8-bit Graustufen TIFF-Dateien digitalisiert und mit Hilfe des Programms MCID Analysis (Version 7.0) ausgewertet. Dies ermöglichte es, dass jeder Bildpunkt (Pixel) innerhalb des Digitalbildes (Bildmatrix) einen entsprechenden Punkt des Autoradiogramms in Graustufengraduierung repräsentierte und sich somit der entsprechende Wert für die optische Dichte (*optical density* = OD) abrufen ließ. Im Autoradiogramm wurden wichtige *Nuclei* des Hypothalamus wie ARC, MnPO, PVN oder VMH, aber auch *Fornix* und *Hippocampus*, sowie Substrukturen des TRM, als "*regions of interests*" (ROIs) markiert und für jede einzelne Geweberegion die OD-Messwerte erfasst. Die Anzahl der jeweiligen Messwerte variierte zwischen zwei und sechs pro Gewebeschnitt. Die so ermittelten OD-Messwerte wurden mit OD-Werten aus ROIs außerhalb des Autoradiogramms (= Filmhintergrund) normiert. Zudem konnte mit Hilfe eines kommerziellen Radioaktivitätsstandards ([14 C]-Microscales) eine Standardkurve generiert, mit der die ermittelten OD-Werte in Relation zur gebundenen Radioaktivität im Gewebe (nCi / g) gesetzt werden konnten. Dadurch wurde eine quantitative Erfassung der Radioligandenbindung er-

möglichst. Die OD-Werte von Doppelbestimmungen wurden gemittelt, und letztlich die arithmetischen Mittelwerte und S.E.M. für die *Locus*-spezifischen ODs von 3 - 4 Tieren errechnet. Mit Hilfe von GraphPad Prism® 5 wurden analog zu *Kap. MM 2.7.4.3* unter Verwendung einer nichtlinearen Regressionsanalyse in Kombination mit einer "*one-site competition*" Gleichung der Verlauf der jeweiligen kompetitiven Verdrängungskurve graphisch dargestellt sowie der K_i -Wert bzw. IC_{50} -Wert ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Quantitative *real-time* PCR

Mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR (qRT-PCR) sollte die relative mRNA-Expression ionotroper Purinozeptorsubtypen (P2X₁ - P2X₇) sowohl im Bereich des hypothalamischen Kerngebietes ARC adulter und neonataler (genauer: früh-postnataler) Tiere als auch in neuroglialen, ARC-angereicherten Primärkulturen quantitativ erfasst werden, welche aus Gehirnschnittpräparationen früh-postnataler Ratten hergestellt wurden (*Kap. MM 2.4 - 2.6*). Die für den ARC erhaltenen Daten sollten zudem mit parallel erarbeiteten Werten für den MnPO verglichen werden, einem hypothalamischen *Nucleus*, welcher Zielstruktur einer früheren Promotionsarbeit der Arbeitsgruppe darstellte (Hitzel, 2009). Für den Vergleich der basalen Expressionsraten der verschiedenen P2XR-Zielgene wurde als Kalibrator das jeweils am geringsten exprimierte Zielgen verwendet.

3.1.1. Expression ionotroper Purinozeptoren im ARC adulter Wistar-Ratten

In den Gewebeproben des hypothalamischen ARC adulter Wistar-Ratten konnten alle sieben P2X-Purinozeptorsubtypen auf mRNA-Expressionsebene nachgewiesen werden. Die mRNA spezifisch für den Rezeptorsubtyp P2X₅ erwies sich dabei als am geringsten exprimiert und diente somit für die Expressionsanalyse als Kalibrator. In *Abb. ERG 1A* sind die relativen mRNA-Expressionsraten für P2X₁R bis P2X₇R in Relation zu derjenigen für P2X₅R als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M (n = 3) dargestellt. Dabei zeigten sich P2X₂R, P2X₄R resp. P2X₆R als 816 ± 138 fach, 368 ± 65 fach resp. 396 ± 87 fach stärker exprimiert als P2X₅R. Für die P2X₇R-spezifische mRNA-Expression konnte ein um den Faktor 127 ± 8 höherer Wert ermittelt werden, wohingegen die mRNA für die Purinozeptorsubtypen P2X₁ respektive P2X₃ lediglich 7 ± 1 fach respektive 32 ± 6 fach stärker exprimiert waren als die für P2X₅R-spezifische mRNA.

3.1.2. Expression ionotroper Purinozeptoren im ARC neonataler Wistar-Ratten

Wie schon für den ARC adulter Tiere nachgewiesen, zeigten auch die Gewebeproben des ARC 3 - 5 Tage alter Wistar-Ratten die geringste mRNA-Expressionsrate für den P2X₅-Purinozeptorsubtyp. In Relation zum P2X₅R-spezifischen mRNA-Gehalt ergaben sich für die jeweiligen mRNAs der Rezeptorsubtypen P2X₂, P2X₄ respektive P2X₆ im arithmetischen Mittel (\pm S.E.M.) (n = 4) um das 711 ± 108 fach, 435 ± 63 fach respektive 650 ± 168 fach erhöhte Werte (*Abb. ERG 1C*). In den untersuchten Gewebeproben erwies sich die mRNA-Expression für die beiden Subtypen P2X₁R und P2X₃R im Durch-

schnitt als 18 ± 3 fach resp. 23 ± 3 fach im Vergleich zu derjenigen des P2X₅R-Subtyps erhöht.

3.1.3. Expression ionotroper Purinozeptoren in der neuroglialen ARC-Primärkultur

Auch für die neurogliale ARC-Primärkultur wurde der Purinozeptorsubtyp P2X₅ als Kalibrator für die Expressionsanalyse herangezogen. Die graphische Darstellung der relativen Expressionsstärken einzelner P2X-Purinozeptorsubtypen in Relation zu P2X₅R wird in *Abb. ERG 1E* gezeigt. Die P2XR-Subtypen P2X₄ respektive P2X₆ erwiesen sich im arithmetischen Mittel ($n = 3$) als 148 ± 5 fach resp. 104 ± 8 fach höher exprimiert als P2X₅R. Sowohl P2X₂R als auch P2X₃R waren 55 ± 3 mal resp. 58 ± 5 mal stärker exprimiert, verglichen mit dem Kalibrator. Der relative mRNA-Gehalt für den P2X₁R resp. P2X₇R war 27 ± 4 fach resp. 14 ± 1 fach höher als für den P2X₅R.

3.1.4. Vergleichende Betrachtung: Expression ionotroper Purinozeptoren im ARC

Ein absoluter Vergleich des mRNA-Gehaltes zwischen den drei verschiedenen Datensätzen (hypothalamischer ARC adulter bzw. neonataler Ratten, ARC-angereicherte Primärkultur) war aus präparationsbedingten Gründen sowie aufgrund der jeweils geringen zur Verfügung stehenden RNA-Menge und dem daraus resultierenden Einsatz unterschiedlicher RNA-Konzentrationen für die qRT-PCR (*Kap. MM .2.8*) nicht möglich. Dennoch konnte durch Relativierung auf das jeweils am niedrigsten exprimierte Zielgen (P2X₅R) ein nahezu kongruentes Expressionsmuster im direkten Vergleich adulter und früh-postnataler Ratten verifiziert werden. So erwiesen sich die Rezeptorsubtypen P2X₂, P2X₄ und P2X₆ als dominant, P2X₁ und P2X₃ als marginal nachweisbar. Für die 3 - 4 Tage nach Präparation der Gehirne 4 - 6 Tage alter Ratten in Primärkultur ausdifferenzierten neuroglialen Zellen des ARC hingegen zeigten die P2XR-Subtypen P2X₄ und P2X₆ die höchsten Expressionsprofile, gefolgt von P2X₂ und P2X₃ (*Abb. ERG 1A,C,E*). Wiederum war die P2X₅R-spezifische mRNA die am geringsten transkribierte aller P2X-Purinozeptor-spezifischen mRNAs. Bei vergleichbaren Expressionsmustern auf mRNA-Ebene für P2X-Purinozeptoren im ARC der adulten ($P2X_2 > P2X_4 = P2X_6 > P2X_7 > P2X_3 > P2X_1 = P2X_5$) vs. neonatalen Ratte ($P2X_2 = P2X_6 > P2X_4 > P2X_7 \gg P2X_1 = P2X_3 > P2X_5$) wurde in der ARC-spezifischen Primärkultur die relative Zunahme der mRNAs für die P2X₃R- und P2X₄R-Subtypen bei gleichzeitig partieller Reduktion der P2X₂R-Expression deutlich.

3.1.5. Expression ionotroper Purinozeptoren im MnPO adulter Wistar-Ratten

In den Gewebeproben des MnPO adulter Ratten konnte mittels RT-PCR mRNA aller P2X-Purinozeptorsubtypen detektiert werden, wobei vergleichbar zur Situation im ARC die mRNAs für P2X₁R und P2X₅R am geringsten nachweisbar waren. Für die relative Kalibrierung aller Subtypen wurde diesmal das Transkript des P2X₁R zugrunde gelegt, bei jedoch lediglich zweifach höherer Expressionsrate für den P2X₅R und 4 ± 1 facher für den P2X₃R (*Abb. ERG 1B*). Im arithmetischen Mittel ($n = 3$) wurden Subtypen P2X₄R resp. P2X₇R 116 ± 12 fach resp. 108 ± 7 fach stärker exprimiert als P2X₁R. Der mRNA-Gehalt der beiden Purinozeptorsubtypen P2X₂ resp. P2X₆ erwies sich als 47 ± 4 fach bzw. 42 ± 8 fach gegenüber demjenigen für P2X₁R erhöht.

3.1.6. Expression ionotroper Purinozeptoren im MnPO neonataler Wistar-Ratten

Der Purinozeptorsubtyp P2X₅ war in der Auswertung des hypothalamischen Kerngebiets des MnPO früh-postnataler Wistar-Ratten am niedrigsten exprimiert. Die relative mRNA-Expression der einzelnen ionotropen P2X-Rezeptoren in Relation zu P2X₅ ist in *Abb. ERG 1D* dargestellt. Im arithmetischen Mittel ($n = 4$) wurden für die P2XR-Subtypen P2X₂, P2X₄ resp. P2X₇ 256 ± 66 fach, 160 ± 41 fach resp. 78 ± 9 fach höhere Expressionsraten im Vergleich zum Kalibrator P2X₅R ermittelt. Für die Purinozeptorsubtypen P2X₁, P2X₃ und P2X₆ konnten deutlich geringere mRNA-Gehalte ermittelt werden, mit Werten von 3 ± 1 fach, 6 ± 1 fach und 26 ± 8 fach höher als für die mRNA des Kalibrators.

3.1.7. Expression ionotroper Purinozeptoren in der neuroglialen MnPO-Primärkultur

Wie schon für Gewebeproben des MnPO neonataler Ratten bestimmt, so wies auch in der daraus gewonnenen Primärkultur der Rezeptorsubtyp P2X₅ die geringste Expressionsrate auf und wurde somit in der Analyse als Kalibrator eingesetzt. Der höchste Wert konnte für den P2X₄R ermittelt werden, mit einer 72 ± 6 fach ausgeprägteren mRNA-Expression verglichen mit derjenigen für den P2X₅R. In der Auswertung wurde erfasst, dass die mRNA-Konzentrationen aller verbleibenden P2XR-Subtypen auf vergleichbarem Expressionsniveau 10 - 20 fach höher waren als diejenige für P2X₅R. Sowohl für den Subtyp P2X₂R als auch P2X₆R wurde im arithmetischen Mittel ($n = 3$) eine 20 ± 3 fach höhere mRNA-Konzentration relativ zu derjenigen für den P2X₅R errechnet, während diejenigen für P2X₁R, P2X₃R resp. P2X₇R sich lediglich auf das 11 ± 2 fache, 14 ± 3 fache resp. 14 ± 1 fache beliefen (*Abb. ERG 1F*).

3.1.8. Abschließende Betrachtung: Expression ionotroper Purinozeptoren im MnPO

Sowohl den neonatalen als auch adulten, neuroglialen MnPO betreffend, zeigten sich die Purinozeptorsubtypen P2X₂, P2X₄, P2X₇ sowie partiell auch P2X₆ als dominant exprimiert. Dabei ergaben sich hinsichtlich der Rangfolge marginal differentielle Expressionsmuster zwischen adultem (P2X₄ = P2X₇ > P2X₂ = P2X₆) vs. früh-postnatalem Status (P2X₂ = P2X₄ > P2X₇ > P2X₆). In der neuroglialen MnPO-Primärkultur hingegen wies der P2X₄R eindeutig das höchste Expressionsniveau auf, mit gegenüber dem intakten MnPO der neonatalen Tiere anteilmäßig vermindertem mRNA-Gehalt für den P2X₂R. Ein absoluter Vergleich des mRNA-Gehaltes zwischen den drei verschiedenen Datensätzen (hypothalamischer MnPO adulter bzw. neonataler Ratten, MnPO-spezifische Primärkultur) war aus präparationsbedingten Gründen sowie aufgrund der jeweils geringen zur Verfügung stehenden extrahierten RNA-Menge und dem daraus resultierenden Einsatz unterschiedlicher RNA-Konzentrationen für die qRT-PCR (Kap. MM 2.8) nicht möglich.

3.1.9. Vergleichende Analyse der P2XR Expressionsmuster in ARC und MnPO

Der im direkten Vergleich der P2XR-Subtyp-spezifischen Expressionsmuster zwischen den Kerngebieten ARC und MnPO der adulten Ratte auffälligste Unterschied ergab sich hinsichtlich der ausgeprägt hohen, relativen mRNA-Expression für den P2X₇-Purinozeptorsubtyp im Bereich des MnPO, bei ansonsten dominanter Expression der P2X₂-, P2X₄- und P2X₆-Rezeptorsubtypen in beiden *Nuclei*. Auch während des früh-postnatalen Entwicklungsstadiums der Tiere wiesen beide Kerngebiete hohe Expressionsraten für P2X₂R und P2X₄R, der ARC auch noch für P2X₆R auf. In den auf diesem Alterstadium der Ratten (4 - 6 Tage postnatal) etablierten Primärkulturen ergaben sich nach 3 - 4 tägiger Kultivierung für beide Kerngebiete eine relative Reduktion resp. Zunahme der mRNA-Expression für den P2X₂R resp. P2X₃R.

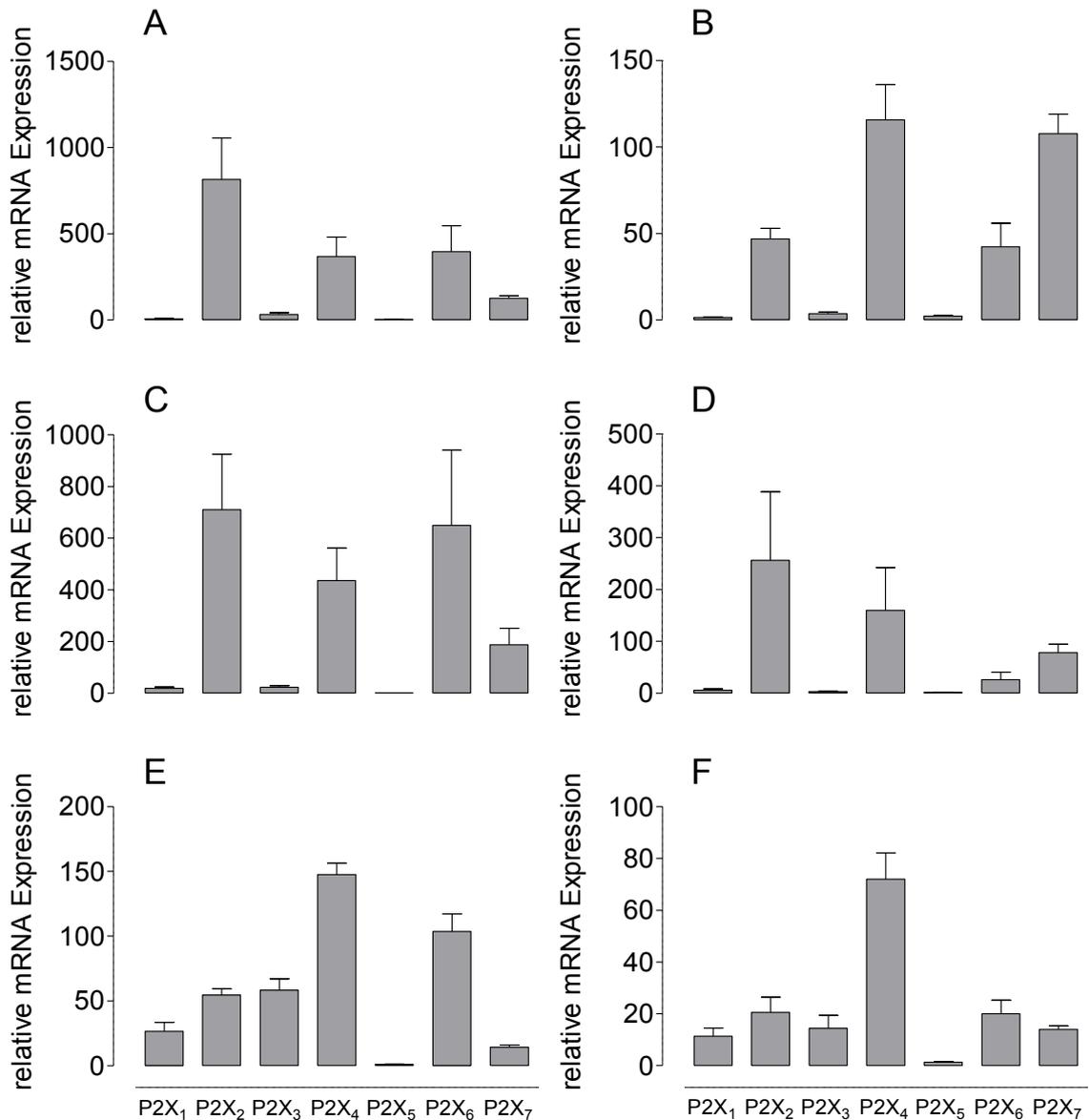


Abb. ERG 1: Relative mRNA-Expression ionotroper Purinozeptoren im ARC resp. MnPO adulter und neonataler Ratten, sowie in den neuroglialen Primärkulturen des ARC bzw. MnPO (N = 3 - 4)

- A:** Expression von P2X₁ – P2X₇ im ARC adulter Ratten. Kalibrator war der am niedrigsten exprimierte P2X-Rezeptorsubtyp (P2X₅)
- B:** Expression von P2X₁ – P2X₇ im MnPO adulter Ratten. Kalibrator war der am niedrigsten exprimierte P2X-Rezeptorsubtyp (P2X₁)
- C:** Expression von P2X₁ – P2X₇ im ARC neonataler Ratten. Kalibrator war der am niedrigsten exprimierte P2X-Rezeptorsubtyp (P2X₅)
- D:** Expression von P2X₁ – P2X₇ im MnPO neonataler Ratten. Kalibrator war der am niedrigsten exprimierte P2X-Rezeptorsubtyp (P2X₅)
- E:** Expression von P2X₁ – P2X₇ in der ARC-Primärkultur. Kalibrator war der am niedrigsten exprimierte P2X-Rezeptorsubtyp (P2X₅)
- F:** Expression von P2X₁ – P2X₇ in der MnPO-Primärkultur. Kalibrator war der am niedrigsten exprimierte P2X-Rezeptorsubtyp (P2X₅)

3.2. Immunzytochemische Charakterisierung der neuroglialen Primärkultur des *Nucleus arcuatus*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde, neben den am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie bereits etablierten Primärkulturen aus verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus bzw. der *Medulla oblongata* neonataler Wistar-Ratten, für die detaillierte Charakterisierung purinerger Rezeptorproteine *de novo* eine ARC-angereicherte, neurogliale Primärkultur erarbeitet (Kap. MM 2.6.4). Wie schon erwähnt, dienten im Rahmen der Präparation des bilateralen ARC aus coronalen, seriellen Vibratomschnitten des früh-postnatalen Rattengehirns unter dem Binokular vor allem der V-III, der lensiforme DMH und die *Eminentia mediana* (EM oder ME) als wichtige "landmarks".

Hinsichtlich der Etablierung einer neuroglialen ARC-Primärkultur in Form einer Mikrokultur zur Minimierung der einzusetzenden Anzahl an neonatalen Ratten wurde die durch mechanische und enzymatische Dissoziation erhaltene Zellsuspension (Kap. MM 2.4.2) nach Erfassung der Zellzahl pro Volumeneinheit in einer Neubauer-Zählkammer auf eine Zelldichte von durchschnittlich 32.000 Zellen pro ml (ca. 13.000 Zellen pro Mikrokulturkammer) verdünnt. Nach 3 - 4 tägiger Kultivierung bis zur vollständigen Differenzierung der verschiedenen Zelltypen wurden einzelne "wells" entweder der funktionellen Analyse mittels Kalzium Ratio-Imaging (Kap. ERG 3.3) oder dem immunzytochemischen Nachweis ARC-spezifischer Neurotransmitter ("coding") (Kap. ERG 3.2.2) zugeführt.

3.2.1. Immunzytochemische Charakterisierung der neuroglialen Zelltypen in der ARC-Primärkultur

Mit Hilfe von Primärantikörpern / -seren gegen Zelltyp-spezifische Markerproteine wurden die verschiedenen Zelltypen der neuroglialen Mischkultur typisiert. Dafür wurde der absolute und prozentuale Anteil (Abb. ERG 3) an Neuronen, Astrozyten, Mikrogliazellen und Oligodendrozyten immunzytochemisch in je einem "well" von sieben verschiedenen Zellpräparationen bestimmt. Im arithmetischen Mittel ergaben sich pro "well" der ARC-Primärkultur 1.900 ± 170 Neurone (entsprechend 34 %), 3.300 ± 250 Astrozyten (ca. 60 %) sowie 300 ± 95 mikrogliale Zellen (ca. 5 %) (Abb. ERG 2). Der prozentualen Anteile der in der ARC-Zellkultur vorkommenden Zelltypen ist in Abb. ERG 3 nochmals graphisch dargestellt. Erstaunlicherweise konnten - im Unterschied zu bis dato allen anderen Primärkulturen des Hypothalamus bzw. der *Medulla oblongata*, keine Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Hatzelmann, 2012; Hitzel, 2009; Ott et al., 2010; Wuchert et al., 2008).

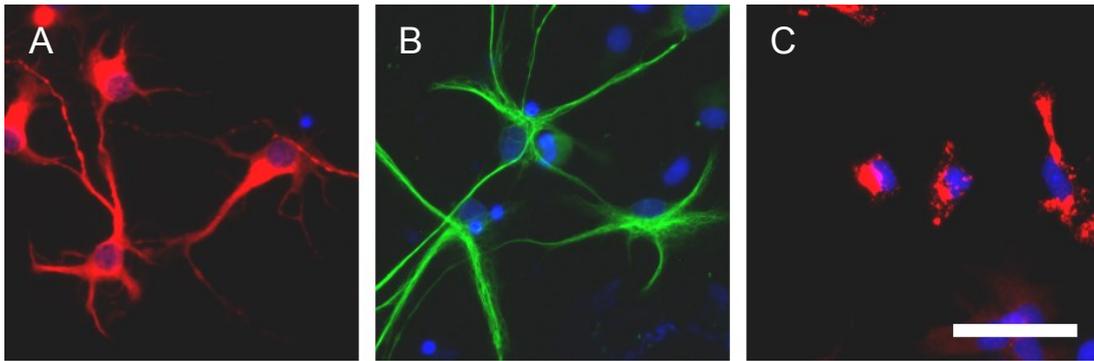


Abb. ERG 2: Immunzytochemische Identifizierung der Zellen in der ARC-Primärkultur neonataler Ratten

- A:** Indirekter Immunfluoreszenznachweis von Neuronen mittels monoklonalem mouse anti-MAP_{2a+2b} Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3TM-gekoppeltes goat anti-mouse IgG eingesetzt (**rot**).
- B:** Markierung von Astrozyten mittels polyklonalem rabbit anti-GFAP Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 -gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (**grün**).
- C:** Identifizierung von Mikrogliazellen durch den monoklonalen mouse anti-CD68 Antikörper. Als sekundärer Antikörper fungierte Cy3TM -gekoppeltes goat anti-mouse IgG (**rot**).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (**blau**).

Der Größenmarker entspricht 50 µm.

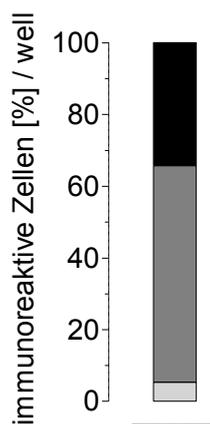


Abb. ERG 3: Prozentualer Anteil der immunzytochemisch nachgewiesenen Zelltypen in der neuroglialen ARC-Primärkultur

Die Ermittlung der prozentualen Anteile in der ARC-Zellkultur immunzytochemisch nachweisbarer Zelltypen wurde mit Hilfe von Marker-spezifischen Antikörpern / -seren durchgeführt: Neurone (MAP_{2a+2b} immunopositiv, schwarzer Balken), Astrozyten (GFAP immunopositiv, dunkelgrauer Balken) und Mikrogliazellen (ED1 immunopositiv, hellgrauer Balken) (N = 7). Oligodendrozyten und Endothelzellen waren nicht nachweisbar.

3.2.2. Immunhistochemischer Nachweis wichtiger Neurotransmittersysteme im *Nucleus arcuatus* der adulten Ratte

Mit Hilfe der in *Kap. MM 2.6.2* beschriebenen Methode der indirekten Immunfluoreszenz wurden in transkardial fixierten coronalen Gehirnschnitten zwei Monate alter Ratten (*Kap. MM 2.6.5*) auf der Ebene des ARC und der Hypophyse spezifische Markierungen für die Neuropeptide ACTH (resp. POMC), NPY, SOM, NT-1 und TH als Schlüsselenzym der Dopamin (DA) -Biosynthese detektiert.

Überwiegend wurden die immunhistochemischen Markierungen für ACTH (resp. POMC) als klar erkennbare Perikaryen sowie neuronale *Punctata* (potentielle Synapsen) und kurze Faserstrukturen in den medialen und lateralen Aspekten des ARC (*Abb. ERG 4*), sowie ACTH-positiver Somata in der Adenohypophyse (nicht gezeigt) beobachtet. Nach quantitativer Auswertung von durchschnittlich sechs coronalen Gehirnschnitten auf der Ebene des ARC von drei Ratten wurden im arithmetischen Mittel 13 ± 6 ACTH-immun-

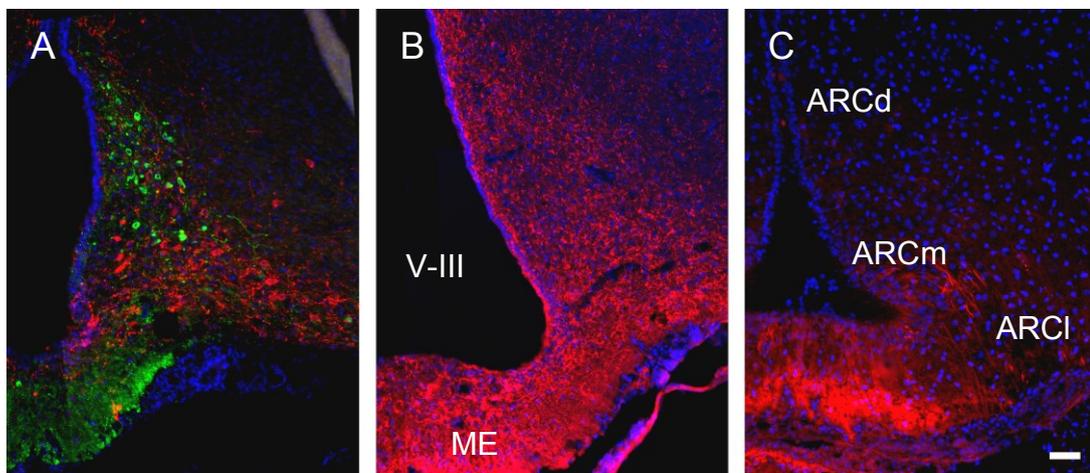


Abb. ERG 4: Immunhistochemischer Nachweis wichtiger Neurotransmitter- bzw. Neurohormonsysteme im *Nucleus arcuatus* der adulten Ratte

Immunhistochemische Markierung wichtiger Neurotransmitter-Systeme in coronalen Gefrierschnitten des perfusionsfixierten (4 % PFA) Gehirns adulter Ratten auf der Ebene des *Nucleus arcuatus* (ARC).

- A:** Indirekter Immunfluoreszenznachweis von POMC-immunpositiven Neuronen mittels polyklonalem rabbit anti-ACTH Antiserum und dopaminergen Neuronen mittels monoklonalem mouse anti-TH Antikörper. Als sekundäre Antikörper wurde Cy3TM-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG (rot) sowie Alexa® 488 -gekoppeltes donkey anti-mouse IgG (grün) eingesetzt.
- B:** Indirekter Immunfluoreszenznachweis NPY-immunpositiver Neurone mittels polyklonalem rabbit anti-NPY Antiserum. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3TM-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (rot).
- C:** Indirekter Immunfluoreszenznachweis SOM-immunpositiver, neuronaler Fasern und *Punctata* mittels polyklonalem rabbit anti-NPY Antiserum. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3TM-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (rot).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau).

Der Größenmarker entspricht 50 µm.

Abkürzungen: ARCd = *Nucleus arcuatus dorsalis*, ARCM = *Nucleus arcuatus medialis*, ARCI = *Nucleus arcuatus lateralis*, ME = EM = *Eminentia mediana*, V-III = *Ventriculus tertius cerebri*

positive Nervenzellen pro Gehirnschnitt und Ratte detektiert, wobei auf den medialen (ARCM) resp. lateralen (ARCL) Bereich des ARC 8 ± 3 resp. 5 ± 2 ACTH-erge Neurone entfielen (*Abb. ERG 4A*).

Zur Dokumentation dopaminerger Neurone wurde ein monoklonaler, TH-spezifischer Primärantikörper verwendet, und TH-immunpositive Zellen wurden u.a. in den dorsalen und medialen Substrukturen des ARC, sowie offensichtlich Axonen im Bereich der EM *externa* markiert (*Abb. ERG 4A*). Bei quantitativer Auswertung immunhistochemischer Präparate mit Doppelmarkierung für TH sowie ACTH in je sechs coronalen Gehirnschnitten von drei Tieren konnten für den gesamten ARC im arithmetischen Mittel 40 ± 7 Zellen immunopositiv für TH ermittelt werden, wobei 23 ± 3 , 13 ± 2 resp. 4 ± 2 im dorsalen (ARCD), medialen (ARCM) resp. lateralen (ARCL) Bereich des Kerngebietes lokalisiert werden konnten. Es ergab sich in keinem Fall eine Kolokalisation mit ACTH-ergen Nervenzellen (*Abb. ERG 4A*).

Der Nachweis einer immunreaktiven NPY-Markierung (*Abb. ERG 4B*) in den mit 4 % PFA transkardial perfundierten Rattengehirnen ermöglichte es nur in wenigen Fällen, Perikaryen NPY-erger Neurone zu markieren, wohingegen Axone sowie *Punctata* im Bereich des gesamten ARC sowie der EM in hoher Dichte demonstriert werden konnten. Bei NPY handelt es sich um ein fragiles, enzymatisch sehr schnell abbaubares Neuropeptid, das sich im Zytosol des neuronalen Zellkörpers meist nur unter Bedingungen einer *in vivo* erfolgten, intracerebroventrikulären Behandlung mit Colchizin immunhistochemisch detektieren lässt (Håkansson et al., 1996). NPY-erge Neurone würden dann vor allem im ventromedialen ARC zu finden sein (Collén et al., 2010; Meister et al., 2006). Ähnlich verhielt es sich für den immunhistochemischen Nachweis Somatostatin- bzw. Neurotensin-positiver Neurone; auch in diesem Fall ließen sich lediglich in postfixierten Gehirnschnitten mit den unter *Kap. MM 2.6.5* aufgeführten polyklonalen anti-SOM bzw. anti-NT1 Antiserum immunreaktive Fasern im mediolateral ARC sowie der EM aufzeigen (*Abb. ERG 4C*).

3.2.3. Immunhistochemischer Nachweis wichtiger Neurotransmittersysteme in der Primärkultur des *Nucleus arcuatus*

Nicht nur in immunhistochemischen Untersuchungen im Bereich des ARC adulter Ratten (*Kap. ERG 3.2.2*) sondern vor allem auch in vergleichenden, immunzytochemischen Studien an den Primärkulturen des früh-postnatalen ARC wurden Häufigkeiten und mögliche Kolokalisationen einiger für den ARC typischen Neurotransmittersysteme (Chronwall, 1985; Chronwall & Zukowska, 2004; Cowley et al., 2003; Gruber & Callahan, 1989;

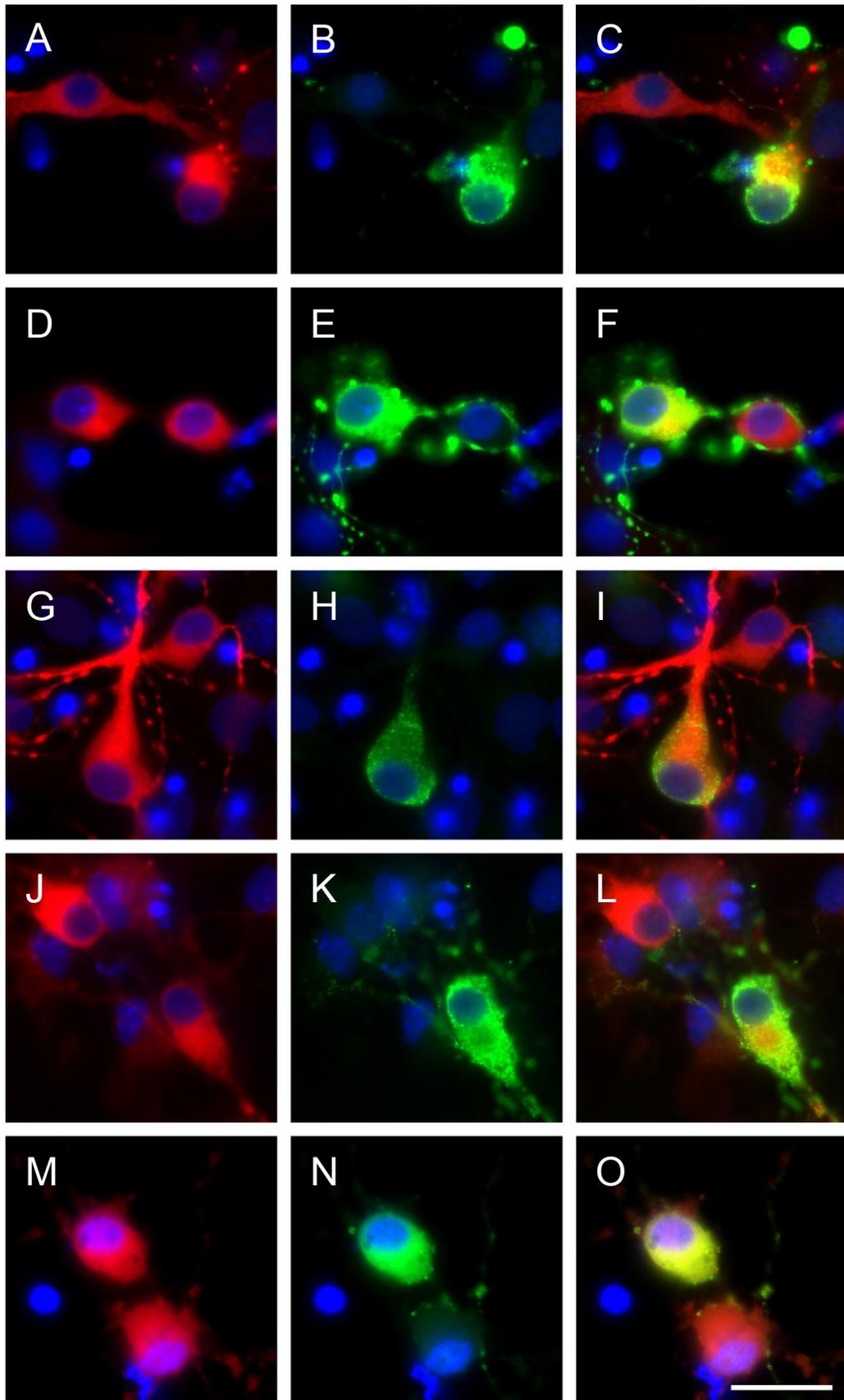


Abb. ERG 5: Immunzytochemischer Nachweis von ACTH, NPY, NT1, SOM und TH in Neuronen der ARC-Primärkultur neonataler Ratten

Die Abbildungen der linken Spalte zeigen die immunzytochemische Markierung entweder für das Neuronen-spezifische Markerprotein MAP_{2a+2b} (**A, D, G, J**) oder Neuronen-spezifische Enolase (NSE) (**M**). Als Primärantikörper /-seren dienten ein monoklonaler mouse anti-MAP_{2a+2b} Antikörper bzw. ein polyklonales rabbit anti-NSE Antiserum; als Sekundärantikörper wurde Cy3TM-gekoppeltes goat anti-mouse IgG bzw. Cy3TM-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (**rot**).

Die Abbildungen der mittleren Spalte zeigen die immunzytochemische Markierung für ACTH (**B**), NPY (**E**), NT1 (**H**), SOM (**K**) und TH (**N**). Als Primärantikörper/-seren dienten polyklonale rabbit anti-Neuropeptid Antisera und lediglich im Falle des TH-Nachweises ein monoklonaler mouse anti-TH Antikörper; als Sekundärantikörper wurden Alexa® 488 -gekoppeltes donkey anti-rabbit bzw. anti-mouse IgG (**grün**) eingesetzt.

Die Abbildungen der rechten Spalte zeigen die digitale Überlagerung beider immunzytochemischen Nachweise (Doppelmarkierungen), wodurch sich in einigen Fällen eine **gelbe** Markierung ergibt.

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (**blau**).

Der Größenmarker entspricht 25 µm.

1989; Li & Pelletier, 1986) durch den Expressionsnachweis für ACTH-, NPY-, NT1-, SOM- bzw. TH-erge Neurone analysiert. Dabei sollte die jeweilige Häufigkeitsverteilung zunächst der Zuordnung der genannten Transmitter- bzw. Neuromodulatorsysteme zu bestimmten Neuronengruppen der ARC-angereicherten Primärkultur dienen. Dazu wurden in "wells" mehrerer Zellpräparationen im Rahmen immunzytochemischer Doppelmärkierungen einerseits die Anzahl MAP_{2a+2b}- bzw. NSE-immunpositiver Zellen (= Neurone) sowie andererseits die Anzahl der ein entsprechendes Neuropeptid synthetisierenden Neurone bestimmt. Letztlich erfolgte dann eine mikroskopisch exakte Analyse und quantitative sowie prozentuale Ermittlung der doppelmarkierten Neurone (*Abb. ERG 5*; *Tab. ERG 1*). Dabei konnte in einigen Fällen die zytosolisch-granuläre Speicherung des jeweiligen Neuropeptides im Bereich des Perikaryon, aber auch den "beaded structures" der axonalen und / oder dendritischen Zellausläufer sowie den offensichtlich Synapsen repräsentierenden *Punctata* demonstriert werden (*Abb. ERG 5*).

Für jeden Versuchsansatz erfolgte die Bestimmung der Anzahl Neurotransmitter- bzw. Neuronenmarker-positiver Zellen als arithmetischer Mittelwert (\pm S.E.M.) von 6 - 9 analysierten "wells", basierend auf 5 - 7 Zellpräparationen, sowie der Errechnung des jeweils prozentualen Anteils Neuropeptid bzw. TH exprimierender Neurone an der Gesamtzahl immunzytochemisch identifizierter Neurone (*Tab. ERG 1*). In *Abb. ERG 5* finden sich zudem für jede Doppelmärkierung für neuronales Markerprotein und eines der genannten Neuropeptide bzw. TH exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen. Im Gegensatz zur zytosolisch uniformen Markierung des neuronalen Strukturproteins MAP_{2a+2b} bzw. des Neuronen-spezifischen Enzyms NSE (*Abb. ERG 5A,D,G,J,M*) zeigte die indirekte Immunfluoreszenz für den Nachweis der Neuropeptide oft positiv markierte zytosolische Speichergranula bzw. potentielle Golgivesikel (z.B. *Abb. ERG 5B,H,K*).

In der ARC-angereicherten Primärkultur erwiesen sich 94 ± 30 und somit $4,5 \pm 0,7$ % der durchschnittlich 1902 ± 328 MAP_{2a+2b}-immunopositiven Zellen, und damit Neurone, als ACTH-erg. In sehr geringer Anzahl zeigten sich auch einige MAP_{2a+2b}-immunonegative Zellen als ACTH-positiv markiert. Dies könnte bedeuten, dass z.B. potentiell marginal differenzierte Neurone nicht das Mikrotubuli-assoziierte Protein (2a+2b) exprimierten. Der Anteil NPY-erger Neurone (294 ± 55) an der Gesamtzahl aller immunzytochemisch als MAP_{2a+2b} exprimierende Neurone charakterisierten Zellen (2134 ± 304 pro "well") belief sich im Mittel (sieben Zellpräparationen, sieben "wells") auf $15,0 \pm 3,3$ %. Dabei konnte das oft zu verzeichnende Phänomen aufgezeigt werden, dass u.a. fragile Neuropeptide wie das NPY sich immunhistochemisch zwar kaum zellulär im Gewebsschnitt (Kap. ERG 3.2.2), wohl aber immunzytochemisch in einer Primärkultur (oder generell Zellkultur) nachweisen lassen, zurückzuführen auf den reduzierten oder verlangsamten axonalen Transport des Neuropeptides. In sechs "wells" aus fünf Zellpräparationen zeigten 433 ± 108 Zellen und damit $17,3 \pm 3,9$ % aller immunzytochemisch charakterisierten Neurone (2636 pro "well") eine Expression des Neuromodulators NT1 (Abb. ERG 6G-I; Tab. ERG 2). Die Morphologie der NT1-positiven Neurone variierte von kleinvolmig und rund bis zu mittelvolmig und multipolar.

| | Anzahl der Neuropeptid / Neuronenmarker-immunopositiven Zellen pro "well" | Anteil der Neuropeptid immunpositiven Neurone [%] | Anzahl der analysierten "wells" | Anzahl der Zellpräparationen |
|------|---|---|---------------------------------|------------------------------|
| ACTH | 94 / 1902 | $4,5 \pm 0,7$ | 6 | 5 |
| NPY | 294 / 2134 | $15,0 \pm 3,3$ | 7 | 7 |
| NT1 | 433 / 2636 | $17,3 \pm 3,9$ | 6 | 5 |
| SOM | 215 / 2499 | $8,7 \pm 2,7$ | 6 | 5 |
| TH | 186 / 1633 | $11,6 \pm 1,5$ | 9 | 7 |

Tab. ERG 1: Neuronale Expression verschiedener Neurotransmitter bzw. Neuromoduloren in der ARC-angereicherten Primärkultur

Mittels indirekter Immunzytochemie und dem Einsatz fluorophorgekoppelter Sekundärantikörper wurden Doppelmarkierungen für den Nachweis (1) eines gut charakterisierten, Neuronen-spezifischen Proteins (MAP_{2a+2b} bzw. NSE) sowie (2) eines der Neuropeptide adrenocorticotrophes Hormon (ACTH), Neuropeptid Y (NPY), Neurotensin (NT1) oder Somatostatin (SOM) sowie Tyrosinhydroxylase (TH) als Schlüsselenzym der Dopamin-Biosynthese durchgeführt.

Die Anzahl der Neuronenmarker- sowie Neurotransmitter- immunpositiven Zellen (= Neurone) sind als Mittelwerte dargestellt (Spalte 1), errechnet aus der Anzahl der analysierten "wells" (Spalte 3). Der jeweils prozentuale Anteil doppelmarkierter Neurone, bezogen auf die Gesamtzahl ermittelter Neurone (Spalte 2), ist als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. der analysierten Anzahl an "wells" (Spalte 3) dargestellt.

Im Rahmen der Auswertung zur Doppelmarkierung SOM- und/oder MAP_{2a+2b} immunopositiver Zellen der ARC-Primärkultur wurde bei 215 ± 93 SOM-immunreaktiven Zellen pro "well", basierend auf den Daten von sechs "wells" aus fünf Zellpräparationen, ein Prozentsatz von 8,7 ± 2,7 % SOM-erger Neurone errechnet, bei einer mittleren Neuronenzahl pro "well" von 2499 ± 389. Da für den immunzytochemischen Nachweis der Tyrosinhydroxylase ein monoklonaler mouse anti-TH Antikörper zum Einsatz kam, erfolgte die Markierung aller Neurone mit einem polyklonalen rabbit anti-NSE Antiserum, wobei im arithmetischen Mittel pro "well" 1633 ± 231 NSE immunopositive Zellen ermittelt wurden. Bei gleichzeitiger Detektion von 186 ± 37 für TH-immunreaktiven Zellen, errechnet aus den neun für diese Versuchsreihe eingesetzten "wells" aus sieben Zellpräparationen, ergab sich ein prozentualer Anteil TH-positiver Neurone von 11,6 ± 1,5 % aller NSE immunpositiven Zellen. Während MAP_{2a+2b} sowohl im Soma als auch den Dendriten, kaum jedoch axonal, lokalisiert werden konnte (Abb. ERG 5G), beschränkte sich die Markierung für NSE nahezu ausschließlich auf das Zytoplasma des Perikaryon (Abb. ERG 5M).

Dopamin (DA) repräsentiert einen der markantesten "klassischen" Neurotransmitter des ZNS und vor allem des ARC, da die als TIDA oder A12 bezeichnete dopaminerge Neuronengruppe dieses Kerngebietes als sehr bedeutsam für die hypothalamische Kontrolle

| | Anzahl der TH- / Neuropeptid-immunopositiven Zellen pro "well" | Anteil der TH-positiven Neuropeptid-Neurone [%] | Anteil der Neuropeptid-positiven TH-Neurone [%] | Anzahl der analysierten "wells" | Anzahl der Zellpräparationen |
|------|--|---|---|---------------------------------|------------------------------|
| ACTH | 232 / 139 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| NPY | 208 / 326 | 27,8 ± 6,5 | 43,7 ± 10,2 | 6 | 6 |
| NT1 | 164 / 434 | 24,9 ± 9,5 | 65,8 ± 25 | 4 | 4 |
| SOM | 293 / 251 | 28,1 ± 11,0 | 24,1 ± 9,4 | 4 | 4 |

Tab. ERG 2: Neuronale Expression verschiedener Neurotransmitter bzw. Neuromodulatoren in der ARC-angereicherten Primärkultur

Mittels indirekter Immunzytochemie und dem Einsatz fluorophorgekoppelter Sekundärantikörper wurden Doppelmarkierungen für den Nachweis (1) der Tyrosinhydroxylase (TH) als Schlüsselenzym der Dopamin-Biosynthese sowie (2) eines der Neuropeptide adrenocorticotrophes Hormon (ACTH), Neuropeptid Y (NPY), Neurotensin (NT1) oder Somatostatin (SOM) durchgeführt.

Die Anzahlen der TH- bzw. / sowie Neuropeptid immunpositiven Zellen sind als Mittelwerte dargestellt (Spalte 1), errechnet aus der Anzahl der analysierten "wells" (Spalte 4). Der jeweils prozentuale Anteil doppelmarkierter Neurone, bezogen auf dopaminerge, TH-immunpositive Neurone (Spalte 3) bzw. auf Neuropeptid-immunpositive Neurone (Spalte 2), ist als arithmetischer Mittelwert ± S.E.M. der analysierten Anzahl an "wells" (Spalte 4) dargestellt.

des HVL anzusehen ist (*Kap. EIN 1.5.2*). Im Rahmen der DA-Biosynthese katalysiert das Enzym Tyrosinhydroxylase die Bildung von L-DOPA, als Vorstufe des DA, aus L-Tyrosin. Wiederum durch Doppelmarkierungsstudien sollte daher analysiert werden, inwieweit dopaminerge Neurone der ARC-Primärkultur, etabliert aus früh-postnatalem ARC-Gewebe, auch eines der schon beschriebenen, für den ARC adulter Ratten ebenfalls klassischen Neuropeptide ACTH, NPY, SOM oder NT1 exprimieren. Für jeden Versuchsansatz erfolgte die Bestimmung der Anzahl TH- bzw. Neuropeptid-positiver Zellen als arithmetischer Mittelwert (\pm S.E.M.) von 4 - 6 analysierten "wells" aus ebenso vielen Zellpräparationen, sowie die Errechnung des jeweils prozentualen Anteils Neuropeptid exprimierender Neurone an der Gesamtzahl der TH-immunopositiven Neurone und *vice versa* (*Tab. ERG 2*). Bei kombiniertem immunzytochemischen Nachweis für TH und ACTH wurden im arithmetischen Mittel Anzahlen von 139 ± 24 ACTH- und 232 ± 68 TH-immunopositiven Neuronen pro "well" ermittelt. Dabei ergab sich keine einzige zelluläre Kolo-kalisation, wie sowohl aus *Tab. ERG 2* als auch *Abb. ERG 6A-C* in der exemplarischen Einzeldarstellung entnommen werden kann. Dieses Ergebnis stimmt vollkommen mit den für den hypothalamischen ARC adulter Tiere an fixierten Gefrierschnitten des Hypothalamus immunhistochemisch erhobenen Daten überein (*Kap. ERG 3.2.2*), und kann als starkes Argument dafür angeführt werden, dass die *in vitro* Primärkultur die *in vivo* Situation selbst im adulten Tier hinreichend gut widerspiegelt (*Kap. DIS 4.1*).

Hinsichtlich der putativen Koexpression von TH mit NPY, analysiert in sechs "wells" aus sechs Zellpräparationen, ergab sich im Mittel die Detektion von 326 ± 37 NPY und 208 ± 45 TH immunreaktiven Zellen, wobei eine hohe Koexpressionsrate zu verzeichnen war. So erwiesen sich ca. 44 % der dopaminergen Zellen als ebenfalls NPY immunopositiv, bzw. ca. 28 % der NPY-ergen nutzten offensichtlich auch DA als Neurotransmitter (*Tab. ERG 2; Abb. ERG 6D - F*). Nahezu zwei Drittel aller 164 ± 65 dopaminergen Neurone der ARC-Primärkultur exprimierten auch den Neuromodulator Neurotensin, während für ca. 25 % der 434 ± 47 NT1-ergen Neurone pro "well" auch eine signifikante Expression der Tyrosinhydroxylase nachweisbar war (*Tab. ERG 2; Abb. ERG 6G - I*). Das Dopamin neuronaler Zellen des ARC repräsentiert den potentesten *inhibiting* Faktor zur Regulation der PRL-Freisetzung, mit abgeschwächter Wirksamkeit hinsichtlich der TSH- und ACTH-Freisetzung, aus endokrinen Zellen des HVL; Somatostatin hingegen hemmt vornehmlich die adenohipophysäre Sekretion von GH sowie auch von TSH und ACTH (Arimura, 2000). Von allen 251 ± 19 SOM immunopositiven Zellen der ARC-Primärkultur erwiesen sich ca. 28 % auch als dopaminerg, wohingegen ca. 24 % der 293 ± 51 dopaminergen ARC-Zellen auch SOM exprimierten (*Tab. ERG 2; Abb. ERG 6J - L*).

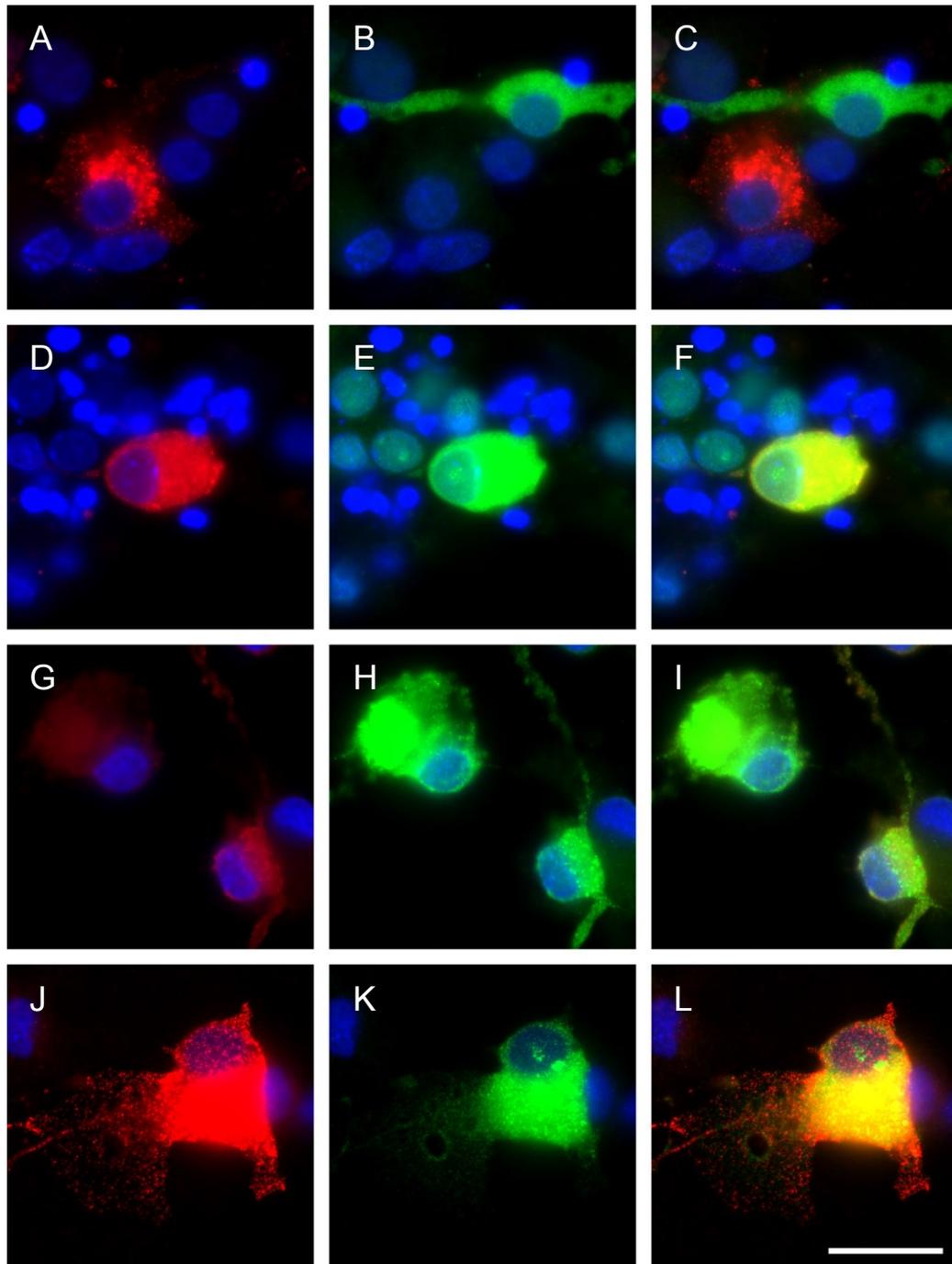


Abb.ERG 6: Darstellung der Kolo-kalisation von dopaminergen Zellen mit ACTH, NPY, NT1 bzw. SOM in Zellen der ARC-Primärkultur neonataler Ratten

Die Abbildungen der linken Spalte zeigen die immunzytochemische Markierung für ACTH (**A**), NPY (**D**), NT1 (**G**) sowie SOM (**J**). Als Primärantikörper diente jeweils ein polyklonales rabbit anti-Neuropeptid Antiserum; als Sekundärantikörper wurden Cy3™-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (**rot**).

Die Abbildungen der mittleren Spalte zeigen die immunzytochemische Markierung für Tyosinhydroxylase (TH) (**B**, **E**, **H**, **K**). Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-TH Antikörper; als Sekundärantikörper wurden Alexa® 488 -gekoppeltes donkey anti-mouse IgG (**grün**) eingesetzt.

Die Abbildungen der rechten Spalte zeigen die digitale Überlagerung beider immunzytochemischen Nachweise (Doppelmarkierungen), wodurch sich in einigen Fällen eine **gelbe** Markierung ergibt.

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (**blau**).

Der Größenmarker entspricht 25 µm.

3.3. Funktionelle Charakterisierung ionotroper Purinozeptoren in der ARC-Primärkultur mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik

Die Fura-2 Ratio-Imaging Technik diente zur kontinuierlichen Detektion der $[Ca^{2+}]_i$ und zur Untersuchung des Einflusses funktionell exprimierter, ionotroper P2X-Rezeptoren auf diese. Die Dauer eines einzelnen Versuchs variierte, abhängig von der Anzahl der Superfusionsstimulationen und der Länge der gewählten Regenerationsintervalle, zwischen 20 und 65 min, wobei pro Zellkulturkammer 15 - 30 Zellen, bei minimalen Zell-zu-Zell Kontakten, analysiert werden konnten. Der endgültigen Analyse der Daten wurden bestimmte Kriterien (*Kap. MM 2.5.7*) zu Grunde gelegt:

- [1] Stabile Fluoreszenz Ratio-Werte des intrazellulären Fura-2.
- [2] Erhöhung der ermittelten 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Fura-2 auf einen exogenen Stimulus um $\geq 0,05$ gegenüber der Basisline.
- [3] Wiederholbarkeit der Agonist-induzierten Erhöhung der Ratio-Werte bei vergleichbarer Amplitude für Versuche mit P2XR-Subtyp-spezifischen Antagonisten oder kalziumfreier Lösung (*Kap. ERG 3.3*).
- [4] Eindeutige, post-experimentelle immunzytochemische Identifikation der analysierten Zellen (*Kap. ERG 3.2*).

3.3.1. Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit den Purinozeptoragonisten ATP, 2-MeSATP und α,β -meATP bei RT

Die Fura-2 Ratio-Imaging Untersuchungen dienten dem Nachweis einer durch den endogenen Purinozeptoragonisten ATP sowie seine Analoga 2-MeSATP und α,β -meATP induzierbaren, intrazellulären Kalziumantwort in den Zelltypen der ARC-angereicherten Primärkultur bei Raumtemperatur (RT). Hierfür wurden ATP, der gegen enzymatische Hydrolyse stabilere Agonist 2-MeSATP sowie der P2X₁- / P2X₃-spezifische Ligand α,β -meATP, wie in *Kap. MM 2.5.6.1* erläutert, im randomisierten Verfahren sequentiell appliziert. Aus fünf Präparationen mit 14 analysierten "wells" gingen nach den beschriebenen Auswahlkriterien 144 Neurone, 204 Astrozyten und drei Mikrogliazellen in die Analyse ein. Die Resultate, inklusive der statistischen Datenauswertung, sind vor allem für Neurone und Astrozyten graphisch in *Abb. ERG 7* dargestellt. Lediglich für zwei Mikrogliazellen konnten Daten erhoben werden, primär bedingt durch die geringe Anzahl an analysierten Mikrogliazellen und nicht deren mangelnden Responsivität, wie aus den recht markanten Kalziumsignalen der beiden Mikrogliazellen mit Δ Ratio-Werten von 0,18 - 0,27 zu erkennen war (nicht gezeigt).

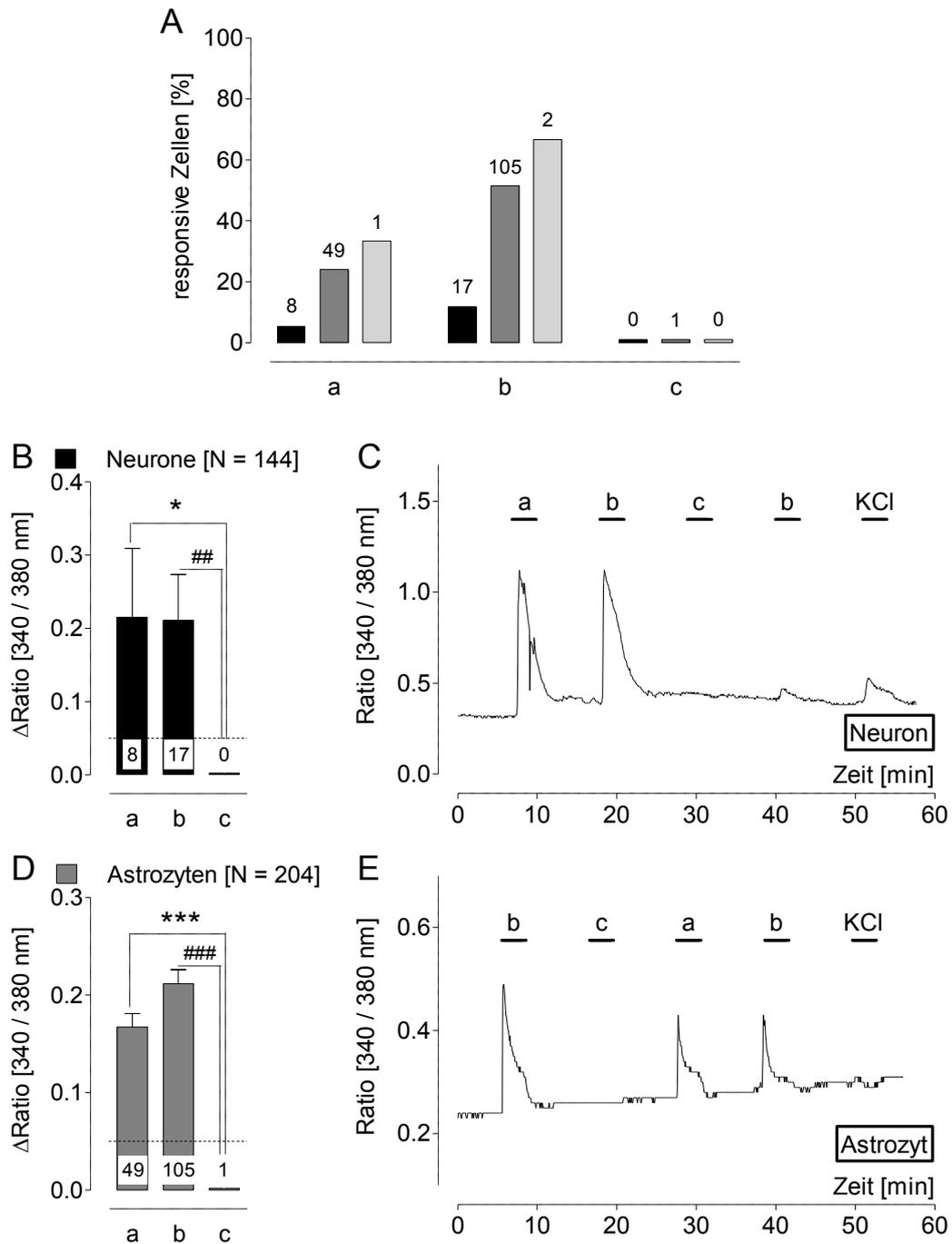
Von den untersuchten Neuronen erwiesen sich 5,6 % resp. 11,8 % mit mittleren 340 / 380 nm Δ Ratio-Werten von $0,22 \pm 0,09$ (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.) resp. $0,21 \pm 0,07$ als responsiv auf die Superfusionsstimulation mit ATP (10^{-6} M) resp. 2-MeSATP (10^{-6} M). Hinsichtlich der Superfusion mit α,β -meATP in äquimolarer Konzentration konnte kein neuronales Kalziumsignal hervorgerufen werden (*Abb. ERG 7A,B*). Im Rahmen der Datenanalyse wurden signifikante Unterschiede zwischen den minimalen Δ Ratio-Werten nach Superfusionsstimulationen mit α,β -meATP vs. ATP (* $P < 0,05$) sowie vs. 2-MeSATP (## $P < 0,01$) errechnet.

Etwa 24 % resp. 51,7 % der getesteten Astrozyten reagierten auf die Superfusionsstimulation mit ATP resp. 2-MeSATP mit einer durchschnittlichen Änderung der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte von $0,17 \pm 0,01$ resp. $0,21 \pm 0,01$. Lediglich ein einziger Astrozyt zeigte nach Superfusion mit äquimolarem α,β -meATP ein transientes Kalziumsignal überschwelliger Magnitude (Δ Ratio-Wert $> 0,05$) (*Abb. ERG 7A,D*). Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden folglich hoch signifikante Unterschiede für die 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte nach Stimulation mit α,β -meATP-spezifischen Daten im direkten Vergleich mit denen nach Stimulation mit ATP (***) $P < 0,001$) resp. 2-MeSATP (### $P < 0,001$) ermittelt. Exemplarisch werden in *Abb. ERG 7C und 7D* Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines Neurons sowie eines Astrozyten dargestellt.

Beim direkten Vergleich der drei Purinozeptoragonisten und ihrer Wirkungen in ein und derselben Zelle zeigten sowohl bei Neuronen als auch Astrozyten etwa doppelt so viele Zellen ein überschwelliges, intrazelluläres Kalziumsignal auf die Superfusion mit 2-MeSATP als mit ATP (*Abb. ERG 7A,B*). Bis auf ein einziges Neuron konnten alle ATP-responsiven Zellen auch durch äquimolare 2-MeSATP Applikation stimuliert werden. In der Ausprägung der mittleren Fluoreszenz Ratio-Änderungen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Stimulation auf ATP und 2-MeSATP ermittelt. Superfusion mit α,β -meATP in äquimolarer Konzentration hatte keinen überschwelligen Effekt auf die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Neuronen und Astrozyten der ARC-Primärkultur.

3.3.2. Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur bei KT mit den Purinozeptoragonisten BzATP und 2-MeSATP

Im Rahmen des Nachweises einer funktionellen Expression der ionotropen P2X-Rezeptorsubtypen P2X₁ bzw. P2X₇ in den Zelltypen der ARC-Primärkultur wurden in acht "wells" aus vier Präparationen 89 Neurone, 104 Astrozyten und drei mikrogliale Zellen auf ihre Responsivität gegenüber dem P2X₁- / P2X₇-spezifischen Liganden BzATP sowie



2-MeSATP bei RT untersucht. Nach sequentieller Superfusionenstimulation mit BzATP in den Konzentrationen 10^{-7} M und 10^{-6} M erfolgte die ebenfalls sequentielle Superfusion der Zellen mit 2-MeSATP in äquimolaren Konzentrationen. Während, wie schon in der vorangegangenen Versuchsserie gezeigt, 19,1 % resp. 22,5 % der Neurone auf 2-MeSATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, d.h. konzentrationsabhängig erhöhten 340 / 380 nm Δ Ratio-Werten von $0,24 \pm 0,05$ resp. $0,36 \pm 0,11$, reagierten, errechneten sich aufgrund der Superfusion mit BzATP lediglich Δ Ratio-Werte von $0,12 \pm 0,04$ resp. $0,11$

$\pm 0,01$ in 3,4 % resp. 4,5 % der ARC-Neurone (*Abb. ERG 8A*). Im Rahmen des direkten Vergleichs neuronaler Antworten auf die beiden BzATP-Stimulationen war auffällig, dass auf 10^{-7} M responsive Neurone auf die Stimulation mit 10^{-6} M nicht mehr reagierten und *vice versa*, was auf ein hohes Maß an Desensibilisierung hindeutet. Andererseits erwiesen sich jeweils zwei der auf BzATP responsiven Neurone auch bei Superfusion mit 2-MeSATP (10^{-6} M) als responsiv. Trotz der markanten Unterschiede hinsichtlich der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte nach Applikation von BzATP vs. 2-MeSATP konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden ($P > 0,05$), möglicherweise basierend auf der unterschiedlichen Anzahl ausgewerteter Zellen (4 vs. 20).

Die Astrozyten betreffend, konnte für BzATP in der finalen Konzentration von 10^{-7} M keine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Δ Ratio-Werten $> 0,05$ festgestellt werden, wohingegen 6,7 % der untersuchten Astrozyten mit einer mittleren Fluoreszenz Ratio-Erhöhung von $0,16 \pm 0,03$ auf die Superfusion mit 10^{-6} M BzATP antworteten (*Abb. ERG 8C*). Von diesen sieben Astrozyten zeigten sechs Zellen auch ein transientes Kalziumsignal auf beide Superfusionen mit 2-MeSATP (*Abb. ERG 8D*). Insgesamt reagierten 73,1 % aller Astrozyten auf die niedrigere, resp. 80,8 % auf die höhere 2-MeSATP Konzentration mit einem durchschnittlichen Ratio-Anstieg von $0,51 \pm 0,04$ resp. $0,53 \pm 0,11$. Im Vergleich der Responsivität der Astrozyten wurde also errechnet, dass die Anzahl der responsiven Astrozyten bei Superfusion mit dem P2X-Agonisten 2-MeSATP in steigender Konzentration geringfügig, aber hoch signifikant ($$$$ P < 0,001$) anstieg. Es wurden hoch signifikante Unterschiede ($*** / ### P < 0,001$) im statistischen Vergleich der Δ Ratio-Werte nach

Abb. ERG 7: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit den Purinozeptoragonisten ATP, 2-MeSATP und α,β -meATP in äquimolarer Konzentration bei RT

Das Balkendiagramm (**A**) zeigt den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der responsiven im Bezug auf alle getesteten Neurone (schwarze Balken), Astrozyten (dunkelgraue Balken) und Mikrogliazellen (hellgraue Balken) nach Superfusionsstimulation mit (**a**) ATP, (**b**) 2-MeSATP und (**c**) α,β -meATP (**c**) in einer Konzentration von jeweils 10^{-6} M bei RT.

In Teilbild **B** resp. **D** sind die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**B**) resp. Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit (**a**) ATP, (**b**) 2-MeSATP und (**c**) α,β -meATP als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M dargestellt. * / # / § kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die drei Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test; [* / # / § $P < 0,05$; ** / ## / \$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]. Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein responsives Neuron (**C**) resp. einen responsiven Astrozyten (**E**) nach randomisiert-sequentieller Superfusionsstimulation mit (**a**) ATP, (**b**) 2-MeSATP und (**c**) α,β -meATP in einer Konzentration von jeweils 10^{-6} M sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

Applikation von 2-MeSATP in beiden Konzentrationen mit Daten nach BzATP Applikation in 10^{-6} M Konzentration ermittelt (Abb. ERG 8C).

Exemplarisch werden in Abb. ERG 8B und 8D Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines Neurons sowie eines Astrozyten dargestellt. Keine der drei untersuchten Mikrogliazellen reagierte mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Superfusion mit einem der beiden P2X-Agonisten.

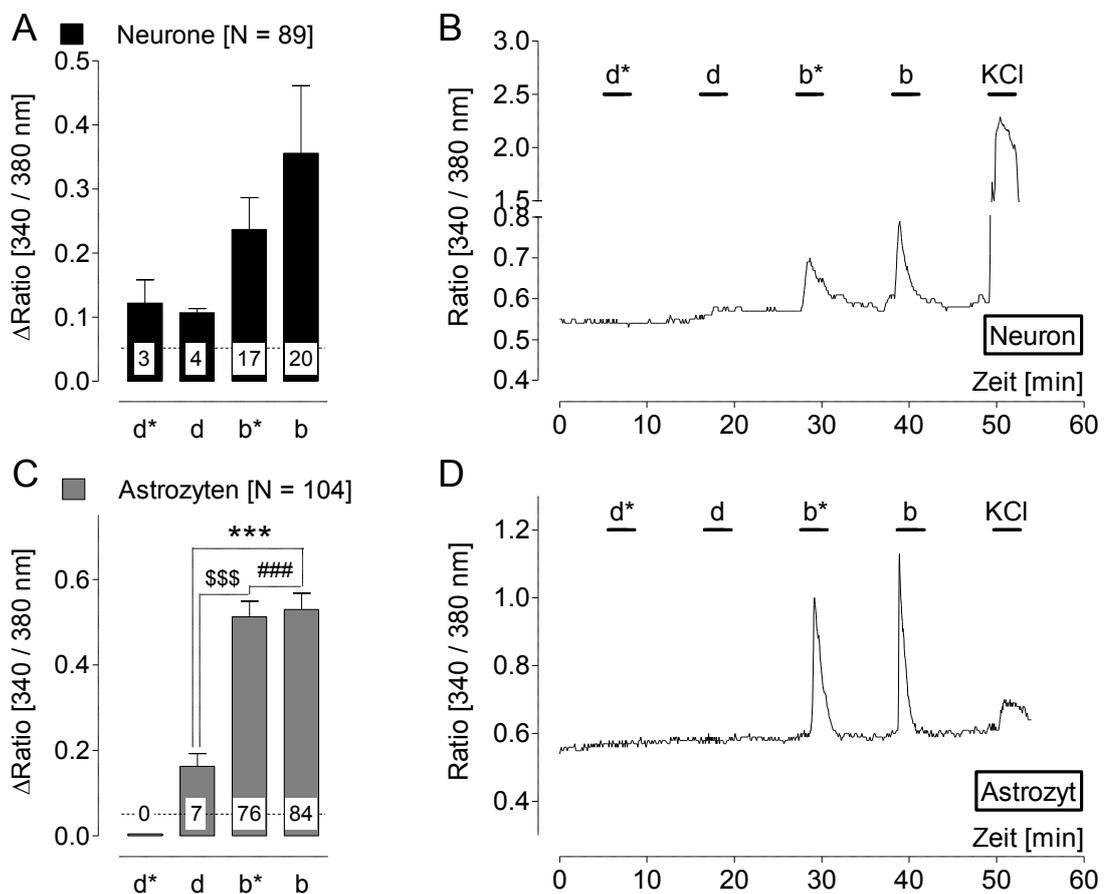


Abb. ERG 8: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit den Purinozeptoragonisten BzATP sowie 2-MeSATP bei KT

Die Balkendiagramme in **A** resp. **C** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**A**) resp. Astrozyten (**C**) nach Superfusionsstimulation mit (**d***) BzATP (10^{-7} M), (**d**) BzATP (10^{-6} M), (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M) und (**b**) 2-MeSATP (10^{-6} M) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test; [* / # / \$ $P < 0,05$; ** / ## / \$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]. Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein responsives Neuron (**B**) resp. einen responsiven Astrozyten (**D**) nach sequentieller Superfusionsstimulation mit (**d***) BzATP (10^{-7} M), (**d**) BzATP (10^{-6} M), (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M) und (**b**) 2-MeSATP (10^{-6} M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

3.3.3. Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Purinozeptoragonisten ATP und 2-MeS-ATP hinsichtlich intrazellulärer Kalziumsignale

Nachdem dargestellt werden konnte, dass sowohl ATP als auch das biochemisch stabilere 2-MeSATP in einer Konzentration von 10^{-6} M in den drei untersuchten Zelltypen der primären ARC-Zellkulturen eine Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration induzieren konnten, sollte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung im Rahmen der Liganden-induzierten Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ erarbeitet werden. Dazu wurden mehrere "wells" der ARC-Primärkultur sequentiell mit jeweils nur einem der beiden P2-Rezeptoragonisten (ATP, 2-MeSATP) in aufsteigender Konzentration (10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M) superfundiert (Kap. MM 2.5.6.2). Für die finale Auswertung wurden nur Zellen herangezogen, die bei der letzten und höchsten Ligandenkonzentration (10^{-6} M) eine Fluoreszenz Ratio-Änderung $\geq 0,05$ erzielten. Wurde bei diesen Zellen auf die vorherigen Stimuli bei 10- bzw. 100-fach niedrigerer Ligandenkonzentration keine Responsivität ($\Delta\text{Ratio} < 0,05$) nachgewiesen, so wurden deren ΔRatio -Werte als 0,001 in die Berechnung für die mittleren 340 / 380 nm ΔRatio -Werte einbezogen. In Experimenten für den ebenfalls in dieser Teilstudie eingesetzten P2X₁- / P2X₃-Rezeptor-spezifischen Agonist α,β -meATP konnte aufgrund nicht erfolgter Kalziumsignale keine Zelle in die Auswertung übernommen werden.

3.3.3.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung für 2-MeSATP bei RT

Zur Bestimmung einer dosisabhängigen, durch 2-MeSATP induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurden die Zellen aus vier Präparationen mit sieben analysierten "wells" in aufsteigender Konzentration mit 2-MeSATP bei Raumtemperatur (RT) superfundiert. In die endgültige Auswertung gingen 94 Neurone, 68 Gliazellen astrozytären Ursprungs und sechs Mikrogliazellen ein. Die graphische Darstellung sowohl des prozentualen Anteils, als auch der Anzahl der responsiven Zellen werden für alle drei untersuchten Zelltypen in Abb. ERG 9A gezeigt. Auf die logarithmisch ansteigenden 2-MeSATP Konzentrationen reagierten 2,1 %, 10,6 % resp. 16,0 % der Neurone mit einem dosisabhängig und insgesamt hoch signifikanten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (***) ($P < 0,001$; Vergleich b** mit b). Wie aus den Balkendiagrammen in Abb. ERG 9B zu entnehmen ist, wurden die Daten experimentell als mittlere ΔRatio -Werte der Fluoreszenz von 0,02 (10^{-8} M), $0,09 \pm 0,02$ (10^{-7} M) resp. $0,15 \pm 0,02$ (10^{-6} M) ermittelt.

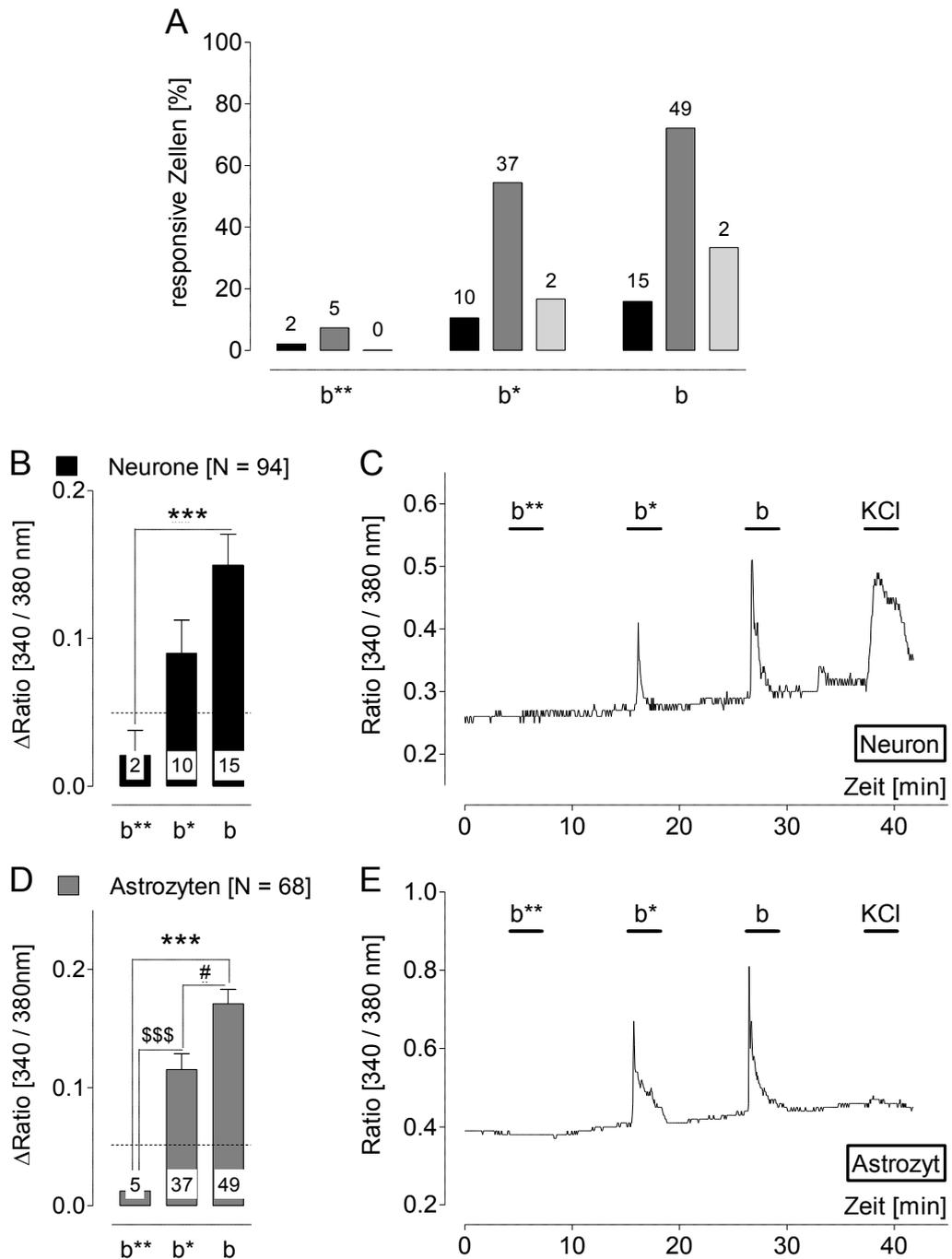
Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für 2-MeSATP wurde ebenfalls für Astrozyten nachgewiesen. In der Endauswertung zeigten 7,4 %, 54,4 % resp. 72,1 % der getesteten Astrozyten mit durchschnittlichen ΔRatio -Werten von $0,01 \pm 0,01$ (10^{-8} M), $0,12 \pm 0,01$ (10^{-7} M) resp. $0,17 \pm 0,01$ (10^{-6} M) dosisabhängig in signifikanter bis hoch signifikanter Weise

transiente Erhöhungen der intrazellulären Kalziumsignale (*Abb. ERG 9A,D*). Exemplarisch werden in *Abb. ERG 9C und 9E* Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines Neurons sowie eines Astrozyten dargestellt. Keine der sechs Mikrogliazellen reagierte mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Superfusion mit 10^{-8} M 2-MeSATP. Während der nachfolgenden Superfusion mit 2-MeSATP in 10^{-} bzw. 100-fach höherer Konzentration zeigte eine (16,7 %) resp. zwei (33,3 %) Mikrogliazellen markante intrazelluläre Kalziumsignale mit Δ Ratio-Werten von 0,24 resp. 0,45.

In der Endauswertung wurde ermittelt, dass bei steigender Konzentration des Agonisten 2-MeSATP der prozentuale Anteil an responsiven Zellen bei Neuronen und Astrozyten deutlich anstieg, wobei sich quantitativ im direkten Vergleich die Astrozyten als der reaktivere Zelltyp darstellten. Eine Dosisabhängigkeit kann für beide Zelltypen der ARC-Primärkultur eindeutig konstatiert werden. Die ausgeprägten Kalziumsignale bei den wenigen analysierten Mikrogliazellen deuten auch für diesen Zelltyp auf eine Rolle purinerger Rezeptorproteine hin. Da in Einzelfällen sowohl bei Neuronen als auch Astrozyten während des Versuchsverlaufes jedoch eine negative Dosisabhängigkeit zu verzeichnen war, was auf mögliche Desensibilisierungsphänomene hinweist, sollte dieser Frage in einer separaten Teilstudie mit repetitiver, äquimolarer Applikation des P2X-Purinozeptoragonist 2-MeSATP nachgegangen werden (*Kap. ERG 3.3.4*).

3.3.3.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung für ATP bei RT

Zusätzlich zur Erstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung bei Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP wurden ARC-Primärkulturzellen aus vier Präparationen mit fünf "wells" in mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für endogenes ATP und eine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ analysiert. In dieser Studie wurden 57 Neurone, 56 Astrozyten und sieben Mikrogliazellen in die endgültige Auswertung aufgenommen. In den Experimenten wurde keine responsive Mikrogliazelle auf die Superfusion mit ATP ermittelt. Auf die Superfusion von ATP in aufsteigender (10^{-8} bis 10^{-6} M) Konzentration erwiesen sich eine, zwei bzw. 12 (21,1 %) aller getesteten Neurone als responsiv, wobei sich gemittelte Δ Ratio-Werte (inkl. der 0,001 Werte nicht als responsiv gewerteter Zellen, da $P < 0,05$) von 0,01 resp. $0,01 \pm 0,01$ resp. $0,20 \pm 0,05$ ergaben. Die Auswertung bei den Astrozyten ergab ein nahezu identisches Bild; bei Superfusion mit 10^{-8} M sowie 10^{-7} M ATP konnte eine marginale Reaktion für lediglich eine resp. zwei Zellen (Δ Ratio-Werte ca. 0,08) ermittelt werden. Erst auf Superfusionsstimulation mit 10^{-6} M ATP wiesen 50,0 % aller getesteten Astrozyten überschwellige intrazelluläre Kalziumsignale mit einem mittleren Fluoreszenz Ratio-Anstieg von $0,24 \pm 0,3$ auf, vergleich-



bar zu den in Kap. ERG 3.2.1 bzw. 3.2.2 erhaltenen Daten. Für Neurone wie auch Astrozyten konnten somit dosisabhängig (hoch) signifikante Unterschiede (***/### $P < 0,001$) der gemittelten Δ Ratio-Werte für ATP-Konzentrationen von 10^{-8} bzw. 10^{-7} M, verglichen mit denjenigen bei 10^{-6} M ATP ermittelt (keine Abbildung). Dabei kann einerseits konstatiert werden, dass ATP wahrscheinlich aufgrund ausgeprägter Hydrolyse lediglich in der Konzentration von 10^{-6} M wirksam war und andererseits mögliche Degradationsprodukte (ADP, Adenosin) nicht zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führten.

3.3.4. Repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit ATP bzw. 2-MeSATP in äquimolaren Konzentrationen

Ionotrope P2X-Rezeptoren zeigen hinsichtlich ihres Aktivierungsprofils Subtyp-spezifisch ein fehlendes, langsames oder schnelles Desensibilisierungsverhalten. Um das Desensibilisierungsphänomen quantitativ zu erfassen, wurde das Antwortverhalten der Zellen in der ARC-Primärkultur in Superfusionsuntersuchungen mit repetitiv (3x) appliziertem, äquimolaren ATP resp. 2-MeSATP (10^{-6} M) bei Raumtemperatur analysiert (Kap. ERG 3.3.4.1 und 3.3.4.3). Da alle weiteren Studien ab Kap. ERG 3.3.6 zudem bei einer Messpuffer-Temperatur von $36,0 \pm 0,3$ °C erfolgten, wurde konform zu dem in Kap. MM 2.5.6.3 skizzierten Experiment mit repetitiver Superfusionsstimulation bei simulierter, physiologischer Körperkerntemperatur der Ratte (KT; 36-37°C) für 2-MeSATP (10^{-6} M) eine weitere Versuchsreihe mit dreimaliger Wiederholung der Superfusionsstimulation erarbeitet (Kap. ERG 3.3.4.2). Dieses Telexperiment in der ARC-Primärkultur stellte darüber hinaus die Grundlage nachfolgender Versuchsreihen mit generalisierten resp. Subtyp-spezifischen Purinozeptorantagonisten für die weitere pharmakologische Charakterisierung potentiell exprimierter P2X-Rezeptorsubtypen dar. Nach abgeschlossener Datenauswertung konnten Neurone, Astrozyten und einige Mikrogliazellen der ARC-Primärkultur, basierend auf ihrem Desensibilisierungsverhalten nach repetitiver Superfusion mit 2-MeSATP (10^{-6} M) - vergleichbar den in vorangegangenen Arbeiten mit einer MnPO-spezifischen neuroglialen Primärkultur (Hitzel, 2009) erhaltenen Daten - in zwei Kategorien (Gruppen) eingeteilt werden :

Abb. ERG 9: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in aufsteigender Konzentration (Dosisabhängigkeit) bei RT

Das Balkendiagramm (A) zeigt den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der responsiven im Bezug auf alle getesteten Neurone (schwarzer Balken), Astrozyten (dunkelgrauer Balken) und Mikrogliazellen (hellgrauer Balken) nach Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in Konzentrationen von 10^{-8} M (**b****), 10^{-7} M (**b***) und 10^{-6} M (**b**) bei RT.

In Teilbild B resp. D sind die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (B) resp. Astrozyten (D) nach Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in Konzentrationen von 10^{-8} M (**b****), 10^{-7} M (**b***) resp. 10^{-6} M (**b**) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M dargestellt. * / # \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die drei Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test; [* / # / \$ P < 0,05; ** / ## / \$\$ P < 0,01; *** / ### / \$\$\$ P < 0,001]. Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein responsives Neuron (C) resp. einen responsiven Astrozyten (E) nach Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in aufsteigender Konzentrationen von 10^{-8} M (**b****), 10^{-7} M (**b***), 10^{-6} M (**b**) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

- [1] In die "Desensibilisierungsgruppe" (*high degree of desensitization*, HDD) wurde eine Zelle eingeordnet, die auf den ersten Superfusionsstimulus mit einem ausgeprägten, überschwelligem Kalziumsignal (Δ Ratio-Wert $\gg 0,05$), auf den dritten jedoch mit einem weit unterschwelligen (Δ Ratio-Wert $< 0,05$) bzw. nicht mehr nachweisbaren Kalziumsignal reagierte. Für die statistische Auswertung wurde in diesen Fällen ein 340 / 380 nm Δ Ratio-Wert von 0,001 eingesetzt.
- [2] Der "repetitiv responsiven Gruppe" (*low degree of desensitization*, LDD) wurde eine Zelle zugeordnet, die sich durch die dreimalig wiederholbare Responsivität in Form eines überschwelligem Kalziumsignals auszeichnete.

3.3.4.1. Repetitive Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP bei RT

Im Rahmen der Untersuchung des Desensibilisierungsverhaltens der durch 2-MeSATP induzierten intrazellulären Kalziumsignale wurden in zwölf "wells" aus acht Präparationen 192 Neurone, 163 Astrozyten und fünf Mikrogliazellen bei Raumtemperatur (RT) auf ihre repetitive Responsivität hin analysiert. Die Ergebnisse, inklusive der statistischen Auswertung sind für beide Antwortmuster in *Abb. ERG 10A,B* graphisch dargestellt; die gemittelten 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die untersuchten Zelltypen der LDD-Gruppe werden in *Tab. ERG 3* aufgeführt.

Neurone: Von den 192 immunzytochemisch identifizierten Neuronen zeigten 33 (17,2 %) eine eindeutige Stimulation der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio in Folge der primären Superfusion mit 2-MeSATP. Dabei wurden 19 Neurone aufgrund der zuvor genannten Kriterien in die HDD-Gruppe und 14 Neurone in die LDD-Gruppe aufgenommen.

Die 19 Neurone der Desensibilisierungsgruppe HDD zeigten lediglich auf die erste Superfusionsstimulation mit 10^{-6} M 2-MeSATP eine mittlere 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderung von $0,11 \pm 0,01$, während auf die zweite Stimulation nur noch fünf Neurone mit einer überschwelligem Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf den purinergen Agonisten antworteten. Inklusiv der einheitlich auf 0,001 gesetzten Δ Ratio-Werte der verbliebenen 14 Neurone ergab sich somit im arithmetischen Mittel ein Δ Ratio-Wert von $0,02 \pm 0,01$ (*Abb. ERG 10B*). Auf die dritte Superfusionsstimulation konnte für kein Neuron eine Änderung der Fluoreszenz Ratio mehr nachgewiesen werden. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden folglich hoch signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Δ Ratio-Werten nach der ersten Stimulation mit 2-MeSATP und denen nach der zweiten (***) resp. dritten äquimolaren Stimulation (\$\$\$ $P < 0,001$) ermittelt (*Abb. ERG 10B*). Exemplarisch wird in *Abb. ERG 10D* ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines Neurons der HDD-Gruppe dargestellt.

In den 14 ARC-Neuronen der repetitiv responsiven LDD-Gruppe induzierten die primäre, sekundäre resp. tertiäre Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) transiente intrazelluläre Kalziumsignale mit Δ Ratio-Werten von $0,17 \pm 0,06$ resp. $0,13 \pm 0,04$ sowie $0,11 \pm 0,03$ (Tab. ERG 3). Im Rahmen der statistischen Analyse konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der mittleren Amplituden der jeweils erzielten maximalen $[Ca^{2+}]_i$ ermittelt werden ($P \geq 0,05$) (Abb. ERG 10A). Ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines Neurons der LDD-Gruppe wird exemplarisch in Abb. ERG 10C dargestellt. Im statistischen Vergleich der Fluoreszenz Ratio-Änderungen als Antwort auf die erste Superfusionsstimulation beider Zellgruppen (HDD vs. LDD) (parameterfreier Mann-Whitney Rangsummentest) wurde kein signifikanter Unterschied ($P \geq 0,05$) errechnet.

| | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation 2-MeSATP | 3. Stimulation 2-MeSATP |
|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Neurone | $0,17 \pm 0,06$ | $0,13 \pm 0,04$ | $0,11 \pm 0,03$ |
| Astrozyten | $0,34 \pm 0,02$ | $0,21 \pm 0,02$ | $0,18 \pm 0,01$ |
| Mikroglia | 0,27 | 0,16 | 0,11 |

Tab. ERG 3: Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. - in Neuronen ($n = 14$), Astrozyten ($n = 65$) und Mikrogliazellen ($n = 1$) der "repetitiv responsiven Gruppe" der ARC-Primärkultur (LDD-Gruppe) nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) für jeweils drei min bei acht-minütigen Waschintervallen.

Astrozyten: Von den 163 post-experimentell eindeutig als Astrozyten charakterisierten Zellen der ARC-Primärkultur zeigten 97 (59,5 %) auf die primäre Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP eine überschwellige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Dabei wurden 32 Astrozyten aufgrund der zuvor genannten Kriterien der HDD-Gruppe und 65 Astrozyten der LDD-Gruppe zugeordnet. Während also für die ARC-Neurone die Anteile an HDD : LDD Zellen 58 : 42 % betragen, ergab sich für die ARC-Astrozyten ein Verhältnis von 33 : 67 %.

Im Rahmen der wiederholten Superfusion mit 2-MeSATP in äquimolarer Konzentration (10^{-6} M) reagierten die Astrozyten der Desensibilisierungsgruppe HDD mit einer mittleren Fluoreszenz Ratio-Änderung von $0,13 \pm 0,01$ auf die primäre Stimulation, während nur noch fünf Astrozyten auf die zweite (mittlerer Δ Ratio-Wert inkl. der 27 nicht-reaktiven

Zellen: $0,08 \pm 0,01$) bzw. kein Astrozyt auf die dritte Stimulation mit einem Kalziumsignal antwortete(n) (*Abb. ERG 10B*). Die statistische Auswertung ergab folglich hoch signifikante Unterschiede für den direkten Vergleich der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte der Kalziumsignale zwischen dem ersten sowie dem zweiten (***) $P < 0,001$) oder dritten (\$\$\$ $P < 0,001$) 2-MeSATP Stimulus (*Abb. ERG 10B*). Exemplarisch wird in *Abb. ERG 10F* ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines Astrozyten der HDD-Gruppe dargestellt.

Die 65 der LDD-Gruppe zugehörigen Astrozyten demonstrierten während der drei sequentiell durchgeführten Superfusionsstimulationen mit 2-MeSATP (10^{-6} M) mittlere 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte von $0,34 \pm 0,02$ resp. $0,21 \pm 0,02$ sowie $0,18 \pm 0,01$ (*Abb. ERG 10A; Tab. ERG 3*). Im Unterschied zur Datenlage bei den Neuronen der ARC-Primärkultur erwies sich bei den Astrozyten die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach der zweiten sowie dritten Stimulationsperiode als hoch signifikant gegenüber den Δ Ratio-Werten der ersten Superfusion mit 2-MeSATP reduziert (***) / (\$\$\$ $P < 0,001$). Bezüglich des Zeitverlaufs der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines Astrozyten der LDD-Gruppe wird ein Einzelbeispiel exemplarisch in *Abb. ERG 10E* dargestellt. Im statistischen Vergleich der Fluoreszenz Ratio-Änderungen als Antwort auf die erste Superfusionsstimulation beider Zellgruppen (HDD vs. LDD) (parameterfreier Mann-Whitney Rangsummentest) wurde ein hoch signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) ermittelt.

Mikrogliazellen: Von den fünf analysierten Mikrogliazellen der ARC-Primärkultur erwies sich lediglich eine als 2-MeSATP responsiv und wurde aufgrund der sequentiell induzierten Δ Ratio-Werte von 0,27 resp. 0,16 resp. 0,11 in die repetitiv responsive Gruppe (LDD) eingeordnet (*Abb. ERG 10A; Tab. ERG 3*).

3.3.4.2. Repetitive Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP bei KT

Analog zu den unter *Kap. ERG 3.3.4.1* dargestellten, repetitiven Superfusionsstimulationen der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP (10^{-6} M) bei RT wurde in limitiertem Umfang eine Studie zur repetitiven, Agonist-induzierten Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ mit äquimolarem 2-MeSATP bei 36 - 37°C, der Körperkerntemperatur der Ratte, durchgeführt. Auf eine graphische sowie tabellarische Darstellung der Resultate wurde verzichtet. Aus Analysen an jeweils einem "well" dreier Präparationen gingen insgesamt 26 Neurone und 29 Astrozyten in die Auswertung ein.

Neurone: Nach den beschriebenen Kriterien (*Kap. ERG 3.3.4*) wurden von den bei primärer Stimulation überschwellig aktivierten vier Neuronen (15,3 %) drei der Desensibilisierungsgruppe HDD und ein Neuron der repetitiv responsiven Gruppe LDD zugeordnet.

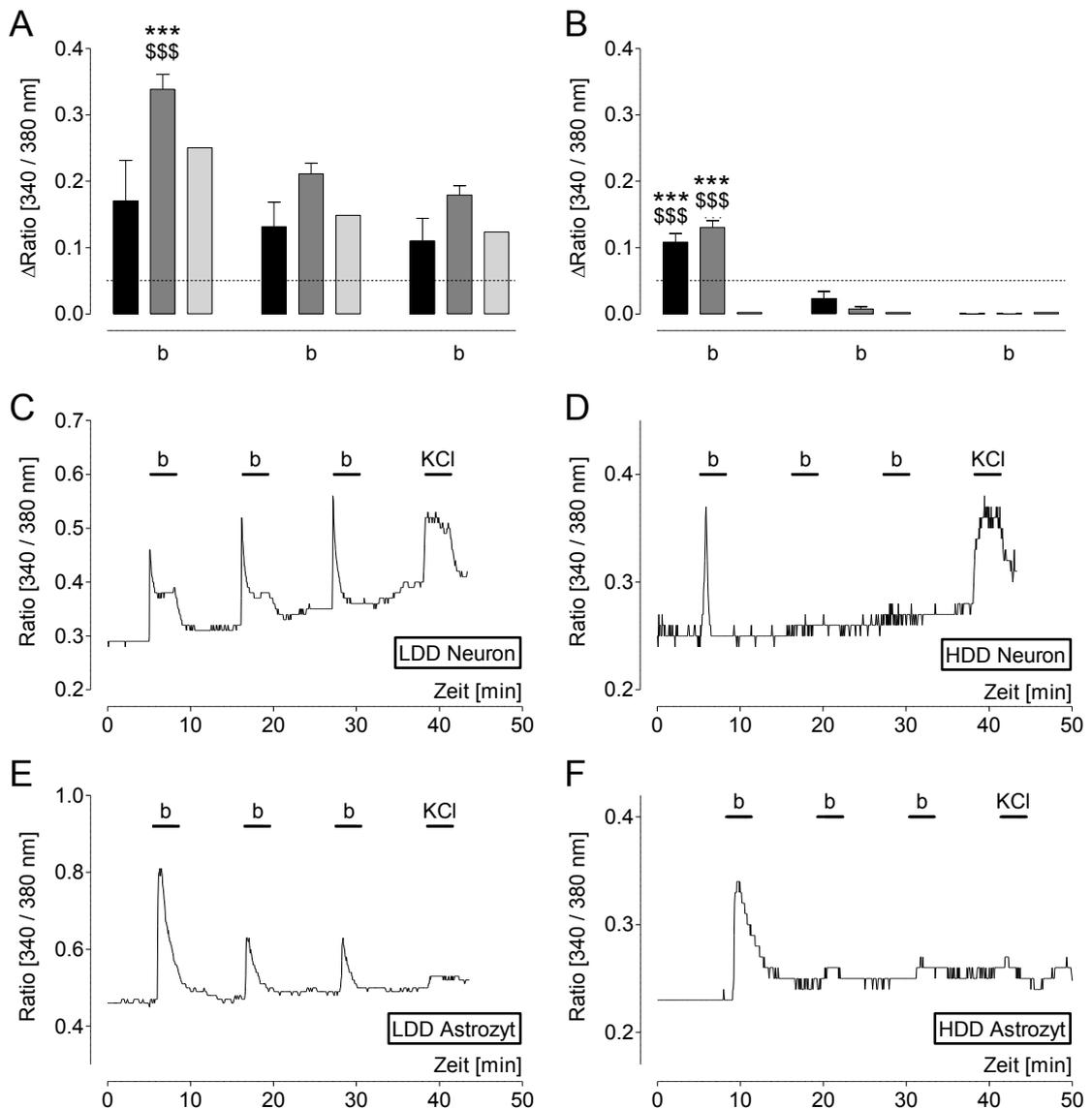


Abb.ERG 10: Repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in konstanter Konzentration

Die Balkendiagramme in Teilbild **A** und **B** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (schwarzer Balken), Astrozyten (dunkelgrauer Balken) und Mikrogliazellen (hellgrauer Balken) nach repetitiver (3 x) Superfusionsstimulation mit (**b**) 2-MeSATP (10^{-6} M) bei Raumtemperatur (RT). Je nach Antwortverhalten wurden die ARC-Zellen entweder der "Desensibilisierungsgruppe" HDD (**B**, **D**, **F**) oder der "repetitiv responsiven Gruppe" LDD Gruppe (**A**, **C**, **E**) zugeordnet. Die Δ Ratio-Werte sind als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M dargestellt. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die drei sequentiellen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test; [* / # / \$ P < 0,05; ** / ## / \$\$ P < 0,01; *** / ### / \$\$\$ P < 0,001].

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für je ein responsives Neuron (**C**,**D**) resp. einen responsiven Astrozyten (**E**,**F**) der HDD (**D**, **F**) bzw. LDD (**C**, **E**) Gruppe nach dreifacher Superfusionsstimulation mit (**b**) 2-MeSATP (10^{-6} M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

Während auf die erste Superfusion mit 2-MeSATP die HDD-Neurone einen Anstieg der mittleren 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio von $0,16 \pm 0,03$ zeigten, reagierte auf die folgende Superfusion nur noch ein Neuron, bei einem gemittelten Δ Ratio-Wert der Population von $0,02 \pm 0,01$. Auf die dritte Superfusionsstimulation konnte gemäß Kriterium keine Änderung der Fluoreszenz Ratio bei den charakterisierten Neuronen mehr nachgewiesen werden. Das singuläre Neuron der LDD-Gruppe zeigte ein ausgeprägtes intrazelluläres Kalziumsignal nach Erststimulation (Δ Ratio-Wert: 0,29) mit nachfolgender Reduktion auf 0,14 resp. 0,13.

Astrozyten: Ein hoher Prozentsatz (79,3 %) der purinerg stimulierten ARC-Astrozyten wies ein ausgeprägtes Kalziumsignal aufgrund der primären Superfusionsstimulation auf. Letztlich konnten 22 dieser Astrozyten der Kategorie mit repetitiver Stimulierbarkeit (LDD-Gruppe) und lediglich eine Gliazelle der HDD-Gruppe mit markanter Desensibilisierung zugeteilt werden. Dieser singuläre Astrozyt zeigte lediglich bei Erst- und Zweitstimulation Δ Ratio-Werte von 0,27 resp. 0,11. Die zahlreichen Astrozyten der LDD-Gruppe reagierten auf die dreimalige Aktivierung durch 2-MeSATP mit mittleren Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio von $0,29 \pm 0,02$, resp. $0,22 \pm 0,02$ sowie $0,20 \pm 0,02$; wobei sich die Δ Ratio-Werte der zweiten und dritten Stimulationsperiode gegenüber denen der ersten als signifikant erniedrigt erwiesen ($P < 0,001$).

3.3.4.3. Repetitive Superfusionsstimulation mit ATP bei RT

Im Rahmen der Untersuchung des Desensibilisierungsverhaltens der P2X-Rezeptorsubtypen nach Superfusionsstimulation wurden in neun "wells" aus acht Präparationen 105 Neurone, 134 Astrozyten und acht Mikrogliazellen auf ihre repetitive Responsivität gegenüber dem endogenen Purinozeptoragonist ATP (10^{-6} M) bei RT untersucht.

Neurone: Von diesen 105 Neuronen reagierten 20 Neurone (19,0 %) auf mindestens eine ATP-erge Superfusionsperiode mit einem überschwelligem, intrazellulärem Kalziumsignal. Dabei wurden 15 Neurone aufgrund der zuvor genannten Kriterien in die HDD-Gruppe und lediglich 5 Neurone in die LDD-Gruppe aufgenommen.

Die Neurone mit starkem Desensibilisierungsverhalten zeigten auf die primäre Superfusionsstimulation mit ATP (10^{-6} M) hin Δ Ratio-Werte von $0,13 \pm 0,01$, während lediglich zwei der 15 Zellen auch auf die zweite und kein einziges Neuron auf die dritte purinerge Stimulation mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ antwortete(n). Im Falle der zweiten Superfusion mit ATP konnte - inkl. der 0,001 Δ Ratio-Werte für nicht als responsiv gewertete zelluläre Antworten ($< 0,05$) - eine mittlere Fluoreszenz Ratio-Änderung von lediglich $0,02 \pm 0,01$ errechnet werden. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden folglich

hoch signifikante Unterschiede für die 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte nach der ersten ATP-ergen Stimulation im direkten Vergleich mit der zweiten ($P < 0,001$) resp. dritten äquimolaren Stimulation ($P < 0,001$) ermittelt werden.

Die fünf Neurone der LDD-Gruppe demonstrierten während aller drei Stimulationsperioden mit 10^{-6} M ATP im Superfusat markante intrazelluläre Kalziumsignale, mit 340 / 380 nm Δ Ratio-Werten von $0,21 \pm 0,09$, resp. $0,15 \pm 0,05$ bzw. $0,14 \pm 0,05$. Dabei ergab die statistische Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Daten-Pools ($P > 0,05$).

Astrozyten: Nahezu ein Drittel (31,4 %) aller getesteten ARC-Astrozyten erwies sich als responsiv nach Aktivierung durch ATP (10^{-6} M). Vergleichbar zu den in Kap. ERG 3.3.4.1 mit repetitiver Applikation des Purinozeptoragonisten 2-MeSATP erhaltenen Daten konnte von den ATP-responsiven Astrozyten die Majorität (61,9 %) der LDD-Gruppe zugeordnet werden, im Gegensatz zu lediglich 25 % der Neurone (siehe oben). Für diese 26 ARC-Astrozyten wurde nach sequentieller Stimulation mit ATP eine jeweils durchschnittliche Erhöhung der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte von $0,31 \pm 0,04$, resp. $0,17 \pm 0,02$ sowie $0,14 \pm 0,02$ ermittelt. Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erbrachte dabei hoch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Δ Ratio-Werte der ersten vs. zweiten bzw. vs. dritten Superfusionsstimulation mit ATP ($P < 0,001$). Der Desensibilisierungsgruppe HDD gehörten 11 Astrozyten der ARC-Primärkultur an (26,2 % der ATP responsiven Astrozyten), die auf den ersten Stimulus eine durchschnittliche 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderung von $0,23 \pm 0,04$ aufwiesen. Die zweite Superfusion mit ATP induzierte lediglich in zwei der 11 Astrozyten ein überschwelliges Kalziumsignal, wodurch sich ein gemittelter Δ Ratio-Wert von lediglich $0,01 \pm 0,01$ ergab. Auf die dritte Superfusionsstimulation konnte eine Änderung der Fluoreszenz Ratio bei keinem der Astrozyten mehr nachgewiesen werden.

3.3.5. Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP: Herkunft des Kalziums (extra- vs. intrazellulär)

Nachdem im Vorfeld eruiert wurde, dass der generalisierte Purinozeptoragonist 2-MeSATP für alle untersuchten Zelltypen in der neuroglialen ARC-Primärkultur einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ induzieren konnte, sollte ermittelt werden, ob diese Änderung durch Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Milieu und/oder durch eine getriggerte Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speicherorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zytoplasma hervorgerufen wurde. Ein Einstrom von Kalziumionen aus dem extrazellulären Raum in die Zelle würde eine Beteiligung ionotroper P2X-

Rezeptoren in den Zellen der ARC-Primärkultur unterstützen, wobei eine zusätzliche Expression metabotroper P2Y-Purinozeptoren hinsichtlich der Kalziumsignale nahezu ausgeschlossen werden könnte. In die Endauswertung wurden 146 Neurone, 192 Astrozyten und drei mikrogliale Zellen aus 11 "wells", beruhend auf neun Präparationen, aufgenommen. Da derartige Studien sinnvollerweise nur an Zellen mit repetitiver Aktivierbarkeit durchgeführt werden können, wird im Folgenden das zelluläre Antwortverhalten (Δ Ratio-Werte, zelluläres Kalzium-"signaling") nur für die LDD-Gruppe in tabellarischer Form (Tab. ERG 4) bzw. in Abb. ERG 11 dargestellt.

Auf die erste und dritte Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) (in kalziumhaltigem Messpuffer) bei Raumtemperatur (RT) erwiesen sich 8,9 % der Neurone ($n = 13$) mit einem überschwelligem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Δ Ratio-Werte: $0,31 \pm 0,09$ resp. $0,18 \pm 0,04$) als responsiv (Tab. ERG 4; Abb. ERG 11A). Weitere zwölf Neurone wurden der Desensibilisierungsgruppe HDD zugeordnet und somit von der finalen Auswertung ausgeschlossen (Kap. ERG 3.3.4). Nach der ersten Superfusion mit 2-MeSATP und einer achtminütigen Regenerationsphase wurden die Zellen für fünf min mit kalziumfreiem, EGTA-haltigen Messpuffer superfundiert. Dies sollte einen kompletten Austausch des Superfusionsmediums und die Eliminierung freier Kalziumionen im Messpuffer gewährleisten. Auf die Superfusion der Zellen mit 2-MeSATP (10^{-6} M) unter kalziumfreien Voraussetzungen reagierte lediglich eines der 13 Neurone mit einer marginalen Erhöhung des Δ Ratio-Wertes, so dass sich unter Einbezug eines Δ Ratio-Wertes von 0,001 für jedes nicht-responsive Neuron ein mittlerer Fluoreszenz Ratio-Wert von $0,01 \pm 0,01$ er-

| | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation 2-MeSATP: kalziumfrei | 3. Stimulation 2-MeSATP |
|------------|----------------------------|--|----------------------------|
| Neurone | $0,31 \pm 0,09$ | $0,01 \pm 0,01$ | $0,18 \pm 0,04$ |
| Astrozyten | $0,35 \pm 0,02$ | $0,13 \pm 0,01$ | $0,19 \pm 0,01$ |
| Mikroglia | 0,13 | 0,06 | 0,11 |

Tab. ERG 4: Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in Ab- und Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium.

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. - in Neuronen ($n = 13$), Astrozyten ($n = 92$) und Mikrogliazellen ($n = 2$) der ARC-Primärkultur (LDD-Gruppe) nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) für jeweils drei min bei achtminütigen Waschintervallen. Messungen erfolgten in Anwesenheit (1. und 3. Stimulation) bzw. Abwesenheit (2. Stimulation) (kalziumfreier, EGTA-haltiger Messpuffer) von extrazellulärem Kalzium.

rechnete (Tab. ERG 4). Im Rahmen der statistischen Auswertung ergab sich folgerichtig eine hoch signifikante ($P < 0,001$) Reduktion, beziehungsweise nahezu vollkommene Unterdrückung, des intrazellulären Kalziumsignals in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium - im direkten Vergleich sowohl mit dem vorausgehenden als auch nachfolgenden Kalziumsignal in Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium (Abb. ERG 11A). Ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines ARC-Neurons unter kalziumhaltigen und transient -freien Versuchsbedingungen wird exemplarisch in Abb. ERG 11B dargestellt.

In der ARC-Primärkultur antworteten 92 der 192 analysierten Astrozyten (47,9 %) sowohl auf die erste als auch letzte Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$, wobei 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte von $0,35 \pm 0,02$ resp. $0,19 \pm 0,01$ (Tab. ERG 4) errechnet wurden. Zusätzlich wurden 31 Astrozyten der HDD-Gruppe zugeordnet und nicht in die Datenauswertung übernommen. Im Unterschied zu den Neuronen der ARC-Primärkultur konnte für 68 der 92 Astrozyten auch unter kalziumfreien Bedingungen nach Superfusion mit 2-MeSATP ein überschwelliger Anstieg der Fluoreszenz Ratio-Werte registriert werden. Bei einem über alle 92 Zellen gemittelten Δ Ratio-Wert von $0,13 \pm 0,01$ erwies dieser sich dennoch sowohl gegenüber dem ersten (^{sss} $P < 0,001$) als auch dritten (^{##} $P < 0,01$) Δ Ratio-Wert in Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium als signifikant erniedrigt (Abb. ERG 11C). Als ebenfalls hoch signifikant unterschiedlich (^{***} $P < 0,001$) zeigten sich im direkten Vergleich die Amplituden der genannten ersten und dritten intrazellulären Kalziumsignale aufgrund der Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP. Bei nahezu $\frac{2}{3}$ aller responsiven ARC-Astrozyten scheint die Aktivierung funktionell exprimierter Purinozeptoren somit neben dem Einstrom von extrazellulärem Kalzium auch eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speicherorganellen zu bewirken. Ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines ARC-Neurons unter kalziumhaltigen und transient -freien Versuchsbedingungen wird exemplarisch in Abb. ERG 11D dargestellt. Dabei lässt sich zudem die transiente Reduktion der $[Ca^{2+}]_{iz}$ während der Superfusion mit kalziumfreien EGTA-Messpuffer selbst unter den Basiswert der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio erkennen.

Von den drei analysierten Mikrogliazellen konnte lediglich eine in die finale Datenauswertung übernommen werden; sie zeigte eine eindeutige Verminderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ unter kalziumfreien Versuchsbedingungen (Tab. ERG 4).

3.3.6. Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP: Temperaturabhängigkeit (RT vs. KT)

In den vorangegangenen Studien wurde die Responsivität der untersuchten Zelltypen der ARC-Primärkultur auf Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP zumeist bei RT ermittelt. Da *in vivo* bei Ratten alle biochemischen und biophysikalischen Lebensvorgän-

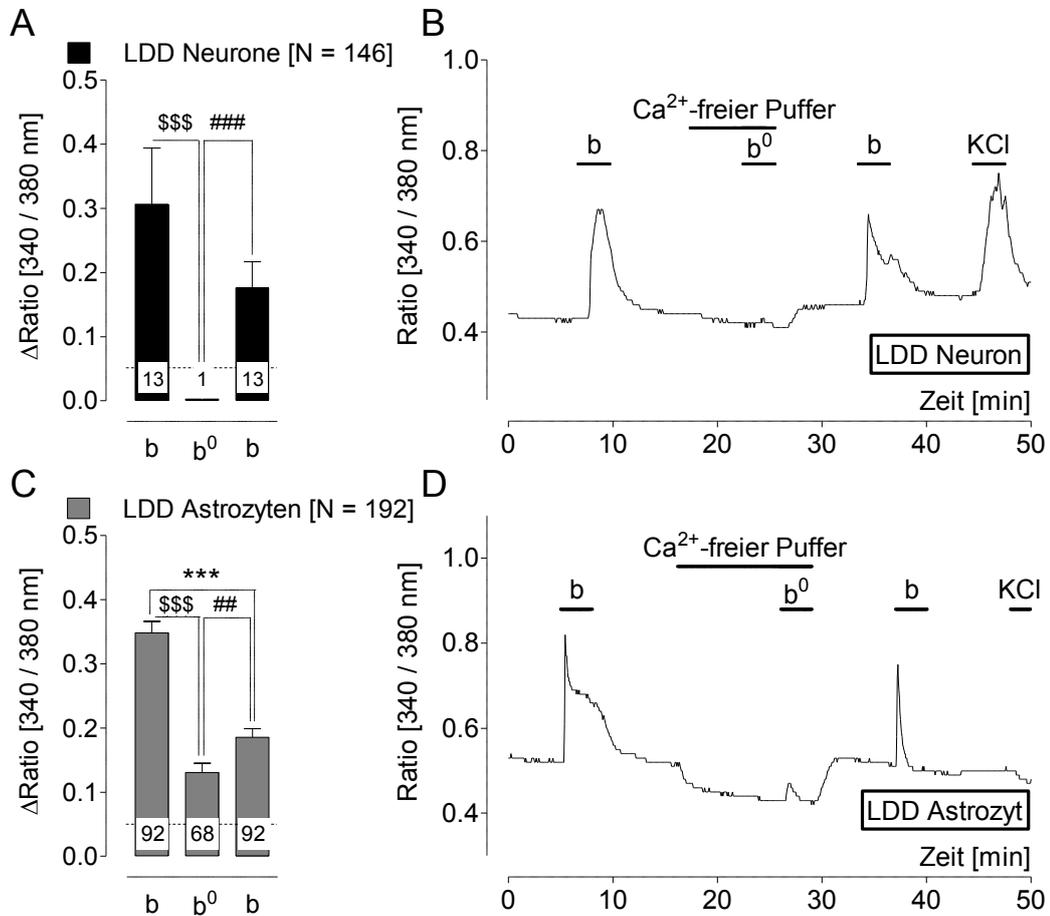


Abb. ERG 11: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulären Kalziumionen bei RT

Die Balkendiagramme in **A** resp. **C** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**A**) resp. Astrozyten (**C**) in der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) bei Raumtemperatur (RT) in Abwesenheit (**b⁰**) bzw. Anwesenheit (**b**) von extrazellulärem Kalzium als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test; [* / # / \$ $P < 0,05$; ** / ## / \$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]). Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen. Alle Zellen gehörten der Gruppe "repetitiv responsiver Zellen" (LDD) an.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein responsives Neuron (**B**) resp. einen responsiven Astrozyten (**D**) nach sequentieller Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) mit kalziumhaltigem (**b**) resp. -freiem (**b⁰**) Messpuffer, sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer. Kalziumfreie Versuchsbedingungen wurden durch die transiente (5 min) Superfusion von kalziumfreiem, EGTA-haltigen Messpuffer erreicht.

ge bei 36 - 37°C ablaufen, war es von Interesse, vergleichend den Einfluß der Raumtemperatur (RT; 25°C) und Körperkerntemperatur (KT; 36°C) auf die durch 2-MeSATP induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in den neuroglialen Zellen detailliert zu analysieren. Diese Studie wurde in zwei experimentellen Versuchsansätzen durchgeführt, wobei die Primärkultur eines "wells" dreimalig sequentiell mit 2-MeSATP (10^{-6} M) superfusionsstimuliert wurde. Dabei wurde entweder das Protokoll RT - KT - RT oder aber das Protokoll KT - RT - KT durchgeführt (Kap. MM 2.5.6.5), wobei die letzte Superfusionsperiode zur Dokumentation möglicher Desensibilisierungseffekte diente, wie bereits in Kap. ERG 3.2.4 hinreichend dargestellt. Eine postexperimentelle Einteilung der Zellen in die Desensibilisierungs- (HDD) sowie die "repetitiv responsive" Gruppe (LDD) wurde vorgenommen. Für die statistische Analyse wurde zum Ausschluss eines Desensibilisierungseffektes jeweils das Ergebnis der dritten 2-MeSATP Stimulationsperiode herangezogen.

3.3.6.1. Repetitive Stimulation mit 2-MeSATP: Temperaturprofil RT - KT - RT

Im ersten Versuchsansatz erfolgten die repetitiven Superfusionsstimulationen mit äquimolarem 2-MeSATP (10^{-6} M) alternierend bei Kammertemperaturen von 25°C, 36°C und wiederum 25°C. In 11 "wells" aus acht Zellpräparationen wurden 96 Neurone und 149 Astrozyten, jedoch keine Mikrogliazellen, hinsichtlich ihres Antwortverhaltens charakterisiert.

Neurone: Gemäß den in Kap. ERG 3.3 dargelegten Kriterien erwiesen sich 19 ARC-Neurone (19,8 %) als responsiv auf die purinerge Stimulation, wobei 10 Neurone der Desensibilisierungsgruppe HDD zugeordnet werden mussten, da zwar auf die primäre Superfusionsstimulation intrazelluläre Kalziumsignale mit Δ Ratio-Werten von $0,11 \pm 0,02$ erreicht wurden, in der dritten Stimulationsperiode jedoch keine überschwellige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mehr zu verzeichnen war. Die der LDD-Gruppe zugehörigen neun Neurone jedoch wiesen eine markante Zunahme der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte während der ersten 2-MeSATP Applikation bei RT von gemittelt $0,34 \pm 0,10$ auf, gefolgt von vergleichbar hohen $[Ca^{2+}]_i$ während der beiden nachfolgenden Stimulationsperioden bei zunächst 36°C (= KT) sowie final wieder bei RT, mit Δ Ratio-Werten von $0,31 \pm 0,09$ resp. $0,33 \pm 0,09$ (Abb. ERG 12A; Tab. ERG 5). Der direkte statistische Vergleich der ermittelten Signalamplituden aller drei Messperioden erbrachte keine signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$). Ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines ARC-Neurons bei wechselnden Temperaturen der Messkammer gemäß des RT - KT - RT Profils ist exemplarisch in Abb. ERG 12C dargestellt.

Astrozyten: Von den 148 Gliazellen astrozytären Ursprungs zeigten 106 (71,6%) ein ein-

deutiges Kalziumsignal aufgrund der ersten Superfusionsstimulation mit 10^{-6} M 2-MeS ATP. Dabei konnten 24 Zellen in die Desensibilisierungsgruppe HDD und 82 in die repetitiv responsive Gruppe LDD eingeordnet werden. Für die HDD-Astrozyten konnte lediglich nach primärer Stimulation eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Δ Ratio-Werte von $0,16 \pm 0,03$ verzeichnet werden, während auf die letzte Superfusion mit 2-MeS ATP keiner der Astrozyten mehr reagierte. Die Astrozyten der LDD-Gruppe hingegen vermochte der Purinozeptoragonist repetitiv zu aktivieren, wobei auf die primäre Induktion intrazellulärer Kalziumsignale mit Δ Ratio-Werten von $0,24 \pm 0,01$ bei RT (= $25^{\circ}C$) solche vergleichbarer Amplitude ($0,25 \pm 0,01$) auch in der nachfolgenden Stimulationsperiode bei KT (= $36^{\circ}C$) des Messpuffers zu verzeichnen waren (Tab. ERG 5). Während der nachfolgenden, dritten Superfusionsstimulation wiederum bei RT ergaben sich im direkten Vergleich zur ersten bei RT (** $P < 0,01$) sowie zweiten bei KT (### $P < 0,001$) eine signifikante Reduktion der Signalamplitude (Abb. ERG 12A) auf Δ Ratio-Werte von $0,18 \pm 0,01$.

| | 1. Stimulation 2-MeS ATP bei RT | 2. Stimulation 2-MeS ATP bei KT | 3. Stimulation 2-MeS ATP bei RT |
|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Neurone | $0,34 \pm 0,10$ | $0,31 \pm 0,09$ | $0,33 \pm 0,09$ |
| Astrozyten | $0,24 \pm 0,01$ | $0,25 \pm 0,01$ | $0,18 \pm 0,01$ |

Tab. ERG 5: Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach Superfusionsstimulation mit 2-MeS ATP bei alternierender Messkammertemperatur : Protokoll RT - KT - RT

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. - in Neuronen (n = 9) und Astrozyten (n = 82) der ARC-Primärkultur (LDD-Gruppe) nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeS ATP (10^{-6} M) für jeweils drei min bei achtminütigen Waschintervallen. Die Superfusionen mit dem Purinozeptoragonist fand sequentiell bei Raumtemperatur (RT = $25^{\circ}C$), Körperkerntemperatur der Ratte (KT = $36^{\circ}C$) und wiederum RT statt.

3.3.6.2. Repetitive Stimulation mit 2-MeS ATP: Temperaturprofil KT - RT - KT

In einem zweiten Versuchsansatz wurden Fluoreszenz Ratio-Messungen bei körperwarmem ($36^{\circ}C$ = KT) Messpuffer während des ersten und dritten 2-MeS ATP Stimulus und bei RT (= $25^{\circ}C$) während der zweiten Superfusionsstimulation durchgeführt. Insgesamt wurden 87 Neurone und 81 Astrozyten in acht "wells" aus sieben Präparationen hinsichtlich ihrer Aktivierung durch den Purinozeptoragonisten 2-MeS ATP analysiert.

Neurone: Von den 17 (19,5 %) responsiven Neuronen der ARC-Primärkultur konnten sieben der Desensibilisierungsgruppe HDD zugeordnet werden, da sie lediglich auf die

erste Superfusion von 2-MeSATP (10^{-6} M) bei KT überschwellige Δ Ratio-Werte von $0,13 \pm 0,03$ und somit eine eindeutige Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ aufwies. Auf den letzten Stimulus, wiederum bei KT, änderte sich die Ratio-Werte bei keiner Zelle mehr. Die 10 Neurone, welche sich als repetitiv stimulierbare Zellen der LDD-Gruppe erwiesen, zeigten nach der ersten Superfusionsstimulation bei KT eine ausgeprägte, transiente Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Δ Ratio-Werten von $0,24 \pm 0,05$. Während der zweiten Superfusionsperiode mit 2-MeSATP, diesmal bei RT, antworteten lediglich fünf der 10 Neurone mit einem überschwelligen Kalziumsignal, wodurch sich - inkl. der 0,001 Δ Ratio-Werte für als nicht responsiv ($\leq 0,05$) gewertete zelluläre Antworten - eine mittlere Fluoreszenz Ratio von $0,09 \pm 0,04$ errechnete (Abb. ERG 12B). Die dritte, wiederum bei KT durchgeführte Superfusionsstimulation resultierte in einer Aktivierung aller 10 Neurone mit Δ Ratio-Werten von $0,13 \pm 0,03$ (Tab. ERG 6). Die statistische Bewertung ergab ein signifikant vermindertes Antwortverhalten bei direktem Vergleich der zweiten Stimulationsperiode bei RT mit der primären bei KT ($P < 0,05$) (Abb. ERG 12B). Ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines ARC-Neurons bei Wechsel der Kamertemperatur nach KT - RT - KT Profil ist exemplarisch in Abb. ERG 12D dargestellt.

| | 1. Stimulation 2-MeSATP bei KT | 2. Stimulation 2-MeSATP bei RT | 3. Stimulation 2-MeSATP bei KT |
|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Neurone | $0,24 \pm 0,05$ | $0,09 \pm 0,04$ | $0,13 \pm 0,03$ |
| Astrozyten | $0,29 \pm 0,02$ | $0,11 \pm 0,02$ | $0,18 \pm 0,01$ |

Tab. ERG 6: Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP bei alternierender Messkammertemperatur : Protokoll KT - RT - KT

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. - in Neuronen (n = 10) und Astrozyten (n = 53) der ARC-Primärkultur (LDD-Gruppe) nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) für jeweils drei min bei achtminütigen Waschintervallen. Die Superfusionen mit dem Purinozeptoragonist fand sequentiell bei Körperkerntemperatur der Ratte (KT = $36^{\circ}C$), Raumtemperatur T = $25^{\circ}C$) und wiederum KT statt.

Astrozyten: Von 81 untersuchten Astrozyten zeigten 62 (76,5 %) eine überschwelliges intrazelluläres Kalziumsignal nach primärer Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M). Davon wurden neun Zellen der HDD Desensibilisierungsgruppe mit mittleren Δ Ratio-Werten von $0,26 \pm 0,07$ zugeordnet. Lediglich zwei und final keine dieser Astrozyten reagierte(n) bei der zweiten (RT) resp. dritten (KT) Stimulationsperiode auf den Purinozep-

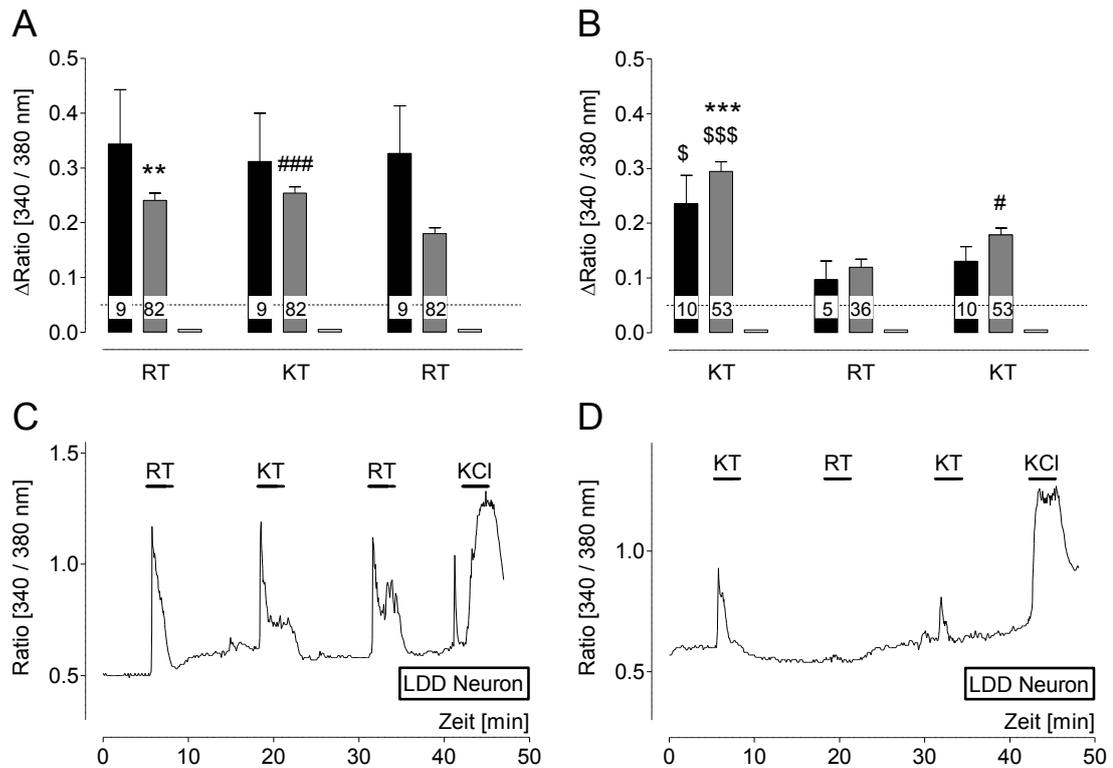


Abb. ERG 12: Vergleichende repetitive Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit 2-MeSATP (10^{-6} M) unter wechselnden RT- und KT-Temperaturbedingungen

Die Balkendiagramme in Teilbild **A** und **B** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (schwarzer Balken), Astrozyten (dunkelgrauer Balken) und Mikrogliazellen (hellgrauer Balken) nach repetitiver (3 x) Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) bei Raumtemperatur (25°C = RT) resp. Körpertemperatur (36°C = KT). In **A** wurden durch 2-MeSATP induzierte Kalziumsignale gemäß dem Temperaturmuster RT - KT - RT für 9 Neurone, 82 Astrozyten und 0 Mikrogliazellen analysiert, in **B** gemäß dem Temperaturmuster KT - RT - KT für 10 Neurone, 53 Astrozyten und 0 Mikrogliazellen. Insgesamt wurden 183 Neurone und 229 Astrozyten getestet. Die Δ Ratio-Werte sind als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M dargestellt. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die drei sequentiellen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test [* / # / \$ $P < 0,05$; ** / ## / \$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]). Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für je ein responsives Neuron der "repetitiv responsiven Gruppe" LDD nach dreifacher Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) unter RT - KT - RT (**C**) bzw. KT - RT - KT (**D**) Bedingungen der Messpuffertemperatur. Finale Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

tagonist. Für die 53 Astrozyten der LDD-Gruppe ohne ausgeprägt adaptives Verhalten konnten während der ersten Superfusion mit 2-MeSATP bei KT (= 36°C) Fluoreszenz Ratio-Werte von $0,29 \pm 0,02$ errechnet werden. Auf die nachfolgende Stimulationsperiode bei RT (= 25°C) reagierten nur noch 36 der zuvor aktivierten Astrozyten, so dass sich eine durchschnittliche Erhöhung der Fluoreszenz Ratio von lediglich $0,09 \pm 0,04$ ergab. Die abschließende Superfusion, wiederum bei KT, resultierte in einer überschwelligeren Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aller 53 Astrozyten mit Δ Ratio-Werten von $0,18 \pm 0,01$ (Abb. ERG

12B; Tab. ERG 6). Im statistischen Vergleich zeigte sich die Signalamplitude der ersten Stimulationsperiode bei KT als hoch signifikant gegenüber derjenigen der zweiten purinergen Stimulation bei RT (***) ($P < 0,001$) als auch der dritten Stimulation bei KT (\$\$\$) ($P < 0,001$) erhöht. Diese wiederum erwies sich als signifikant gegenüber derjenigen bei 25°C (RT) gesteigert (#) ($P < 0,05$).

3.3.7. Modulation der Agonist-induzierten Kalziumsignale in Zellen der ARC-Primärkultur durch generalisierte P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten bei KT

Aufbauend auf den Ergebnissen der Versuchsreihe mit repetitiver, purinerg Stimulation der ARC-Primärkultur bei äquimolarer Konzentration des generellen P2X-Purinozeptoragonisten 2-MeSATP (Kap. ERG 3.3.4), sollte in nachfolgenden Untersuchungen durch Koapplikation der generalisierten P2-Purinozeptorantagonisten PPADS, Suramin sowie Reactive blue-2 (Rb-2) die postulierte Hemmung der durch 2-MeSATP induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der neuroglialen ARC-Primärkultur bei KT nachgewiesen werden. Auch wenn, vergleichbar zu den in Kap. ERG 3.3.4 erhaltenen Ergebnissen, eine post-experimentelle Einteilung der analysierten Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen in die beschriebene "Desensibilisierungsgruppe" (HDD) bzw. "repetitiv responsive Gruppe" (LDD) vorgenommen wurde, wird im Folgenden jeweils explizit nur das zelluläre Antwortverhalten (Δ Ratio-Werte) für die LDD-Gruppe ohne ausgeprägte Desensibilisierung der Kalziumsignale in tabellarischer bzw. graphischer Form wiedergegeben. Der Purinozeptoragonist 2-MeSATP wurde jeweils in einer Konzentration von 10^{-7} M, die Antagonisten in äquimolarer, meist jedoch 10- bzw. 1000-fach höherer Konzentration eingesetzt.

3.3.7.1. PPADS

Im Rahmen der Charakterisierung einer funktionellen Expression ionotroper P2X-Rezeptoren in den Zelltypen der ARC-Primärkultur war es von Interesse, ob die Agonist-induzierte Responsivität durch den generalisierten Purinozeptorantagonisten PPADS in reversibler Weise gehemmt werden konnte. Gemäß des in Kap. MM 2.5.6.6 dargestellten Messprotokolls wurde in einem ersten Telexperiment PPADS in einer Konzentration von 10^{-4} M eingesetzt. Aus acht Präparationen (11 analysierte "wells") gingen nach den in Kap. ERG 3.3.4 genannten Auswahlkriterien insgesamt 132 Neurone, 93 Astrozyten und vier Mikrogliazellen in die finale Analyse ein. Die Ergebnisse inkl. der statistischen Datenauswertung sind für Neurone resp. Astrozyten der LDD-Gruppe in Abb. ERG 13A/C graphisch dargestellt; die gemittelten 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die untersuchten Zelltypen der LDD-Gruppe werden in Tab. ERG 7 angeführt.

Neurone: Von den 132 post-experimentell eindeutig als Neurone charakterisierten Zellen der ARC-Primärkultur zeigten 20 (15,2 %) auf die primäre Superfusion mit 2-MeSATP (10^{-7} M) eine überschwellige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Dabei wurden jeweils 10 Neurone aufgrund der zuvor beschriebenen Kriterien der HDD- bzw. LDD-Gruppe zugewiesen. In den Neuronen der repetitiv responsiven LDD-Gruppe induzierte die primäre resp. quartäre Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-7} M) *per se* transiente intrazelluläre Kalziumsignale mit Δ Ratio-Werten von $0,33 \pm 0,06$ resp. $0,24 \pm 0,04$ (Tab. ERG 7). Die Koapplikation von PPADS (10^{-4} M) und 2-MeSATP (10^{-7} M) verursachte in lediglich einem Neuron eine überschwellige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Inklusive der einheitlich auf 0,001 gesetzten Δ Ratio-Werte der neun nicht-responsiven Neurone ergab sich somit im arithmetischen Mittel ein Δ Ratio-Wert von $0,01 \pm 0,01$ (Abb. ERG 13A), was einer ausgeprägten Hemmung des durch den Agonisten hervorgerufenen Kalziumsignals gleichkommt. Die Superfusion mit PPADS alleine bedingte in neun der 10 analysierten ARC-Neurone eine - wenn überhaupt - weit unterschwellige, marginale Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei gemittelter (n = 10) 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio von nur $0,02 \pm 0,02$ (Tab. ERG 7). Selbst in 1000-fach höherer Konzentration als 2-MeSATP zeigte PPADS somit keine (pseudo-)agonistische, pharmakologische Aktivität. Die statistische

| PPADS 10^{-4} M | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation PPADS | 3. Stimulation PPADS + 2-MeSATP | 4. Stimulation 2-MeSATP |
|----------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Neurone | $0,33 \pm 0,06$ | $0,02 \pm 0,02$ | $0,01 \pm 0,01$ | $0,24 \pm 0,06$ |
| Astrozyten | $0,38 \pm 0,02$ | 0 | $0,02 \pm 0,01$ | $0,20 \pm 0,01$ |
| PPADS 10^{-5} M | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation PPADS | 3. Stimulation PPADS + 2-MeSATP | 4. Stimulation 2-MeSATP |
| Neurone | $0,21 \pm 0,05$ | $0,01 \pm 0,01$ | $0,02 \pm 0,01$ | $0,13 \pm 0,03$ |
| Astrozyten | $0,35 \pm 0,02$ | 0 | $0,13 \pm 0,02$ | $0,21 \pm 0,02$ |

Tab. ERG 7: Blockade der Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP durch den generalisierten P2-Rezeptorantagonisten PPADS

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. - in Neuronen (n = 10 für PPADS 10^{-4} M bzw. n = 10 für PPADS 10^{-5} M) und Astrozyten (n = 53 für PPADS 10^{-4} M bzw. n = 71 für PPADS 10^{-5} M) der "repetitiv responsiven Gruppe" der ARC-Primärkultur (LDD-Gruppe) bei 36°C (= KT) nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-7} M) für jeweils drei min bei achtminütigen Waschintervallen.

Datenanalyse in Abwesenheit (Stimulation 1 und 4) bzw. Anwesenheit (Stimulation 3) des generalisierten P2X / P2Y-Rezeptorantagonisten PPADS (10^{-5} bzw. 10^{-4} M) sowie für die Kontrollapplikation von PPADS alleine (Stimulation 2).

Auswertung ergab folglich signifikante Unterschiede für den direkten Vergleich der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte zwischen den solitären, Agonist-induzierten Kalziumsignalen (Stimulationen 1 und 4) sowie denjenigen bei Koapplikation des generalisierten P2-Rezeptorantagonisten PPADS (Stimulation 3; ** $P < 0.01$) sowie bei Applikation von PPADS alleine (Stimulation 2; ## $P < 0.01$). Bezüglich des Zeitverlaufes der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines Neurons mit vollständiger, reversibler Hemmung des durch 2-MeSATP indu-

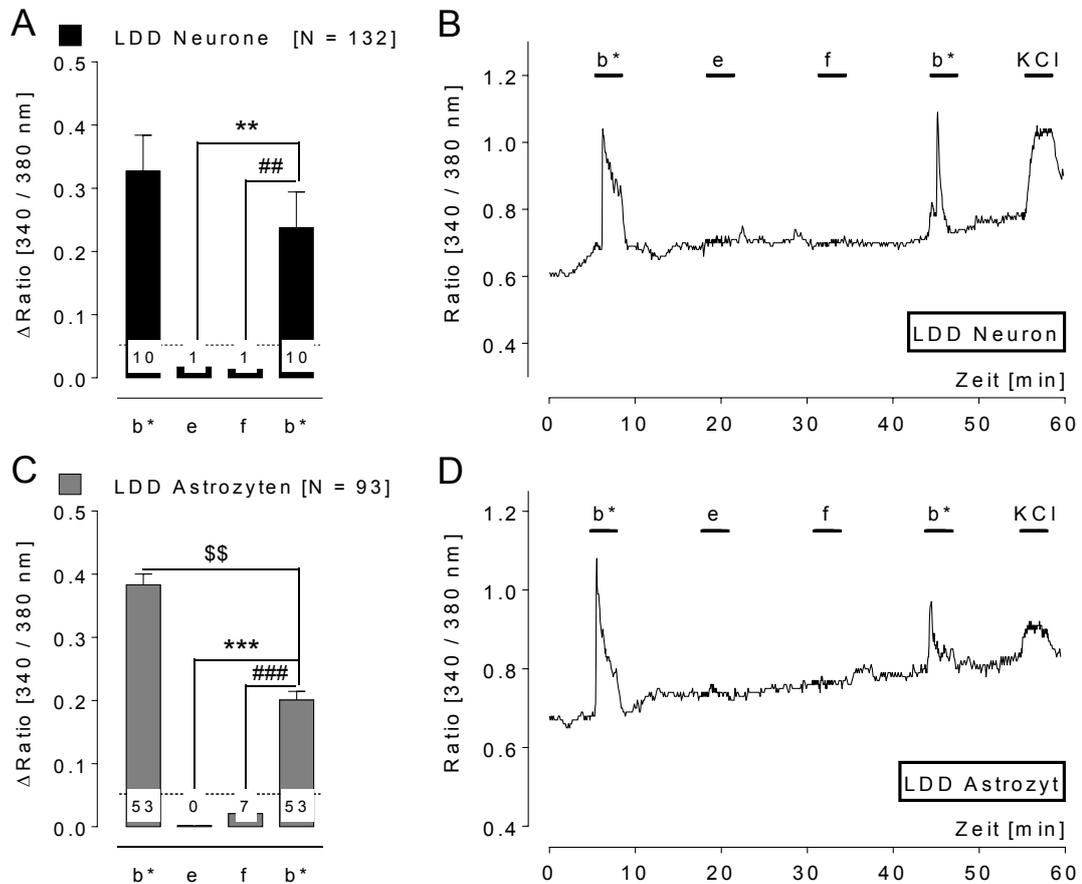


Abb. ERG 13 Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten PPADS (10^{-4} M) bei KT

Die Balkendiagramme in **A** und **C** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**A**) resp. Astrozyten (**C**) (jeweils LDD-Gruppe) nach Superfusionsstimulation bei 36°C (KT) mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**e**) PPADS (10^{-4} M) und (**f**) 2-MeSATP (10^{-7} M) + PPADS (10^{-4} M) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test [* / # / \$ $P < 0,05$; ** / ## / \$\$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]. Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein responsives Neuron (**B**) resp. einen responsiven Astrozyten (**D**) nach sequentieller Superfusionsstimulation bei KT mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**e**) PPADS (10^{-4} M) und (**f**) 2-MeSATP (10^{-7} M) + PPADS (10^{-4} M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

zierten Kalziumsignals in Gegenwart von PPADS in 1000-fach höherer Konzentration wird ein Einzelbeispiel exemplarisch in *Abb. ERG 13B* dargestellt.

Astrozyten: Nahezu zwei Drittel (67,7 %) aller analysierten ARC-Astrozyten reagierten auf die primäre 2-MeSATP-erge Superfusionsperiode mit einem überschwelligem, intrazellulären Kalziumsignal. Vergleichbar zu den in *Kap. ERG 3.3.4.2* mit repetitiver Applikation des P2-Agonisten 2-MeSATP erhaltenen Resultaten konnte die überwiegende Mehrheit der responsiven Astrozyten (84,1 %) der LDD-Gruppe zugeordnet werden. Für diese 53 Astrozyten wurde nach Superfusion mit dem Agonisten (Stimulationen 1 und 4) eine jeweils durchschnittliche Zunahme der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte um $0,38 \pm 0,02$ resp. $0,20 \pm 0,01$ ermittelt (*Tab. ERG 7*), wobei im direkten Vergleich der Amplituden die finale Reizantwort während Stimulation 4 sich als signifikant ($^{\$}$ $P < 0,01$) niedriger erwies. In Anwesenheit von PPADS (10^{-4} M; Stimulation 3) reagierten sieben der 53 Astrozyten mit einer überschwelligem Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auf gemeinsame Superfusion mit 2-MeSATP, während für die Mehrzahl an Gliazellen (46) keine Änderung der Fluoreszenz Ratio-Werte nachgewiesen werden konnte. Bei einem über alle 53 Astrozyten gemittelten Δ Ratio-Wert von $0,13 \pm 0,02$ (*Tab. ERG 7*) zeigte sich dieser sowohl gegenüber dem primären ($P < 0,001$) als auch quartären ($^{###}$ $P < 0,001$) Δ Ratio-Wert bei Applikation von 2-MeSATP als hoch signifikant erniedrigt (*Abb. ERG 13C*). Bei nahezu 87 % der repetitiv responsiven Astrozyten scheint die Aktivierung funktionell exprimierter P2-Rezeptoren somit durch den Antagonisten PPADS in einer Konzentration von 10^{-4} M vollständig supprimiert worden zu sein. Die Superfusion mit PPADS alleine bedingte in keinem der analysierten Astrozyten eine Veränderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. Ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines Astrozyten der LDD-Gruppe wird exemplarisch in *Abb. ERG 13D* dargestellt.

Mikrogliazellen: Von den lediglich vier analysierten Mikrogliazellen konnte keine in die finale Datenauswertung übernommen werden; sie wiesen ein eindeutiges Dekrement der Fluoreszenz Ratio-Amplitude unter wiederholter Agonistensuperfusion auf.

In einer zweiten Teilstudie wurde der generelle P2-Rezeptorantagonist PPADS in einer 10-fach niedrigeren Konzentration (10^{-5} M) eingesetzt, um neuropharmakologisch möglicherweise besser die Beteiligung verschiedener P2X-Rezeptorsubtypen diskriminieren zu können (Burnstock, 2006b; North, 2002). Aus experimentellen Studien an 17 "wells" aus elf Präparationen gingen insgesamt 145 Neurone, 160 Zellen astrozytären Ursprungs und vier Mikrogliazellen in die Auswertung ein. Die Ergebnisse, inklusive der statistischen Auswertung sind für Neurone resp. Astrozyten der LDD-Gruppe in *Abb. ERG 14A/C* graphisch dargestellt; die gemittelten 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Ände-

rungen für die untersuchten Zelltypen der LDD-Gruppe werden in *Tab. ERG 7* angeführt.

Neurone: In der neuroglialen ARC-Primärkultur zeigten 10 der 145 analysierten Neurone (6,9 %) sowohl auf die erste als auch letzte Stimulation mit 2-MeSATP eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, wobei Δ Ratio-Werte von $0,21 \pm 0,05$ resp. $0,13 \pm 0,03$ errechnet wurden. Zudem wurden acht Neurone (5,5 %) der HDD-Gruppe zugeordnet. Während der Kontrollapplikation von PPADS (10^{-5} M) alleine wies eine einzige Zelle der LDD-Gruppe einen Anstieg der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio (mittlerer Δ Ratio-Wert inkl. der neun nicht-reaktiven Zellen: $0,01 \pm 0,01$) auf. Auf die Superfusion der Zellen mit 2-MeSATP (10^{-7} M) in Anwesenheit von PPADS (10^{-5} M) reagierten zwei der zehn Neurone mit einer marginalen Erhöhung des Δ Ratio-Wertes, so dass sich unter Inklusion des Δ Ratio-Wertes von 0,001 für jedes nicht-responsive Neuron ein durchschnittlicher 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Wert von nur $0,02 \pm 0,01$ ermitteln ließ (*Tab. ERG 7*). Die statistische Datenauswertung erbrachte dabei eine signifikante Verminderung der Δ Ratio-Amplitude beim Vergleich der Δ Ratio-Werte der dritten mit ersten bzw. vierten Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in Ab- resp. Anwesenheit des Antagonisten PPADS ($\# P < 0,05$). Wie auch im vorangegangenen Telexperiment erwies sich PPADS, auch in einer 10-fach niedrigeren Konzentration, wiederum als effektiv in der Reduktion der Anzahl der auf 2-MeSATP-responsive Neurone bzw. der Amplitude der intrazellulären Kalziumsignale.

Astrozyten: Von den 160 Gliazellen astrozytären Ursprungs induzierte die primäre resp. finale Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-7} M) bei 71 Zellen (44,4 %) ein überschwelliges Kalziumsignal mit durchschnittlichen Δ Ratio-Werten von $0,35 \pm 0,02$ resp. $0,21 \pm 0,02$. Obwohl zwischen beiden Amplituden der Kalziumsignale nach purinenger Stimulation ein signifikanter Unterschied ermittelt wurde ($\$ P < 0,05$), konnten alle diese Zellen der LDD-Gruppe zugeordnet werden (der HDD-Gruppe gehörten 15 auf 2-MeSATP responsive Astrozyten an). Auf die nachfolgende purinerge Superfusionsstimulation in Gegenwart von PPADS (10^{-5} M) reagierten noch 63,4 % (45 Zellen) der zuvor aktivierten LDD-Astrozyten, so dass sich im arithmetischen Mittel eine mittlere Erhöhung der Fluoreszenz Ratio von $0,13 \pm 0,02$ errechnete (*Tab. ERG 7*). Im Rahmen der statistischen Auswertung ergab sich folgerichtig eine signifikante ($\#\# P < 0,01$) Reduktion der durchschnittlichen 340 / 380 nm Fluoreszenz Δ Ratio-Werte in Anwesenheit von PPADS, im direkten Vergleich sowohl mit dem vorausgehenden als auch nachfolgenden 2-MeSATP-induzierten Kalziumsignal in Abwesenheit des Antagonisten (*Abb. ERG 14C*). Ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines ARC-Astrozyten wird exemplarisch in *Abb. ERG 14D* dargestellt. Somit vermochte PPADS in einer Konzentration von 10^{-5} M lediglich bei ca. $\frac{1}{3}$ aller responsiven ARC-Astrozyten die Aktivierung funk-

tionell exprimierter Purinozeptoren und somit den Einstrom von Ca^{2+} in den intrazellulären Raum vollständig zu unterdrücken. In diesem Zusammenhang konnte für Astrozyten somit eine dosisabhängige Reduktion der gemittelten ΔRatio -Werte für PPADS-Konzentrationen von 10^{-5} bzw. 10^{-4} M ermittelt werden.

Mikrogliazellen: Keine der vier untersuchten Mikrogliazellen reagierte auf die wiederholte Superfusion mit dem P2X-Agonisten mit einer repetitiven Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

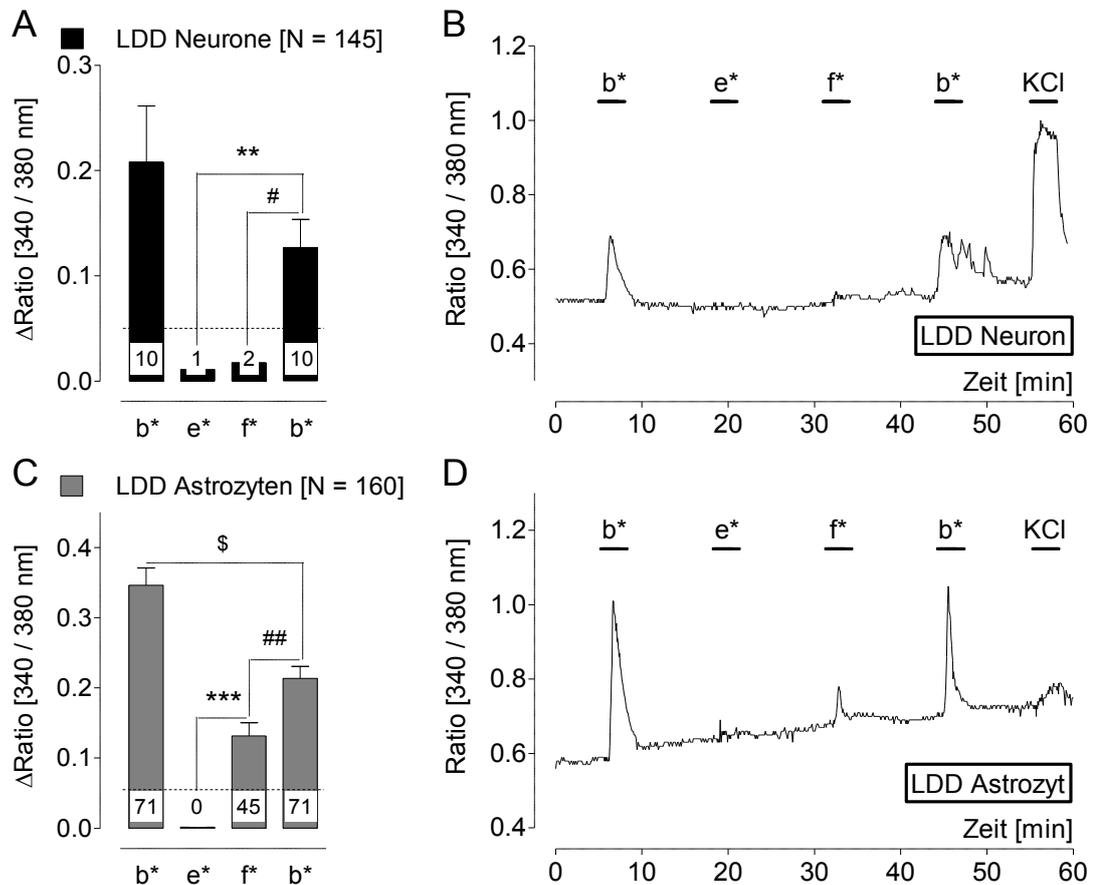


Abb. ERG 14 Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten PPADS (10^{-5} M) bei RT

Die Balkendiagramme in **A** und **C** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**A**) resp. Astrozyten (**C**) (jeweils LDD-Gruppe) nach Superfusionsstimulation bei 36°C (RT) mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**e***) PPADS (10^{-5} M) und (**f***) 2-MeSATP (10^{-7} M) + PPADS (10^{-5} M) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test [* / # / \$ $P < 0,05$; ** / ## / \$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]). Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein responsives Neuron (**B**) resp. einen responsiven Astrozyten (**D**) nach sequentieller Superfusionsstimulation bei RT mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**e***) PPADS (10^{-5} M) und (**f***) 2-MeSATP (10^{-7} M) + PPADS (10^{-5} M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

3.3.7.2. Suramin

Vergleichbar zu den in *Kap. ERG 3.3.7.1* dargestellten experimentellen Untersuchungen, wurde in weiteren Studien die potentiell inhibitorische Wirkung des generalisierten P2X- / P2Y-Purinozeptorantagonisten Suramin auf den durch 2-MeSATP induzierbaren Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ in Zellen der ARC-Primärkultur bei KT (= 36°C) charakterisiert. In einem ersten Telexperiment wurde Suramin in einer finalen Konzentration von 10^{-4} M in 19 "wells" aus elf Präparationen eingesetzt; dabei wurden 114 Neurone, 165 Astrozyten und neun mikrogliale Zellen auf ihre Reponsivitätsmuster hin analysiert. Die Resultate inkl. der statistischen Auswertung sind für Neurone resp. Astrozyten der LDD-Gruppe in *Abb. ERG 15A,C* graphisch dargestellt; die durchschnittlichen 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die untersuchten Zellentypen der LDD-Gruppe werden in *Tab. ERG 8* aufgeführt.

Neurone: Nach den zuvor beschriebenen Kriterien (*Kap. ERG 3.3.4*) wurden von den nach der primären Stimulation mit 2-MeSATP überschwellig aktivierten 15 Neuronen (13,2 %) sieben der HDD- und acht der LDD-Gruppe zugeordnet. Diese acht LDD-Neurone mit geringem Desensibilisierungsverhalten (53,3 %) zeigten sowohl auf die erste als auch finale Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-7} M) gemittelte Δ Ratio-Änderungen von $0,31 \pm 0,05$ resp. $0,22 \pm 0,04$, die sich als nicht signifikant voneinander unterschiedlich erwiesen ($P > 0,05$). Auf die Applikation lediglich des Antagonisten Suramin konnte keine messbare Veränderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ verzeichnet werden, und nur ein Neuron erwies sich während der simultanen Superfusion mit 2-MeSATP (10^{-7} M) und Suramin (10^{-4} M) (3. Stimulation) als marginal responsiv, wodurch sich inkl. der sieben vollkommen unreaktiven Zellen (gewertet als Δ Ratio-Werte von 0,001) eine arithmetisch gemittelte Zunahme des Δ Ratio-Wertes von $0,01 \pm 0,01$ errechnete (*Tab. ERG 8; Abb. ERG 15A*). Suramin in der Konzentration von 10^{-4} M erwies sich somit als hochpotenter Purinozeptorantagonist ohne eigene (pseudo-)agonistische Wirkung. Die statistische Analyse der ermittelten Daten ergab dabei eine hoch signifikante Reduktion der Δ Ratio-Werte beim direkten Vergleich der Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in An- (3. Stimulation) bzw. Abwesenheit des Antagonisten Suramin vor (1. Stimulation; $P < 0,001$) bzw. nach (4. Stimulation; $## P < 0,01$) der Koapplikation. Ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte eines Neurons der LDD-Gruppe wird exemplarisch in *Abb. ERG 15B* dargestellt.

Astrozyten: Von den 165 immunzytochemisch identifizierten Astrozyten ergab sich für die responsiven Zellen ($n = 116$; 70,3 %) ein 1 : 9 Verhältnis an Gliazellen, die der HDD- bzw. LDD-Gruppe zugeordnet werden konnten. Die 100 Astrozyten der LDD-Gruppe de-

| Suramin 10 ⁻⁴ M | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation Suramin | 3. Stimulation Suramin + 2-MeSATP | 4. Stimulation 2-MeSATP |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|---|----------------------------|
| Neurone | 0,31 ± 0,05 | 0 | 0,01 ± 0,01 | 0,22 ± 0,04 |
| Astrozyten | 0,36 ± 0,02 | < 0,005 | 0,01 ± 0,01 | 0,21 ± 0,01 |
| Suramin 10 ⁻⁵ M | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation Suramin | 3. Stimulation Suramin + 2-MeSATP | 4. Stimulation 2-MeSATP |
| Neurone | 0,26 ± 0,05 | 0 | 0,03 ± 0,01 | 0,18 ± 0,04 |
| Astrozyten | 0,39 ± 0,02 | 0,01 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 0,25 ± 0,02 |

Tab. ERG 8: Blockade der Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP durch den generalisierten P2X- / P2Y-Rezeptorantagonisten Suramin

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. - in Neuronen (n = 8 für Suramin 10⁻⁴ M bzw. n = 8 für Suramin 10⁻⁵ M) und Astrozyten (n = 100 für Suramin 10⁻⁴ M bzw. n = 93 für Suramin 10⁻⁵ M) der "repetitiv responsiven Gruppe" der ARC-Primärkultur (LDD-Gruppe) bei 36°C (= KT) nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10⁻⁷ M) für jeweils drei min bei achtminütigen Waschintervallen.

Datenanalyse in Abwesenheit (Stimulation 1 und 4) bzw. Anwesenheit (Stimulation 3) des generalisierten P2X / P2Y-Rezeptorantagonisten Suramin (10⁻⁵ bzw. 10⁻⁴ M) sowie für die Kontrollapplikation von Suramin alleine (Stimulation 2).

monstrierten eine markante Erhöhung der mittleren 340 / 380 nm Fluoreszenz Δ Ratio-Werte von 0,36 \pm 0,02 resp. 0,21 \pm 0,01 auf die primäre resp. quartäre Stimulation mit 2-MeSATP (10⁻⁷ M), wobei die Stimulation zu Beginn des Versuches signifikant (\$\$\$ P < 0,001) stärker ausfiel. Superfusion der Primärkultur mit dem P2X-/ P2Y-Rezeptorantagonisten Suramin (10⁻⁴ M) alleine vermochte bei lediglich drei Astrozyten marginal überschwellige Kalziumsignale zu induzieren, so dass sich ein mittlerer Δ Ratio-Wert (inkl. der 97 nicht-reaktiven Zellen) von < 0,005 errechnen ließ. In zwei der 100 Gliazellen vermochte 2-MeSATP (10⁻⁷ M) auch bei Koapplikation mit Suramin in 1000-fach höherer Konzentration (10⁻⁴ M) die [Ca²⁺]_i unverändert zur nachfolgenden 2-MeSATP-ergen Stimulation zu erhöhen, und in weiteren fünf Gliazellen konnte lediglich eine Teilreduktion des Kalziumsignals verzeichnet werden. Da bei der großen Mehrzahl (n = 93) der getesteten Astrozyten der LDD-Gruppe Suramin das Agonist-induzierte Kalziumsignal jedoch vollständig zu supprimieren vermochte, errechnete sich im Mittel ein Δ Ratio-Wert von lediglich 0,01 \pm 0,01 (Tab ERG 8; Abb. ERG 15C). Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden folglich hoch signifikante Unterschiede für die 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte nach der ersten (P < 0,001) resp. finalen (### P < 0,001) 2-MeSATP-ergen Stimulation im direkten Vergleich mit der dritten Stimulation in Anwesenheit von Suramin ermittelt. Ein

Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines ARC-Astrozyten unter Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in Ab- und Anwesenheit des generalisierten P2X- / P2Y-Rezeptorantagonisten Suramin wird exemplarisch in *Abb. ERG 15D* dargestellt. Dabei lässt sich die deutliche Hemmung des Agonist-induzierten Kalziumsignals durch Suramin erkennen.

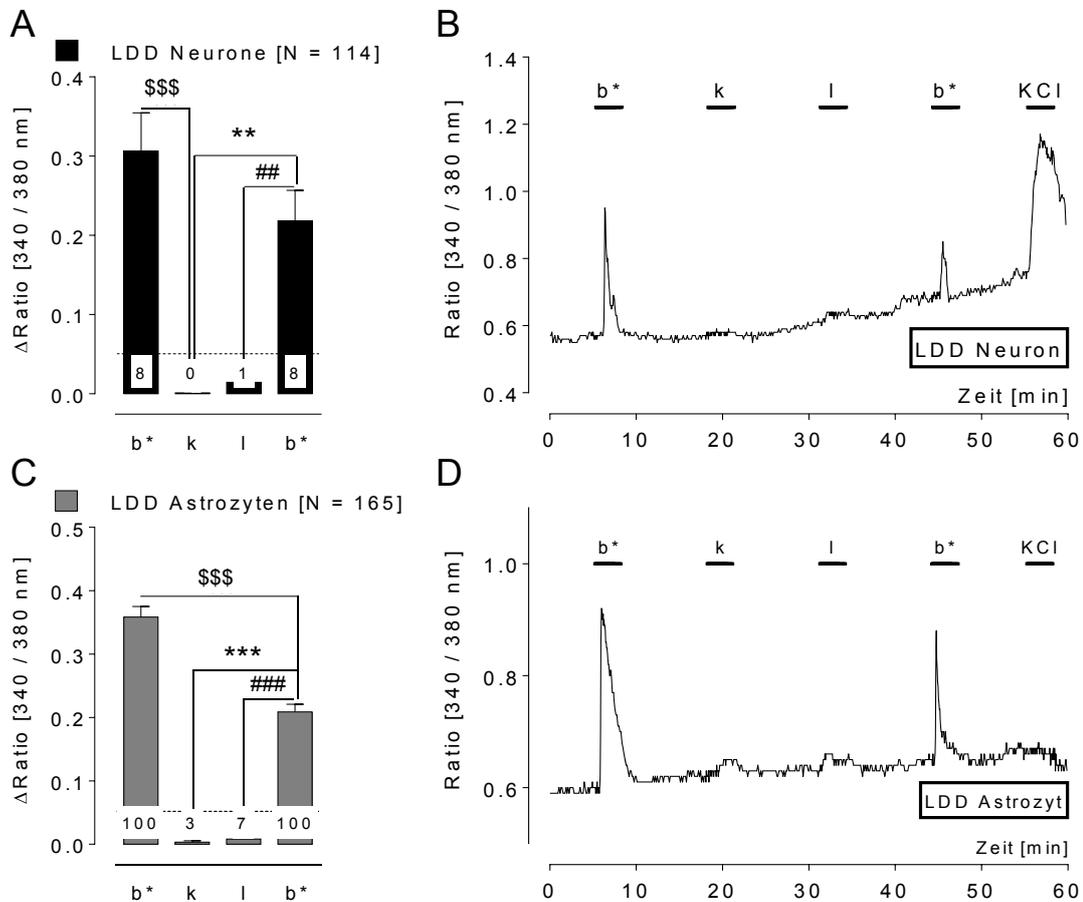


Abb. ERG 15 Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X- / P2Y-Purinozeptorantagonisten Suramin (10^{-4} M) bei KT

Die Balkendiagramme in **A** und **C** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**A**) resp. Astrozyten (**C**) (jeweils LDD-Gruppe) nach Superfusionsstimulation bei 36°C (KT) mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**k**) Suramin (10^{-4} M) und (**l**) 2-MeSATP (10^{-7} M) + Suramin (10^{-4} M) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test [* / # / \$ $P < 0,05$; ** / ## / \$\$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]). Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein responsives Neuron (**B**) resp. einen responsiven Astrozyten (**D**) nach sequentieller Superfusionsstimulation bei KT mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**k**) Suramin (10^{-4} M) und (**l**) 2-MeSATP (10^{-7} M) + Suramin (10^{-4} M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

Mikrogliazellen: Im Rahmen der wiederholten Superfusion mit 2-MeSATP in äquimolarer Konzentration (10^{-7} M) zeigten von den neun analysierten Mikrogliazellen der ARC-Primärkultur vier eine mittlere Fluoreszenz Ratio-Änderung von $0,12 \pm 0,04$ lediglich auf die primäre Stimulation. Sie erwiesen sich somit als ausgesprochen desensibilisierbar und eine potentiell hemmende Wirkung von Suramin ließ sich nicht analysieren.

Im Rahmen des zweiten Teilexperiments mit Einsatz von Suramin in einer 10-fach geringeren Konzentration (10^{-5} M) wurden in 21 "wells" aus zwölf Präparationen 181 Neurone, 201 Astrozyten und neun Mikrogliazellen auf die Modulation der Agonist-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ hin analysiert.

Neurone: Auf die 2-MeSATP-erge (10^{-7} M) Superfusion (1. und 4. Stimulation) bei KT (= $36^{\circ}C$) erwiesen sich 4,4 % der Neurone ($n = 8$) als repetitiv responsiv (LDD-Gruppe), wobei nicht-signifikant voneinander unterschiedliche Fluoreszenz Ratio-Änderungen von $0,26 \pm 0,05$ resp. $0,18 \pm 0,04$ errechnet wurden (Tab. ERG 8; Abb. ERG 16A). Weitere sechs Neurone wurden der HDD-Gruppe zugeordnet und somit von der finalen Auswertung ausgeschlossen (Kap. ERG 3.3.7). Während die Koapplikation von Suramin bei fünf der LDD-Neurone eine vollständige Blockade der Agonist-induzierten Kalziumantwort zur Folge hatte, wurde für drei Zellen ein überschwelliger Anstieg ($> 0,05$) der Fluoreszenz Ratio registriert. Bei einem über alle acht Neurone gemittelten Δ Ratio-Wert von $0,03 \pm 0,01$ erwies dieser sich sowohl gegenüber dem ersten ($P < 0,01$) als auch vierten ($\# P < 0,05$) Δ Ratio-Wert als signifikant erniedrigt (Abb. ERG 16A). Als ebenfalls signifikant unterschiedlich zeigten sich im direkten Vergleich die Signalamplituden der zweiten vs. ersten ($P < 0,001$) bzw. vierten ($** P < 0,01$) Stimulation, da Suramin alleine in keiner Zelle zu einem überschwelligem Kalziumsignal führte. Exemplarisch wird der zeitliche Versuchsverlauf für ein vollständig inhibiertes LDD-Neuron in Abb. ERG 16B graphisch dargestellt.

Astrozyten: In der ARC-Primärkultur antwortete nahezu die Hälfte der 201 analysierten Astrozyten (46,3 %) sowohl auf die primäre als auch finale Stimulation durch den Agonisten mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, wobei durchschnittliche Δ Ratio-Werte von $0,36 \pm 0,02$ resp. $0,25 \pm 0,02$ (Tab. ERG 8) errechnet wurden. Dabei erwies sich die Amplitude des quartären Kalziumsignals als signifikant ($\$ P < 0,01$) gegenüber dem primären erniedrigt. Zudem wurden weitere zwölf Astrozyten (6,0 %) in die Desensibilisierungsgruppe eingeordnet. Die Superfusionsstimulation mit Suramin (10^{-5} M) alleine verursachte in lediglich einer der 93 Astrozyten ein überschwelliges Kalziumsignal, wodurch ein mittlerer Δ Ratio-Wert von $0,01 \pm 0,01$ errechnet wurde. Im Unterschied zur den für Neurone der ARC-Primärkultur erhaltenen Ergebnissen konnte für 71 der 93 LDD-Astrozyten

(76,3 %) auch in Gegenwart des P2X- /P2Y-Rezeptorantagonisten (10^{-5} M) während der Superfusion mit 2-MeSATP (10^{-7} M) ein überschwelliger Anstieg der Fluoreszenz Ratio ermittelt werden. Für 30 dieser LDD-Astrozyten ließ sich im direkten Vergleich mit dem nachfolgenden 2-MeSATP-ergen Stimulus sogar keinerlei Reduktion der Signalamplitude

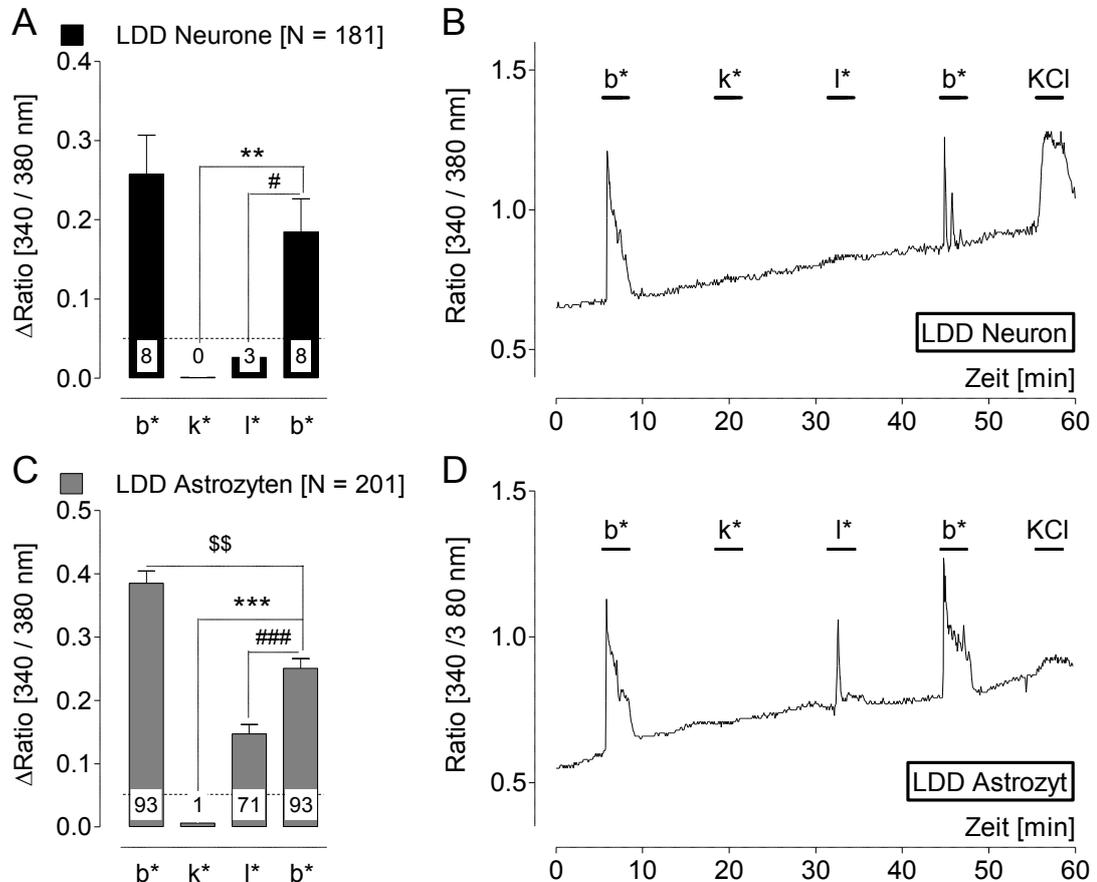


Abb. ERG 16 Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X / P2Y-Purinozeptorantagonisten Suramin (10^{-5} M) bei KT

Die Balkendiagramme in **A** und **C** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**A**) resp. Astrozyten (**C**) (jeweils LDD-Gruppe) nach Superfusionsstimulation bei 36°C (KT) mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**k***) Suramin (10^{-5} M) und (**l***) 2-MeSATP (10^{-7} M) + Suramin (10^{-5} M) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / § kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test [* / # / § $P < 0,05$; ** / ## / §§ $P < 0,01$; *** / ### / §§§ $P < 0,001$]). Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein responsives Neuron (**B**) resp. einen responsiven Astrozyten (**D**) nach sequentieller Superfusionsstimulation bei KT mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**k***) Suramin (10^{-5} M) und (**l***) 2-MeSATP (10^{-7} M) + Suramin (10^{-5} M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

aufzeigen, während bei 41 LDD-Astrozyten eine partielle Inhibition zu verzeichnen war. Im Rahmen der statistischen Datenanalyse wurde für die gesamte Zellpopulation eine hoch signifikante Reduktion der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte bei purinenger Superfusionsstimulation in Gegenwart von Suramin, im direkten Vergleich mit der primären ($P < 0,001$) sowie finalen (#### $P < 0,001$) Stimulation mit 2-MeSATP errechnet (*Abb. ERG 16C*). Wie schon für den P2-Rezeptorantagonisten PPADS beschrieben, konnte speziell für die ARC-Astrozyten somit eine dosisabhängige Reduktion der gemittelten Δ Ratio-Werte für Suramin ermittelt werden. Ein Einzelbeispiel für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte eines ARC-Astrozyten unter Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in Ab- und Anwesenheit des generalisierten P2X- /P2Y-Rezeptorantagonisten Suramin wird exemplarisch in *Abb. ERG 16D* dargestellt.

Mikrogliazellen: Fünf der neun untersuchten Mikrogliazellen (44,4 %) wurden der Desensibilisierungsgruppe zugeordnet. Die weiteren vier Zellen waren nicht auf eine Superfusion mit dem Agonisten responsiv.

3.3.7.3. Reactive blue-2 (Rb-2)

Zur Charakterisierung des Aktivierungsprofils ionotroper P2X-Rezeptoren hinsichtlich ihrer Subtyp-spezifischen, funktionellen Expression in der ARC-Primärkultur früh-postnataler Ratten wurde - vergleichbar zu den vorangegangenen Versuchsansätzen mit PPADS (*Kap. ERG 3.3.7.1*) resp. Suramin (*Kap. ERG 3.3.7.2*), der u.a. für P2X₂-Purinozeptoren sowie einige P2Y-Rezeptorsubtypen spezifische Antagonist Reactive blue-2 (Rb-2) verwendet. In einem ersten Telexperiment wurden für die Analyse des zellulären Antwortverhaltens nach purinenger Stimulation in Gegenwart von Rb-2 in einer Konzentration von 10⁻⁵ M 80 Neurone, 138 Astrozyten sowie drei Mikrogliazellen in 16 "wells" aus zehn Präparationen ausgewertet.

Neurone: Im Rahmen der wiederholten Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in äquimolarer Konzentration (10⁻⁷ M) - und ohne bzw. mit Koapplikation des Antagonisten Rb-2 - reagierten lediglich fünf der insgesamt 80 Neurone (6,3 %) mit einer mittleren 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderung von $0,18 \pm 0,03$ auf die primäre Stimulation, wobei jedoch keine einzige dieser Zellen auf die abschließende 2-MeSATP-erge Stimulation mit einem weiteren Kalziumsignal antwortete. Folglich wurden alle responsiven Neurone der HDD-Gruppe zugeordnet.

Astrozyten: Von den 138 post-experimentell eindeutig als Gliazellen astrozytären Ursprungs charakterisierten Zellen der ARC-Primärkultur erwiesen sich 68 (49,3 %) als auf die primäre Superfusion mit 2-MeSATP (10⁻⁷ M) responsiv. Dabei wurden 20 Astrozyten

in die HDD- sowie 48 in die LDD-Gruppe eingeordnet. Wie aus den Balkendiagrammen in *Abb. ERG 17A* bzw. *Tab. ERG 9* zu entnehmen ist, wurden gemittelte Δ Ratio-Werte für die primäre bzw. quartäre Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP von $0,39 \pm 0,02$ resp. $0,17 \pm 0,02$ errechnet, wobei sich letztere als signifikant ($^{\$} P < 0,01$) niedriger erwiesen. Während bei 41 aller reaktiven LDD-Astrozyten (85,4 %) die Koapplikation von Rb-2 (10^{-5} M; 3. Stimulation) eine vollständige Blockade der durch 2-MeSATP induzierten Kalziumantwort zur Folge hatte, erwiesen sich zwei Astrozyten als Rb-2 "resistent" und bei fünf Gliazellen konnte lediglich eine partielle Reduktion des intrazellulären Kalziumsignals nachgewiesen werden. Bei einem über alle 48 Astrozyten gemittelten Δ Ratio-Wert von $0,02 \pm 0,01$ (*Tab. ERG 9*) zeigte sich dieser sowohl gegenüber dem ersten ($P < 0,001$) als auch finalen ($^{\#\#\#} P < 0,001$) Δ Ratio-Wert bei Applikation von 2-MeSATP als hoch signifikant erniedrigt (*Abb. ERG 17A*). Die alleine Superfusion der Primärkulturen mit Rb-2 (2. Stimulation) rief in keinem einzigen Astrozyten eine Modulation der basalen $[Ca^{2+}]_i$ hervor. In *Abb. ERG 17B* wird die exemplarische Aufzeichnung des

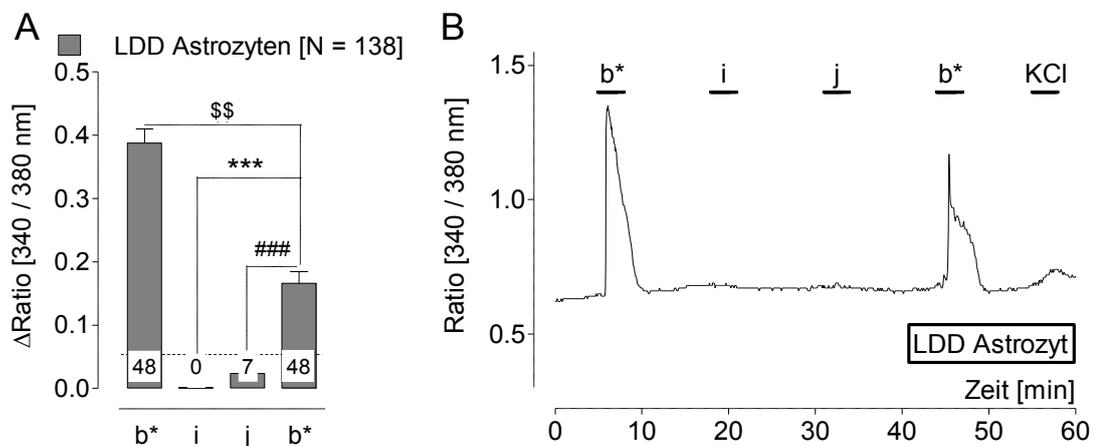


Abb. ERG 17 Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X- / P2Y-Purinozeptorantagonisten Reactive blue-2 (10^{-5} M) bei KT

Die Balkendiagramme in **A** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Astrozyten (LDD-Gruppe) nach Superfusionsstimulation bei $36^{\circ}C$ (KT) mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**i**) Reactive blue 2 (Rb-2) (10^{-5} M) und (**j**) 2-MeSATP (10^{-7} M) + Rb-2 (10^{-5} M) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test [$* / # / \$ P < 0,05$; $** / \#\# / \$\$ P < 0,01$; $*** / \#\#\# / \$\$\$ P < 0,001$]). Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für einen responsiven Astrozyten (**B**) nach sequentieller Superfusionsstimulation bei KT mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**i**) Rb-2 (10^{-5} M) und (**j**) 2-MeSATP (10^{-7} M) + Rb-2 (10^{-5} M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signals für einen hinsichtlich des purinerg induzierten Kalzium “*signaling*“ inhibierten Astrozyten nach sequentieller Superfusionsstimulation aufgezeigt.

Mikrogliazellen: Von den drei analysierten Mikrogliazellen wies lediglich eine Zelle ausschließlich während der primären 2-MeSATP-ergen Superfusionsstimulation eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf, sodass diese der HDD-Gruppe zugeordnet wurde.

Im Rahmen des zweiten Teilexperiments wurden Daten von 149 Neuronen, 186 Astrozyten und fünf Mikrogliazellen, gewonnen aus mikrospektrofluorimetrischen Messungen in 18 “*wells*“ aus elf Präparationen, hinsichtlich der putativen Modulation der durch 2-MeSATP induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Rb-2 in jetzt 10-fach niedrigerer Konzentration (10^{-6} M) ausgewertet. Dabei wird das zelluläre Antwortverhalten (Δ Ratio-Werte) für die LDD-Gruppe in tabellarischer Form (*Tab. ERG 9*) bzw. graphisch in *Abb. ERG 18* dargestellt.

Neurone: In der ARC-Primärkultur zeigten lediglich drei der 149 analysierten Neurone (2,0 %) sowohl auf die erste als auch letzte purinerge Stimulation eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, bei gemittelten Δ Ratio-Werten von $0,45 \pm 0,10$ resp. $0,22 \pm 0,05$. Zudem mussten weitere elf Neurone (7,4 %) der HDD-Gruppe zugeordnet werden. Während der Superfusion der Primärkulturen mit Rb-2 (10^{-6} M) alleine wies keine Zelle der LDD-Grup-

| Rb-2 10^{-5} M | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation Rb-2 | 3. Stimulation Rb-2 + 2-MeSATP | 4. Stimulation 2-MeSATP |
|------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| Astrozyten | $0,39 \pm 0,02$ | 0 | $0,02 \pm 0,01$ | $0,17 \pm 0,02$ |
| Rb-2 10^{-6} M | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation Rb-2 | 3. Stimulation Rb-2 + 2-MeSATP | 4. Stimulation 2-MeSATP |
| Neurone | $0,45 \pm 0,10$ | 0 | $0,13 \pm 0,04$ | $0,22 \pm 0,05$ |
| Astrozyten | $0,43 \pm 0,02$ | 0 | $0,18 \pm 0,02$ | $0,23 \pm 0,01$ |

Tab. ERG 9: Blockade der Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP durch den generalisierten P2-Rezeptorantagonisten Reactive blue 2 (Rb-2)

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. - in Neuronen ($n = 3$ für Rb-2 10^{-6} M) und Astrozyten ($n = 48$ für Rb-2 10^{-5} M bzw. $n = 90$ für Rb-2 10^{-6} M) der “repetitiv responsiven Gruppe“ der ARC-Primärkultur (LDD-Gruppe) bei $36^{\circ}C$ (= KT) nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-7} M) für jeweils drei min bei achtminütigen Waschintervallen.

Datenanalyse in Abwesenheit (Stimulation 1 und 4) bzw. Anwesenheit (Stimulation 3) des generalisierten P2X- / P2Y-Rezeptorantagonisten Reactive blue-2 (Rb-2) (10^{-6} bzw. 10^{-5} M) sowie für die Kontrollapplikation von Rb-2 alleine (Stimulation 2).

pe einen Anstieg der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio auf. Alle drei Neurone antworteten auf die Superfusion mit 2-MeSATP (10^{-7} M) in Anwesenheit von Rb-2 (10^{-6} M) mit einer marginalen Erhöhung des Δ Ratio-Wertes ($0,13 \pm 0,04$) (Tab. ERG 7). Dabei erwies sich im direkten Vergleich das induzierte Kalziumsignal bei zwei Neuronen als $> 5\%$ niedriger als auf die nachfolgende purinerge Stimulation, während das dritte Neuron keine Reduktion des Δ Ratio-Werts zeigte. Die statistische Analyse der ermittelten Resultate erbrachte aufgrund der geringen Zellzahl dabei lediglich signifikante Unterschiede beim direkten Vergleich der Δ Ratio-Werte der ersten vs. zweiten Stimulation ($^{\$} P < 0,05$; Abb. ERG 18A).

Astrozyten: Von den 186 immunzytochemisch identifizierten Astrozyten reagierten 116 (62,4 %) auf die primäre Stimulation mit einer überschwelliger Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Das Verhältnis von HDD- zu LDD-Zellen betrug 22,4 : 77,6 % (ca. 1 : 3). Im Rahmen der Experimente demonstrierten die 90 LDD-Astrozyten einen Anstieg der mittleren 340 / 380 nm Fluoreszenz Δ Ratio von $0,43 \pm 0,02$ resp. $0,23 \pm 0,01$ auf die erste resp. finale Stimulationen mit 2-MeSATP (10^{-7} M). Dabei wies die vierte Superfusionsstimulation eine hoch signifikante Reduktion der durchschnittlichen Δ Ratio-Amplitude ($^{\$ \$ \$} P < 0,001$) im Vergleich zur ersten auf. Während der Superfusionsperiode mit Rb-2 (10^{-6} M) alleine reagierte keine einzige Zelle. Auf die darauffolgende 2-MeSATP-erge Stimulation in Gegenwart des Antagonisten Rb-2 zeigten 25 Astrozyten eine vollkommene Blockade des purinerg induzierten Kalziumsignals, 37 Astrozyten eine Verminderung der Signalamplitude sowie 28 Astrozyten keine Reduktion der Amplitude des Kalziumantwort, jeweils im direkten Vergleich zur finalen purinergen Stimulation (4. Stimulation). Im arithmetischen Mittel errechneten sich Δ Ratio-Werte von $0,18 \pm 0,02$ (Tab. ERG 9; Abb. ERG 18C). Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden signifikante Unterschiede für die 340 / 380 nm Fluoreszenz Δ Ratio-Werte bei direktem Vergleich der purinergen Stimulation in Anwesenheit des Antagonisten Rb-2 sowohl zur ersten ($P < 0,001$) als auch letzten ($^{\#} P < 0,05$) Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP alleine erhalten. Einzelbeispiele für eine partielle sowie nahezu vollständige Hemmung des durch 2-MeSATP induzierten Kalziumsignals in ARC-Astrozyten während Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X- / P2Y-Rezeptorantagonisten Rb-2 werden exemplarisch in Abb. ERG 18B,D dargestellt. Wie schon für die Experimente mit PPADS (Kap. ERG 3.3.7.1) und Suramin (Kap. ERG 3.3.7.2) geschlossen wurde, konnte auch für Rb-2 in Konzentrationen von 10^{-6} bzw. 10^{-5} M eine dosisabhängige Reduktion der Agonist-induzierten Kalziumsignale bestimmt werden.

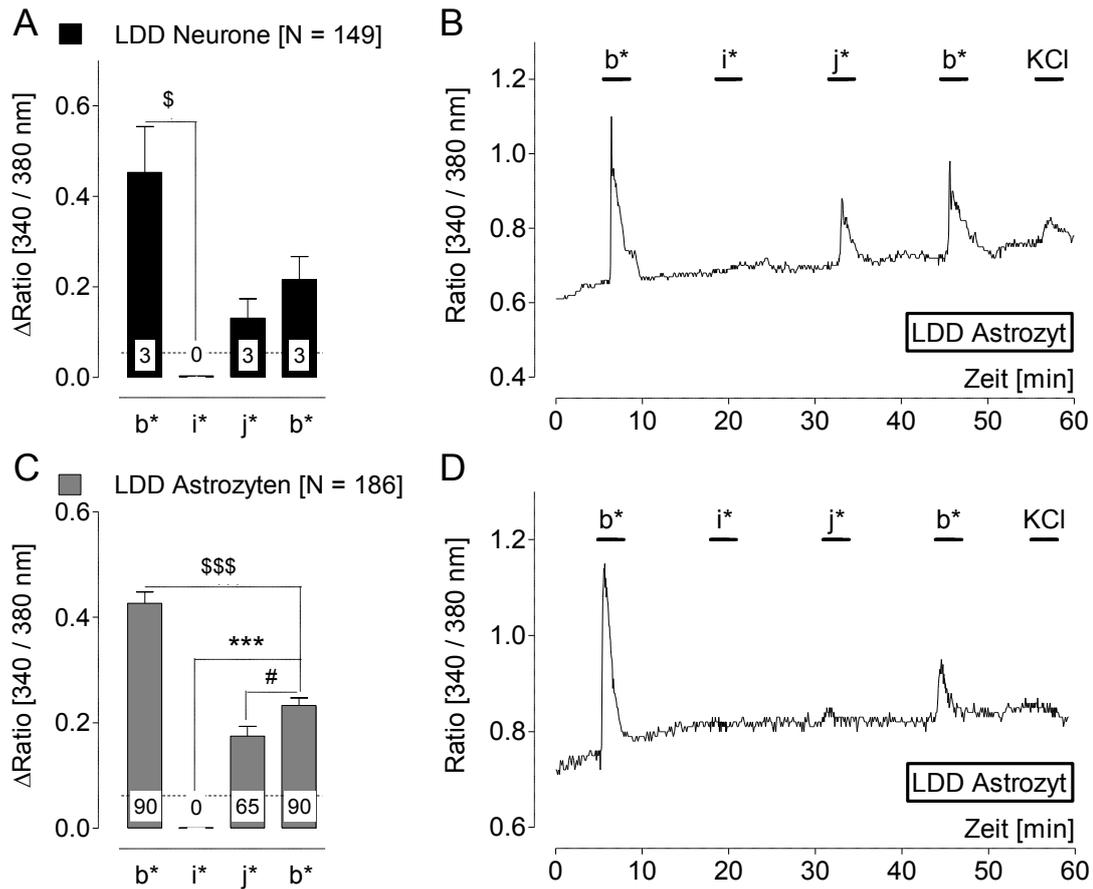


Abb. ERG 18 Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des generalisierten P2X- / P2Y-Purinozeptorantagonisten Reactive blue-2 (10^{-6} M) bei KT

Die Balkendiagramme in **A** und **C** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**A**) resp. Astrozyten (**C**) (jeweils LDD-Gruppe) nach Superfusionsstimulation bei 36°C (KT) mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**i***) Reactive blue-2 (Rb-2) (10^{-6} M) und (**j***) 2-MeSATP (10^{-7} M) + Rb-2 (10^{-6} M) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test [* / # / \$ $P < 0,05$; ** / ## / \$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]). Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein partielle (**B**) resp. einen komplett blockierten Astrozyten (**D**) nach sequentieller Superfusionsstimulation bei KT mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**i***) Rb-2 (10^{-6} M) und (**j***) 2-MeSATP (10^{-7} M) + Rb-2 (10^{-6} M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

Mikrogliazellen: Von den fünf analysierten Mikrogliazellen reagierte keine mit einem Anstieg der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio auf die primäre, 2-MeSATP-erge Superfusion.

3.3.8. Modulation der Agonist-induzierten Kalziumsignale in Zellen der ARC-Primärkultur durch Subtyp-spezifische P2X-Purinozeptorantagonisten bei KT

Im Rahmen der pharmakologischen Charakterisierung potentiell von Zellen der ARC-Primärkultur exprimierter, ionotroper P2X-Purinozeptorsubtypen wurden, aufbauend auf den Resultaten der vorangegangenen Teilstudien (*Kap. ERG 3.3.7*), weiterführende Experimente zur Analyse des Antwortverhaltens mit Hilfe Subtyp-spezifischer P2X-Rezeptorantagonisten bei simulierter, physiologischer Körpertemperatur der Ratte (KT; 36°C) durchgeführt. Basierend auf den in *Kap. ERG 3.3.4* dargelegten Kriterien wurde weiterhin eine post-experimentelle Zuordnung der responsiven Neurone, Astrozyten sowie Mikrogliazellen in die "Desensibilisierungsgruppe" (HDD) bzw. "repetitiv responsive Gruppe" (LDD) vorgenommen. Im Folgenden wird das zelluläre Antwortverhalten (Δ Ratio-Werte) nur für die LDD-Gruppe in tabellarischer und graphischer Form dargestellt.

3.3.8.1. P2X₁-, P2X_{2/3}- und P2X₃-spezifischer Purinozeptorantagonist TNP-ATP

Während in den vorangegangenen Experimenten die inhibitorische Wirkung generalisierter P2X- / P2Y-Rezeptorantagonisten wie PPADS, Suramin und Rb-2 (*Kap. ERG 3.3.7*) auf die durch den Purinozeptoragonisten 2-MeSATP induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ demonstriert wurde, sollte in einer anschließenden Untersuchung die Responsivität der untersuchten ARC-Zellen auf den P2X₁-, P2X_{2/3}- und P2X₃-spezifischen Purinozeptorantagonist TNP-ATP in Konzentrationen von 10⁻⁵ M und 10⁻⁷ M ermittelt werden.

Für eine detaillierte Charakterisierung der funktionell exprimierten homotrimeren Rezeptorsubtypen P2X₁ und P2X₃ sowie des heterotrimerem P2X_{2/3}-Purinozeptors wurde auf Grundlage der intrazellulären Kalziumsignale in Ab- bzw. Anwesenheit des Antagonisten TNP-ATP neben der Kategorisierung der responsiven Zellen in die HDD- bzw. LDD-Gruppe (*Kap. ERG 3.3.7*), zusätzlich die Zellpopulation ohne ausgeprägt adaptives Verhalten (LDD-Gruppe) in drei Unterkategorien (Untergruppen) gegliedert:

- [1] Der LDD-Gruppe "starke Inhibition" wurde eine Zelle zugeordnet, deren Signalamplitude (Δ Ratio-Wert als Maß für die $[Ca^{2+}]_i$) bei purinergem Stimulation (2-MeSATP, 10⁻⁷ M) in Gegenwart von TNP-ATP, im direkten Vergleich mit der darauffolgenden 2-MeSATP-ergen Stimulation, um > 50 % reduziert war.
- [2] Der LDD-Gruppe "schwache Inhibition" wurde eine Zelle zugeordnet, deren Signalamplitude in Gegenwart von TNP-ATP, im direkten Vergleich mit der darauffolgenden 2-MeSATP-ergen Stimulation, um 5 - 50 % reduziert war.
- [3] Der LDD-Gruppe "ohne Inhibition" wurde eine Zelle zugeordnet, deren Signalamplitude

tude in Gegenwart von TNP-ATP, im direkten Vergleich mit der darauffolgenden 2-MeSATP-ergen Stimulation, gar nicht oder um $< 5\%$ reduziert war.

In einem ersten Telexperiment, bei Einsatz des Antagonisten TNP-ATP in einer Konzentration von 10^{-5} M, wurden in 15 "wells" aus sieben Präparationen insgesamt 135 Neurone, 152 Astrozyten und zwei Mikrogliazellen auf ihre Antwortmuster hin analysiert. Die Resultate, inklusive der statistischen Auswertung, sind für Neurone resp. Astrozyten der LDD-Gruppe (inkl. der drei Untergruppen) in *Abb. ERG 19* graphisch dargestellt; die durchschnittlichen 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die untersuchten Zelltypen der LDD-Gruppe (inkl. der aufgeführten Untergruppen) werden in *Tab. ERG 10* aufgeführt.

Neurone: Insgesamt zeigten 15 ARC-Neurone (11,1 %) eine überschwellige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach primärer Stimulation mit 2-MeSATP (10^{-7} M), wobei 10 Neurone der HDD-Gruppe mit mittleren Δ Ratio-Werten von $0,09 \pm 0,02$ zugeteilt werden mussten. Lediglich fünf Neurone konnten der LDD-Gruppe (3,7 %) zugeordnet werden, bei einer durchschnittlichen Amplitude des Kalziumsignals von $0,35 \pm 0,05$, da die finale Superfusion mit 2-MeSATP ebenfalls in einer überschweligen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Δ Ratio-Werten von $0,14 \pm 0,04$ resultierte, die sich jedoch aufgrund der geringen Zellzahl als nicht signifikant unterschiedlich zu denen der primären Stimulation erwiesen ($P > 0,05$) (*Abb. ERG 19B; Tab. ERG 10*). Auf die Superfusion mit TNP-ATP (10^{-5} M) alleine (2. Stimulation) erwies sich keine Zelle als responsiv. Während der dritten Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP und TNP-ATP ergab sich ein durchschnittlicher 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Anstieg für die gesamte LDD-Gruppe von $0,08 \pm 0,04$. Aufgrund der dargelegten Kriterien (*siehe oben*) wurden drei der fünf LDD-Neurone (60 %) der Subgruppe "starke Inhibition" und jeweils ein Neuron (20 %) der Kategorie "schwache Inhibition" resp. "ohne Inhibition" zugeordnet. Bedingt durch die geringe Anzahl an LDD-Neuronen wurde es nicht als notwendig erachtet, eine graphische Unterteilung dieser Zellpopulation in *Abb. ERG 19* vorzunehmen. Hinsichtlich des direkten Vergleichs der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte für die 3. Stimulationsperiode mit sowohl denen der 1. als auch 4. Stimulationsperiode konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede errechnet werden ($P > 0,05$), möglicherweise basierend auf der geringen Anzahl auswertbarer LDD-Neurone.

Astrozyten: Von den 152 immunzytochemisch identifizierten Astrozyten ergab sich für die responsiven Zellen ($n = 107$; 70,4 %) ein Verhältnis von HDD- zu LDD-Zellen von 10,2 : 89,8 %, als etwa 1 : 9. Im Rahmen der Versuche reagierten die 96 LDD-Astrozyten

| TNP-ATP 10 ⁻⁵ M | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation TNP-ATP | 3. Stimulation TNP-ATP + 2-MeSATP | 4. Stimulation 2-MeSATP |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|---|----------------------------|
| starke Inhibition | | | | |
| Neurone | 0,39 ± 0,07 | 0 | 0 | 0,08 ± 0,02 |
| Astrozyten | 0,35 ± 0,03 | 0,03 ± 0,02 | 0,05 ± 0,01 | 0,34 ± 0,03 |
| schwache Inhibition | | | | |
| Neurone | 0,19 | 0 | 0,10 | 0,16 |
| Astrozyten | 0,45 ± 0,04 | 0 | 0,36 ± 0,03 | 0,47 ± 0,04 |
| ohne Inhibition | | | | |
| Neurone | 0,39 | 0 | 0,31 | 0,29 |
| Astrozyten | 0,69 ± 0,07 | 0,08 ± 0,07 | 0,50 ± 0,06 | 0,43 ± 0,06 |
| Gesamt- daten | | | | |
| Neurone | 0,35 ± 0,05 | 0 | 0,08 ± 0,06 | 0,14 ± 0,04 |
| Astrozyten | 0,45 ± 0,03 | 0,03 ± 0,01 | 0,25 ± 0,03 | 0,41 ± 0,02 |

Tab. ERG 10: Blockade der Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP durch den Subtyp-spezifischen P2X-Rezeptorantagonisten TNP-ATP (10⁻⁵ M)

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. - in Neuronen (n = 3 für starke, n = 1 für schwache und n = 1 ohne Inhibition; n = 5 für Gesamtdaten) und Astrozyten (n = 42 für starke, n = 37 für schwache und n = 17 ohne Inhibition; n = 96 für Gesamtdaten) der LLD-Gruppe der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10⁻⁷ M) bei 36°C (= KT) für jeweils drei min bei achtminütigen Waschintervallen.

Datenanalyse in Abwesenheit (Stimulation 1 und 4) bzw. Anwesenheit (Stimulation 3) des Subtyp-spezifischen P2X-Rezeptorantagonisten TNP-ATP (10⁻⁵ M) sowie für die Kontrollapplikation von TNP-ATP (10⁻⁵ M) alleine (Stimulation 2).

auf die primäre Stimulation mit einer mittleren 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderung von 0,45 \pm 0,03. Die finale Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP hatte für die Gesamtpopulation der 96 Astrozyten vergleichbar ausgeprägte Kalziumsignale mit Δ Ratio-Werten von 0,41 \pm 0,03 zur Folge, die sich als nicht signifikant unterschiedlich zu denen der primären Stimulation erwiesen, trotz der hohen Anzahl an analysierten Zellen (*Abb. ERG 19A*). Auf die Applikation des Antagonisten TNP-ATP (10⁻⁵ M) alleine (2. Stimulation) reagierten fünf der 96 Astrozyten mit einem leicht überschwelligen Anstieg der [Ca²⁺]_i, so dass ein arithmetisches Mittel des Δ Ratio-Wertes für alle Zellen von 0,03 \pm

0,01 errechnet wurde. Bei Koapplikation sowohl des Purinozeptoragonisten 2-MeSATP (10^{-7} M) und des Antagonisten TNP-ATP (10^{-5} M) (3. Stimulationsperiode) konnte ein über alle 96 Astrozyten gemittelter Δ Ratio-Wert von $0,25 \pm 0,03$ errechnet werden (*Tab. ERG 10*). Dieser zeigte sich sowohl im direkten Vergleich mit den Δ Ratio-Werten der primären ($P < 0,001$) als auch finalen (### $P < 0,001$) Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-7} M) als hoch signifikant erniedrigt (*Abb. ERG 19A*). Als ebenfalls hoch signifikant unterschiedlich erwiesen sich die gemittelten Amplituden der ersten ($P < 0,001$), dritten (\$\$\$ $P < 0,001$) und vierten (*** $P < 0,001$) Stimulationsperiode im direkten Vergleich mit derjenigen bei Superfusion lediglich des Purinozeptorantagonisten.

Zur besseren pharmakologischen Charakterisierung glial exprimierter P2X-Purinozeptor-subtypen - ermöglicht durch die hohe Zahl responsiver LDD-Astrozyten sowie die vergleichbaren Amplituden der intrazellulären Kalziumsignale bei der ersten sowie finalen Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP - wurde eine Subkategorisierung der Astrozyten hinsichtlich der supprimierenden Wirkung von TNP-ATP vorgenommen (*Tab. ERG 10; Abb. ERG 19C-H*).

[1] Sub-LDD-Gruppe "starke Inhibition": Etwa $\frac{2}{5}$ (43,8 %) aller responsiven LDD-Astrozyten erwiesen sich hinsichtlich der Modulation purinerg induzierter intrazellulärer Kalziumsignale durch den Antagonisten TNP-ATP als ausgeprägt hemmbar. Für diese 42 LDD-Astrozyten wurde nach sequentieller Stimulation mit 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit von TNP-ATP eine jeweils durchschnittliche Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Δ Ratio-Werte von $0,35 \pm 0,03$ (Agonist), $0,05 \pm 0,01$ (Agonist + Antagonist) sowie $0,34 \pm 0,03$ (Agonist) errechnet (*Tab. ERG 10*). Dabei zeigten 23 Astrozyten eine vollständige und 19 eine mehr als 50 %, antagonistvermittelte Inhibition der Signalamplitude (*Abb. ERG 19G,H*). Die statistische Datenanalyse ergab folgerichtig eine hoch signifikante Inhibition der intrazellulären, purinerg mediierten Kalziumsignale durch TNP-ATP beim jeweiligen Vergleich der Δ Ratio-Werte während der ersten ($P < 0,001$) sowie finalen (### $P < 0,001$) Stimulationsperiode mit denen bei Koapplikation von Agonist und Antagonist.

[2] Sub-LDD-Gruppe "schwache Inhibition": Ein Prozentsatz von 38,5 % der purinerg stimulierten LDD-Astrozyten zeigte ein ausgeprägtes Kalziumsignal aufgrund der primären resp. finalen Superfusionsstimulation durch 2-MeSATP (gemittelte Δ Ratio-Werte: $0,45 \pm 0,04$ resp. $0,47 \pm 0,04$; *Tab. ERG 10*). Diese 37 LDD-Astrozyten reagierten selbst in Gegenwart des Antagonisten TNP-ATP (10^{-5} M) auf die Aktivierung durch 2-MeSATP mit mittleren Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio von $0,36 \pm 0,03$. Obwohl dieser Wert um über 20 % unter denjenigen der Stimulations-

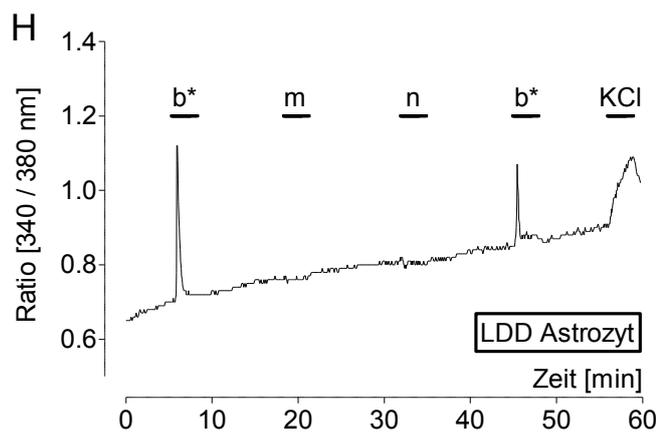
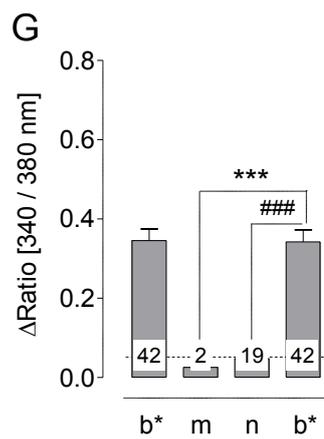
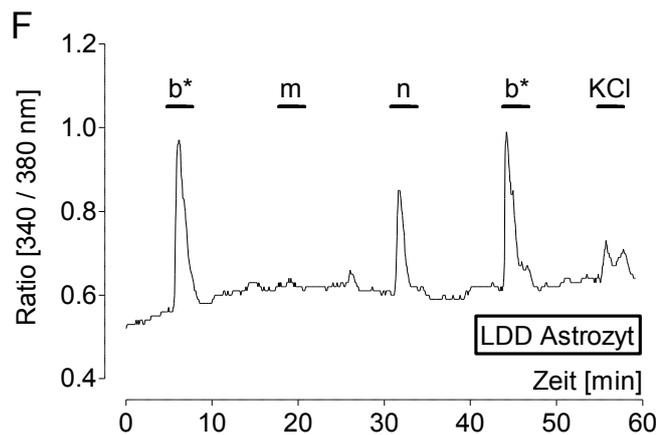
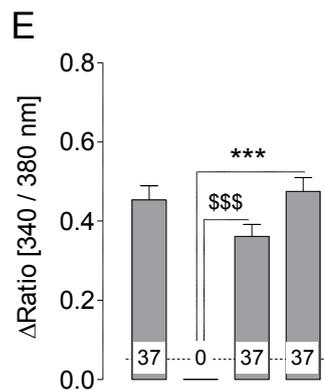
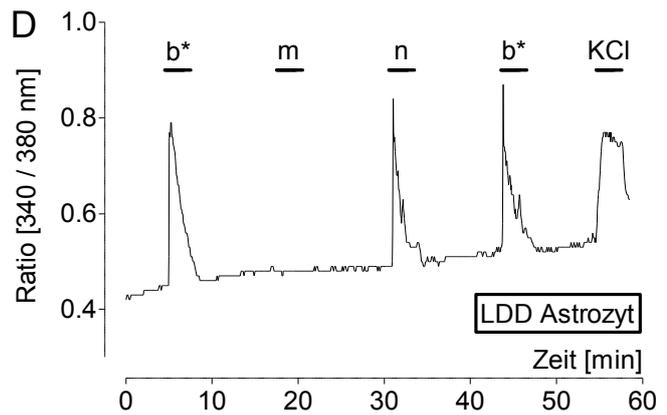
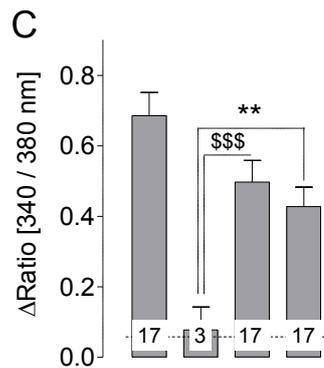
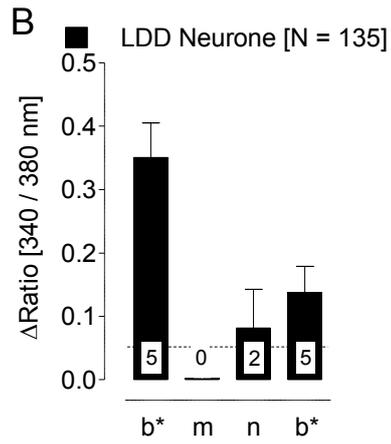
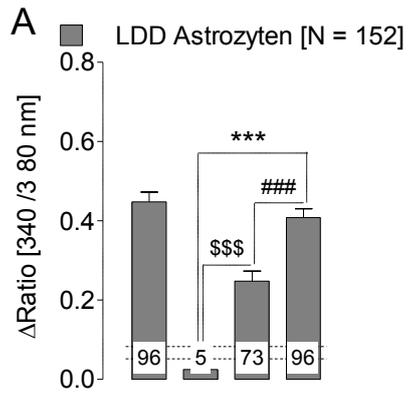


Abb. ERG 19: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des Subtyp-spezifischen P2X-Rezeptorantagonisten TNP-ATP (10^{-5} M) bei KT

Die Balkendiagramme in **A**, **B**, **C**, **E** und **G** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Astrozyten (**A**) resp. Neurone (**B**) (jeweils LDD-Gruppe) sowie für Astrozyten ohne (**C**), schwache (**E**) resp. starke Inhibition (**G**) nach Superfusionsstimulation bei 36°C (KT) mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**m**) TNP-ATP (10^{-5} M) und (**n**) 2-MeSATP (10^{-7} M) + TNP-ATP (10^{-5} M) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test [* / # / \$ $P < 0,05$; ** / ## / \$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]. Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für einen responsiven Astrozyten ohne Hemmung (**D**), mit schwacher (**F**) resp. starker Inhibition (**H**) nach sequentieller Superfusionsstimulation bei KT mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**m**) TNP-ATP (10^{-5} M) und (**n**) 2-MeSATP (10^{-7} M) + TNP-ATP (10^{-5} M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

perioden 1 bzw. 4 lag, erwies sich der jeweilige Unterschied als statistisch nicht signifikant ($P > 0,05$) (Abb. ERG 19E/F).

[3] Sub-LDD-Gruppe "ohne Inhibition": Die 17 von 96 LDD-Astrozyten (17,7 %) ohne Verminderung der Signalamplitude während der purinergen Superfusionsstimulation in Anwesenheit des Antagonisten zeigten ein transientes Kalziumsignal auf primäre und finale Superfusionen mit 2-MeSATP allein mit Δ Ratio-Werten von $0,69 \pm 0,07$ resp. $0,43 \pm 0,06$ (Tab. ERG 10). Da drei Astrozyten ein marginal überschwelliges Kalziumsignal als Antwort auf die Superfusion des Antagonisten alleine zeigten, wurde für die 2. Stimulationsperiode ein mittlerer Fluoreszenz Ratio-Anstieg von $0,08 \pm 0,07$ errechnet. Auf die dritte Stimulation in Anwesenheit von TNP-ATP demonstrierten alle 17 Zellen eine Änderung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio von $0,50 \pm 0,06$ (Abb. ERG 19C), die sich als nicht statistisch unterschiedlich zu den Δ Ratio-Werten der primären und finalen Stimulationsperioden erwies. Hoch signifikante Unterschiede ($P < 0,01$, $P < 0,001$) konnten ausnahmslos für sämtliche Vergleiche mit der 2. Stimulationsperiode (TNP-ATP alleine) ermittelt werden.

Mikrogliazellen: Keine der zwei analysierten Mikrogliazellen reagierte mit einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf die Superfusion mit 10^{-7} M 2-MeSATP.

Im Rahmen des zweiten Telexperiments wurden in 15 "wells" aus sieben Präparationen insgesamt 124 Neurone, 152 Astrozyten und fünf mikrogliale Zellen auf ihre Responsivität gegenüber dem Purinozeptoragonist 2-MeSATP (10^{-7} M) und dem P2X-Subtyp-spezifischen Antagonisten TNP-ATP in 100-fach geringerer (10^{-7} M) und damit zum Agonist äquimolarer Konzentration studiert. Basierend auf der bekanntermaßen hohen Affinität dieses Antagonisten für homotrimere P2X_3 - sowie heterotrimere $\text{P2X}_{2/3}$ -Purinozepto-

ren, bei geringerer Affinität für homotrimere P2X₂-Purinozeptoren (Bianchi et al., 1999; Coddou et al., 2011b; Liu et al., 2001; Virginio et al., 1998), könnte somit zwischen diesen P2XR-Subtypen differenziert werden. Im Folgenden wird das zelluläre Antwortverhalten (Δ Ratio-Werte) nur für die LDD-Gruppen, einschließlich der beschriebenen Unterkategorien, in tabellarischer Form (*Tab. ERG 11*) bzw. in *Abb. ERG 20* dargestellt.

Neurone: In der neuroglialen ARC-Primärkultur reagierten 19 der 124 getesteten Neurone (15,3 %) auf die primäre purinerge Superfusionsperiode mit einem überschwelligem, intrazellulärem Kalziumsignal. Dabei wurden zehn Neurone aufgrund der genannten Kriterien (*Kap. ERG 3.3.4*) in die HDD-Gruppe und neun in die LDD-Gruppe aufgenommen. Die neun Neurone der LDD-Gruppe zeigten auf die erste 2-MeSATP-erge Stimulation hin 340 / 380 nm Fluoreszenz Δ Ratio-Werte von $0,20 \pm 0,04$, sowie eine gemittelte Signalamplitude von $0,18 \pm 0,03$ auf die finale Superfusionsstimulation, wobei sich beide Datengruppen nicht signifikant voneinander unterschieden ($P > 0,05$). Die Applikation des Antagonisten alleine bedingte lediglich in einer Zelle eine marginal überschwellige Reaktion, wodurch sich für die genannte Zellpopulation eine mittlere Ratio-Änderung von $0,02 \pm 0,02$ errechnete. Die Koapplikation von 2-MeSATP und TNP-ATP in äquimolarer Konzentration (3. Stimulationsperiode) hatten mittlere Δ Ratio-Werte von $0,17 \pm 0,04$ zur Folge, einem weder von der primären noch finalen purinergen Stimulation signifikant unterschiedlichen Wert ($P > 0,05$). Die statistische Bewertung ergab einen signifikant verminderten Δ Ratio-Wert bei direktem Vergleich lediglich der zweiten Stimulationsperiode mit der ersten ($P < 0,01$), dritten ($\# P < 0,05$) und vierten ($* P < 0,05$) (*Abb. ERG 20A*). Trotz der relativ geringen Anzahl responsiver LDD-Neurone ($n = 9$) wurde eine Subkategorisierung der ARC-Neurone wie folgt vorgenommen (*Tab. ERG 11*).

- [1] Sub-LDD-Gruppe "starke Inhibition": Lediglich ein LDD-Neuron zeigte sich hinsichtlich der Modulation purinerg induzierter, intrazellulärer Kalziumsignale durch TNP-ATP als vollkommen hemmbar (*Tab. ERG 11*).
- [2] Sub-LDD-Gruppe "schwache Inhibition": Zwei LDD-Neurone reagierten auf die erste resp. finale purinerge Superfusionsstimulation mit einer durchschnittlichen Änderung der 340 / 380 nm Δ Ratio-Werte von 0,17 resp. 0,26, und beide Neurone zeigten nach 2-MeSATP-erger Kosuperfusion mit äquimolarem TNP-ATP ein transientes Kalziumsignal überschwelliger Magnitude (Δ Ratio-Wert: 0,19).
- [3] Sub-LDD-Gruppe "ohne Inhibition": Von den untersuchten LDD-Neuronen erwiesen sich $\frac{2}{3}$ ($n = 6$) mit mittleren 340 / 380 nm Δ Ratio-Werten von $0,23 \pm 0,06$ auf die primäre und $0,17 \pm 0,04$ auf die finale Superfusion als 2-MeSATP responsiv. Während der purinergen Superfusionsperiode in Anwesenheit des Antagonisten TNP-ATP

ergaben sich durchschnittliche Fluoreszenz Ratio-Änderungen von $0,20 \pm 0,04$, die sich als nicht signifikant unterschiedlich zur primären und finalen Stimulationsperiode erwiesen ($P > 0,05$) (Tab. ERG 11).

| TNP-ATP 10^{-7} M | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation TNP-ATP | 3. Stimulation TNP-ATP + 2-MeSATP | 4. Stimulation 2-MeSATP |
|------------------------|----------------------------|---------------------------|---|----------------------------|
| starke Inhibition | | | | |
| Neurone | 0,10 | 0 | 0 | 0,09 |
| Astrozyten | 0 | 0 | 0 | 0 |
| schwache Inhibition | | | | |
| Neurone | 0,17 | 0 | 0,19 | 0,26 |
| Astrozyten | $0,41 \pm 0,1$ | 0 | $0,41 \pm 0,06$ | $0,48 \pm 0,06$ |
| ohne Inhibition | | | | |
| Neurone | $0,23 \pm 0,06$ | $0,04 \pm 0,04$ | $0,20 \pm 0,04$ | $0,17 \pm 0,04$ |
| Astrozyten | $0,49 \pm 0,03$ | $< 0,01 \pm 0,01$ | $0,43 \pm 0,02$ | $0,33 \pm 0,02$ |
| Gesamt- daten | | | | |
| Neurone | $0,20 \pm 0,04$ | $0,02 \pm 0,02$ | $0,17 \pm 0,04$ | $0,18 \pm 0,03$ |
| Astrozyten | $0,48 \pm 0,03$ | $< 0,01 \pm 0,01$ | $0,42 \pm 0,02$ | $0,35 \pm 0,02$ |

Tab. ERG 11: Blockade der Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP durch den Subtyp-spezifischen P2X-Rezeptorantagonisten TNP-ATP (10^{-7} M)

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. - in Neuronen ($n = 1$ für starke, $n = 2$ für schwache und $n = 6$ ohne Inhibition; $n = 9$ für Gesamtdaten) und Astrozyten ($n = 0$ für starke, $n = 18$ für schwache und $n = 97$ ohne Inhibition; $n = 115$ für Gesamtdaten) der LLD-Gruppe der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-7} M) bei 36°C (= KT) für jeweils drei min bei achtminütigen Waschintervallen.

Datenanalyse in Abwesenheit (Stimulation 1 und 4) bzw. Anwesenheit (Stimulation 3) des Subtyp-spezifischen P2X-Rezeptorantagonisten TNP-ATP (10^{-7} M) sowie für die Kontrollapplikation von TNP-ATP (10^{-7} M) alleine (Stimulation 2).

Astrozyten: Ein hoher Prozentsatz (79,3 %) der purinerg stimulierten ARC-Astrozyten wies ein ausgeprägtes Kalziumsignal aufgrund der primären Superfusionsstimulation auf. Letztlich konnten 115 dieser Astrozyten der Kategorie mit repetitiver Stimulierbarkeit (LDD-Gruppe) und nur sechs Gliazellen der HDD-Gruppe mit markanter Desensibilisierung zugeteilt werden. Die zahlreichen Astrozyten der LDD-Gruppe reagierten auf die

erste und finale Aktivierung durch 2-MeSATP allein mit mittleren Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio von $0,48 \pm 0,03$ resp. $0,35 \pm 0,02$ (*Tab. ERG 11*), wobei sich die Δ Ratio-Werte der vierten Stimulationsperiode gegenüber jenen der ersten als signifikant erniedrigt erwiesen ($^{\$} P < 0,05$). Während lediglich drei LDD-Astrozyten (2,6 %) einen marginalen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach der Applikation des Antagonisten alleine demonstrierten (gemittelter Δ Ratio-Wert der Population: $< 0,01 \pm 0,01$), antworteten auf die Kosuperfusion von 2-MeSATP und TNP-ATP wiederum alle 115 Gliazellen mit einer mittleren Signalamplitude von $0,42 \pm 0,02$. Dieser Wert erwies sich trotz der hohen Zellzahl als nicht signifikant unterschiedlich zu denjenigen während der primären und auch finalen Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP alleine. Die statistische Analyse ergab hoch signifikante Unterschiede ausschließlich für die Vergleiche zwischen der zweiten Stimulation und der ersten ($P < 0,001$), dritten ($#### P < 0,001$) resp. vierten Stimulation ($*** P < 0,001$) (*Abb. ERG 20B*).

- [1] Sub-LDD-Gruppe "starke Inhibition": Von den 115 analysierten Astrozyten der LDD-Gruppe konnte keine Zelle dieser Kategorie zugeordnet werden.
- [2] Sub-LDD-Gruppe "schwache Inhibition": Ein Anteil von 15,7 % der purinerg stimulierten LDD-Astrozyten zeigte ein ausgeprägtes Kalziumsignal aufgrund der primären resp. finalen Superfusionsstimulation durch 2-MeSATP (gemittelte Δ Ratio-Werte: $0,41 \pm 0,01$ resp. $0,48 \pm 0,06$; *Tab. ERG 11*). Auf die alleinige Applikation von TNP-ATP in einer Konzentration von 10^{-7} M reagierte keine Zelle mit einer Änderung der $[Ca^{2+}]_i$. Die 18 Astrozyten dieser Kategorie generierten auch in Gegenwart des äquimolaren Antagonisten TNP-ATP auf die Aktivierung durch 2-MeSATP (10^{-7} M) ein Kalziumsignal mit einer Amplitude (Δ Ratio-Wert) von $0,41 \pm 0,06$, einem Wert, der nicht signifikant um gemittelt 15 % niedriger lag als der während finaler, purinerg Superfusionsstimulation. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden lediglich hoch signifikante Unterschiede für die 340 / 380 nm Fluoreszenz Δ Ratio-Werte der zweiten Stimulation vs. der ersten ($P < 0,001$), dritten ($#### P < 0,001$) und vierten ($*** P < 0,001$) Stimulation ermittelt.
- [3] Sub-LDD-Gruppe "ohne Inhibition": Die 97 von 115 LDD-Astrozyten (84,3 %) ohne Verminderung der Signalamplitude während der purinergen Superfusionsstimulation in Anwesenheit des Antagonisten zeigten ein transientes Kalziumsignal auf primäre und finale Superfusionen mit 2-MeSATP allein mit Δ Ratio-Werten von $0,49 \pm 0,03$ resp. $0,33 \pm 0,02$, bei signifikant ($^{\$\$} P < 0,01$) reduzierter Magnitude der letzteren (*Tab. ERG 11*). Die Applikation des Antagonisten alleine wurde von drei Gliazellen mit einem marginal überschwelligem Kalziumsignal beantwortet, sodass sich - inkl.

der 94 nicht-responsiven Zellen - ein arithmetisches Mittel der Δ Ratio-Werte von $< 0,01 \pm 0,01$ errechnete (Tab. ERG 11). Auf die 2-MeSATP-erge Superfusion in Anwesenheit von TNP-ATP zeigten diese Zellen gegenüber der primären wie auch finalen purinergen Stimulation keine signifikante Verminderung der 340 / 380 Fluoreszenz Ratio-Änderung ($0,43 \pm 0,02$). Der direkte statistische Vergleich der ermittelten Signalamplitude während der zweiten Superfusionsperiode vs. derjenigen der anderen drei Messperioden erbrachte hoch signifikante Unterschiede (###, *** $P < 0,001$).

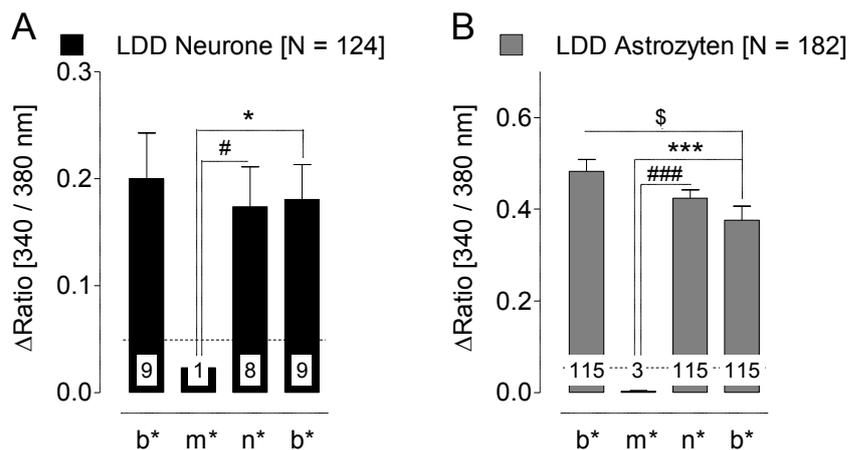


Abb. ERG 20: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des P2X-Subtyp-spezifischen Antagonisten TNP-ATP (10^{-7} M) bei KT

Die Balkendiagramme in **A** und **B** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**A**) resp. Astrozyten (**B**) (jeweils LDD-Gruppe) nach Superfusionsstimulation bei 36°C (KT) mit (**b***) 2-MeSATP (10^{-7} M), (**m***) TNP-ATP (10^{-7} M) und (**n***) 2-MeSATP (10^{-7} M) + TNP-ATP (10^{-7} M) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test; [* / # / \$ $P < 0,05$; ** / ## / \$\$ $P < 0,01$; *** / ### / \$\$\$ $P < 0,001$]. Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

3.3.8.2. Putativer, P2X₂-spezifischer Purinozeptorantagonist PSB1011

Im Rahmen des Nachweises einer möglichen, funktionellen Expression ionotroper P2X-Rezeptoren des Subtyps P2X₂ in den Zelltypen der neuroglialen ARC-Primärkultur wurden in 19 "wells" aus sieben Präparationen 129 Neurone, 203 Astrozyten und sieben mikrogliale Zellen auf deren Antwortverhalten gegenüber dem P2X₂-spezifischen Purinozeptorantagonisten PSB1011 nach Stimulation mit 2-MeSATP bei KT analysiert. PSB-1011 erwies sich in elektrophysiologischen Studien an Oozyten des Krallenfrosches

Xenopus, welche den rattenspezifischen Purinozeptor P2X₂ überexprimierten, als hochpotenter (IC₅₀-Wert: 80 nM) Antagonist (Baqi et al., 2011). Im Folgenden wird das zelluläre Antwortverhalten (Δ Ratio-Werte der intrazellulären Kalziumsignale) für die LDD-Gruppe in tabellarischer Form (*Tab. ERG 12*) bzw. graphisch in *Abb. ERG 21* dargestellt.

Neurone: Gemäß den in *Kap. ERG 3.3.4* beschriebenen Kriterien erwiesen sich 14 Neurone (10,9 %) als responsiv auf die purinerge Stimulation, wobei elf Neurone der HDD-Gruppe zugeordnet werden mussten, da zwar auf die primäre Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10⁻⁷ M) intrazelluläre Kalziumsignale mit Δ Ratio-Werten von 0,25 ± 0,08 erreicht wurden, in der finalen purinergen Stimulationsperiode jedoch kein überschwelliger Anstieg der [Ca²⁺]_iz mehr zu verzeichnen war. Die der LDD-Gruppe zugehörigen drei Neurone wiesen eine markante Zunahme der Δ Ratio-Werte während der ersten (0,20 ± 0,13) und auch finalen (0,15 ± 0,07) Superfusion des Agonisten auf. Die Applikation lediglich des Antagonisten alleine bedingte keine Änderung der [Ca²⁺]_iz. Die Koapplikation von 2-MeSATP (10⁻⁷ M) und PSB1011 (10⁻⁵ M) verursachte eine Hemmung in lediglich einem der drei Neurone, wodurch sich im arithmetischen Mittel ein Δ Ratio-Wert von 0,12 ± 0,08 ergab. Der direkte statistische Vergleich der ermittelten jeweiligen Signalamplituden aller vier Messperioden erbrachte, möglicherweise auch aufgrund der geringen Zellzahl, keine signifikanten Unterschiede (P > 0,05) (*Abb. ERG 21A*; *Tab. ERG 9*).

| PSB1011 10 ⁻⁵ M | 1. Stimulation 2-MeSATP | 2. Stimulation PSB1011 | 3. Stimulation PSB1011 + 2-MeSATP | 4. Stimulation 2-MeSATP |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|---|----------------------------|
| Neurone | 0,20 ± 0,13 | 0 | 0,12 ± 0,08 | 0,15 ± 0,07 |
| Astrozyten | 0,50 ± 0,03 | < 0,01 ± 0,01 | 0,30 ± 0,02 | 0,29 ± 0,02 |

Tab. ERG 12: Blockade der Fura-2 Fluoreszenz Ratio-Änderungen responsiver Zellen der ARC-Primärkultur nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP durch den P2X₂R-spezifischen Antagonisten PSB1011.

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration - gemessen als 340 / 380 Δ Ratio-Werte (Fura-2) und dargestellt als arithmetische Mittelwerte ± S.E.M. - in Neuronen (n = 3) und Astrozyten (n = 94) der "repetitiv responsiven Gruppe" der ARC-Primärkultur (LDD-Gruppe) nach repetitiver Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10⁻⁷ M) bei 36°C (= KT) für jeweils drei min bei achtminütigen Waschintervallen, in Ab- (Stimulation 1 und 4) bzw. Anwesenheit (Stimulation 3) des P2X₂R-spezifischen Antagonisten PSB1011 (10⁻⁵ M). Kontrollapplikation von PSB1011 alleine (Stimulation 2).

Astrozyten: Nahezu 70,0 % (n = 142) aller 203 analysierten ARC-Astrozyten demonstrierten auf die primäre purinerge Superfusionsperiode ein überschwelliges Kalziumsignal. Vergleichbar zu den in *Kap. ERG 3.3.4.2* erhaltenen Resultaten konnten ca. ⅔ der

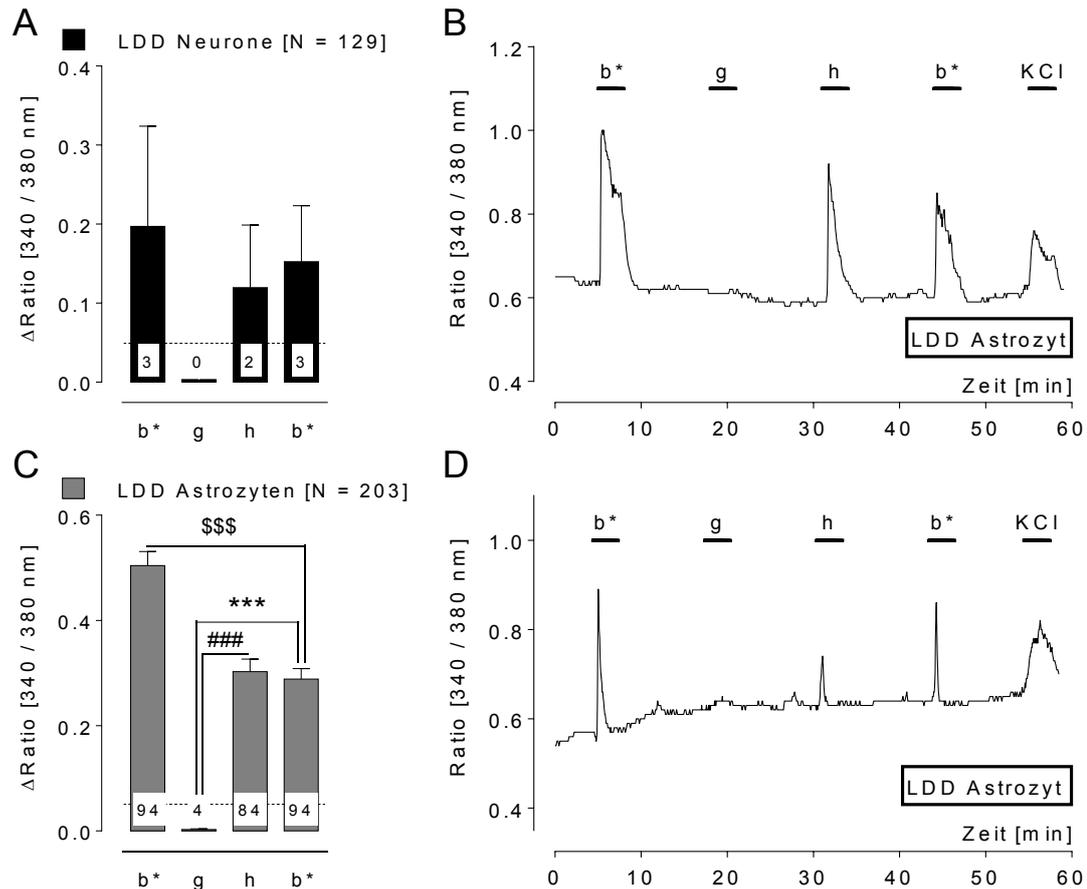


Abb. ERG 21: Superfusionsstimulation der ARC-Primärkultur mit dem Purinozeptoragonisten 2-MeSATP in Ab- bzw. Anwesenheit des putativen P2X₂R-spezifischen Antagonisten PSB1011 (10⁻⁵ M) bei KT

Die Balkendiagramme in **A** und **C** zeigen die durchschnittlichen Erhöhungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Neurone (**A**) resp. Astrozyten (**C**) (jeweils LDD-Gruppe) nach Superfusionsstimulation bei 36°C (KT) mit (**b***) 2-MeSATP (10⁻⁷ M), (**g**) PSB1011 (10⁻⁵ M) und (**h**) 2-MeSATP (10⁻⁷ M) + PSB1011 (10⁻⁵ M) als arithmetische Mittelwerte ± S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderungen für die jeweiligen Superfusionsstimulationen (One-Way ANOVA in Kombination mit nichtparametrischem Kruskalis-Wallis Test und Dunn's Post-hoc Test [* / # / \$ P < 0,05; ** / ## / \$\$ P < 0,01; *** / ### / \$\$\$ P < 0,001]. Zahlen im Bereich der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach jeder Superfusion, [N] die Gesamtzahl der untersuchten Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für einen ungehemmten (**B**) resp. einen partiell blockierten Astrozyten (**D**) nach sequentieller Superfusionsstimulation bei KT mit (**b***) 2-MeSATP (10⁻⁷ M), (**g**) PSB1011 (10⁻⁵ M) und (**h**) 2-MeSATP (10⁻⁷ M) + PSB1011 (10⁻⁵ M) sowie finaler Superfusion mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer.

responsiven Astrozyten (66,2 %) der LDD-Gruppe zugeordnet werden. Für diese 94 Astrozyten wurde nach Stimulation mit 2-MeSATP (Stimulationen 1 und 4) eine jeweils durchschnittliche Änderung der 340 / 380 nm ΔRatio-Werte von 0,50 ± 0,03 resp. 0,29 ± 0,02 ermittelt (Tab. ERG 12), wobei sich die final induzierte Signalamplitude als hoch signifikant gegenüber der primären reduziert erwies (\$\$\$ P < 0,001). Bei Superfusion der

ARC-Primärkulturen mit PSB1011 (10^{-5} M) alleine zeigten vier Gliazellen (4,3 %) einen marginalen Anstieg der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio, wodurch sich für die gesamte Zellpopulation ein gemittelter Δ Ratio-Wert von $< 0,01$ errechnete. In Anwesenheit des P2X₂R-spezifischen Antagonisten PSB1011 (Stimulation 3) reagierten nahezu 90 % der 94 Gliazellen ($n = 84$) mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Superfusion mit 2-MeSATP (durchschnittlicher Δ Ratio-Wert inkl. der zehn nicht-responsiven Zellen: $0,30 \pm 0,02$). Dabei konnte auf diese Koapplikation bei 63 Astrozyten (67,0 %) kein Unterschied in der Signalamplitude zur nachfolgenden Stimulation mit 2-MeSATP alleine, bei 21 Gliazellen (22,3 %) eine Verminderung der Signalamplitude um mindestens 5 % demonstriert werden. In der statistischen Analyse ergab sich folglich zwar ein hoch signifikanter Unterschied der 340 / 380 nm Fluoreszenz Δ Ratio-Werte im direkten Vergleich zur primären ($P < 0,001$), jedoch nicht zur nachfolgenden 2-MeSATP-ergen Stimulation alleine. Logischerweise erbrachten die entsprechenden Vergleiche mit der nur PSB1011 enthaltenden Superfusionsperiode hoch signifikante ($P < 0,001$; *** $P < 0,001$) Unterschiede. Exemplarisch werden in *Abb. ERG 21B,D* jeweils Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der 340 / 380 nm Ratio-Werte von Astrozyten ohne Inhibition resp. partielle Blockade des 2-MeSATP-induzierten Kalziumsignals unter Superfusionsstimulation in Ab- und Anwesenheit des Subtyp-spezifischen Antagonisten PSB1011 dargestellt.

Mikrogliazellen: Auf die 2-MeSATP-erge Stimulation zeigte keine der Mikrogliazellen eine Änderung der Fluoreszenz Ratio.

3.4. Immunhisto- und zytochemischer Nachweis ionotroper purinergerezeptorsubtypen

Die in *Kap. MM 2.6.2* beschriebene Methode der indirekten Immunfluoreszenz diente zum Nachweis der zellulären Expression verschiedener ionotroper P2X-Rezeptorsubtypen sowohl in coronalen Gehirnschnitten zwei Monate alter Ratten als auch den Zellen der neuroglialen ARC-Primärkultur aus dem früh-postnatalen Rattengehirn.

3.4.1. Immunhistochemischer Nachweis des purinergen P2X₂-Rezeptorsubtyps im *Nucleus arcuatus* der adulten Ratte

Im Rahmen des zellulären Nachweises purinergerezeptorsubtypen (P2X₁ - P2X₅, P2X₇) auf Proteinebene konnte mit Hilfe eines polyklonalen Primärantiserums gegen den rattenspezifischen P2X₂-Rezeptorsubtyp dessen Verteilung in transkardial fixierten coronalen Gehirnschnitten adulter Ratten auf der Ebene des ARC lokalisiert werden. So ließ sich eine spezifische immunhistochemische Markierung für das P2X₂-Rezeptorprotein sowohl im Bereich neuronaler Perikaryen als auch kurzer Faserstrukturen in den medialen und medio-posterioren Aspekten des ARC, überwiegend in unmittelbarer Nähe zur ependymalen Auskleidung des dritten Gehirnventrikels, verifizieren (*Abb. ERG 22A*).

3.4.2. Zelltypspezifische Expression purinergerezeptorsubtypen in der Primärkultur des *Nucleus arcuatus*

Im Zusammenhang mit der detaillierten Charakterisierung funktionell exprimierter Purinozeptorsubtypen in der neuroglialen ARC-Primärkultur (*Kap. ERG 3.3*) sowie der mRNA-Expression der verschiedenen P2X-Rezeptorsubtypen in der Primärkultur (*Kap. ERG 3.1*) war es Ziel dieses experimentellen Ansatzes, mit Hilfe von Primärantikörpern /-seren sowohl gegen verschiedene purinerge Rezeptorsubtypen (P2X₁ - P2X₅, P2X₇) als auch zelltypspezifische Markerproteine die Zuordnung etwa eines speziellen Purinozeptorsubtyps zu einem bestimmten Zelltyp der neuroglialen Mischkultur des früh-postnatalen ARC nachzuweisen (*Kap. ERG 3.2.1*). Hierzu wurden in "wells" mehrerer Zellpräparationen im Rahmen immunzytochemischer Doppelmarkierungen einerseits die Anzahl der MAP_{2a+2b}- (= Neurone), GFAP- (= Astrozyten) oder ED1-immunpositiven Zellen (= Mikrogliazellen) sowie andererseits die Anzahl der einen entsprechenden Purinozeptorsubtyp exprimierenden Zellen bestimmt. Letztlich erfolgte eine mikroskopisch exakte Analyse und quantitative sowie prozentuale Ermittlung der doppelmarkierten Zelltypen. In diesem Zusammenhang führten immunzytochemische Untersuchungen für die ionotropen P2X-Rezeptorsubtypen P2X₁, P2X₃, P2X₅ und P2X₇ zu keinen eindeutig, positiven Markierun-

gen, wie auch schon teilweise für die Primärzellkultur des MnPO beschrieben (Hitzel, 2009).

Doppelmarkierungsstudien in ARC-angereicherten Primärkulturen aus drei Präparationen (jeweils ein "well") erbrachten den eindeutigen Hinweis für eine spezifische Expression des P2X₂-Rezeptorsubtyps in Neuronen dieses Kerngebietes. Pro "well" exprimierten 773 ± 47 Zellen und somit $38,5 \pm 5,1$ % der durchschnittlich 2045 ± 148 MAP_{2a+2b}-immunopositiven Neurone den P2X₂R. Wie aus exemplarischen Darstellungen in *Abb. ERG 22B* und *Abb. ERG 23C* ersichtlich, war die P2X₂R-spezifische Markierung dabei in vielen Fällen offensichtlich auf die Plasmamembran v.a. eines Zellpols dieser Neurone fokussiert.

Im Rahmen des immunzytochemischen Nachweises ionotroper P2X-Rezeptorsubtypen in Gliazelltypen der ARC-Primärkultur wurde ebenfalls einerseits die Anzahl der GFAP-

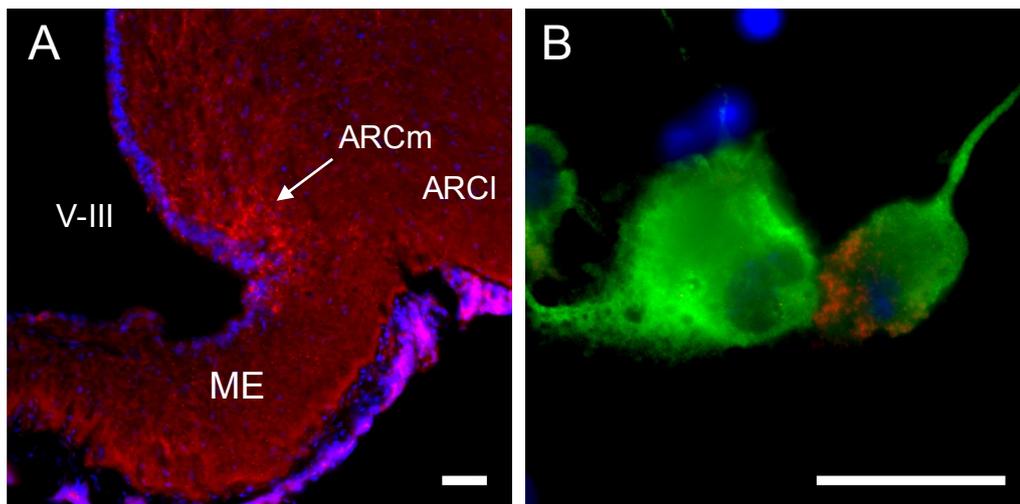


Abb. ERG 22: Immunhisto- und zytochemischer Nachweis des P2X₂-Rezeptorproteins im *Nucleus arcuatus* der adulten Ratte sowie in der neuroglialen ARC-Primärzellkultur früh-postnataler Ratten

Abbildung (A) zeigt die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung für das P2X₂-Rezeptorprotein im coronalen Gefrierschnitt des perfusionsfixierten (4 % PFA) Gehirns einer adulten Ratte auf der Ebene des *Nucleus arcuatus* (ARC). Als Primärantikörper diente ein polyklonales rabbit anti-rat P2X₂R Antiserum; als Sekundärantikörper wurde Cy3TM-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (rot).

Abbildung (B) zeigt die digitale Überlagerung der immunzytochemischen Markierung für das Neuronen-spezifische Markerprotein MAP_{2a+2b} und das P2X₂-Rezeptorprotein in der neuroglialen ARC-Primärzellkultur früh-postnataler Ratten. Als Primärantikörper /-seren dienten ein monoklonaler mouse anti-MAP_{2a+2b} Antikörper bzw. ein polyklonales rabbit anti-rat P2X₂R Antiserum; als Sekundärantikörper wurde Alexa[®] 488-gekoppeltes donkey anti-mouse IgG (grün) bzw. Cy3TM-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG (rot) eingesetzt.

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 50 µm (A) resp 25 µm (B)

Abkürzungen: ARCm = *Nucleus arcuatus medialis*, ARCI = *Nucleus arcuatus lateralis*, ME = *Eminentia mediana*, V-III = *Ventriculus tertius cerebri*

immunpositiven Astrozyten bzw. der ED1-immunpositiven Mikrogliazellen sowie andererseits die Anzahl der einen entsprechenden Purinozeptorsubtyp exprimierenden Zellen analysiert. Bei kombiniertem immunzytochemischen Nachweis für das Glykoprotein CD-68 (ED1) und den P2X₄R wurden aus vier Zellpräparationen (jeweils ein "well") sämtliche ED1-immunpositiven Mikrogliazellen doppelmarkiert (Abb. ERG 23D-F). Die Kolokalisation des Purinozeptorsubtyps P2X₄ und CD68 zeigte für CD68 = ED1 eine eindeutige Markierung zahlreicher zytoplasmatischer Granula mit dichter Aggregation in einer perinukleären Zone (Abb. ERG 23E), in welcher auch eine ausgeprägte, voraussichtlich zellmembranständige Komarkierung für den P2X₄R erfolgte (Abb. ERG 23D,F).

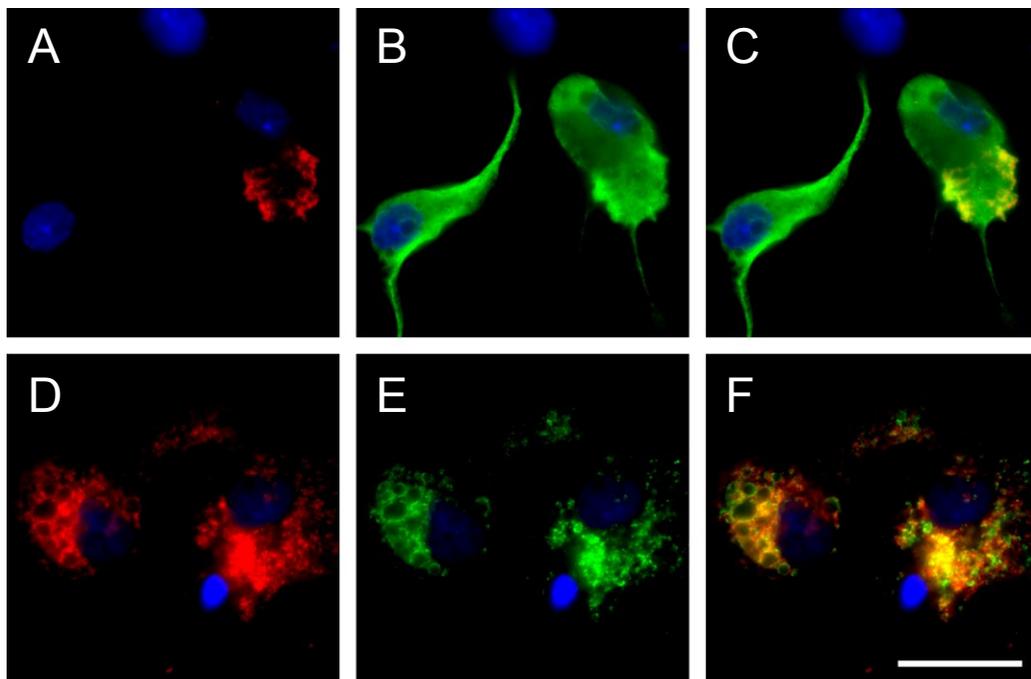


Abb. ERG 23: Immunzytochemischer Nachweis der P2X₂- und P2X₄-Rezeptorproteine in Neuronen respektive Mikrogliazellen der ARC-Primärzellkultur neonataler Ratten

Die Abbildungen der linken Spalte zeigen die immunzytochemische Markierung entweder für das P2X₂- (A) oder P2X₄-Rezeptorprotein (D). Als Primäntisera dienen ein polyklonales rabbit anti-rat P2X₂R resp. anti-rat P2X₄R Antiserum; als Sekundäntikörper wurde Cy3TM-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (rot).

Die Abbildungen der mittleren Spalte zeigen die immunzytochemische Markierung für das Neuronenspezifische Markerprotein MAP_{2a+2b} (B) oder das Oberflächenprotein CD68 mikroglialer Zellen (E). Als Primäntikörper dienen monoklonale mouse anti-MAP_{2a+2b} resp. anti-CD68 Antikörper; als Sekundäntikörper wurden Alexa[®] 488-gekoppeltes donkey anti-mouse IgG (grün) eingesetzt.

Die Abbildungen der rechten Spalte (C, F) zeigen die digitale Überlagerung beider immunzytochemischen Nachweise (Doppelmarkierungen), wodurch sich in einigen Fällen eine gelbe Markierung ergibt.

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau).

Der Größenmarker entspricht 25 µm.

Es wurden keine Doppelmarkierungen für die Rezeptorsubtypen P2X₂ bzw. P2X₄ mit GFAP-immunopositiven Zellen, also den Astrozyten, ermittelt.

3.4.3. Immunzytochemische Charakterisierung 2-MeSATP-responsiver Neurone der ARC-Primärkultur: Transmitter *coding*

Zur näheren Charakterisierung der neuronalen Zellen der ARC-Primärkultur, welche auf eine singuläre Superfusionsstimulation (2-MeSATP; 10⁻⁶ M) mit einem eindeutig überschwelligem Kalziumsignal reagierten, wurden diese post-experimentell immunzytochemisch auf die Expression von ACTH, NPY, NT1 oder TH (Transmitter *coding*), bzw. des P2X₂R hin analysiert. Für jeden Versuchsansatz erfolgte die Bestimmung der Anzahl Neurotransmitter- bzw. P2X₂R-immunpositiver Neurone, sinngemäß zu dem in *Kap. MM 2.6.4.2* beschriebenen Vorgehen, von 7 - 9 analysierten "wells", basierend auf 5 - 7 Zellpräparationen, sowie die Berechnung des jeweils prozentualen Anteils Neurotransmitter / P2X₂R exprimierender bzw. P2-Agonist-responsiver Neurone an der Gesamtzahl der immunzytochemisch charakterisierten bzw. der als 2-MeSATP responsiv identifizierten Neurone. Aus den in *Abb. ERG 5* präsentierten Daten geht die eindeutig exklusiv neuronale Biosynthese der genannten Neuropeptide bzw. der TH hervor.

ACTH: Aus Analysen an sieben "wells" (sieben Präparationen) gingen insgesamt 67 Neurone in die Auswertung ein. In der neuroglialen ARC-Primärkultur zeigten elf der 67 identifizierten Neurone (16,4 %) auf die Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP eine überschwellige Erhöhung der [Ca²⁺]_i. Zudem wurden 10 der im Kalzium *imaging* analysierten Neurone (14,9 %) als ACTH-positiv immunmarkiert. Dabei erwies sich eines der agonistresponsiven Neurone (9,1 % aller responsiven Neurone) als ACTHerg (10,0 % aller ACTHergen Neurone).

NPY: Im Rahmen dieser Untersuchung wurden insgesamt 92 Neurone aus neun "wells" (sieben Zellpräparationen) in die Auswertung aufgenommen. Von den 92 Neuronen induzierte die singuläre Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP bei 13 Zellen (14,1 %) einen signifikanten (> 0,05) Anstieg der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio, und 16 der superfusionsstimulierten Neurone (17,4 %) nutzten NPY als Neuromodulator. Es erwies sich lediglich eines der 2-MeSATP -responsiven Neurone (7,7 % aller responsiven Neurone) als NPYerg (6,3 % aller NPYergen Neurone).

NT1: In fünf "wells" (fünf Präparationen) antworteten 25 von insgesamt 65 analysierten Neuronen (38,5 %) auf die 2-MeSATP-erge Stimulation mit einer markanten Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio, und neun der mikrospektrofluorimetrisch analysierten Neurone (13,8 %) konnten immunzytochemisch als NT1-positiv gewertet werden.

Dabei erwiesen sich vier der agonistresponsiven Neurone (16 % aller responsiven Neurone) als NT1erg (44,4 % aller NT1ergen Neurone).

TH: Im Rahmen der Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) wurde bei 22 der 73 post-experimentell eindeutig als Neurone charakterisierten Zellen (30,1 %; sieben "wells" aus sieben Präparationen) ein Anstieg der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio ermittelt. Weiterhin wurden acht Neurone (11,0 %) als dopaminerg identifiziert. Wiederum erwies sich lediglich eines der 2-MeSATP -responsiven Neurone (4,5 % aller responsiven Neurone) als TH-immunpositiv (12,5 % aller dopaminergen Neurone).

P2X₂R: Im Rahmen der Auswertung zur Doppelmarkierung P2X₂R- und/oder MAP_{2a+2b}-immunopositiver Zellen der ARC-Primärkultur konnte post-experimentell in 15 "wells" aus vier Zellpräparationen keine eindeutige Immunfluoreszenzmarkierung des purinergen Rezeptorsubtyps P2X₂ ermittelt werden.

Dabei kann festgehalten werden, dass die subjektiv ermittelte Qualität der Immunfluoreszenzmarkierung für die genannten Neurotransmitter in den zuvor mikrospektrofluorimetrisch analysierten Arealen der ARC-Primärkultur niedriger ausfiel als in solchen Arealen eines "wells", die während der Fura-2 Ratio-Imaging Experimente nicht erfasst wurden. Der parallel durchgeführte Nachweis der neuronalen Markerproteine MAP_{2a+2b} bzw. NSE zeigte keine Beeinträchtigung des Immunfluoreszenzsignals.

3.5. Pharmakologische Charakterisierung des purinergen Rezeptorsystems in Hypothalamus / thorakalem Rückenmark adulter Ratten: Radiorezeptor Bindungsassay (RRA) und Autoradiographie

Radiorezeptor Bindungsassays (RRA) dienen der pharmakologischen Charakterisierung meist membrangebundener Rezeptorproteine wie den ionotropen P2X-Purinozeptoren des Hypothalamus bzw. des thorakalen Rückenmarks adulter Ratten in der vorliegenden Arbeit (*Kap. MM 2.7.4*). Aufgrund des limitiert zur Verfügung stehenden Gewebematerials einerseits, sowie des erfolgreichen Nachweises spezifischer Bindungsstellen in corticalen Synaptosomen des Rattengehirns (Schäfer & Reiser, 1997) andererseits, wurde als Radioligand [³⁵S]dATP α S mit hoher spezifischer Aktivität (1.000 Ci / mmol) eingesetzt. Zur genaueren Lokalisierung der durch den Radioliganden markierten Rezeptorproteine erfolgte die Durchführung und semiquantitative Evaluierung sogenannter Rezeptorautoradiogramme an coronalen Gehirnschnitten der adulten Ratte (*Kap. MM 2.7.5*).

3.5.1. RRA: Temperatur- und Zeitabhängigkeit

Zur grundlegenden Charakterisierung der Plasmamembranbindung des Radioliganden [³⁵S]dATPαS wurden vergleichende Bindungsstudien, bei konstanter Radioligandenkonzentration (50 pM), mit einer angereicherten Plasmamembranfraktion (PM) des Hypothalamus (HYP) durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss der Inkubationstemperatur (4°C, RT und 37°C) und -dauer (10 s bis 25 min) auf die Liganden-Rezeptor Interaktion bestimmt (Kap. MM 2.7.4). Für die Datenanalyse wurden für jeden der acht Zeitpunkte (10 s - 25 min) sowohl zur Ermittlung der Gesamtbindung (TO) als auch der unspezifischen Bindung (NSB) des Radioliganden Dreifachbestimmungen durchgeführt, wobei der NSB-Wert jeweils in Gegenwart von final $1,6 \times 10^{-5}$ M nicht-markiertem 2-MeSATP bestimmt wurde. Die Ermittlung der entsprechenden spezifischen Radioligandenbindung (B) erfolgte durch Subtraktion des NSB-Wertes von dem der Gesamtbindung (TO). Für die finale Auswertung entsprach der höchste B-Wert (B_0) 100 %, wobei alle weiteren B-Werte in Relation zu diesem gesetzt wurden. *Abb. ERG 24* zeigt exemplarisch die spezifische Radioligandenbindung an die PM-Fraktion des HYP in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei Inkubationstemperaturen von 4°C, RT und 37°C.

Im Rahmen dieser Studie wurden drei vergleichende Bindungsstudien unter Einfluss der genannten Inkubationsdauer und -temperaturen (Kap. MM 2.7.4.1) durchgeführt. Bei einer Inkubationstemperatur von 4°C nahm innerhalb der gesamten Inkubationsdauer die spezifische Radioligandenbindung (B) degressiv zu. Zu den Inkubationszeitpunkten min-2 resp. min-5 betrugen die B-Werte durchschnittlich $53,2 \pm 9,9$ % resp. $79,5 \pm 9,7$ % der maximalen, spezifischen Radioligandenbindung (B_0) und erreichten bei min-15 bis -25 eine stabile Plateauphase (95 -100 % B_0). Ein vergleichbarer Kurvenverlauf wurde bei einer Inkubationstemperatur von 22 - 25°C (= RT) erzielt, wobei hier die Plateauphase schon bei etwa min-8 erreicht wurde. Für die Inkubationszeitpunkte min-2 resp. min-5 wurden B-Werte von $64,4 \pm 3,7$ % resp. $88,4 \pm 3,0$ % in Bezug auf B_0 errechnet. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C erfolgte ein rapider Anstieg der spezifischen Bindung mit min-2 Werten von 88,5 % in Bezug auf den B_0 -Wert bei min-8. Danach kam es, vermutlich aufgrund eines gesteigerten enzymatischen Abbaus des Radioliganden, zu einer raschen Reduktion der spezifischen Bindung mit B-Werten von im Mittel 43,8 % in Bezug auf B_0 zum Inkubationszeitpunkt min-25. Die aus je drei Versuchen gemittelten Assoziationskonstanten K_a [min] beliefen sich auf 2,9 (4°C), 1,45 (22°C) und 0,5 (37°C) min. Basierend auf den Resultaten erfolgten die nachfolgenden, kompetitiven Verdrängungsstudien an PM des HYP sowie TRM bei einer Inkubationstemperatur von 4°C für 20 min (Kap. MM 2.7.4).

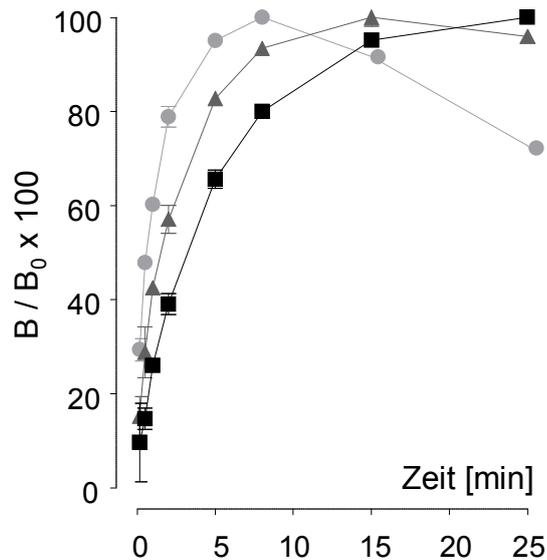


Abb. ERG 24: Radiorezeptor Bindungsassay: Temperatur- und Zeitabhängigkeit spezifischer Bindung des Radioliganden [³⁵S]dATPαS

Exemplarische Darstellung der spezifischen Rezeptor-Liganden Bindung an eine angereicherte Plasmamembranfraktion des Hypothalamus adulter Ratten mit dem Radioliganden [³⁵S]dATPαS (50 pM). Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Ligand-Rezeptor Interaktion: 4°C (schwarze Quadrate), Raumtemperatur (dunkel-graue Dreiecke) resp. 37°C (hellgraue Kreise), in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (10 s bis 25 min). Die spezifische Radioligandenbindung (B) in Relation zur maximalen spezifischen Bindung (B₀) ist jeweils als arithmetischer Mittelwert ± S.E.M aus Dreifachbestimmungen ermittelt und durch nicht-lineare Regressionsanalyse bei Punkt-zu-Punkt Verbindung dargestellt.

3.5.2. RRA: Charakterisierung der Purinozeptorsubtypen durch kompetitive Verdrängungsstudien

Zum Nachweis und zur neuropharmakologischen Charakterisierung der in der jeweils angereicherten PM-Fraktion des HYP sowie des TRM adulter Ratten funktionell exprimierten P2X-Purinozeptoren wurden kompetitive Verdrängungsstudien mit [³⁵S]dATPαS als Radioligand durchgeführt (Kap. MM 2.7.4.2) Bei konstanter Radioligandenkonzentration (0,56 nM) wurden in aufsteigender Konzentrationsreihe von 1 pM bis 100 μM folgende nicht-markierte Liganden (Kompetitor) koinkubiert: ATP und 2-Me-SATP (= generelle Purinozeptoragonisten), α,β-meATP (= P2X₁R- / P2X₃R-spezifischer Ligand), Bz-ATP (= P2X₁-R / P2X₇-R spezifischer Agonist), sowie Suramin und Reactive blue-2 (= generalisierte P2X- / P2Y-Purinozeptorantagonisten) und TNP-ATP (= P2X₁- / P2X_{2/3}- / P2X₃-spezifischer Antagonist). Für die Auswertung wurde die spezifische Bindung des Radioliganden (B) als prozentualer Anteil an der maximalen Bindung (TO = B₀) gegen die Konzentration (log M) des kompetitiven Liganden aufgetragen, wobei B₀ zu 100 %

gesetzt wurde. Die graphische Darstellung exemplarischer kompetitiver Verdrängungskurven in *Abb. ERG 25* wurde mit Hilfe von GraphPad Prism® (*Kap. MM 2.7.4.3*) ausgeführt. Zudem gibt *Tab. ERG 13* Auskunft über die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der entsprechenden Liganden sowie deren Affinität zu den [^{35}S]dATP α S-Bindungsstellen in Relation zu ATP.

3.5.2.1. Kompetitive Verdrängungsstudien an der angereicherten Plasmamembranfraktion des Hypothalamus adulter Ratten

Für die kompetitive Verdrängung des Radioliganden [^{35}S]dATP α S (0,56 nM) von putativen, membranständigen P2X- / P2Y-Purinozeptoren wurden vier verschiedene Präparationen einer angereicherten PM-Fraktion von jeweils 8 - 13 tiefgefrorenen Hypothalami adulter Ratten eingesetzt. In der graphischen Darstellung wurde für die Agonisten ATP, 2-MeSATP resp. BzATP sowie für den Antagonisten TNP-ATP bei jeweils zunehmender Ligandenkonzentration ein jeweils absteigender, sigmoidaler Verlauf der kompetitiven Verdrängungskurven bis unter 10 % der maximalen [^{35}S]dATP α S-Radioligandenbindung ermittelt (*Abb. ERG 25A-D*). Anhand der Kurvenverläufe und Daten konnte für ATP, 2-MeSATP, BzATP resp. TNP-ATP eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von $23,8 \pm 3,8$ nM, $13,6 \pm 2,0$ nM, 212 ± 14 nM resp. $18,2 \pm 3,5$ nM errechnet werden (*Tab. ERG 13*). Im direkten Vergleich zu den zuvor genannten Liganden wies die Verdrängungskurve des Agonisten α,β -meATP zwar ebenfalls einen sigmoidalen Kurvenverlauf auf, verdrängte jedoch den Radioliganden [^{35}S]dATP α S selbst in einer Konzentration von 10^{-4} M nur zu $73,0 \pm 6,0$ % von seinen Bindungsstellen (IC_{50} -Wert: $1,5 \pm 0,3$ μ M) (*Abb. ERG 25B,D; Tab. ERG 13*). Sowohl für den Antagonisten Rb-2 als auch Suramin wurde kein eindeutig sigmoidaler Kurvenverlauf ermittelt. In einem Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis 10^{-3} M wurde die spezifische Bindung des Radioliganden linear bis auf einen B-Wert von $25,0 \pm 6,2$ % (Rb-2) bzw. $11 \pm 1,2$ % (Suramin) des B_0 -Wertes reduziert. Als mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) ergab sich für Rb-2 ein Wert von $22,1 \pm 13,1$ mM und für Suramin von $45,2 \pm 3,3$ μ M. In den kompetitiven Verdrängungsstudien an der PM-Fraktion des HYP diente der endogene Purinozeptoragonist ATP als Referenz für die jeweilige Affinität der verschiedenen unmarkierten Liganden zu den mit [^{35}S]-dATP α S besetzten Bindungsstellen. Durch eine proportionale "Kalibrierung" der jeweiligen IC_{50} -Werte zu dem als 1,0 gesetzten IC_{50} -Wert für ATP ist eine direkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Affinitäten am besten möglich (*Tab. ERG 13*).

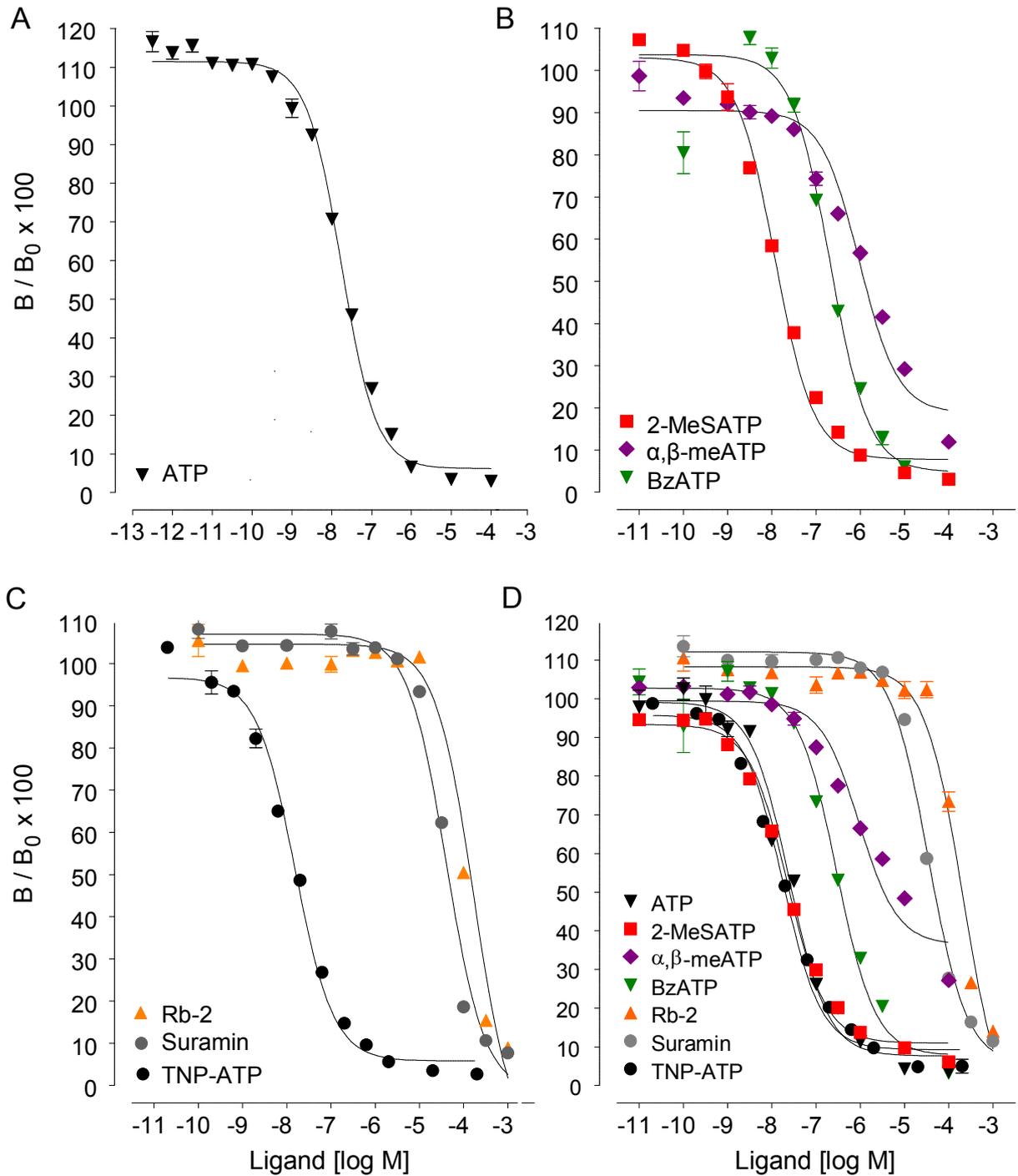


Abb. ERG 25: Kompetitive Verdrängung des Radioliganden $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$ von Purinozeptoren einer angereicherten PM-Fraktion aus Hypothalamus und thorakalem Rückenmark adulter Ratten

In Teilbild **A**, **B** resp. **C** ist die kompetitive Verdrängung des Radioliganden $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$ (0,56 nM) von intrinsischen Purinozeptoren einer angereicherten Plasmamembran (PM)-fraktion aus Hypothalamus resp. in Teilbild **D** aus thorakalem Rückenmark adulter Ratten exemplarisch gezeigt. Als unmarkierte Liganden wurden die kompetitiven Purinozeptoragonisten ATP, 2-MeSATP, α,β -meATP und BzATP sowie die Purinozeptorantagonisten Rb-2, Suramin und TNP-ATP in 8 - 16 aufsteigenden Konzentrationen (10^{-12} M - 10^{-3} M) eingesetzt. Die spezifische Radioligandenbindung (B) in Relation zur maximalen spezifischen Bindung (B_0) ist jeweils als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. von Dreifachbestimmungen dargestellt; die kompetitiven Verdrängungskurven wurden unter Verwendung nichtlinearer Regressionsanalysen in Kombination mit einer "one-site competition" Gleichung ermittelt.

3.5.2.2. Kompetitive Verdrängungsstudien an der angereicherten Plasmamembranfraktion des thorakalen Rückenmarks adulter Ratten

Vergleichbar zu den an hypothalamischem Gewebe durchgeführten kompetitiven Verdrängungsstudien (Kap. ERG 3.5.2.1) wurde in drei verschiedenen Präparationen von jeweils 7 - 10 tiefgefrorenen TRM-Segmenten eine angereicherte PM-Fraktion isoliert und für einen RRA mit den nämlichen agonistischen und antagonistischen, unmarkierten Liganden für Purinozeptoren herangezogen. Dabei zeigten die errechneten Kurven der kompetitiven Verdrängungsstudien für die Liganden ATP, 2-MeSATP und TNP-ATP einen vergleichbaren absteigend sigmoidalen Kurvenverlauf bis unter 10 % der maximalen Radioligandenbindung mit IC_{50} -Werten von $30,0 \pm 4,1$ nM, $20,0 \pm 3,4$ nM und $13,7 \pm 4,0$ nM auf (Abb. ERG 25A-D). BzATP allerdings erwies sich als um das 8-fache affiner als im hypothalamischen Gewebe, den Radioliganden von seinen Bindungsstellen zu verdrängen (IC_{50} -Wert: $32,3 \pm 0,3$ nM) (Abb. ERG 25B, D). Wie schon für den Hypothalamus, demonstrierte der P2X₁R- und P2X₃R-spezifische Agonist α,β -meATP auch am Rückenmark eine wesentlich geringere Affinität zu den vorhandenen Purino-

| | Hypothalamus | | thorakales Rückenmark | |
|-----------------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| | IC_{50} -Wert | Affinität | IC_{50} -Wert | Affinität |
| ATP | $23,8 \pm 3,8$ | 1 | $30,0 \pm 4,1$ | 1 |
| 2-MeSATP | $13,6 \pm 2,0$ | 0,6 | $20,0 \pm 3,5$ | 0,7 |
| α,β -meATP | $1,5 \pm 0,3 \times 10^3$ | 63 | $1,0 \pm 0,1 \times 10^3$ | 33 |
| BzATP | 212 ± 14 | 9 | $32,3 \pm 0,3$ | 1,1 |
| Suramin | $45,2 \pm 3,3 \times 10^3$ | 1.900 | $56,5 \pm 21,1 \times 10^3$ | 1.880 |
| Rb-2 | $22,1 \pm 13,1 \times 10^6$ | 928.600 | $2,5 \pm 2,0 \times 10^6$ | 83.300 |
| TNP-ATP | $18,2 \pm 3,5$ | 0,8 | $13,7 \pm 4,0$ | 0,5 |

Tab. ERG 13: Kompetitive Verdrängungsstudien an Plasmamembranfraktionen des Hypothalamus und thorakalen Rückenmarks mit [³⁵S]dATP α S als Radioligand: IC_{50} -Werte

Kompetitive Verdrängung von [³⁵S]dATP α S (0,56 nM) von Purinozeptoren einer angereicherten Plasmamembranfraktion des Hypothalamus (n = 4) bzw. thorakalen Rückenmarks (n = 3) adulter Ratten. Als kompetitive Liganden kamen generelle und subtypspezifische Purinozeptoragonisten (ATP, 2-MeSATP, α,β -meATP und BzATP) sowie -antagonisten (Suramin, Rb-2 und TNP-ATP) über einen weiten Konzentrationsbereich (10^{-12} - 10^{-3} M) zum Einsatz. Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} : nM) als Maß für die Affinität des jeweiligen unmarkierten Liganden, den Radioliganden [³⁵S]dATP α S von seinen Bindungsstellen zu verdrängen. Darstellung der IC_{50} -Werte als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M aus drei resp. vier Versuchsansätzen. Proportionale "Kalibrierung" der jeweiligen IC_{50} -Werte zu dem als 1,0 gesetzten IC_{50} -Wert für ATP erlaubt die direkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Affinitäten verschiedener Liganden.

zeptorsubtypen (IC_{50} -Wert: $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$) (Tab. ERG13). Die Purinozeptorantagonisten Rb-2 resp. Suramin wiesen wiederum keinen eindeutig sigmoidalen Kurvenverlauf auf. Für beide Kompetitoren wurde noch bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ ein gemittelter B-Wert von $82,3 \pm 4,9 \%$ für Rb-2 resp. von $37,6 \pm 8,6 \%$ für Suramin errechnet. In diesem Zusammenhang wurde für Rb-2 resp. Suramin ein IC_{50} -Wert von $2,5 \pm 2,0 \text{ mM}$ resp. $56,5 \pm 21,1 \mu\text{M}$ ermittelt. Wie auch in Verdrängungsstudien in der Plasmamembransuspension des HYP, diente ATP als Bezugspunkt für die Bindungsaffinitäten anderer Liganden (Tab. ERG 13). In dieser Teilstudie erwies sich die Affinität für die beiden P2X-Rezeptorsubtyp-spezifischen Liganden BzATP und α,β -meATP 1,1-fach resp. 33-fach erniedrigt im Vergleich zu derjenigen von ATP. Für die P2-Antagonisten Suramin und Rb-2 konnten deutlich geringere Affinitäten ermittelt werden, mit Werten von 1.880-fach und 83.300-fach niedrigeren Werten als für die Affinität der Bezugssubstanz ATP. Die in den kompetitiven Verdrängungsstudien verwendeten Kompetitoren wurden hinsichtlich ihrer Affinität für die [^{35}S]dATP αS -besetzten Bindungsstellen für beide neuroglialen Gewebe in eine Rangfolge eingeordnet:

Hypothalamus: 2-MeSATP > ATP > TNP-ATP > BzATP > α,β -meATP > Suramin > Rb-2

Rückenmark: TNP-ATP > 2-MeSATP > ATP > BzATP > α,β -meATP > Suramin > Rb-2

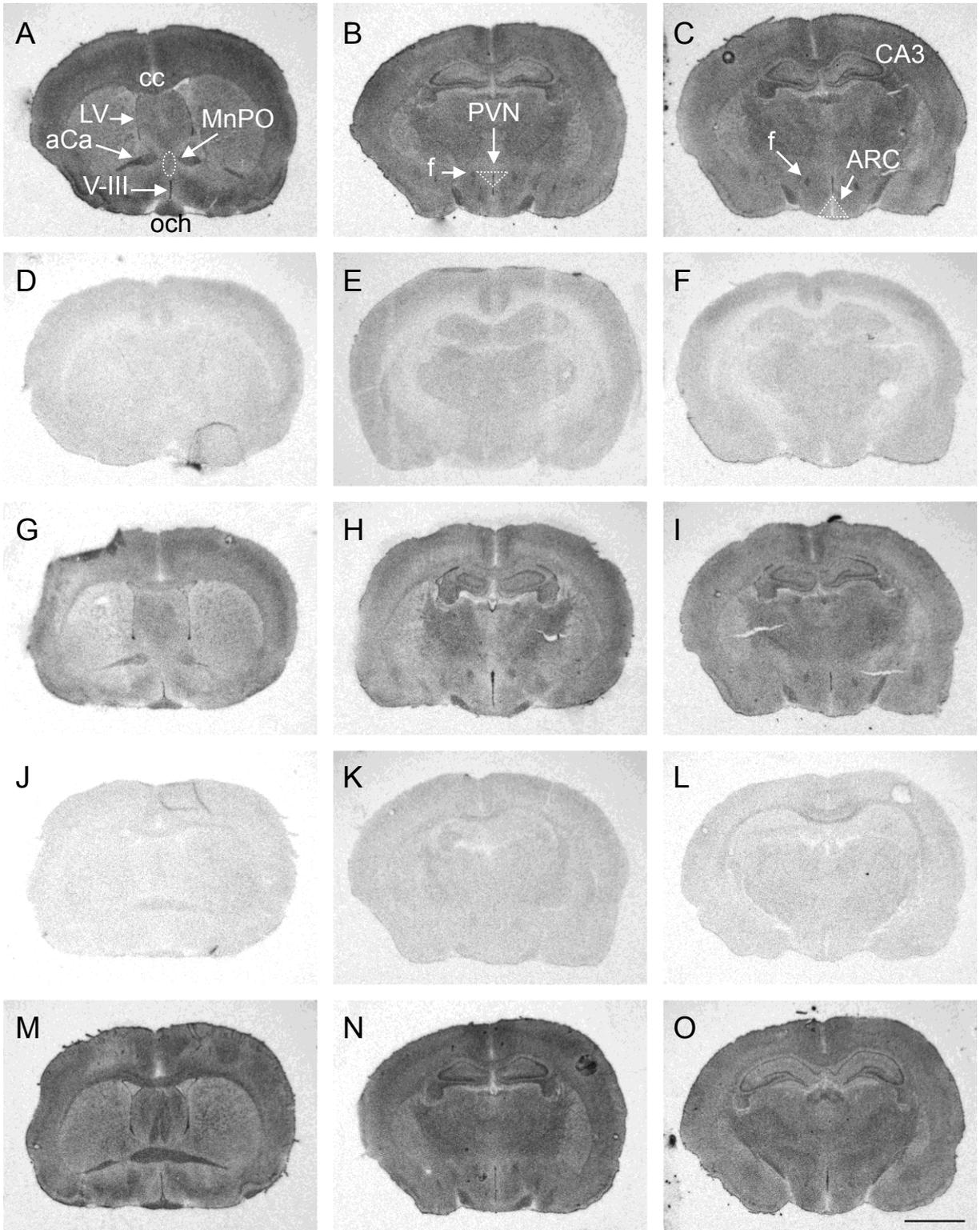
3.5.3. Autoradiographische Darstellung der [^{35}S]dATP αS -spezifischen Bindungsstellen in neuronalem Gewebe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten für die neuropharmakologische Charakterisierung der in Gehirn und TRM exprimierten P2X-Rezeptorsubtypen kompetitive Verdrängungsstudien bei konstanter Konzentration des Radioliganden [^{35}S]dATP αS ($0,65 \text{ nM}$) auch am Gewebsschnitt mit nachfolgender rezeptorautoradiographischer Analyse bei hoher räumlicher Auflösung. Als kompetitive, nicht-markierte Liganden der Purinozeptoren im Gehirn bzw. Rückenmark dienten, ähnlich wie für die Membranbindungsstudien (Kap. ERG 3.5.2) ATP, 2-MeSATP, α,β -meATP, BzATP sowie Suramin und TNP-ATP, wobei für alle Kompetitoren ein Konzentrationsbereich von $0,1 \text{ nM}$ bis $100 \mu\text{M}$ gewählt wurde.

In den Rezeptorautoradiogrammen in coronalen Gehirnschnitten (Abb. ERG 26A-C) wurde für die maximale Bindung in Abwesenheit kompetitiver Liganden eine intensive Bindung des Radionuklid-markierten Liganden (hohe optische Dichte) in den oft faserhaltigen Gehirnstrukturen wie dem *Chiasma opticum* (och), der *Commissura anterior* (aCa), dem *Corpus callosum* (cc), der *Fornix cerebri* (f) sowie dem *Tractus opticus* (opt) nachgewiesen, was auf eine möglicherweise hohe Expressionsrate spezifischer Purinozepto-

Ergebnisse

ren auf Oligodendrozyten bzw. neuronalen Axonen hinweist. Zudem zeigten sich hippocampale Strukturen wie *Cornu ammonis*-Regionen (CA) des *Hippocampus proprius* (hip) stark markiert. Eine mittelstarke Intensität des Schwärzungsbildes und somit Bindung von [³⁵S]dATPαS wiesen einige hypothalamische Bereiche wie der *Nucleus arcuatus*



(ARC) und der *Nucleus ventromedialis hypothalami* (VMH) auf. Aufgrund der kompetitiven Verdrängungsstudien konnte eine Liganden-abhängig verminderte [³⁵S]dATPαS-Bindung in diesen Gehirnstrukturen, und damit reduzierte, lokale optische Dichte des Autoradiographiefilms quantitativ erfasst werden. Exemplarisch werden Autoradiogramme coronaler Gefrierschnitte in Gegenwart der nicht-markierten Purinozeptorliganden ATP, α,β-meATP, TNP-ATP sowie Suramin in einer Konzentration von jeweils 10⁻⁵ M in *Abb. ERG 26* dargestellt.

Im Konsens zu der Teilstudie an Gehirnschnitten wurde eine hohe optische Dichte (= markante Radioligandenbindung) für die *Substantia grisea* sowie eine verminderte OD für die *Substantia alba* des TRM (*Abb. ERG 27A*) ermittelt. In *Abb. ERG 27* finden sich exemplarisch Rezeptorautoradiogramme der kompetitiven Verdrängung des Radioliganden [³⁵S]dATPαS durch den P2X₁- / P2X₇-spezifischen Agonist BzATP in aufsteigender Konzentration am thorakalen Rückenmark der Ratte.

Bei der densitometrischen Analyse der digitalisierten Rezeptorautoradiogramme (8-bit Graustufen TIFF-Dateien) der kompetitiven Verdrängungsstudien mit ATP, α,β-meATP sowie TNP-ATP wurden die Graustufengraduierung (= optische Dichte) von Doppelbestimmungen für wichtige *Nuclei* des Hypothalamus wie ARC oder VMH, aber auch *Fornix cerebri* und *Hippocampus proprius* mit MCID Analysis ermittelt und letztlich die

Abb. ERG 26: Autoradiographischer Nachweis von [³⁵S]dATPαS-spezifischen Bindungsstellen im coronalen Gehirnschnitt der Ratte

Kompetitive Verdrängungsstudien an nicht-fixierten, coronalen Gehirnschnitten der adulten Ratte mit dem Radioliganden [³⁵S]dATPαS (0,65 nM). Als kompetitive, nicht-markierte Liganden dienten ATP bzw. α,β-meATP resp. TNP-ATP und Suramin in aufsteigender Konzentration (10⁻¹⁰ M bis 10⁻⁴ M). Der für die Auto-radiographie verwendete Bereich des Gehirns beinhaltet die hypothalamischen Kerngebiete (durch weiße Striche markiert) des MnPO (linke Spalte), PVN (mittlere Spalte) und ARC (rechte Spalte), sowie den *Hippocampus proprius* und die *Fornix cerebri*. Die Teilabbildungen der oberen Reihe (**A - C**) zeigen die Gesamtbindung (TO) des Radioliganden mit lokalisierter Schwärzung des Autoradiographiefilms. Die Teilbilder der zweiten resp. dritten Reihe zeigen durch eine relative Verminderung der optischen Dichte des Autoradiographiefilms die partielle Dissoziation des Radioliganden [³⁵S]dATPαS von den spezifischen Bindungsstellen durch den unmarkierten generellen P2-Rezeptoragonisten ATP (**D - F**) resp. den spezifischen P2X₁R- und P2X₃R-Agonisten α,β-meATP (**G - I**) (beide 10⁻⁵ M). Die Teilabbildungen der vierten resp. fünften Bildreihe zeigen exemplarisch durch eine geringere Schwärzung des Autoradiographiefilms die Verdrängung des Radioliganden durch den Subtyp-spezifischen P2X-Rezeptorantagonisten TNP-ATP (**J - L**) resp. den generellen P2-Antagonisten Suramin (**M - O**) (beide 10⁻⁵ M).

Der Größenmarker entspricht 3 mm.

Helligkeit und Kontrast der Abbildung sind mit dem Programm Photoshop um einen Wert von 50 erhöht.

Abkürzungen: aCa = *Commissura anterior*, ARC = *Nucleus arcuatus*, CA3 = *Cornu ammonis* Region 3 des *Hippocampus proprius*, cc = *Corpus callosum*, f = *Fornix cerebri*, LV = *Ventriculi laterales*, MnPO = *Nucleus praeopticus medianus*, och = *Chiasma opticum*, PVN = *Nucleus paraventricularis*, V-III = *Ventriculus tertius cerebri*

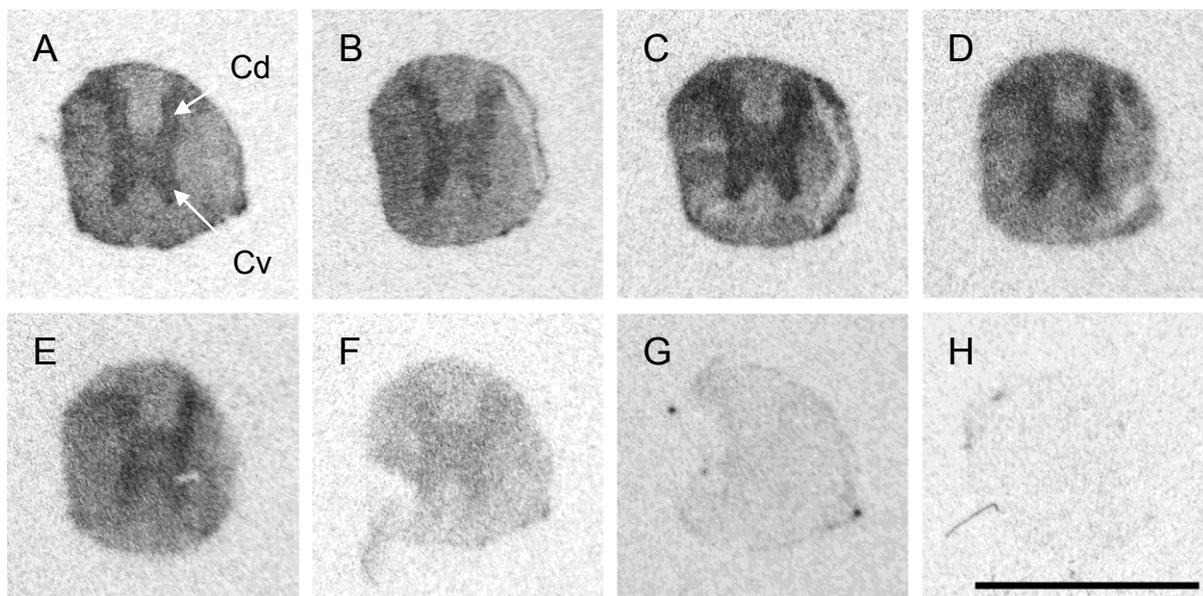


Abb. ERG 27: Autographischer Nachweis der kompetitiven Verdrängung von $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$ -Bindungsstellen im thorakalen Rückenmark der adulten Ratte

Die Abbildung stellt exemplarisch die kompetitive Verdrängung des Radioliganden $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$ (0,65 nM) durch den nicht-markierten P2X₁- und P2X₇ subtypspezifischen Liganden BzATP in nicht-fixierten Gewebeschnitten des thorakalen Rückenmarks der adulten Ratte dar. Die Teilabbildung **A** zeigt die Gesamtbinding von $[^{35}\text{S}]\text{dATP}\alpha\text{S}$ im Rückenmarksschnitt durch lokale Schwärzung des Autoradiographiefilms. Die kompetitive Verdrängung des Radioliganden durch BzATP in einer aufsteigenden Konzentration von 10^{-10} M bis 10^{-4} M wird in den Teilabbildungen **B** bis **H** durch eine stufenweise Verringerung der optischen Dichte des Autoradiographiefilms gezeigt.

Der Größenmarker entspricht 3 mm.

Helligkeit und Kontrast der Abbildung ist mit dem Programm Photoshop um einen Wert von 50 erhöht.

Abkürzungen: Cd = *Cornu dorsale*, Cv = *Cornu ventrale*

arithmetischen Mittelwerte mit S.E.M. für die Locus-spezifischen ODs von 3 - 4 Tieren errechnet (Abb. ERG 26, 27). Mit Hilfe von GraphPad Prism® wurde analog zu Kap. MM 2.7.4.3 unter Verwendung einer nicht-linearen Regressionsanalyse in Kombination mit einer "one-site competition" Gleichung der Verlauf der jeweiligen Verdrängungskurven graphisch (Abb. ERG 28) dargestellt sowie die IC₅₀-Werte ermittelt.

In den hypothalamischen Kerngebieten des ARC und VMH sowie in den Gehirngebieten der hippocampalen CA3 Region bzw. der *Fornix cerebri* konnte der Radioligand kompetitiv von den putativen Purinozeptoren verdrängt werden. Wie auch in den kompetitiven Verdrängungsstudien an Plasmamembransuspensionen des Hypothalamus (Kap. ERG 3.5.2.1) wurde für ATP und TNP-ATP ein absteigend sigmoidaler Kurvenverlauf erfasst, wohingegen für α,β -meATP kein eindeutig sigmoidaler Graph ermittelt wurde. Im Rahmen der densitometrischen Auswertung wurde im ARC in der Teilstudie mit ATP in einer

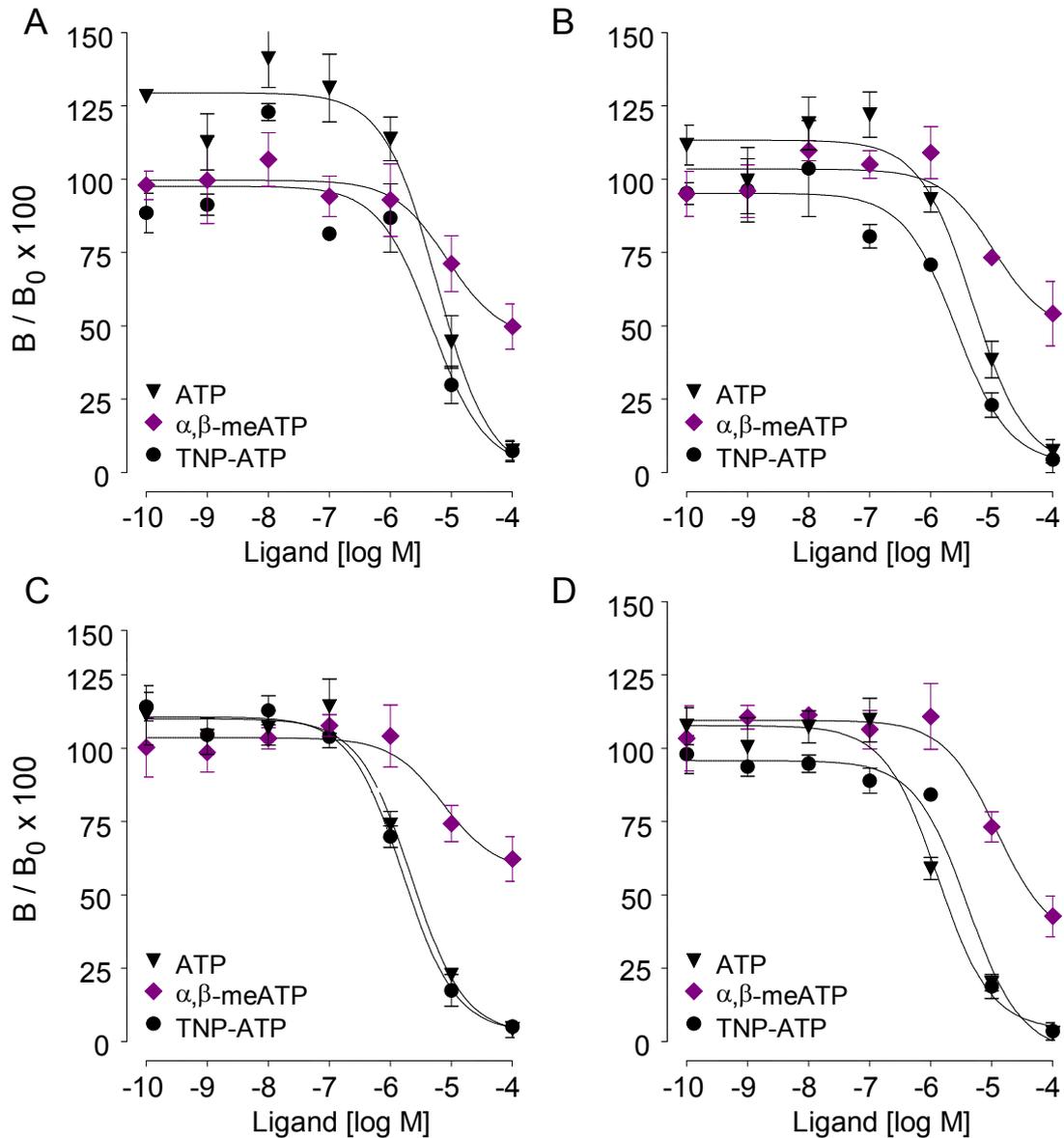


Abb. ERG 28: Kompetitive Verdrängungsstudien mit dem Radioliganden [^{35}S]dATP α S im coronalen Gehirnschnitt der Ratte

Die Verdrängungskurven **A** bis **D** zeigen die densitometrische Erfassung der kompetitiven Verdrängung des Radioliganden [^{35}S]dATP α S (0,65 nM) in den hypothalamischen Kerngebieten des *Nucleus arcuatus* (**A**) und *Nucleus ventromedialis hypothalami* (**B**) sowie den Gehirnstrukturen CA3 Region des *Hippocampus proprius* (**C**) und *Fornix cerebri* (**D**) adulter Ratten (N = 3). Als nicht-markierte Kompetitoren dienten der endogene Purinozeptoragonist ATP, der P2X₁R- und P2X₃R-spezifische Agonist α, β -meATP sowie der P2X-Subtypspezifische Antagonist TNP-ATP in aufsteigender Konzentration (10^{-10} M - 10^{-4} M). Die spezifische Radioligandenbindung (B) in Relation zur maximalen spezifischen Bindung (B_0) ist als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M unter Verwendung nichtlinearer Regressionsanalysen in Kombination mit einer "one-site competition" Gleichung dargestellt.

Datenanalyse in Abwesenheit (Gesamtbindung) bzw. Anwesenheit des unmarkierten P2-Rezeptorliganden in aufsteigender Konzentration, sowie in Anwesenheit von 10^{-4} M 2-MeSATP (unspezifische Bindung, NSB) als Doppelbestimmungen der optischen Dichte des Autoradiographiefilms.

Endkonzentration von 0,1 mM eine gemittelte spezifische Radioligandenbindung von lediglich $7,2 \pm 3,3$ % des B_0 -Wertes sowie eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) im ARC von $5,8 \pm 0,7$ μ M berechnet. Im ARC wurde für den Liganden α,β -meATP kein eindeutig sigmoidaler Kurvenverlauf bestimmt. In diesem Zusammenhang wurde bei einer finalen Konzentration von 0,1 mM immer noch eine mittlere Radioligandenbindung von $49,8 \pm 7,7$ % des B_0 -Wertes, sowie ein IC_{50} -Wert von $8,4 \pm 0,4$ μ M errechnet. In Anwesenheit des Antagonisten TNP-ATP (0,1 mM) wurden durchschnittlich $92,8 \pm 3,2$ % des Radioligand [35 S]dATP α S von dessen Bindungsstellen verdrängt, dabei wurde für TNP-ATP ein IC_{50} -Wert von $4,8 \pm 0,6$ μ M ermittelt.

Die kompetitiven Verdrängungsstudien im hypothalamischen VMH (*Abb. ERG 28B*) wiesen für ATP in einer Endkonzentration von 0,1 mM eine gemittelte spezifische Radioligandenbindung von lediglich $7,3 \pm 4,0$ % des B_0 -Wertes sowie einen IC_{50} -Wert von $4,9 \pm 0,1$ μ M auf. Im Rahmen der densitometrischen Auswertung des hypothalamischen VMH ergab sich für die Dissoziationsstudie mit α,β -meATP bei einer Konzentration von 0,1 mM immer noch eine mittlere Radioligandenbindung von $44,2 \pm 8,0$ % des B_0 -Wertes, sowie ein durchschnittlicher IC_{50} -Wert von $2,6 \pm 0,2$ μ M. Die Datenanalyse der Rezeptorautoradiographien für TNP-ATP ergab bei einer Konzentration von 0,1 mM eine gemittelte spezifische Bindung von $4,4 \pm 4,3$ % des B_0 -Wertes sowie eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) im VMH von $5,8 \pm 0,7$ μ M.

Die densitometrische Auswertung der kompetitiven Verdrängungsstudien im Bereich der hippocampalen CA3 Region ergab eine Radioligandenbindung von $5,5 \pm 3,2$ %, $56,3 \pm 8,3$ % resp. $1,7 \pm 1,3$ % des B_0 -Wertes für die Kompetitoren ATP, α,β -meATP resp. TNP-ATP in einer Konzentration von 0,1 mM. Außerdem wurde ein IC_{50} -Wert für ATP, α,β -meATP resp. TNP-ATP von $2,2 \pm 0,1$ μ M, $7,4 \pm 0,2$ μ M resp. $1,6 \pm 0,1$ μ M berechnet.

Basierend auf den Resultaten der Rezeptorautoradiographien im Bereich der *Fornix cerebri* wurden für ATP, α,β -meATP resp. TNP-ATP eine Radioligandenbindung von $2,9 \pm 1$ %, $42,7 \pm 6,9$ % resp. $3,5 \pm 2,9$ % des B_0 -Wertes berechnet. In der *Fornix* konnte mit Hilfe kompetitiver Verdrängungsstudien mit ATP, α,β -meATP resp. TNP-ATP ein IC_{50} -Wert von $1,3 \pm 0,1$ μ M, $12,1 \pm 0,2$ μ M resp. $4,1 \pm 0,1$ μ M ermittelt werden. Während also die Membranbindungsstudien im Rahmen der kompetitiven Verdrängungsstudien für ATP, 2-MeSATP oder TNP-ATP zu IC_{50} -Werten von 10 - 30 nM führten, ergaben sich bei den quantitativen Auswertungen der Rezeptorautoradiogramme IC_{50} -Werte im unteren mikromolaren Bereich. Eine vermehrte enzymatische Degradation des Radioliganden durch aus den unfixierten Gehirnschnitten freigesetzte Endonukleotidasen könnten zumindest teilweise für diese Diskrepanz verantwortlich gewesen sein.

4. Diskussion

4.1. Immunzytochemische Charakterisierung ARC-spezifischer Neurotransmittersysteme in der Primärkultur

Die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung ionotroper purinerge Rezeptoren im hypothalamischen *Nucleus arcuatus* (ARC) der Ratte repräsentierte die zentrale Zielstellung der vorliegenden Arbeit. Dabei kommt dem ARC der Wirbeltiere neben dem *Nucleus paraventricularis* (PVN), dem *Nucleus ventromedialis hypothalami* (VMH) sowie der *Regio hypothalami lateralis* (LH) eine herausragende Bedeutung als zentrales Regelzentrum für den komplexen autonomen Regelkreis zur Konstanzhaltung des Energiehaushaltes inklusive der Nahrungsaufnahme (*Kap. EIN 1.6*) zu. Neben klassischen Neurotransmittern wie Glutamat oder GABA sind dabei vor allem Neuropeptide als Signalmoleküle beteiligt. Der ARC repräsentiert außerdem ein wichtiges neuroendokrines Kontrollzentrum für die Hormonsysteme der Adenohypophyse. Dabei spielen neuropeptiderge und katecholaminerge *inhibiting* und *releasing* Faktoren eine wichtige Rolle.

Die Grundvoraussetzung für pharmakologisch-zellbiologische Studien an einzelnen Neuronen sowie Gliazellen des ARC stellte dabei die *de novo* Etablierung einer Primärkultur des ARC neonataler Ratten dar (*Kap. MM 2.4*). Hierfür konnte auf profunde Erfahrungen in der Etablierung neuroglialer primärer Zellkulturen spezifischer hypothalamischer Kerngebiete (MnPO, PVN) resp. zirkumventrikulärer Strukturen (AP, OVLT, SFO) des Rattengehirns in der AG Gerstberger am Max-Planck-Institut für Physiol. & Klin. Forschung (Bad Nauheim) (1994-2000) resp. am Institut für Veterinär-Physiologie & -Biochemie der JLU (2000 bis *dato*) zurückgegriffen werden (Gebke et al., 1998, 2000; Hatzelmann et al., 2013; Hitzel, 2009; Jurzak et al., 1994, 1995a, 1995b; Ott et al., 2010, 2012; Wuchert et al., 2008, 2009). Die immunzytochemische Markierung ARC-intrinsischer Neurotransmitter- bzw. -peptidsysteme in Neuronen der ausdifferenzierten Primärkultur *in vitro* stellte ein wichtiges Kriterium dar für den Nachweis (1) der erfolgreichen Kultivierung ARC-spezifischen Gehirnparenchyms sowie (2) einer dem ARC *in vivo* vergleichbaren Transmitterkodierung der ARC-Neurone. Zur eingehenden Charakterisierung der zellulären Expression der ARC-spezifischen Neurotransmittersysteme in den kleinzelligen, bi-, tri- und multipolaren Neuronen der ARC-Primärkultur - sowie vergleichend in coronalen Gehirnschnitten adulter Ratten - wurden antigenspezifische polyklonale Antiseren sowie monoklonale Antikörper eingesetzt.

Ventromedial bzw. -lateral lokalisierte Neurone des ARC exprimieren nachweislich POMC als Pro-Polypeptid für ACTH und α -MSH (Broberger & Hökfelt, 2001; Chronwall,

1985; Colldén et al., 2010). Dessen anorexigene Wirkung *via* Interaktion mit dem Melanocortinrezeptor konnte durch icv-Applikation an Futter-deprivierten Ratten demonstriert werden (Harrold et al., 2012; Poggioli et al., 1986). Neben der Lokalisation von POMC-Neuronen im ARC adulter Ratten wurde in der vorliegenden Arbeit, konform mit immunhistochemischen Untersuchungen des ARC von Mäusen, sowohl in Neuronen der primären Zellkultur des ARC als auch im Gehirnschnitt adulter Ratten keine Kolokalisation von POMC mit der Tyrosinhydroxylase (TH) als Schlüsselenzym für die Synthese von Dopamin (DA) ermittelt (Cowley et al., 2001). Zusätzlich wird in der Fachliteratur explizit auf eine fehlende Koexpression des POMC-Peptides mit Neuropeptid Y (NPY) oder Somatostatin (SOM) hingewiesen (Chronwall, 1985; Colldén et al., 2010; Cowley et al., 2001). NPY sowie das *agouti gene-related peptide* (AGRP) stimulieren die Nahrungsaufnahme, wobei beide Neuropeptide im ventromedialen ARC kolokalisiert sind (Broberger & Hökfelt, 2001; Tatemoto et al., 1982). Über einen negativen *feedback* Mechanismus wirkt NPY sowohl autoregulatorisch auf die Aktivität der NPY / AGRP-Neurone als auch direkt hemmend auf die POMC / CART-Neurone des ARC ein, wodurch die Abgabe von α -MSH gesenkt wird (Broberger et al., 1997; King et al., 1999; 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden etwa 15 % der identifizierten Nervenzellen der ARC-Primärkultur als NPY-immunoreaktiv charakterisiert, und mehr als 27 % der NPY-ergen Nervenzellen erwiesen sich ebenfalls als dopaminerg (*Kap. ERG 3.2.2*). Neben der Detektion von POMC-Neuronen war dies ein weiterer Hinweis auf ein offensichtlich auch in der neuroglialen Zellkultur des ARC früh-postnataler Ratten erhaltenes, ARC-typisches Transmittercoding seiner Neurone.

Immunhistochemische Studien demonstrierten außerdem die synaptische Verbindung NPY-exprimierender ARC-Nervenzellen mit SOM-produzierenden Neuronen des *Nucleus periventricularis* (PE) (Hisano et al., 1990; Minami et al., 1998). Aufgrund der experimentellen Unterbrechung afferenter Projektionen in den PE, sowie der icv-Applikation von NPY und Bestimmung des Plasmaspiegels an Wachstumshormon (GH), postulierten Minami und Kollegen (1998) eine autoregulatorische, GH-induzierte Freisetzung von NPY, welches wiederum die SOM-Sekretion der PE-Neurone stimuliert. Letzteres reduziert entweder direkt durch Inhibition der sekretorischen Aktivität somatotropher Zellen des HVL, oder indirekt durch Supprimierung der GHRH-Freisetzung aus ARC-Neuronen, die GH-Abgabe aus den Zellen der Adenohypophyse (*Kap. EIN 1.5.2*) (Minami et al., 1998).

Untersuchungen mit retrograden Tracersubstanzen zeigten, dass das Neuropeptid Neurenin (NT) im Hypothalamus v.a. in den Kerngebieten PE, ARC und pPVN exprimiert

wird (Merchenthaler & Lennard, 1991; Rostène & Alexander, 1997). Im ventrolateralen sowie dorsomedialen Bereich des ARC wurden immunhistochemisch partielle Kollokationen von NT aber auch NT-spezifischen Rezeptoren mit dopaminergen und / oder GHRH-positiven Neuronen demonstriert (Everitt et al., 1986; Hökfelt et al., 1984; Iyata et al., 1983; Meister & Hökfelt, 1988; Moga & Saper, 1994; Nicot et al., 1994; Rostène & Alexander, 1997). Auf der Basis der GHRH-Koexpression wurde vermutet, dass die ventrolateral lokalisierte Neuronenpopulation an der Freisetzung von GH sowie weiterer HVL-Hormone beteiligt sein könnte (Rostène & Alexander, 1997). Die dorsomediale Neuronengruppe (TIDA-Neurone) ist zudem von primärer Bedeutung für die Suppression der hypophysären Prolaktin (PRL) Sekretion (Everitt et al., 1986; Rostène & Alexander, 1997). Im Gegensatz zur DA-vermittelten Wirkung stimuliert NT *via* Ca²⁺-Mobilisierung in laktotrophen Zellen des HVL eine erhöhte PRL-Sekretion (Memo et al., 1985). Die nachweislich partielle Kollokalisierung von NT in dopaminergen Neuronen des ARC adulter Ratten wurde ebenfalls immunzytochemisch in der etablierten ARC-Primärkultur demonstriert (*Kap. ERG 3.2.3*), wohingegen sich NT aufgrund seiner raschen enzymatischen Degradation nicht im coronalen Gehirnschnitt von nicht mit Colchicin behandelten Ratten ermittelt ließ. In anderen immunhistochemischen Studien wurde dazu Colchicin als Inhibitor des axonalen Transports, und damit zur nachweisbaren Akkumulation von neuroaktiven Substanzen wie NT oder NPY in neuronalen Zellkörpern, intracerebroventrikulär bei Versuchstieren mikroappliziert (Dahlström, 1968; James et al., 1970; Merchenthaler & Lennard, 1991). Als unerwünschter Nebeneffekt der Colchicin-Behandlung wurde jedoch u.a. eine deutliche Erhöhung der mRNA-Synthese für NT in verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus (u.a. PVN, ARC) von Ratte und Maus beschrieben (Rostène & Alexander, 1997). Die Verwendung von nicht mit Colchicin behandelten Ratten könnte in der vorliegenden Arbeit die fehlende immunhistochemische Markierung von NT und NPY auf zellulärer Ebene im Gehirnschnitt begründen (*Kap. ERG 3.2.2*).

Anhand des Nachweises von TH als Schlüsselenzym der Dopamin Biosynthese (Chan-Palay et al.; 1984) konnte DA in etwa 11 % aller Neurone der ARC-Primärkultur immunzytochemisch nachgewiesen werden. Das DA dorsomedial und ventrolateral lokalisierter TIDA-Neurone des ARC stellt, wie schon erwähnt, den potentesten *inhibiting* Faktor zur Regulation der adenohipophysären Freisetzung von Prolaktin (*Kap. EIN 1.5.2*) sowie in abgeschwächter Form auch des adrenocorticotrophen Hormons (ACTH) dar (Arimura, 2000; Chan-Palay et al., 1984; Chronwall, 1985; Fehér et al., 2010; Tucker, 2000).

In Hinblick auf die hypothalamische Regulation der adenohipophysären PRL- bzw. GH-Sekretion wurde konform mit den Resultaten vorausgegangener immunhistochemischer

Untersuchungen am Gehirn adulter Ratten ebenfalls in der neuroglialen ARC-Primärkultur eine partielle neuronale Kollokalisierung von Dopamin (bzw. TH) und dem *inhibiting* Faktor SOM (~ 25 %) ermittelt (Kumar, 2007; Sakanaka et al., 1990). Neben einem negativen *short-loop feedback* Mechanismus v.a. der SOM-exprimierenden Neurone des PE und auch des ARC auf die PRL-Sekretion (*Kap. EIN 1.5.2*), hemmen innerhalb des ARC-Kerngebietes SOM-produzierende Neurone die GHRH-Freisetzung benachbarter Neurone, und reduzieren somit die Sekretion von GH aus dem HVL (Ben-Shlomo et al., 2013; Bluet-Pajot et al., 2001; Burton et al., 1992; Freeman et al., 2000). Kumar (2007) wies dabei die Expression SOM-spezifischer Rezeptoren (SSTR) auf dopaminergen Nervenzellen des ARC sowie des PE nach und vermutete, dass in Folge dieser Kollokalisierung, SOM *via* SSTR direkten Einfluss auf Katecholamin-vermittelte Mechanismen haben könnte (Kumar, 2007). Im Bereich des Hypothalamus ist ein Großteil der SOM-produzierenden Neurone im PE und nur ein geringer Anteil im ARC konzentriert (Chronwall, 1985; Kumar, 2007; Patel, 1999). Während das polyklonale SOM-Antiserum im Gehirnschnitt ausschließlich immunoreaktive Fasern im mediolateral ARC sowie der *Eminentia mediana* aufzeigte (*Abb. ERG 4C*), waren in der ARC-Primärkultur etwa acht Prozent der Neurone SOM-positiv.

Zusammenfassend zeigte diese Untersuchung, dass in Neuronen der neuroglialen Primärkultur früh-postnataler Ratten klassische Neurotransmitter bzw. Neuromodulatoren des *Nucleus arcuatus* adulter Ratten wie Dopamin, Neuropeptid Y, Neurotensin und Somatostatin, aber auch das Prohormon Proopiomelanocortin, nachgewiesen werden konnten. Konform mit immunhistochemischen Studien am ARC adulter Ratten lieferten in der vorliegenden Arbeit Kollokalisationsuntersuchungen zusätzlich Hinweise darauf, dass ARC-Neurone der Primärkultur mehr als nur einen Neurotransmittertyp synthetisieren, speichern und freisetzen können, vergleichbar der *in vivo* Situation der adulten Ratte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine funktionelle, neurogliale Primärkultur des ARC früh-postnataler Ratten erfolgreich etabliert und manifestiert werden konnte (Chronwall, 1985; Meister & Hökfelt, 1988).

4.2. Charakterisierung purinerge Rezeptoren im ARC

Neben den klassischen Neurotransmittern wird extrazellulärem Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in vielen Bereichen der Neurowissenschaften seit den Pionierstudien von Burnstock und Kollegen (1970) eine wichtige modulatorische Funktion zugeschrieben. Neuronal synthetisiertes, extrazelluläres ATP interagiert dabei nach in erster Linie vesikulär-synaptischer Freisetzung als *messenger* Molekül über purinerge P2-Rezeptoren mit

nachgeschalteten Neuronen bzw. möglicherweise parakrin mit umgebenden Gliazellen (Inoue et al., 2010; Pankratov et al., 2006). Neuere experimentelle Untersuchungen legen auch für hypothalamische neuronale Netzwerke eine funktionelle Beteiligung von synaptisch freigesetztem ATP nahe. So gibt es für Kerngebiete wie den PVN oder den SON erste Daten bezüglich der physiologischen Relevanz von ATP etwa für die magnozelluläre Neurosekretion von Oxytocin oder ADH (Gomes et al., 2009). Erste Hinweise für die Existenz von P2X-Purinorezeptoren (P2X₂, P2X₄ und P2X₆) im ARC von Ratte und Maus stammen aus *in situ* Hybridisierungsstudien und immunhistochemischen Untersuchungen an Gehirnschnitten der Ratte (Collo et al., 1996; Colldén et al., 2010; Xiang et al., 1998) sowie aus elektrophysiologischen Studien an ARC-Neuronen *in vitro* (Wakamori & Sorimachi, 2004).

Der Nachweis purinerner Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene im Bereich des Hypothalamus wirft die Frage nach der funktionellen Expression purinerner Rezeptoren in den neuroglialen Komponenten des ARC sowie deren mögliche Beteiligung an den vorgestellten Regulationsmechanismen auf.

4.2.1. Betrachtung der Expression purinerner Rezeptoren in der Ontogenese des Zentralnervensystems der Ratte

Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte detailliert die Expression aller sieben bekannten P2X-Purinozeptorsubtypen gleichermaßen im hypothalamischen ARC neonataler und adulter Wistar-Ratten als auch für die neurogliale Primärzellkultur des ARC sowie des MnPO demonstriert werden. Die Resultate der Genexpressionsanalysen für die Untersuchung der mRNA-Expressionsmuster ermöglichen jedoch keine Differenzierung der P2X-Purinozeptorexpression bezüglich der verschiedenen Zelltypen des ARC. Aus methodischen Gründen konnte der mRNA-Gehalt der sieben P2X-Rezeptorsubtypen für adulten ARC, neonatalen ARC sowie die ARC-Primärkultur ebenfalls nicht direkt miteinander verglichen werden (*Kap. ERG 3.1.4*). Durch Relativierung auf das jeweils am niedrigsten exprimierte Zielgen (P2X₅) wurde jedoch ein nahezu kongruentes Expressionsmuster im direkten Vergleich des hypothalamischen ARC-Kerngebiets früh-postnataler und adulter Ratten verifiziert. Für den ARC früh-postnataler Ratten stellt sich die quantitative Erfassung der Expressionsmuster wie folgt dar: P2X₂ = P2X₆ > P2X₄ > P2X₇ >> P2X₃ = P2X₁ > P2X₅. Für den ARC adulter Tiere gilt: P2X₂ > P2X₆ = P2X₄ > P2X₇ >> P2X₃ = P2X₁ > P2X₅. Während der Entwicklung der Ratte wurden diesbezüglich Veränderungen in der Expression der P2X-Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene im ZNS beschrieben (Brosenitsch et al., 2005; Cheung et al.,

2002; 2005; Kidd et al., 1998; Xiang & Burnstock, 2005a; b). Während der P2X₃-Rezeptorsubtyp bereits früh in der embryonalen Entwicklung des ZNS der Sprague-Dawley Ratte (embryonaler Tag 11 = E11) im Bereich des *Metencephalon* bzw. wenig später im *Nucleus mesencephalicus nervi trigemini* (MeN5) und NTS exprimiert wird, ist die Existenz der Rezeptorsubtypen P2X₂ und P2X₇ erstmals ab E14 nachweisbar. Hinsichtlich der Expression des P2X₁R während der Neurogenese liegen keine eindeutigen Belege vor (Cheung & Burnstock; 2002; Cheung et al., 2005). Im direkten Vergleich der Expressionsprofile für die P2XR-Subtypen P2X₁ und P2X₂ im *Cerebellum* und *Hippocampus* pränataler und adulter Ratten wurde molekularbio- und immunologisch eine abnehmende Expression beider Subtypen beschrieben (Kidd et al., 1995; 1998). Cheung und Kollegen (2002; 2005) wiesen mittels Immunhistochemie und RT-PCR zudem nach, dass die Purinozeptorsubtypen P2X₄₋₆ erst während der postnatalen Neurogenese gebildet werden. In der weiteren postnatalen Entwicklung wurde einerseits eine *down*-Regulation des P2X₃R-Expression im *Nucleus ambiguus*, sowie im MeN5 von 14 - 21 Tage alten (P14 - P21) im Vergleich zu neonatalen (P3) Ratten festgestellt (Brosenitsch et al., 2005; Kidd et al., 1998). Andererseits wurde immunhistochemisch im *Cerebellum* junger Ratten bis zu P14 eine *up*-Regulation der Expression aller P2X-Rezeptorsubtypen, mit Ausnahme von P2X₃R, ermittelt (Xiang & Burnstock, 2005b).

Die hohe mRNA-Expressionsrate für P2X₂R und die moderate bis hohe Expression von P2X₄R im ARC früh-postnataler Ratten blieben im Adultstadium der Tiere erhalten. Im direkten Vergleich der erstellten P2X-Expressionsmuster für den ARC konnte eine leichte Reduktion der Transkriptionsrate für P2X₆R in adulten vs. neonatalen Tieren konstatiert werden. Die generell jedoch hohe mRNA-Expressionsrate in beiden Altersgruppen lässt posttranslational möglicherweise auf die Bildung von funktionellen heterotrimeren Rezeptoren aus P2X₂- resp. P2X₄- mit P2X₆-Untereinheiten schließen (*Kap. EIN 1.4.2*). Diese Heterotrimere vereinen die pharmakologischen Eigenschaften des P2X₂R resp. P2X₄R mit denen des P2X₆R und generieren somit ein neues pharmakologisches Profil für spezifische Agonisten und Antagonisten (Coddou et al., 2011b; Lé et al., 1998; Ormond et al., 2006). Gemäß den Untersuchungen von Loesch und Burnstock (2001) an neurosekretorischen Neuronen des PVN und SON im Bereich des HHL adulter Tiere wurde impliziert, dass der P2X₆-Rezeptorsubtyp an der Freisetzung der Neurohormone aus axonalen Synapsen oder der Wiederverwertung der Vesikelmembranen beteiligt sein könnte, und somit nicht für die Ontogenese relevant sei (Cheung et al., 2005). Die marginale mRNA-Expression für P2X₁R und P2X₃R, sowie die moderate Ausprägung für P2X₇R waren ebenfalls konform mit den Ergebnissen von Cheung und Kollegen (2005).

Der Expression des P2X₃R wird einhergehend mit einer *down*-Regulation im neonatalen und adulten Stadium hauptsächlich eine Rolle in der embryonalen Ontogenese des ZNS und PNS zugeschrieben (Boldogkoi et al., 2002; Brosenitsch et al., 2005; Cheung et al., 2005; Kidd et al., 1998). Der P2X₇R wird bereits im embryonalen Gehirn exprimiert und scheint in den programmierten Zelltod (Apoptose) im sich entwickelnden Gehirn sowie in zentrale Entzündungsprozesse involviert zu sein (Cheung et al., 2005; Le Feuvre et al., 2002). Diese Daten bezogen sich jedoch hauptsächlich nur auf die neuronale Komponente des ZNS bzw. des PNS.

Übereinstimmend mit den Genexpressionsanalysen für native MnPO-Gewebeexplantate früh-postnataler sowie adulter Wistar-Ratten von Hitzel (2009) gestalteten sich das Expressionsmuster der Purinozeptoren früh-postnataler Tiere wie folgt: P2X₂ > P2X₄ > P2X₇ > P2X₆ > P2X₁ ≥ P2X₃ > P2X₅. Für den MnPO adulter Ratten gilt: P2X₄ > P2X₇ > P2X₂ > P2X₆ > P2X₃ ≥ P2X₅ ≥ P2X₁. Sowohl den neonatal als auch adulten MnPO betreffend waren die Purinozeptorsubtypen P2X₂, P2X₄, P2X₇ sowie partiell auch P2X₆ dominant exprimiert (*Kap. ERG 3.1*). Der im MnPO adulter Tiere anteilmäßig verminderte mRNA-Gehalt für den P2X₂R gegenüber jenem neonataler Ratten könnte neurogenetische Ursachen mit einer *down*-Regulation der P2X₂-Expression im Verlauf der postnatalen Entwicklung haben. Der im direkten Vergleich der P2XR-Expressionsmuster zwischen den hypothalamischen *Nuclei* ARC und MnPO adulter Ratten auffälligste Unterschied ergab sich bezüglich der markant hohen, relativen mRNA-Expression für P2X₇ im Bereich des MnPO, bei ansonsten dominanter Expression der P2X₂, P2X₄ und P2X₆ in beiden Kerngebieten (*Abb. ERG 1*). Die geringe Ausprägung von P2X₃ und P2X₅ im MnPO erwies sich als konform zu den in der Fachliteratur beschriebenen Befunden für andere zentralnervöse Strukturen. In Übereinstimmung mit den Daten von Hitzel (2009) ist somit anzunehmen, dass bezüglich der mRNA-Expression für die P2X-Rezeptorsubtypen (P2X₁ - P2X₇) im MnPO geringfügige ontogenetische Unterschiede, v.a. für P2X₂ und P2X₄, zwischen neonatalen und adulten Ratten ermittelt werden konnten. Hinsichtlich der Expressionsmuster im ARC neonataler vs. adulter Ratten wurde diese Gegebenheit nicht deutlich (*Kap. ERG 3.1.4*).

Die Resultate der durchgeführten kompetitiven Verdrängungsstudien im Rahmen der Radiorezeptor-Assays lassen vermuten, dass durch die effektive Verdrängung des purinergen Rezeptorliganden [³⁵S]dATPαS mittels unmarkiertem TNP-ATP und BzATP Rezeptoren mit P2X₁-ähnlichen Charakteristika sowie P2X₇ im Gesamthypothalamus adulter Ratten exprimiert werden. Zudem kann das Vorkommen der Rezeptorsubtypen P2X₂ und P2X₃, welche gemeinsam das P2X_{2/3}-Heterotrimer bilden können, nicht ausge-

geschlossen werden (Bianchi et al., 1999; Ford et al., 2006). Zudem deuten die im Rahmen der neuropharmakologischen Charakterisierung der im Gehirn exprimierten P2X-Rezeptorsubtypen erfolgten kompetitiven Verdrängungsstudien an coronalen Gehirnschnitten (*Kap. ERG 3.5.3*) durch die effektive Dissoziation des Radioliganden mittels TNP-ATP ebenfalls auf eine Expression der purinergen Rezeptorsubtypen P2X₂ und P2X₃ in den hypothalamischen Gebieten des ARC und VMH sowie in der CA3-Region des *Hippocampus* und der *Fornix cerebri* adulter Ratten hin.

Zur Expression purinergere Rezeptoren in Astrozyten und Oligodendrozyten während der Ontogenese liegen bis *dato* nur wenige Befunde vor. Es wird jedoch angenommen, dass durch neurale Aktivität, astrozytäre Signaltransduktion oder Zellyse freigesetztes ATP die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen und die Myelinbildung durch Oligodendrozyten stimuliert wird (Agresti et al., 2005). In der späten embryonalen bzw. frühen postnatalen Lebensphase, in welcher mikrogliale Vorläuferzellen in das sich entwickelnde ZNS einwandern (*Kap. EIN 1.7.3*), bis ins adulte Lebensstadium, exprimieren Mikrogliazellen purinerge Rezeptoren (Xiang & Burnstock, 2005a; b). Molekularbiologisch und immunhisto- bzw. immunzytochemisch konnten im *Prosencephalon* (*Diencephalon* und *Telencephalon*) in der embryonalen Ontogenese (E16) die Purinozeptoren P2X₁R, P2X₄R und P2X₇R in Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Hierbei waren beinahe alle Mikrogliazellen gleichermaßen ED1- als auch P2X₁R- und P2X₄R-immunoreaktiv, jedoch nur ein Drittel P2X₇R-immunpositiv (Xiang & Burnstock, 2005a). In diesem Zusammenhang fungiert ED1 als ein Marker für aktivierte, amöboide Mikrogliazellen (*Kap. ERG 3.2*) (Kullberg et al., 2001; Wu et al., 2005). Während der postnatalen Entwicklung wurde ebenfalls eine Veränderung des Expressionsmusters der ionotropen Purinozeptoren festgestellt. So wurde eine *down*-Regulation des P2X₁R ermittelt, wobei ab dem Tag P30 keine amöboiden P2X₁R-positiven Mikrogliazellen mehr zu ermitteln waren (Coddou et al., 2011b; Xiang & Burnstock, 2005a). Zu diesem Zeitpunkt wurden die P2X₇-immunpositiven Mikrogliazellen nur noch mit Hilfe einer Kolo-kalisation mit Isolectin B4, einem unspezifischen Mikroglia-marker, der eine Unterscheidung in ruhende und aktivierte Zellen nicht ermöglichte, detektiert. Diesbezüglich wird vermutet, dass die Differenzierung und Reifung der aktivierten, amöboiden Mikroglia v.a. *via* P2X₁R und P2X₄R vermittelt wird (Coddou et al., 2011b; Xiang & Burnstock, 2005a; b).

Die hohe Expressionsrate von P2X₄R (und nachfolgend moderate Expression auch von P2X₇R) stimmt zum einen auf mRNA-Ebene sowohl im ARC neonataler als auch adulter Tiere (*Kap. ERG 3.1*), und zum anderen mit den immunzytochemischen Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von P2X₄R in der vorliegenden Arbeit überein (*Kap.*

ERG 3.4). So waren internalisierte P2X₄-Rezeptoren in kultivierten Mikrogliazellen bzw. in frisch präparierten, peritonealen Makrophagen hauptsächlich in Lysosomen lokalisiert (Coddou et al., 2011b; Qureshi et al., 2007). Diese Daten sind konform mit den erhobenen Befunden der Kolo-kalisation des Rezeptorsubtyps P2X₄R mit der Immunreaktivität gegen das in der Lysosomenmembran vorkommende Glykoprotein CD68 in Mikrogliazellen. Während unstimulierte Makrophagen diesen Rezeptorsubtyp kaum funktionell in der Plasmamembran exprimierten, wurde eine erhöhte Expression während der Phagozytose im Plasmalemma detektiert (Coddou et al., 2011b; Stokes & Surprenant, 2009). Außerdem wurde angenommen, dass ATP über den P2X₇R in ruhenden, mikroglialen Zellen einen weiteren Signalweg, möglicherweise bei Inflammation, Verletzungen oder gar degenerativen Krankheiten vermittelt (Xiang & Burnstock, 2005a).

4.2.2. Die Expression purinergere Rezeptoren in der neuroglialen Primärkultur des ARC und des MnPO der Ratte

Die funktionelle Charakterisierung purinergere Rezeptoren wurde und wird meist entweder an rekombinanten Systemen mit Hilfe stabil transfizierter Zelllinien bzw. Oozyten von *Xenopus laevis* (glatter Krallenfrosch), oder mittels verschiedenen murinen bzw. humanen Zelllinien, welche Purinozeptoren nachweisbar exprimieren, durchgeführt (Gever et al., 2006; King et al., 1998; North, 2002; Ralevic & Burnstock, 1998; Wolf et al., 2011). Im Fokus der heutigen Forschung steht die mögliche Übertragung der daraus gewonnenen Resultate auf native Zellen, Gewebe oder gar Organismen. Ausführliche, vergleichende Expressionsstudien zeigten, dass [1] die Genexpression von Zellen aus etablierten, immortalisierten Zelllinien sich sehr stark von *in vivo* Systemen unterscheiden und [2] Primärzellkulturen und Gewebeexplantate dem *in situ* Genexpressionsmuster näher kommen als Zelllinien (Boess et al., 2003). Für die pharmakologische Klassifikation der purinergere Rezeptoren im hypothalamischen ARC wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neurogliale Primärzellkultur aus dem ARC neonataler Ratten etabliert. Dabei konnte die Expression aller bekannten P2X-Purinozeptoren sowohl in der Primärzellkultur des ARC, als auch des MnPO auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Beide neuroglialen Primärzellkulturen wiesen Konformität im mRNA-Expressionsmuster auf. Die Resultate der qRT-PCR für die Primärzellkultur des ARC (*Kap. ERG 3.1.3.*) gestalten sich in der quantitativen Erfassung der Expressionsmuster wie folgt: P2X₄ > P2X₆ > P2X₃ ≥ P2X₂ > P2X₁ > P2X₇ > P2X₅. In der Gegenüberstellung der Expressionsprofile nicht nur des ARC-Parenchyms neonataler sondern auch adulter Ratten mit der Primärkultur des ARC war die relative Zunahme der P2X₃R- und P2X₄R-Subtypen bei gleichzeitiger partieller Re-

duktion der P2X₂R-Expression auffällig (*Abb. ERG 1*). Die Analyse der Gewebeeexplantate zeigte den *in situ* Status der purinergen Rezeptoren unbehandelter Tiere in einem bestimmten Entwicklungsstadium an. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen der Primärkultur aus dem Körper sowie Gewebeverband entnommen und mit minimalem Kontakt zu anderen Zellen vereinzelt. Zudem wurde es den Zellen ermöglicht, sich den neuen Gegebenheiten unter Zellkulturbedingungen anzupassen (*Kap. MM 2.5.4*). Die dominante mRNA-Expression des Rezeptorsubtyps P2X₄ im Expressionsmuster gleichermaßen in der Primärkultur des ARC und des MnPO warf die Frage auf, ob dieser Rezeptorsubtyp verstärkt exprimiert wurde, oder ein geringerer mRNA-Gehalt für P2X₂ verglichen mit dem *in situ* Status beider Entwicklungsstadien detektiert wurde.

Beruhend darauf, dass ruhende Mikrogliazellen im gesunden ZNS in der Lage sind, pathologische Veränderungen wahrzunehmen, welche u.a. als Folge der Gewinnung der Primärkultur (*Kap. MM 2.4.2*) mit der Zerstörung von neuroglialem Gewebe unvermeidlich wäre, ist anzunehmen, dass Mikrogliazellen der ARC-Primärkultur in einen aktivierten, amöboiden Zustand transformierten, was mit einer vermehrten Expression u.a. von purinergen Rezeptoren einherginge (Färber & Kettenmann, 2006, Kreutzberg, 1996; Verderio & Matteoli, 2001). Darauf deutet in der vorliegenden Arbeit u.a. die hervorragende Markierung der Mikrogliazellen für ED1 sowie ihre Morphologie hin. Zusätzlich ist es wahrscheinlich, dass gleichwohl Astrozyten und Mikrogliazellen der Primärkultur des ARC wie bei einer Astroglie zur Proliferation angeregt werden könnten (Franke et al., 2001a), sodass sich das Verhältnis zwischen Gliazellen zu den u.a. P2X₂R- bzw. P2X_{2/3}R-exprimierenden Neuronen und folglich auch der mRNA-Gehalt im Vergleich zum *in situ* Zustand veränderte. In diesem Zusammenhang induzierte eine hervorgerufene reaktive Astroglie im NAc *in vivo* eine Astrozytenproliferation mit gleichzeitiger Hochregulation verschiedener Purinozeptorsubtypen, besonders von P2X₁R und P2X₇R (Franke et al., 2001a).

Andererseits ist sehr wahrscheinlich, dass in Folge der Präparation der hypothalamischen Kerngebiete für die ARC- resp. MnPO-Primärkultur, Nervenzellen durch Durchtrennung nervaler Projektionsbahnen (vor allem also Axonen) innerhalb bzw. zu weiteren Kerngebieten während des mechanischen Herauslösen des ARC aus dem Gehirngewebe (*Kap. MM 2.4.2*) soweit geschädigt wurden, dass ein Teil der Neurone in der Zellkultur abstarb und nicht in der Genexpressionsanalyse erfasst werden konnte. Zudem wurde in der neuroglialen ARC-Zellkultur immunzytochemisch ausschließlich eine Kolo-kalisation von P2X₄R mit ED1-immunoreaktiven Mikrogliazellen detektiert. Wie bereits erwähnt, exprimieren v.a. aktivierte Mikroglia diesen Rezeptorsubtyp, was zur höheren

mRNA-Expression von P2X₄ in der neuroglialen ARC-Zellkultur beitragen würde (Crain et al., 2009; Tsuda et al., 2003). Eine Kombination beider Erklärungsansätze ist anzunehmen.

Die mRNA-Expressionsprofile für sowohl den P2X₂- als auch den P2X₃-Rezeptorsubtyp erwiesen sich in der ARC-Primärkultur als auf vergleichbarem Niveau liegend. Im ZNS werden diese Subtypen in der *Medulla oblongata* (NTS) und im Dorsalhorn des Rückenmarks exprimiert, sodass es dort zur Bildung neuronaler, heterotrimerer P2X_{2/3}R kommen kann (Chen et al., 1995; Garcia-Guzman et al., 1997; Lewis et al., 1995). Im Hypothalamus wurde das Vorkommen beider Rezeptorsubtypen bis *dato* v.a. in Neuronen des PVN bzw. SON, sowie in neurohypophysären Axonterminalen vasopressinerner PVN-Neurone (Cham et al., 2006; Knott et al., 2005; Yao et al., 2003) beschrieben. Untersuchungen an Zellkulturen des embryonalen Neuralrohrs zeigten, dass ATP *via* P2X₃R das Neuritenwachstum hemmen kann (Cheung et al., 2005).

Eine mögliche Veränderung des Expressionsprofils purinerner Rezeptoren von Zellen neuroglialer Zellkulturen unter *in vitro* Bedingungen im Vergleich zur *in situ* Situation greifen Sperlágh und Kollegen (2006) bzw. Fischer und Mitarbeiter (2009) auf. Eine vergleichende, systematische Genexpressionsanalyse unter Verwendung der qRT-PCR an murinen Mikrogliazellen lieferte erste Hinweise dafür, dass sich das mRNA-Expressionsprofil purinerner Rezeptoren etwa *in vitro* kultivierter Mikrogliazellen neonataler Mäuse von frisch isolierten Mikrogliazellen unterscheidet (Crain et al., 2009). So wurde eine signifikant höhere Expression der mRNA des Purinozeptorsubtyp P2X₁R in Mikroglia während der postnatalen Entwicklung zwischen dem dritten Tag bis zum zwölften Monat im Vergleich mit der Mikroglia-Primärkultur ermittelt. Zusätzlich stieg der mRNA-Gehalt für P2X₄R in der mikroglialen Primärkultur verglichen mit den frisch isolierten Zellen signifikant an. Angesichts der Tatsache, dass in dieser Studie die primären Mikrogliazellen zehn Tage in einer neuroglialen Mischkultur sowie weitere zwei Tage isoliert, ohne mögliche Interaktion mit weiteren Zelltypen (Neurone, Astrozyten), kultiviert wurden, ist umstritten, in wie weit dies den physiologischen Bedingungen ähnelt. Außerdem wurde postuliert, dass Mikrogliazellen jegliche Manipulation, wie eine Isolierung aus dem Gehirn, der Herstellung von Gehirnschnitten oder gar eine Kultivierung in einer primären Mischkultur, als pathologische Veränderung wahrnehmen und aus einem ruhenden Stadium in einen Aktivierungszustand transformieren (Färber & Kettmann, 2006). Diesbezüglich ist es wahrscheinlich, dass im Vergleich des *in situ* und des *in vitro* Zustandes eine Änderung der Expressionsmuster u.a. der purinergen Rezeptoren ermittelt werden kann. Es wurde angemerkt, dass es weiterer Untersuchungen auf mRNA- sowie Protein-

ebene an Einzelzellen *in situ*, sowie an intakten Gehirnschnitten und Zellkulturen bedarf, um diese Daten auf Translations- und Translokationsebene auch für Neurone oder andere Gliazelltypen zu verifizieren (Crain et al., 2009; Sperlágh et al., 2006). Dass dieser Einwand nicht unbegründet ist, verdeutlicht eine Gegenüberstellung der Expressionsmusters für bis zu 5.000 Gene der Leber *in situ* mit demjenigen primärer Hepatozytenzellkulturen (Boess et al., 2003; Pan et al., 2009; Perkins et al., 2006). Eine zeitabhängige Änderung des Expressionscharakters bei diesen Primärzellkulturen wurde auf das Entfernen der dreidimensionalen Zytoarchitektur bzw. der extrazellulären Matrix im Gewebeverband, das Fehlen endogener Faktoren wie Hormonen bzw. Wachstumsfaktoren, und das Ausbleiben von zirkadianen Rhythmen zurückgeführt, und erschwert die Übertragung in Zellkultur gewonnener Resultate auf den *in situ* Zustand im Organismus. Erschwerend für eine explizite pharmakologische Klassifikation purinerger Rezeptoren ist/war außerdem die Vielzahl an beschriebenen unspezifischen und mehr oder weniger spezifischen Agonisten bzw. Antagonisten für Purinozeptoren. Aufgrund der zum Teil unterschiedlichen und Zelltyp-spezifischen Reaktionen auf die Superfusionen der verwendeten Purinozeptoragonisten und -antagonisten in der vorliegenden Arbeit, wird die P2X-Rezeptorexpression in Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen im Folgenden getrennt diskutiert.

4.2.3. Funktionelle Purinozeptorexpression in Neuronen

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe von Fura-2 Ratio-Imaging Untersuchungen Hinweise auf die funktionelle Expression spezifischer Purinozeptoren in Neuronen des ARC gewonnen werden. So bewirkte eine Superfusion mit den Agonisten ATP resp. 2-MeSATP bei 6 - 22 % (je nach Versuchsansatz) der Neurone der ARC-Primärkultur in der vorliegenden Arbeit einen raschen und transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, welcher nahezu vollständig auf den Einstrom von extrazellulärem Kalzium zurückzuführen war. Im Rahmen einer kalziumabhängigen, intrazellulären Signaltransduktion in Neuronen erwies sich in der direkten Gegenüberstellung beider Purinozeptoragonisten der gegen enzymatische Hydrolyse stabilere Agonist 2-MeSATP als deutlich potenter, vermutlich zurückzuführen auf die mehrfach beschriebene, schnelle Hydrolyse des ATP durch verschiedene Ektonukleotidasen (*Kap. EIN 1.4.5*) (Chessell et al., 1997; Gomez-Villafuertes et al., 2000; Hibell et al., 2000; Rassendren et al. 1997; Zimmermann, 2006).

Gegen eine dominante, funktionelle Expression der Purinozeptorsubtypen P2X₁R und P2X₃R in Neuronen der ARC-Primärkultur spricht deren vollkommen fehlende Reaktivität auf eine Superfusion sowohl mit α,β -meATP als auch BzATP selbst in der höchsten Kon-

zentration von 1 μM . Rekombinant exprimierte P2X₁- und P2X₃-Purinozeptoren lassen sich in zahlreichen Veröffentlichungen bereits durch geringe Konzentrationen an α,β -me-ATP aktivieren (EC₅₀-Wert: 0,3 μM resp. 0,8 μM) (Burgard et al., 1999; Coddou et al., 2011b ; Gever et al., 2006; Jarvis & Khakh, 2009; Valera et al., 1994), und BzATP bindet mit sehr hoher Affinität an den P2X₁R (EC₅₀-Wert: 3 nM) sowie mit niedrigerer Affinität auch an den P2X₇R (EC₅₀-Wert: 5 - 50 μM) (Bianchi et al., 1999; Hibell et al., 2000; Jarvis & Khakh, 2009). Im Vergleich der EC₅₀-Werte für den P2X₁R zeigte BzATP eine deutlich höhere Wirksamkeit als α,β -meATP (Bianchi et al., 1999; Jarvis & Khakh, 2009). In diesem Zusammenhang demonstrierten pharmakologische Untersuchungen, dass der Purinozeptoragonist BzATP (EC₅₀-Wert: 5 - 50 μM) im Vergleich zu ATP (EC₅₀-Wert: 100 μM) um ein Vielfaches potenter am P2X₇-Rezeptorsubtyp wirkt (Bianchi et al., 1999; Jarvis & Khakh, 2009; Surprenant et al., 1996). Im Rahmen der mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen antworteten auf die Superfusionsstimulation mit BzATP (1 μM) ein äußerst geringer Anteil sowohl an Neuronen (4,5 %) als auch Astrozyten (6,7 %) mit einem raschen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (*Kap. ERG 3.3.2*). Hinsichtlich der Hemmung des purinerg induzierten Kalziumsignals konnte in den Fura-2 Ratio-Imaging Versuchen an der ARC-Primärkultur unter Verwendung des generellen P2-Antagonisten Suramin (*siehe unten*) die Kalziumantworten moduliert werden, wohingegen der P2X₇R insensitiv gegenüber Suramin ist (North, 2002; Surprenant, 1996). In diesem Zusammenhang ist zu vermuten, dass der P2X₇-Rezeptorsubtyp nicht dominant in den repetitiv responsiven Neuronen exprimiert war. Zudem wurde das Vorkommen dieses Rezeptorsubtyps im ZNS ebenso in Mikrogliazellen (teils vorrangig), Astrozyten oder Oligodendrozyten beschrieben (Burnstock, 2007; Coddou et al., 2011a; Lecca et al., 2012).

Im Hinblick auf eine hypothalamische P2X₅R-Expression deuten die Befunde aus molekularbiologischen, immunhistochemischen und pharmakologischen Untersuchungen auf eine Expression in vasopressinergen bzw. nitrogenen, magnozellularen Neurone des PVN sowie SON des Rattengehirns, bzw. Nervenzellen des VMH, SON und ARC sowie des LH im Mäusegehirn hin (Burnstock & Knight, 2004; Guo et al., 2008; Xiang et al., 2006). Die quantitative Bestimmung Purinozeptorsubtyp-spezifischer mRNAs in der vorliegenden Arbeit konnte weder für den ARC oder MnPO adulter bzw. neonataler Ratten, noch für die ARC- bzw. MnPO-Primärkultur eine signifikante Expression des P2X₅R feststellen. An coronalen Gehirnschnitten durchgeführte *in situ* Hybridisierungsstudien drei Wochen alter Ratten unterstützen die qRT-PCR Resultate der vorliegenden Arbeit (Collo et al., 1996). Elektrophysiologische Untersuchungen an rP2X₅R-transfizierten HEK-Zellen

konnten zudem nachweisen, dass die ATP-induzierte Stromstärke in diesem Fall deutlich niedriger ausfiel als an HEK-Zellen, welche mit rP2X₂R resp. rP2X₄R (bei vergleichbarer Rezeptorkinetik) transfiziert worden waren (Garcia-Guzman et al., 1996; North, 2002). Eine Beteiligung des P2X₅-Purinozeptorsubtyps an den durch ATP bzw. 2-MeSATP induzierten Kalziumsignalen in Neuronen der ARC-Primärkultur kann somit nahezu ausgeschlossen werden.

Elektrophysiologische Experimente sowie kompetitive Verdrängungsstudien mit dem Radioliganden [³⁵S]dATPγS an P2X₄R-transfizierten Zelllinien demonstrierten, dass ATP, ATPγS und 2-MeSATP die effektivsten Agonisten dieses Purinozeptorsubtyps mit EC₅₀-Werten von 1 - 10 μM darstellen (Bianchi et al., 1999; Buell et al., 1996; He et al., 2003; Michel et al., 1997). Im Gegensatz z.B. zum pharmakologischen Profil des P2X₂R erweist sich dieser Subtyp der Ratte jedoch gegenüber den Antagonisten Suramin und PPADS als insensitiv (IC₅₀-Wert: > 500 μM), wohingegen die entsprechenden Orthologa von Maus und Mensch durch PPADS inhibiert werden konnten (Coddou et al., 2011b; Garcia-Guzman et al., 1997; Jones et al., 2000). Die in den mikrospektrofluorimetrischen Versuchen der vorliegenden Arbeit erfolgreich eingesetzten Antagonisten PPADS und Suramin vermochten es, die durch den Agonist induzierten Kalziumsignale in ARC-Neuronen selbst in einer 50-fach niedrigeren Konzentration vollständig zu unterdrücken. Immunzytochemisch konnte zudem für kein einziges Neuron das Vorkommen dieses Purinozeptorsubtyps bestätigt werden; eine neuronale Expression des P2X₄-Rezeptors in der ARC-Primärkultur - mit Hinblick auf die Generierung intrazellulärer Kalziumsignale - kann somit nahezu ausgeschlossen werden.

Sowohl der homotrimere P2X₂- als auch der heterotrimere P2X_{2/3}-Purinozeptorsubtyp repräsentieren somit potentielle Kandidaten für deren funktionelle Expression in den Neuronen der ARC-Primärkultur. Durch Studien bezüglich der P2X₂-Rezeptorsubtyp-spezifischen Kinetik in rekombinanten Expressionssystemen wurde demonstriert, dass ATP resp. 2-MeSATP die potentesten agonistischen Purinozeptorliganden mit einem EC₅₀-Wert von 1 - 8 μM für den P2X₂R darstellten (Coddou et al., 2011b; Evans et al., 1995; Zemkova et al., 2004). Im Gegensatz dazu repräsentierten BzATP (EC₅₀: 6 - 30 μM), α,β-meATP oder ADP (EC₅₀: 100 - 300 μM) offensichtlich nur Teilagonisten dieses Rezeptorsubtyps (Bianchi et al., 1999; Brake et al., 1994; Coddou et al., 2011b; Evans et al., 1995; Lynch et al., 1999). Der Purinozeptorantagonist TNP-ATP repräsentiert einen Modulator, der neben einigen Vertreter der P2Y-Rezeptorfamilie auch die Purinozeptoren P2X₁R, P2X₃R, oder P2X_{2/3}R (IC₅₀-Wert: 1 - 10 nM) äußerst effektiv zu inhibieren vermag, wohingegen sich die Affinität dieses Antagonisten zu P2X₂R, P2X₄R und P2X₇R

um mehr als das 1000-fache geringer erwies (Virginio et al., 1998). Das Anthrachinon Reactive blue-2 weist u.a. auch eine ausgeprägte Reaktivität für den P2X₂-, nicht jedoch den heterotrimeren P2X_{2/3}-Purinozeptor auf, wie wiederum an in *Xenopus*-Oozyten koexprimierten, rattenspezifischen P2X₂R und P2X₃R getestet (Liu et al., 2001). Es sollte daher geeignet sein, zwischen beiden Systemen zu differenzieren. Die inhibitorische Wirkung von Rb-2 in einer Konzentration von bis zu 100 µM auf P2X₂R-exprimierende Oozyten bzw. PC12-Zellen wurde bereits zuvor mehrfach elektrophysiologisch demonstriert (Brake et al., 1994; Inoue et al., 1991; King et al., 1997). Dabei liegen teilweise kontroverse Hinweise dafür vor, dass Anthrachinone wie Rb-2 (*cibacron blue F3GA*) oder *cibacron blue FN-R*, auch eine negative bis toxische Wirkung auf Zellen entfalten könnten (Birhanli & Ozmen, 2005; Hulak et al., 1991; Santambien et al., 1995). Obwohl in der vorliegenden Arbeit Rb-2 in einer Konzentration von lediglich 1 - 10 µM eingesetzt wurde, konnte nach experimenteller Superfusion mit Rb-2 in einer höheren Konzentration (100 µM; Daten nicht gezeigt) demonstriert werden, dass das Fluoreszenz Ratio-Signal einer Mehrzahl der zu analysierenden Zellen einen ausgeprägten, kontinuierlichen Anstieg der Basislinie aufwies sowie die Zellen sich vermehrt vom Untergrund ablösten. Vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen an rekombinanten Oozyten verdeutlichten, dass Rb-2 mit einem IC₅₀-Wert von 0,4 µM die ATP-vermittelten Ströme über den P2X₂R effektiver zu inhibieren vermochte als TNP-ATP (IC₅₀-Wert: 1,1 µM) oder PPADS (IC₅₀-Wert: 1,6 µM) (Liu et al., 2001). Die Ineffektivität von TNP-ATP in einer Konzentration von 10⁻⁷ M, die durch den Agonisten induzierten Kalziumsignale in Neuronen der ARC-Primärkultur zu inhibieren, bei gleichzeitig zumindest angedeuteter Potenz in einer Konzentration von 10⁻⁵ M, könnte dahingehend interpretiert werden, dass vorrangig der P2X₂R und nicht der heterotrimer P2X_{2/3}R in Neuronen des ARC exprimiert war. In letzterem Fall hätte man außerdem davon ausgehen können, mit einem für den rattenspezifischen P2X₃R spezifischen Antiserum / Antikörper sowohl im Gewebeschnitt als auch der ARC-Primärkultur ein immunpositives Signal zu erhalten (Hitzel, 2009).

Aufgrund der bis *dato* limitierten Verfügbarkeit subtypspezifischer Antagonisten entwickelten Baqi und Kollegen (2011) mehrere offensichtlich hochpotente, P2X₂R-selektive Antagonisten. So vermochte das in der vorliegenden Arbeit verwendete Anthrachinonderivat PSB 1011 als P2X₂R-selektiver Antagonist im nanomolaren Bereich (IC₅₀-Wert: 79 nM) den durch ATP induzierten Ionenstrom durch in *Xenopus*-Oozyten exprimierte, rattenspezifische rP2X₂R zu hemmen (Baqi et al., 2011). Wie auch in den Untersuchungen zur modulierenden Wirkung von Rb-2 auf das 2-MeSATP-induzierte Ca²⁺-Signal, erwies sich die Anzahl der auf die Superfusion mit 2-MeSATP responsiven Neurone

leider als zu gering, um eine eindeutig inhibitorische Wirkung beider, mehr (PSB1011) oder weniger (Rb-2) spezifischer P2X₂R-Antagonisten verifizieren zu können (Kap. ERG 3.3.7 / 3.3.8).

Der direkte Vergleich der inhibitorischen Wirkung der Antagonisten PPADS und Suramin in der vorliegenden Arbeit verdeutlichte, dass PPADS in der niedrigsten Konzentration (1 µM) potenter den 2-MeSATP-induzierten Anstieg der [Ca²⁺]_iz bei Neuronen des ARC zu unterdrücken vermochte als Suramin (Kap. ERG.3.3.7). Diese Befunde werden ebenfalls durch pharmakologische und elektrophysiologische Studien an rekombinanten Modellen unterstützt (Brake et al., 1994; Coddou et al., 2011b; Evans et al., 1994; 1995; Liu et al., 2001; Lynch et al., 1999). Eine ansteigende Antagonistenkonzentration von PPADS, Suramin resp. TNP-ATP bei gleichbleibender Agonistenkonzentration von 2-MeSATP bewirkte sowohl einen Anstieg des prozentualen Anteils der vollständig inhibierten Neurone, als auch eine verstärkte Abnahme der durchschnittlichen 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte (Kap. ERG 3.3.7). Dies sind weitere Hinweise für die dominante Expression des purinergen Rezeptorsubtyps P2X₂ in den Neuronen der ARC-Primärkultur. Neben der nahezu vollständigen Inhibition der P2X₂R in rekombinanten Zellen unter Verwendung der genannten Antagonisten, konnten gleichermaßen neuronale P2X-Rezeptoren in kultivierten resp. frisch dissoziierten hypothalamischen Neuronen des ARC und SON, oder in orexigenen Neuronen in Gehirnschnitten auf der Ebene des LH blockiert werden (Chen et al., 1993; King et al., 1999; Shibuya et al., 1999; Sorimachi et al., 2001; Wakamori & Sorimachi, 2004; Wolf et al., 2011; Wollman et al., 2005). Auch diese Autoren gingen davon aus, dass die entsprechenden Neurone den P2X₂R-Purinozeptorsubtyp funktionell exprimieren.

Ein weiteres, wichtiges Kriterium für das mögliche, primäre Vorliegen des P2X₂-Purinozeptorsubtyps liegt in dessen reduzierten Desensibilisierungsverhalten - im Vergleich zu anderen P2X-Rezeptorsubtypen - begründet (Burnstock, 2007a, North, 2002). So lieferte die repetitive Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP in jeweils äquimolarer Konzentration Anhaltspunkte für die möglicherweise vorherrschende Expression des P2X₂R-Subtyps in Neuronen der ARC-Primärzellkultur. Dabei wurden nahezu 50 % aller analysierten und 2-MeSATP-responsiven ARC-Neurone mit nur geringen Desensibilisierungseffekten in die sogenannte LDD-Gruppe eingeordnet, und nur diese Neurone wurden einer detaillierten Charakterisierung hinsichtlich ihrer P2XR-Subtypexpression unterzogen. Die zweite Hälfte aller 2-MeSATP-responsiven ARC-Neurone zeigte demnach starke Desensibilisierungsphänomene (HDD-Gruppe), sowohl schon während der ersten Superfusionsstimulation als auch hinsichtlich der Wiederholbarkeit einer Induktion des Kalzium-

signals (signifikantes Dekrement des 2-MeSATP-induzierbaren Kalziumsignals) (Kap. ERG 3.3.4). Bei bekanntermaßen langsamer Desensibilisierung des P2X₂R ermöglicht das Vorkommen mehrerer Spleißvarianten dieses Purinozeptorsubtyps zusätzliche Auswirkungen auf den Grad der Desensibilisierung (Brändle et al., 1997; Coddou et al., 2011; Koshimizu et al., 1998; Stojilkovic et al., 2000). Elektrophysiologische Untersuchungen (*whole-cell patch clamp* oder *outside-out patch*) an rekombinanten HEK-293 und GT1-Zellen demonstrierten, dass beide P2X₂R-Spleißvarianten (P2X_{2a}R, P2X_{2b}R) (Kap. EIN 1.4.2) zwar eine rasche Erhöhung des [Ca²⁺]_iz während der Aktivierungsphase zeigten, jedoch eine Rezeptorspezifische Abstufung der Desensibilisierung aufwiesen. So desensibilisierte bei ständiger Präsenz von ATP die lange P2X_{2a}R-Isoform innerhalb von 200 s resp. die kürzere P2X_{2b}R-Isoform innerhalb von 60 s (Khadra et al., 2012). Dies erschwert zusätzlich die genauere Charakterisierung des P2X₂-Rezeptorsubtyps *in situ* bzw. im Rahmen von *in vivo* Untersuchungen (Coddou et al., 2011; North, 2002).

Die geringe Desensibilisierungsrate der Agonist-stimulierten ARC-Neurone in der vorliegenden Arbeit während der Superfusionsstimulation, die Wiederholbarkeit der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der [Ca²⁺]_iz in Intervallen von nur acht min sowie das Ausbleiben einer Blockade des Ca²⁺-Signals durch TNP-ATP in niedriger Konzentration (10⁻⁷ M) deuten auf eine funktionelle Expression von homotrimeren P2X₂-Rezeptoren in der repetitiv responsiven Gruppe (LDD) hin. Das deutliche Desensibilisierungsverhalten mit einem raschen Anstieg der 340 / 380 nm Fluoreszenz Δ Ratio-Werte auf eine Superfusion mit 2-MeSATP sowie das Absinken des Ca²⁺-Signals noch vor Beendigung des Stimulus sind charakteristisch für P2X₁R und P2X₃R in DRG bzw. rekombinanten Zelllinien (Bianchi et al., 1999; Burgard et al., 1999; Valera et al., 1994). So ist es nicht auszuschließen, dass Neurone der HDD-Gruppe diese Rezeptorsubtypen funktionell exprimierten. Der niedrigere Desensibilisierungsgrad des P2X₂R, im Vergleich zu P2X₁R oder P2X₃R, verläuft je nach Konfiguration des Rezeptors zwischen 1 - 110 s (Coddou et al., 2011; North, 2002). Für den P2X₁R wie auch den P2X₃R sind ein hohes Maß an Desensibilisierung im Hinblick auf die Abnahme der ATP-induzierten Antwort während der kontinuierlichen Ligandenpräsenz, innerhalb von wenigen Hundert Millisekunden (0,1 - 10 s), sowie eine etwa 15-minütige Regenerationsdauer von der Desensibilisierung charakteristisch (Coddou et al., 2011a; Cook & McCleskey, 1997; Dutton et al., 2000; Surprenant, 1996). So ist das Ausmaß der Desensibilisierung des P2X₃R abhängig von der Ligandenkonzentration und beträgt bei einer ATP-Konzentration von 30 μ M weniger als 100 ms (Lewis et al., 1995; North, 2002). Außerdem wiesen Experimente mit *green fluorescent protein* (GFP)-markierten P2X₁R bzw. Biotinylierung der in der Zellmembran

lokalisierten Rezeptoren im anschließend durchgeführten Western-blot auf eine Translokation des Rezeptors ins Zytosol (= Internalisation) nach Agonistenaktivierung hin (Dutton et al., 2000; Ennion & Evans, 2001). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass eine hochaffine Agonistenbindung in einem lang anhaltenden, geschlossen und nicht-aktivierbaren Zustand des P2X₁-Ionenkanals resultiert (Coddou et al., 2011b; Rettinger & Schmalzing, 2003).

Eine heterotrimere Konfiguration des Rezeptorsubtyps P2X₂ mit P2X₁R resp. P2X₃R in der vorliegenden Arbeit scheint ebenso unwahrscheinlich. Immunpräzitationsexperimente an rekombinanten Zelllinien oder Untersuchungen mit der nativen Gelelektrophorese (*blue native PAGE*), zur Erhaltung der Proteinfaltung, bei transfizierten Oozyten wiesen zwar die Bildung von heterotrimeren P2X_{1/2}R nach, jedoch unterschieden sich deren pharmakologische Eigenschaften bis *dato* nur in *punkto* der pH-Sensitivität zu homotrimeren P2X₁R (Aschrafi et al., 2004; Brown et al., 2002). Heterotrimere P2X_{2/3}R teilen pharmakologische Eigenschaften vorrangig mit dem P2X₃R, einschließlich der Sensitivität zu verschiedenen Purinozeptoragonisten. Die Sensitivität zu α,β -meATP erleichtert die Identifikation dieses Heterotrimers gegenüber dem P2X₂R hinsichtlich einer ausbleibenden Aktivierung von lediglich P2X₂R bei niedrigen α,β -meATP-Konzentrationen. P2X_{2/3}-Purinozeptoren sind wie P2X₂R, und im Gegensatz zum P2X₃R, durch eine relativ langsame Desensibilisierung charakterisiert (Coddou et al., 2011b; Koshimizu et al., 2002; Spelta et al., 2002).

Die quantitativ vergleichende Analyse der Kalziumsignale nach wiederholter, äquimolarer Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10^{-6} M) bei Raumtemperatur (25°C) bzw. simulierter Körperkerntemperatur (36°C) zeigte deren positiven Effekt auf die Verminderung der Desensibilisierungsphänomene bzw. den Nachweis einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ohne Dekrement nach repetitiver Stimulation bei Neuronen und Astrozyten (*Kap. ERG 3.3.6*). Ein Angleichen der Temperatur auf physiologisches Niveau könnte den Zellmetabolismus und somit die Regenerationsfähigkeit der Zellen auf die Stimulation erhöhen bzw. die Desensibilisierungsdauer der entsprechenden Purinozeptoren senken. Diese Annahme wird dahingehend unterstützt, dass eine Absenkung der Kammertemperatur auf 25°C während der Regenerationsphase sowie der nachfolgenden Superfusionsstimulation sowohl zu einem Absinken der Anzahl an repetitiv responsiven Neuronen als auch deren Signalamplitude führte.

Der immunhisto- bzw. -zytochemische Nachweis verschiedener P2X-Rezeptorsubtypen auf Proteinebene erfolgte unter Verwendung polyklonaler, P2XR-subtypspezifischer Antisera. Während die Purinozeptorsubtypen P2X_{1,3,5,7} in der neuroglialen ARC-Primärkul-

tur nicht nachweisbar waren, ließ sich der Purinozeptorsubtyp P2X₂ eindeutig in ca. 39 % der identifizierten ARC-Neurone detektieren. Im coronalen Gehirnschnitt der adulten Ratte zeigte sich die zelluläre Markierung für P2X₂R vorwiegend im medialen oder medial-posterioren Bereich des ARC überwiegend in unmittelbarer Nähe zur ependymalen Auskleidung des dritten Gehirnvtrikels lokalisiert. Die Expression des P2X₂R konnte für den ARC von anderen Arbeitsgruppen immunhistochemisch bestätigt werden (Coll-dén et al., 2010; Kanjhan et al., 1999). Darüber hinaus wurde der P2X₂R immunhistochemisch, auf mRNA-Ebene oder auf Grund elektrophysiologischer und mikrospektrofluorimetrischer Experimente auch in hypothalamischen Neuronen des DMH, des LH, des VMH, sowie in neurohypophysären Axonen des PVN resp. SON nachgewiesen (Florenzano et al., 2006; Loesch et al., 1999; Matsumoto et al., 2004; Sorimachi et al., 2001; Troadec et al., 1998; Wakamori & Sorimachi, 2004; Wollman et al., 2005), in zelltypspezifischer Ausprägung (Colle et al., 1996; Sperlágh et al., 2007). Auf hypothalamischer Ebene wurde unter Verwendung von Genexpressionsanalysen und elektrophysiologischen Untersuchungen demonstriert, dass P2X₂-Rezeptoren an der ATP-induzierten Erhöhung der [Ca²⁺]_i und der Freisetzung von ADH aus neurohypophysären Synapsen beteiligt ist (Knott et al., 2005; Troadec et al., 1998; Stojilkovic et al., 2010). Zusätzlich wird angenommen, dass ATP durch die Aktivierung von postsynaptischen Rezeptoren auf den Perikaryen oder Dendriten von Neuronen des SON modulierend auf die ADH-Sekretion wirkt (Song & Sladek, 2006; Stojilkovic et al., 2010). Elektrophysiologische Experimente an frisch dissoziierten Neuronen des ARC postnataler Ratten (P15 -20) bestätigten, dass bis zu diesem Zeitpunkt unidentifizierte Nervenzellen des ARC funktionell P2X₂R homo- / heterotrimer exprimieren. Unter anderem zeigten diese Versuche, dass multipolare Neurone auf α,β -meATP insensitiv und die P2X-vermittelten Änderungen der Stromstärke durch PPADS antagonisierbar waren (Wakamori & Sorimachi, 2004). Immunhistologische Untersuchungen von Colldén und Kollegen (2010) in Gehirnschnitten der Ratte demonstrierten die Kolokalisation von P2X₂R mit verschiedenen, Nahrungsaufnahme-assoziierten Neurotransmittern. Hierbei war hauptsächlich der P2X₂R mit den orexigenen NPY- resp. AGRP- und nur in geringen Anteilen mit anorexigenen α -MSH- oder CART-Neuronen des ventromedialen ARC kolokalisiert.

Erste Hinweise darauf, dass hypothalamisches ATP eine physiologische Rolle bei der Nahrungsaufnahme spielen könnte, wurden in einer *in vivo* Untersuchung von Kittner und Mitarbeitern (2006) an Ratten durch icv-Applikation von ATP respektive ATP-Analoga und / oder Purinozeptorantagonisten geliefert. Die Autoren postulierten, dass der metabotrope Purinozeptorsubtyp P2Y₁R die gesteigerte Futteraufnahme vermittelte

(Kittner et al., 2006). Eine Vorbehandlung mit dem unspezifischen Purinozeptorantagonisten PPADS bzw. einem P2Y₁R-Antagonisten unterdrückten diese Wirkungen (Kittner et al., 2003; 2006). Allerdings wurde die Beteiligung von ionotropen P2X-Rezeptoren an der Steuerung der Nahrungsaufnahme allein durch die Tatsache ausgeschlossen, dass eine Applikation von α,β -meATP (spezifischer P2X₁R- und P2X₃R-Agonist) keine erhöhte Futteraufnahme induzierte. Diese Interpretation der Resultate erscheint angesichts der Annahme, dass funktionelle P2X-Rezeptoren wie P2X₂R in den genannten hypothalamischen Kerngebieten exprimiert werden, zweifelhaft. Auf mRNA- und Proteinebene wurden zudem eine erhöhte Expression des metabotropen P2Y₁R in Neuronen aber auch Astrozyten der Energiehomöostase-involvierten, hypothalamischen Kerngebieten ARC, DMH, VMH und LH Futter-limitierter Ratten detektiert (Seidel et al., 2006). Hierbei wurde immunhistochemisch ebenfalls eine partielle Kolokalisation von P2Y₁R mit der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) ermittelt und es wurde u.a. vermutet, dass die extrazelluläre purinerge Signaltransduktion zum Teil über die NO-Bildung eine Rolle in der hypothalamischen Regulation der Nahrungsaufnahme spielen könnte (Seidel et al., 2006). So kann die mögliche Beteiligung von metabotropen P2YR an der hypothalamischen Kontrolle der Energiehomöostase durch diese Experimente nicht ausgeschlossen werden. Anzeichen dafür, dass eine vermeintlich funktionelle Interaktion zwischen dem purinergen und nitrergen System im Gehirn besteht, wurde 2003 durch immunhistochemische Untersuchung hinsichtlich einer Kolokalisation der nNOS mit dem purinergen P2X₂R sowohl im magnozellularen und parvozellulären PVN, sowie SON, als auch im NTS aufgezeigt (Yao et al., 2003). Es wurde postuliert, dass auf hypothalamischer Ebene eventuell NO die ATP-induzierte Aktivierung der P2X-Rezeptoren in der Regulation der Hormonsekretion von ADH oder der Körpertemperatur, einschließlich des LPS-induzierten Fiebers, vermittelt (Gerstberger, 1999; Gourine, 1995; Gourine et al., 2002; Steiner et al., 2002; Yao et al., 2003).

Eine Expression metabotroper, purinerge Rezeptoren wie Adenosin- oder P2Y-Rezeptoren in Nervenzellen der neuroglialen ARC-Zellkultur konnte im Rahmen der in vorliegenden Arbeit durch das vollständige Ausbleiben des Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ nach Depletion des Kalziums im extrazellulären Medium nahezu ausgeschlossen werden. Im Rahmen der näheren Charakterisierung der neuronalen Zellen der ARC-Primärkultur, welche auf eine singuläre Superfuionsstimulation (2-MeSATP; 10^{-6} M) mit einem eindeutigen überschwelligem Kalziumsignal reagierten, konnte post-experimentell keine Immunfluoreszenzmarkierung des purinergen P2X₂-Rezeptors in der ARC-Primärkultur ermittelt werden (*Kap. ERG 3.4.3*). Hinsichtlich der post-experimentellen immunzytochemischen

Charakterisierung ARC-typischer Neurotransmittersysteme, wie ACTH, NPY, NT1 oder TH (Transmitter *coding*) nach singulärer 2-MeSATP-Superfusion war der immunzytochemische Nachweis nur eingeschränkt möglich. In diesem Zusammenhang fiel die subjektiv ermittelte Immunfluoreszenzmarkierung für das Transmitter *coding* in den zuvor mikrospektrofluorimetrisch analysierten Arealen der ARC-Primärkultur niedriger aus als in solchen Bereichen eines "wells". Es ist anzunehmen, dass eine, wenn auch nur kurzfristige, Bestrahlung mit ultravioletten Licht die untersuchten Zellen bzw. die nachzuweisenden Antigene soweit beeinflusste, dass deren Nachweis eingeschränkt wurde. Erhärtet wird diese Annahme dadurch, dass die Markierungen der Antigene in den umliegenden Bereichen, die nicht direkt dem UV-Licht ausgesetzt wurden, immunoreaktiv waren.

4.2.4. Funktionelle Purinozeptorexpression in Astrozyten

In der vorliegenden Arbeit konnte die funktionelle Expression purinerner Rezeptoren in Astrozyten der neuroglialen ARC-Primärkultur demonstriert werden, wenngleich sich die immunzytochemische Untersuchung mittels subtypspezifischer Antikörper zur Charakterisierung ionotroper P2X-Rezeptorsubtypen für astroglial exprimierte P2X-Purinozeptoren als negativ erwies. Einerseits muss das negative Resultat der Immunhisto- resp. -zytochemie nicht zwangsläufig die Inexistenz dieser Rezeptoren bedeuten (Harlow & Lane, 1988; Hitzel, 2009), andererseits weist ein positives Ergebnis lediglich auf die zelluläre Lokalisation des entsprechenden Antigens und nicht notwendigerweise das Vorkommen funktioneller Rezeptorproteine hin (Fischer et al., 2009). Immunhistochemisch konnte im *Nucleus accumbens* (NAc) adulter Ratten ausschließlich die P2X-Rezeptorsubtypen P2X₂₋₄ in Kolokalisation mit dem Astrozytenmarker GFAP nachgewiesen werden, wobei auf Transkriptionsebene in dieser neuroglialen Struktur alle sieben Purinozeptorsubtypen detektiert werden konnten (Franke et al., 2001; Verkhasky et al., 2009). *In situ* wurde für astrogliale Zellen eine Immunreaktivität im *Cerebellum* für P2X₁R resp. P2X₂R, im Hirnstamm für den P2X₄R sowie im Rückenmark wiederum für den P2X₂R beschrieben (Ashour & Deuchars, 2004; Kanjhan et al., 1996; 1999; Loesch & Burnstock, 1998; Verkhasky et al., 2009). Zusätzlich weisen hippocampale Astrozyten juveniler Ratten alle Rezeptorsubtypen, mit Ausnahme von P2X₅R, auf (Kukley et al., 2001). Eine Vielzahl der Erkenntnisse über Purinozeptoren in Astrozyten stammt aus Studien an primären Zellkulturen oder Zelllinien (James & Butt, 2002; Hung & Sun; Panenka et al., 2001; Sun et al., 1999). Pharmakologische und immunzytochemische Untersuchungen belegen die Expression sowohl von P2X₄₋₇R, als auch von verschiedenen

metabo-tropen P2Y-Purinozeptoren (P2Y_{1,2,6,14}R) etwa in der cortikalen Zellkultur embryonaler Ratten (Fischer et al., 2009; Nörenberg et al., 2010). Hingegen zeigen cortikale Astrozyten neonataler Ratten die funktionelle Expression aller P2X-Rezeptorsubtypen (außer P2X₆R) sowie mehrerer P2YR (Fumagalli et al., 2003). Die Klärung der physiologischen Bedeutung astroglialer P2-Rezeptoren rückt hierbei stärker in den Fokus der heutigen Forschung (Fischer et al., 2009). Erste Hinweise für eine physiologische Bedeutung astroglialer purinerner Rezeptoren im Hypothalamus lieferten Espallergues und Kollegen (2007) mittels mikrospektrofluorimetrischer Untersuchungen bezüglich der Noradrenalin-vermittelten Kontrolle der ADH-Sekretion an Gehirnschnitten auf Ebene des SON. Hierbei wurde postuliert, dass Astrozyten des SON *via* glialer P2Y₁R sowie α - und β -Adrenozeptoren eine potentielle Rolle in der neuroendokrinen Regulation des Wasserhaushaltes und der Änderung des Blutdrucks einnehmen (Espallergues et al., 2007).

Zur Beantwortung der Frage, ob in Gliazellen des ARC P2X-Rezeptoren exprimiert werden, haben in der vorliegenden Arbeit mikrospektrofluorimetrische Untersuchungen an der ARC-Primärkultur detaillierte Befunde für die funktionelle Expression von purinergen Rezeptoren in Astrozyten dieses Kerngebietes erbracht. Zum einen indizieren die erhaltenen Daten zumindest eine marginale Expression an P2X₂- und/oder P2X₄-Rezeptoren; zum anderen zeigten sich einige Unterschiede im Reaktionsverhalten zwischen Neuronen und Astrozyten, welche auf eine Koexpression metabotroper P2Y-Purinozeptoren hindeuten. In diesem Zusammenhang präsentierte Hitzel (2009) bereits vergleichbare Befunde für die Primärzellkultur des MnPO neonataler Ratten.

Im direkten Vergleich des Responsivitätsverhaltens auf generelle Purinozeptoragonisten (ATP, 2-MeSATP) zwischen Neuronen und Astrozyten stellten sich letztere als reaktiver Zelltyp dar. So zeigten – über alle Versuchsserien gemittelt - 67 % aller Astrozyten und 15 % aller Neurone ein überschwelliges intrazelluläres Kalziumsignal auf die jeweils primäre Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP (10⁻⁶ M) (*Kap. ERG 3.3*). Wie bereits in *Kap. DIS 4.2.3* für Neurone beschrieben, bewirkte eine Superfusion mit den Agonisten ATP resp. 2-MeSATP eine rasche und transiente Erhöhung der [Ca²⁺]_{iz}, welche nicht vollständig nur auf den Influx von extrazellulären Kalziumionen zurückzuführen war (*Kap. ERG 3.3.5*). Im Rahmen der Eruiierung ob diese Änderung durch Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Milieu und/oder durch eine getriggerte Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speicherorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zytoplasma hervorgerufen wurde, bewirkte die Aktivierung funktionell exprimierter Purinozeptoren bei nahezu $\frac{2}{3}$ aller responsiven ARC-Astrozyten somit neben dem Einstrom von

extrazellulärem Kalzium auch eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speicherorganellen (*siehe unten*).

Wie bereits in *Kap. DIS 4.2.3* für Neurone beschrieben, zeigten sich in den mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen die analysierten astroglialen Zellen, konform mit den Daten von Fischer und Kollegen (2009), gegenüber dem P2X_1 - und P2X_3 -spezifischen Agonisten α, β -meATP bis zur finalen Konzentration von 1 μM insensitiv. Zudem induzierte der P2X_1 -, P2X_3 - und der P2X_7 -spezifische Agonist BzATP (1 μM) bei einem sehr geringen Anteil der untersuchten Astrozyten einen transienten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$, wobei diese Zellen ebenfalls auf die darauffolgenden 2-MeSATP-Stimulationen mit einem Kalziumsignal antworteten. Unter Berücksichtigung der Desensibilisierungsprofile der ionotropen Purinozeptorsubtypen und der wiederholten Responsivität der Zellen, würden die Daten dieser wenigen responsiven Gliazellen auf die Expression des Rezeptorsubtyps P2X_7 deuten. So wiesen P2X_7 -transfizierte HEK293-Zellen während der ATP- resp. BzATP-Stimulationen keine Desensibilisierungsverhalten auf (North, 2002; Surprenant et al., 1996). Die niedrige Sensitivität des $\text{P2X}_7\text{R}$ auf 2-MeSATP (EC_{50} -Wert: 100 μM) deutet ebenfalls auf eine fehlende astrogliale Expression dieses Subtyps in der ARC-Primärkultur hin. Im Hinblick auf das Desensibilisierungsverhalten desensibilisieren die Rezeptorsubtypen P2X_1 und P2X_3 innerhalb weniger hundert Millisekunden und weisen eine Refraktärzeit von bis zu 15 min auf (Khakh et al., 2001; North, 2002). Diese ist deutlich länger als die Dauer der in dieser Arbeit gewählten Regenerationsintervalle von acht min zwischen den einzelnen Superfusionsstimulationen. In diesem Zusammenhang scheinen die Rezeptorsubtypen P2X_1 , P2X_3 und P2X_7 nicht dominant von repetitiv responsiven LDD-Astrozyten exprimiert zu werden. In diesem Fall kann eine Beteiligung und Expression von metabotropen P2YR , welche bereits in Astrozyten kortikaler Primärkulturen ($\text{P2Y}_{1,2,6}\text{R}$) charakterisiert und durch BzATP und/oder 2-MeSATP aktiviert werden, nicht vollständig ausgeschlossen werden (Chang et al., 1995; Fischer et al., 2009; Nörenberg et al., 2010; Vöhringer et al., 2006; von Kügelgen, 2006; Wildman et al., 2003).

Die sequentielle, äquimolare purinerge Superfusion führte bei etwa einem Drittel aller responsiven Astrozyten zu einem hohen Grad der Desensibilisierung (*Kap. ERG 3.3.4*). Die genauere pharmakologische Charakterisierung deren Purinozeptorsubtypen konnte jedoch durch das Fehlen der wiederholten Kalziumsignale auf die repetitiven Superfusionen mit 2-MeSATP nicht erfolgen. Hingegen zeigten etwa 68 % der responsiven Zellen einen reproduzierbaren Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ auf wiederholte Stimulationen mit beiden Agonisten (*Kap. ERG 3.3.4*). Diese Ergebnisse weisen auf langsamer desensibilisieren-

de Rezeptorsubtypen wie P2X_{2,4,5}R hin. Dabei stellte der zuletzt genannte P2X₅R in der Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene gleichermaßen im Bereich des hypothalamischen Kerngebietes des ARC adulter und neonataler Ratten als auch in der Primärkultur (Kap. ERG 3.1) den am niedrigsten exprimierten Purinozeptorsubtypen dar. Zudem waren die deutlichen Kalziumsignale auf einen 2-MeSATP-Stimulus in Astrozyten der ARC-Primärkultur nicht mit der für den P2X₅R elektrophysiologisch nachgewiesenen niedrigen Stromstärke an transfizierten HEK293-Zellen im Vergleich zu P2X₂R oder P2X₄R in Einklang zu bringen (Garcia-Guzman et al., 1996; North, 2002).

Der in Kap. DIS 4.2.3 beschriebene positive Einfluss der Simulation der physiologischen Körpertemperatur der Ratte auf das reproduzierbare Responsivitätsverhalten, auf die Verminderung der Desensibilisierungseffekte bezüglich der Höhe der Kalziumantwort und die Anzahl der responsiven Zellen, konnte ebenfalls bei astroglialen Zellen des ARC demonstriert werden (Kap. ERG 3.3.6). Erstreckte sich die Simulation der Körpertemperatur sogar über den gesamten Versuchsablauf der repetitiv sequentiellen Stimulation mit 2-MeSATP (Kap. ERG 3.3.4.2), zeigten prozentual deutlich mehr responsive Astrozyten (~ 97 %) ein geringeres Desensibilisierungsverhalten als während der Durchführung bei Raumtemperatur (~ 67%). Diese Resultate unterstützen die Hypothese des positiven Einflusses der Temperatur auf die Responsivität der Zellen.

Neben der Expression ionotroper Purinozeptoren wurden mehrfach metabotrope purinergere Rezeptoren (P2Y_{1,2,4}R) *in situ* in astroglialen Zellen des Sehnerven oder *in vitro* in neuroglialen Zellkulturen des *Cerebellum*, *Cortex*, *Hippocampus* bzw. des NAc mittels Genexpressionsanalyse, mikrospektrofluorimetrischen und/oder immunzytochemischen Untersuchungen beschrieben (James & Butt, 2001; 2002; Lenz et al., 2000; Franke et al., 2001a; 2004; Fischer et al., 2009; Koizumi et al., 2002; Zhu & Kimbelberg, 2004). Unter Verwendung der Reverse Transkriptase-PCR, Immunzytochemie und des Fluoreszenz Ratio-Imaging wurde die Koexpression des P2Y₁R mit verschiedenen P2YR (P2Y_{2,4,6,13}R) in isolierten, cerebralen Typ-1 Astrozyten der Ratte demonstriert (Carrasquero et al., 2005; James & Butt, 2002; Jiménez et al., 2000). Bis auf die funktionelle Expression des bereits erwähnten P2Y₁R in Astrozyten des SON im Kontext der regulierten ADH-Sekretion lagen bis *dato* nur wenige Daten über die Rolle metabotroper Purinozeptoren in hypothalamischen Astrozyten vor (Espellargues et al., 2007).

Erste Hinweise für ein etwaiges Vorkommen von P2Y-Rezeptoren in astroglialen Zellen der ARC-Primärkultur, sowie deren nicht marginale Bedeutung in der purinergen Signaltransduktion demonstrierten die Experimente der 2-MeSATP-vermittelten Erhöhung des [Ca²⁺]_iz nach vorheriger Depletion des extrazellulären Ca²⁺ (Kap. ERG 3.3.5). Trotz sig-

nifikanter Verringerung der mittleren Fluoreszenz Ratio-Amplitude und der Anzahl an responsiven Zellen kann für annähernd $\frac{3}{4}$ der repetitiv-responsiven Astrozyten (LDD) neben einem Influx von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum ebenso ein Einstrom aus intrazellulären Speichern ins Zytosol postuliert werden. Diese Minderung der durchschnittlichen Amplitude des Kalziumsignals lässt sich bei Absenz des extrazellulären Ca^{2+} durch die hervorgerufene Ineffektivität membranständiger Ionenkanäle, einschließlich der ionotropen P2X-Rezeptoren zurückführen (James & Butt, 2002). Die Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen *Retikulum*, wird über den $G_{q/11}$ -Signalweg vermittelt und ist ein Charakteristikum für die Purinozeptorsubtypen $\text{P2Y}_{1,2,4,6,11}$ (*Kap. EIN 1.4.4*) (Burnstock, 2006; Ravelic & Burnstock, 1998; Stojilkovic, 2009).

Die Resultate aus den Experimenten zur Modulation der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ unter Verwendung von P2-Antagonisten mit unterschiedlichen Selektivitäten für die P2X- / P2Y-Rezeptorsubtypen stützen zusätzlich zu den Daten aus der Untersuchung zur Ermittlung der Ca^{2+} -Quelle, dass neben P2X- ebenfalls P2Y-Rezeptoren in Astrozyten des ARC koexprimiert werden. Die (pseudo-)antagonistische Effektivität dieser Substanzen stellte sich wie folgt dar: Rb-2 \gg PPADS \geq Suramin \geq TNP-ATP $>$ PSB1011. Im direkten Vergleich der P2-Antagonisten war PSB1011 (10 μM) bei wiederholt responsiven Astrozyten ein relativ ineffektiver Antagonist. So wurde weder die mittlere 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Änderung, noch die Anzahl der responsiven Astrozyten signifikant supprimiert (*Kap. ERG 3.3.8.2*). Die ermittelten Daten aus den Teilstudien weisen darauf hin, dass der $\text{P2X}_2\text{R}$ nicht in Astrozyten des ARC exprimiert wird. PSB1011 inhibiert homomere $\text{P2X}_2\text{R}$ bereits im nanomolaren Bereich (Baqi et al., 2011). Die verwendete Konzentration (10 μM) würde sowohl $\text{P2X}_{2/3}\text{R}$, $\text{P2X}_4\text{R}$, als auch metabotrope $\text{P2Y}_{2,4,6}\text{R}$ mit einer halbmaximalen Effektivität von etwa 10 μM zumindest teilweise supprimieren (Baqi et al., 2011). In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit trotz der Präsenz von PSB1011 jedoch nur etwa 10 % der LDD-Astrozyten in ihrem 2-MeSATP-induzierten Responsivitätsverhalten gehemmt.

PPADS, Suramin und TNP-ATP stellten sich in der Inhibition der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ in den durchgeführten Teilstudien als nahezu äquipotent dar. In einer Konzentration von 10 μM hemmten die drei Antagonisten annähernd ein Viertel bis zu einem Drittel der wiederholt responsiven Zellen vollständig. Aus mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen an Astrozyten der MnPO-Primärzellkultur ging hervor, dass TNP-ATP verglichen mit Rb-2 oder PPADS als potentesten Inhibitor bei Astrozyten des MnPO fungierte (Hitzel, 2009). In jener Studie wurde bereits bei einer niedrigeren TNP-

ATP-Konzentration (100 nM) das 2-MeSATP-vermittelte Kalziumsignal bei 18 % der astroglialen Zellen des MnPO vollständig gehemmt (Hitzel, 2009). TNP-ATP stellt im nanomolaren Bereich einen effektiven Antagonisten für P2X₁-, P2X₃- und P2X_{2/3}-Rezeptoren dar (Jarvis & Khakh, 2009; Lewis et al., 1998; Virginio et al., 1998). Dies unterstützt die Annahme, dass die drei genannten Rezeptorsubtypen nur *devo*t in die 2-MeSATP-vermittelte Kalziumantwort der LDD-Astrozyten der ARC-Primärkultur einbezogen waren.

Im Gegensatz zur vollständigen Blockade des Kalziumsignals aller responsiven Astrozyten der MnPO-Zellkultur (Hitzel, 2009), hemmte PPADS in einer Konzentration von 10 µM in der vorliegenden Arbeit nur ein Drittel der responsiven ARC-Astrozyten vollständig (*Kap. ERG 3.3.7*). Eine völlige Inhibition aller astroglialen Zellen wurde selbst in der zehnfach höheren Dosis nicht erreicht. Somit waren beide Antagonisten deutlich effektiver bei Astrozyten der MnPO-Primärkultur (Hitzel, 2009) als bei jenen des ARC. In den verwendeten Dosen zeigten gleichermaßen P2X₄R, sowie P2Y₂R und P2Y₄R eine relative Insensitivität gegenüber PPADS (IC₅₀-Wert: > 100 µM) (Bianchi et al., 1999; Wildman et al., 2003). Diese Resultate lassen somit keine genaue Differenzierung der beteiligten Purinozeptorsubtypen zu. Eine vergleichbar niedrige Potenz wie PPADS weist ebenfalls Suramin gegenüber dem P2X₄R auf (IC₅₀-Wert: > 100 µM) (Bianchi et al., 1999). Obwohl Suramin nicht-selektiv andere Purinozeptoren inhibiert, kann es zur Differenzierung zwischen dem P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptorsubtypen herangezogen werden (Bogdanov et al., 1998; Wildman et al., 2003). Elektrophysiologische Experimente an P2Y₂R- resp. P2Y₄R-rekombinanten Oozyten demonstrierten, dass Letzterer (IC₅₀-Wert: 1 mM) insensitiv gegenüber Suramin ist (Wildman et al., 2003). Im Gegensatz dazu wies Suramin für den P2Y₂R einen niedrigeren IC₅₀-Wert von etwa 9 µM auf (Bogdanov et al., 1998; Wildman et al., 2003).

Rb-2 stellte in der vorliegenden Arbeit den potentesten Antagonisten der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung des [Ca²⁺]_i in Astrozyten des ARC dar. Bereits die Verwendung einer niedrigen Konzentration (1 µM) supprimierte etwa ¼ der Astrozyten bezüglich ihrer Responsivität auf eine gleichzeitige Superfusionsstimulation mit 2-MeSATP vollständig. So wurde mit einer zehnfach niedrigeren Dosis verglichen mit den Liganden PPADS und Suramin ein ähnlich hoher prozentualer Anteil an responsiven Astrozyten inhibiert. Dieses Resultat lässt sich nicht ausschließlich auf die alleinige Hemmung des Purinozeptorsubtyps P2X₂ (IC₅₀-Wert: 0,4 µM) begründen (King et al., 1997). Einerseits hätte ebenso PSB1011 eine P2X₂R-spezifische Hemmung aufweisen können. Andererseits wäre eine Kreuzreaktion mit verschiedenen P2Y-Rezeptoren durch Rb-2 nicht auszu-

schließen (Bagi et al., 2011; King et al., 1997; Simon et al., 1994). Neben der effizienten Hemmung des P2X₂R stellt Rb-2 einen potenten Antagonisten sowohl an rekombinanten P2Y₁R (IC₅₀-Wert: 1 µM), als auch an P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptoren (IC₅₀-Wert: 20 µM) dar (Bogdanov et al., 1998; Burnstock, 2007b; Inoue et al., 1991; Ralevic & Burnstock, 1998; von Kügelgen, 2005; Vöhringer et al., 2000; Wildman et al., 2003). Hingegen sind rekombinante P2Y₂R insensitiv gegenüber Rb-2 (IC₅₀-Wert: 10 mM) (Wildman et al., 2003). Sowohl diese Daten als auch die Resultate aus den Teilstudien mit Suramin und Rb-2 deuten darauf hin, dass der P2Y₂R funktionell nicht in den analysierten Zellen exprimiert wurde. Der P2Y₆R kann aus der Betrachtung ausgeschlossen werden, da diesem Rezeptorsubtyp eine niedrigere Sensitivität gegenüber 2-MeSATP als den beiden weiteren P2YR zugeschrieben wird (Nicholas et al., 1996).

Dass u.a. der P2Y₁R und der P2X₇R ebenfalls an der Generierung eines Ca²⁺-Signals in den Astrozyten einer Zellkultur beteiligt sein könnten, zeigten pharmakologische, mikrospektrofluorimetrisch Untersuchungen an kortikalen Zellkulturen embryonaler resp. neonataler Ratten (Fischer et al., 2009; Fumagalli et al., 2003; Nörenberg et al., 2010). Espallergues und Kollegen demonstrierten am Gehirnschnitt der Ratte, dass ATP *via* P2Y₁R auf hypothalamischen Astrozyten des SON wirkt. Es wurde u.a. angenommen, dass entweder ATP zusammen mit Noradrenalin aus katecholaminergen Axonen im SON freigesetzt wird (Day et al., 1993; Espallergues et al., 2007; Sperl agh et al., 1998) und direkt einen Anstieg der [Ca²⁺]_iz in Neuronen des SON sowie die Sekretion von ADH und Oxytocin (OT) induziert, oder möglicherweise indirekt zuvor umliegende Astrozyten dazu stimuliert einen noch nicht identifizierten Gliotransmitter freizusetzen, welcher die Hormonabgabe und somit im Endeffekt die Neurohypophysenfunktionen beeinflusst (Espallergues et al., 2007; Song et al., 2006a).

Wie bereits im *Kap. DIS 4.2.3* für Neurone beschrieben, wurde eine erhöhte Expression des P2Y₁-Rezeptors *in vivo* im Hypothalamus Futter-limitierter, adulter Ratten im Zusammenhang mit einer vermuteten purinergen Regulation der Nahrungsaufnahme gezeigt (Seidel et al., 2006). Hierbei exprimierten neben Neuronen auch Astrozyten vor allem im ARC, aber auch im DMH, VMH und LH diesen Rezeptorsubtyp (Seidel et al., 2006). Wie Astrozyten in den Aspekt der Nahrungsaufnahme involviert sind, ist jedoch unklar. Spekuliert wurde, dass diese Gliazellen möglicherweise Gliotransmitter abgeben bzw. Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt partiell entfernen (Seidel et al., 2006). Dass hypothalamische Astrozyten über den Gliotransmitter ATP die neuronale Aktivität *via* postsynaptisch lokalisierter P2X₇R modulieren, wurde von Gordon und Kollegen (2009)

mittels *whole cell patch clamp*- und mikrospektrofluorimetrischen Experimenten an glutaminergen Neuronen des magnozellularen PVN im Gehirnschnitt postuliert.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen eine funktionelle Expression des P2Y₁R, sowie in geringerem Umfang die des Purinozeptorsubtyps P2Y₄ in den Astrozyten des ARC nicht ausgeschlossen werden. Eine genaue Identifikation der P2Y-Rezeptorsubtypen ohne die Verwendung von existierenden P2Y-Rezeptor-spezifischen Agonisten und Antagonisten war nicht möglich.

Aufgrund der ausgeprägten Insensitivität der analysierten Astrozyten der ARC-Primärkultur, die äußerst geringe Responsivität der astroglialen Zellen auf Superfusionsstimulation mit BzATP, sowie die geringe antagonistische Wirkung des P2XR-Subtyp-spezifischen Antagonisten TNP-ATP kann die funktionelle Expression astroglialer P2X₁R und/oder P2X₃R trotz einiger zuvor erwähnter typischer Eigenschaften ausgeschlossen werden. Aufgrund der fehlenden repetitiven Responsivität auf die Superfusionsstimulationen mit 2-MeSATP der HDD-Astrozyten, welche einen hohen Grad der Rezeptordesensibilisierung zeigten, konnte keine weitere pharmakologische Charakterisierung der exprimierten Purinozeptorsubtypen mit Hilfe der Purinozeptorantagonisten erfolgen. Weiterhin scheint für die Mehrzahl der Astrozyten der Primärkultur des ARC die funktionelle Expression des P2X-Rezeptorsubtyps P2X₂ sowie in geringem Umfang P2X₄ als wahrscheinlich. Das Fehlen einer eindeutigen Immunfluoreszenzmarkierung der P2X-Rezeptorsubtypen, trotz der Verwendung von P2XR-subtypspezifischen Antikörpern muss nicht zwangsläufig die Absenz funktioneller P2X-Rezeptoren in Astrozyten der ARC-Primärkultur bedeuten (Harlow & Lane 1988). Die zum Teil gegensätzlichen Daten aus der Literatur hinsichtlich der Existenz einiger P2X- / P2Y-Rezeptorsubtypen in Astrozyten könnten das Resultat verschiedener Faktoren, wie zum Beispiel unterschiedlicher Tierspezies, Gehirnregionen, Entwicklungsstadien, die Heterogenität der Astrozyten, die Zellkulturbedingungen im Vergleich zu den *in vivo* Bedingungen, oder die Spezifität der Antikörper, sein (Fischer et al., 2009).

4.2.5. Funktionelle Purinozeptorexpression in Mikrogliazellen

Die Mikrogliazellen stellten den geringsten Prozentsatz (~ 5%) der in der ARC-Zellkultur vorkommenden Zelltypen dar. Wie in *Kap. ERG 3.4.2* beschrieben, konnte immunzytochemisch der P2X₄-Rezeptor eindeutig in Kolokalisation mit ED1-immunoreaktiven Mikroglia der Primärkultur des ARC nachgewiesen werden. Der Purinozeptorsubtyp P2X₄ stellte zudem nach den P2X₂ und P2X₆ den drittstärksten auf mRNA-Ebene exprimierten ionotropen Rezeptorsubtyp im hypothalamischen Kerngebiet des ARC neonataler und

adulter Ratten dar, während dieser in der primären Zellkultur den höchsten mRNA-Gehalt relativ zu den anderen P2X-Rezeptorsubtypen aufwies (*Kap. ERG 3.1*). In Folge einer eingehenden Charakterisierung der mRNA-Expression aller P2-Rezeptorsubtypen mittels qRT-PCR rasch isolierter Mikrogliazellen neonataler und adulter Mäuse sowie einer mikroglialen Primärzellkultur konnte die Expression des Purinozeptorsubtyps P2X₂ in Mikroglia ausgeschlossen werden (Crain et al., 2009). Zusätzlich wurde demonstriert, dass kultivierte Mikroglia die Rezeptorsubtypen P2X₃, P2X₄ und P2X₆ in Relation zu den verbleibenden P2XR auf mRNA-Ebene deutlich stärker exprimierten (Crain et al., 2009). Dies unterstützt die Annahme, dass der P2X₄-Rezeptor gleichermaßen auf mRNA- und Proteinebene in Mikrogliazellen des ARC vorhanden ist.

Eine detaillierte pharmakologische Charakterisierung der purinergen Rezeptorsubtypen der Mikroglia konnte innerhalb der verschiedenen Versuchsansätze der mikrospektrofluorimetrischen Untersuchung auf Grund der zu geringen Anzahl an zu analysierenden Zellen nicht erfolgen. Wie auch bereits von Hitzel (2009) beobachtet, bestehen Unterschiede zwischen der Beladung der verschiedenen Zelltypen neuroglialer Primärkulturen mit dem Acetoxymethylester-Derivat Fura-2 AM. Im Vergleich mit Neuronen bzw. Astrozyten erfolgte die Beladung der Mikroglia mit dem Kalziumchelator Fura-2 AM ineffektiver. Trotz dieser Schwierigkeiten konnte bei ca. 21 % der insgesamt 70 analysierten Mikrogliazellen ein [Ca²⁺]_i-Anstieg nach einmaliger Superfusionsstimulation mit dem generellen Purinozeptoragonisten 2-MeSATP nachgewiesen werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der P2X₄R ebenfalls funktionell auf Mikroglia des ARC exprimiert werden könnte. Dieser mikroglial exprimierte Purinozeptorsubtyp wird hauptsächlich mit dem Schmerzempfinden bzw. taktiler Allodynie assoziiert (Inoue et al., 2010; Tsuda et al., 2003; Ulmann et al., 2008). Sowohl *in vitro* in murinen mikroglialen Primärkultur des *Cortex*, als auch *in vivo* im Mausmodell wurde eine Hochregulation des P2X₄R in aktivierten Mikroglia des Rückenmarks, welche die Bildung und Freisetzung des Wachstumsfaktors BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) stimuliert, demonstriert (Trang et al., 2009; Ulmann et al., 2008). Dieses Neurotrophin repräsentiert offensichtlich ein wichtigen Mediator bei der Kommunikation zwischen Mikrogliazellen und Neuronen sowie bei der Aufrechterhaltung der Schmerzhypersensitivität im Tiermodell (Coull et al., 2005; Trang et al., 2009). So führte die pharmakologische Hemmung des P2X₄R nach einer induzierten Nervenschädigung zur Aufhebung der Schmerzhypersensitivität (Tsuda et al., 2003). Zusätzlich wiesen P2X₄-defiziente Mäuse eine verminderte taktile Allodynie auf (Ulmann et al., 2008).

Ohsawa und Kollegen (2007) wiesen mittels Chemotaxis Assays, Fluoreszenz Ratio-Imaging, qRT-PCR und Immuno-Blot Analysen in cerebralen Primärkulturen neonataler Ratten ferner die Beteiligung des P2X₄R neben des P2Y₁₂R im Prozess der mikroglialen Chemotaxis nach. Der metabotrope P2Y₁₂R aktiviert über den G_{i/o}-Signalweg die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), welche u.a. eine Rolle in der Neuordnung des Zytoskeletts und der Zellmigration spielt (Ohsawa et al., 2007; Procko & McColl, 2005; Van Haastert & Devreotes, 2004). Hierbei wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine ATP-induzierte lokale Ca²⁺-Mobilisierung *via* P2X₄R zur Erhaltung bzw. Verstärkung eines örtlich begrenzten P2Y₁₂R-induzierten PI3K-Signals nötig sei (Crain & Watters, 2011; Ohsawa et al., 2007).

Im Rahmen der Immunabwehr von Pathogenen im ZNS werden diese u.a. durch verschiedene TRLs oder NOD2 der immunkompetenten Mikrogliazellen erkannt (*Kap. EIN 1.7.3*) (Guo et al., 2006; Nasu-Tada et al., 2005). In primären Zellkulturen neonataler Gliazellen induzierte eine LPS-vermittelte Stimulation der TRLs oder NOD2 eine vermehrte Expression des P2X₄R sowie eine gesteigerte Synthese von TNF- α und NO (Hide et al., 2000; Guo et al., 2006). Mittels Zytokin-spezifischer Bioassays demonstrierte Hitzel (2009) an der Primärkultur des MnPO gleichermaßen die ATP- sowie LPS-induzierte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α mikroglialer Zellen. In Gegenwart der Purinozeptorantagonisten PPADS bzw. TNP-ATP konnte die LPS-stimulierte Zytokinsekretion partiell supprimiert werden (Hitzel, 2009). Dies ließ auf eine Verbindung zwischen den TLRs und/oder NOD2 und der purinergen Aktivierung (P2X₄R) mikroglialer Zellen schließen (Guo et al., 2006). MnPO und POA stellen wichtige hypothalamische Gebiete für die Regulation der Körpertemperatur dar (Gerstberger et al., 2001; Simon et al., 1986). Hitzel (2009) postulierte, dass extrazelluläres ATP für die Sekretion proinflammatorischer Zytokine im Zusammenhang mit der zentralen Fiebergenese und Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt.

4.3. Ausblick

Die vorliegende Arbeit lieferte erste Hinweise für die funktionelle Expression purinerge Rezeptoren in Nervenzellen, Astrozyten und Mikroglia des *Nucleus arcuatus* der Ratte. Sinnvoll ist es nun die gewonnenen Erkenntnisse durch die Berücksichtigung anderer Versuchsanordnungen zu erweitern und zu vervollständigen. Zum Beispiel wurden an isolierten Neuronen des hypothalamischen *Nucleus tuberomamillaris* die modulatorischen Eigenschaften von Zinkionen (Zn²⁺) im extrazellulären Medium auf den Aktivierungszustand der ionotropen P2XR untersucht (*Kap. EIN 1.4.2*) (Vorobjev et al., 2003).

Für P2X₂R wurde u.a. ein biphasischer Effekt von Zinkionen in physiologischen Konzentrationen (1 µM - 10 µM) auf ATP-induzierte Ströme nachgewiesen (Vorobjev et al., 2003). Niedrige Konzentrationen von Zn²⁺ potenzierten durch Verzögerung der Deaktivierung des Ionenkanals die ATP-induzierten Ströme, wohingegen höhere Konzentrationen (> 300 µM) die Öffnung der Ionenkanäle supprimierten (Vorobjev et al., 2003). Zudem moduliert der pH-Wert des extrazellulären Mediums auf den Aktivierungszustand der verschiedenen Purinozeptorsubtypen (Wildman et al., 2003). Ausschließlich bei homo- bzw. heterotrimeren P2X₂-Rezeptoren führt eine Ansäuerung zu einer Potenzierung der Agonisten-induzierten Antwort, wohingegen ein Anstieg der Protonenkonzentration die Aktivität aller anderen homomeren P2X-Rezeptoren reduziert (Coddou et al., 2011b; Clyne et al., 2002; King et al., 1997; Stoop et al., 1997). Um die Expression des Rezeptorsubtyps P2X₄ in Neuronen und Astrozyten vollständig auszuschließen, müssten Untersuchungen zur allosterischen Modulation des 2-MeSATP-induzierten Ca²⁺-Signals mittels Ivermectin durchgeführt werden. Ivermectin wirkt spezifisch an P2X₄R und erhöht nicht nur die ATP-induzierten Ströme und die Sensitivität des Rezeptors für Agonisten, sondern senkt auch die Desensibilisierungsrate (Coddou et al., 2011b; Khakh et al., 1999; Priel & Silberberg, 2004). Um die Existenz von P2X₂R in Neuronen des ARC zu verdeutlichen, müsste der Versuchsansatz der Modulation der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der [Ca²⁺]_i in Zellen der ARC-Primärkultur durch P2X-Rezeptorsubtyp spezifische Antagonisten mit PSB1011 und TNP-ATP wiederholt werden. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen eine gemeinsame funktionelle Expression ionotroper und metabotroper Purinozeptoren in den Astrozyten des ARC umrissen werden. Eine eindeutige Charakterisierung von P2Y-Rezeptorsubtypen wurde jedoch nicht durchgeführt. Zur genaueren Identifikation der postulierten P2YR wie P2Y₁R und P2Y₄R, müssten spezifische P2Y₁R-Agonisten (MRS2365) oder Antagonisten (MRS2179) verwendet werden (Fischer et al., 2009). Neben elektrophysiologischen Untersuchungen mittels *patch-clamp* Technik zur Differenzierung der Purinozeptorsubtypen im Gehirnschnitt auf der Ebene des ARC eröffnet die *single-cell* RT-PCR eine Methode zur Charakterisierung der ionotropen und metabotropen Purinozeptoren auf Einzelzellniveau. Zusätzlich bietet diese Methode einen Ansatzpunkt zur Identifikation der zellulären Expression ARC-spezifischer Neurotransmittersysteme in den ATP-responsiven Neuronen.

Nach der molekularbiologischen und pharmakologischen Charakterisierung der purinergen Rezeptoren im *in vitro* Modell könnten spezifische *in vivo* Versuche zur Bestimmung der funktionellen Bedeutung der Purinozeptoren im ARC adulter Tiere folgen. Telemetri-

schen Versuchsansätzen mit einer icv-Mikroapplikation bzw. Mikrodialyse ausgewählter, spezifischer Purinozeptoragonisten bzw. -antagonisten in den dritten Gehirnventrikel ermöglichen die Charakterisierung der Bedeutung des purinergen Systems auf der Ebene des ARC für die Regulation der Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme, der Körperkerntemperatur und des Schlaf-/Wachverhaltens sowie die lokomotorischer Aktivität zu untersuchen. Weiterhin könnte die molekular- und/oder zellbiologische Untersuchung des ARC auf eine Änderung der Expressionsprofile der Purinozeptorsubtypen nach einer gezielten Manipulation dieser autonomen Regelkreise, wie beispielsweise auf eine kurzfristige externe Hypo- (10°C) und Hyperthermie (33°C), ein LPS-induziertes "*sickness behaviour*", eine Glucose-Deprivation oder eine "Cafeteria"-Diät erfolgen.

5. Zusammenfassung

Der im tuberalen Hypothalamus, in unmittelbarer Nähe zur *Eminentia mediana* und zur Adenohypophyse lokalisierte *Nucleus arcuatus* (ARC) übt durch neuronale Synthese und Freisetzung von spezifischen *releasing* - und *inhibiting* Faktoren eine wichtige Rolle in der neuroendokrinen Kontrolle der Adenohypophyse und somit u.a. auf das Wachstum und die Reproduktion des tierischen Organismus aus. Im Rahmen der Homöostase des Energiehaushaltes inklusive der Nahrungsaufnahme kommt v.a. dem ARC durch seine relativ durchlässige Blut-Hirn Schrankenfunktion eine besondere Bedeutung zu. Zirkulierende Hormone des Energiestoffwechsels wie Leptin (und Insulin) ist es möglich, direkt mit Neuronen des ARC zu interagieren und deren neuronale Aktivität zu modulieren.

Auf Grund histologischer (*in situ* Hybridisierung, Immunhistochemie) und elektrophysiologischer Studien an Gehirnschnitten von Maus und Ratte existieren erste Hinweise auf eine wichtige Adenosin-Nukleotid-vermittelte Signaltransduktion mittels ionotroper (P2X) und metabotroper (P1 und P2Y) purinergere Rezeptoren im ARC der Ratte. Eine spezifische Identifikation funktionell exprimierter purinergere Rezeptoren im Bereich des ARC ist bis *dato* in der Fachliteratur nur limitiert beschrieben worden. Daher erfolgte im Rahmen der vorliegenden experimentellen Promotionsarbeit eine detaillierte pharmakologische, molekularbiologische, sowie immunhisto- und immunzytochemische Charakterisierung ionotroper P2X-Rezeptoren im ARC des Rattenhypothalamus v.a. anhand einer neuroglialen Primärzellkultur des ARC.

- (1) Die Grundvoraussetzung für alle darauffolgenden Teilstudien war die *de novo* Etablierung einer neuroglialen Primärzellkultur des ARC 4 - 6 Tage alter Ratten. Im Zusammenhang mit der immunzytochemischen Charakterisierung konnte eine markante neuronale Expression ARC-spezifischer Transmittersysteme der Neuropeptide adrenocorticotrophes Hormon (ACTH), Neuropeptid Y (NPY), Neurotensin (NT), Somatostatin (SOM), sowie eine partielle Kolo-kalisation mit der Tyrosinhydroxylase (TH) für dopaminerge Nervenzellen (mit Ausnahme von ACTH) dargestellt werden. Eine Manifestation und Spezifität der Primärkultur des ARC neonataler Ratten ist diesbezüglich anzunehmen, welche zudem dem *in situ* Zustand des ARC im Gehirn adulter Ratten gut widerspiegelt.
- (2) Im Hinblick auf die mRNA-Expression verschiedener purinergere Rezeptorsubtypen der P2X-Familie (P2X₁₋₇) im Bereich des ARC konnten mit Hilfe der qRT-PCR marginale ontogenetische Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien früh-postnataler und adulter Ratten gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wurden für den MnPO marginale differentielle Expressionsmuster zwischen

früh-postnatalen ($P2X_2 = P2X_4 > P2X_7 > P2X_6$) vs. adultem Status ($P2X_4 = P2X_7 > P2X_2 = P2X_6$) ermittelt. In den etablierten Primärkulturen ergaben sich nach 3 - 4 tägiger Kultivierung für beide Kerngebiete für $P2X_4R$ eindeutig das höchste Expressionsniveau sowie eine relative Reduktion resp. Zunahme der mRNA-Expression für $P2X_2R$ resp. $P2X_3R$ gegenüber intakten Kerngebieten neonataler Tiere.

- (3)** Immunzytochemisch konnte ein zelltypspezifischer Nachweis des Purinozeptorsubtyps $P2X_2$ in zahlreichen Neuronen der ARC-Primärzellkultur sowie des $P2X_4$ ausschließlich in Mikrogliazellen erfolgen. In Astrozyten waren immunzytochemisch keine ionotropen Purinozeptoren nachweisbar. In coronalen Gehirnschnitten transkardial perfusionsfixierter, adulter Ratten wurde auf Ebene des ARC der $P2X_2R$ in Neurone vorrangig in unmittelbarer Nähe zur ependymalen Auskleidung des dritten Gehirnventrikels immunhistochemisch detektiert.
- (4)** Die pharmakologische Charakterisierung der $P2X$ -Rezeptorsubtypen auf Einzelzellebene erfolgte durch mikrospektrofluorimetrische Untersuchungen der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ mit Hilfe des Kalziumchelators Fura-2. Es wurde die funktionelle Expression der Purinozeptorsubtypen durch die Aufzeichnung der durch zahlreiche Manipulationen im Superfusionsmodus der ARC-Primärkultur erzeugten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen erfasst und quantitativ analysiert. Mikrogliazellen konnten infolge einer marginalen Fura-2 AM Aufnahme und dem geringen Vorkommen nicht adäquat ausgewertet werden.
 - (a)** Sowohl Neurone als auch Astrozyten der ARC-angereicherten Primärkultur zeigten bezüglich der $[Ca^{2+}]_i$ bei den Superfusionsstimulation mit ATP sowie 2-MeSATP ($10^{-8} M - 10^{-6} M$) eine eindeutig nachweisbare Dosis-Wirkungs-Beziehung. Während bei Neuronen der Agonist-induzierte Kalziumstrom vollständig von extrazellulär über Ionenkanäle wie $P2X$ -Rezeptoren erfolgte, ist bei Depletion extrazellulären Ca^{2+} bei Astrozyten eine zusätzliche Beteiligung zellulären Speicherorganellen als Ursprungsort der intrazellulären Kalziumsignale anzunehmen.
 - (b)** Ein maßgeblicher Anteil der 2-MeSATP-responsiven Neurone und Astrozyten zeigten einen raschen, Agonist-induzierten Anstieg des intrazellulären Kalziumsignals mit geringen Desensibilisierungseffekten bei einer repetitiv applizierten (dreimal), äquimolaren Ligandenkonzentration. Dennoch demonstrierten einige responsive Zellen beider Zelltypen einen ho-

hen Grad der Desensibilisierung der entsprechenden Purinozeptoren, sowie ein signifikantes Dekrement der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ bei wiederholter, äquimolarer Superfusionsstimulation.

- (c) Die Simulation der physiologischen Körpertemperatur der Ratte zur besseren Nachahmung der *in vivo* Situation in *in vitro* Untersuchungen (ca. 36 °C) führte nachweislich zur Reduktion der Desensibilisierungsphänomene bzw. der Verringerung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Amplitude bei responsiven Neuronen und Astrozyten.
 - (d) Sowohl Neurone als auch Astrozyten zeigten eine Supprimierung der 2-MeSATP-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch P2-Purinozeptorantagonisten. In diesem Zusammenhang konnte für Neurone ausschließlich für die generalisierten P2-Antagonisten PPADS und Suramin eine ausreichende Anzahl an Zellen analysiert werden. Für Astrozyten wurde folgende Effektivitäts-Rangfolge ermittelt: Rb-2 >> PPADS = Suramin = TNP-ATP >> PSB1011. Die funktionelle Expression der ionotropen Purinozeptorsubtypen P2X₁ und P2X₃ konnten durch Verwendung Rezeptorsubtypspezifischer Liganden (α,β -meATP, TNP-ATP) in den drei untersuchten Zelltypen ausgeschlossen werden. Eine marginale Expression des Rezeptorsubtyps P2X₇ konnte durch Induktion intrazellulärer Kalziumsignale mittels des P2X₁ / P2X₇-spezifischen Agonisten BzATP ermittelt werden. Die detaillierten pharmakologischen Studien legen nahe, dass ionotrope Rezeptoren mit P2X₂-ähnlichen Charakteristika für die Mehrzahl der intrazellulären Kalziumsignale in Neuronen und Astrozyten verantwortlich waren.
 - (e) Aus der post-experimentellen immunzytochemischen Charakterisierung der 2-MeSATP-responsiven Neurone der ARC-Primärkultur gingen deren neuronale Biosynthese ARC-typischer Neuropeptide (ACTH, NPY, NT) bzw. der TH hervor.
- (5) Zusammenfassend aus den Resultaten der kompetitiven Verdrängungsstudien der Radiorezeptor Bindungsassays (RRA) konnte gefolgert werden, dass durch die effektive Verdrängung des purinergen Rezeptorliganden $[^{35}S]dATP\alpha S$ mittels unmarkiertem TNP-ATP und BzATP die P2X-Rezeptorsubtypen P2X₃ und P2X₇ im Gesamthypothalamus und thorakalen Rückenmark adulter Ratten exprimiert werden.
- (6) Semiquantitative Rezeptorautoradiographien kompetitiver Verdrängungsstudien mit P2X-Rezeptorsubtyp-spezifischen Liganden α,β -meATP und TNP-ATP an

seriellen, coronalen Gehirnschnitten deuten auf die Expression des heterotrimeren P2X_{2/3}R im hypothalamischen ARC und VMH sowie im *Hippocampus* und der *Fornix cerebri* adulter Ratten hin.

- (7) Auf Grund der Resultate der qRT-PCR, der Immunhisto- und -zytochemie sowie der detaillierten Charakterisierung der exprimierten P2X-Rezeptoren kann für Neurone des ARC die Prävalenz eines funktionellen P2X₂-Purinozeptors postuliert werden. Zudem ist anzunehmen, dass in den Astrozyten des ARC neben dem Rezeptorsubtyp P2X₂- auch Rezeptoren mit P2X₃-ähnlichen Charakteristika sowie metabotrope P2Y₁- bzw. P2Y₄-Purinozeptoren eine Änderung der [Ca²⁺]_i vermitteln. Für Mikrogliazellen des ARC scheint eine Expression des P2X₄-Rezeptors wahrscheinlich.

6. Summary

The *arcuate nucleus* (ARC), an aggregate of neurons located in the tuberal region of the hypothalamus and in close proximity to the *Eminentia mediana*, plays an important role in neuroendocrine control of the adenohipophysis and consequently in the growth and reproduction of organisms. This control is achieved by synthesis and liberation of specific releasing and inhibiting factors. The ARC gains special importance in regard to the homeostasis of energy balance especially due to the relative permeability of its blood-brain barrier. Because of this it is possible for circulating energy metabolism hormones such as leptin (and insulin) to interact with and to modulate the activity of ARC neurons.

Histological (*in situ* hybridization, immunohistochemistry) and electrophysiological studies on cells in brain slices of mouse and rat have provided first evidence for an important adenosine-nucleotide mediated signal transduction *via* ionotropic (P2X) and metabotropic (P1 and P2Y) purinoceptors in the ARC of the rat. Until now reports on the specific identification of functionally expressed purinergic receptors within the ARC have been limited. The aim of the present thesis was therefore to undertake a detailed pharmacological, molecular biological, immunohistochemical and immunocytochemical characterization of ionotropic P2X receptors in the ARC of the rat hypothalamus using a neuroglial primary cell culture of the ARC.

- (1) The basic prerequisite for all of the following investigations was the *de novo* establishment of a neuroglial primary cell culture from the ARC of 4 - 6 day old rat pups. In conjunction with the immunocytochemical characterization it was possible to demonstrate a distinctive neuronal expression of ARC specific transmitter systems of the following neuropeptides: adrenocorticotrophic hormone (ACTH), neuropeptide Y (NPY), neurotensin (NT), somatostatin (SOM) as well as a partial co-localization with tyrosine hydroxylase (TH) for dopaminergic nerve cells (with the exception of ACTH). Manifestation and specificity of the ARC neonatal rat primary culture to this effect can be assumed. Additionally, these cells distinctly reflect the *in situ* state of the ARC in the brain of the adult rat.
- (2) With regard to the mRNA expression of various purinergic receptor subtypes of the ARC-related P2X family (P2X₁₋₇) no differences could be detected between early postnatal developmental stage and adult rats. In this connection it should be noted that for the median preoptic nucleus (MnPO) marginally different expression patterns were detected between early postnatal status (P2X₂ = P2X₄ > P2X₇ > P2X₆) and the adult status (P2X₄ = P2X₇ > P2X₂ = P2X₆). After 3 - 4 days cultivation the established primary cell culture of both hypothalamic nuclei (ARC

or MnPO) the highest expression levels were found for P2X₄ as well as a relative reduction in mRNA expression for P2X₂ or increase for P2X₃ mRNA compared to the intact hypothalamic nuclei of rat pups.

- (3)** An immunocytochemical cell-specific identification of the purinoceptor subtype P2X₂ was obtained in numerous neurons of the ARC primary cell culture as was identification of P2X₄ exclusively in microglial cells. No ionotropic purinoceptors could be immunocytochemically detected in astrocytes. By immunohistochemical testing of coronal brain sections of adult rats fixed by transcardial perfusion P2X₂R was principally detected in neurons in the immediate vicinity of the third ventricle of the brain.
- (4)** Pharmacological characterization of P2X receptor subtypes at the single-cell level was carried out by microspectrofluorometric determination of intracellular calcium concentration [Ca²⁺]_{ic} using a calcium chelator, Fura-2. Functional expression of the purinoceptor subtypes was measured and quantified by recording the changes in [Ca²⁺]_{ic} in neurons, astrocytes and microglial cells resulting from numerous manipulations of the ARC primary culture in superfusion mode. It was not possible to evaluate these values in microglial cells due to marginal Fura-2 AM uptake and the low number of microglial cells in the primary cell culture of the ARC.
 - (a)** In regard to 2-MeSATP (10⁻⁸ M - 10⁻⁶ M) superfusion induced rising of [Ca²⁺]_{ic} in both neurons and astrocytes from the ARC enriched primary culture demonstrated a clearly detectable dose-response relationship. Whereas in neurons the 2-MeSATP-induced calcium current took place extracellularly *via* ion channels such as the P2X receptors in astrocytes it can be assumed that upon depletion of extracellular Ca²⁺ cellular storage organelles are also involved as source of the intracellular calcium signal.
 - (b)** A significant percentage of the 2-MeSATP responsive neurons and astrocytes demonstrated a rapid agonist-induced increase in the intracellular calcium signal with weak desensibilization effects following repetitive (triple) applications of an equimolar concentration of the ligand. A few responsive cells of both types, however, demonstrated a high degree of desensibilization of the corresponding purinoceptor as well as a significant decrement in [Ca²⁺]_{ic} increase upon repetitive equimolar superfusion stimulation.

- (c) Simulation with 2-MeSATP by physiological body temperature of the rat in order to more accurately reflect the *in vivo* situation in the *in vitro* experiments (to approximately 36°C) led to a verifiable reduction in the desensitization phenomenon and/or to a decline in the $[Ca^{2+}]_i$ amplitude in responsive neurons and astrocytes.
- (d) Both neurons and astrocytes demonstrated suppression of the 2-MeSATP induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ produced by purinoceptor antagonists. For neurons it was only possible to test an adequate number of cells with the generalized P2 antagonists PPADS and suramin. The following effectivity ranking was found for astrocytes: Rb-2 >> PPADS = Suramin = TNP-ATP >> PSB1011. P2X₁/P2X₃-specific α,β -meATP failed to induce a calcium signal in all three cell types examined whereas P2X₇-specific BzATP induced a signal in individual cells. There is large evidence, that these receptor subtypes aren't expressed in the microculture. Ionotropic receptors with P2X₂-like characteristics mediate the 2-MeSATP induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in neurons and astrocytes.
- (e) An immunocytochemical identification of 2-MeSATP responsive neurons demonstrated the biosynthesis of following neuropeptides: ACTH, NPY or NT as well as TH.
- (5) The radioreceptor assays show that receptor subtypes P2X₃ and P2X₇ are expressed throughout the whole hypothalamus and thoracic spinal cord as a result of the effective displacement of the radioactive purinoceptor ligand [³⁵S]dATP α S by unmarked TNP-ATP and BzATP.
- (6) Additionally, semiquantitative receptor autoradiographs from competitive displacement studies on serial, coronal brain slices indicate the occurrence of purinoceptor subtypes P2X₁ and P2X₃, without the capacity to disable the existence of a heteromeric P2X_{2/3}R, in hypothalamic ARC and VMH as well as in the *Hippocampus* and the *Fornix cerebri* of adult rats.
- (7) Based on the results of the qRT-PCR, the immunohistochemistry and immunocytochemistry as well as the detailed characterization of the expressed P2X receptors it can be postulated that in the neurons of the ARC there is a prevalence of a functional P2X₂ purinoceptor. It can also be assumed that for astrocytes of the ARC, receptors with P2X₃-like characteristics and metabotropic P2Y purinoceptors like P2Y₁ or P2Y₄ mediate changes in the $[Ca^{2+}]_i$. Expression of P2X₄ receptors appear likely in ARC microglial cells.

7. Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A., Burnstock, G.** 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 52-55.
- Abbracchio, M. P. And Ceruti, S.** 2006. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinergic Signal.* 2: 595-604.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson K. A., Weisman, G. A.** 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58: 281-341.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhatsky, A., Zimmermann, H.** 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32: 19-29.
- Agresti, C., Meomartini, M. E., Amadio, S., Ambrosini, E., Volonté, C., Aloisi, F., Visentin, S.** 2005. ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. *Brain Res.* 48: 157-165.
- al-Awqati, Q.** 1995. Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP. *Science* 269: 805-806.
- Albertson, B. D., Sienkiewicz, M. L., Kimball, D., Munabi, A. K., Cassorla, F., Loriaux, D. L.** 1987. New evidence for a direct effect of prolactin on rat adrenal steroidogenesis. *Endocrine Res.* 13: 317-333.
- Alexander, M. J.** 1999. Colocalization of neurotensin messenger ribonucleic acid (mRNA) and progesterone receptor mRNA in rat arcuate neurons under estrogen-stimulated conditions. *Endocrinology* 140: 4995-5003.
- Alexander, S. P. and Mathie, A., Peters, J. A.** 2008. Guide to receptors and channels (GRAC), 3rd edition. *Br. J. Pharmacol.* 153: 1-209.
- Allgaier, C., Reinhardt, R., Schädlich, H., Rubini, P., Bauer, S., Reichenbach, A., Illes, P.** 2004. Somatic and axonal effects of ATP via P2X2 but not P2X7 receptors in rat thoracolumbar sympathetic neurones. *J. Neurochem.* 90: 359-367.
- Anand, B. K. & Brobeck, J. R.** 1951. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77: 323-324.
- Andersson, B.** 1978. Regulation of water intake. *Physiol. Rev.* 58: 582.
- Anderson, L. L., Jeffinija, S., Scanes, C. G.** 2004. Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. *Exp. Biol. Med.* 229: 291-302.
- Anderson, S. T., Barclay, J. L., Fanning, K. J., Kusters, D. H., Waters, M. J., Curlewis, J. D.** 2006. Mechanisms underlying the diminished sensitivity to prolactin negative feedback during lactation: reduced STAT5 signaling and up-regulation of cytokine-inducible SH2 domain-containing protein (CIS) expression in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Endocrinology* 147: 1195-1202.
- Antunes-Rodrigues, J., de Castro, M., Elias, L. L., Valença, M. M., McCann, S. M.** 2004. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol. Rev.* 84: 169-208.
- Aoyama, R., Okada, Y., Yokota, S., Yasui, Y., Fukuda, K., Shinozaki, Y., Yoshida, H., Nakamura, M., Chiba, K., Yasui, Y., Kato, F., Toyama, Y.** 2011. Spatiotemporal and anatomical analyses of P2X receptor-mediated neuronal and glial processing of sensory signals in the rat dorsal horn. *Pain* 152: 2085-2097.
- Arey, B. J. & Freeman, M. E.** 1992. Activity of oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus mirrors the periodicity of the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology* 130: 126-132.
- Arimura, A.** 2000. Hypothalamic hormones. In: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine* [Conn, P. E. & Freeman, M. E. eds]. Part I. The Humana Press. New Jersey. 41-48.

- Aschoff, J.** 1990. Annual rhythm of human reproduction: II. Environmental correlations. *J. Biol. Rhythms* 5: 217-239.
- Ashour, F. & Deuchars, J.** 2004. Electron microscopic localisation of P2X₄ receptor subunit immunoreactivity to pre- and post-synaptic neuronal elements and glial processes in the dorsal vagal complex of the rat. *Brain Res.* 1026: 44-55.
- Ashwell, K.** 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev. Brain Res.* 58: 1-12.
- Aschrafi, A., Sadtler, S., Niculescu, C., Rettinger, J., Schmalzing, G.** 2004. Trimeric architecture of homomeric P2X₂ and heteromeric P2X₁₊₂ receptor subtypes. *J. Mol. Biol.* 342: 333-343.
- Azmitia, E. C. & Segal, M.** 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179: 641-667.
- Bagdade, J. D., Bierman, E. L., Porte, Jr. D.** 1967. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 46: 1549-1557.
- Bagnol, D., Lu, X. Y., Kaelin, C. B., Day, H. E., Ollmann, M., Gantz, I., Akil, H., Barsh, G. S., Watson, S. J.** 1999. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J. Neurosci.* 19: RC26.
- Bailey, M. A., Turner, C. M., Hus-Citharel, A., Marchetti, J., Imbert-Teboul, M., Milner, P., Burnstock, G., Unwin, R. J.** 2004. P2Y receptors present in the native and isolated rat glomerulus. *Nephron Physiol.* 96: 79-90.
- Ballerini, P., Ciccarelli, R., Caciagli, F., Rathbone, M. P., Werstiuk, E. S., Traversa, U., Buccella, S., Giuliani, P., Jang, S., Nargi, E., Visini, D., Santavenere, C., Di Iorio, P.** 2005. P2X₇ receptor activation in rat brain cultured astrocytes increases the biosynthetic release of cysteinyl leukotrienes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18: 417-430.
- Ballerini, P., Giulina, P., Buccella, S., Nargi, E., Santavenere, C., Scemes, E., Rathbone, M. P., Caciagli, F.** 2000. P2X₇ ATP receptor-mediated modulation of astrocyte proliferation and coupling. *Drug Dev. Res.* 50: 108.
- Ballerini, P., Rathbone, M. P., Di Iorio, P., Renzetti, A., Giuliani, P., D'Alimonte, I., Trubiani, O., Caciagli, F., Ciccarelli, R.** 1996. Rat astroglial P2Z (P2X₇) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport* 7: 2533-2537.
- Banks, W. A.** 2010. Blood-brain barrier as a regulatory interface. *Forum Nutr.* 63: 102-110.
- Banks, W. A.** 2012. Brain meets body: the blood-brain barrier as an endocrine interface. *Endocrinology* 153: 4111-4119.
- Baqi, Y., Hausmann, R., Rosefort, C., Rettinger, J., Schmalzing, G., Müller, C. E.** 2011. Discovery of potent competitive antagonists and positive modulators of the P2X₂ receptor. *J. Med. Chem.* 54: 817-830.
- Barres, B. A.** 1991. New roles for glia. *J. Neurosci.* 11: 3685-3694.
- Bartke, A.** 1986. Hyperprolactinemia and male reproduction. In: *Andrology: Male Fertility and Sterility* [Paulsen, J. D., Negro-Vilar, A., Lucina, E., Martini, L. eds]. Academic Press. New York. 101-123.
- Bar-Yehuda, S., Silverman, M. H., Kerns, W. D., Ochaion, A., Cohen, S., Fishman, P.** 2007. The anti-inflammatory effect of A₃ adenosine receptor agonists: a novel targeted therapy for rheumatoid arthritis. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 16: 1601-1613.
- Baylor, S. M. & Hollingworth, S.** 2000. Measurement and interpretation of cytoplasmic [Ca²⁺] signals from calcium-indicator dyes. *News Physiol. Sci.* 15: 19-26.
- Beaulieu, J., Champagne, D., Drolet, G.** 1996. Enkephalin innervation of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: distribution of fibers and origins of input. *J. Chem. Neuroanat.* 10: 79-92.
- Ben-Jonathan, N.** 1980. Catecholamines and pituitary prolactin release. *J. Reprod. Fertil.* 58: 501-512.
- Ben-Jonathan, N.** 1985. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr. Rev.* 6: 564-589.

- Ben-Shlomo, A., Pichurin, O., Khalafi, R., Zhou, C., Chesnokova, V., Ren, S. G., Liu, N. A., Melmed, S.** 2013. Constitutive somatostatin receptor Ssubtype 2 activity attenuates GH synthesis. *Endocrinology* [Epub ahead of print].
- Benker, G., Jaspers, C., Häusler, G., Reinwein, D.** 1990. Control of prolactin secretion. *Klin. Wochenschr.* 68: 1157-1167.
- Bennett, E., McGuinness, L., Gevers, E. F., Thomas, G. B., Robinson, I. C., Davey, H. W., Luckman, S. M.** 2005. Hypothalamic STAT proteins: regulation of somatostatin neurones by growth hormone via STAT5b. *J. Neuroendocrinol.* 17: 186-194.
- Berelowitz, M., Szabo, M., Frohman, L. A., Firestone, S., Chu, L., Hintz, R. L.** 1981. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212: 1279-1281.
- Bermann, M., Jaffe, C. A., Tsai, W., DeMott-Friberg, R., Barkan, A. L.** 1994. Negative feedback regulation of pulsatile growth hormone secretion by insulin-like growth factor I. Involvement of hypothalamic somatostatin. *J. Clin. Invest.* 94: 138-145.
- Bertherat, J., Bluet-Pajot, M. T., Epelbaum, J.** 1995. Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur. J. Endocrinol.* 132: 12-24.
- Bianchi, B. R., Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E. C., Alexander, K. M., Park, H. S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., Jarvis, M. F., van Biesen, T.** 1999. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 376: 127-138.
- Bideci, A., Camurdan, O.** 2009. Physiology of growth hormone secretion. *J. Clin. Res. Ped. Endo.* 1: 1-7.
- Bilezikjian, L. M. & Vale, W. W.** 1983. Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 113: 1726-1731.
- Billington, C. J., Briggs, J. E., Harker, S., Grace, M., Levine, A. S.** 1994. Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am. J. Physiol.* 266: R1765-R1770.
- Birbaumer, N. & Schmidt, R. F.** 2001. Motivation und Emotion. In: *Neuro- und Sinnesphysiologie* [Schmidt R. F. & Schaible, H.-G. eds]. Vol. 4. Springer-Verlag GmbH. Heidelberg-Berlin. 424-448.
- Birder, L. A., Ruan, H. Z., Chopra, B., Xiang, Z., Barrick, S., Buffington, C. A., Roppolo, J. R., Ford, A. P., de Groat, W. C., Burnstock, G.** 2004. Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am. J. Physiol.* 287: F1084-F1091.
- Birhanli, A. & Ozmen, M.** 2005. Evaluation of the toxicity and teratogenicity of six commercial textile dyes using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus. *Drug Chem. Toxicol.* 28: 51-65.
- Bishop, N., Fawcett, C. P., Krulich, L., McCann, S. M.** 1972. Acute and chronic effects of hypothalamic lesions on the release of FSH, LH and prolactin in intact and castrated rats. *Endocrinology* 91: 643-656.
- Björklund, A., Hökfelt, T., Swanson, L. W., 1987.** Integrated systems of the CNS: hypothalamus, hippocampus, amygdala, retina. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 5. Part I. Elsevier. Amsterdam. 459.
- Blähser, S.** 1988. The ACTH-immunoreactive system in the brain of the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii* (*Passeriformes, Emberizidae*). *Histochemistry* 88: 309-312.
- Blähser, S. & Dubois, M. P.** 1980. Immunocytochemical demonstration of met-enkephalin in the central nervous system of the domestic fowl. *Cell Tissue Res.* 213: 53-68.
- Blähser, S., Fellmann, D., Bugnon C.** 1978. Immunocytochemical demonstration of somatostatin-containing neurons in the hypothalamus of the domestic mallard. *Cell Tissue Res.* 195: 183-187.

- Blähser, S., Vigh-Teichmann, I., Ueck, M.** 1982. Cerebrospinal fluid-contacting neurons and other somatostatin-immunoreactive perikarya in brains of tadpoles of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 224: 693-697.
- Blouet, C. & Schwartz, G. J.** 2010. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav. Brain Res.* 209: 1-12.
- Bluet-Pajot, M. T., Epelbaum, J., Gourdj, D., Hammond, C., Kordon, C.** 1998. Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cell Mol. Neurobiol.* 18: 101-123.
- Bluet-Pajot, M. T., Tolle, V., Zizzari, P., Robert, C., Hammond, C., Mitchell, V., Beauvillain, J. C., Viollet, C., Epelbaum, J., Kordon, C.** 2001. Growth hormone secretagogues and hypothalamic networks. *Endocrine* 14: 1-8.
- Bo, X., Zhang, Y., Nassar, M., Burnstock, G., Schoepfer, R.** 1995. A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett.* 375: 129-133.
- Boess, F., Kamber, M., Romer, S., Gasser, R., Muller, D., Albertini, S., Suter, L.** 2003. Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol. Sci.* 73: 386-402.
- Bogdanov, Y. D., Wildman, S. S., Clements, M. P., King, B. F., Burnstock, G.** 1998. Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br. J. Pharmacol.* 124: 428-430.
- Bolborea, M. & Dale, N.** 2013. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* 36: 91-100.
- Boldogkoi, Z., Schutz, B., Sallach, J., Zimmer, A.** 2002. P2X(3) receptor expression at early stage of mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 118: 255-260.
- Boswell, T.** 2010. Food intake: behavioral endocrinology. In: *Encyclopedia of Animal Behavior* [Breed, M. D & Moore, J. eds]. Elsevier. Amsterdam. 738-743.
- Boucsein, C., Kettenmann, H., Nolte, C.** 2000. Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur. J. Neurosci.* 12: 2049-2058.
- Boué-Grabot, E., Archambault, V., Séguéla, P.** 2000. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J. Biol. Chem.* 275: 10190-10195.
- Bouret, S. G., Draper, S. J., Simerly, R. B.** 2004. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J. Neurosci.* 24: 2797-2805.
- Bowler, J. W., Bailey, R. J., North, R. A., Surprenant, A.** 2003. P2X4, P2Y1 and P2Y2 receptors on rat alveolar macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 140: 567-575.
- Bowser, D. N. & Khakh, B. S.** 2007; Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J. Gen. Physiol.* 129: 485-491.
- Brake, A. J., Wagenbach, M. J., Julius, D.** 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371: 519-523.
- Brambilla, R., Cottini, L., Fumagalli, M., Ceruti, S., Abbracchio, M. P.** 2003a. Blockade of A_{2A} adenosine receptors prevents basic fibroblast growth factor-induced reactive astrogliosis in rat striatal primary astrocytes. *Glia* 43: 190-194.
- Brambilla, R., Neary, J. T., Fumagalli, M., Cottini, L., Cattabeni, F., Schiller, P. R., Abbracchio, M. P.** 2003b. P2Y receptors in brain astroglial cells: identification of a gliotic P2Y receptor coupled to activation of a calcium-independent Ras/ERK1/2 pathway. *Drug Develop. Res.* 59: 161-170.
- Brändle, U., Spielmanns, P., Osteroth, R., Sim, J., Surprenant, A., Buell, G., Ruppersberg, J. P., Plinkert, P. K., Zenner, H. P., Glowatzki, E.** 1997. Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett.* 404: 294-298.
- Braun, N., Sevigny, J., Mishra, S. K., Robson, S. C., Barth, S. W., Gerstberger, R., Hammer, K., Zimmermann, H.** 2003. Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 17: 1355-1364.

- Braun, N. & Zimmermann, H.** 2001. Microglial ectonucleotidases: Identification and functional roles. *Drug Develop. Res.* 53: 208-217.
- Braun, N., Sevigny, J., Robson, S. C., Enjvoji, K., Guckelberger, O., Hammer, K., Di Virgilio, F., Zimmermann, H.** 2000. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur. J. Neurosci.* 12: 4357-4366.
- Brawer, J. R.** 1971. The role of the arcuate nucleus in the brain-pituitary-gonad axis. *J. Comp. Neurol.* 143: 411-445.
- Bray, G. A.** 1996. Static theories in a dynamic world: a glucodynamic theory of food intake. *Obes. Res.* 4: 489-492.
- Brenner, D. & Gerstberger, R.** 1999. Functional receptors in the avian kidney for C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 140: 1622-1629.
- Brobeck, J. R.** 1946. Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol. Rev.* 26: 541-559.
- Broberger, C. & Hökfelt, T.** 2001. Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol. Behav.* 74: 669-682.
- Broberger, C., Landry, M., Wong, H., Walsh, J. N., Hökfelt, T.** 1997. Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology.* 66: 393-408.
- Brosenitsch, T. A., Adachi, T., Lipski, J., Housley, G. D., Funk, G. D.** 2005. Developmental downregulation of P2X3 receptors in motoneurons of the compact formation of the nucleus ambiguus. *Eur. J. Neurosci.* 22: 809-824.
- Brown, D. A., Filippov, A. K., Barnard, E. A.** 2000. Inhibition of potassium and calcium currents in neurones by molecularly-defined P2Y receptors. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81: 31-36.
- Brown, S.G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K. A., Burnstock, G., King, B. F.** 2002. Heteromultimeric P2X_{1/2} receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 673-680.
- Brownstein, M. J., Eskay, R. L., Palkovits, M.** 1982. Thyrotropin releasing hormone in the median eminence is in processes of paraventricular nucleus neurons. *Neuropeptides* 2: 197-201.
- Bruno, J. F., Xu, Y., Song, J., Berelowitz, M.** 1993. Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* 133: 2561-2567.
- Bruno, J. F., Xu, Y., Song, J., Berelowitz, M.** 1994. Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in the food-deprived and diabetic rat. *Endocrinology* 135: 1787-1792.
- Buchthal, F. & Folkow, B.** 1948. Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol. Scand.* 15: 150-160.
- Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R. A., Surprenant, A.** 1996. An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J.* 15: 55-62.
- Bunge, R. P., Bunge, M. B., Cochran, M.** 1978. Some factors influencing the proliferation and differentiation of myelin-forming cells. *Neurology* 28: 59-67.
- Burgard, E. C., Niforatos, W., van Biesen, T., Lynch, K. J., Touma, E., Metzger, R. E., Kowaluk, E. A., Jarvis, M. F.** 1999. P2X receptor-mediated ionic currents in dorsal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* 82: 1590-1598.
- Burnstock, G.** 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach* [Straub, R. W. & Bolis, L. eds]. Raven Press. New York. 107-118.
- Burnstock, G.** 1981. Review lecture. Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. *J. Physiol.* 313: 1-35.

- Burnstock, G.** 2001. Purinergic signalling in lower urinary tract. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Purinergic and Pyrimidinergic Signalling I - Molecular, Nervous and Urinogenitary System Function [Abbracchio, M.P. & Williams, M., eds]. Volume 151/I. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin. 423-515.
- Burnstock, G.** 2002. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 364-373.
- Burnstock, G.** 2004. Introduction: P2 receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 4: 793-803.
- Burnstock, G.** 2006a. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27: 166-176.
- Burnstock, G.** 2006b. Purinergic signaling. *Br. J. Pharmacol.* 147: 172-181.
- Burnstock, G.** 2007a. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87: 659-797.
- Burnstock, G.** 2007b. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol. Life Sci.* 64: 1471-1483.
- Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D., Smythe, A.** 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.* 40: 668-688.
- Burnstock, G. & Holman, M. E.** 1961. The transmission of excitation from autonomic nerve to smooth muscle. *J. Physiol.* 155: 115-133.
- Burnstock, G. & Kennedy, C.** 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P₂-purinoceptor. *Gen. Pharmacol.* 16: 433-440.
- Burnstock, G. & Knight, G. E.** 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240: 31-304.
- Burnstock, G. & Verkhratsky, A.** 2012. Purinergic signaling and the nervous system. Springer-Verlag GmbH. Heidelberg-Berlin.
- Burton, K. A., Kabigting, E. B., Clifton, D. K., Steiner, R. A.** 1992. Growth hormone receptor message ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalisation in hypothalamic somatostatin neurones. *Endocrinology* 131: 958-963.
- Buvinic, S., Briones, R., Huidobro-Toro, J. P.** 2002. P2Y(1) and P2Y(2) receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Br. J. Pharmacol.* 136: 847-856.
- Cai, X. J., Widdowson, P. S., Harrold, J., Wilson, S., Buckingham, R. E., Arch, J. R., Tadayyon, M., Clapham, J. C., Wilding, J., Williams, G.** 1999. Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48: 2132-2137.
- Canonica, P. L., Valdenegro, C. A., Of, W. I. T. A., MacLeod, R. M., O'Dell, A. N. H.** 1983. The inhibition of phosphatidylinositol turnover: a possible postreceptor mechanism for the prolactin secretion-inhibiting effect of dopamine. *Endocrinology* 113: 7-14.
- Cardullo, R. A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P. C., Wolf, D. E.** 1988. Detection of nucleic acid hybridization by non-radioactive fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 8790-8794.
- Carrasquero, L. M., Delicado, E. G., Jimenez, A. I., Perez-Sen, R., Miras-Portugal, M. T.** 2005. Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y(13)-like receptors. *Purinergic Signal.* 1: 153-159.
- Cavaliere, F., Sancesario, G., Bernardi, G., Volonté, C.** 2002. Extracellular ATP and nerve growth factor intensify hypoglycemia-induced cell death in primary neurons: role of P2 and NGFRp75 receptors. *J. Neurochem.* 83: 1129-1138.
- Chakfe, Y., Seguin, R., Antel, J. P., Morissette, C., Malo, D., Henderson, D., Seguela, P.** 2002. ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels. *J. Neurosci.* 22: 3061-3069.
- Cham, J. L., Owens, N. C., Barden, J. A., Lawrence, A. J., Badoer, E.** 2006. P2X purinoceptor subtypes on paraventricular nucleus neurones projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Exp. Physiol.* 91: 403-411.

- Chan-Palay, V., Záborszky, L., Köhler, C., Goldstein, M., Palay, S. L.** 1984. Distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the hypothalamus of rats. *J. Comp. Neurol.* 227: 467-496.
- Chang, K., Hanaoka, K., Kumada, M., Takuwa, Y.** 1995. Molecular cloning and functional analysis of a novel P₂ nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 26152-26158.
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., Wood, J. N.** 1995. A P₂x purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377: 428-431.
- Chen, W. W., Niepel, M., Sorger, P. K.** 2010. Classic and contemporary approaches to modeling biochemical reactions. *Genes Dev.* 24: 1861-1875.
- Chen, Z. P., Kratzmeier, M., Levy, A. McArdle, C. A., Poch, A., Mukhopadhyay, A. K., Lightman, S. L.** 1995. Evidence for a role of pituitary ATP receptors in the regulation of pituitary function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 5219-5223.
- Chen, Z. P., Levy, A., McArdle, C.A., Lightman, S. L.** 1994. Pituitary ATP receptors: characterization and functional localization to gonadotropes. *Endocrinology* 135: 1280-1283.
- Cheng, H. C.** 2001. The power issue: determination of K_B or K_i from IC₅₀. A closer look at the Cheng-Prusoff equation, the Schild plot and related power equations. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 46: 61-71.
- Cheng, Y. & Prusoff, W. H.** 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108.
- Chessell, I. P., Hatcher, J. P., Bountra, C., Michel, A. D., Hughes, J. P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W. L., Grahames, C. B., Casula, M. A., Yiangou, Y., Birch, R., Anand, P., Buell, G. N.** 2005. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114: 386-396.
- Chessell, I. P., Michel, A. D. Humphrey, P. P.** 1997. Properties of the pore-forming P2X7 purinoceptor in mouse NTW8 microglial cells. *Br. J. Pharmacol.* 121: 1429-1437.
- Cheung, K. K. & Burnstock, G.** 2002. Localization of P2X3 receptors and coexpression with P2X2 receptors during rat embryonic neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 443: 368-382.
- Cheung, K. K., Chan, W. Y., Burnstock, G.** 2005. Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience* 133: 937-945.
- Cheung, K. K., Ryten, M., Burnstock, G.** 2003. Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Dev. Dyn.* 228: 254-266.
- Choi, H. B., Ryu, J. K., Kim, S. U., McLarnon, J. G.** 2007. Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *J. Neurosci.* 27: 4957-4968.
- Chow, Y. W. & Wang, H. L.** 1998. Functional modulation of P2X2 receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* 70: 2606-2612.
- Christensen, H. R., Zeng, Q., Murawsky, M. K., Gregerson, K. A.** 2011. Estrogen regulation of the dopamine-activated GIRK channel in pituitary lactotrophs: implications for regulation of prolactin release during the estrous cycle. *Am. J. Physiol.* 301: R746-R756.
- Chronwall, B. M.** 1985. Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides* 6: 1-11.
- Chronwall, B. M. & Zukowska, Z.** 2004. Neuropeptide Y, ubiquitous and elusive. *Peptides.* 25: 359-363.
- Clark, R. G., Carlsson, L. M., Robinson, I. C.** 1988. Growth hormone (GH) secretion in the conscious rat: negative feedback of GH on its own release. *J. Endocrinol.* 119: 201-209.
- Chung, H. S., Park, K. S., Cha, S. K., Kong, I. D., Lee, J. W.** 2000. ATP-induced [Ca²⁺]_i changes and depolarization in GH3 cells. *Br. J. Pharmacol.* 130: 1843-1852.

- Clyne, J. D., LaPointe, L. D., Hume, R. I.** 2002. The role of histidine residues in modulation of the rat P2X₂ purinoceptor by zinc and pH. *J. Physiol.* 539: 347-359.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., Verderio, C.** 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J. Biol. Chem.* 278: 1354-1362.
- Codocedo, J. F., Godoy, J. A., Poblete, M. I., Inestrosa, N. C., Huidobro-Toro, J. P.** 2013. ATP induces NO production in hippocampal neurons by P2X₇ receptor activation independent of glutamate signaling. *PLoS ONE.* 8: e57626.
- Coddou, C., Stojilkovic, S. S., Huidobro-Toro, J. P.** 2011a. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev. Neurosci.* 22: 335-354.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., Stojilkovic, S. S.** 2011b. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* 63: 641-683.
- Collén, G., Mangano, C., Meister, B.** 2010. P2X₂ purinoreceptor protein in hypothalamic neurons associated with the regulation of food intake. *Neuroscience* 171: 62-78.
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Kosco-Vilbois, M., North, R. A., Buell, G.** 1997. Tissue distribution of the P2X₇ receptor. *Neuropharmacology* 36: 1277-1283.
- Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A., Buell, G.** 1996. Cloning of P2X₅ and P2X₆ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci.* 16: 2495-2507.
- Communi, D., Robaye, B., Boeynaems, J. M.** 1999. Pharmacological characterization of the human P2Y₁₁ receptor. *Br. J. Pharmacol.* 128: 1199-1206.
- Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., Brezillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M., Boeynaems, J. M.** 2001. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J. Biol. Chem.* 276: 41479-41485.
- Cone, R. D.** 2005. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* 8: 571-578.
- Conrad, L. C., Pfaff, D. W.** 1976a. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J. Comp. Neurol.* 169: 185-219.
- Conrad, L. C. & Pfaff, D. W.** 1976b. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 169: 221-261.
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., Caro, J. F.** 1996. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334: 292-295.
- Cook, S. P. & McCleskey, E. W.** 1997. Desensitization, recovery and Ca²⁺-dependent modulation of ATP-gated P2X receptors in nociceptors. *Neuropharmacology* 36: 1303-1308.
- Coons, A. H.** 1958. Fluorescent antibody methods. *Gen. Cytochem. Methods.* 1: 399-422.
- Corazzini, V. & Salvatori, R.** 2013. Molecular and clinical aspects of GHRH receptor mutations. *Endocr. Dev.* 24: 106-117.
- Cottrell, G. T. & Ferguson, A. V.** 2004. Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Regul. Pept.* 117: 11-23.
- Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W., De Koninck, Y.** 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., Low, M. J.** 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411: 480-484.
- Crain, J. M., Nikodemova, M., Watters, J. J.** 2009. Expression of P2 nucleotide receptors varies with age and sex in murine brain microglia. *J. Neuroinflam.* 6: 24.

- Crain, J. M. & Watters, J. J.** 2010. Estrogen and P2 purinergic receptor systems in microglia: therapeutic targets for neuroprotection. *Open Drug Discov. J.* 2: 148-167.
- Crevat-Pisano, P., Hariton, C., Rolland, P. H., Cano, J. P.** 1986. Fundamental aspects of radioreceptor assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 4: 697-716.
- Cross, B. A. & Leng, G.** 1983. The neurohypophysis: structure, function and control. In: *Progress in Brain Research*. Vol. 60. Elsevier. Amsterdam.
- Cruz, J. C., Bonagamba, L. G. H., Machado, B. H.** 2010. Modulation of the arterial pressure by P2 purinoceptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of awake rats. *Auton. Neurosci. Bas. Clin.* 158: 79-85.
- Custer, E. E., Knott, T. K., Cuadra, A. E., Ortiz-Miranda, S., Lemos, J. R.** 2012. P2X purinergic receptor knockout mice reveal endogenous ATP modulation of both vasopressin and oxytocin release from the intact neurohypophysis. *J. Neuroendocrinol.* 24: 674-680.
- Dahlström, A.** 1968. Effect of colchicine on transport of amine storage granules in sympathetic nerves of rat. *Eur. J. Pharmacol.* 5: 111-113.
- Dahlström, A. & Fuxe, K.** 1964. Evidence for the existence of monoaminergic containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62. Suppl. 232: 1-55.
- Dale, N.** 2011. Purinergic signaling in hypothalamic tanycytes: potential roles in chemosensing. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22: 237-244.
- Dale, N. & Frenguelli, B. G.** 2012. Measurement of purine release with microelectrode biosensors. *Purinergic Signal.* 8: 27-40.
- Dallman, M. F., Strack, A. M., Akana, S. F., Bradbury, M. J., Hanson, E. S., Scribner, K. A., Smith, M.** 1993. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front. Neuroendocrinol.* 14: 303-347.
- Damm, J.** 2012. Charakterisierung der Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 an der Induktion zentralnervös induzierter Krankheitssymptome. Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen. VVB Laufersweiler Verlag. Gießen.
- Darby, M., Kuzmiski, J. B., Panenka, W., Feighan, D., MacVicar, B. A.** 2003. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J. Neurophysiol.* 89: 1870-1877.
- Daré, E., Schulte, G., Karovic, O., Hammarberg, C., Fredholm, B. B.** 2007. Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol. Behav.* 92: 15-20.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., Gan, W. B.** 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8: 752-758.
- Davenport, A. P. & Russel, F. D.** 1996. Radioligand binding assays: theory and practice. In: *Current Directions in Radiopharmaceutical Research* [Mather, S.J. ed]. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 169-179.
- Day, T. A., Sibbald, J. R., Khanna, S.** 1993. ATP mediates an excitatory noradrenergic neuron input to supraoptic vasopressin cells. *Brain Res.* 607: 341-344.
- Delahunty, T. M., Cronin, M. J., Linden, J.** 1988. Regulation of GH₃-cell function via adenosine A₁ receptors. Inhibition of prolactin release, cyclic AMP production and inositol phosphate generation. *Biochem. J.* 255: 69-77.
- Demarest, K. T., McKay, D. W., Riegle, G. D., Moore, K. E.** 1981. Sexual differences in tuberoinfundibular dopamine nerve activity induced by neonatal androgen exposure. *Neuroendocrinology.* 32: 108-113.
- Demaria, J. E., Nagy, G. M., Lerant, A., Fekete, M. I. E., Levenson, C. W., Freeman, M. E.** 2000. Dopamine transporters participate in the physiological regulation of prolactin. *Endocrinology* 141: 366-374.
- DeVito, W. J.** 1988. Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150: 599-604.

- Dietrich, M. O., Horvath, T. L.** 2013. Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 36: 65-73.
- Dil'mukhametova, L. K., Pronina, T. S., Ugrumov, M. V.** 2012. Noradrenaline role in regulation of dopamine-producing neurons in rat arcuate nucleus. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova.* 12: 1507-1519.
- Ding, S. & Sachs, F.** 1999. Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: single channel recordings. *J. Membr. Biol.* 172: 215-223.
- Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P., Abbracchio, M. P.** 2009. Purinergic signaling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci.* 32: 79-87.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J. M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., Baricordi, O. R.** 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97: 587-600.
- Dixon, A. K., Gubitz, A. K., Sirinathsinghji, D. J., Richardson, P. J. Freeman, T. C.** 1996. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 118: 1461-1468.
- Dockray, G. J.** 2009. Cholecystokinin and gut-brain signalling. *Regul. Pept.* 155: 6-10.
- Dolphin, A. C.** 2003. G-protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 65: 607-627.
- Domené, H., Krishnamurthi, K., Eshet, R., Gilad, I., Laron, Z., Koch, I., Stannard, B., Cassorla, F., Roberts, C. T. Jr., LeRoith, D.** 1993. Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I-binding protein-3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats. *Endocrinology* 133: 675-82.
- Dong, C. X. & Brubaker, P. L.** 2012. Ghrelin, the proglucagon-derived peptides and peptide YY in nutrient homeostasis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9: 705-715.
- Doniach, I. & Pelc, S. R.** 1949. Autoradiographs with radio-active iodine. *Proc. R. Soc. Med.* 42: 957-959.
- Dorflinger, L. J. & Schonbrunn, A.** 1985. Adenosine inhibits prolactin and growth hormone secretion in a clonal pituitary cell line. *Endocrinology.* 117: 2330-2338.
- Douglas, A. J., Bicknell, R. J., Leng, G., Russell, J. A., Meddle, S. L.** 2002. Beta-endorphin cells in the arcuate nucleus: projections to the supraoptic nucleus and changes in expression during pregnancy and parturition. *J. Neuroendocrinol.* 14: 768-777.
- Drury, A. N. & Szent-Gyorgyi, A.** 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 68: 213-237.
- Dunn-Meynell, A. A., Govek, E., Levin, B. E.** 1997. Intracarotid glucose selectively increases Fos-like immunoreactivity in paraventricular, ventromedial and dorsomedial nuclei neurons. *Brain Res.* 748: 100-106.
- Dutton, J. L., Poronnik, P., Li, G. H., Holding, C. A., Worthington, R. A., Vandenberg, R. J., Cook, D. I., Barden, J. A., Bennett, M. R.** 2000. P2X(1) receptor membrane redistribution and down-regulation visualized by using receptor-coupled green fluorescent protein chimeras. *Neuropharmacology* 39: 2054-2066.
- Duvernoy, H. M. & Risold, P. Y.** 2007. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res. Rev.* 56: 119-147.
- Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbaek, C., Flier, J. S., Saper, C. B., Elmquist, J. K.** 1999. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775-786.
- Elias, C. F., Saper, C. B., Maratos-Flier, E., Tritos, N. A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J. B., Hoffman, G. E., Ollmann, M. M., Barsh, G. S., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Elmquist, J. K.** 1998. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J. Comp. Neurol.* 402: 442-459.
- Emmelin, N. & Feldberg, W.** 1948. Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 3: 273-284.

- Enjalbert, A. & Bockaert, J.** 1983. Pharmacological characterization of D2 dopamine receptors negatively coupled with adenylate cyclase in the rat anterior pituitary. *Mol. Pharmacol.* 23: 576-584.
- Enjalbert, A., Guillon, G., Mouillac, B., Audinot, V., Rasolonjanahary, R., Kordon, C., Bockaert, J.** 1990. Dual mechanisms of inhibition by dopamine of basal and thyrotropin-releasing hormone-stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. Evidence for an inhibition not mediated by voltage-dependent Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* 265: 18816-18822.
- Ennion, S. J. & Evans, R. J.** 2001. Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X(1) in rat vas deferens. *FEBS Lett.* 489: 154-158.
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I., Weisman, G. A.** 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452: 552-562.
- Espallergues, J., Solovieva, O., Techer, V., Bauer, K., Alonso, G., Vincent, A., Hussy, N.** 2007. Synergistic activation of astrocytes by ATP and norepinephrine in the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience* 148: 712-723.
- Evans, R. J., Lewis, C., Buell, G., North, R. A., Surprenant, A.** 1995. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P_{2X} -purinoceptors). *Mol. Pharmacol.* 48: 178-183.
- Everitt, B. J., Meister, B., Hökfelt, T., Melander, T., Terenius, L., Rökaeus, A., Theodorsson-Norheim, E., Dockray, G., Edwardson, J., Cuello, C., Elde, R., Goldstein, M., Hemmings, H., Ouimet, C., Walaas, I., Greengard, P., Vale, W., Weber, E., Wu, J-Y., Chang, K-J.** 1986. The hypothalamic arcuate nucleus-median eminence complex: Immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence in dopamine neurons. *Brain Res. Rev.* 11: 97-155.
- Färber, K. & Kettenmann, H.** 2005. Physiology of microglial cells. *Brain Res. Rev.* 48: 133-143.
- Färber, K. & Kettenmann, H.** 2006. Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Arch.* 452: 615-621.
- Fam, S., R., Gallagher, C. J., Kalia, L. V., Salter, M. W.** 2003. differential frequency dependence of $P2Y_1$ - and $P2Y_2$ - mediated Ca^{2+} signaling in Astrocytes. *J. Neurosci.* 23: 4437-4444.
- Fan, W., Ellacott, K. L., Halatchev, I. G., Takahashi, K., Yu, P., Cone, R. D.** 2004. Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat. Neurosci.* 7: 335-336.
- Fedan, J. S., Hogaboom, G. K., O'Donnell, J. P., Colby, J., Westfall, D. P.** 1981. Contributions by purines to the neurogenic response of the vas deferens of the guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.* 69: 41-53.
- Fehér, P., Oláh, M., Bodnár, I., Hechtel, D., Bácskay, I., Juhász, B., Nagy, G. M., Vecsernyés, M.** 2010. Dephosphorylation/inactivation of tyrosine hydroxylase at the median eminence of the hypothalamus is required for suckling-induced prolactin and adrenocorticotrophic hormone responses. *Brain Res. Bull.* 82: 141-145.
- Feldberg, W. & Sherwood, P. D.** 1954. Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. *J. Physiol.* 123: 148-167.
- Ferguson, A. V. & Bains, J. S.** 1996. Electrophysiology of the circumventricular organs. *Front. Neuroendocrinol.* 17: 440-475.
- Fernandez-Botran, R.** 2000. Soluble cytokine receptors: novel immunotherapeutic agents. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 9: 497-514.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Melchiorri, L., Baricordi, O. R., Di Virgilio, F.** 1997c. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol.* 159: 1451-1458.
- Fields, D., Burnstock, G.** 2006. Purinergic signaling in neuron-glia interactions. *Nature. Neurosci. Rev.* 7: 423-436.

- Fioramonti, X., Contié, S., Song, Z., Routh, V. H., Lorsignol, A., Pénicaud, L.** 2007. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin networks? *Diabetes* 56: 1219-1227.
- Filippov, A. K., Brown, D. A., Barnard, E. A.** 2000. The P2Y₁ receptor closes the N-type Ca²⁺ channel in neurones, with both adenosine triphosphates and diphosphates as potent agonists. *Br. J. Pharmacol.* 129: 1063-1066.
- Fischer, W., Nörenberg, W., Franke, H., Schaefer, M., Illes, P.** 2009. Increase of intracellular Ca²⁺ by P2Y but not P2X receptors in cultured cortical multipolar neurons of the rat. *J. Comp. Neurol.* 516: 343-359.
- Fiske, C. H. & Subbarow, Y.** 1929. Phosphorus compounds of muscle and liver. *Science* 70: 381-382.
- Fitzgerald, P. & Dinan, T. G.** 2008. Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J. Psychopharmacol.* 22: 12-19.
- Florenzano, F., Viscomi, M. T., Mercaldo, V., Longone, P., Bernardi, G., Bagni, C., Molinari, M., Carrive, P.** 2006. P2X₂R purinergic receptor subunit mRNA and protein are expressed by all hypothalamic hypocretin/orexin neurons. *J. Comp. Neurol.* 498: 58-67.
- Fomina, A. F. & Levitan, E. S.** 1995. Three phases of TRH-induced facilitation of exocytosis by single lactotrophs. *J. Neurosci.* 15: 4982-4991.
- Ford, A. P., Gever, J. R., Nunn, P. A., Zhong, Y., Cefalu, J. S., Dillon, M. P., Cockayne, D. A.** 2006. Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* 147: S132-143.
- Förster, Th.** 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Annalen der Physik.* 6. Folge. Band 2. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. 55-75.
- Frangakis, M. V., Kimelberg, H. K.** 1984. Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. *Neurochem. Res.* 9: 1689-1698.
- Franke, H., Grosche, J., Schädlich, H., Krugel, U., Allgaier, C., Illes, P.** 2001a. P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 108: 421-429.
- Franke, H., Krugel, U., Grosche, J., Heine, C., Hartig, W., Allgaier, C., Illes, P.** 2004. P2Y receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 127: 431-441.
- Franke, H., Krugel U., Illes, P.** 1999. P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. *Glia* 28: 190-200.
- Franke, H., Krugel, U., Schmidt, R., Grosche, J., Reichenbach, A., Illes, P.** 2001b. P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 134: 1180-1189.
- Franke, H., Verkhratsky, A., Burnstock, G., Illes, P.** 2012. Pathophysiology of astroglial purinergic signaling. *Purinergic Signal.* 8: 629-657.
- Frawley, L. S. & Boockfor, F. R.** 1986. Focusing on hormone release. *Nature* 321: 793-793.
- Frawley, L. S., Clark, C. L., Schoderbek, W. E., Hoeffler, J. P., Boockfor, F. R.** 1986. A novel bioassay for lactogenic activity: demonstration that prolactin cells differ from one another in bio- and immuno-potencies of secreted hormone. *Endocrinology.* 119: 2867-2869.
- Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., Linden, J.** 2001. International union of pharmacology. XXV. nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53: 527-552.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G.** 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80: 1523-1631.
- Freist, W., Verhey, J. F., Stühmer, W., Gauss, D. H.** 1998. ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthases. *FEBS Lett.* 434: 61-65.
- Fu, J., Yu, Q., Guo, W., He, C., Burnstock, G., Xiang, Z.** 2009. P2X receptors are expressed on neurons containing luteinizing hormone-releasing hormone in the mouse hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 458: 32-36.

- Fumagalli, M., Brambilla, R., D'Ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Verderio, C., Abbraccio, M. P.** 2003. Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43: 218-203.
- Galligan, J. J.** 2004. Enteric P2X receptors as potential targets for drug treatment of the irritable bowel syndrome. *Br. J. Pharmacol.* 141: 1294-1302.
- Gallopin, T., Luppi, P. H., Cauli, B., Urade, Y., Rossier, J., Hayaishi, O., Lambolez, B., Fort, P.** 2005. The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* 134: 1377-1390.
- Gan, E. H. & Quinton, R.** 2010. Physiological significance of the rhythmic secretion of hypothalamic and pituitary hormones. *Prog. Brain Res.* 181: 111-126.
- Ganten, D., Ruckpaul, K., Köhrle, J.** 2006. Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen. Springer-Verlag GmbH. Heidelberg-Berlin.
- Gao, Q. & Horvath, T. L.** 2008. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am. J. Physiol.* 294: E817-E826.
- Garcia-Guzman, M., Soto, F., Laube, B., Stühmer, W.** 1996. Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett.* 388: 123-127.
- Garcia-Guzman, M., Soto, F., Gomez-Hernandez, J. M., Lund, P. E., Stühmer, W.** 1997. Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol. Pharmacol.* 51: 109-118.
- Garden, G. A., Möller, T.** 2006. Microglial biology in health and disease, *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1: 127-137.
- Gebke, E., Müller, A. R., Jurzak, M., Gerstberger, R.** 1998. Angiotensin II-induced calcium signaling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 85: 509-520.
- Gebke, E., Müller, A. R., Pehl, U., Gerstberger, R.** 2000. Astrocytes in sensory circumventricular organs of the rat brain express functional binding sites for endothelin. *Neuroscience* 97: 371-381.
- Gerstberger, R.** 1999. Nitric oxide and body temperature control. *News Physiol. Sci.* 14: 30-36.
- Gerstberger, R., Barth, S. W., Horowitz, M., Hudl, K., Panagiotis, P., Hübschle, T.** 2001. Differential activation of rat hypothalamic neurons by heat exposure and dehydration. In: *Thermotherapy: Principles and Practice - Applications in Neoplasia, Inflammation and Pain* [Kosaka, M., Sugahara, T., Schmidt, K. L., Simon, E. eds]. Springer-Verlag GmbH. Heidelberg-Berlin. 43-62.
- Gever, J. R., Cockayne, D. A., Dillon, M. P., Burnstock, G., Ford, A. P.** 2006. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 452: 513-537.
- Gibbs, D. M.** 1984. High concentrations of oxytocin in hypophysial portal plasma. *Endocrinology* 114: 1216-1218.
- Gillespie, J. H.** 1934. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol.* 80: 345-359.
- Ginsborg, B. L. & Hirst, G. D. S.** 1972. The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J. Physiol.* 224: 629-645.
- Glass, R., Townsend-Nicholson, A., Burnstock, G.** 2000. P2 receptors in the thymus: expression of P2X and P2Y receptors in adult rats, an immunohistochemical and in situ hybridisation study. *Cell Tissue Res.* 300: 295-306.
- Goldenberg, N. & Barkan, A.** 2007. Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 36: 37-55.
- Gomes, D. A., Song, Z., Stevens, W., Sladek, C. D.** 2009. Sustained stimulation of vasopressin and oxytocin release by ATP and phenylephrine requires recruitment of desensitization-resistant P2X purinergic receptors. *Am. J. Physiol.* 297: R940-R949.

- Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J., Miras-Portugal, M. T., Pintor, J.** 2000. Adenosine 5'-tetrphosphate (Ap(4)), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P2 receptors. *Neuropharmacology* 39: 2381-2390.
- Gordon, G. R., Iremonger, K. J., Kantevari, S., Ellis-Davies, G. C., MacVicar, B. A., Bains, J. S.** 2009. Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses. *Neuron* 64: 391-403.
- Goudreau, J. L., Falls, W. M., Lookingland, K. J., Moore, K. E.** 1995. Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 62: 147-154.
- Gourine, A. V.** 1995. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. *Gen. Pharmacol.* 26: 835-841.
- Gourine, A. V. & Kasparov, S.** 2011. Astrocytes as brain interoceptors. *Exp. Physiol.* 96: 411-416.
- Gourine, A. V., Melenchuk, E. V., Poputnikov, D. M., Gourine, V. N., Spyer, K. M.** 2002. Involvement of purinergic signaling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. *Br. J. Pharmacol.* 135: 2047-2055.
- Griffond, B., Colard, C., Deray, A., Fellmann, D., Bugnon, C.** 1994. Evidence for the expression of dynorphin gene in the prolactin-immunoreactive neurons of the rat lateral hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 165: 89-92.
- Gross, P. M.** 1992. Circumventricular organ capillaries. *Prog. Brain Res.* 91: 219-233.
- Grossman, A., Savage, M.O., Besser, G. M.** 1986. Growth hormone releasing hormone. *Clin. Endocrinol. Metab.* 15: 607-627.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y.** 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
- Gualix, J., Pintor, J., Miras-Portugal, M. T.** 1999. Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 73: 1098-1104.
- Guan, X. M., Yu, H., Palyha, O. C., McKee, K. K., Feighner, S. D., Sirinathsinghji, D. J., Smith, R. G., Van der Ploeg, L. H., Howard, A. D.** 1997. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Mol. Brain Res.* 48: 23-29.
- Gruber, K. A. & Callahan, M. F.** 1989. ACTH-(4-10) through gamma-MSH: evidence for a new class of central autonomic nervous system-regulating peptides. *Am. J. Physiol.* 257: R681-R694.
- Gudelsky, G. A., Berry, S. A., Meltzer, H. Y.** 1989. Neurotensin activates tuberoinfundibular dopamine neurons and increases serum corticosterone concentrations in the rat. *Neuroendocrinology* 49: 604-609.
- Gudelsky, G. A. & Porter, J. C.** 1980. Release of dopamine from tuberoinfundibular neurons into pituitary stalk blood after prolactin or haloperidol administration. *Endocrinology* 106: 526-529.
- Guo, D., von Kügelgen, I., Moro, S., Kim, Y. C., Jacobson, K. A.** 2002. Evidence for the recognition of non-nucleotide antagonists within the transmembrane domains of the human P2Y(1) receptor. *Drug Dev. Res.* 57: 173-181.
- Guo, L. H., Guo, K. T., Wendel, H. P., Schluesener, H. J.** 2006. Combinations of TLR and NOD2 ligands stimulate rat microglial P2X4R expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 1156-1162.
- Guo, W., Xu, X., Gao, X., Burnstock, G., He, C., Xiang, Z.** 2008. Expression of P2X5 receptors in the mouse CNS. *Neuroscience* 156: 673-692.
- Guthrie, P. B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V., Charles, A. C., Kater, S. B.** 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci.* 19: 520-528.
- Gyllensten, U. B. & Erlich, H. A.** 1988. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 7652-7656.

- Håkansson, M. L., Hulting, A. L., Meister, B.** 1996. Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus - relationship with NPY neurones. *Neuroreport* 7: 3087-3092.
- Halász, B.** 2000. The hypothalamus as an endocrine organ. In: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine* [Conn, P. E. & Freeman, M. E. eds]. Part I. The Humana Press. New Jersey. 3-21.
- Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J., Lefkowitz, R. J.** 1998. A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 8496-8501.
- Hansen, B. L., Hansen, G. N., Hagen, C.** 1982. Immunoreactive material resembling ovine prolactin in perikarya and nerve terminals of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 226: 121-131.
- Harlow, E. & Lane, D.** 1988. *Antibodies - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Harnisch, U. K. & Kettenmann, H.** 2007. Microglia: active sensors and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neurosci.* 10: 1387-1394.
- Harrold, J. A., Dovey, T. M., Blundell, J. E., Halford, J. C.** 2012. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* 63: 3-17.
- Harrold, J. A., Dovey, T., Cai, X. J., Halford, J. C., Pinkney, J.** 2008. Autoradiographic analysis of ghrelin receptors in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1196: 59-64.
- Hassinger, T. D., Guthrie, P. B., Atkinson, P. B., Bennett, M. V., Kater, S. B.** 1996. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 13268-13273.
- Hastings, J. W., Mitchell, G., Mattingly, P. H., Blinks, J. R., Van Leeuwen, M.** 1969. Response of aequorin bioluminescence to rapid changes in calcium concentration. *Nature* 222: 1047-1050.
- Hatzelmann, T.** 2012. Immunohistochemische, zellbiologische und physiologische *in vivo* Untersuchungen zum Apelin/APJ System in Hypothalamus und Hypophyse der Ratte. Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen und dem Institut für Tierphysiologie (Fachbereich Biologie) der Philipps-Universität Marburg.
- Hatzelmann, T., Harden, L. M., Roth, J., Gerstberger, R.** 2013. Antipyretic effect of central [Pyr¹]apelin₁₃ on LPS-induced fever in the rat. *Regul. Pept.* 184: 6-13.
- Haydon, P. G.** 2001. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 185-193.
- Haymes, A. A. & Hinkle, P. M.** 1993. Activation of protein kinase C increases Ca²⁺ sensitivity of secretory response of GH₃ pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 264: C1020-C1028.
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W. B., Julius D.** 2006. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9: 1512-1519.
- He, M. L., Gonzalez-Iglesias, A. E., Stojilkovic, S. S.** 2003a. Role of nucleotide P2 receptors in calcium signaling and prolactin release in pituitary lactotrophs. *J. Biol. Chem.* 278: 46270-46277.
- He, M. L., Gonzalez-Iglesias, A. E., Tomic, M., Stojilkovic, S. S.** 2005. Release and extracellular metabolism of ATP by ecto-nucleotidase eNTPDase 1-3 in hypothalamic and pituitary cells. *Purinergic Signal.* 1: 135-144.
- He, M. L., Zemkova, H., Stojilkovic, S. S.** 2003b. Dependence of purinergic P2X receptor activity on ectodomain structure. *J. Biol. Chem.* 278: 10182-10188.
- Hechler, B., Nonne, C., Roh, E. J., Cattaneo, M., Cazenave, J. P., Lanza, F., Jacobson, K. A., Gachet, C.** 2006. MRS2500 [2-iodo-N⁶-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadeno-

- sine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y₁ receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316: 556-563.
- Henry, B. A.** 2007. Hypothalamic control of food intake and body weight. In: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & Sons. Ltd. Chichester.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Cullinan, W. E.** 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24: 151-180.
- Hervás, C., Pérez-Sen, R., Miras-Portugal, M. T.** 2003. Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 73: 384-399.
- Hetherington, A. W. & Ranson, S. W.** 1940. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat. Rec.* 78: 149-172.
- Hibell, A. D., Kidd, E. J., Chessell, I. P., Humphrey, P. P., Michel, A. D.** 2000. Apparent species differences in the kinetic properties of P2X₇ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 130: 167-173.
- Hide, I., Tanaka, M., Inoue, A., Nakajima, K., Kohsaka, S., Inoue, K., Nakata, Y.** 2000. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia. *J. Neurochem.* 75: 965-972.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)* 10: 413-417.
- Hille, B.** 1994. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 17: 531-536.
- Hindley, S., Herman, M. A., Rathbone, M. P.** 1994. Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extracellular adenosine diphosphate or an adenosine A₂ receptor agonist. *J. Neurosci. Res.* 38: 399-406.
- Hinman, L. E. & Sammak, P. J.** 1998. Intensity modulation of pseudocolor images. *Biotechniques.* 25: 124-128.
- Hisano, S., Tsuruo, Y., Kagotani, Y., Daikoku, S., Chihara, K.** 1990. Immunohistochemical evidence for synaptic connections between neuropeptide Y-containing axons and periventricular somatostatin neurons in the anterior hypothalamus in rats. *Brain Res.* 520: 170-177.
- Hitzel, N.** 2009. Charakterisierung ionotroper purinergere Rezeptoren im Nucleus medianus praeopticus des anterioren Hypothalamus der Ratte. Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen. VVB Laufersweiler Verlag. Giessen.
- Hofer, H.** 1958. Zur Morphologie der circumventricularen Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. *Zool. Anz. (Suppl.)* 22: 203-251.
- Hökfelt, T., Everitt, B. J., Theodorsson-Norheim, E., Goldstein, M.** 1984. Occurrence of neurotensin-like immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J. Comp. Neurol.* 222: 243-259.
- Hökfelt, T., Fuxe, K., Johansson, O., Jeffcoate, S., White, N.** 1975. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the central nervous system as revealed with immunohistochemistry. *Eur. J. Pharmacol.* 34: 389-392.
- Holmström, K. M., Marina, N., Baev, A. Y., Wood, N. W., Gourine, A. V., Abramov, A. Y.** 2013. Signaling properties of inorganic polyphosphate in the mammalian brain. *Nat. Commun.* 4: 1362.
- Holton, F. A. & Holton, P.** 1954. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots: a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol.* 126: 124-140.
- Holton, P.** 1959. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol.* 145: 494-504.

- Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., Kohsaka, S.** 2001. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J. Neurosci.* 21: 1975-1982.
- Holzappel, B. & Wickert, L.** 2007. Die quantitative realtime-PCR (qRT-PCR). *Biologie in Unserer Zeit* 37: 120-126.
- Horstmann, E.** 1954. Die Faserglia des Selachiergehirns. *Z. Zellforsch.* 39: 588-617.
- Horváth, S. & Palkovits, M.** 1988. Synaptic interconnections among growth hormone-releasing hormone (GHRH)-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 48: 471-476.
- Horvath, T. L., Diano, S., van den Pol, A. N.** 1999. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J. Neurosci.* 19: 1072-1087.
- Hösli, L., Hösli, E., Uhr, M., Della Briotta, G.** 1987. Electrophysiological evidence for adenosine receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci. Lett.* 79: 108-112.
- Hu, Z. Z., Zhuang, L., Meng, J., Dufau, M. L.** 1998. Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBPbeta and Sp1. *J. Biol. Chem.* 273: 26225-26235.
- Hübschle, T., Mütze, J., Mühlradt, P. F., Korte, S., Gerstberger, R., Roth, J.** 2006. Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *Am. J. Physiol.* 290: R180-R187.
- Hulak, I., Nguyen, C., Girot, P., Boschetti, E.** 1991. Immobilized cibacron blue - leachables, support stability and toxicity on cultured cells. *J. Chromatogr.* 539: 355-362.
- Hung, A. C. & Sun, S. H.** 2002. The P2X₇ receptor-mediated phospholipase D activation is regulated by both PKC-dependent and PKC-independent pathways in a rat brain-derived Type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell. Signal.* 14: 83-92.
- Ibata, Y., Fukui, K., Okamura, H., Kawakami, T., Tanaka, M., Obata, H. L., Tsuto, T., Terubayashi, H., Yanaihara, C., Yanaihara, N.** 1983. Coexistence of dopamine and neurotensin in hypothalamic arcuate and periventricular neurons. *Brain Res.* 269: 177-179.
- Illes, P., Verkhatsky, A., Burnstock, G., Franke, H.** 2012. P2X receptors and their roles in astroglia in the central and peripheral nervous system. *Neuroscientist* 18: 422-438.
- Inoue, K.** 2002. Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40: 156-163.
- Inoue, K.** 2006. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol. Ther.* 109: 210-226.
- Inoue, K., Kato, F., Tsuda, M.** 2010. The modulation of synaptic transmission by the glial purinergic system. *Open Neurosci. J.* 4: 84-92.
- Inoue, K., Nakazawa, K., Ohara-Imaizumi, M., Obama, T., Fujimori, K., Takanaka, A.** 1991. Antagonism by reactive blue 2 but not by brilliant blue G of extracellular ATP-evoked responses in PC12 pheochromocytoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 102: 851-854.
- Inoue, K., Tsuda, M., Koizumi, S.** 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X₄. *J. Pharmacol. Sci.* 94: 112-114.
- Ishibashi, T., Dakin, K. A., Stevens, B., Lee, P. R., Kozlov, S. V., Stewart, C. L., Fields, R. D.** 2006. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49: 823-832.
- Israel, J. M., Kirk, C., Vincent, J.D.** 1987. Electrophysiological responses to dopamine of rat hypophysial cells in lactotroph-enriched primary cultures. *J. Physiol.* 390: 1-22.
- James, G. & Butt, A. M.** 2002. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca²⁺ signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 447: 247-260.

- James, K. A., Bray, J. J., Morgan, I. G., Austin, L.** 1970. The effect of colchicine on the transport of axonal protein in the chicken. *Biochem. J.* 117: 767-771.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J.** 2002. *Immunologie*. Vol. 5. Spektrum Akademischer Verlag. Berlin.
- Jarvis, M. F. & Khakh, B. S.** 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*. 56: 208-215.
- Jarvis, M. F. & Williams, M.** 1989. Direct autoradiographic localization of adenosine A2 receptors in the rat brain using the A2-selective agonist, [³H]CGS 21680. *Eur. J. Pharmacol.* 168: 243-246.
- Jhanwar-Uniyal, M., Beck, B., Jhanwar, Y. S., Burlet, C., Leibowitz, S. F.** 1993. Neuropeptide Y projection from arcuate nucleus to parvocellular division of paraventricular nucleus: specific relation to the ingestion of carbohydrate. *Brain Res.* 631: 97-106.
- Jiang, L. H., Kim, M., Spelta, V., Bo, X., Surprenant, A., North, R. A.** 2003. Subunit arrangement in P2X receptors. *J. Neurosci.* 23: 8903-8910.
- Jiménez, A. I., Castro, E., Communi, D., Boeynaems, J. M., Delicado, E. G., Miras-Portugal, M. T.** 2000. Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes. *J. Neurochem.* 75: 2071-2079.
- Jin, J., Tomlinson, W., Kirk, I. P., Kim, Y. B., Humphries, R. G., Kunapuli, S. P.** 2001. The C6-2B glioma cell P2Y(AC) receptor is pharmacologically and molecularly identical to the platelet P2Y(12) receptor. *Br. J. Pharmacol.* 133: 521-528.
- Jin, Y. H., Bailey, T. W., Li, B. Y., Schild, J. H., Andresen, M. C.** 2004. Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *J. Neurosci.* 24: 4709-4717.
- Jo, Y. H. & Role, L. W.** 2002. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J. Neurosci.* 22: 4794-4804.
- Jo, Y. H. & Schlichter, R.** 1999. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat. Neurosci.* 2: 241-245.
- Jones, C. A., Chessell, I. P., Simon, J., Barnard, E. A., Miller, K. J., Michel, A. D., Humphrey, P. P.** 2000. Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *Br. J. Pharmacol.* 129: 388-394.
- Jurzak, M., Müller, A. R., Schmid, H. A., Gerstberger, R.** 1994. Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis. *Brain Res.* 662: 198-208.
- Jurzak, M., Müller, A. R., Gerstberger, R.** 1995. AVP-fragment peptides induce Ca²⁺ transients in cells cultured from rat circumventricular organs. *Brain Res.* 673: 349-55.
- Jurzak, M., Müller, A. R., Gerstberger, R.** 1995. Characterization of vasopressin receptors in cultured cells derived from the region of rat brain circumventricular organs. *Neuroscience* 65: 1145-1159.
- Kahle, W.** 2001. Nervensystem und Sinnesorgane. In: Taschenatlas der Anatomie. Band 3. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. New York.
- Kanematsu, S., Sawyer, C. H.** 1973. Elevation of plasma prolactin after hypophysial stalk section in the rat. *Endocrinology* 93: 238-241.
- Kanjhan, R., Housley, G. D., Burton, L. D., Christie, D. L., Kippenberger, A., Thorne, P. R., Luo, L., Ryan, A. F.** 1999. Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 407: 11-32.
- Kanjhan, R., Housley, G. D., Thorne, P. R., Christie, D. L., Palmer, D. J., Luo, L., Ryan, A. F.** 1996. Localization of ATP-gated ion channels in cerebellum using P2x₂R subunit-specific antisera. *Neuroreport* 7: 2665-2669.

- Kasymov, V., Larina, O., Castaldo, C., Marina, N., Patrushev, M., Kasparov, S., Gourine, A. V.** 2013. Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia. *J. Neurosci.* 33: 435-441.
- Kawano, H. & Masuko, S.** 2000. Beta-endorphin-, adrenocorticotrophic hormone- and neuro-peptide γ - containing projection fibers from the arcuate hypothalamic nucleus make synaptic contacts onto nucleus preopticus medianus neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *Neuroscience* 98: 555-565.
- Kemp, D. J., Smith, D. B., Foote, S. J., Samaras, N., Peterson, M. G.** 1989. Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 2423-2427.
- Khadra, A., Yan, Z., Coddou, C., Tomić, M., Sherman, A., Stojilkovic, S. S.** 2012. Gating properties of the P2X2a and P2X2b receptor channels: experiments and mathematical modeling. *J. Gen. Physiol.* 139: 333-348.
- Khakh, B. S.** 2001. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 165-174.
- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Seguela, P., Voigt, M., Humphrey, P. P.** 2001. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 53: 107-118.
- Khakh, B. S. & Henderson, G.** 1998. ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol. Pharmacol.* 54: 372-378.
- Khakh, B. S., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V., Labarca, C., Lester, H. A.** 1999. Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J. Neurosci.* 19: 7289-7299.
- Kidd, E. J., Grahames, C. B., Simon, J., Michel, A. D., Barnard, E. A., Humphrey, P. P.** 1995. Localization of P2X purinoceptor transcripts in the rat nervous system. *Mol. Pharmacol.* 48: 569-573.
- Kidd, E. J., Miller, K. J., Sansum, A. J., Humphrey, P. P.** 1998. Evidence for P2X3 receptors in the developing rat brain. *Neuroscience.* 87: 533-539.
- King, B. F., Wildman, S. S., Ziganshina, L. E., Pintor, J., Burnstock, G.** 1997. Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X₂ receptor. *Br. J. Pharmacol.* 121: 1445-1453.
- King, J. C., Williams, T. H., Arimura, A. A.** 1975. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in rat hypothalamus using radioimmunoassay. *J. Anat.* 120: 275-288.
- King, M., Housley, G. D., Raybould, N. P., Greenwood, D., Salih, S. G.** 1998. Expression of ATP-gated ion channels by Reissner's membrane epithelial cells. *Neuroreport* 9: 2467-2474.
- King, P. J., Widdowson, P. S., Doods, H. N., Williams, G.** 1999. Regulation of neuropeptide Y release by neuropeptide Y receptor ligands and calcium channel antagonists in hypothalamic slices. *J. Neurochem.* 73: 641-646.
- King, P. J., Williams, G., Doods, H., Widdowson, P. S.** 2000. Effect of a selective neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist, BIIIE0246 on neuropeptide Y release. *Eur. J. Pharmacol.* 396: 1-3.
- Kittner, H., Franke, H., Fischer, W., Schultheis, N., Krügel, U., Illes, P.** 2003. Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropsychopharmacology* 28: 435-444.
- Kittner, H., Franke, H., Harsch, J. I., El-Ashmawy, I. M., Seidel, B., Krugel, U., Illes, P.** 2006. Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. *Eur. J. Neurosci.* 24: 2049-2056.

- Knott, T. K., Velázquez-Marrero, C., Lemos, J. R.** 2005. ATP elicits inward currents in isolated vasopressinergic neurohypophysial terminals via P2X2 and P2X3 receptors. *Pflugers Arch.* 450: 381-389.
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Tokunaga, A., Noguchi, K.** 2005. Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *J. Comp. Neurol.* 481: 377-390.
- Kobayashi, R. M., Palkovits, M., Kopin, I. J., Jacobowitz, D. M.** 1974. Biochemical mapping of noradrenergic nerves arising from the rat locus coeruleus. *Brain Res.* 77: 269-279.
- Köhler, G., Howe, S. C., Milstein, C.** 1976. Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.* 6: 292-295.
- Köhler, G. & Milstein, C.** 2005. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J. Immunol.* 174: 2453-2455.
- Kohno, D. & Yada, T.** 2012. Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. *Neuropeptides* 46: 315-319.
- Koizumi, S., Saito, Y., Nakazawa, K., Nakajima, K., Sawada, J. I., Kohsaka, S., Illes, P., Inoue, K.** 2002. Spatial and temporal aspects of Ca²⁺ signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes. *Life Sci.* 72: 431-442.
- Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B. V., Jacobson, K. A., Kohsaka, S., Inoue, K.** 2007. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446: 1091-1095.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K.** 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.
- Kopp, M. D., Meissl, H., Dehghani, F., Korf, H. W.** 2001. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates glutamatergic calcium signalling: investigations on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurochem.* 79: 161-171.
- Kopp, M. D., Schomerus, C., Dehghani, F., Korf, H. W., Meissl, H.** 1999. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and melatonin in the suprachiasmatic nucleus: effects on the calcium signal transduction cascade. *J. Neurosci.* 19: 206-219.
- Koshimizu, T. A., Kretschmannova, K., He, M. L., Ueno, S., Tanoue, A., Yanagihara, N., Stojilkovic, S. S., Tsujimoto, G.** 2006. Carboxyl-terminal splicing enhances physical interactions between the cytoplasmic tails of purinergic P2X receptors. *Mol. Pharmacol.* 69: 1588-1598.
- Koshimizu, T. A., Tomic, M., Van Goor, F., Stojilkovic, S. S.** 1998. Functional role of alternative splicing in pituitary P2X2 receptor-channel activation and desensitization. *Mol. Endocrinol.* 12: 901-913.
- Koshimizu, T. A., Tomić, M., Wong, A. O., Zivadinovic, D., Stojilkovic, S. S.** 2000. Characterization of purinergic receptors and receptor-channels expressed in anterior pituitary cells. *Endocrinology* 141: 4091-4099.
- Koshimizu, T. A., Ueno, S., Tanoue, A., Yanagihara, N., Stojilkovic, S. S., Tsujimoto, G.** 2002. Heteromultimerization modulates P2X receptor functions through participating extracellular and C-terminal subdomains. *J. Biol. Chem.* 277: 46891-46899.
- Kow, L. M. & Pfaff, D. W.** 1991. The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38: 359-364.
- Kreutzberg, G. W.** 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19: 312-318.
- Krisch, B., Leonhardt, H., Buchheim, W.** 1978. The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat. *Cell Tissue Res.* 195: 485-497.

- Krisch, B., Leonhardt, H., Oksche, A.** 1983. The meningeal compartments of the median eminence and the cortex. A comparative analysis in the rat. *Cell Tissue Res.* 228: 597-640.
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., Clausen, J. T., Jensen, P. B., Madsen, O. D., Vrang, N., Larsen, P. J., Hastrup, S.** 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76.
- Kukley, M., Barden, J. A., Steinhäuser, C., Jabs, R.** 2001. Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36: 11-21.
- Kullberg, S., Aldskogius, H., Ulfhake, B.** 2001. Microglial activation, emergence of ED1-expressing cells and clusterin upregulation in the aging rat CNS, with special reference to the spinal cord. *Brain Res.* 899: 169-186.
- Kumar, U.** 2007. Colocalization of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) with somatostatin, NADPH-diaphorase (NADPH-d), and tyrosine hydroxylase in the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 504: 185-205.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Parpura, V., Verkhratsky, A.** 2011. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of "excitable" molecules in non-excitable cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1813: 992-1002.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S.P., Rossner, M.J., North, R.A., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A.** 2008. P2X₁ and P2X₅ subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 28: 5473-5480.
- Lamberts, S. W. J., MacLeod, R. M.** 1990. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol. Rev.* 70: 279-318.
- Langhans, W., Geary, N., Lutz, T. A.** 2010. Steuerung der Nahrungsaufnahme. In: *Physiologie der Haustiere* [Engelhardt, W. v. & Breves, G. eds]. Enke Verlag. MSV Medizinverlag Stuttgart GmbH & Co KG. Stuttgart. 616-630.
- Le Brun, I., Dufour, A., Crest, M., Szabó G., Erdelyi, F., Baude, A.** 2008. Differential expression of Nk1 and NK3 neurokinin receptors in neurons of the nucleus tractus solitarius and the dorsal vagal motor nucleus of the rat and mouse. *Neuroscience* 152: 56-64.
- Lê, K. T., Paquet, M., Nouel, D., Babinski, K., Séguéla, P.** 1997. Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system. *FEBS Lett.* 418: 195-199.
- Lê, K. T., Villeneuve, P., Ramjaun, A. R., McPherson, P. S., Beaudet, A., Séguéla, P.** 1998. Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* 83: 177-190.
- Lecca, D., Ceruti, S., Fumagalli, M., Abbracchio, M. P.** 2012. Purinergic trophic signalling in glial cells: functional effects and modulation of cell proliferation, differentiation, and death. *Purinergic Signal.* 8: 539-557.
- Lechan, R. M., Jackson, I. M. D.** 1982. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 111: 55-65.
- Lee, D. A. & Witzemann, V.** 1983. Photoaffinity labeling of a synaptic vesicle specific nucleotide transport system from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry* 22: 6123-6130.
- Lee, H. Y., Bardini, M., Burnstock, G.** 2000. Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J. Urol.* 163: 2002-2007.
- Lee, S. Y., Wolff, S. C., Nicholas, R. A., O'Grady, S. M.** 2003. P2Y receptors modulate ion channel function through interactions involving the C-terminal domain. *Mol. Pharmacol.* 63: 878-885.
- Le Feuvre, R., Brough, D., Rothwell, N.** 2002. Extracellular ATP and P2X₇ receptors in neurodegeneration. *Eur. J. Pharmacol.* 447: 261-269.
- Leibowitz, S. F., Wortley, K. E.** 2004. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25: 473-504.

- Lemos, J. R., Ortiz-Miranda, S. I., Cuadra, A. E., Velázquez-Marrero, C., Custer, E. E., Dad, T., Dayanithi, G.** 2012. Modulation/physiology of calcium channel sub-types in neurosecretory terminals. *Cell Calcium* 51: 284-292.
- Leng, G., Yamashita, H., Dyball, R. E., Bunting, R.** 1988. Electrophysiological evidence for a projection from the arcuate nucleus to the supraoptic nucleus. *Neurosci. Lett.* 89: 146-151.
- Lenz, G., Gottfried, C., Luo, Z., Avruch, J., Rodnight, R., Nie, W-J., Kang, Y., Neary, J. T.** 2000. P2Y purinoceptor subtypes recruit different MEK activators in astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 129: 927-936.
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G., Surprenant, A.** 1995. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377: 432-435.
- Lewis, C. J., Surprenant, A., Evans, R. J.** 1998. 2',3'-O-(2,4,6- trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP) - a nanomolar affinity antagonist at rat mesenteric artery P2X receptor ion channels. *Br. J. Pharmacol.* 124: 1463-1466.
- Li, S. & Pelletier, G.** 1986. The role of dopamine in the control of neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* 69: 74-77.
- Lin, J. W., Sugimori, M., Llinás, R. R., McGuinness, T. L., Greengard, P.** 1990. Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 8257-8261.
- Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qiu, X., de Jong, P. J., Nishino, S., Mignot, E.** 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98: 365-376.
- Lin, S., Boey, D., Couzens, M., Lee, N., Sainsbury, A., Herzog, H.** 2005. Compensatory changes in [125I]-PYY binding in Y receptor knockout mice suggest the potential existence of further Y receptor(s). *Neuropeptides* 39: 21-28.
- Linden, J., Thai, T., Figler, H., Jin, X., Robeva, A. S.** 1999. Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* 56: 705-713.
- Liu, M., King, B. F., Dunn, P. M., Rong, W., Townsend-Nicholson, A., Burnstock, G.** 2001. Coexpression of P2X(3) and P2X(2) receptor subunits in varying amounts generates heterogeneous populations of P2X receptors that evoke a spectrum of agonist responses comparable to that seen in sensory neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296: 1043-1050.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K.** 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4: 357-362.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Loesch, A. & Burnstock, G.** 1998. Electron-immunocytochemical localization of P2X1 receptors in the rat cerebellum. *Cell Tissue Res.* 294: 253-260.
- Loesch, A. & Burnstock, G.** 2001. Immunoreactivity to P2X(6) receptors in the rat hypothalamo-neurohypophysial system: an ultrastructural study with extravidin and colloidal gold-silver labelling. *Neuroscience* 106: 621-631.
- Loesch, A., Miah, S., Burnstock, G.** 1999. Ultrastructural localisation of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial system. *J. Neurocytol.* 28: 495-504.
- London, A., Cohen, M., Schwartz, M.** 2013. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front. Cell Neurosci.* 7: 34.
- Londos, C., Cooper, D. M., Wolff, J.** 1980. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 2551-2554.

- Lu, D., Willard, D., Patel, I. R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R. P., Wilkison, W. O.** 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371: 799-802.
- Lumpkin, M. D., Samson, W. K., McCann, S. M.** 1983. Hypothalamic and pituitary sites of action of oxytocin to alter prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 112: 1711-1718.
- Luqmani, Y. A.** 1981. Nucleotide uptake by isolated cholinergic synaptic vesicles: evidence for a carrier of adenosine 5'-triphosphate. *Neuroscience* 6: 1011-1021.
- Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Kage, K. L., Burgard, E. C., van Biesen, T., Kowaluk, E. A., Jarvis, M. F.** 1999. Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol. Pharmacol.* 56: 1171-1181.
- Ma, F. Y., Anderson, G. M., Gunn, T. D., Goffin, V., Grattan, D. R., Bunn, S. J.** 2005. Prolactin specifically activates signal transducer and activator of transcription 5b in neuroendocrine dopaminergic neurons. *Endocrinology* 146: 5112-5119.
- Mains, R. E., Eipper, B. A., Ling, N.** 1977. Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 3014-3018.
- Margaroli, A., Milani, D., Meldolesi, J., Pozzan, T.** 1987. Fura-2 measurement of cytosolic free Ca²⁺ in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J. Cell Biol.* 105: 2145-2155.
- Mangurian, L. P., Walsh, R. J., Posner, B. I.** 1992. Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology* 131: 698-702.
- Mano-Otagiri, A., Nemoto, T., Sekino, A., Yamauchi, N., Shuto, Y., Sugihara, H., Oikawa, S., Shibasaki, T.** 2006. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in the arcuate nucleus (Arc) of the hypothalamus are decreased in transgenic rats whose expression of ghrelin receptor is attenuated: Evidence that ghrelin receptor is involved in the up-regulation of GHRH expression in the arc. *Endocrinology* 147: 4093-4103.
- Mantegazza, M., Yu, F. H., Powell, A. J., Clare, J. J., Catterall, W. A., Scheuer, T.** 2005. Molecular determinants for modulation of persistent sodium current by G-protein betagamma subunits. *J. Neurosci.* 25: 3341-3349.
- Maood, N. & Meister, B.** 2008. Dynorphin in pro-opiomelanocortin neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience* 154: 1121-1131.
- Matsumoto, N., Sorimachi, M., Akaike, N.** 2004. Excitatory effects of ATP on rat dorsomedial hypothalamic neurons. *Brain Res.* 1009: 234-237.
- Mazia, D., Schatten, G., Sale, W.** 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J. Cell Biol.* 66: 198-200.
- McIlvain, H. B., Ma, L., Ludwig, B., Manners, M. T., Martone, R. L., Dunlop, J., Kaftan, E. J., Kennedy, J. D., Whiteside, G. T.** 2010. Purinergic receptor-mediated morphological changes in microglia are transient and independent from inflammatory cytokine release. *Eur. J. Pharmacol.* 643: 202-210.
- McKinley, M. J., McAllen, R. M., Davern, P., Giles, M. E., Penschow, J., Sunn, N., Uschakov, A., Oldfield, B. J.** 2003. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 172: III-XII. 1-122.
- Mehta, V. B., Hart, J., Wewers, M. D.** 2001. ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *J. Biol. Chem.* 276: 3820-3826.
- Meister, B.** 2007. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* 92: 263-271.
- Meister, B., Gömüç, B., Suarez, E., Ishii, Y., Dürr, K., Gillberg, L.** 2006. Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. *Eur. J. Neurosci.* 24: 2731-2740.
- Meister, B. & Hökfelt, T.** 1988. Peptide- and transmitter-containing neurons in the medio-basal hypothalamus and their relation to GABAergic systems: Possible roles in control of prolactin and growth hormone. *Synapse* 2: 585-605.

- Meister, B. & Hakansson, M. L.** 2001. Leptin receptors in hypothalamus and circumventricular organs. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28: 610-617.
- Memo, M., Carboni, E., Trabucchi, M., Carruba, M. O., Spano, P. F.** 1985. Dopamine inhibition of neurotensin-induced increase in Ca^{2+} influx into rat pituitary cells. *Brain Res.* 347: 253-257.
- Meomartini, M. E., Amadio, S., Visentin, S., Franchini, L., Aloisi, F., Volontà, C., Agresti, C.** 2003. Expression and functional analysis of P2 receptors in oligodendrocytes. *Glia* 43: 59.
- Merenthaler, I. & Lennard, D. E.** 1991. The hypophysiotropic neurotensin-immunoreactive neuronal system of the rat brain. *Endocrinology* 129: 2875-2880.
- Meyer, M. P., Gröschel-Stewart, U., Robson, T., Burnstock, G.** 1999. Expression of two ATP-gated ion channels, P2X5 and P2X6, in developing chick skeletal muscle. *Dev. Dyn.* 216: 442-449.
- Michel, A. D., Miller, K. J., Lundström, K., Buell, G. N., Humphrey, P. P.** 1997. Radiolabeling of the rat P2X4 purinoceptor: evidence for allosteric interactions of purinoceptor antagonists and monovalent cations with P2X purinoceptors. *Mol. Pharmacol.* 51: 524-532.
- Milenkovic, L., Parlow, A. F., McCann, S. M.** 1990. Physiological significance of the negative short-loop feedback of prolactin. *Neuroendocrinology* 52: 389-392.
- Milligan, C. E., Cunningham, T. J., Levitt, P.** 1991. Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 314: 125-135.
- Minami, S., Kamegai, J., Sugihara, H., Suzuki, N., Wakabayashi, I.** 1998. Growth hormone inhibits its own secretion by acting on the hypothalamus through its receptors on neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus and somatostatin neurons in the periventricular nucleus. *Endocr. J.* 45: S19-26.
- Moga, M. M. & Saper, C. B.** 1994. Neuropeptide-immunoreactive neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 346: 137-150.
- Mondal, M. S., Date, Y., Yamaguchi, H., Toshinai, K., Tsuruta, T., Kangawa, K., Nakazato, M.** 2005. Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regul. Pept.* 126: 55-59.
- Morairty, S., RAINNIE, D., McCarley, R., Greene, R.** 2004. Disinhibition of ventrolateral preoptic area sleep-active neurons by adenosine: a new mechanism for sleep promotion. *Neuroscience* 123: 451-457.
- Morel, N. & Meunier, F. M.** 1981. Simultaneous release of acetylcholine and ATP from stimulated cholinergic synaptosomes. *J. Neurochem.* 36: 1766-1773.
- Moreton, R. B.** 1994. Optical methods for imaging ionic activities. *Scanning Microsc. Suppl.* 8: 371-390.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., Schwartz, M. W.** 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289-295.
- Mülhardt, C.** 2002. *Der Experimentator: Molekularbiologie Genomics*. Vol. 3. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Müller, A. R. & Gerstberger, R.** 1994. Ontogenesis of the angiotensin II (ANG II) receptor system in the duck brain. *Dev. Brain Res.* 18: 10-16.
- Muller, C. E.** 2002. P2-pyrimidinergic receptors and their ligands. *Curr. Pharm. Des.* 8: 2353-2369.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Muroya, S., Funahashi, H., Yamanaka, A., Kohno, D., Uramura, K., Nambu, T., Shibahara, M., Kuramochi, M., Takigawa, M., Yanagisawa, M., Sakurai, T., Shioda, S., Yada, T.** 2004. Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca^{2+} signaling in a reciprocal manner to leptin:

- orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 19: 1524-1534.
- Muroya, S., Yada, T., Shioda, S., Takigawa, M.** 1999. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci. Lett.* 264: 113-116.
- Murray, P. G. & Clayton, P. E.** 2013. Endocrine control of growth. *Am. J. Med. Genet. Part C. Semin. Med. Genet.* 163: 76-85.
- Mütze, J., Roth, J., Gerstberger, R., Hübschle, T.** 2007. Nuclear translocation of the transcription factor STAT5 in the rat brain after systemic leptin administration. *Neurosci. Lett.* 417: 286-291.
- Naik, D. V.** 1975. Immuno-electron microscopic localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the arcuate nuclei and median eminence of the rat. *Cell Tissue Res.* 157: 437-455.
- Naik, D. V.** 1976. Immuno-histochemical localization of LH-RH during different phases of estrus cycle of rat, with reference to the preoptic and arcuate neurons, and the ependymal cells. *Cell Tissue Res.* 173: 143-166.
- Nakatsuka, T. & Gu, J. G.** 2001. ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 21: 6522-6531.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., Matsukura, S.** 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198.
- Nasu-Tada, K., Koizumi, S., Tsuda, M., Kunifusa, E., Inoue, K.** 2006. Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X₄, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia* 53: 769-775.
- Neary, J. T., Rathbone, M. P., Cattabeni, F., Abbracchio, M. P., Burnstock, G.** 1996. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* 19: 13-18.
- Neill, J. D.** 1970. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87: 1192-1197.
- Neill, J. D.** 1974. Prolactin: its secretion and control. *Handbook of Physiology. Endocrinology. The Pituitary Gland and Its Neuroendocrine Control.* Am. Physiol. Soc. Washington, DC. 7: 469-488.
- Neill, J. D., Frawley, L. S., Plotsky, P. M., Peck, J. D., Leong, D.** 1982. Hypothalamic regulation of prolactin secretion. In: *Pituitary Hormones and Related Peptides* [Motta, M., Zanisi, M., Piva, F. eds]. Academic. New York. 223-241.
- Newman, E. A., Zahs, K. R.** 1997. Calcium waves in retinal glial cells. *Science* 275: 844-847.
- Nicholas, R. A., Watt, W. C., Lazarowski, E. R., Li, Q., Harden, K.** 1996. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol. Pharmacol.* 50: 224-229.
- Nicot, A., Bérod, A., Gully, D., Rowe, W., Quirion, R., de Kloet, E. R., Rostène, W.** 1994. Blockade of neurotensin binding in the rat hypothalamus and of the central action of neurotensin on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with non-peptide receptor antagonists. *Neuroendocrinology* 59: 572-578.
- Niiori-Onishi, A., Iwasaki, Y., Mutsuga, N., Oiso, Y., Inoue, K., Saito, H.** 1999. Molecular mechanisms of the negative effect of insulin-like growth factor-I on growth hormone gene expression in MtT/S somatotroph cells. *Endocrinology* 140: 344-349.
- Nishino, H.** 1993. Intracerebral grafting of catecholamine producing cells and reconstruction of disturbed brain function. *Neurosci. Res.* 16: 157-172.
- Nishizaki, T., Nagai, K., Nomura, T., Tada, H., Kanno, T., Tozaki, H., Li, X. X., Kondoh, T., Kodama, N., Takahashi, E., Sakai, N., Tanaka, K., Saito, N.** 2002. A new neuro-

- modulatory pathway with a glial contribution mediated via A(2a) adenosine receptors. *Glia* 39: 133-147.
- Nogueiras, R., Tschöp, M. H., Zigman, J. M.** 2008. Central nervous system regulation of energy metabolism; Ghrelin versus Leptin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1126: 14-19.
- Nörenberg, W. & Illes, P.** 2000. Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362: 324-339.
- Nörenberg, W., Schunk, J., Fischer, W., Sobottka, H., Riedel, T., Oliveira, J. F., Franke, H., Illes, P.** 2010. Electrophysiological classification of P2X7 receptors in rat cultured neocortical astroglia. *Br. J. Pharmacol.* 160: 1941-1952.
- Norris, J. G., Tang, L. P., Sparacio, S. M., Benveniste, E. N.** 1994. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 152: 841.
- Norsted, E., Gömüc, B., Meister, B.** 2008. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* 36: 107-121.
- North, R. A.** 1996. Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 474-483.
- North, R. A.** 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82: 1013-1067.
- Nunes, A. R., Chavez-Valdez, R., Ezell, T., Donnelly, D. F., Glover, J. C., Gauda, E. B.** 2012. Effect of development on $[Ca^{2+}]_i$ transients to ATP in petrosal ganglion neurons: a pharmacological approach using optical recording. *J. Appl. Physiol.* 112: 1393-1402.
- Núñez, L., Villalobos, C., Frawley, L. S.** 1997. Extracellular ATP as an autocrine/paracrine regulator of prolactin release. *Am. J. Physiol.* 272: E1117-E1123.
- O'Connor, N. & Silver, R. B.** 2007. Ratio Imaging: Practical considerations for measuring intracellular Ca^{2+} and pH in living cells. *Meth. Cell Biol.* 81: 415-433.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K., Kohsaka, S.** 2007. Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* 55: 604-616.
- Olah, M. E. & Stiles, G. L.** 2000. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol. Ther.* 85: 55-75.
- Oldfield, B. J., Hards, D. K., McKinley, M. J.** 1991. Projections from the subfornical organ to the supraoptic nucleus in the rat: ultrastructural identification of an interposed synapse in the median preoptic nucleus using a combination of neuronal tracers. *Brain Res.* 558: 13-19.
- Ondo, J. G., Walker, M. W., Wheeler, D. D.** 1989. Central actions of adenosine on pituitary secretion of prolactin, luteinizing hormone and thyrotropin. *Neuroendocrinology* 49: 654-658.
- Ongini, E. & Fredholm, B. B.** 1996. Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 364-372.
- Ormond, S. J., Barrera, N. P., Qureshi, O. S., Henderson, R. M., Edwardson, J. M., Murrell-Lagnado, R. D.** 2006. An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol. Pharmacol.* 69:1692-1700.
- Osterstock, G., Escobar, P., Mitutsova, V., Gouty-Colomer, L. A., Fontanaud, P., Molino, F., Fehrentz, J. A., Carmignac, D., Martinez, J., Guerineau, N. C., Robinson, I. C., Mollard, P., Méry, P. F.** 2010. Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. *PLoS One* 5: e9159.
- Ott, D., Murgott, J., Rafalzik, S., Wuchert, F., Schmalenbeck, B., Roth, J., Gerstberger, R.** 2010. Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Res.* 1363: 93-106.
- Ott, D., Wuchert, F., Murgott, J., Rummel, C., Gerstberger, R., Roth, J.** 2012. The viral mimetic polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) induces cellular responses in primary cultures from rat brain sites with an incomplete blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* 530: 64-68.

- Palkovits, M.** 1999. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front. Neuroendocrinology* 20: 270-295.
- Palkovits, M., Mezey, E., Záborszky, L., Feminger, A., Versteeg, D. H., Wijnen, H. J., de Jong, W., Fekete, M. I., Herman, J. P., Kanyicska, B.** 1980a. Adrenergic innervation of the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 18: 237-243.
- Palkovits, M., Záborszky, L., Feminger, A., Mezey, E., Fekete, M. I., Herman, J. P., Kanyicska, B., Szabó, D.** 1980b. Noradrenergic innervation of the rat hypothalamus: experimental biochemical and electron microscopic studies. *Brain Res.* 191: 161-171.
- Pan, C., Kumar, C., Bohl, S., Klingmueller, U., Mann, M.** 2009. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol. Cell. Proteom.* 8: 443-450.
- Pan, J. T., Tian, Y., Lookingland, K. J., Moore, K. E.** 1992. Neurotensin-induced activation of hypothalamic dopaminergic neurons is accompanied by a decrease in pituitary secretion of prolactin and α -melanocyte-stimulating hormone. *Life Sci.* 50: 2011-2017.
- Panenka, W., Jijon, H., Herx, L. M., Armstrong, J. N., Feighan, D., Wei, T., Yong, V. W., Ransohoff, R. M., MacVicar, B. A.** 2001. P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* 21: 7135-7142.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O., Verkhratsky, A.** 2003. P2X receptor-mediated excitatory synaptic currents in somatosensory cortex. *Mol. Cell. Neurosci.* 24: 842-849.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., North, R. A.** 2006. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452: 589-597.
- Papp, L., Balázs, T., Köfalvi, A., Erdélyi, F., Szabó, G., Vizi, E. S., Sperlágh, B.** 2004. P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310: 973-980.
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W., Lechleiter J. D.** 2008. Chemical calcium indicators. *Methods* 46: 143-151.
- Patel, Y. C.** 1999. Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrinol.* 20: 157-198.
- Paxinos, G., Watson, C.** 2004. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (5th ed.). Elsevier Academic Press. Oxford.
- Pearson, R. A., Dale, N., Llaudet, E., Mobbs, P.** 2005. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46: 731-744.
- Pelc, S. R.** 1947. Autoradiograph technique. *Nature* 160: 749.
- Perez-Medrano, A., Donnelly-Roberts, D. L., Honore, P., Hsieh, G. C., Namovic, M. T., Peddi, S., Shuai, Q., Wang, Y., Faltynek, C. R., Jarvis, M. F., Carroll, W. A., Péni-caud, L., Fioramonti, X., Lorsignol, A., Bénani, A., Leloup, C.** 2007. Brain glucose sensing. *Bull. Acad. Natl. Med.* 191: 923-931.
- Perkins, E. J., Bao, W., Guan, X., Ang, C. Y., Wolfinger, R. D., Chu, T. M., Meyer, S. A., Inouye, L. S.** 2009. Comparison of transcriptional responses in liver tissue and primary hepatocyte cell cultures after exposure to hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine. *BMC Bioinformatics* 7: 22.
- Perry, V. H. & Gordon, S.** 1988. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.* 11: 273-277.
- Perry, V. H., Hume, D. A., Gordon, S.** 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15: 313-326.
- Petruska, J. C., Mena, N., Nakatsuka, T., Cooper, B. Y., Johnson, R. D., Gu, J. G.** 2000. Discovery and biological evaluation of novel cyanoguanidine P2X(7) antagonists with analgesic activity in a rat model of neuropathic pain. *Neuroreport* 11: 3589-3592.
- Pfaffl, M. W.** 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum. Sonderausgabe PCR.* 10. 92-95.

- Podingbauer, A., Ekmekcioglu, C.** 2005. Regulation der Nahrungsaufnahme: Physiologische Mechanismen und klinische Relevanz. *J. Ernährungsmed.* 1: 22-29.
- Poggioli, R., Vergoni, A. V., Bertolini, A.** 1986. ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides* 7: 843-848.
- Price, C., Hoyda, T. D., Ferguson, A. V.** 2008. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist* 14: 182-194.
- Priel, A. & Silberberg, S. D.** 2004. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X₄ receptor channels. *J. Gen. Physiol.* 123: 281-293.
- Procko, E. & McColl, S. R.** 2005. Leukocytes on the move with phosphoinositide 3-kinase and its downstream effectors. *Bioessays* 27: 153-163.
- Pusztai, P., Sarman, B., Ruzicska, E., Toke, J., Racz, K., Somogyi, A., Tulayssay, Z.** 2008. Ghrelin: a new peptide regulating the neurohormonal system, energy homeostasis and glucose metabolism. *Diab. Metab. Res. Rev.* 24: 343-352.
- Qureshi, O. S., Paramasivam, A., Yu, J. C., Murrell-Lagnado, R. D.** 2007. Regulation of P2X₄ receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J. Cell Sci.* 120: 3838-3849.
- Ramamoorthy, P. & Whim, M. D.** 2008. Trafficking and fusion of neuropeptide Y-containing dense-core granules in astrocytes. *J. Neurosci.* 28: 13815-27.
- Ransohoff, R. M. & Cardona, A. E.** 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468: 253-262.
- Rassendren, F., Buell, G. N., Virginio, C., Collo, G., North, R. A., Surprenant, A.** 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X₇. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* 272: 5482-5486.
- Ralevic, V. & Burnstock, G.** 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Stehle, J. H., Rivkees, S. A.** 1991. Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol. Endocrinol.* 5: 1037-1048.
- Reshkin, S. J., Guerra, L., Bagorda, A., Debellis, L., Cardone, R., Li, A. H., Jacobson, K. A., Casavola, V.** 2000. Activation of A(3) adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in A(6) cells. *J. Membr. Biol.* 178: 103-113.
- Rettinger, J. & Schmalzing, G.** 2003. Activation and desensitization of the recombinant P2X₁ receptor at nanomolar ATP concentrations. *J. Gen. Physiol.* 121: 451-461.
- Ricardo, J. A. & Koh, E. T.** 1978. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res.* 153: 1-26.
- Richman, R. A., Weiss, J. P., Hochberg, Z., Florini, J. R.** 1981. Regulation of growth hormone release: evidence against negative feedback in rat pituitary cells. *Endocrinology* 108: 2287-2292.
- Riediger T.** 2012. The receptive function of hypothalamic and brainstem centres to hormonal and nutrient signals affecting energy balance. *Proc. Nutr. Soc.* 71: 463-477.
- Rikhy, R., Ramaswami, M., Krishnan, K. S.** 2003. A temperature-sensitive allele of *Drosophila* *sesB* reveals acute functions for the mitochondrial adenine nucleotide translocase in synaptic transmission and dynamin regulation. *Genetics* 165: 1243-1253.
- Robertson, S. J. & Edwards, F. A.** 1998. ATP and glutamate are released from separate neurones in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosine-mediated inhibition of release. *J. Physiol.* 508: 691-701.
- Robson, S. C., Sévigny, J., Zimmermann, H.** 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2: 409-430.
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., Guerra, M.** 2010. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private

- milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31: 757-776.
- Rogers, A. W.** 1961. A simple photometric device for the quantitation of silver grains in autoradiographs of tissue sections. *Exp. Cell Res.* 24: 228-239.
- Rodgers, R. J., Ishii, Y., Halford, J. C., Blundell, J. E.** 2002. Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 36: 303-325.
- Romero, C. J., Pine-Twaddell, E., Sima, D. I., Miller, R. S., He, L., Wondisford, F., Radovick, S.** 2012. Insulin-like growth factor 1 mediates negative feedback to somatotroph GH expression via POU1F1/CREB binding protein interactions. *Mol. Cell Biol.* 32: 4258-4269.
- Rostène, W. H. & Alexander, M. J.** 1997. Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 18: 115-173.
- Roth, J., Harre, E. M., Rummel, C., Gerstberger, R., Hübschle, T.** 2004. Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front. Biosci.* 9: 290-300.
- Roth, J., Rummel, C., Barth, S. W., Gerstberger, R., Hübschle, T.** 2009. Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Immunol. Allergy Clin.* 29: 229-245.
- Rubio, M. E., Soto, F.** 2001. Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J. Neurosci.* 21: 641-653.
- Rummel, C., Voss, T., Matsumura, K., Korte, S., Gerstberger, R., Roth, J., Hübschle, T.** 2005. Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *J. Comp. Neurol.* 491: 1-14.
- Sah, P., Faber, E. S., Lopez, D. A., Power, J.** 2003. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol. Rev.* 83: 803-834.
- Sakanaka, M., Magari, S., Inoue, N.** 1990. Somatostatin co-localizes with tyrosine hydroxylase in the nerve cells of discrete hypothalamic regions in rats. *Brain Res.* 516: 313-317.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sam, S. & Frohman, L. A.** 2008. Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 37: 1-22.
- Samson, W. K., Lumpkin, M. D., McCann, S. M.** 1986. Evidence for a physiological role for oxytocin in the control of prolactin. *Endocrinology* 119: 554-561.
- Santambien, P., Sdiqiu, S., Hubert, E., Girot, P., Roche, A. C., Monsigny, M., Boschetti, E.** 1995. In vitro toxicity assays for dye ligands used in affinity chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 664: 241-246.
- Saper, C. B., Loewy, A. D., Swanson, L. W., Cowan, W. M.** 1976. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res.* 117: 305-312.
- Saper, C. B., Swanson, L. W., Cowan, W. M.** 1979. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 183: 689-706.
- Sasaki, Y., M. Hoshi, C. Akazawa, Y. Nakamura, H. Tsuzuki, K. Inoue, Kohsaka, S.** 2003. Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia* 44: 242-250.
- Sato, M. & Frohman, L. A.** 1993. Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology* 133: 793-799.
- Sawchenko, P. E., Swanson, L. W., Joseph, S. A.** 1982. The distribution and cells of origin of ACTH(1-39)-stained varicosities in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Brain Res.* 232: 365-374.

- Scemes, E. & Giaume, C.** 2006. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* 54: 716-725.
- Schäfer, RT., Reiser, G.** 1997. Characterization of [³⁵S]-TPαS and [3H]-α,β-MeATP binding sites in rat brain cortical synaptosomes: regulation of ligand binding by divalent cations. *Brit. J. Pharmacol.* 121:913-922.
- Schütz, H., Gray, D. A., Gerstberger, R.** 1992. Modulation of kidney function in conscious Peking ducks by atrial natriuretic factor. *Endocrinology* 130: 678-684.
- Schwander, J. C., Hauri, C., Zapf, J., Froesch, E. R.** 1983. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 113: 297-305.
- Schwartz, G. J.** 2006. Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361: 1275-1280.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., Baskin, D. G.** 2000. Central nervous system control and food intake. *Nature* 404: 661-671.
- Schwiebert, E. M.** 1999. ABC transporter-facilitated ATP conductive transport. *Am. J. Physiol.* 276: C1-C8.
- Sclafani, A., Ackroff, K., Schwartz, G. J.** 2003. Selective effects of vagal deafferentiation and celiac-superior mesenteric ganglionectomy on the reinforcing and satiating action of intestinal nutrients. *Physiol. Behav.* 78: 285-289.
- Seidel, B., Bigl, M., Franke, H., Kittner, H., Kiess, W., Illes, P., Krugel, U.** 2006. Expression of purinergic receptors in the hypothalamus of the rat is modified by reduced food availability. *Brain Res.* 1089: 143-152.
- Sergeeva, O. A., Klyuch, B. P., Fleischer, W., Eriksson, K. S., Korotkova, T. M., Siebler, M., Haas, H. L.** 2006. P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 24: 1413-4126.
- Shibuya, I., Tanaka, K., Hattori, Y., Uezono, Y., Harayama, N., Noguchi, J., Ueta, Y., Izumi, F., Yamashita, H.** 1999. Evidence that multiple P2X purinoceptors are functionally expressed in rat supraoptic neurones. *J. Physiol.* 514: 351-367.
- Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Tsuda, M., Ohsawa, K., Kohsaka, S., Inoue, K.** 2001. Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5. *J. Neurochem.* 78: 1339-1349.
- Shimomura, O., Johnson F. H., Saiga, Y.** 1963. Microdetermination of calcium by aequorin luminescence. *Science* 140: 1339-1340.
- Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., Hayashi, T., Inoue, G., Hosoda, K., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K.** 2001. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50: 227-232.
- Shukla, V., Zimmermann, H., Wang, L., Kettenmann, H., Raab, S., Hammer, K., Sévigny, J., Robson, S. C., Braun, N.** 2005. Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 80: 600-610.
- Sim, L. J. & Joseph, S. A.** 1991. Arcuate nucleus projections to brainstem regions which modulate nociception. *J. Chem. Neuroanat.* 4: 97-109.
- Simerly, R. B. & Swanson, L. W.** 1988. Projections of the medial preoptic nucleus: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 270: 209-242.
- Simon, E.** 2000. Interface properties of circumventricular organs in salt and fluid balance. *News Physiol. Sci.* 15: 61-67.
- Simon, E., Pierau, F. K., Taylor, D. C.** 1986. Central and peripheral thermal control of effectors in homeothermic temperature regulation. *Physiol. Rev.* 66: 235-300.

- Simon, J., Filippov, A. K., Goransson, S., Wong, Y. H., Frelin, C., Michel, A. D., Brown, D. A., Barnard, E. A.** 2002. Characterization and channel coupling of the P2Y₁₂ nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277: 31390-31400.
- Simon, J., Kidd, E. J., Smith, F. M., Chessell, I. P., Murrell-Lagnado, R., Humphrey, P. P., Barnard, E. A.** 1997. Localization and functional expression of splice variants of the P2X₂ receptor. *Mol. Pharmacol.* 52: 237-248.
- Simon, J., Webb, T. E., King, B. F., Burnstock, G., Barnard, E. A.** 1994. Characterisation of a recombinant P2Y purinoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* 291: 281-289.
- Sindelar, D. K., Havel, P. J., Seeley, R. J., Wilkinson, C. W., Woods, S. C., Schwartz, M. W.** 1999. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes* 48: 1275-1280.
- Skaper, S. D., Debetto, P., Giusti, P.** 2010. The P2X₇ purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J.* 24: 337-345.
- Smith, R. G.** 2005. Development of Growth Hormone Secretagogues. *Endocr. Rev.* 26: 346-360.
- Smith, R. G., Cheng, K., Schoen, W. R., Pong, S. S., Hickey, G., Jacks, T., Butler, B., Chan, W. W., Chung, L. Y., Judith, F., Taylor, J., Wyvratt, M. J., Fisher, M. H.** 1993. A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science* 260: 1640-1643.
- Smith, R. G., Pong, S. S., Hickey, G., Jacks, T., Cheng, K., Leonard, R., Cohen, C. J., Arena, J. P., Chang, C. H., Drisko, J., Wyvratt, M., Fisher, M., Nargund, R., Patchett, A.** 1996. Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. *Rec. Prog. Horm. Res.* 51: 261-86.
- Smith-Gill, S. J., Wilson, A. C., Potter, M., Prager, E. M., Feldmann, R. J., Mainhart, C. R.** 1982. Mapping the antigenic epitope for a monoclonal antibody against lysozyme. *J. Immunol.* 128: 314-322.
- Song, X., Guo, W., Yu, Q., Liu, X., Xiang, Z., He, C., Burnstock, G.** 2011. Regional expression of P2Y(4) receptors in the rat central nervous system. *Purinergic Signal.* 7: 469-488.
- Song, Z. & Sladek, C. D.** 2006. Site of ATP and phenylephrine synergistic stimulation of vaso-pressin release from the hypothalamo-neurohypophyseal system. *J. Neuroendocrinol.* 18: 266-272.
- Song, Z., Vijayaraghavan, S., Sladek, C. D.** 2006a. ATP increases intracellular calcium in supraoptic neurons by activation of both P2X and P2Y purinergic receptors. *Am. J. Physiol.* 292: R423-R431.
- Sorimachi, M., Ishibashi, H., Moritoyo, T., Akaike, N.** 2001. Excitatory effect of ATP on acutely dissociated ventromedial hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 105: 393-401.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., Karschin, C., Stühmer, W.** 1996. Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 456-460.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., Stühmer, W.** 1997. Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J. Membr. Biol.* 160: 91-100.
- Spelta, V., Jiang, L. H., Surprenant, A., North, R. A.** 2002. Kinetics of antagonist actions at rat P2X_{2/3} heteromeric receptors. *Br. J. Pharmacol.* 135: 1524-1530.
- Sperlágh, B., Heinrich, A., Csölle, C.** 2007. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release - an update. *Purinergic Signal.* 3: 269-284.
- Sperlágh, B., Sershen, H., Lajtha, A., Vizi, E. S.** 1998. Co-release of endogenous ATP and [³H]noradrenaline from rat hypothalamic slices: origin and modulation by α₂-adrenoceptors. *Neuroscience* 82: 511-520.
- Sperlágh, B., Szabo, G., Erdelyi, F., Baranyi, M., Vizi, E. S.** 2003. Homo- and heteroexchange of adenine nucleotides and nucleosides in rat hippocampal slices by the nucleoside transport system. *Br. J. Pharmacol.* 139: 623-633.

- Sperlágh, B. & Vizi, S. E.** 1996. Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Seminars in Neuroscience* 8: 175-186.
- Sperlágh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K., Illes, P.** 2006. P2X7 receptors in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 78: 327-346.
- Stanley, B. G., Chin, A. S., Leibowitz, S. F.** 1985. Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Res. Bull.* 14: 521-524.
- Steiner, A. A., Antunes-Rodrigues, J., McCann, S. M., Branco, L. G.** 2002. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. *Am. J. Physiol.* 282: R584-R593.
- Stephan, F. K., Zucker, I.** 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 1583-1586.
- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., Fields, R. D.** 2002. Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 36: 855-868.
- Stewart, S. F. & Pugsley, T. A.** 1985. Increase of rat serum prolactin by adenosine analogs and their blockade by the methylxanthine aminophylline. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 331: 140-145.
- Stjarne, L.** 2001. Novel dual 'small' vesicle model of ATP- and noradrenaline-mediated sympathetic neuromuscular transmission. *Auton. Neurosci.* 87: 16-36.
- Stojilkovic, S. S.** 2009. Purinergic regulation of the hypothalamo-pituitary functions. *Trends Endocrinol. Metab.* 20: 460-468.
- Stojilkovic, S. S., He, M. L., Koshimizu, T. A., Balik, A., Zemkova, H.** 2010. Signaling by purinergic receptors and channels in the pituitary gland. *Mol. Cell Endocrinol.* 314: 184-191.
- Stojilkovic, S. S. & Koshimizu, T.** 2001. Signaling by extracellular nucleotides in anterior pituitary cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 12: 218-225.
- Stojilkovic, S. S., Tomic, M., Van Goor, F., Koshimizu, T.** 2000. Expression of purinergic P2X2 receptor-channels and their role in calcium signaling in pituitary cells. *Biochem. Cell Biol.* 78: 393-404.
- Stokes, L. & Surprenant, A.** 2009. Dynamic regulation of the P2X4 receptor in alveolar macrophages by phagocytosis and classical activation. *Eur. J. Immunol.* 39: 986-995.
- Stoll, L. & Müller, W. E.** 1991. In vitro down-regulation predicts agonist efficacy at central muscarinic cholinergic receptors. *Biochem. Pharmacol.* 41: 1963-1966.
- Stoop, R., Surprenant, A., North, R. A.** 1997. Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J. Neurophysiol.* 78: 1837-1840.
- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C., Charles, A. C.** 2002. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277: 10482-10488.
- Straus, D. S. & Takemoto, C. D.** 1990. Effect of fasting on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver. *Mol. Endocrinol.* 4: 91-100.
- Suadicani, S. O., Brosnan, C. F., Scemes, E.** 2006. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J. Neurosci.* 26: 1378-1385.
- Sun, S. H., Lin, L. B., Hung, A. C., Kuo, J. S.** 1999. ATP-stimulated Ca²⁺ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-7, astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X₇ receptors. *J. Neurochem.* 73: 334-343.
- Surprenant, A.** 1996. Functional properties of native and cloned P2X receptors. In: *P2 Purinoceptors: Localization, Function and Transduction Mechanisms*, Ciba Foundation Symposium. Vol. 198. John Wiley & Sons. Ltd. Chichester. 208-222.

- Surprenant, A. & North, R. A.** 2009. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 71: 333-359.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., Buell, G.** 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science* 272: 735-738.
- Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K., Nakata, Y.** 2004. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* 24: 1-7.
- Swanson, L. W.** 1987. The hypothalamus. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Integrated Systems of the CNS.* [Hökfelt, T., Björklund, A., Swanson, L. W. eds]. Vol. 5. Part I. Elsevier. Amsterdam. 1-124.
- Swanson, L. W. & Kuypers, H. G.** 1980. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J. Comp. Neurol.* 194: 555-570.
- Takaya, K., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Iwakura, H., Yoshimoto, A., Harada, M., Mori, K., Komatsu, Y., Usui, T., Shimatsu, A., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K.** 2000. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 4908-4911.
- Tan, H. Y., Huang, L., Simmons, D., Veldhuis, J. D., Steyn, F. J., Chen, C.** 2013. Hypothalamic distribution of somatostatin (Sst) mRNA expressing neurons relative to pubertal and adult changes in pulsatile GH secretion in mice. *J. Neuroendocrinol.* doi: 10.1111/jne.12078. [Epub ahead of print].
- Tannenbaum, G. S., Epelbaum, J., Bowers, C. Y.** 2003. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 144: 967-974.
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wool, E. A., Monroe C. A., Tepper, R. I.** 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
- Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V.** 1982. Neuropeptide Y, a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296: 659-660.
- Tena-Sempere, M., Pinilla, L., González, L. C., Aguilar, E.** 2000. Regulation of growth hormone (GH) secretion by different glutamate receptor subtypes in the rat. *Amino Acids* 18: 1-16.
- Terasawa, E., Keen, K. L., Grendell, R. L., Golos, T. G.** 2005. Possible role of 5'-adenosine triphosphate in synchronization of Ca²⁺ oscillations in primate luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Mol. Endocrinol.* 19: 2736-2747.
- Terkel, J., Blake, C. A., Sawyer, C. H.** 1972. Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 91: 49-53.
- Thews, G. & Vaupel, P.** 2001. Ernährung. In: *Vegetative Physiologie.* Vol 4. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin. 324-338.
- Thomas, A. R. & Delaville, F.** 1991. The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. In: *Cellular Calcium, a Practical Approach* [Cobbold, P. H. ed]. IRL Press at Oxford University Press. Oxford. 1-54.
- Thomas, S., Virginio, C., North, R. A., Surprenant, A.** 1998. The antagonist trinitrophenyl-ATP reveals co-existence of distinct P2X receptor channels in rat nodose neurones. *J. Physiol.* 509: 411-417.
- Thompson, S. A.** 1982. Localization of immunoreactive prolactin in ependyma and circumventricular organs of rat brain. *Cell Tissue Res.* 225: 79-93.
- Tomić, M., Jobin, R. M., Vergara, L. A., Stojilkovic, S. S.** 1996. Expression of purinergic receptor channels and their role in calcium signaling and hormone release in pituitary

- gonadotrophs. Integration of P2 channels in plasma membrane- and endoplasmic reticulum-derived calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 271: 21200-21208.
- Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M. S., Shimbara, T., Guan, J. L., Wang, Q. P., Funahashi, H., Sakurai, T., Shioda, S., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M.** 2003. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144: 1506-1512.
- Trang, T., Beggs, S., Wan, X., Salter, M. W.** 2009. P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J. Neurosci.* 29: 3518-3528.
- Troade, J. D., Thirion, S., Nicaise, G., Lemos, J. R., Dayanithi, G.** 1998. ATP-evoked increases in $[Ca^{2+}]_i$ and peptide release from rat isolated neurohypophysial terminals via a P2X2 purinoceptor. *J. Physiol.* 511: 89-103.
- Trueta, C. & De-Miguel, F. F.** 2012. Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. *Front. Physiol.* 3: 319.
- Tsaneva-Atanasova, K., Sherman, A., van Goor, F., Stojilkovic, S. S.** 2007. Mechanism of spontaneous and receptor-controlled electrical activity in pituitary somatotrophs: Experiments and theory. *J. Neurophysiol.* 98: 131-144.
- Tsien, R. Y.** 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19: 2396-2404.
- Tsien, R. Y.** 1989. Fluorescent probes of cell signaling. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 227-253.
- Tsien, R. Y. & Poenie, M.** 1986. Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling. *Trends Biochem. Sci.* 11: 450-455.
- Tsien, R. Y., T. J. Rink, Poenie, M.** 1985. Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6: 145-157.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W., Inoue, K.** 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424: 778-783.
- Tucker, H. A.** 2000. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J. Dairy Sci.* 83: 874-884.
- Ulmann, L., Hatcher, J. P., Hughes, J. P., Chaumont, S., Green, P. J., Conquet, F., Buell, G. N., Reeve, A. J., Chessell, I. P., Rassendren, F.** 2008. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J. Neurosci.* 28: 11263-11268.
- Valassi, E., Scacchi, M., Cavagnini, F.** 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18: 158-168.
- Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A., Buell, G.** 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-519.
- Valera, S., Talabot, F., Evans, R. J., Gos, A., Antonarakis, S. E., Morris, M. A., Buell, G. N.** 1995. Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Receptors Channels* 3: 283-289.
- Vallon, V., Mühlbauer, B., Osswald, H.** 2006. Adenosine and kidney function. *Physiol. Rev.* 86: 901-940.
- van Calker, D., Muller, M., Hamprecht, B.** 1978. Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* 276: 839-841.
- van Calker, D., Muller, M., Hamprecht, B.** 1979. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* 33: 999-1005.
- van Haastert, P. J. & Devreotes, P. N.** 2004. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 626-634.

- Vavra, V., Bhattacharya, A., Zemkova, H.** 2011. Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices. *Neuroscience* 188: 1-12.
- Veldhuis, J. D. & Bowers, C. Y.** 2003a. Human GH pulsatility: an ensemble property regulated by age and gender. *J. Endocrinol. Invest.* 26: 799-813.
- Veldhuis, J. D. & Bowers, C. Y.** 2003b. Sex-steroid modulation of growth hormone (GH) secretory control: three-peptide ensemble regulation under dual feedback restraint by GH and IGF-I. *Endocrine* 22: 25-40.
- Veldhuis, J. D. & Bowers, C. Y.** 2003c. Three-peptide control of pulsatile and entropic feedback-sensitive modes of growth hormone secretion: modulation by estrogen and aromatizable androgen. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 16: S587-605.
- Verderio, C. & Matteoli, M.** 2001. ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J. Immunol.* 166: 6383-6391.
- Verkhatsky, A., Krishtal O. A., Burnstock, G.** 2009. Purinoceptors on neuroglia. *Mol. Neurobiol.* 39: 190-208.
- Villalobos, C., Alonso-Torre, S. R., Núñez, L., García-Sancho, J.** 1997. Functional ATP receptors in rat anterior pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 273: C1963-C1971.
- Vincent, S. R., McIntosh, C. H., Buchan, A. M., Brown, J. C.** 1985. Central somatostatin systems revealed with monoclonal antibodies. *J. Comp. Neurol.* 238: 169-186.
- Virginio, C., Robertson, G., Surprenant, A., North, R. A.** 1998. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Mol. Pharmacol.* 53: 969-973.
- von Kügelgen, I.** 2006. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* 110: 415-432.
- von Kügelgen, I. & Harden, T. K.** 2011. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv. Pharmacol.* 61: 373-415.
- Vöhringer, C., Schäfer, R., Reiser, G.** 2000. A chimeric rat brain P2Y₁ receptor tagged with green-fluorescent protein: High-affinity ligand recognition of adenosine diphosphates and triphosphates and selectivity identical to that of the wild-type receptor. *Biochem. Pharmacol.* 59: 791-800.
- Vorobjev, V. S., Sharonova, I. N., Sergeeva, O. A., Haas, H. L.** 2003. Modulation of ATP-induced currents by zinc in acutely isolated hypothalamic neurons of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 139: 919-926.
- Vulchanova, L., Riedl, M. S., Shuster, S. J., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A., Elde, R.** 1997. Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* 36: 1229-1242.
- Vulchanova, L., Arvidsson, U., Riedl, M., Wang, J., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A., Elde, R.** 1996. Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 8063-8067.
- Vulchanova, L., Riedl, M. S., Shuster, S. J., Stone, L. S., Hargreaves, K. M., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A., Elde, R.** 1998. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur. J. Neurosci.* 10: 3470-3478.
- Wakamori, M. & Sorimachi, M.** 2004. Properties of native P2X receptors in large multipolar neurons dissociated from rat hypothalamic arcuate nucleus. *Brain Res.* 1005: 51-59.
- Walsh, R. J., Slaby, F. J., Posner, B. I.** 1987. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120: 1846-1850.
- Wang, C. Z., Namba, N., Gono, T., Inagaki, N., Seino, S.** 1996. Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 196-202.
- Wang, H. L. & Wu, T.** 1996. G $\alpha_{q/11}$ mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Mol. Brain Res.* 36: 29-36.

- Wang, T. F. & Guidotti, G.** 1998. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 790: 318-322.
- Wang, T. F., Rosenberg, P. A., Guidotti, G.** 1997. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol. Brain Res.* 47: 295-302.
- Wehrenberg, W. B. & Giustina, A.** 2000. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. *Neuroendocrinol. Physiol. Med.* 181-195.
- White, P. J., Webb, T. E., Boarder, M. R.** 2003. Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y₁₁ receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Mol. Pharmacol.* 63: 1356-1363.
- Wiegand, S. J. & Price, J. L.** 1980. Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. *J. Comp. Neurol.* 192: 111-119.
- Wildman, S. S., Unwin, R. J., King, B. F.** 2003. Extended pharmacological profiles of rat P2Y₂ and rat P2Y₄ receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *Br. J. Pharmacol.* 140: 1177-1186.
- Williams, M. & Jarvis, M. F.** 2000. Purinergic and pyrimidinergetic receptors as potential drug targets. *Biochem. Pharmacol.* 59: 1173-1185.
- Wittmann, G., Füzesi, T., Singru, P. S., Liposits, Z., Lechan, R. M., Fekete, C.** 2009. Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Comp. Neurol.* 515: 313-330.
- Wolf, C., Rosefort, C., Fallah, G., Kassack, M. U., Hamacher, A., Bodnar, M., Wang, H., Illes, P., Kless, A., Bahrenberg, G., Schmalzing, G., Hausmann, R.** 2011. Molecular determinants of potent P2X₂ antagonism identified by functional analysis, mutagenesis, and homology docking. *Mol. Pharmacol.* 79: 649-661.
- Wollmann, G., Acuna-Goycolea, C., van den Pol, A. N.** 2005. Direct excitation of hypocretin/orexin cells by extracellular ATP at P2X receptors. *J. Neurophysiol.* 94: 2195-2206.
- Woods, S. C. & D'Alessio, D. A.** 2009. Central control of body weight and appetite. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: S37-50.
- Wu, D., Miyamoto, O., Shibuya, S., Okada, M., Igawa, H., Janjua, N. A., Norimatsu, H., Itano, T.** 2005. Different expression of macrophages and microglia in rat spinal cord contusion injury model at morphological and regional levels. *Acta Med. Okayama* 59: 121-127.
- Wuchert, F.** 2008. Die Bedeutung der Area postrema als zentralnervöser Sensor für inflammatorische Signale. Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen. VVB Laufersweiler Verlag. Giessen.
- Wuchert, F., Ott, D., Murgott, J., Rafalzik, S., Hitzel, N., Roth, J., Gerstberger, R.** 2008. Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J. Neuroimmunol.* 204: 66-74.
- Wuchert, F., Ott, D., Rafalzik, S., Roth, J., Gerstberger, R.** 2009. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema. *J. Neuroimmunol.* 206: 44-51.
- Xiang, Z. & Burnstock, G.** 2005a. Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia.* 52: 119-126.
- Xiang, Z. & Burnstock, G.** 2005b. Changes in expression of P2X purinoceptors in rat cerebellum during postnatal development. *Dev. Brain Res.* 156: 147-157.
- Xiang, Z., Bo, X., Burnstock, G.** 1998a. Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci. Lett.* 256: 105-108.
- Xiang, Z., Bo, X., Oglesby, I., Ford, A., Burnstock, G.** 1998b. Localization of ATP-gated P2X₂ receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 813: 390-397.
- Xiang, Z., He, C., Burnstock, G.** 2006. P2X₅ receptors are expressed on neurons containing arginine vasopressin and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1099: 56-63.

- Xiang, Z., Xiong, Y., Yan, N., Li, X., Mao, Y., Ni, X., He, C., LaMotte, R. H., Burnstock, G., Sun, J.** 2008. Functional up-regulation of P2X3 receptors in the chronically compressed dorsal root ganglion. *Pain* 140: 23-34.
- Yaar, R., M. R. Jones, J. F. Chen, Ravid, K.** 2005. Animal models for the study of adenosine receptor function. *J. Cell Physiol.* 202: 9-20.
- Yamamura, H. I. & Hulme, R. L.** 1992. Receptor-ligand Interactions: a Practical Approach. Oxford University Press. New York.
- Yan, Z., Li, S., Liang, Z., Tomić, M., Stojilkovic, S. S.** 2008. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J. Gen. Physiol.* 132: 563-573.
- Yao, S. T., Gourine, A. V., Spyer, K. M., Barden, J. A., Lawrence, A. J.** 2003. Localisation of P2X2 receptor subunit immunoreactivity on nitric oxide synthase expressing neurones in the brain stem and hypothalamus of the rat: a fluorescence immunohistochemical study. *Neuroscience* 121: 411-419.
- Yu, W. H., Kimura, M., Walczewska, A., Porter, J. C., McCann, S. M.** 1998. Adenosine acts by A1 receptors to stimulate release of prolactin from anterior-pituitaries in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 7795-7798.
- Yuan, Z. F. & Pan, J. T.** 1996. Stimulatory effect of central oxytocin on tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity and inhibition on prolactin secretion: neurochemical and electrophysiological studies. *Endocrinology* 137: 4120-4125.
- Zaborszky, L. & Makara, G. B.** 1979. Intrahypothalamic connections: an electron microscopic study in the rat. *Exp Brain Res.* 34: 201-215.
- Zemkova, H., Balik, A., Jiang, Y., Kretschmannova, K., Stojilkovic, S. S.** 2006. Roles of purinergic P2X receptors as pacemaking channels and modulators of calcium-mobilizing pathway in pituitary gonadotrophs. *Mol. Endocrinol.* 20: 1423-1436.
- Zemkova, H., He, M. L., Koshimizu, T. A., Stojilkovic, S. S.** 2004. Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors. *J. Neurosci.* 24: 6968-6978.
- Zemkova, H., Kucka, M., Li, S., Gonzalez-Iglesias, A. E., Tomic, M., Stojilkovic, S. S.** 2010. Characterization of purinergic P2X4 receptor channels expressed in anterior pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 298: E644-E651.
- Zheng, H., Bailey, A., Jiang, M. H., Honda, K., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Van der Ploeg, L. H., Schaeffer, J. M., Leng, G., Smith, R. G.** 1997. Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to growth hormone-negative feedback on arcuate neurons. *Mol. Endocrinol.* 11: 1709-1717.
- Zheng, H., Patterson, L. M., Phifer, C. B., Berthoud, H. R.** 2005. Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *Am. J. Physiol.* 289: R247-R258.
- Zhu, Y. & Kimelberg, H. K.** 2004. Cellular expression of P2Y and beta-AR receptor mRNAs and proteins in freshly isolated astrocytes and tissue sections from the CA1 region of P8-12 rat hippocampus. *Dev. Brain Res.* 148: 77-87.
- Zimmermann, H.** 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49: 589-618.
- Zimmermann, H.** 2001. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Develop. Res.* 52: 44-56.
- Zimmermann, H.** 2006. Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found. Symp.* 276: 113-128.
- Zlokovic, B. V., Jovanovic, S., Miao, W., Samara, S., Verma, S., Farrell, C. L.** 2000. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology* 141: 1434-1441.
- Zsarnovszky, A., Bartha, T., Frenyo, L. V., Diano, S.** 2009. NTPDases in the neuroendocrine hypothalamus: possible energy regulators of the positive gonadotrophin feedback. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7: 63.